



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**LA HOLOCARBOXILASA SINTETASA SE ASOCIA A LA
CROMATINA DURANTE EVENTOS DE REPRESIÓN
TRANSCRIPCIONAL EN EMBRIONES DE *Drosophila
melanogaster*.**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

BIOL. SANDRA RAQUEL REYES CARMONA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**Dr. Alfonso León Del Río. Instituto de Investigaciones Biomédicas.
Dra. Carmen Gómez Eichelmann. Instituto de Investigaciones Biomédicas.
Dra. Alicia González Manjarrez. Instituto de Fisiología Celular**

MÉXICO, D.F.

ENERO 2013



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.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PDCB/grad/021/Jur/2011

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 278ª del 06 de abril del 2011, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de **SANDRA RAQUEL REYES CARMONA**, con número de cuenta **506011962**, con la tesis titulada "**LA HOLOCARBOXILASA SINTETASA SE ASOCIA A LA CROMATINA DURANTE EVENTOS DE REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL EN EMBRIONES DE *Drosophila melanogaster***", dirigida por el Dr. Alfonso León del Río.

Presidente:	Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar
Vocal:	Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Vocal:	Dr. Ernesto Maldonado Olvera
Vocal:	Dr. Félix Recillas Targa
Secretario:	Dr. Alfonso León del Río

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Ciudad Universitaria a 07 de abril del 2011



DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ
RESPONSABLE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS



DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA

c.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM
Tutor: Dr. Alfonso León del Río
Coordinación de PDCB

RCC/AGC/aap

Teléfono 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdcb.unam.mx> E-mail: pdcb@servidor.unam.mx

El trabajo de investigación de la presente tesis se desarrolló bajo la asesoría del Dr. Alfonso León Del Río, en el Laboratorio B-046 del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en la Universidad Nacional Autónoma de México. Este proyecto de investigación fue parcialmente financiado por el donativo *127606* del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y por el donativo *IN226609* del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT).

AGRADECIMIENTOS

A mi casa de estos últimos años, la Universidad Nacional Autónoma de México, por poner a mi alcance todo lo necesario para lograr este objetivo con la mejor calidad, a la gente que la constituye y que lleva tatuado en el corazón su escudo, en pro de mantenerla siendo día a día la mejor.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado.

Al posgrado en Ciencias Biomédicas, por todas las facilidades que me otorgaron durante estos años.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, por albergarme este tiempo, por otorgarme un lugar donde manejar la ciencia con mis propias manos, por los seminarios, las charlas y las clases que enriquecieron mi formación. A toda la gente que al disfrutar de su trabajo nos aliviana la vida como estudiantes.

A mi tutor el Dr. Alfonso León-Del-Río, por creer en mí y permitirme formar parte de su equipo de trabajo. Por mostrarme el fascinante mundo de la biotina, por su disposición y su guía. Gracias también por esos momentos de plática que terminaron en risas ininidad de veces.

A de los miembros de mi comité tutorial: Dra. Carmen Gómez Eichelmann y Dra. Alicia González Manjarréz. Su apoyo y tutoría resultaron particularmente importante para mí en cada sesión que compartimos juntos.

A los investigadores del Instituto de Biotecnología de la UNAM: Dr. Mario Zurita, Dr. Javier Aguilar Flores, Dra. Viviana Valadéz Graham y la Dra. Zoraya Palomera Sánchez por su apoyo y consejo científico. Así mismo, mi proyecto fue beneficiado con el apoyo técnico de M. en C. Andrés Saralegui, responsable de la Unidad de Microscopía Confocal.

A los miembros del jurado; Dra. Leticia Rocha Zavaleta, Dr. Juan Riesgo Escobar, Dr. Ernesto Maldonado y Dr. Félix Recillas por cada comentario y sugerencia que sirvieron para enriquecer mi trabajo de tesis. Gracias por su tiempo y dedicación.

En el Instituto de Investigaciones Biomédicas, conté con la asesoría y consejo del Dr. Alfonso González Noriega así como de la asesoría técnica de la Bióloga Colette Michalak. A los dos infinitas gracias por su tiempo, sus consejos y su confianza para trabajar en su laboratorio cuando las circunstancias lo ameritaban.

Quiero agradecer en particular al Biólogo Rafael Cervantes Roldán su apoyo técnico y metodológico, así como su labor administrativa para el abastecimiento de reactivos y materiales utilizados en este proyecto. Además por ser un amigo con plena disposición a escuchar y apoyar sin límites.

A mis compañeros de laboratorio: Itzel, Vanesa, Cinthya, Zyanya, Iván, Anylú, Sofia, Alberto y Tonatiuh, por todos aquellos días que compartimos un mismo espacio sin importar fecha, hora, día, clima, estado de ánimo o de salud, todo con el simple propósito de aprender y dejar huella en este fantástico mundo de la ciencia. De todos ustedes me quedo con gratos recuerdos y sin duda grandes enseñanzas también.

A mis amigos que conformaron mi familia en México; Anahí, Christopher, Ury, Bere, Sofia, Anylú, Rafael, Alberto, Laura y Tonatiuh, no solo por las risas que compartimos juntos sin fin de veces, sino también por ser mi apoyo y mi mano derecha en muchas ocasiones a lo largo de estos años, los cuales sin duda consolidaron nuestros lazos para los años venideros.

A mis compadres, Oscar y Arturo, por sus consejos y buena vibra para poder alcanzar este objetivo.

A los integrantes del laboratorio del Dr. Mario Zurita por su cálida hospitalidad durante mi estancia. Especialmente a Viviana por su apoyo y gratos consejos y a Javier por su buena vibra y por compartirme tus secretos al trabajar con *Drosophila*.

A Zoraya, la persona que Dios puso en mi camino para mostrarme que los ángeles existen. Gracias comadre!

A mis adorables abuelos maternos y paternos. Ustedes constituyen los pilares más grandes de mí existir, admiro y envidio sus 337 años de vida traducidos en experiencia. Su amor, dedicación, tiempo y enseñanzas están impresos en mi vida cotidiana.

A mi familia, los Reyes Leyva y los Carmona Espíndola, porque cuando se trata de echar montón no hay familia alguna que los iguale, todas sus acciones por pequeñas que parezcan están impregnadas de entrega hacia los suyos, lo cual sin duda se ve reflejada al paso de los años desde mi infancia hasta hoy.

A mi tío Miguel, por ayudarme a descubrir mis propias alas, por impulsarme a volar a pesar del miedo y porque aún en la distancia siempre permaneces a mi lado.

A mi tío Julio y a mi tía Vero, por haber compartido conmigo mis primeros pasos en la ciencia, por sus consejos y disposición a ayudar en todo momento.

A mis suegros por su ayuda y apoyo de cada día.

A mi papá, porque aún estando lejos siempre has sido parte de mí, me has mostrado un mundo en el cual con plena libertad me has permitido adueñarme de algunas cosas y de muchas otras solo dejarlas pasar ayudándome con ello a crecer y crear.

A mis hermanos Israel e Isaac, por ser mis primeros compañeros de viaje, por todos los lazos invisibles e irrompibles que resultaron de los buenos y malos momentos con los que la vida nos ha enfrentado, sin duda son parte de mí.

A mi mamá, por todas tus horas de trabajo, de cansancio y de entrega incondicional, por tus oraciones de cada día y por hacernos sentir que la distancia no va más allá que a la vuelta de la esquina, porque cada que lo necesitamos estuviste ilimitadamente al pie del cañón, con tu notable y característico toque de amor. Mamá sin tu apoyo nada podría darse por concluido con éxito. Te admiro, respeto y amo.

A Claudio, por todas esas veces que nos has tendido la mano en caminos hostiles, por estar al pendiente cada día de nuestro bienestar y por mostrarnos el significado de compartir ilimitadamente. Gracias por toda tu disposición!

DEDICATORIAS

Con mi profundo agradecimiento y todo mi amor dedico este logro a los que constituyen la piedra angular de mi vida: mi hermosa familia!

Danna y Valeria, ustedes representan la muestra de amor más grande que Dios me ha dado, su presencia en mi vida es el motor de impulso de cada día!

Danna, Gracias por alimentarme con tu presencia en mi ser desde el inicio de este trabajo, y con tu amor, sonrisas, travesuras y tu hermosa primera infancia a lo largo de nuestra gran aventura en México.

Valeria, eres la parte que nos faltaba para completar este hermoso rompecabezas llamado familia. Tu alegría y travesuras puso de cabeza nuestro mundo dándole los matices que le hacían falta.

Jonathan, Gracias por poner a mi disposición cada día, las piezas fundamentales para lograr ésta meta. Gracias por tu tiempo inacabable, tu entrega ilimitada, tu inagotable dedicación, por tu infinito amor y silenciosa complicidad en buenos y malos momentos. Tú constituyes la parte complementaria perfecta que le hacía falta a mi vida.

INDICE

Prefacio	- 1 -
La vitamina biotina como un regulador del metabolismo y expresión genética.	- 4 -
1. Biotina	- 5 -
2. Ciclo de utilización de la biotina	- 6 -
Transportador Multi-Vitamínico dependiente de Sodio (SMVT)	- 7 -
Holocarboxilasa Sintetasa (HCS) y la biotinilación de las carboxilasas en eucariontes ..	- 8 -
Carboxilasas Dependientes de Biotina.....	- 12 -
a) Acetil Coenzima-A Carboxilasa (ACC).	- 12 -
b) Piruvato carboxilasa (PC).....	- 13 -
c) Metilcrotonil Co-enzima A carboxilasa (MCC)	- 13 -
d) Propionil Co-enzima A Carboxilasa (PCC).....	- 13 -
Biotinidasa.....	- 14 -
3. Bir A y la biotinilación de carboxilasas en <i>Escherichia coli</i>	- 15 -
4. Errores innatos en el metabolismo de la biotina	- 17 -
Deficiencia de HCS.....	- 17 -
Deficiencia de Biotinidasa.....	- 19 -
5. Biotina en la regulación genética y la vía de traducción de señales.	- 20 -
6. Altruismo tisular	- 23 -
7. Biotina y el núcleo	- 24 -
Planteamiento del problema	- 28 -
Justificación.....	- 29 -
Hipotesis.....	- 30 -
Objetivo	- 31 -
Tráfico y dinámica de asociación de la holocarboxilasa sintetasa a la cromatina durante el desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i>	- 32 -
Resumen.....	- 33 -

1. Introducción.....	- 34 -
2. Materiales y Métodos.....	- 36 -
2.1 Stock de moscas	- 36 -
2.2 Ensayos de inmunofluorescencia	- 36 -
2.3 Purificación de la HCS humana	- 37 -
2.4 Electroforesis de proteínas (Western blot).....	- 37 -
2.5 Tratamiento de larvas de <i>D. melanogaster</i> con choque térmico (Heat Shock)....	- 38 -
2.6 Inmuno-Precipitación de la Cromatina (ChIP).....	- 38 -
2.7 Análisis Estadísticos	- 40 -
3. RESULTADOS	- 41 -
3.1 Caracterización funcional de anticuerpos contra la Holocarboxilasa Sintetasa humana.....	- 41 -
3.2 La Holocarboxilasa Sintetasa migra al núcleo celular después de la etapa de gastrulación en embriones de <i>Drosophila melanogaster</i>	- 44 -
3.3. La HCS nuclear está localizada en dominios de cromatina enriquecidos con la marca epigenética de represión transcripcional H3K9me3 en cromosomas politénicos de <i>Drosophila</i>	- 46 -
3.5 La Holocarboxilasa Sintetasa está presente en la región inactiva transcripcionalmente del promotor del gen de <i>hsp70</i>	- 53 -
4. Discusión	- 55 -
Discusión general.....	- 60 -
Anexos.....	- 63 -
Anexo 1. E fecto de la holocarboxilasa sintetasa sobre la expresión génica en la línea celular HepG2.....	- 64 -
Clonación de la HCS en el vector pM.....	- 66 -
Cultivo celular.	- 67 -
Ensayos de Transfección Transitoria.	- 67 -
Obtención extracto total.	- 67 -
Ensayo de β -gal.....	- 67 -
Ensayo de luciferasa.....	- 68 -
Análisis Luc/ β -gal.....	- 68 -

Anexo 2. <u>I</u> dentificación de proteínas que interactúan con la holocarboxilasa sintetasa.....	- 71 -
Clonación HCS ⁵⁸ - pAS2.1.....	- 73 -
Doble híbrido en levadura y tamizaje de la librería de ADNc	- 73 -
Anexo 3. <u>P</u> ublicaciones	- 77 -
Literatura citada	- 97 -

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura Química de la Biotina o Vitamina B ₈	5 -
Figura 2. Ciclo de utilización de biotina en eucariontes.....	6 -
Figura 3. El Multi-Trasportador dependiente de Sodio (SMVT).....	7 -
Figura 4. La Biotinilación de las carboxilasas.....	9 -
Figura 5. Sitio conservado de biotinilación.....	9 -
Figura 6. Representación esquemática del gen y la proteína de la Holocarboxilasa sintetasa.....	11-
Figura 7. Vías metabólicas en las que participan las carboxilasas dependientes de biotina.....	14-
Figura 8. Vías en las que participa la Biotina en <i>E.coli</i>	16-
Figura 9. Representación esquemática de las mutaciones presentes en la proteína de la Holocarboxilasa sintetasa.	19-
Tabla 1. Genes regulados por biotina a nivel transcripcional o post-transcripcional.....	21-
Figura 10. Representación esquemática de la Vía de señalización mediada por biotina.....	23-
Figura 11. Representación esquemática de los residuos de lisinas blancas de biotinilación.....	25-
Figura 12. Conservación en la secuencia de aminoácidos y perfil de expresión proteica de HCS en humanos y <i>Drosophila melanogaster</i>	43-
Figura 13. Tráfico de HCS durante el desarrollo temprano de <i>Drosophila melanogaster</i>	45-
Figura 14. Localización subcelular y cromosomal de HCS en glándulas salivales y cromosomas politénicos de larvas de <i>Drosophila</i>	47-

Figura 15. Co-localización de HCS con las marcas epigenéticas H3K9me3 y H3K9ac en cromosomas politénicos.....	-49-
Figura 16. Inmuno-localización de HCS en el locus de <i>hsp70</i> de cromosomas politénicos de <i>Drosophila melanogaster</i>	-51-
Figura 17. Localización de HCS, XPB, XPD y la RNA pol II en el dominio de <i>hsp70</i> en cromosomas politénicos tratados con choque térmico.....	- 52-
Figura 18. Localización de la HCS y la RNA pol II en el promotor del gen de <i>hsp70</i>	-54-
Figura 19. Representación esquemática de los vectores de transfección pM y Gal4-tk-luc utilizados en el sistema heterólogo.....	-66-
Figura 20. Efecto de la HCS y la HDAC1 sobre la expresión del gen reportero luciferasa.....	-69-
Tabla 2. Proteínas posibles blanco de interacción a la HCS ⁵⁸	-74-
Figura 21. Portada de la revista <i>Molecular Genetics and Metabolism</i>	-78-

Abreviaturas

ACC-1	<i>Acetil Co-enzima 1 Carboxilasa.</i>
ACC-2	<i>Acetil Co-enzima 2 Carboxilasa.</i>
AD	<i>Dominio de Activación.</i>
AMP	<i>Adenosín monofosfato.</i>
Arg	<i>Aminoácido Arginina.</i>
ARN	<i>Ácido ribonucleico.</i>
ARNi	<i>ARN de interferencia.</i>
ARNm	<i>ARN mensajero.</i>
Asn	<i>Aminácido Asparagina.</i>
Asp	<i>Aminoácido Aspartato.</i>
ATP	<i>Adenosin Trifosfato.</i>
B-AMP	<i>Biotinil 5'AMP.</i>
BCCP	<i>Proteína carboxiacarreadora de biotina en E. coli.</i>
BCCP87	<i>Últimos 87 carboxil-residuos de la BCCP.</i>
bioO	<i>Operón Biotina.</i>
BL-11	<i>Clona 11 con la ligasa de biotina completa (HCS).</i>
CDK	<i>Cinasa dependiente de ciclina.</i>
ChIP	<i>Inmno-Precipitación de la Cromatina.</i>
CO2	<i>Dióxido de Carbono.</i>
CTD	<i>Dominio Carboxilo Terminal de la RNA polimerasa II.</i>
Cy2	<i>Fluoróforo 2 del grupo de las cianinas, análogo a la fluoresceína.</i>
Cy3	<i>Fluoróforo 3 del grupo de las cianinas, análogo a la rodamina.</i>
DMC	<i>Deficiencia Múltiple de Carboxilasas.</i>
D-MEM	<i>Medio con una modification simple del medio basal de Eagle.</i>
DNA-BD	<i>Dominio de unión al DNA.</i>
ADNc	<i>Acido deoxiribonucleico complementario.</i>
DTT	<i>Ditiotreitol.</i>
EDTA	<i>Ácido Etilen-diamino-tetracético.</i>
EMBL	<i>Laboratorio Europeo de Biología Molecular.</i>
FBS	<i>Suero Bovino Fetal.</i>
GABA	<i>Ácido gamma aminobutírico.</i>
Gal4DBD	<i>Dominio de unión al DNA de Gal4.</i>
GCs	<i>Guanilato Ciclasa soluble.</i>
Gly	<i>Aminoácido Glicina.</i>
GMPC	<i>Guanosin monofosfato cíclico.</i>
GST	<i>Glutation-S-Transferasa.</i>
H	<i>Histona.</i>
H3K9ac	<i>Acetilación de la lisina 9 de la histona H3.</i>
H3K9me3	<i>Trimetilación de la lisina 9 de la histona H3.</i>
HCS	<i>Holocarboxilasa Sintetasa.</i>
HCS-FL	<i>Holocarboxilasa Sintetasa full length.</i>
HCS_h	<i>Holocarboxilasa Sintetasa humana.</i>
HDAC1	<i>Deacetilasa de histonas 1.</i>

HepG2	<i>Línea celular de hepatocarcinoma humano.</i>
HIS3	<i>Gen de S. cerevisiae que codifica para el aminoácido Histidina.</i>
HPI	<i>Proteína de heterocromatina 1.</i>
hsp70	<i>Heat shock protein 70.</i>
IgM	<i>Inmunoglobulina M</i>
IL	<i>Isoleucina.</i>
KDa	<i>Kilodaltons.</i>
Km	<i>Constante de Michaelis y Menten.</i>
lacZ	<i>Gen de la β-galactosidasa.</i>
Leu	<i>Aminoácido Leucina.</i>
LiCl	<i>Cloruro de Litio.</i>
MCC	<i>Metilcrotonil Co-enzima A Carboxilasa.</i>
Met	<i>Aminoácido Metionina.</i>
ml	<i>Mililitro</i>
Min	<i>Minutos</i>
Mm	<i>Milimolar</i>
MyoD	<i>Proteína 1 de diferenciación miogénica.</i>
NaAc	<i>Acetato de Sodio.</i>
NaCl	<i>Cloruro de Sodio.</i>
NAD⁺	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada.</i>
nM	<i>Nanomolar.</i>
NMNAT1	<i>Nicotinamida Mononucleótido Adenilil Transferasa 1.</i>
N-myc	<i>Oncogen de expresión en Neuroblastoma.</i>
NP-40	<i>Nonyl Phenoxyethoxyethanol.</i>
ODQ	<i>1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one.</i>
pb	<i>Pares de bases.</i>
PBS	<i>Bufer fosfato salino.</i>
PBS-I	<i>Bufer fosfato salino-Igepal</i>
PC	<i>Piruvato Carboxilasa.</i>
PCC	<i>Propionil Co-enzima A Carboxilasa.</i>
PCR	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa.</i>
pH	<i>Potencial de hidrógeno.</i>
PKG	<i>Proteína cinasa dependiente de GMPc.</i>
Pro	<i>Aminoácido Prolina.</i>
PVDF	<i>Polifluoruro de vinilideno.</i>
Rp-cGMPs	<i>Guanosina- 3', 5'- cyclic monophosphorothioate.</i>
rpm	<i>Revoluciones por minuto.</i>
SDS	<i>Dodecil sulfato de sodio.</i>
SDS-PAGE	<i>Gel de poliacrilamida SDS.</i>
Seg	<i>Segundos</i>
Ser	<i>Aminoácido Serina.</i>
Sf-900 II	<i>Medio libre de suero y proteínas para cultivo celular de insectos.</i>
SIRT1	<i>Sirtuina 1.</i>
SMVT	<i>Transportador Multivitamínico dependiente de Sodio.</i>
Su(var)3-9	<i>Supresor de variegación histona 3 lisina 9.</i>

SV40	<i>Vacualavirus del simio 40.</i>
TA	<i>Temperatura Ambiente.</i>
TBE	<i>Bufer Tris-Borato-EDTA.</i>
TBP	<i>Proteina de union a la caja TATA.</i>
TBS-T	<i>Tris bufer salino- Tween 20.</i>
TE	<i>Bufer Tris-EDTA.</i>
TFIIH	<i>Factor de Transcripción IIH.</i>
Tk	<i>Tirosin cinasa.</i>
TNT	<i>Sistema de transcripción y traducción in vitro.</i>
UAS	<i>Sitio de activación río arriba.</i>
Val	<i>Aminoácio Valina.</i>
Vmax	<i>Velocidad máxima de reacción enzimática.</i>
W¹¹¹⁸	<i>Línea de D. melanogaster con el gen White.</i>
XPB	<i>Xeroderma Pigmentosum B. Helicasa 3'→ 5' del core de TFIIH.</i>
XPD	<i>Xeroderma Pigmentosum D. Helicasa 5'→ 3' del core de TFIIH.</i>
3'AT	<i>3-Amino-1,2,4-triazole.</i>
μg	<i>Microgramo</i>
μl	<i>Microlitro</i>
°C	<i>Grados Centigrados</i>

Prefacio

La biotina fue reconocida como un nutriente esencial para levaduras en 1946. Sin embargo, no fue sino hasta mediados de la década de los años 70 en que se identificó su función en el metabolismo de organismos eucariontes como cofactor de carboxilasas. Desde entonces, diversos grupos de investigación presentaron evidencias que sugerían que la biotina estaba involucrada en la regulación de la expresión de decenas de genes que codifican enzimas hepáticas. El mecanismo responsable del papel regulador de la biotina permaneció sin ser entendido hasta que nuestro laboratorio descubrió que la vitamina forma parte de una cascada de transducción de señales cuya activación resulta en la transcripción de sus genes blanco. Recientemente, el descubrimiento de biotina en el núcleo celular y la capacidad de ciertas enzimas de catalizar la biotinilación de histonas llevó a la hipótesis de que esta modificación postraducciona forma parte del “código de histonas” y de la remodelación de la cromatina, eventos responsables de la activación de la expresión genética.

Sin embargo, distintos grupos de investigación demostraron que la biotinilación de histonas es un evento que no sucede de manera natural en las histonas, lo que deja sin explicación la presencia de biotina y la Holocarboxilasa sintetasa dentro del núcleo celular. Estos antecedentes han dado pie a la elaboración de este proyecto de tesis.

Esta tesis ha sido estructurada en tres partes distintas, la primera la denominamos **La vitamina biotina como un regulador del metabolismo y expresión genética**, y consiste en una revisión de la literatura existente en el campo de biotina, la cual incluye las funciones conocidas de esta vitamina y de la HCS, así como la evidencia que sugiere que actúa de manera indirecta como un regulador transcripcional. Al final de esta revisión nos enfocamos al reciente papel de la biotina dentro del núcleo, lo que nos permite situar respecto a los distintos roles en los que la biotina y la HCS participan.

La segunda parte de esta tesis titulada **“Tráfico y dinámica de asociación de la Holocarboxilasa sintetasa a la cromatina durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*”**, constituye la parte central de mi trabajo de doctorado, el cual permitió asociar a la HCS nuclear con eventos de represión transcripcional. Para ello, utilizamos

como modelo experimental a *Drosophila melanogaster* debido al tamaño de los cromosomas politénicos de glándulas salivales y al amplio conocimiento de las proteínas asociadas a la cromatina así como la dinámica de asociación de estos factores durante la activación o represión de la expresión genética. Con la finalidad de aprender el manejo de *Drosophila melanogaster* y las técnicas para la preparación e inmunotinción de embriones y cromosomas de *Drosophila* realicé una estancia en el laboratorio del Dr. Mario Zurita Ortega en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos. Los resultados mostrados en esta parte de la tesis fueron publicados como un artículo original en la revista *Molecular Genetics and Metabolism* con el título:

Trafficking and chromatin dynamics of holocarboxylase synthetase during development of *Drosophila melanogaster*. Sandra Reyes-Carmona, Viviana Valadéz-Graham, Javier Aguilar-Fuentes, Mario Zurita, Alfonso León-Del-Río. *Molecular Genetics and Metabolism*, Volume 103, Issue 3, July 2011, Pages 240-248.

La parte final de esta tesis se encuentran distintos anexos, los cuales describen experimentos enfocados a corroborar la función de represión transcripcional de la biotina y HCS observados en *Drosophila melanogaster*. El anexo 1 titulado: **“Efecto de la Holocarboxilasa sintetasa sobre la expresión génica en la línea celular HepG2”**, muestra ensayos realizados con un sistema heterólogo, en el cual la HCS fue fusionada a la región de unión al ADN del factor transcripcional de levadura GAL4 y utilizada en ensayos de transfección transitoria en células HepG2. Los resultados del efecto de la HCS fueron medidos sobre la expresión del gen reportero luciferasa. Estos ensayos se realizaron en colaboración con el Dr. Tonatiuh Barrios-García, miembro del laboratorio del Dr. Alfonso León, quien amablemente me asesoró en la realización de los mismos.

El anexo 2 titulado **“Identificación de proteínas que interactúan con la Holocarboxilasa sintetasa”**, consiste en un ensayo de doble híbrido en levadura, en el cual se utilizó a la HCS como proteína carnada, ensayo que nos permitió identificar proteínas blanco de unión a la HCS. Este trabajo se realizó en colaboración con la Bióloga Sofia Lobato-Gil de la Universidad de las Américas Puebla quien estuvo bajo mi asesoría y supervisión durante la realización de su tesis de licenciatura en el laboratorio.

El anexo 3, consiste en las versiones originales de las publicaciones realizadas durante mi estancia doctoral en el laboratorio del Dr. León-Del-Río. El artículo Trafficking and chromatin dynamics of holocarboxylase synthetase during development of *Drosophila melanogaster* Reyes-Carmona, S., et al. fue seleccionado por el Dr. Edward McCabe, editor en jefe de *Molecular Genetics and Metabolism*, como portada del número de Julio 2011 de la revista.

En el artículo: “Impaired Biotinidase Activity Disrupts Holocarboxylase Synthetase Expression in late Onset Multiple Carboxylase Deficiency” Anylu Pérez-Monjaras Rafael Cervantes-Roldan, Iván Meneses-Morales, Roy A. Gravel, Sandra Reyes-Carmona, Sergio Solórzano-Vargas, Alfonso González-Noriega, Alfonso León-Del-Río colaboré en la sección correspondiente a el efecto de la deficiencia y suplementación de biotina sobre los niveles de proteínas de carboxilasas en células normales y deficientes de biotinidasa mediante “*western blot*”.

*La vitamina biotina como un
regulador del metabolismo y
expresión genética.*

1. Biotina

La biotina es una vitamina hidrosoluble que pertenece al complejo vitamínico B y se le conoce también con el nombre de Vitamina B₈ o Vitamina H (del alemán *haut*; piel). La biotina se encuentra en cantidades traza en la mayor parte de los alimentos pero es particularmente abundante en levadura, hígado, riñón y clara de huevo entre otros [1, 2].

La biotina está compuesta por la fusión de un anillo ureido (imidazólico) y un anillo tetrahidrotiofeno los cuales se unen a un ácido valérico (Figura 1) y tiene un peso molecular de 244 daltones [3].

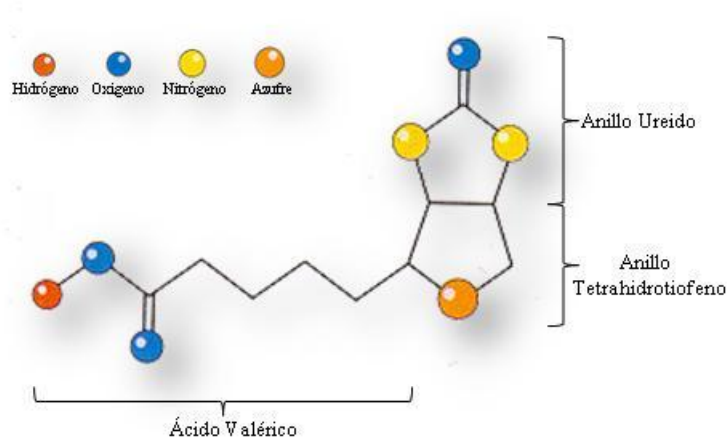


Figura 1. Estructura Química de la Biotina o Vitamina B₈.

En células eucariotas la vitamina biotina tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis metabólica debido a que es utilizada como cofactor de enzimas conocidas como carboxilasas [1]. Las carboxilasas dependientes de biotina catalizan reacciones clave en gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y catabolismo de aminoácidos mediante la transferencia de CO₂, entre una molécula donadora y otra aceptora de carboxilación.

En años recientes diversos grupos de investigación han presentado evidencia que relaciona a la vitamina biotina en otros procesos celulares fundamentales como el control de la expresión genética.

2. Ciclo de Utilización de la Biotina

La biotina es una vitamina distribuida en cantidades traza en la mayor parte de las plantas y animales lo que representa un riesgo para la sobrevivencia de los seres humanos ya que al igual que el resto de los organismos eucariontes hemos perdido la capacidad para sintetizar biotina. Durante la evolución, los mamíferos desarrollaron un mecanismo de utilización y reutilización de biotina que involucra la función de varias enzimas para asegurar el máximo aprovechamiento de esta vitamina (Figura 2). En las páginas siguientes se detallarán las características y funciones y de cada una de las enzimas que participan en el ciclo de utilización de biotina.

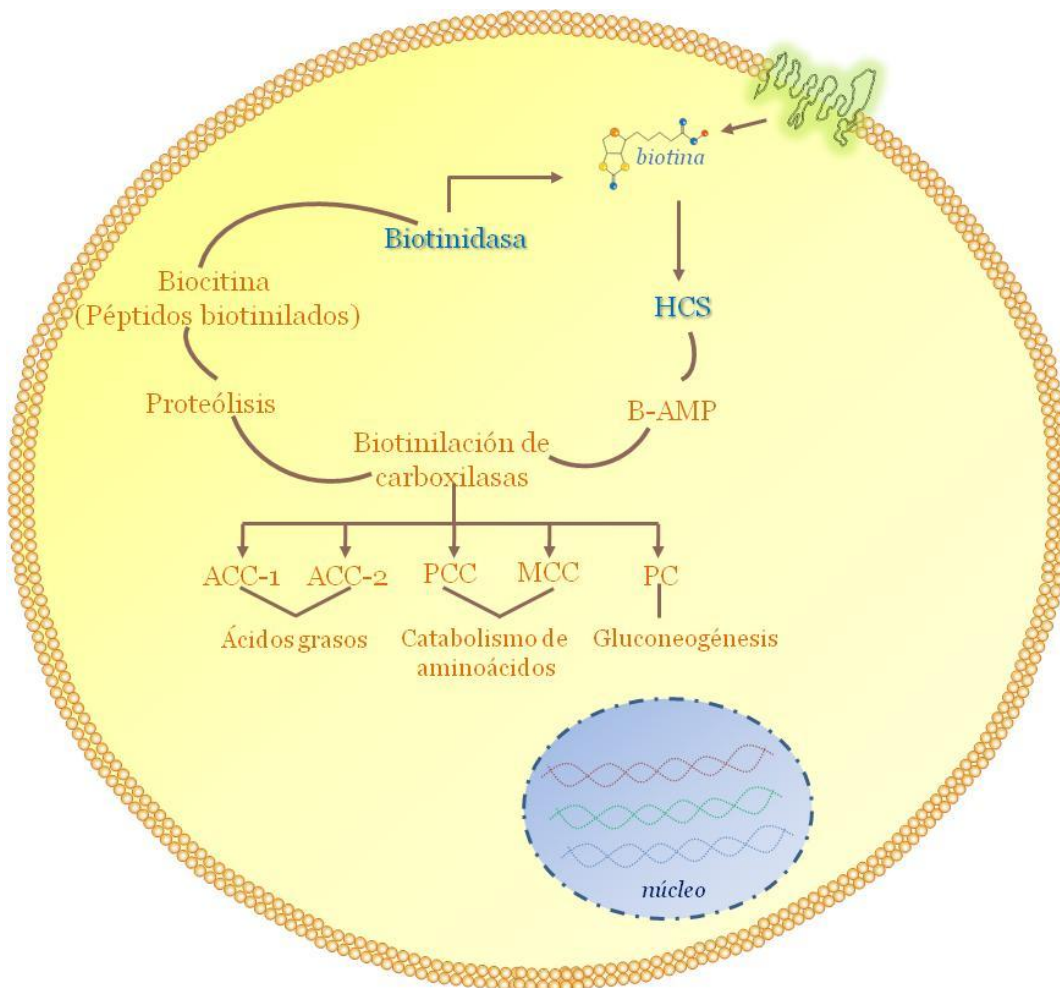


Figura 2. Ciclo de utilización de biotina en eucariontes. La biotina ingresa a la célula mediante el Transportador Multi-Vitaminico dependiente de Sodio (SMVT), una vez dentro es reconocida por la HCS y unida a las carboxilasas ACC1 y 2, PCC, MCC y PC las cuales participan en reacciones clave de gluconeogénesis, catabolismo de aminoácidos y síntesis de ácidos grasos, una vez cumplida su función son degradadas mediante proteólisis, de la que resultan péptidos biotinilados (biocitina), la enzima Biotinidasa libera la biotina para dejarla disponible y ser reutilizada por la célula.

Transportador Multi-Vitamínico dependiente de Sodio (SMVT)

El transportador multi-vitamínico dependiente de sodio (SMVT) es responsable de introducir a la célula tres distintas vitaminas: ácido pantoténico, ácido lipoico y biotina [4]. El ADNc tiene una longitud de 3137 pb y contiene un marco de lectura abierto de 1911 pb que codifica para una proteína de 636 aminoácidos con un peso aproximado de 68.6 KDa. El SMVT se caracteriza por tener doce dominios transmembranales y porque los dominios amino y carboxilo terminales orientados hacia el lado citoplásmico de la membrana celular. En su secuencia peptídica se localizan tres sitios de glicosilación (Asn⁴⁸⁹, Asn⁴⁹⁸ y Asn⁵³⁴) situados entre los dominios transmembranales 11 y 12. Además contiene dos sitios blanco de fosforilación por la proteína cinasa C en los residuos de Ser²⁸³ y Ser²⁸⁶ localizadas en el loop citoplásmico entre los dominios 6 y 7 (Figura 3). La biotina es reconocida por el SMVT en su grupo ceto, localizado en el anillo imidazol y por cada molécula de biotina que transporta, dos iones de sodio son co-transportados. El SMVT tiene una afinidad por biotina de ~8μM [4]. El SMVT tiene una Km de 8 μM para biotina lo que ha llevado a especular que este es un transportador de baja afinidad por la vitamina y que debe haber uno o varios transportadores mas de alta afinidad y que hasta ahora han eludido ser caracterizados molecularmente.

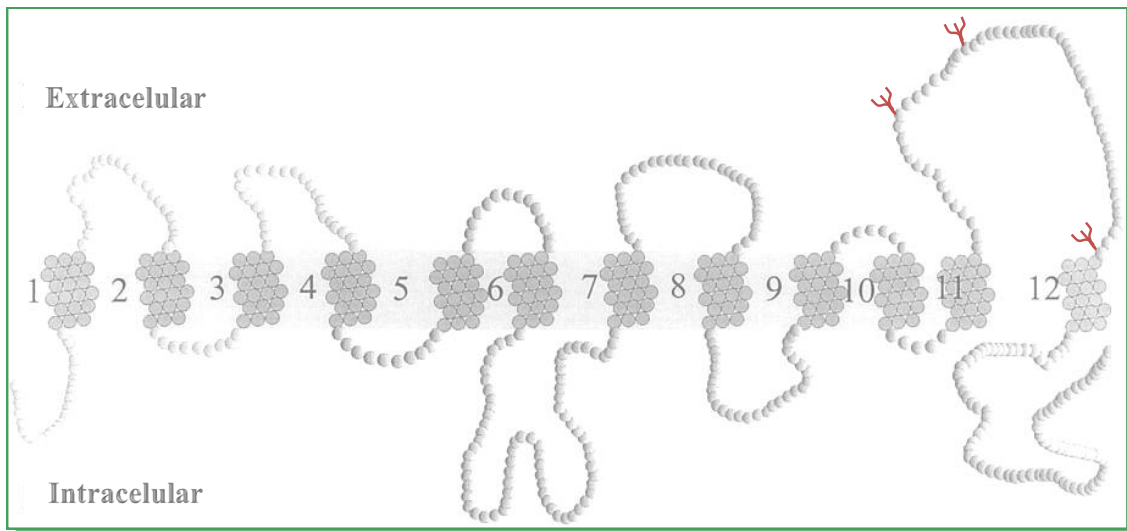


Figura 3. El Multi-transportador dependiente de Sodio (SMVT). El extremo amino y carboxilo-terminal se encuentran dirigidos hacia el citoplasma, cuenta con tres sitios de glicosilación y dos blancos de fosforilación. Ilustración tomada de Prasad *et al.* 1999.

Holocarboxilasa Sintetasa y la biotinilación de las carboxilasas en eucariontes

La HCS es la enzima responsable de unir de manera covalente a la biotina con las carboxilasas dependientes de biotina. Cuando la biotina llega al citoplasma celular se convierte en sustrato de la enzima holocarboxilasa sintetasa. Esta enzima es la responsable de la biotinilación de las cinco carboxilasas dependientes de biotina; Piruvato Carboxilasa (PC), Acetil Coenzima-A Carboxilasa (ACC1-2), Propionil Coenzima-A Carboxilasa (PCC) y Metilcrotonil Coenzima-A Carboxilasa (MCC) [5]. Distintos experimentos han revelado que la reacción de biotinilación actúa de manera universal ya que la ligasa de biotina en *E.coli* conocida como BirA puede reconocer y biotinar a las carboxilasas eucariontes, mientras que HCS a su vez puede biotinar a BCCP, la única carboxilasa en *E.coli* [6, 7].

La reacción de biotinilación por la HCS se lleva a cabo mediante dos pasos dependientes de ATP, en el primero la biotina es activada a un intermediario conocido como biotinil-5'-AMP o adenilato de biotina, el cual es utilizado en un segundo paso, para transferir la biotina al residuo de lisina en cada carboxilasa (Figura 4) [8].

La biotinilación de las carboxilasas es una modificación post-transcripcional, la cual se lleva a cabo mediante la formación de un enlace amida entre la biotina y el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina en la secuencia Ala/Val-Met-Lys-Met, una región altamente conservada en todas las carboxilasas, localizado en la mayoría de las enzimas a 35 aminoácidos del carboxilo terminal excepto en ACC, donde el dominio Met-Lys-Met está localizado en la región amino terminal de la proteína (Figura 5) [9].

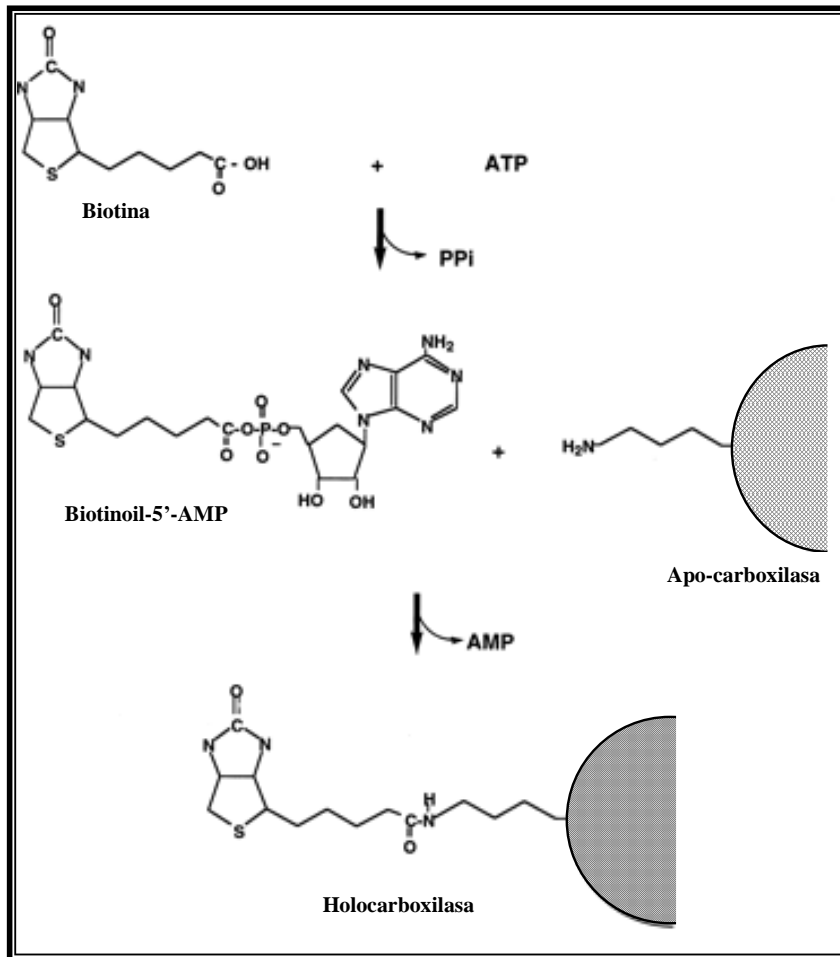


Figura 4. La Biotinilación de las carboxilasas. La reacción de biotinilación está mediada por la enzima HCS en dos pasos dependientes de ATP. Tomada de Chapman & Cronan 1999.

<i>PCC</i>	-----PMPG <u>V</u> VVAVSVKPG <u>D</u> AVAEG <u>Q</u> EICVIEAM <u>M</u> KMQNSMTAGKT <u>G</u> TVKS <u>V</u> HQCAGDTVGEGLLVELE-
<i>PC</i>	-----PMPG <u>K</u> VIDIKVVA <u>G</u> AKVAK <u>Q</u> PLCVLSAM <u>M</u> KMETVVTSPME <u>G</u> TVRK <u>V</u> HVTKDMTLEGDDLILEIE-
<i>ACC1</i>	PSVMRSPSAG <u>G</u> KLIQYIVED <u>G</u> GHVFAG <u>Q</u> CYAEIEV <u>M</u> KMVMTLTAVES <u>G</u> CIHY <u>V</u> KR-PGAALDPGCVLAKMQL
<i>ACC2</i>	PTVLRSPSAG <u>G</u> KLTQYTVED <u>G</u> GHVEAG <u>S</u> SYAEMEVM <u>M</u> KMIMTLNVQER <u>G</u> RVKY <u>I</u> KR-PGAVLEAGCVVARLEL

Figura 5. Sitio conservado de biotinilación. La reacción de biotinilación en las carboxilasas dependientes de biotina se realiza en el residuo de lisina en la región Met-Lys-Met presente en todas las carboxilasas.

La enzima HCS es una proteína de 726 amino ácidos. La HCS tiene tres dominios estructurales, una en la región amino-terminal (aminoácidos 1-290) y dos en el extremo carboxilo-terminal (aminoácidos 460-669 y 670-726). La región en el dominio amino-terminal entre la Leu 166 y la Arg 290 es necesaria para la actividad catalítica de HCS, ya que estudios de mutagénesis dirigida demostraron que la ausencia de estos aminoácidos interfieren con la reacción de transferencia de biotina a las carboxilasas (Figura 6) [10, 11].

El dominio más característico de la HCS es su región carboxilo terminal ya que en ella se encuentra localizado el sitio activo de la enzima. Esta región es altamente conservada entre las HCS eucariontes y las ligasas de biotina bacterianas [7]. La región mínima funcional de HCS radica en los últimos 349 aminoácidos de su extremo carboxilo-terminal, donde se sitúa el dominio de biotilación constituido por 9 aminoácidos (Gly⁴⁶⁶-Val⁶⁷⁴). Esta región de la enzima contiene el mayor grado de conservación entre todas las especies ya que también se encuentra la secuencia G(K/R)GRXG (Gly⁵⁰⁵-Gly⁵¹⁰) en la cual se lleva a cabo la unión de ATP (Figura 6). Dentro de esta región de 349 aminoácidos, la secuencia conformada por los aminoácidos (P/D)DGN(S/T)FD (Pro⁷⁰⁹-Asp⁷¹⁵) es altamente conservada en levaduras, *Arabidopsis thaliana* y *Caenorhabditis elegans*, lo que implica aun más la región carboxilo-terminal en la importancia funcional de HCS [11, 12].

El gen de la HCS en humanos se localiza en el cromosoma 21q22.1, se extiende a lo largo de aproximadamente 240 kb y comprende 14 exones. El primer codón de metionina se localiza en el exón 6 mientras que el codón de paro en el exón 14. Este gen cuenta con 13 intrones, de los cuales el intron 9 es el más largo (~130 kb). Se conocen tres tipos de ARNm que difieren en su extremo 5'. El ARNm tipo 1 comienza en el exón 1, mientras que los ARNm tipo 2 y 3 comienzan en el exón 3 y 2, respectivamente. [5]. Han sido propuestos tres sitios de transcripción alternativa, los cuales corresponden a la Met¹, Met⁷ y Met⁵⁸ [7, 13]. Las isoformas de HCS han sido identificadas en diferentes tejidos así como en placenta humana, lo que sugiere una regulación tejido-específica del procesamiento del ARNm [5, 14]. Debido a que la función del extremo amino-terminal de HCS aún no está claramente definida, se le ha asociado en catálisis, ya que en estudios cinéticos con las diferentes isoformas, se observó que la HCS Met⁵⁸ tiene una reducción del 40% en su actividad comparada con la isoforma HCS Met¹ [15].

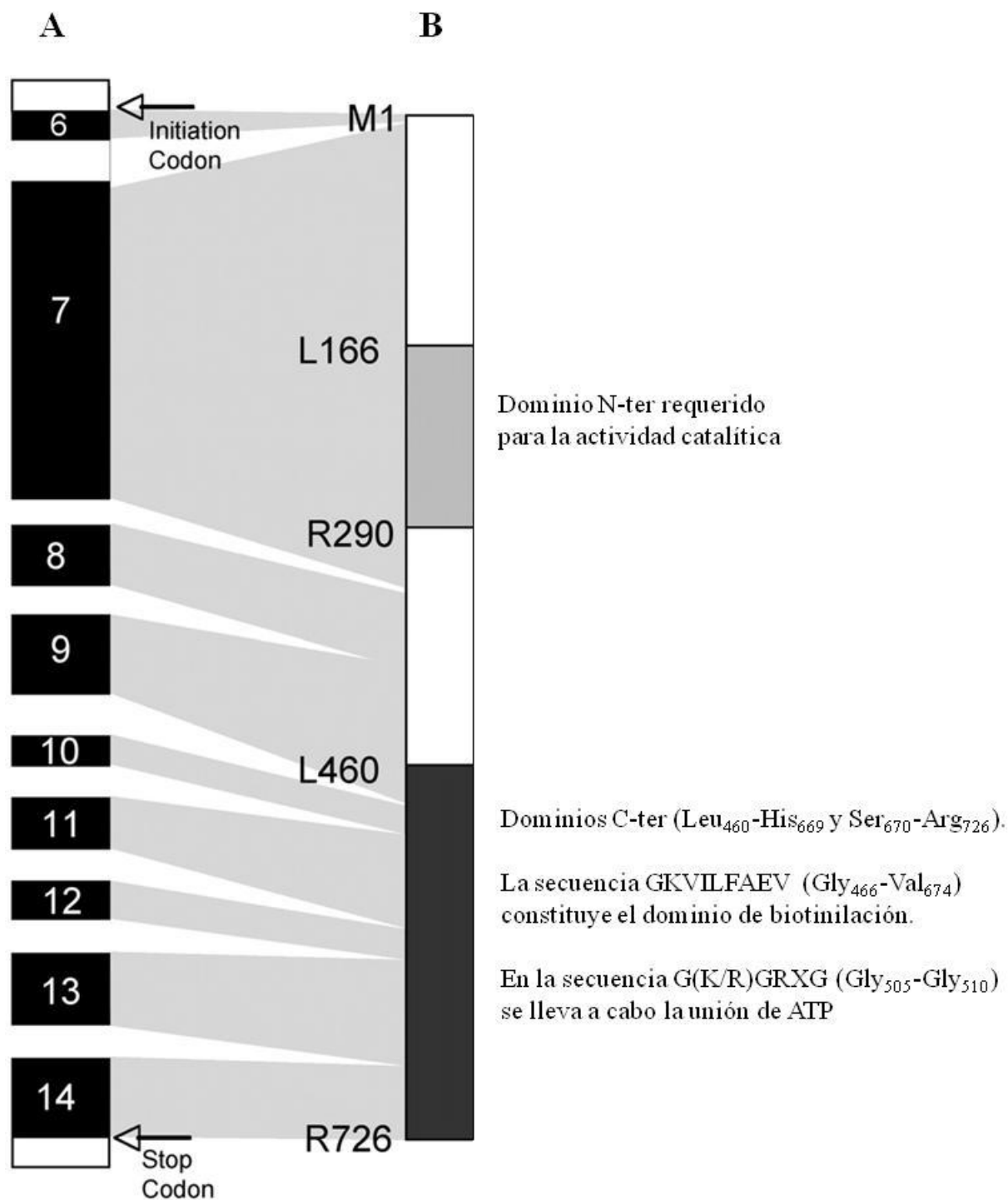


Figura 6. Representación esquemática del gen y la proteína de la Holocarboxilasa sintetasa. A) El gen de la HCS tiene una longitud ≈ 240 kb y está formado por 14 exónes los cuales codifican para una proteína de 726 aa. B) La proteína de HCS está constituida por tres dominios, uno en la región N-ter y dos en la región C-ter. Representación adaptada de Pendini *et al*, 2008.

Carboxilasas Dependientes de Biotina

En los humanos, existen cinco diferentes carboxilasas dependientes de biotina, las cuales son sintetizadas como precursores inactivos y requieren ser biotiniladas para utilizar a la biotina como un vector en la transferencia de un grupo carboxilo entre una molécula donadora y una aceptora. Las carboxilasas dependientes de biotina, una vez activadas participan en procesos clave del metabolismo celular las cuales se muestran en la figura 7.

a) Acetil Coenzima-A Carboxilasa (ACC).

La ACC cataliza la carboxilación de Acetil-CoA a Malonil-CoA, paso esencial en la biosíntesis de ácidos grasos. En las células humanas existen dos formas de ACC (ACC-1 y ACC-2). Estas enzimas están codificadas por diferentes genes y en su forma madura se sintetiza un solo polipéptido cuyo peso molecular es de ~265 KDa. La ACC-1 es la única carboxilasa localizada en el citoplasma de las células, se expresa de manera general en todos los tejidos, mayoritariamente en tejidos lipogénicos como hígado, tejido adiposo, riñón y glándula mamaria lactante.

La ACC-2 al igual que las demás carboxilasas, se localiza en mitocondria y se expresa principalmente en músculo esquelético y corazón [16]. La expresión diferencial de las isoformas de ACC, sugiere la hipótesis de que la ACC-1 participa en síntesis de ácidos grasos y la ACC-2 en catabolismo de ácidos grasos en músculo. La regulación transcripcional de las dos enzimas es diferente: La ACC-1 es regulada por nutrientes como glucosa e insulina mientras que la ACC-2 es regulada por factores celulares músculo específicos como MyoD [8].

Las enzimas ACC-1 y la ACC-2 están codificadas en distintos genes en los cromosomas 17q12 y 12q23, respectivamente. La secuencia de aminoácidos entre estas dos proteínas muestra un 80% de identidad; los primeros 218 aminoácidos de la ACC-2, entre los cuales aparecen 20 aminoácidos altamente hidrofóbicos en el extremo amino-terminal, le confieren a la ACC2 su localización mitocondrial [16].

b) Piruvato carboxilasa (PC)

La enzima PC es la enzima que cataliza la transformación de piruvato a oxaloacetato, un producto intermediario en la síntesis de fosfoenolpiruvato, el cual es esencial para la síntesis de la glucosa [8]. La PC es un homotetramero de 1180 aminoácidos, contiene su secuencia aceptora de biotina confinada en los últimos 86 aminoácidos de la proteína (p-86). El gen que codifica para la PC se localiza en el cromosoma 11q13.4-q13.5. Su peso es de 130 KDa aproximadamente y su localización es exclusivamente mitocondrial [17].

c) Metilcrotonil Co-enzima A carboxilasa (MCC)

La MCC está formada por una subunidad alfa y una beta las cuales le confieren un peso aproximado de 76 Kda. Participa en el catabolismo de la leucina, ya que cataliza la carboxilación de 3-metilcrotonil CoA a 3-metilglutaconil CoA [8, 18].

d) Propionil Co-enzima A Carboxilasa (PCC)

La PCC Tiene un peso de 72 KDa y participa en el catabolismo de aminoácidos ramificados así como de ácidos grasos de cadena larga, ya que cataliza la transformación de Propionil CoA a Metilcrotonil CoA. La PCC es un heteropolímero conformado por dos subunidades, una α y una β . La enzima PCC puede presentarse en una estructura $\alpha_4\beta_4$ o $\alpha_6\beta_6$. La subunidad α es la que contiene el sitio de biotinilación. Los últimos 67 aminoácidos (p67) de la subunidad α actúan como un dominio independiente que es capaz de ser reconocido por la HCS dentro de los 703 aminoácidos que la constituyen [6, 8].

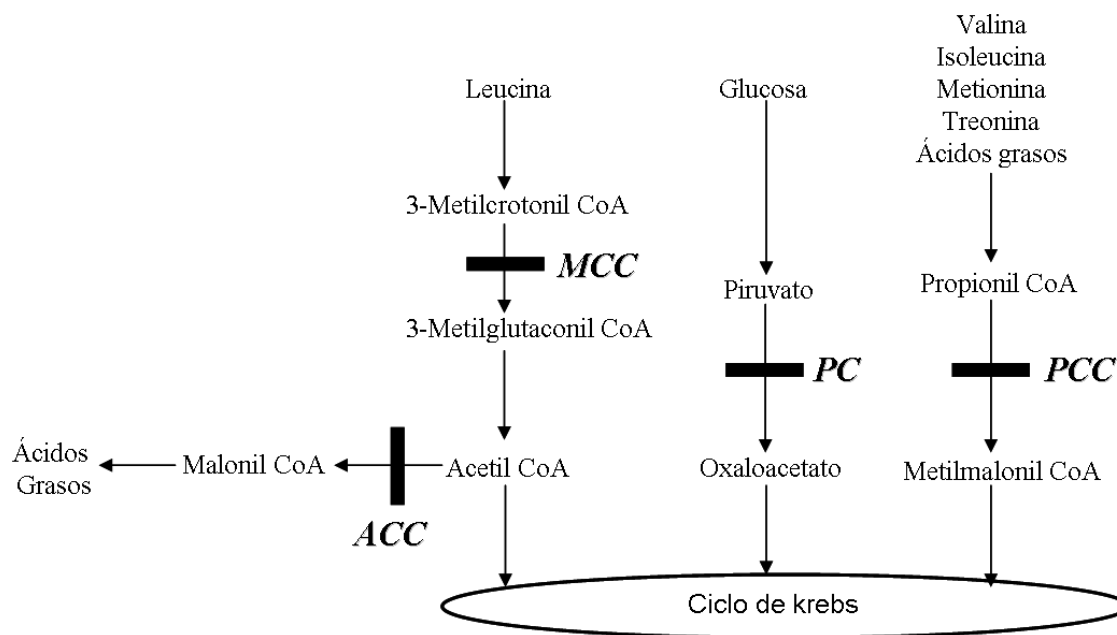


Figura 7. Vías metabólicas en las que participan las carboxilasas dependientes de biotina. En los humanos existen cinco carboxilasas dependientes de biotina, las cuales participan en reacciones clave de gluconeogénesis, catabolismo de aminoácidos y síntesis de ácidos grasos. Diagrama tomado de Baumgartner & Soumala 1997.

Biotinidasa

La biotina presente en los alimentos, se asocia mayoritariamente a proteínas, por lo que la Biotinidasa es una enzima altamente importante en el ciclo de utilización de biotina, ya que es la enzima responsable de hidrolizar los enlaces amida del compuesto conocido como biocitina (biotinil- ϵ -lisina), reacción en la cual la biotina es liberada al citoplasma para ser re-utilizada por la célula [19]. La actividad de Biotinidasa en mamíferos está particularmente elevada en suero, hígado, glándulas adrenales y riñones. Sin embargo, en el cerebro la presencia de biotinidasa es mucho menor [19].

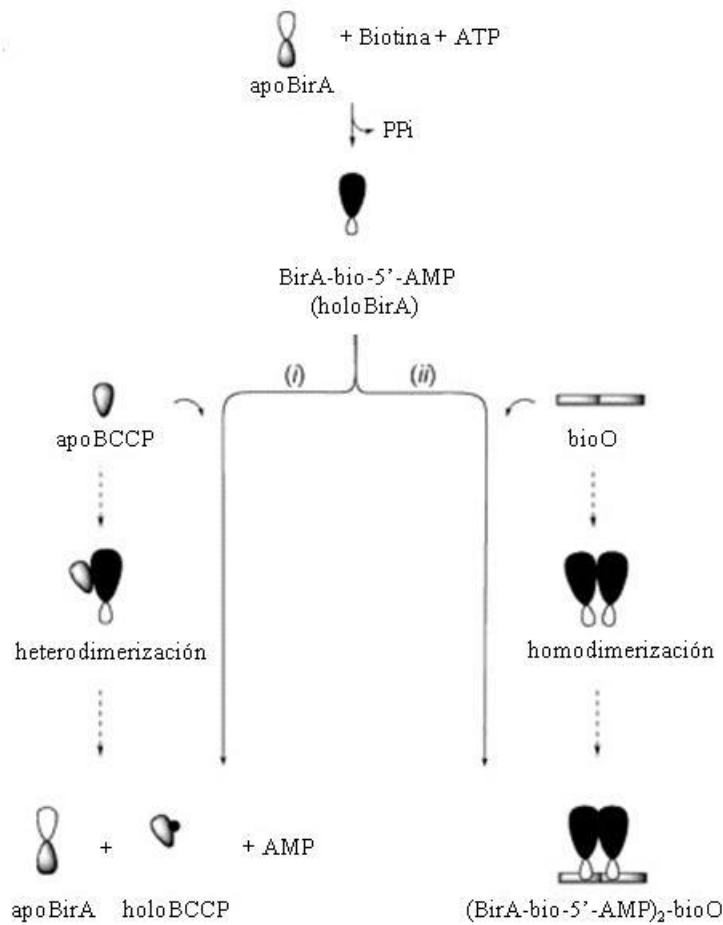
El ADNc de Biotinidasa codifica para una proteína monomérica de 543 aminoácidos, con una masa molecular de ~56 Kda. Contiene seis sitios potenciales de N-glicosilación, los cuales pueden incrementar su peso en 13-19 KDa, resultando en un peso total de 70-76 KDa [19]. El gen de la biotinidasa contiene al menos cuatro exones, los cuales se extienden a lo largo de 21 Kbs del cromosoma 3p25 [20-22].

3. Bir A y la Biotinilación de carboxilasas en *Escherichia coli*

En *E. coli*, la biotina está involucrada en dos sucesos, el primero como parte del metabolismo celular, vía la unión de esta vitamina a la proteína acarreadora de biotina (BCCP) de la Acetil Co-A Carboxilasa, y el segundo en la represión de la transcripción del operon de biotina (bioO) [23].

La proteína ligasa de biotina BirA lleva a cabo estas dos funciones, primero catalizando la síntesis de biotinil-5'-AMP, a partir de biotina y ATP. Esta unión enzima-biotina interactúa con la subunidad BCCP de la ACC en el citoplasma, para la transferencia de biotina. Por otro lado se puede formar el homodímero necesario para la unión a la secuencia específica en el operón de biotina (bioO) (Figura 8) [23]. El operón de biotina en *E. coli* contiene cinco genes estructurales involucrados en la biosíntesis de la biotina. La transcripción del operón es regulado vía BirA y depende del nivel de biotinil-5'-AMP disponible. Cuando todas las apoproteínas disponibles han sido convertidas a holocarboxilasas mediante la unión de biotina, no es necesaria la presencia adicional de biotina en el medio. La estabilidad del complejo BirA-biotina-AMP asegura que la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de biotina se apague [9, 24].

A



B

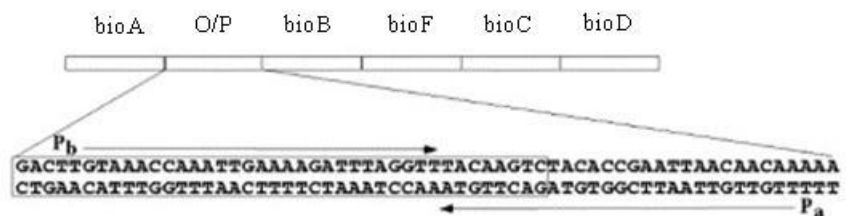


Figura 8. Vías en las que participa la Biotina en *E.coli*. A, Representación esquemática del sistema de regulación de biotina en *E.coli*. La enzima activada BirA-bio-5'-AMP puede funcionar como (i) ligasa de biotina o (ii) como represor transcripcional. B, Representación esquemática del operon de biotina (bioO) y su secuencia: bioA al bioF son los genes que codifican para las enzimas sintetizadoras de biotina, O/P es la región control del operon, P_a y P_b son los promotores para la transcripción hacia la izquierda o derecha, respectivamente como indican las flechas. La caja en gris representa la secuencia del operador de biotina. Ilustración tomada de Brown 2004.

La BirA en un monómero de 35 KDa, tiene una secuencia de 321 aminoácidos y está constituida por tres dominios. En el extremo amino-terminal contiene un dominio helice-vuelta-helice característico de proteínas de unión a ADN, el dominio central tiene una

estructura de β plegada, enmarcado por α -hélices y en la cual se encuentra la actividad catalítica. Por último el dominio carboxilo-terminal tiene una estructura total de β plegada, y es en este dominio donde se lleva a cabo la homodimerización de BirA, necesaria para la unión al ADN, y por el contrario, en este mismo dominio se da la heterodimerización con BCCP para realizar la transferencia de biotina [25, 26].

4. Errores innatos en el metabolismo de la biotina

Desde el punto de vista metabólico y fisiológico, la deficiencia de biotina tiene consecuencias catastróficas para el organismo debido a que este compuesto juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis metabólica como cofactor de carboxilasas. Existen dos formas diferentes en que los organismos desarrollan deficiencia de biotina. La deficiencia adquirida, debido a la falta de esta vitamina en la dieta, y la deficiencia genética producida por mutaciones en alguno de los genes involucrados en la utilización de esta vitamina.

Deficiencia de HCS

La deficiencia múltiple de carboxilasas causada por las mutaciones en el gen de la enzima HCS constituye uno de los daños metabólicos más severos; en este caso la habilidad celular para biotinar carboxilasas está afectada directamente, mientras que la liberación de biotina por la biotinidasa y la absorción intestinal son normales [8, 15, 27, 28]. Los síntomas clínicos y bioquímicos de este desorden incluyen cetoacidosis (bajo pH en sangre), acidemia orgánica (exceso de ácido en la sangre y orina), hiperamonemia (aumento de amonio sanguíneo), dificultades respiratorias, hipotonía (disminución del tono muscular), ataques, retraso en el desarrollo y anormalidades dérmicas como erupciones, resequedad y alopecia (pérdida del cabello) [8]. Los síntomas de la deficiencia de HCS aparecen entre las primeras horas del nacimiento y los 15 meses de edad. Este desorden puede llevar al coma e incluso la muerte, sin embargo todas las manifestaciones clínicas y bioquímicas pueden ser revertidas con dosis farmacológicas de biotina (10-100 mg/día) [10].

Han sido reportadas más de 15 mutaciones en el gen de *HCS* que dan como consecuencia la deficiencia múltiple de carboxilasas. Estas mutaciones han sido clasificadas dentro de dos

grupos, el primer grupo consiste a mutaciones en la K_M , las cuales se dan por sustituciones en aminoácidos, lo que resulta en una enzima con un decremento en la afinidad por la biotina. Los pacientes con estas mutaciones en HCS responden bien a la administración oral de dosis farmacológicas de biotina (10 mg/día). La mayoría de las mutaciones que resultan en una elevada K_M por biotina radican en la región catalítica del extremo C-terminal. Estudios de modelaje en la estructura de HCS han dejado al descubierto que la sustitución de aminoácidos que dan origen a las mutaciones se presentan alrededor del sitio de biotinilación y de unión a ATP. Una de ellas, es la mutación de la Arg₅₀₈ (*E.coli* Arg₁₁₈), un residuo altamente conservado entre las biotina-ligasas. La Arg₁₁₈ en *E.coli* está localizada en la región del asa flexible de los aminoácidos 110-128 la cual toma forma una vez unido su ligando. Mutaciones en la Arg₁₁₈ por una glicina en *E.coli* causa un decremento en la velocidad de disociación de biotina y biotinil-5'-AMP, por lo que resulta en una biotinilación inapropiada de proteínas. La mutación en este residuo resulta en una alterada afinidad de las proteínas ligasas de biotina por su sustrato [10]. Otra de las mutaciones frecuentes es la de la Asn₅₁₁ la cual reside en el asa flexible junto a la Arg₅₀₈. La Asp₅₇₁ ocurre en una posición altamente conservada dentro de la secuencia KWPND presente en todas las ligasas de biotina. Esta mutación no interfiere con la unión de biotina, pero su función es crítica dentro del dominio de unión al ATP [10].

El segundo grupo de mutaciones, esta caracterizado por ser mutaciones en la V_{MAX} , en donde la actividad de la enzima está comprometida pero no se restablece con altas concentraciones de biotina en la mayoría de los casos [10]. Las mutaciones en el grupo de la V_{MAX} son: Arg₁₈₃→Pro, Leu₂₁₆→Arg y Leu₂₃₇→Pro, localizadas en el amino terminal, fuera del dominio catalítico de la HCS (Figura 9).

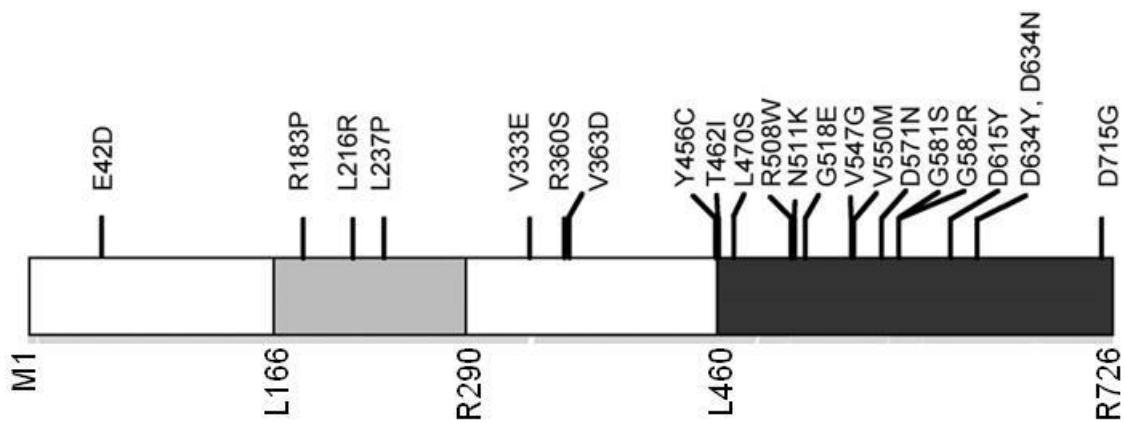


Figura 9. Representación esquemática de las mutaciones presentes en la proteína de la Holocarboxilasa sintetasa. Las mutaciones en la HCS dan como resultado la deficiencia múltiple de carboxilasas (MCD) y han sido clasificadas en dos grupos, uno de mutaciones en la K_M y otro de mutaciones en la V_{Max} .

Deficiencia de Biotinidasa

El déficit en la actividad de la biotinidasa no permite la liberación de biotina obtenida de los alimentos y del reciclaje una vez realizada la proteólisis de las carboxilasas, lo que resulta en una deficiencia secundaria de biotina, alterando la actividad de las carboxilasas. En estos pacientes la absorción intestinal de biotina y la biotilación de las carboxilasas no se ve afectada, lo que explica la respuesta inmediata de los pacientes a una dieta suplementada con biotina. La deficiencia de biotina presenta los mismos síntomas clínicos y bioquímicos de la deficiencia de HCS, los cuales se presentan entre las dos semanas después del nacimiento hasta los dos años de edad [8].

Los individuos con una deficiencia profunda de biotinidasa tienen menos del 10% de actividad normal en suero. Los pacientes con este padecimiento, además de los síntomas mencionados anteriormente presentan conjuntivitis, problemas visuales y auditivos como atrofia óptica y auditiva. Si esta deficiencia es detectada a tiempo, puede ser revertida, con dosis farmacológicas de biotina (5–20 mg al día). Algunos niños con deficiencia profunda de biotinidasa, desarrollan los primeros síntomas al final de su niñez o durante la adolescencia, con características aún más severas, como debilidad motora y pérdida visual [8, 20].

5. Biotina en la regulación genética y la vía de traducción de señales.

En los últimos 40 años, varios investigadores han demostrado que la biotina, además del papel como cofactor de carboxilasas, tiene un efecto en la regulación transcripcional y también post-transcripcional de varios genes. Dentro de los genes regulados por biotina se encuentra la glucocinasa hepática, la fosfoenol-piruvato carboxicinasa, la piruvato cinasa, el receptor de asialoglicoproteínas, así como las IL-2 y 4 e interferon- γ , entre otros (Tabla 2) [29-34]. El grupo de investigación del Dr. Velazquez, demostró por primera vez que la biotina es capaz de regular la expresión de las enzimas PC, PCC y HCS, en tejidos como hígado y riñón mayoritariamente, y en músculo y cerebro en menor grado. Estos resultados fueron obtenidos mediante el uso de un modelo animal con deficiencia de biotina, en el cual se observó que esta vitamina afecta los niveles del ARNm de la HCS, así como la actividad y cantidad de las carboxilasas [35].

Enzima	Efecto mediado por biotina	Nivel	Vía metabólica en la que participa
Glucocinasa hepática	↑	Transcripcional	Glicólisis
Fosfofructocinasa	↑	Post-transcripcional??	Glicólisis
Piruvato cinasa	↑	Post-transcripcional??	Glicólisis
Ornitina Transcarbamilasa	↑	Transcripcional	Ciclo de la urea
Guanilato ciclasa soluble y GMPc	↑	Post-transcripcional	Múltiples vías
Fosfoenol piruvato carboxikinasa	↓	Transcripcional	Gluconeogénesis
Receptor de asialoglicoproteínas	↑	Post-transcripcional	Endocitosis de glicoproteínas
Holocarboxilasa sintetasa	↑	Transcripcional	Ciclo de utilización de biotina
Acetil-CoA carboxilasa 1	↑	Transcripcional	Ciclo de utilización de biotina
Propionil- CoA carboxilasa	↑	Transcripcional	Ciclo de utilización de biotina
Metilcrotonil-CoA carboxilasa	↑	Transcripcional	Ciclo de utilización de biotina
IL-1 β	↑	Transcripcional	Respuesta inmune
Interferón- γ	↑	Transcripcional	Respuesta inmune
IL-2	↑	Transcripcional	Respuesta inmune
IL-4	↓	Transcripcional	Respuesta inmune
N-ras	↑	Transcripcional	Transducción de señales y expresión
N-myc	↑	Transcripcional	Transducción de señales y expresión
Raf	↑	Transcripcional	Transducción de señales y expresión
C-myb	↑	Transcripcional	Transducción de señales y expresión

Tabla 1. Genes regulados por biotina a nivel transcripcional o post-transcripcional. Existen varios reportes que demuestran que la presencia de biotina en la célula puede aumentar (↑) o disminuir (↓) la expresión de varias enzimas hepáticas así como enzimas que participan en el ciclo de utilización de biotina.

A pesar de conocer el efecto de la biotina a nivel transcripcional o post-transcripcional, el mecanismo por el cual esta vitamina realiza esta función se desconocía, por tal motivo el grupo de trabajo del Dr. León del Río se dispuso a explorar este mecanismo. Los experimentos propuestos para alcanzar este objetivo se basaron en un estudio realizado a principios de los años 80 donde se demostró que la biotina incrementa los niveles de GMPc en riñón, hígado, colon, cerebelo y corazón de rata, mediante el aumento en la actividad de la Guanilato Ciclasa soluble [36]. En estos experimentos, células HepG2 (línea celular de carcinoma de hígado humano) fueron incubadas en un medio deficiente de biotina, lo cual generó al paso del tiempo, una disminución del ARNm de la HCS, PCC y ACC-1, sin

embargo los niveles del ARNm de la enzima ACC-2 y del control β -actina no se vieron afectados. Para comprobar que el efecto en la disminución de los ARNm de estas enzimas fuera dependiente de biotina, las células fueron incubadas con biotina, lo cual re-estableció los niveles del ARNm de las enzimas afectadas. Este efecto fue comparado con el obtenido de células deficientes de biotina incubadas con GMPc lo cual provocó un aumento en los niveles de ARNm de la HCS, PCC y ACC-1. Debido a que la GCs cataliza la formación de GMPc, se incubaron células deficientes de biotina en presencia de biotina y ODQ (inhibidor específico de la GCs) lo cual tuvo como resultado la inhibición de la recuperación de los niveles de ARNm de la HCS, PCC y ACC-1, con lo cual se confirmó la participación de la GCs en la regulación transcripcional mediada por biotina. Finalmente, para explorar si el efecto de biotina ocurre a través de la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) se incubaron células deficientes de biotina en presencia de Rp-cGMPs, un inhibido de la PKG, lo cual limitó la recuperación de los niveles del ARNm de las enzimas HCS, PCC y ACC-1. Mediante estos ensayos, nuestro grupo de investigación demostró que la vía de señalización que involucra a la HCS-GCs-PKG, es la vía mediante la cual biotina lleva a cabo su función en la regulación transcripcional (Figura 10) [37]. La cascada de señalización mediada por biotina regula la expresión de genes involucrados en el ciclo de utilización de biotina como son el de SMVT, la HCS, la ACC-1, la PCC y la MCC [35, 37, 38].

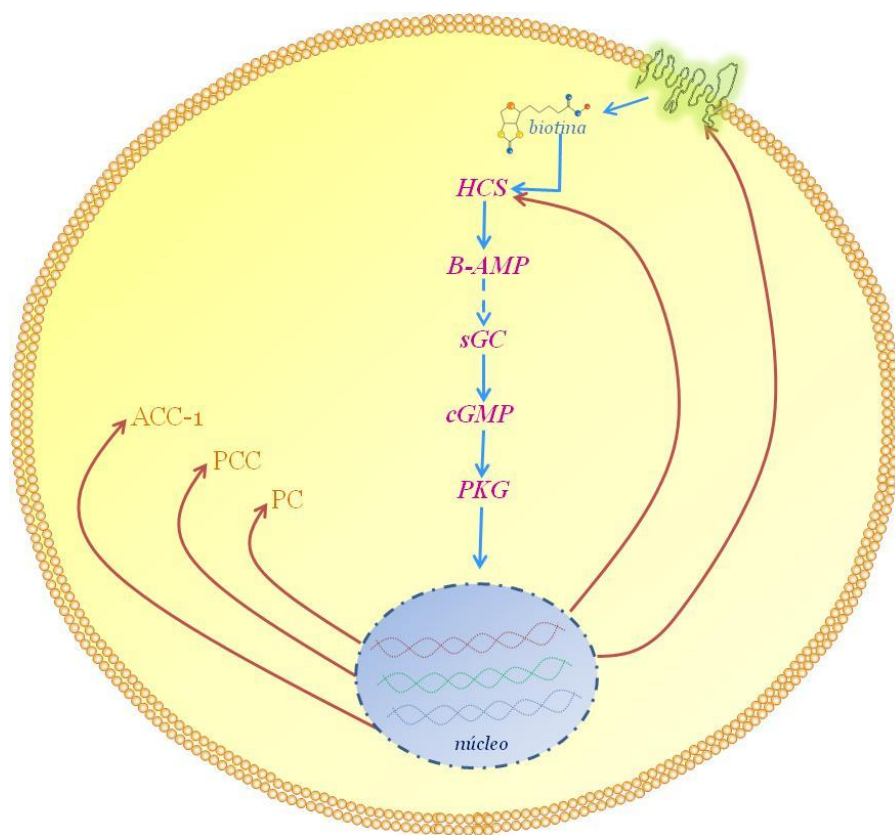


Figura 10. Representación esquemática de la Vía de señalización mediada por biotina. La biotina participa en la regulación génica a través de la cascada de señalización que comprende a la Holocarboxilasa sintetasa (HCS) que activa a la biotina a un intermediario conocido como biotinil-5' AMP (B-AMP). Este compuesto actúa como un segundo mensajero sobre la actividad de la Guanilato ciclasa soluble (sGC) alterando los niveles de Guanósín monofosfato cíclico o cGMP el cual actúa sobre la proteína cinasa dependiente de cGMP (PKG). Esta enzima se internaliza al núcleo y fosforila factores de transcripción permitiendo la expresión de genes blanco, incluidos los genes que codifican para proteínas del ciclo de utilización de biotina como el transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT) y tres de las carboxilasas; la isoforma 1 de la Acetil coenzima-A carboxilasa (ACC1), la propionil coenzima-A carboxilasa (PCC) y la piruvato carboxilasa (PC).

6. Altruismo tisular

En periodos de deficiencia de biotina, el SMVT y la HCS responden disminuyendo su transcripción, contrario a lo que sucede con la biotinidasa, la cual no es afectada por el estatus de esta vitamina. La disminución del ARNm de SMVT y de HCS se presenta en los tejidos periféricos especialmente en hígado y riñón, mientras que permanecen inalterados en el cerebro. En este trabajo, nuestro grupo propuso que la reducción de la utilización de biotina en los órganos periféricos permite que la biotina del plasma esté disponible para el cerebro, en el cual se ha demostrado que en periodos de ayuno la expresión de las

carboxilasa no se ve afectada en este tejido, contrario a la síntesis de estas proteínas en tejidos periféricos. La expresión de ARNm que codifica para las proteínas involucradas en el ciclo de biotina, es regulado por la vía de transducción de señales que involucra a la HCS-GCs-PKG descrita previamente en el laboratorio [8].

La razón por la cual los niveles de biotina en cerebro no se alteran, radica en la importancia del mantenimiento de la función de las carboxilasas en el metabolismo celular. La enzima PC en el cerebro participa en la generación del alfa-cetoglutarato el cual se pierde en la liberación de glutamato y GABA de neuronas y la exportación de glutamina por la glia. La carboxilación del piruvato en las neuronas y la glia aporta un 30% y un 40-60%, respectivamente, de los intermediarios del ciclo de Krebs [8]. El mantenimiento de estas funciones vitales en el cerebro explica la razón por la cual las células de tejidos periféricos actúan de manera altruista, al sacrifican sus requerimientos temporales de biotina.

7. Biotina y el núcleo

A principios de los años sesenta se identificó la presencia de la biotina en el núcleo de células normales, así como en células tumorales [39-41]. Esto no se pudo explicar en su momento pues no hay presencia de carboxilasas en este organelo y la activación transcripcional mediada por biotina se lleva a cabo por la activación de la cascada HCS-GCs-PKG que reside en el citoplasma.

Un antecedente importante para tratar de explicar la presencia de biotina en el núcleo fue la demostración de Wolf y colaboradores de que la biotinidasa podía transferir biotina a las cinco diferentes histonas [39, 42]. Las bases para realizar este experimento nunca fueron explicadas sobre todo porque la biotinidasa no se localiza en el núcleo y el utilizar a las histonas como sustrato pudo deberse a la abundancia de residuos de lisina en sus extremos carboxilo terminales [43]. Este experimento fue utilizado por Mock y después por Zemleni como base de un proyecto que llevó a demostrar la biotinilación de histonas aisladas de cultivos celulares, en los cuales fueron identificados 10 sitios de biotinilación en las histonas H2, H3 y H4 [42, 44-47]. En estos trabajos también se describió que la biotinilación de histonas se ve afectada por las marcas post-transcripcionales que sufren las histonas, por ejemplo; la acetilación de los residuos de lisina, así como la fosforilación de las serinas,

disminuye la biotilación de los residuos de lisina adyacentes; por el contrario, la dimetilación de los residuos de arginina aumentan la biotilación de las lisinas (Figura 11).

La biotilación de histonas ha sido asociada por el mismo grupo de Zemleni y colaboradores a los siguientes eventos: proliferación celular en linfocitos humanos así como a la respuesta celular al daño en el ADN, por mencionar algunos [48].

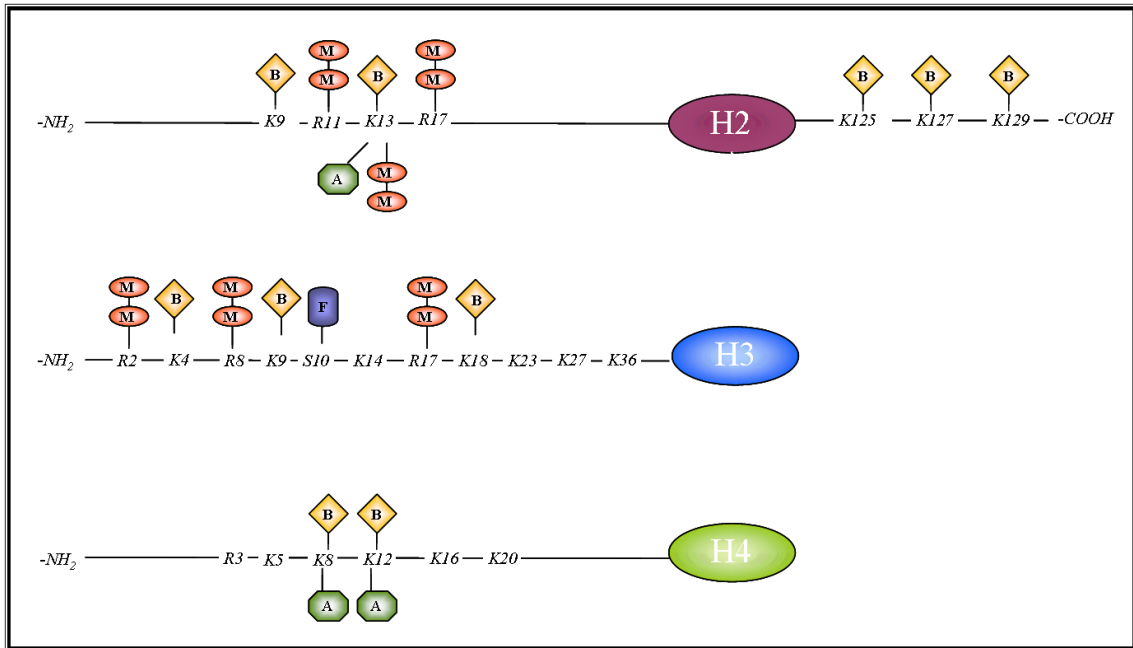


Figura 11. Representación esquemática de los residuos de lisinas blancas de biotilación, así como de las modificaciones post-trancripcionales que aumentan o disminuyen la presencia de biotina. **B:** Biotilación, **M:** Metilación, **A:** Acetilación, **F:** Fosforilación.

Por otro lado, el grupo de Gravel y colaboradores demostraron mediante inmunofluorescencia que la HCS es una enzima que a pesar de su localización y función citoplasmica, se concentra predominantemente en el núcleo y proponen a HCS como posible responsable de la biotilación de histonas [49].

Sin embargo, recientemente la biotilación de histonas ha sido puesta en duda por los siguientes hallazgos realizados por varios laboratorios. Wallace y colaboradores demostraron que la unión de estreptavidina a carboxilasas es dependiente de la disponibilidad de biotina en el medio; sin embargo las histonas presentan marcas de biotilación al ser incubadas en ausencia o presencia de biotina. Estos resultados fueron comprobados en este mismo estudio al incubar a la carboxilasa PC e histonas purificadas y comerciales en dos condiciones

distintas, una con estreptavidina normal y otra con estreptavidina pre-incubada con biotina. En las dos condiciones la marca de las histonas biotiniladas no desapareció ni disminuyó, mientras que la señal para PC solo está presente en la incubación con estreptavidina normal, lo que demuestra que la unión de la estreptavidina a las histonas se da de manera independiente a la presencia de biotina [50].

Por otra parte, en un estudio realizado por Beckett y colaboradores propuso que el producto biotinil-5'-AMP de BirA, en ausencia de la enzima, produce la transferencia de biotina a BCCP87 [51]. Este estudio fue retomado por el grupo de Gravel y colaboradores, que utilizando biotinil-5'-AMP como sustrato en ausencia de las proteínas ligasas de biotina (HCS y BirA), demostraron que la biotina se une de manera covalente en distintos residuos de lisina en la histona H2A, sin existir un incremento en la biotina unida a los residuos de lisina en presencia de HCS o BirA. Estos hallazgos sugieren que el papel de estas enzimas en la biotinilación de histonas, está restringido a la primera reacción de la transferencia de biotina, es decir, la formación del compuesto biotinil-5'-AMP; sin embargo, el segundo componente de la reacción, la transferencia de biotina al residuo de lisina, ocurre de manera no enzimática [52].

Debido a la controversia creada en torno a la biotinilación de histonas y la manera mediante la cual es detectada, distintos grupos realizaron una amplia investigación utilizando diversas técnicas para re-examinar y re-evaluar la detección de biotina en las histonas. En uno de estos estudios se analizó la especificidad de distintas especies de avidina para la detección de biotina, generando anticuerpos acoplados a avidina para ser utilizados en ensayos de "western blot". En este mismo estudio se analizó la incorporación de biotina radioactiva a las histonas en células deficientes de biotina, así como un análisis de espectrometría de masas, la cual es capaz de detectar cantidades picomolares de péptidos sintéticos biotinilados. Sin embargo, ninguno de estos métodos mostró la presencia de biotina en las histonas nativas, a pesar de su habilidad para detectar biotina unida covalentemente a las histonas *in vitro*, así como para la detección de otras modificaciones como acetilación, metilación y fosforilación, presentes en las histonas nativas. Un resultado aún más interesante arrojado por estos estudios, es que los anticuerpos utilizados en los trabajos sobre la biotinilación de histonas tienen una reacción cruzada con marcas de acetilación [53].

En resumen, estas observaciones demuestran que la biotinilación de histonas no es un proceso natural de modificación post-traducciona, por lo que el papel de la biotina como

parte del código de histonas y su efecto sobre la remodelación de cromatina y la regulación transcripcional sigue en duda.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde su descubrimiento como un nutriente esencial para organismos eucariontes a mediados del siglo XX, la vitamina biotina ha sido relacionada principalmente al mantenimiento de la homeostàsis metabólica debido a su papel como cofactor de carboxilasas. Sin embargo, descubrimientos recientes que la describen como un regulador transcripcional y la presencia de HCS en el núcleo celular sugirieron que esta vitamina pudiera participar en la regulación de la expresión genética a través de la biotinilación de histonas. Estudios recientes publicados por tres diferentes laboratorios han revisado los métodos utilizados para la detección de biotina unida a las histonas y han demostrado que la biotinilación de histonas no es una modificación natural de las histonas. Debido a estos resultados la función de la HCS en el núcleo celular permanece sin explicación.

JUSTIFICACION

En años recientes diversos grupos de investigación han reportado la participación de biotina y HCS en diferentes enfermedades genéticas. Estos desordenes genéticos no pueden explicarse con base a las funciones conocidas de la vitamina biotina y la enzima HCS en el metabolismo y regulación transcripcional en células humanas. Los diversos laboratorios que han estudiado a la biotina y la HCS en el núcleo celular han fracasado en identificar su función en este organelo debido principalmente a la complejidad del núcleo celular y la cromatina en células humanas y células de roedores. Por esta razón en este trabajo decidimos utilizar al embrión de *Drosophila melanogaster*, como modelo experimental por las ventajas que representa la presencia de cromosomas politénicos de glándulas salivales, lo que permite el estudio de proteínas asociadas a la cromatina así como la dinámica de asociación de distintos factores durante la activación o represión transcripcional de la expresión génica.

HIPOTESIS

La HCS regula la expresión genética a través de dos mecanismos diferentes. El primero depende de la activación de la cascada de transducción de señales HCS-GCs-PKG. El segundo se basa en la translocación de la HCS al núcleo celular y su asociación con la cromatina.

OBJETIVO

En esta tesis, proponemos indagar la posible función de la enzima Holocarboxilasa sintetasa nuclear, mediante el uso del modelo experimental *Drosophila melanogaster*. En lo particular deseamos entender la distribución y funcionamiento durante diferentes etapas del desarrollo, así como bajo condiciones de activación y represión transcripcional.

*Tráfico y dinámica de
asociación de la
Holocarboxilasa sintetasa a
la cromatina durante el
desarrollo de Drosophila
melanogaster.*

RESUMEN

En este trabajo se estudió la localización celular de la Holocarboxilasa sintetasa y su asociación a la cromatina en diferentes etapas de desarrollo de *Drosophila melanogaster*. La HCS es una enzima de la que se conoce muy bien su participación en la unión de biotina a las carboxilasas dependientes de biotina, y también se conoce por regular la transcripción del gen de HCS y de las carboxilasas mediante el disparo de una cascada de traducción de señales dependiente de GMPc. Además, la presencia de HCS en el núcleo de las células sugiere una función regulatoria adicional, sin embargo el mecanismo involucrado aún se desconoce. En este estudio, mostramos que en embriones de *Drosophila melanogaster* la HCS migra al núcleo durante el estadio de gastrulación. En cromosomas politénicos, la HCS está asociada a bandas de heterocromatina donde co-localiza con marcas de tri-metilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3) pero no con la marca de eucromatina acetilada de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9ac). Los resultados mostraron la asociación de la HCS al promotor del gen *hsp70* mediante inmunofluorescencia e inmuno-precipitación de la cromatina (ChIP, por sus siglas en inglés). Se demostró también, que la HCS ocupa la región del promotor del gen de *hsp70* transcripcionalmente inactivo. Sin embargo, la activación del promotor de *hsp70* por choque térmico resulta en el desplazamiento de la HCS mientras que la región del promotor se enriquece con las proteínas XPB y XPD, subunidades del complejo TFIIH, y con la RNA polimerasa II. En resumen los resultados obtenidos sugieren que la HCS podría tener un papel en la represión transcripcional o silenciamiento genético mediante un mecanismo que involucra su tráfico al núcleo y su interacción con sitios de heterocromatina coincidiendo con la H3K9me3.

1. Introducción

En organismos eucariotes la vitamina biotina juega una función esencial en gluconeogénesis, catabolismo de aminoácidos y síntesis de ácidos grasos como cofactor de carboxilasas dependientes de biotina [8, 19]. En células humanas, la biotinilación de las carboxilasas es catalizada por la enzima Holocarboxilasa sintetasa en una reacción dependiente de ATP que genera un producto intermediario conocido como biotinil-5-AMP (B-AMP) [6, 8]. Nuestro laboratorio demostró que la HCS es un participante obligatorio en el control transcripcional de genes involucrados en el metabolismo de biotina. El papel regulatorio de HCS involucra la activación de una cascada de traducción de señales dependientes de B-AMP que incluye la participación de la Guanilato ciclasa soluble y la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) [37, 54]. Paradójicamente, la deficiencia de biotina, al interferir con el funcionamiento de la cascada de señalización dependiente de HCS, reduce la expresión de genes involucrados en el transporte y utilización de biotina en riñón, hígado y músculo pero no en el cerebro [55] o corazón. Nuestro grupo de investigación propuso que la cascada de transducción de señales HCS-GCs-PKG es la base de un mecanismo que controla la distribución tejido-específica de biotina que asegura un continuo suministro de esta vitamina al cerebro durante estrés nutricional [55].

Aunque tradicionalmente se había considerado que el papel de la HCS estaba restringido a la función y regulación de carboxilasas, recientemente se ha localizado a esta enzima en el núcleo de células humanas [49]. Se ha demostrado que en el núcleo celular la HCS está asociada con proteínas de la lámina nuclear y localizada en focos discretos durante la mitosis. Otros estudios han reportado a la biotina como una modificación covalente de las histonas lo cual explicaría la función nuclear de HCS, aunque los estudios iniciales habían atribuido la biotinilación de las histonas a la acción de la biotinidasa, enzima responsable de reciclar a la biotina [39]. Esto condujo a la propuesta de que la biotinilación de las histonas podría ser una modificación post-traducciona involucrada en la regulación de la expresión de genes mediante la modificación de la estructura de la cromatina [39, 44-46]. Sin embargo, el significado fisiológico de la biotinilación de las histonas *in vivo* ha sido cuestionada por trabajos recientes, en los cuales, los métodos utilizados para detectar la unión de biotina a las histonas fueron exhaustivamente analizados [53]. Estos trabajos demuestran que, mientras la biotina puede ser detectada en carboxilasas o histonas biotiniladas *in vitro*, la biotinilación de histonas endógenas no puede ser detectada en células en cultivo con métodos de detección con una sensibilidad de al menos una en 100,000. Estos trabajos proponen que la

detección de biotina en histonas puede ser debido a una serie de factores que incluyen la habilidad de la estreptavidina para interactuar con histonas libres de biotina, a una reacción de biotilación no-enzimática [50, 51] y a que los anticuerpos generados contra la biotilación de las histonas muestran una reacción cruzada con histonas acetiladas [50-53]. Estos estudios demuestran que la biotina no es una modificación natural de las histonas, dejando sin explicación la función de HCS en el núcleo [53].

En este trabajo investigamos la función nuclear de HCS estudiando la distribución y comportamiento de esta enzima en *Drosophila melanogaster* con el objetivo particular de conocer su dinámica de localización celular y asociación a la cromatina durante el desarrollo y bajo condiciones de activación o represión transcripcional. Los resultados obtenidos muestran que en embriones la HCS es una proteína citoplásmica y que conforme avanza el desarrollo ésta migra al núcleo hasta convertirse predominantemente en una proteína nuclear en tejidos diferenciados. En este trabajo mostramos, además, que la HCS nuclear se asocia al cromocentro y a bandas de heterocromatina en donde colocaliza con la marca de trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3). Ensayos ChIP demostraron la asociación de HCS con la región promotora del gen *hsp70* inactivo y que la enzima es desplazada de la región promotora HCS durante la activación transcripcional inducida por choque térmico. Estos resultados contrastan con los obtenidos con la RNA polimerasa II y por las subunidades de TFIIH; XPD y XPB, las cuales se enriquecen en la región promotora de *hsp70* sólo después de que la activación transcripcional es inducida. Estos resultados nos llevan a proponer que la HCS nuclear es reclutada a dominios de heterocromatina durante eventos de represión transcripcional.

2. Materiales y Métodos

2.1 Stock de moscas

La línea *w*¹¹⁸ de *Drosophila melanogaster*, fue utilizada en todos los ensayos de este trabajo. Las moscas fueron mantenidas bajo condiciones estándar a 25°C.

2.2 Ensayos de inmunofluorescencia

Embriones de *Drosophila* en distintas etapas del desarrollo fueron decorionados en hipoclorito de sodio al 2.5%, seguidos de una fijación con una solución 1:1 de formaldehído:heptano y desvitelinizados con metanol. Las glándulas salivales de *Drosophila* fueron aisladas de larvas de tercer instar y colocadas en una solución de NaCl al 0.7% en hielo.

Los ensayos de inmunofluorescencia en embriones y glándulas salivales se iniciaron con un bloqueo de sitios blanco inespecíficos, utilizando suero de cabra al 10% en TBS-T durante toda la noche a TA en agitación. A continuación fueron incubadas con un anticuerpo policlonal que reconoce a HCS completa (HCS-FL) (donado por el Dr. Roy Gravel, Universidad de Calgary, Canada) a una dilución de 1:2000 en TBS-T durante toda la noche a 4°C en agitación, el exceso de anticuerpo primario fue eliminado con seis lavados de TBS-T seguidos por la incubación con un anticuerpo secundario acoplado a un colorante de cianina, en este caso, Cy3 (Rockland), a una dilución de 1:1000 durante tres horas a TA en agitación; por último se realizaron seis lavados mas con TBS-T. El ADN fue teñido con 15 nM de Sytox green (Roche). Las muestras fueron montadas en citofluor y observadas al microscopio.

Los cromosomas politénicos fueron aislados de larvas de tercer instar y preparados como lo describe Reynaud *et al.* 1999. Los cromosomas se lavaron tres veces con PBS-I y tratados con RNasa (100 µg/ml) durante 1 hora a TA, después fueron lavados tres veces con PBS-I y bloqueados con 10% de leche en PBS-I durante dos horas a TA. Para las dobles inmunofluorescencias se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios en las diluciones indicadas: HCS-FL (1:2500), TBP (1:100) (Santa Cruz Biotechnology), XPB y XPD (1:250) [56, 57], RNA polimerasa II Ser5 (1:500) (Covance), HP1 (1:100) (Developmental Studies Hybridoma Bank), H3K9me3 y H3K9ac (1:100) (Upstate). Las preparaciones de cromosomas fueron lavados con PBS-T, seguidas de la incubación con anticuerpos secundarios acoplados a los siguientes fluoróforos: cabra anti-conejo Cy3 (1:1500), cabra anti-ratón Cy2 (1:500), cabra anti-rata Cy2 (1:50) (Rockland), cabra anti-ratón Rodamina

Red-X (1:1000) (Jackson ImmunoResearch), Alexa fluor 488 y 568 (1:100) (Invitrogen). El material genético fue visualizado con 15 nM de Sytox green (Roche).

Las muestras de embriones, glándulas salivales y cromosomas politénicos fueron visualizados utilizando un microscopio confocal (Zeiss), perteneciente a la unidad de microscopía del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

2.3 Purificación de la HCS humana

El ADNc de HCS (2,2 Kb) fue amplificado mediante PCR a partir de la clona BL-11 [7] con los siguientes oligonucleótidos: sentido 5' - TTT GAG CTC ATG GAG GAT AGA CTC C - 3' y anti-sentido 5' - GTT TGC CGC CAT TAC AGC TGG CAC - 3'. El producto de PCR fue clonado en el vector pQE30 (Quiagen) para expresar HCS como una proteína de fusión conteniendo seis residuos de histidina en la región amino-terminal (His6-HCS) en *E. coli* (*DH5α*). La proteína recombinante fue purificada a partir de extractos totales de *E. coli* utilizando una columna de níquel (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La proteína unida a las perlas de níquel fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. La pureza de HCS recombinante se verificó mediante la tinción con azul de coomassie y por “western blot” utilizando el anticuerpo anti-HCS.

2.4 Electroforesis de proteínas (Western blot)

Para preparar extractos de proteínas totales de células HepG2 humanas, los cultivos celulares fueron incubados en bufer de lisis (10 mM KCl, 50 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA pH 8, 0.1% NP40 e inhibidores de proteasas) durante 20 minutos en hielo con agitación. La solución resultante fue centrifugada a 13,200 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante conteniendo las proteínas citoplásmicas fue colocado en un nuevo tubo y cuantificado a una absorbancia de 280 nm en el espectofotómetro Nanodrop. Para cada ensayo de “western blot” fueron utilizados 80 µg de proteína. En el caso de los extractos proteicos de larvas de *Drosophila*, éstos fueron obtenidos al lavar en agua estéril por inmersión 5 larvas de 3er instar para cada ensayo y después colocadas en un tubo eppendorf para su lisis en 20 µl de bufer de carga 4X (30% glicerol, 250 mM Tris-HCL pH 6.8, 8% SDS, 0.02% azul de bromofenol, 300 mM DTT), 20 µl de agua destilada estéril e inhibidor de proteasas (1:25) (Roche). Las larvas fueron homogeneizadas dentro del tubo con un pistilo de plástico y colocadas en un baño a 95°C durante 10 minutos. La muestra se centrifugó a 13,200 rpm durante 5 minutos en frío y 30 µl del sobrenadante fue utilizada para el ensayo.

Los extractos protéicos de las células HepG2 y de *Drosophila* fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% (SDS-PAGE). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Millipore). Se realizó análisis de “western blot” utilizando el sistema de detección de proteínas SNAP id (Millipore) usando el anticuerpo anti-HCS 1:2000 o el anticuerpo anti-HCS pre-absorbido en solución de bloqueo (0.01% caseína (Roche) en TBST). El anticuerpo secundario cabra anti-conejo acoplado a peroxidada (Invitrogen) fue usado en una dilución de 1:15,000.

2.5 Tratamiento de larvas de *D. melanogaster* con choque térmico (Heat Shock)

Las glándulas salivales aisladas de larvas de tercer instar de *D. melanogaster* fueron mantenidas en el medio Sf-900 II (Gibco) adicionado con FBS (1:10) en hielo. Cada set de 100 pares de glándulas fue sometido a choque térmico a 42°C durante 5 minutos, para inducir la formación de *puffs*. Los squash para análisis de inmunofluorescencia, así como los ensayos de ChIP fueron realizados inmediatamente.

2.6 Inmuno-Precipitación de la Cromatina (ChIP)

El ensayo de ChIP se realizó en larvas de 3 instar con y sin heat shock. La disección de glándulas salivales para ambos grupos fue realizada como se mencionó previamente. Para fijar las proteínas al ADN (crosslink) las glándulas fueron tratadas con 1.2% de formaldehído (Merck) en PBS durante 15 minutos a TA y en rotación, una vez fijadas, las glándulas se dejaron en hielo hasta sedimentarse y eliminar el sobrenadante. Las glándulas fueron lavadas tres veces con PBS-T .01% durante diez minutos con ciclos de sedimentación entre ellos. Una vez eliminado cualquier residuo de PBS-T las glándulas se congelaron en nitrógeno líquido y almacenadas a -70°C hasta su uso. Para continuar el ensayo de ChIP, las muestras se descongelaron lentamente en hielo y fueron resuspendidas e incubadas por diez minutos en bufer de lisis (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8 mas inhibidores de proteasas (Roche)) dando suaves golpeteos para disgregar las muestras. Pasado el tiempo de incubación la cromatina fue fragmentada mediante sonicación en hielo hasta obtener fragmentos de cromatina entre 100-500 pb, para lo cual fueron necesarios 20 pulsos a una amplitud de 35% durante 45 segundos y un minuto en hielo al final de cada pulso. Para eliminar los restos del tejido, las muestras se centrifugaron diez minutos a máxima velocidad a 4°C. La muestra celular fue diluida diez veces en bufer de ChIP (0.01% SDS, 1.1% Tritón X-100, 1.2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 0.1% deoxicolato de sodio, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.0, mas inhibidores de proteasas). En cada ensayo de ChIP, la muestra diluida fue distribuida en diferentes tubos correspondientes al control positivo (Input), el control

negativo (Mock) y la del anticuerpo (anti-HCS o anti-RNA pol II). El control positivo corresponde al 5% de la cromatina total, la cual se separa y se congela antes de iniciar cualquier procedimiento del ensayo. El control negativo cuya única diferencia con respecto a las demás, es la incubación solo con la sefarosa en ausencia de anticuerpo, con el objetivo de demostrar la especificidad de cada anticuerpo utilizado.

Una vez separada la muestra en cada tubo se eliminaron interacciones inespecíficas mediante dos pre-lavados, uno de tres horas y otro durante toda la noche a 4°C y en rotación, utilizando 50 µl de sefarosa en una relación 1:1 con bufer ChIP; las perlas fueron eliminadas y el sobrenadante conteniendo la cromatina fue incubado por tres horas con los anticuerpos específicos antiHCS-FL (2 µg) o anti-RNA pol II Ser 2 (20 µg) (Covance) a 4° en rotación. El complejo anticuerpo-proteína-ADN fue precipitado mediante la incubación con 50 µl de proteína-sefarosa A/G (Invitrogen) en el caso del ChIP anti-HCS o sefarosa 4B IgM rata anti-ratón (Zymed) para el ChIP anti- RNA pol II, mediante centrifugación a 1,200 rpm a 4°C durante 10 minutos. El complejo precipitado fue lavado cinco veces con bufer ChIP, dos veces con bufer de baja y alta sal (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0 con 150 mM o 500 mM NaCl, respectivamente), dos veces con bufer de LiCl (250 mM LiCl, 1% Igepal, 1% deoxicolato de sodio, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8) y dos veces con TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8). La duración de cada lavado fue de 10 minutos en rotación a TA seguidos por un minuto de centrifugación a 1000 rpm a 4°C. El complejo fue resuspendido en 200 µl de TE y cambiado de tubo. A partir de este momento el input fue descongelado y tratado bajo las mismas condiciones que las muestras con RNasa (50 µg/ml) durante 30 minutos a 37°C, seguido de 0.5% de SDS y proteinasa K (0.5mg/ml) por una hora a 45°C. El crosslink fue revertido mediante una incubación a 65°C durante toda la noche en termomixer con 500 rpm. Las muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad (13,400 rpm) durante 10 minutos en frío para eliminar todas las perlas de agarosa. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y el ADN se purificó dos veces con fenol-cloroformo (1:1) centrifugando entre cada una de ellas 15 minutos a máxima velocidad a temperatura ambiente. El sobrenadante conteniendo el ADN se incubó con cloroformo para eliminar restos de fenol, se agitó en vortex por un minuto y se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad. La muestra se cambió de tubo y el ADN se precipitó con 20 µg de glicógeno, 1/10 volúmenes de NaAc 3M pH 5.2 y 3 volúmenes de etanol absoluto frío. La solución de precipitación se dejó durante dos horas a -20°C y se centrifugó durante 20 minutos a máxima velocidad a 4°C. El sobrenadante se desechó y el pellet se lavó con etanol

al 70% frío y se centrifugó por 15 min a máxima velocidad a 4°C, el sobrenadante se eliminó y el pellet se resuspendió en 20 µl de agua estéril (Gibco).

Cada muestra del ChIP fue sometida a PCR, para amplificar un fragmento de ADN de ~110 pb (+4 a +113) del promotor del gen *hsp70*, para lo cual se utilizaron los siguientes nucleótidos específicos: sentido: 5'-CTATTCAAACAAGTAAAGTGAACAC-3'; y antisentido: 5'-ACTAAGTGAAATTGAACGTGAAAT-3'. Las condiciones de PCR fueron: Inicio: 5 min a 95°C, desnaturalización del ADN: 1 min a 95°C, alineamiento: 1 min a 60°C, elongación de la cadena: 30 seg a 72°C y extensión final: 2 min a 72°C. Se realizaron 30 ciclos de amplificación y el producto de PCR se mantuvo a 4° hasta su uso. Los productos de PCR fueron observados en geles de acrilamida al 5% en TBE 5X (1M Tris; 900 mM Acido Bórico; 25 mM EDTA pH 8.0) en bufer de TBE 1X durante 1:30 horas a 100 Volts. Los geles fueron incubados con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) en TBE 1X en movimiento por 5 minutos, seguido de tres lavados de 10 minutos con agua destilada estéril y observados en un trans-iluminador.

2.7 Análisis Estadísticos

Cada ensayo de ChIP se realizó en tres diferentes experimentos utilizando diferentes preparaciones de cromatina. Los productos de PCR fueron cuantificados utilizando el FX-Molecular Imager (BioRad) y los resultados fueron normalizados con la densidad de los productos de PCR obtenidos de las larvas de *Drosophila* no tratadas. Los datos se presentan como el promedio ± error estandar. Las diferencias entre las glándulas salivales no tratadas y tratadas con choque térmico demostraron ser estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

3. Resultados

3.1 Caracterización funcional de anticuerpos contra la Holocarboxilasa Sintetasa humana.

Para explorar la posibilidad de utilizar anticuerpos contra la HCS humana, en estudios de localización celular de HCS durante el desarrollo de embriones de *Drosophila melanogaster*, determinamos el grado de homología en los distintos dominios que componen a las ligasas de biotina humana y de mosca. La comparación de las secuencias de HCS de *Drosophila* (1041 aminoácidos) y de la HCS humana (726 aminoácidos) contenidas en las bases de datos de GenBank (Número de acceso **X80160.1**) y de EMBL (Número de acceso **X80160**), mostraron que comparten áreas específicas de homología.

Estas dos proteínas comparten 43% de identidad entre sus dominios catalíticos, amino ácidos 466-726 y 782-1041 en la enzima humana y de *Drosophila*, respectivamente (Figura 12 A y B). Estudios anteriores utilizando cristalografía de rayos-X y análisis de NMR, identificaron dos dominios estructurales (aminoácidos 460-669 y 670-726) en el carboxilo terminal de la HCS humana, que está altamente conservada entre todas las ligasas de biotina [10]. Fuera de su dominio catalítico la homología entre las dos proteínas es menor al 30% de identidad en la región media y menor al 10% de identidad en el dominio amino-terminal (Figura 12 A).

Anticipándonos al potencial de epítopes comunes en el dominio catalítico, probamos si el anticuerpo anti-HCS humana podía detectar a la HCS de *Drosophila* mediante “western blot”. Para ello, utilizamos extractos totales de proteínas provenientes de células humanas y de *Drosophila* los cuales se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Los blots resultantes fueron incubados con el anticuerpo anti-HCS humana. En los extractos de HepG2, identificamos dos bandas mayoritarias de 82 y 80 KDa y dos menos abundantes de 70 y 62 KDa (Figura 12 C). El peso molecular aparente de las bandas obtenidas reproduce las diferentes isoformas de HCS reportadas anteriormente en distintas líneas celulares humanas, así como en placenta humana [13, 14, 49]. El análisis de los extractos de proteínas de larvas de *Drosophila* utilizando el mismo anticuerpo, revelaron una sola banda de aproximadamente 125 KDa (Figura 12 D). La especificidad del anticuerpo anti-HCS se confirmó mediante la pre-absorción del suero con la HCS recombinante total unida a perlas como se describe en Materiales y Métodos. El anticuerpo pre-absorbido no detectó ninguna

de las bandas definidas con el anticuerpo sin tratar en los análisis de “*western blot*” en los extractos proteicos humanos y de las larvas de moscas (Figura 12 C y D, PA anti-HCS).

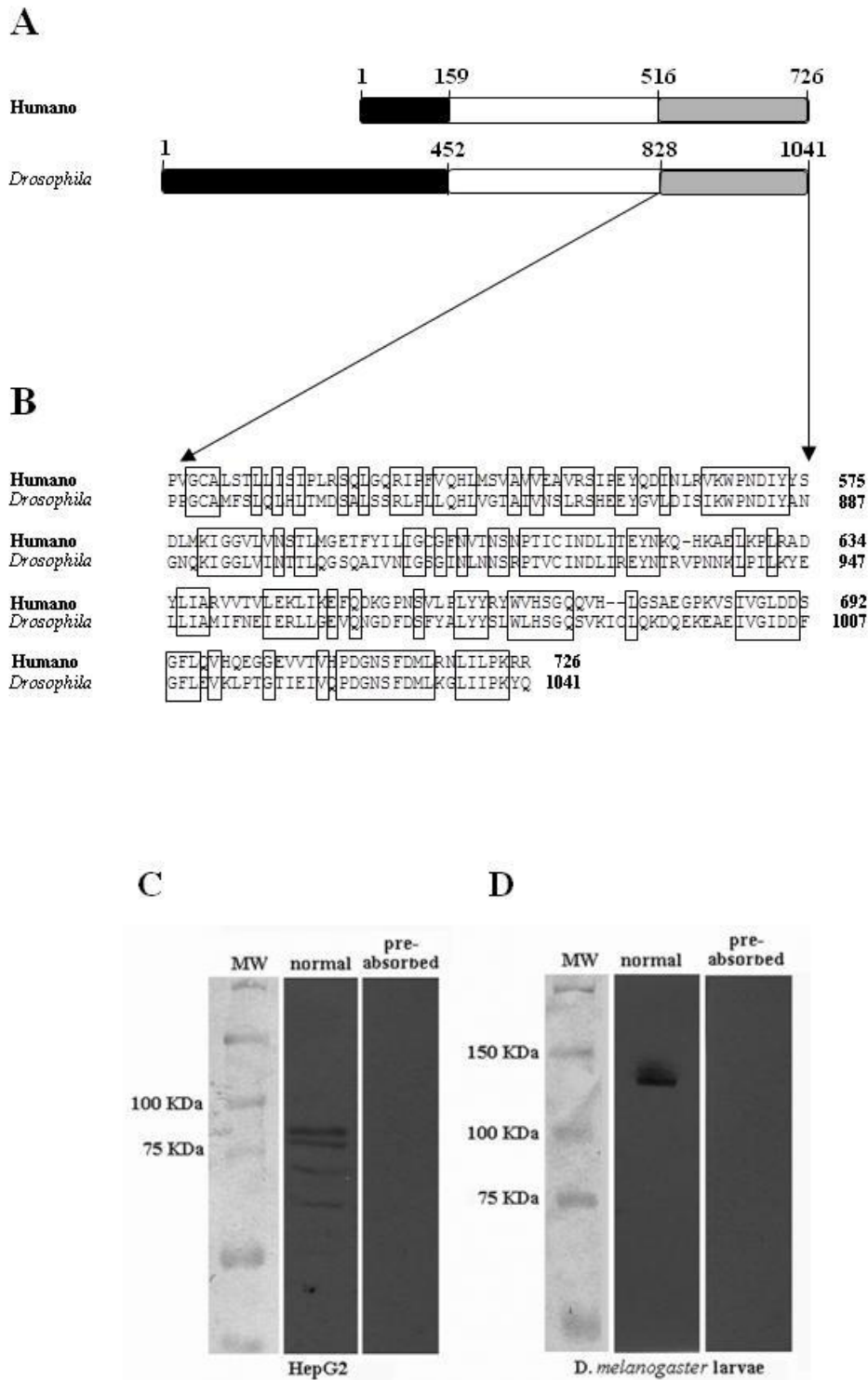


Figura 12. Conservación en la secuencia de aminoácidos y perfil de expresión proteica de HCS en humanos y *Drosophila melanogaster*. (A) Representación esquemática de HCS humana y de *Drosophila* la cual muestra la homología en su secuencia: Dominio amino terminal, <10% de identidad (■); Dominio intermedio, <30% de identidad (□); Dominio carboxilo terminal, 43% identidad (■). (B) Alineamiento de la secuencia del dominio carboxilo terminal de HCS humana y de mosca. (C y D) Análisis de “western blot” de extractos celulares de HepG2 (C) y extractos de *Drosophila melanogaster* (D), usando anti-HCS normal (α HCS) o anti-HCS pre-absorbido con HCS total purificada (PA α HCS). Marcadores de peso molecular (MW) a la izquierda de cada panel.

3.2 La Holocarboxilasa Sintetasa migra al núcleo celular después de la etapa de gastrulación en embriones de *Drosophila melanogaster*.

Para determinar la localización sub-celular de la HCS durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*, examinamos su distribución en embriones mediante la técnica de inmunocitoquímica. Utilizando un anticuerpo anti-HCS demostramos que esta proteína es depositada por la madre en el blastodermo sincicial temprano y se encuentra distribuida uniformemente en el citoplasma (Figura 13 A). Durante las divisiones nucleares 10 y 13, la tinción del ADN con sytox green permite observar que los núcleos migran hacia la periferia de los embriones. En esta etapa, la HCS comienza a ser desplazada hacia la periferia de los embriones rodeando a los núcleos como una banda densa (Figura 13 B y C). Durante la etapa de celularización, en la división nuclear 13-14, la HCS continúa localizándose en el citoplasma mientras que los núcleos se separan por membranas (Figura 13 D). Durante la fase de gastrulación, la HCS comienza a estar presente en el núcleo de algunas células co-localizando con el ADN genómico (Figura 13 E), sugiriendo que la HCS migra al núcleo celular después de comenzada la diferenciación celular.

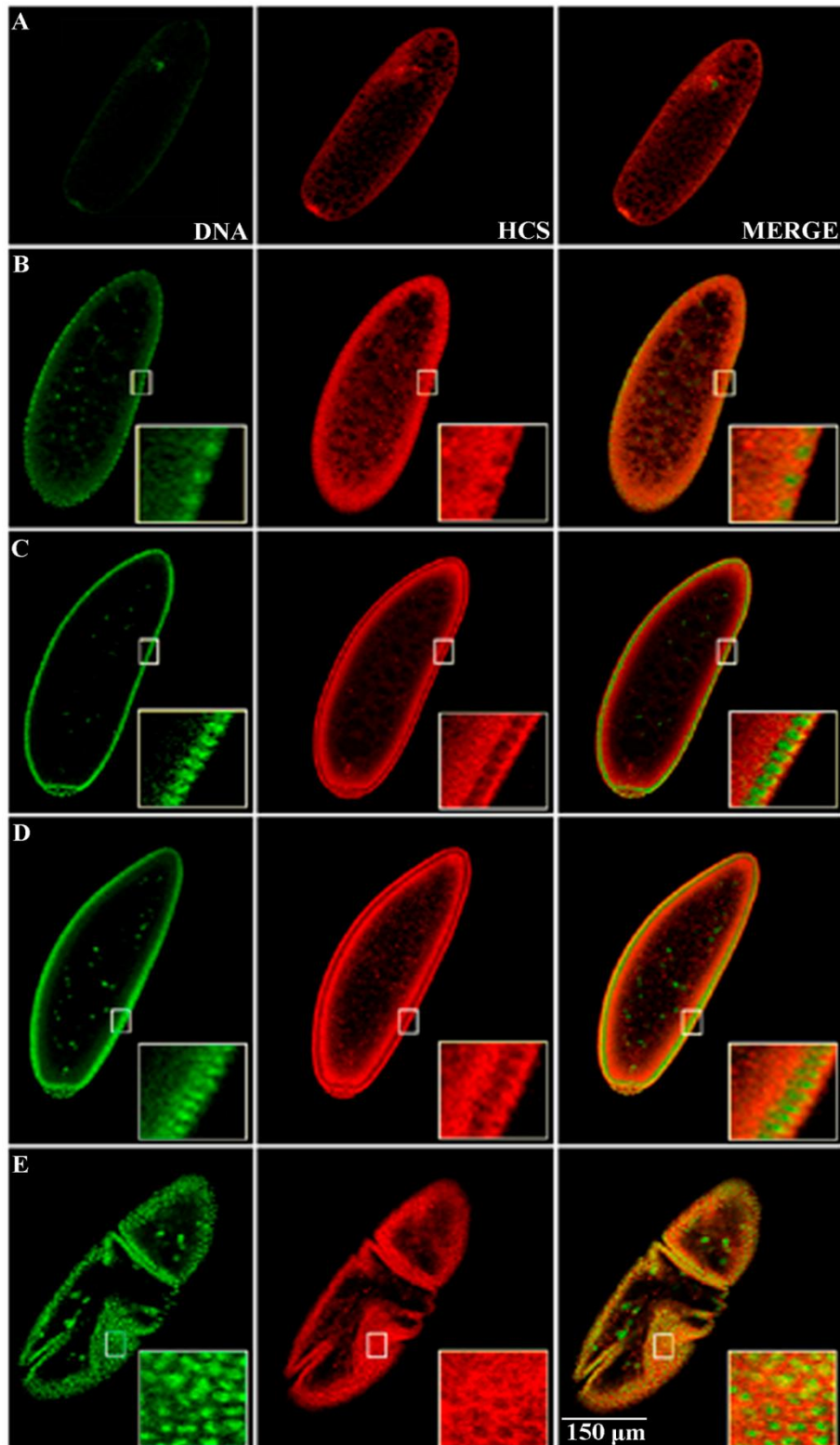


Figura 13. Tráfico de HCS durante el desarrollo temprano de *Drosophila melanogaster*. La localización de HCS en embriones de distintas etapas de desarrollo fue determinada utilizando un anticuerpo anti-HCS (rojo) y sytox para visualizar el ADN (verde) mediante microscopía confocal. La co-localización de HCS y el ADN genómico aparece en amarillo después de superponer las dos imágenes (merge). (A) Blastodermo sincicial: HCS está distribuida en el citoplasma. (B) Blastodermo sincicial de un embrión en la división nuclear 10: los núcleos se mueven a la periferia del embrión y HCS comienza a concentrarse alrededor de los núcleos. (C, D) Embriones en la división nuclear 13 y celularización: HCS aparece localizada principalmente en la periferia de los embriones alrededor del núcleo. (E) Embriones en gastrulación: HCS está localizada en el citoplasma, pero comienza a aparecer en el núcleo de algunas células. Selección de áreas de embriones, indicadas en cuadros blancos, son vistas a mayor aumento para mostrar la localización de HCS con respecto al ADN genómico.

Para confirmar la presencia de HCS en el núcleo celular, estudiamos su localización en glándulas salivales de larvas de *Drosophila*. Los ensayos de inmunotinción mostraron que la HCS se localiza predominantemente en el núcleo de las células de glándulas salivales donde colocaliza con el ADN genómico (Figura 14 A).

3.3. La HCS nuclear está localizada en dominios de cromatina enriquecidos con la marca epigenética de represión transcripcional H3K9me3 en cromosomas politénicos de *Drosophila*.

Para explorar si HCS nuclear está asociada con la cromatina en células diferenciadas, fueron examinados mediante inmunotinción con el anticuerpo anti-HCS, cromosomas politénicos aislados de glándulas salivales de larvas de *Drosophila*. Estos experimentos revelaron que HCS es una proteína que se asocia a la cromatina, enriquecida en bandas discretas a lo largo de todos los cromosomas. La HCS parece localizarse en bandas de heterocromatina enmarcando interbandas de cromatina menos compacta y que representa dominios transcripcionalmente activos (Figura 14 B). La especificidad del anticuerpo anti-HCS fue confirmada al pre-adsorber el suero con la HCS purificada unida a perlas como se describe en Materiales y Métodos. Tal y como se mostró en los “*western blot*” al pre-adsorber el anticuerpo, existe una pérdida completa de señal al incubarlo con cromosomas politénicos (datos no mostrados).

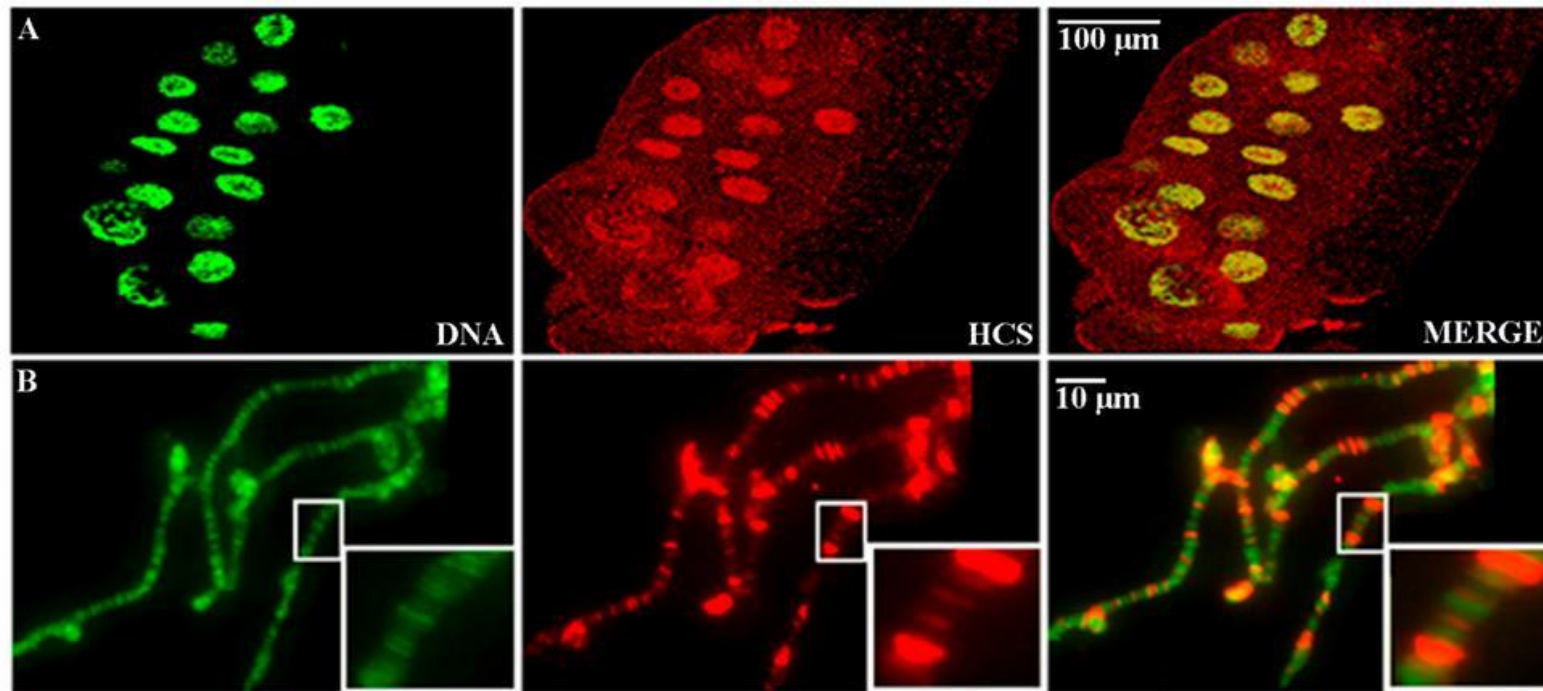


Figura 14. Localización subcelular y cromosomal de HCS en glándulas salivales y cromosomas politénicos de larvas de *Drosophila*. DNA (verde) y HCS (rojo) fueron visualizadas en glándulas salivales (A) y en cromosomas politénicos (B), como se describe en Materiales y Métodos. (A) En células de glándulas salivales, HCS es más abundante en el núcleo que en el citoplasma y muestra una fuerte colocalización (merge) con el DNA genómico. (B) Análisis de inmuno-fluorescencia de cromosomas politénicos usando el anticuerpo anti-HCS, muestran que esta proteína está localizada en bandas discretas a lo largo de todos los cromosomas. Áreas seleccionadas en los cromosomas politénicos, indicados en cuadros blancos, a mayor aumento para mostrar la localización heterocromática de la HCS.

Para discriminar entre el reclutamiento de la HCS cromosomal a dominios de heterocromatina o de eucromatina, se realizaron inmunotinciones para localizar a la HCS con respecto a marcas de modificación de las histonas como la trimetilación (H3K9me3) o acetilación (H3K9ac) de la lisina 9 de la histona H3. Las marcas epigenéticas H3K9me3 y H3K9ac han sido asociadas a cromatina transcripcionalmente reprimida o activa, respectivamente [58]. Inmunotinciones de cromosomas politénicos con anticuerpos anti-H3K9me3 o anti- H3K9ac (en rojo cada una) comparado con la distribución obtenida con el anti-HCS (verde) se muestran en la Figura 15 pánels A y B, respectivamente. Las inmunotinciones para la marca de la histona H3K9me3 revelan una fuerte co-localización con HCS en el cromocentro y en distintas bandas en todos los cromosomas de *Drosophila melanogaster* (Figura 15 A). Estos resultados contrastan con la inmunodetección de la HCS comparado con la H3K9ac. En este sentido, HCS (verde) y H3K9ac (rojo) están distribuidas en bandas a lo largo de todos los cromosomas, pero sin que aparentemente co-localicen. Las bandas rojas y verdes son discretas y la evidencia de amarillo, indicando presencia de las dos proteínas, está ausente (Fig. 15 B). La localización independiente de la HCS y H3K9ac se evidencia claramente en el cromocentro de los cromosomas politénicos en donde la señal de la HCS está fuertemente enriquecida y no hay H3K9ac (Fig. 15 B). Estos datos apoyan la idea de que la HCS nuclear se encuentra asociada con dominios de heterocromatina en cromosomas politénicos.

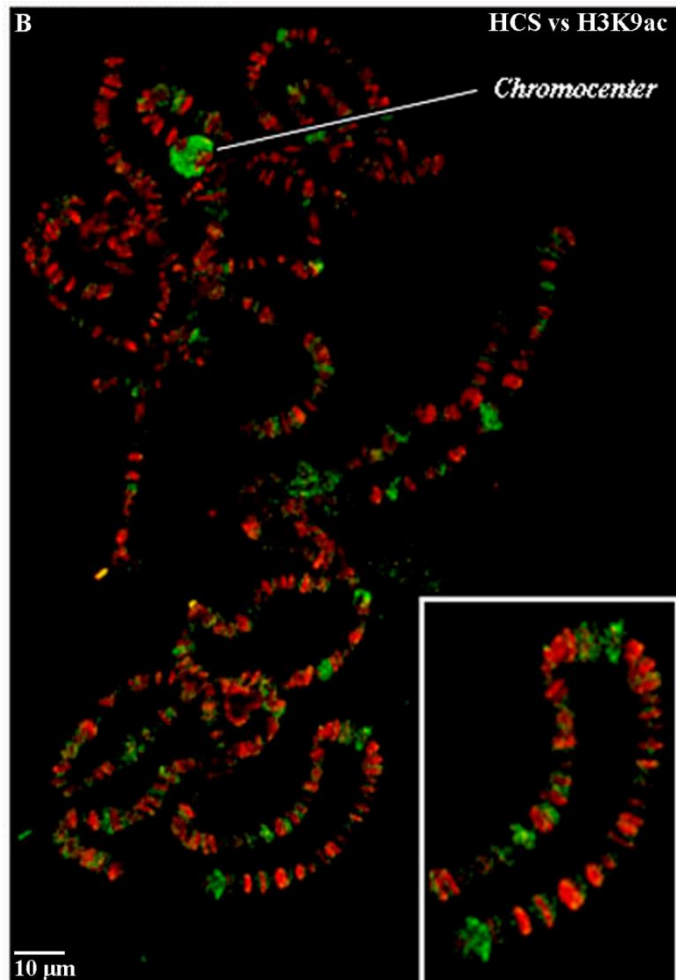
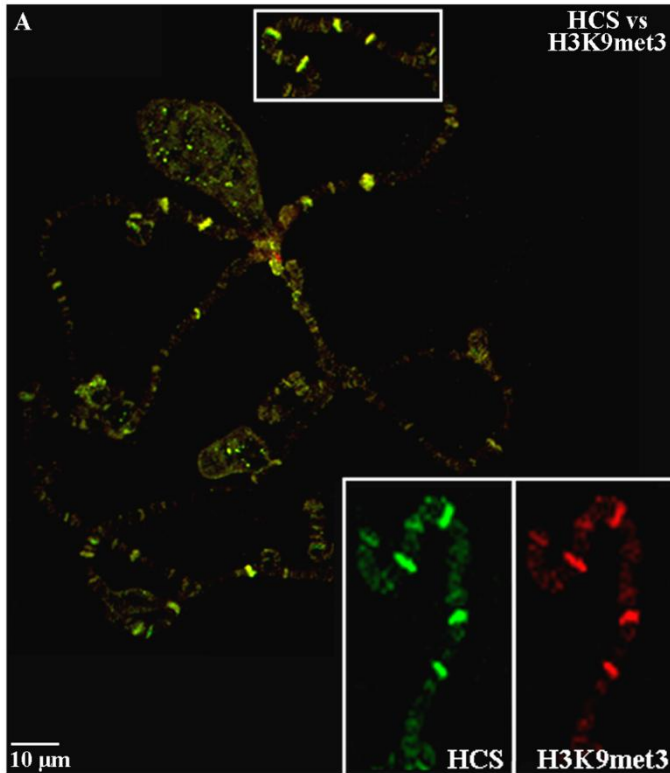


Figura 15. Co-localización de HCS con las marcas epigenéticas H3K9me3 y H3K9ac en cromosomas politénicos. Cromosomas politénicos de *Drosophila* fueron inmunoteñidos con el anticuerpo anti-HCS (verde) y anticuerpos contra las marcas epigenéticas (rojo) H3K9me3 (A) y H3K9ac (B). Se muestran como superposición ambas imágenes para mostrar co-localización (amarillo). (A) Áreas elegidas en los cromosomas politénicos, las cuales muestran la localización de HCS (verde) relativa a la marca de heterocromatina H3K9me3 (rojo) dentro de cuadrados blancos a mayor aumento. (B) localización de HCS (verde) con relación a la marca de eucromatina H3K9ac (rojo). Áreas elegidas muestran que la HCS no co-localiza (ausencia de amarillo) con la H3K9ac, en ampliaciones dentro de cuadrados blancos.

3.4 La activación de la transcripción mediante choque térmico no causa la disociación de la Holocarboxilasa Sintetasa del locus de *hsp70* en los cromosomas politénicos de *Drosophila*.

Para explorar la dinámica de la asociación de la HCS a la cromatina durante la activación de la transcripción, estudiamos la presencia de esta proteína en el locus de *hsp70* en cromosomas politénicos obtenidos de glándulas salivales de larvas de *Drosophila* normales y expuestas a choque térmico. El locus de *hsp70* está localizado en la posición 87A del cromosoma 3R (Figura 16 panel PC no tratados). La dinámica de expresión del *hsp70* inducido por calor ha sido utilizado como una herramienta para determinar la asociación de diferentes proteínas con miembros de la maquinaria basal de la transcripción [59-61]. La exposición de las larvas a 42°C por 5 minutos produce la clásica estructura de *puff* en el locus de *hsp70* en los cromosomas politénicos, lo cual indica que este dominio ha sido activado transcripcionalmente (Figura 16 PC tratados con calor). Nuestros resultados muestran que mientras la HCS está presente en el locus silenciado de *hsp70* en cromosomas de *Drosophila* (Figura 16, HCS no tratado), y que la formación del *puff* inducido por calor resulta en el desplazamiento de la HCS de este dominio (Figura 16 HCS tratado con calor). En estos experimentos, la localización de la proteína de unión a la caja TATA (TBP) ha sido utilizada como un control interno, a partir de que se conoce que está presente en el promotor del gen de *hsp70* no transcrito (Figura 16 TBP no tratado) y desplazado de este dominio tras el choque térmico (Figura 16 TBP tratado con calor) [61]. Al fusionar las imágenes de HCS y TBP observamos que las dos proteínas co-localizan en el locus de *hsp70* inactivo (Figura 16 no tratado).

Como control de la especificidad de nuestros resultados, incubamos los cromosomas de moscas tratadas previamente con choque térmico, con anticuerpos anti-HCS y componentes del complejo de pre-inicio de la RNA pol II, incluyendo subunidades del factor de transcripción II H (TFIIH), la XPB y XPD [59, 60] y la RNA pol II fosforilada en la serina 5 del CTD (Figura 17). Como se esperaba, el locus de *hsp70* activo transcripcionalmente mostró una señal intensa de la XPB, XPD y la RNA pol II, mientras que HCS se disocia de este dominio (Figura 17). Estos resultados sugieren que la presencia de la HCS en el locus de *hsp70* se interrumpe después de la activación transcripcional.

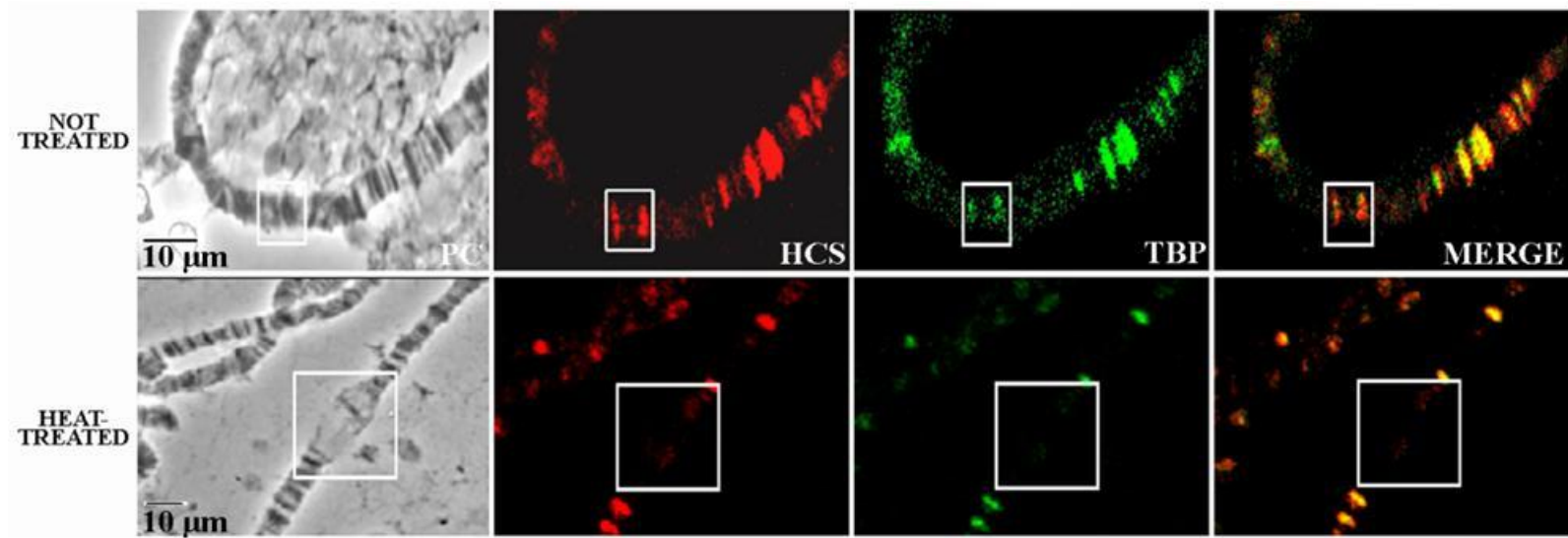


Figura 16. Inmuno-localización de HCS en el locus de *hsp70* de cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster*. Los cromosomas politénicos aislados de larvas de tercer instar como control (no tratados) y tratados con choque térmico (choque térmico) fueron inmuno-teñidos con el anticuerpo anti-HCS (rojo) o anti-TBP (verde). Las imágenes en contraste de fases de los cromosomas politénicos muestran dentro de cuadros blancos el locus de *hsp70* antes (panel de arriba) y después (panel de abajo) de la formación del *puff* correspondiente a la inducción con calor. En los cuadros del panel de abajo se muestra la co-localización de HCS y TBP (bandas amarillas) en el dominio de *hsp70* inactivo después de sobreponer las imágenes.

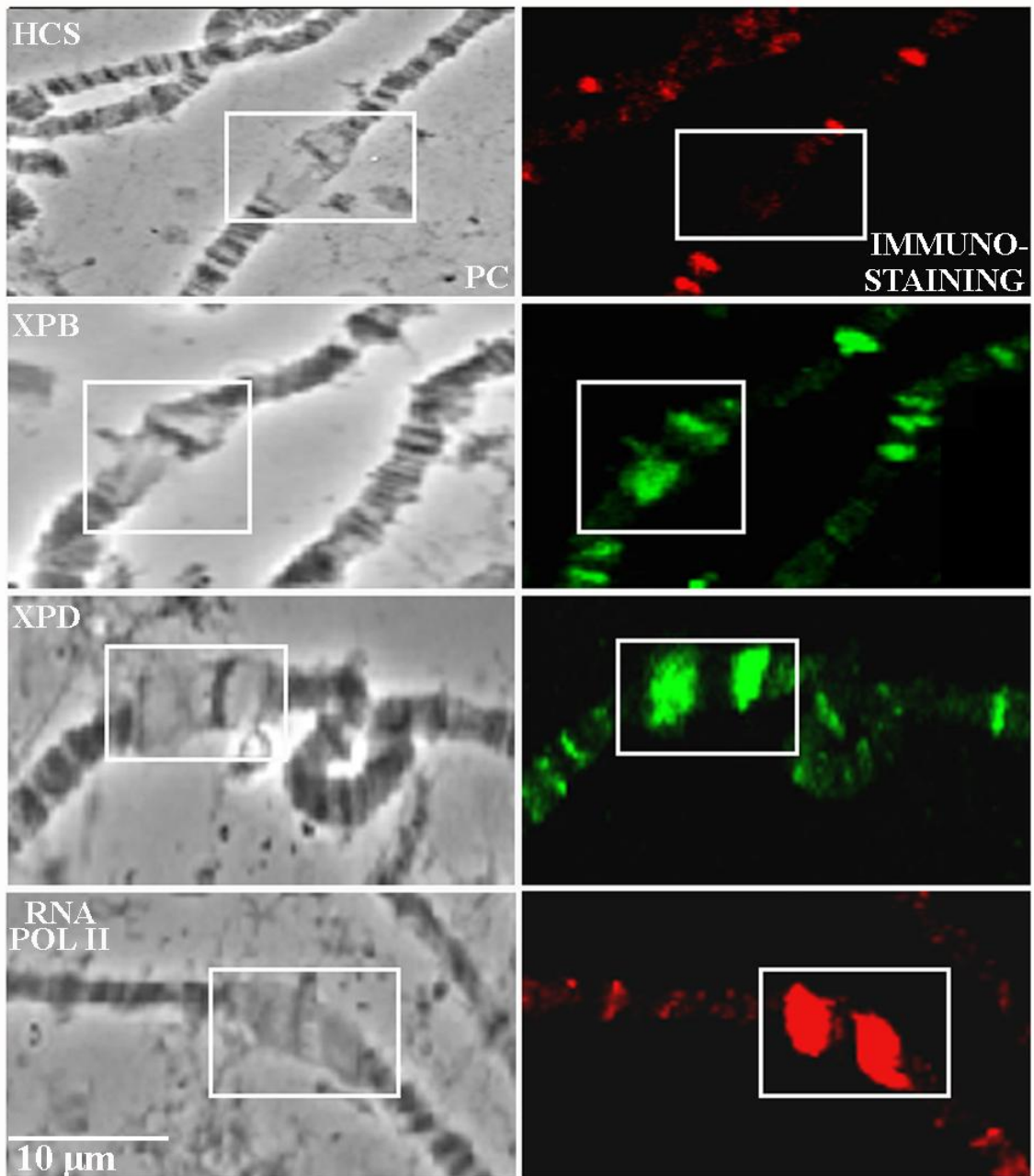


Figura 17. Localización de HCS, XPB, XPD y la RNA pol II en el dominio de *hsp70* en cromosomas politénicos tratados con choque térmico. El panel de la izquierda muestra la imagen en contraste de fases de los cromosomas politénicos aislados de larvas de *Drosophila* tratadas con choque térmico, las cuales muestran la formación de la estructura de *puff* en el dominio de *hsp70* (dentro de cuadros blancos). El panel de la derecha muestra la inmuno-tinción con anticuerpos anti-HCS, las helicasas XPB y XPD, sub-unidades del complejo TFIID, así como la RNA polimerasa II (RNA pol II).

3.5 La Holocarboxilasa Sintetasa está presente en la región inactiva transcripcionalmente del promotor del gen de *hsp70*.

Para explorar si la HCS nuclear está asociada *in vivo* a regiones regulatorias del genoma, investigamos el reclutamiento de esta proteína al promotor del gen de *hsp70* en larvas de *Drosophila* tratadas o no con choque térmico mediante ensayos de ChIP. El material genético inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-HCS, se utilizó para amplificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un fragmento de ADN de ~110 pb (+4 al +113) del promotor de *hsp70* [62], indicando la presencia de HCS en el promotor de *hsp70* en ausencia de activación transcripcional (Figura 18 A y B, HCS no tratado). La banda no se obtuvo cuando el ChIP se realizó en ausencia del anticuerpo anti-HCS (Figura 18 A, HCS Mock). Cuando se realizó el ChIP con larvas tratadas con choque térmico, el fragmento de amplificación obtenido después del PCR fue 45% menos abundante que en las larvas no tratadas (Figura 18 A y B). Como control positivo, los experimentos fueron repetidos utilizando un anticuerpo que reconoce a la RNA pol II fosforilada en la Ser 2 (esta fosforilación ocurre después de la activación transcripcional del gen de *hsp70* permitiendo la liberación de la polimerasa del promotor). Los resultados mostraron la ausencia de producto del PCR realizado con el material del ChIP de las larvas no tratadas (Figura 18 A y C, RNA pol II no tratadas). Sin embargo, se observó una banda en el PCR del ChIP de las larvas tratadas con choque térmico (Figura 18 A y C, RNA pol II inducidas con calor), confirmando la presencia de la RNA pol II después de la activación del gen de *hsp70* (Figura 18 A y C).

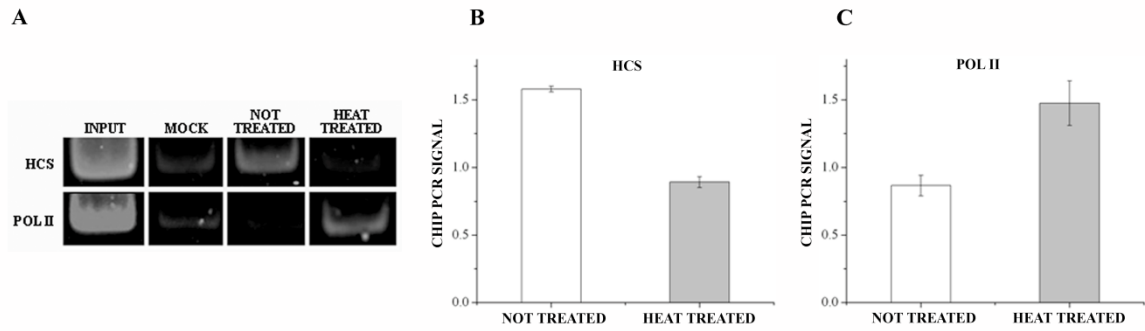


Figura 18. Localización de la HCS y la RNA pol II en el promotor del gen de *hsp70*. (A) Se realizó ensayo de ChIP como se describe en Material y Métodos. La cromatina obtenida de glándulas salivales de larvas de tercer instar como control (no tratadas) o tratadas con choque térmico (choque térmico) fue inmuno-precipitada utilizando un anticuerpo anti-HCS o anti-RNA pol II. Se realizó amplificación por PCR de ~110 pares de bases del promotor de gen de *hsp70* y los productos fueron separados mediante electroforesis en geles de acrilamida y observados con luz UV. El 5% de la cromatina utilizada en el ensayo de ChIP sirvió como control positivo del PCR (input). El ChIP fue realizado en ausencia de los anticuerpos para determinar la especificidad y el posible ruido en la amplificación por PCR (Mock). Los resultados de tres distintos experimentos usando anticuerpos anti-HCS (B) o anti-RNA pol II (C) se presentan como el promedio \pm error estándar (EE). Las diferencias entre las larvas control y las tratadas con choque térmico se observan estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

4. Discusión

Se ha sugerido que la biotina, además de su papel como co-factor de las carboxilasas y activador de la vía de transducción de señales HCS-GCs-PKG, podría actuar como marca epigenética de las histonas. La localización de HCS en el núcleo celular ha llevado a la hipótesis de que esta enzima pudiera ser responsable de la biotinilación de histonas [42, 63-65], sin embargo, la reciente evidencia de que la biotinilación de histonas no es una modificación natural ha dejado sin explicación la función de HCS nuclear [53]. En este trabajo, abordamos esta pregunta, examinando el tráfico y localización celular de la HCS durante el desarrollo temprano de embriones de *Drosophila melanogaster*.

Nuestros resultados mostraron que la HCS es depositada por contribución materna en el blastodermo sincicial de *Drosophila* y se encuentra distribuida uniformemente en el citoplasma (Figura 13 B). En los estadios iniciales de desarrollo, la función de HCS puede estar limitada a asegurar la biotinilación de las carboxilasas y la homeóstasis metabólica. Al avanzar el desarrollo, la HCS comienza a aparecer en el núcleo, en la etapa de desarrollo cuando la transcripción cigótica inicia en el embrión (Figura 13 E). En el desarrollo temprano de *Drosophila*, muchas proteínas involucradas en la regulación de la expresión génica muestran una localización nuclear seguida de una migración al núcleo en distintas etapas. Por ejemplo, la proteína de unión a la caja TATA (TBP) ingresa al núcleo en la división mitótica 8 [66], miembros del complejo TFIID y la RNA polimerasa II migran al núcleo en la división 8-10 y el complejo de la cinasa de CDK migra al núcleo durante la celularización [59]. Los múltiples eventos de re-localización de proteínas, que preceden a la expresión de genes en el desarrollo temprano de los embriones de mosca son graduales y estocásticas, y son parte de un mecanismo de activación transcripcional [67]. La re-localización de HCS durante el desarrollo de la mosca podría controlar su transición de participar en la biotinilación y activación de las carboxilasas en el citoplasma a su papel regulatorio en el núcleo.

En células diferenciadas, la HCS nuclear está asociada a dominios de heterocromatina de cromosomas politénicos. HCS aparece abundante en el cromocentro y en múltiples bandas en todos los cromosomas en donde co-localiza con la marca de heterocromatina H3K9me3 pero no con la marca de eucromatina H3K9ac. Estos resultados podrían sugerir que la HCS asociada a la cromatina podría estar involucrada en mecanismos de represión de la transcripción o en la formación de la heterocromatina. Esta hipótesis está apoyada por el

análisis de la localización de HCS en el dominio de *hsp70*, producto de la amplificación del gen de *hsp70*. La activación transcripcional dependiente de calor de *hsp70* puede ser monitoreada por la formación de una estructura característica conocida como *puff*, la cual ha facilitado los estudios para determinar la presencia de diferentes factores de transcripción durante la activación o represión transcripcional. Nuestros resultados mostraron que mientras la HCS está presente en el locus inactivo de *hsp70*, en la transcripción activada por calor de este gen, HCS es desplazada de este dominio de ADN. En contraste, los cromosomas politénicos tratados con choque térmico mostraron un enriquecimiento en el dominio de *hsp70* de la RNA pol II y las helicasas XPD y XPB, subunidades del complejo TFIIF, tal y como se esperaba en un región de ADN activa transcripcionalmente. De manera interesante, HCS y TBP un factor necesario para el inicio de la transcripción, comparten una dinámica similar durante la transcripción inducida por calor. Esta observación puede ser entendida por las demostraciones anteriores en las cuales TBP es pre-ensamblada en el dominio inactivo de *hsp70* para asegurar una rápida activación de la transcripción de este gen [61]. Una vez iniciada la transcripción, TBP ya no es requerida y se retira del promotor de *hsp70* [25].

Nuestros resultados sugieren una asociación de HCS a la cromatina de *Drosophila* de manera parcialmente similar a lo previamente reportado por Zemleni y colaboradores [64]. Este grupo utilizó un anticuerpo hecho en conejo que reconoce a la HCS de humano, para la detección de la HCS de *Drosophila*, mostrando que HCS está distribuida uniformemente a lo largo de los brazos eucromáticos de todos los cromosomas de *Drosophila melanogaster*. Sin embargo, mientras que sus resultados muestran una inmunotinción intensa en ciertas bandas, *puffs* y telómeros, en nuestro trabajo, HCS parece estar localizada sólo en bandas heterocromáticas. El anticuerpo utilizado por este grupo se hizo contra un péptido conteniendo la secuencia de la HCS humana EHVGRDDPKALGEEPQRRGC (aminoácidos 58-77) [45] la cual no tiene correspondencia con la HCS de *Drosophila*, por lo que el significado de sus hallazgos es incierto.

En este estudio, mostramos que mientras en extractos celulares humanos se observan dos bandas mayoritarias de 82-80 kDa, las larvas de *Drosophila* muestran una sola banda de 125 kDa. Es probable que estas bandas representen diferentes isoformas de HCS ya que al competir el anticuerpo con HCS recombinante, la detección mediante “*western blot*” se abate. Diferentes estudios han reportado la presencia de bandas de HCS de 82-80, 70 y 60 kDa en distintas líneas celulares humanas, así como en placenta humana [13, 14, 49]. Se ha

sugerido recientemente la existencia de una relación entre la localización celular de HCS humana, citoplásmica o nuclear, con diferentes isoformas de esta, las cuales varían en su extremo N-terminal [13]. La región más larga de la HCS de *Drosophila* es su región N-terminal, relativo a su alineamiento con la secuencia de sitios activos (Fig. 12), y sugiere un papel especie-específico en la región amino-terminal. De manera interesante, el análisis de la región N-terminal de otras HCS eucariotas o de proteínas ligasas de biotina, como en *C. elegans*, levaduras y *Dictyostelium discoideum*, fallan en revelar alguna similitud a pesar de la conservación de la secuencia de su sitio activo.

En nuestro trabajo, inmunotinciones de cromosomas politénicos de *Drosophila* resultaron ser en una herramienta invaluable para estudiar la dinámica de HCS en la cromatina. Sin embargo, es una técnica limitada y de baja resolución, la cual no nos permite caracterizar los eventos moleculares que ocurren durante la activación del promotor. Para ampliar la información acerca de la presencia de HCS en dominios de ADN regulados transcripcionalmente, nos apoyamos en la activación del locus de *hsp70* de *Drosophila melanogaster*, la cual permite una observación directa de los eventos moleculares que rodean su estado transcripcional. Realizamos experimentos de CHIP en la región del promotor del gen de *hsp70* para tratar de conocer la participación de HCS en este sitio. Los resultados fueron parecidos a la observación hecha en los cromosomas politénicos tratados con choque térmico, mostrando la presencia de HCS en el promotor inactivo de *hsp70*. La estimulación con choque térmico resultó en el desplazamiento de HCS del promotor de *hsp70*, con un enriquecimiento significativo de la RNA polimerasa II activa. Estos resultados apoyan la participación de HCS en sitios transcripcionalmente inactivos y confirma su disociación del promotor activo transcripcionalmente. Mientras que nosotros examinamos un solo gen a este nivel, su extensa pero discreta distribución en regiones de heterocromatina en todos los cromosomas y su ausencia en regiones eucromáticas, sugieren un papel generalizado de la dinámica de HCS en la cromatina. En el caso de *hsp70*, es posible que HCS contribuya a mantener un estado de represión del gen en ausencia de la inducción por calor. Estudios más detallados de genes específicos mostrando la unión de HCS en sus regiones promotoras serán necesarios para conocer su papel molecular.

La participación de HCS en eventos de represión de la transcripción o silenciamiento genético podría representar una característica común entre las ligasas de biotina de eucariotas y de bacterias. La proteína BirA en *E. coli* cataliza la biotilación de la carboxilasa acetil-CoA y actúa como un represor del operón de biotina, regulando la síntesis

de biotina, mediante la unión directa a secuencias específicas de ADN en el promotor del operón de biotina [25, 68].

Sin embargo, la pérdida del dominio de unión al ADN en la HCS, sugiere que su reclutamiento a dominios de heterocromatina y su función putativa en el silenciamiento podría requerir de la interacción con otros factores celulares, los cuales se unan directamente al ADN. La localización de HCS en el núcleo de células HeLa es consistente respecto a un papel doble para esta enzima en los humanos [49]. En este sentido, HCS mostró estar asociada con la cromatina y con la lámina B, el mayor componente de la lámina nuclear [69]. Estos resultados podrían asociarse con la co-localización de HCS y la marca de heterocromatina H3K9me3 (bandas discretas en los cromosomas) observados en este estudio. En núcleos diferenciados, inactivos transcripcionalmente, la represión de regiones multigénicas es frecuente en la periferia nuclear, sugiriendo que la unión de un loci genético a la lámina nuclear puede causar su silenciamiento [70, 71]. La lámina contribuye al silenciamiento genético, al proveer de sitios en los cuales diversos represores puedan anclarse [69]. Algunas de estas proteínas están enriquecidas en el cromocentro y en dominios teloméricos de los cromosomas politénicos de la mosca, además de unirse a los tallos N-terminales de la H3 cuando están metilados en la lisina 9 [72]. Se ha propuesto que un gran número de proteínas asociadas a la lámina nuclear, reclutan marcas de H3K9me3 a la matriz nuclear en donde se encuentra transcripcionalmente silenciada [69, 72, 73]. La co-localización de HCS nuclear con la H3K9me3 en múltiples bandas en heterocromatina en los cromosomas politénicos, sugiere que esta enzima podría estar participando en la represión de dominios de la cromatina como parte de un complejo proteico que incluya a la lamina B y la histona H3K9me3.

Debido a que el papel de HCS es mantener la homeostasis metabólica, al ser activador de las carboxilasas dependientes de biotina, resulta difícil generar mutaciones que incluyan deleciones del gen de HCS, para explorar su posible función en la supresión de la variegación por efecto de posición. Por esta razón, proponemos el uso de la tecnología de ARNi para generar Knockdown de HCS en las glándulas salivales y analizar el efecto en la activación transcripcional y la represión del locus de *hsp70*. Estos experimentos podrían identificar interacciones genéticas entre HCS y otras proteínas asociadas a la cromatina involucradas en la represión transcripcional como HP1 o Su(var)3-9.

Hemos demostrado anteriormente que en células humanas HCS regula la expresión de genes involucrados en la utilización de biotina a través de la activación de la cascada de traducción de señales que involucra a la HCS-GCs-PKG [37, 55]. En este trabajo presentamos evidencia de una nueva función para la HCS en la represión de la expresión genética a través de un mecanismo que involucra el movimiento de HCS al núcleo y su interacción con dominios de heterocromatina. Estos hallazgos amplían enormemente las funciones de HCS, además de la biotilación de las carboxilasas. Un papel más general en la regulación para HCS al mismo tiempo parece enigmático, debido a que la biotina no ha sido implicada. Sería importante identificar los factores celulares que reclutan a HCS a la cromatina, para identificar los genes afectados por este mecanismo y para determinar si la biotina, como mediador o en relación a su estatus metabólico, tiene un papel en esta nueva función de HCS.

Discusión General

La biotina constituye un requerimiento necesario para el buen funcionamiento de la célula, debido a su función como activador de las carboxilasas dependientes de biotina así como de la cascada de señalización citoplásmica que involucra a la HCS-GCs-PKG [8, 37]. Sin embargo, a pesar de su función citoplásmica, la biotina y la HCS se localizan dentro del núcleo celular [39, 49]. A partir de esta evidencia, surgieron varios trabajos en los cuales se propuso que la biotina y la HCS participaban en un proceso al que denominaron biotinilación de histonas [33, 42, 44]. Esta marca epigenética se asoció a diversos procesos celulares entre los que destaca su efecto en la proliferación y ciclo celular [42, 49], así como eventos de transcripción y de respuesta al daño del ADN [48], entre otras. Sin embargo, a pesar de estos trabajos, la hipótesis de la biotinilación de histonas quedó descartada, al existir inconsistencias en los métodos de detección, específicamente por el uso de streptavidina y de los anticuerpos empleados para detectar a la biotina unida a las histonas [50, 52]. Estos trabajos demostraron que la biotinilación de histonas es un proceso que no sucede de manera natural en las histonas, dejando nuevamente sin respuesta la función biológica de esta enzima en el núcleo así como el mecanismo mediante el cual lleva a cabo esta función.

Por tal motivo, para explorar la función de HCS en el núcleo recurrimos al uso de *Drosophila melanogaster* como modelo experimental. La relevancia del trabajo con *Drosophila* se expone con detalle en la sección titulada “Tráfico y dinámica de asociación de la Holocarboxilasa sintetasa a la cromatina durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*” de esta tesis en el cual es posible concluir que la contribución de los ensayos realizados con este modelo experimental, demostraron por primera vez que la HCS es una enzima de contribución materna lo cual se relaciona con la función de biotinilación de carboxilasas y la homeóstasis metabólica. Una vez que inicia la diferenciación celular la HCS migra al núcleo. En este mismo trabajo demostramos que la HCS se encuentra no solo dentro del núcleo sino que también está asociada al ADN de los cromosomas politénicos en dominios de heterocromatina, y que co-localiza con la marca de tri-metilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3) involucrada en silenciamiento genético. El uso del gen de *hsp70* para estudiar la localización de la HCS antes y después de la activación transcripcional, nos permitió proponer a la HCS como una proteína involucrada en silenciamiento genético, paso

importante en el campo de biotina, debido a la falta de información respecto a su función nuclear de los últimos años.

Los ensayos siguientes al trabajo de *Drosophila* consistieron en explorar si la HCS lleva a cabo este mismo papel en células humanas. Para ello, se realizaron ensayos de transfección transitoria (Anexo 1). En estos ensayos se utilizó a la HCS fusionada a un dominio de unión a ADN para conocer su efecto sobre la expresión del gen reportero luciferasa. Los resultados mostraron un decremento de aproximadamente el 40% con respecto al control, lo cual concuerda con la función de la HCS como regulador negativo de la transcripción propuesta en el trabajo con *Drosophila*. A pesar de conocer el efecto de silenciamiento en el cual la HCS participa, aún se desconoce el mecanismo por el cual esta enzima lleva a cabo dicha función. La hipótesis que proponemos consiste en que la HCS lleva a cabo esta función mediante la formación de complejos proteicos al asociarse a otras proteínas represoras, ya que como bien se sabe, la HCS carece de un dominio de unión al ADN, contrario a lo que sucede con su homólogo BirA en *E. coli* [23, 55]. Para explorar esta propuesta, se están realizando ensayos de pull-down para determinar si HCS interactúa con alguna deacetilasa de histonas, lo cual nos permitiría discernir respecto a distintos complejos proteicos represores en los cuales HCS actúe a nivel transcripcional.

Por otro lado, mediante ensayos de doble híbrido en levadura (Anexo2) identificamos a la proteína nuclear NMNAT1 como proteína de unión a la HCS⁵⁸, la isoforma funcional más corta reportada para HCS, la cual mediante ensayos de inmunofluorescencia, se propuso como la única isoforma de la HCS con localización nuclear [6, 13, 74]. La posible interacción entre HCS⁵⁸ y la NMNAT1 resulta muy atractiva debido a que diversos grupos de investigación han demostrado que NMNAT1 es una proteína exclusivamente nuclear y que participa en la ruta de biosíntesis de NAD⁺ para proveer de este sustrato a enzimas nucleares dependientes de NAD⁺. Dentro de estas enzimas dependientes de NAD⁺, se encuentra la proteína SIRT1, sobre la cual la NMNAT1 lleva a cabo sus funciones de regulación más relevantes. SIRT1 es una proteína que pertenece a la clase III de las deacetilasas de histonas (HDAC), la única clase de HDAC dependientes de NAD⁺. SIRT1 ha sido reportada como proteína clave en procesos de metabolismo, neurogénesis y supervivencia celular por su habilidad para deacetilar histonas y sustratos distintos a las histonas [75]. La interacción entre la HCS y la NMNAT1, está pendiente de comprobación por lo que se proponen distintos métodos que permitan comprobar esta interacción, la cual

de ser cierta nos indicaría el posible mecanismo por el cual la HCS lleva a cabo su función en la regulación negativa del ADN.

La información contenida en esta tesis, muestra a la HCS como una enzima multifuncional, ya que participa en distintos eventos, que incluyen la biotinilación de las carboxilasas, la participación en la cascada de señalización citoplásmica HCS-GCs-PKG, así como su función como represor transcripcional dentro del núcleo. Todas estas características permiten colocar a la HCS dentro del grupo de proteínas del llamado “gene sharing”. Este término hace referencia a que la función de una proteína puede estar directamente afectada por la expresión diferenciada de su gen, así como que su localización celular refleja su función más allá de su catálisis. Con el paso del tiempo son más las proteínas que se identifican con este grupo, entre ellas, la Hexocinasa tipo II, fosfoglucosa isomerasa, citrato sintetasa y la lactato deshidrogenasa. La función de estas proteínas son claro ejemplo de pragmatismo y flexibilidad más que de un solo diseño y un solo propósito [76]. Es claro que con lo mostrado en este trabajo la enzima Holocarboxilasa Sintetasa se apega a las características de este término, por lo cual aún resulta más interesante conocer las implicaciones de esta enzima a nivel nuclear.

Finalmente, existe un largo camino por recorrer que permita determinar las circunstancias, el momento, el tiempo y el sitio exacto, que rigen las interacciones de la HCS con la gama de proteínas nucleares. El estudio de estos parámetros nos permitiría definir de manera integral a una proteína tan versátil como lo es la Holocarboxilasa Sintetasa, de la cual por si fuera poco, no solo dependemos a nivel metabólico sino también dependemos del efecto que ejerce sobre la expresión genética.

ANEXOS

ANEXO 1

*Efecto de la Holocarboxilasa
sintetasa sobre la expresión
génica en la línea celular
HepG2.*

El trabajo realizado con *Drosophila melanogaster* nos permitió proponer que la HCS nuclear se encuentra asociada a eventos de represión transcripcional. Tras esta propuesta, surgieron varias cuestiones por explorar, sin embargo, consideramos importante conocer si el efecto observado dentro del núcleo celular en *D. melanogaster* se comparte en células de origen humano en donde han sido caracterizadas las funciones citoplásmicas en las que la HCS está involucrada, es decir, la biotilación de carboxilasas y la regulación de la transcripción génica mediada por la cascada de señalización que involucra a la HCS-GCs-PKG [8, 37]. El análisis de manera global involucrando esta nueva función de la HCS en el núcleo celular, podría ayudarnos a comprender ampliamente la biología de esta enzima.

Para conocer si el efecto negativo sobre la expresión génica se mantiene en células humanas recurrimos al uso de un sistema heterólogo. En este sistema se utilizan dos vectores, uno de ellos, el vector pM se utiliza para generar proteínas de fusión al dominio de unión al ADN del factor de transcripción Gal4 (Gal4DBD). Utilizando este vector se obtiene una proteína híbrida que contiene la secuencia de unión al ADN en su extremo 5' y que es dirigida al núcleo mediante la secuencia de localización nuclear de Gal4. La transcripción de la proteína híbrida está regulada por el promotor y la señal de terminación polyA del virus SV40 (Figura 19 a). Por otro lado, el vector Gal4-tk-luc, es un vector que contiene a la luciferasa como gen reportero, este gen está bajo el control de los elementos de respuesta a Gal4 presentes en un consenso de cinco sitios de unión a Gal4 y del promotor de la tirosin-cinasa (tk) (Figura 19 b). Los vectores son co-transfectados dentro de una línea celular hospedera utilizando los métodos convencionales. Unas horas después, el efecto de la proteína de interés se observa mediante la expresión del gen reportero (Figura 19 c). En ausencia de la activación de los sitios de Gal4 no se observan niveles significativos de luciferasa, lo que resulta en una baja expresión del gen [77].

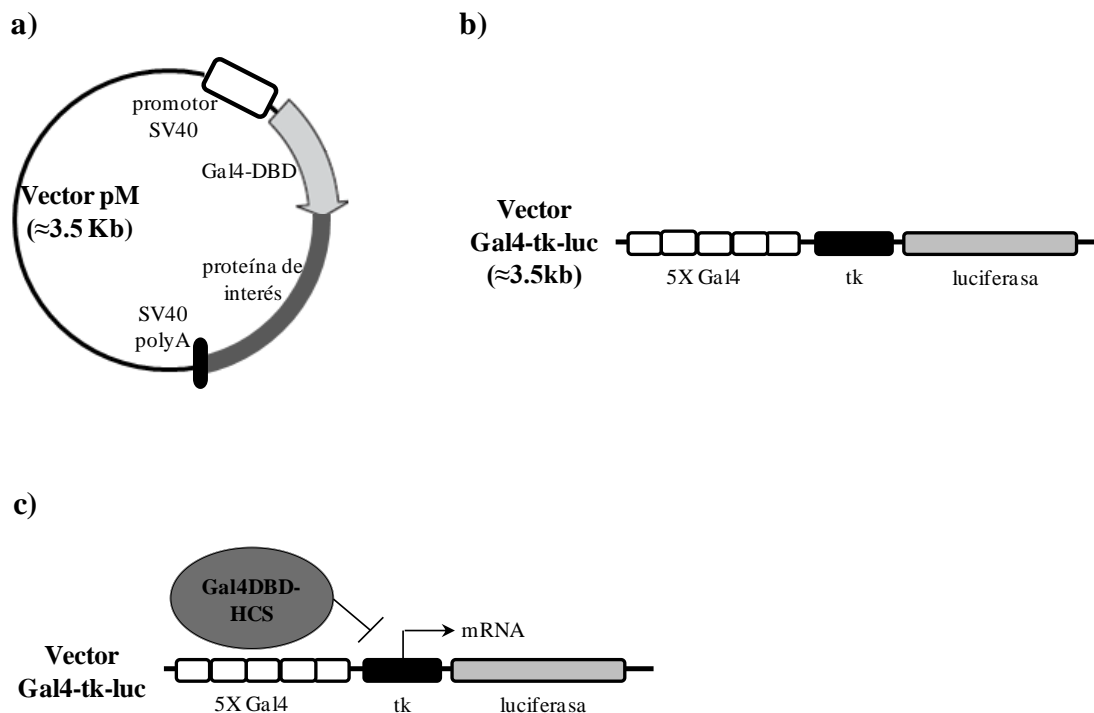


Figura 19. Representación esquemática de los vectores de transfección pM y Gal4-tk-luc utilizados en el sistema heterólogo. a) El vector pM permite generar una proteína de fusión al dominio de unión al ADN de Gal4. b) El vector Gal4-tk-luc contiene al gen reportero luciferasa. c) Unión de la proteína de fusión a los elementos de respuesta a Gal4 y la expresión del gen reportero.

El sistema heterólogo, en este caso, consistió en el uso de la proteína híbrida Gal4DBD-HCS, la cual fue co-transfectada con el vector reportero en células HepG2 mediante transfección transitoria.

Clonación de la HCS en el vector pM.

El ADNc de la HCS (2.2Kb) fue amplificado a partir de la construcción pCMV-3T/HCS utilizando los siguientes oligos específicos: sentido 5'- AA GAA TTC ATG GAA GAT AGA CTC CAC ATG GAT y anti-sentido 5'- AA CTC GAG TTA CCG CCG TTT GGG GAG GAT G que contienen los sitios de restricción para las enzimas EcoRI y XhoI, respectivamente. El producto de PCR fue clonado en el vector pM (Clontech) para generar una proteína de fusión al dominio de unión al ADN del factor de transcripción Gal4 (Gal4DBD-HCS). Esta clonación se realizó mediante el uso de extremos cohesivos compatibles entre XhoI y Sall.

Cultivo celular.

Las células HepG2 se mantuvieron en medio D-MEM (Gibco) suplementado con FBS al 5%, con los siguientes antibióticos: Penicilina (100U/ml), Streptomina (100µg/ml) y Kanamicina (100µg/ml). Las células se incubaron a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂.

Ensayos de Transfección Transitoria.

Los ensayos de transfección se realizaron en células HepG2 con una confluencia aproximada de 4×10^5 células/pozo. La transfección se realizó de acuerdo al método de fosfato de calcio. Para ello se realizó una mezcla de ADN (vectores), CaCl₂ (2.5M) y bufer de precipitación de ADN 2X (50mM Hepes, 10mM KCl, 280mM NaCl, 12mM Glucosa, 1.5mM Na₂HPO₄, pH7). Un grupo de células fue transfectado solo con el vector Gal4-tk-luc como control de la expresión basal del reportero, un segundo grupo se co-transfectó con la construcción Gal4DBD-HCS y el vector reportero y el último grupo con la construcción Gal4DBD-HDAC1 (donada por el Dr. Tonatiuh Barrio-García) y Gal4-tk-luc. Los ensayos de transfección transitoria se realizaron por triplicado utilizando en cada uno de ellos 1 µg de ADN correspondiente. Las células fueron incubadas con la mezcla entre 6-8 horas en las mismas condiciones de cultivo celular. Después de este tiempo, el medio se retiró y las células se lavaron dos veces con PBS 1X y finalmente se dejaron recuperar en dos mililitros de medio D-MEM hasta su análisis.

Obtención extracto total.

Las células transfectadas fueron lavadas dos veces con PBS a temperatura ambiente, y colocados en cada pozo con 200 µl de bufer de lisis (2mM NaEDTA, 1% Triton X-100, 0.1M KH₂PO₄ pH7.8, 1mM DTT) y se incubaron durante 20 minutos a 4°C. El homogenado fue traspasado a tubos eppendorf y centrifugados durante 30 segundos a 13,200 rpm. El sobrenadante obtenido fue utilizado inmediatamente para los ensayos de cuantificación de la expresión de β-gal y luciferasa.

Ensayo de β-gal.

Se mezclaron e incubaron 20 µl del sobrenadante obtenido más 100 µl de bufer RX (100 mM Na₃PO₄ pH 8, 1 mM MgCl₂, Galactón) a temperatura ambiente durante una hora. Para

realizar la lectura correspondiente, se anexó 100 μ l de acelerador II (Tropix) a cada muestra y la expresión de β -gal fue cuantificada en el luminómetro (Monolight 3010 pharmingen BD).

Ensayo de luciferasa.

Para este ensayo fueron mezclados 100 μ l de sobrenadante y 100 μ l de solución RX (Bufer KTME [Tricina pH7.8, 10 mM MgSO₄, 2 mM EDTA], 0.86 mM DTT, 1.8 mM ATP y luciferina (BD Biosciences) y se tomo lectura en el luminómetro.

Análisis Luc/ β -gal.

La actividad de luciferasa fue normalizada con respecto al valor obtenido de β -gal en células HepG2 transfectadas únicamente con el vector reportero Gal4-tk-luc. Los ensayos se realizaron por triplicado en tres ocasiones distintas.

Para determinar el efecto de la HCS sobre la expresión del gen reportero luciferasa, la construcción Gal4DBD-HCS fue co-transfectada con el vector Gal4-tk-luc en células humanas HepG2 mediante transfección transitoria. Como control positivo se utilizó a la enzima deacetilasa de histonas 1 (HDAC1), por su efecto negativo bien conocido sobre la expresión genética. La HDAC1 es una proteína de 482 aa, la cual pertenece a la clase I de las deacetilasas de histonas y en conjunto con la HDAC2 tienen exclusiva localización nuclear. La HDAC1 forma parte de complejos de proteínas que modulan su actividad de deacetilación y unión al ADN. Existen tres complejos en los que HDAC1 participa: Sin3, NuRD y Co-REST. La interacción con las proteínas que constituyen cada complejo le permite a la HDAC1 llevar a cabo su función de silenciamiento genético [78-80].

Los resultados de este experimento revelaron que la expresión de la proteína de fusión Gal4DBD-HCS en células HepG2 reduce en un 40% la actividad de luciferasa con respecto a las células control (Figura 20). Por otra parte, la expresión de la proteína Gal4DBD-HDAC1 resultó en una disminución del 60% en la actividad de luciferasa. Estos resultados muestran que la HCS comparte con la HDAC1 el mismo patrón de represión sobre el gen

reportero de luciferasa. Estos datos nos permiten confirmar que la HCS nuclear participa en eventos de represión transcripcional como se observa en los ensayos con *D. melanogaster*.

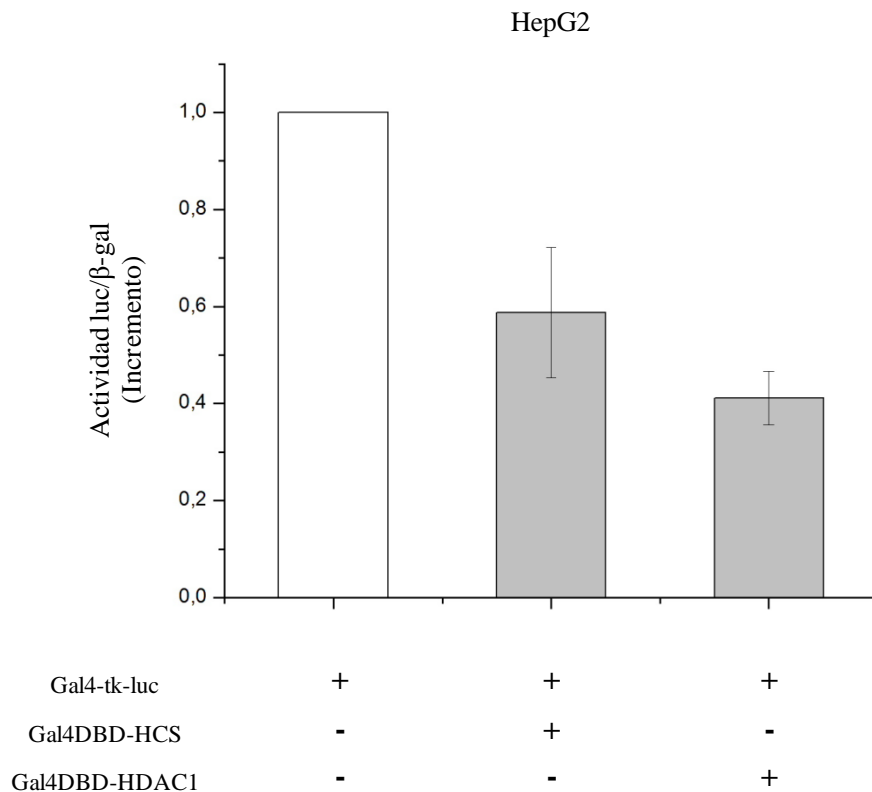


Figura 20. Efecto de la HCS y la HDAC1 sobre la expresión del gen reportero luciferasa. Células HepG2 fueron transfectadas con las construcciones Gal4-tk-Luc, Gal4DBD-HCS y Gal4DBD-HDAC1. El efecto de estas proteínas fue analizado sobre la expresión del gen reportero luciferasa.

Los resultados obtenidos mediante los ensayos de transfección nos permiten demostrar de manera preliminar que la regulación negativa de la HCS sobre la expresión génica sucede en *D. melanogaster*, así como en células de origen humano. Estos datos resultan de gran interés debido a que nos permite sugerir que la función dentro del núcleo celular de la HCS está conservada; sin embargo es necesario realizar ensayos que involucren a distintas especies para poder reforzar la idea de la conservación funcional dentro del núcleo de la HCS.

Respecto al papel de la HCS en el núcleo, es necesario recordar que esta enzima no puede llevar a cabo su función sobre la regulación transcripcional de manera directa, es decir, que

la HCS no puede unirse por sí sola al ADN, debido a que la HCS humana carece de un dominio de unión al ADN, contrario a su homólogo en bacteria BirA, la cual actúa como un represor del operon de biotina, una vez que el medio en el que se encuentra esté saturado de esta vitamina [25]. Por tal motivo, hemos propuesto que el papel nuclear de la HCS sobre la regulación transcripcional es mediante la formación de complejos multiproteicos, en los cuales la HCS se une a distintas proteínas nucleares. Esta hipótesis ha empezado a abordarse en el laboratorio mediante el uso de distintos ensayos como el doble híbrido en levadura (anexo 2) y mediante ensayos de pull-down con los cuales se planea identificar si la HCS interactúa con alguna de las deacetilasas de histonas la cual le permitiera a la HCS ejercer su efecto negativo sobre la expresión génica. El identificar alguna proteína nuclear de interacción con la HCS podría ayudarnos a asociar a la HCS con algún complejo represor y comenzar a desentrañar el mecanismo por el cual la HCS regula la actividad transcripcional.

Dentro de las interrogantes arrojadas por los ensayos previos, existe la duda respecto a si la función de la HCS como regulador negativo es dependiente o no de biotina. Para abordar esta pregunta se planearon ensayos de transfección transitoria con la proteína HCS normal y una HCS que contiene una mutación en el sitio de unión a biotina. Los resultados de este ensayo nos permitirían tratar de explicar porque los pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas no presentan un cuadro mucho más grave en tiempo y forma al afectar la regulación genética mediada por la HCS nuclear.

ANEXO 2

*Identificación de proteínas
que interactúan con la
Holocarboxilasa sintetasa.*

A pesar de la función citoplásmica de la HCS, esta enzima también ha sido localizada dentro del núcleo celular [49]. En 2010 Poliak y col realizaron un estudio en el cual identificaron la localización celular de las tres isoformas propuestas de la HCS, conocidas como HCS-Met¹, HCS-Met⁷ y HCS-Met⁵⁸. Los resultados demostraron que la isoforma HCS-Met⁵⁸ es la única con localización citoplásmica y nuclear [6, 13, 14]. Debido a que la HCS carece de un dominio de unión al ADN, como sucede con su homóloga en bacteria BirA [8], propusimos la hipótesis de que la HCS nuclear lleva a cabo sus funciones de represor transcripcional mediante la unión a otras proteínas como parte de un complejo multi-proteico. Para comenzar a estudiar esta idea, en el laboratorio se propuso la realización de un ensayo de doble híbrido en levadura, utilizando específicamente a la HCS-Met⁵⁸ como proteína carnada la cual nos permitiría identificar proteínas nucleares blanco de interacción a la HCS.

El ensayo de doble híbrido en levadura se basa en la característica de varios factores de transcripción en eucariotas, los cuales están compuestos por dos dominios funcionalmente independientes y físicamente separados. El factor de transcripción GAL4 de levadura, contiene un dominio de unión a ADN (DNA-BD) y un dominio de activación transcripcional (AD por sus siglas en ingles). El dominio de unión a ADN reconoce y se une a los UAS (Upstream Activation Site) en la región río arriba de los genes de respuesta a GAL4, mientras que el dominio de activación interactúa con otros componentes de la maquinaria de transcripción necesarios para iniciar la transcripción, siendo necesarios ambos dominios para activar al gen [81].

En el sistema de doble híbrido, se utilizan dos diferentes vectores de clonación (pAS2.1 y pACT2) para generar los dominios de GAL4 fusionados a proteínas que potencialmente interactúan una con otra. Las proteínas híbridas son co-expresadas en levadura y dirigidas al núcleo de la célula. Si se obtiene interacción entre las dos proteínas híbridas, el activador transcripcional GAL4 se reconstituye funcionalmente y llevará a cabo la activación de la transcripción de los genes reporteros *lacZ* y *HIS3*, lo que permite que la interacción proteica sea fenotípicamente detectable [81].

Utilizando este principio, se utilizó a la HCS⁵⁸ fusionada al dominio de unión al ADN (HCS⁵⁸-pAS2.1) y una librería de hígado humano fusionada al dominio de activación de GAL4 (DNAC-pACT2). Mediante este ensayo identificamos distintas proteínas, entre las cuales sobresale una proteína con exclusiva localización nuclear.

Clonación HCS⁵⁸ - pAS2.1.

El ADNc de la HCS⁵⁸ (2Kb) fue amplificado a partir de la construcción pQE-HCS total (donada por el Biol. Rafael Cervantes-Roldan) mediante PCR utilizando oligos específicos: sentido 5'-AA GAA TTC ATG GAG CAT GTT GGC AGA GA y anti-sentido 5'-TT GTC GAC CCG CCG TTT GGG GAG GAT cada uno de ellos contienen sitios de restricción para las enzimas EcoRI y SalI respectivamente. El producto de la amplificación fue clonado en el vector pAS2.1 (Clontech).

Doble híbrido en levadura y tamizaje de la librería de ADNc

El ensayo de doble híbrido en levadura se realizó de acuerdo con el método de acetato de litio, basados en el protocolo del proveedor [81]. La biblioteca de ADNc de hígado humano y la construcción HCS-pAS2.1 fueron co-transformadas dentro de la cepa de levadura Y190. Aproximadamente 5×10^6 levaduras fueron co-transformadas para realizar el tamizaje, e incubadas en platos con medio mínimo -Leu-Trp-His y una concentración de 55 mM de 3'AT (Sigma). Las colonias fueron seleccionadas después de 10 días de incubación a 30°C y confirmadas mediante ensayos de β -galactosidasa en filtro. Los plásmidos fueron extraídos de la levadura y re-transformados en *E. coli*. Las clonas positivas fueron secuenciadas para su identificación.

En el ensayo de doble híbrido en levadura obtuvimos un total de 12 proteínas; 8 de secreción, una proteína de membrana, dos proteínas citoplásmicas y una con localización nuclear (Tabla 3). Además se obtuvieron proteínas consideradas como falsos positivos propios del sistema de doble híbrido.

1	<i>Homo sapiens</i> complement factor B (CFB)	Secreción
2	<i>Homo sapiens</i> complement component 3 (C3)	Secreción
3	<i>Homo sapiens</i> MT-RNR2-like 8 (MTRNR2L8)	Secreción
4	<i>Homo sapiens</i> leptin receptor (LEPR), transcript variant 3	Membrana plasmática
5	<i>Homo sapiens</i> haptoglobin (HP)	Secreción
6	<i>Homo sapiens</i> albumin (ALB)	Secreción
7	<i>Homo sapiens</i> alanyl-tRNA synthetase (AARS)	Citoplasma
8	<i>Homo sapiens</i> alpha-1-microglobulin/bikunin precursor (AMBIP)	Secreción
9	<i>Homo sapiens</i> apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I) (APOH)	Secreción
10	<i>Homo sapiens</i> nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1 (NMNAT1)	Núcleo
11	<i>Homo sapiens</i> antizyme inhibitor 1 (AZIN1), transcript variant 1 y 2	Citoplasma
12	<i>Homo sapiens</i> fibrinogen gamma chain (FGG), transcript variant gamma-A y B	Secreción

Tabla 2. Proteínas posibles blanco de interacción a la HCS⁵⁸. Mediante un ensayo de doble híbrido en levadura, se obtuvieron 12 proteínas de unión a la HCS⁵⁸ de las cuales sólo una tiene exclusiva localización nuclear.

Debido a nuestro interés en conocer el mecanismo por el cual la HCS lleva a cabo sus funciones nucleares, la presencia de la proteína NMNAT1 en nuestros resultados es de gran relevancia. La enzima NMNAT1 (Número de acceso en NCBI: NP_073624.2) de 279 aa es una proteína exclusivamente nuclear y participa en la ruta de biosíntesis de la molécula NAD⁺ para proveer de este sustrato a las enzimas nucleares dependientes de NAD⁺ [82]. La NMNAT-1 regula a nivel transcripcional las enzimas dependientes de NAD⁺ de la familia de las sirtuinas, especialmente la proteína SIRT1. SIRT1 es una deacetilasa que regula la estructura de la cromatina y la transcripción de genes a través de la modificación de proteínas asociadas a cromatina, incluyendo histonas, factores de transcripción, correguladores y componentes de la maquinaria basal de transcripción. Asimismo, SIRT1 es

reclutada a promotores de genes al interactuar directamente con estos factores de transcripción y puede tener un efecto de activación o represión, dependiendo de los factores específicos con los que interactúa [83].

NMNAT-1 y SIRT1 co-localizan en los mismos promotores, por lo que se consideró la posibilidad de que SIRT1 reclute a NMNAT-1 a sitios específicos en la cromatina. Se ha propuesto que la interacción con la NMNAT1 podría regular la actividad de SIRT1 de dos maneras: la primera mediante la proximidad de NMNAT-1 con SIRT1, que permita una mayor eficiencia en la utilización de NAD^+ por parte de SIRT1 y la segunda, por medio de una interacción alostérica con NMNAT-1 para activar, reprimir o aumentar la actividad enzimática de ambas enzimas [83].

Si la interacción entre la HCS⁵⁸ y la NMNAT1 se lleva a cabo, es posible proponer que el mecanismo por el cual esta enzima está regulando la expresión genética es mediante la formación de un complejo dependiente de NAD^+ , el cual podría involucrar a la HCS en procesos variados como lo son la diferenciación celular, metabolismo y señalización entre otros.

Debido a que el ensayo de doble híbrido se realizó solo una vez, consideramos que la interacción entre estas dos proteínas debe de ser corroborada. Para ello, proponemos distintos ensayos en células humanas así como en levadura que permitirían explorar de una forma más exhaustiva y profunda la posible interacción de la HCS⁵⁸ y la NMNAT1.

En los ensayos con levaduras proponemos realizar una co-transformación utilizando a la HCS⁵⁸-pAS2.1 y la NMNAT1-pACT2, de manera tal, que de haber interacción entre ellas, las levaduras transformadas con los plásmidos sean capaces de crecer en los medios mínimos y se sometan a ensayos de β -gal en filtro o en líquido que permitan confirmar dicha interacción. Así mismo, en levadura proponemos la realización de un nuevo tamizaje que nos permitiera identificar otras proteínas nucleares que interactúen con la HCS⁵⁸ y de este modo explorar alternativas del probable mecanismo por el que la HCS actúa en el núcleo.

Respecto a los ensayos con células humanas proponemos ensayos de inmunofluorescencia para identificar si la HCS⁵⁸ y la NMNAT1 co-localizan específicamente dentro del núcleo celular. Para estudiar de manera puntual la posible función de la HCS⁵⁸ y la NMNAT1,

proponemos un ensayo de ChIP con el cual fuera posible identificar si la HCS⁵⁸ se encuentra en los promotores de genes regulados por la NMNAT1 y SIRT1. Por otro lado, podrían realizarse ensayos de inmunoprecipitación con un anticuerpo que reconozca a la HCS e identificar la presencia de otras proteínas conocidas que forman parte del complejo de la NMNAT, por ejemplo, SIRT1. Otro ensayo que nos permitiría identificar la interacción física de la HCS⁵⁸ y la NMNAT1 sería mediante pull-down, en el cual la HCS⁵⁸ se utilice como carnada fusionada a GST y la NMNAT1 sea expresada en el sistema TNT con incorporación de metionina radioactiva para su identificación mediante SDS-PAGE.

En esta sección hemos mostrado de manera preliminar los resultados obtenidos de un ensayo de doble híbrido en levadura, tratando de identificar proteínas nucleares que interactúen con la HCS⁵⁸. Los resultados obtenidos proponen a la NMNAT1 como blanco de unión a la HCS, por lo que estos resultados han sido retomados por distintos integrantes del laboratorio para su corroboración, ya que el hallazgo de la proteína NMNAT1 es de gran relevancia por su función nuclear y de interactuar con la HCS probablemente nos indique el mecanismo por el cual la HCS actúa a nivel transcripcional.

ANEXO 3

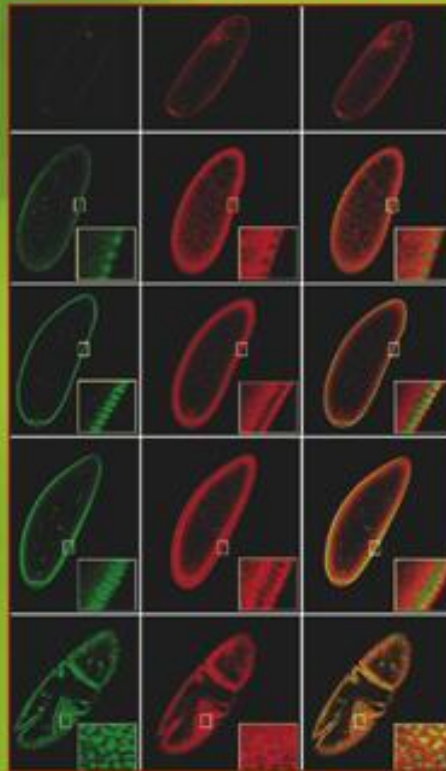
PUBLICACIONES



ISSN 1096-7192
Volume 103, Issue 3, July 2011

Molecular Genetics and Metabolism

Editor-in-Chief
Edward R.B. McCabe



SOCIETY FOR INHERITED
SIMD
METABOLIC DISORDERS
www.SIMD.org

The official journal of the
Society for Inherited
Metabolic Disorders

Available online at www.sciencedirect.com


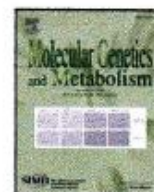
 ScienceDirect

Figura 21. Portada de la revista *Molecular Genetics and Metabolism*. El Dr. Edward McCabe, editor en jefe de esta revista seleccionó nuestro artículo para aparecer en la portada correspondiente al mes de Julio de 2011.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymgme

Trafficking and chromatin dynamics of holocarboxylase synthetase during development of *Drosophila melanogaster*

Sandra Reyes-Carmona^a, Viviana Valadéz-Graham^b, Javier Aguilar-Fuentes^{b,c},
Mario Zurita^b, Alfonso León-Del-Río^{a,*}

^a Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico

^b Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos 62210, Mexico

^c Laboratorio de Biología del Desarrollo, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca Morelos 62209, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2011

Received in revised form 5 March 2011

Accepted 5 March 2011

Available online 15 March 2011

Keywords:

Holocarboxylase synthetase

Biotin

Drosophila

Chromatin

ABSTRACT

This work examines the cellular localization of holocarboxylase synthetase (HCS) and its association to chromatin during different stages of development of *Drosophila melanogaster*. While HCS is well known for its role in the attachment of biotin to biotin-dependent carboxylase, it also regulates the transcription of HCS and carboxylases genes by triggering a cGMP-dependent signal transduction cascade. Further, its presence in the nucleus of cells suggests additional regulatory roles, but the mechanism involved has remained elusive. In this study, we show in *D. melanogaster* that HCS migrates to the nucleus at the gastrulation stage. In polytene chromosomes, it is associated to heterochromatin bands where it co-localizes with histone 3 trimethylated at lysine 9 (H3K9me3) but not with the euchromatin mark histone 3 acetylated at lysine 9 (H3K9ac). Further, we demonstrate the association of HCS with the *hsp70* promoter by immunofluorescence and chromatin immuno-precipitation (ChIP) of associated DNA sequences. We demonstrate the occupancy of HCS to the core promoter region of the transcriptionally inactive *hsp70* gene. On heat-shock activation of the *hsp70* promoter, HCS is displaced and the promoter region becomes enriched with the TFIIF subunits XPD and XPB and elongating RNA pol II, the latter also demonstrated using ChIP assays. We suggest that HCS may have a role in the repression of gene expression through a mechanism involving its trafficking to the nucleus and interaction with heterochromatic sites coincident with H3K9me3.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In eukaryotic organisms the vitamin biotin plays an essential role in gluconeogenesis, amino acid catabolism and fatty acid synthesis as the cofactor of biotin-dependent carboxylases [1,2]. In human cells, the biotinylation of carboxylases is catalyzed by the enzyme holocarboxylase synthetase (HCS) in a two step, ATP-dependent reaction that generates 5-biotinyl-AMP as an intermediate product [2,3]. We have shown that HCS is also an obligatory participant in the transcriptional control of genes involved in biotin metabolism. The regulatory role of HCS involves 5-biotinyl-AMP-dependent activation of a signal transduction pathway that includes the participation of

soluble guanylate cyclase (sGC) and cGMP-dependent protein kinase (PKG) [4,5]. Paradoxically, biotin deficiency, by impairing the HCS-dependent pathway, reduces the expression of genes required for biotin transport and utilization in liver, kidney and muscle but not in the brain [6] or heart [7]. We have proposed that the HCS-sGC-PKG pathway is the basis of a tissue-specific biotin allocation mechanism that ensures a continuous supply of the vitamin to the brain during nutritional stress [6].

While the role of HCS has traditionally been viewed as restricted to the regulation or functionality of carboxylases, it has also been reported to localize to the nucleus of human cells [8]. It was shown to be associated with the nuclear lamina and localized to discrete foci during mitosis. Other studies had reported biotin as a covalent modification of histones, providing a rationale for nuclear HCS, although initial studies attributed histone biotinylation to the activity of biotinidase, the enzyme responsible for biotin recycling [9]. This led to the view that histone biotinylation might be a post-translational modification involved in the regulation of gene expression through the modification of chromatin structure [8–12]. However, the physiological significance of histone biotinylation *in vivo* has been questioned by a recent study in which methods used to detect biotin attachment on histones were thoroughly examined [13]. This work

Abbreviations: HCS, holocarboxylase synthetase; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; H3K9me3, histone 3 trimethylated at lysine 9; H3K9ac, histone 3 acetylated at lysine 9; Hsp70, heat shock protein 70; ChIP, chromatin immune-precipitation; TFIIF, transcription factor II H; XPD, Xeroderma pigmentosum D; XPB, Xeroderma pigmentosum Type B.

* Corresponding author. Fax: +52 55 56228921.

E-mail addresses: sandraquel@biomedicas.unam.mx (S. Reyes-Carmona), vvaladez@ibt.unam.mx (V. Valadéz-Graham), aguilarf@gmail.com (J. Aguilar-Fuentes), marioz@ibt.unam.mx (M. Zurita), leon@biomedicas.unam.mx (A. León-Del-Río).

1096-7192/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.ymgme.2011.03.005

demonstrated that, while biotin could be readily detected on biotin-dependent carboxylases in cells or on histones biotinylated *in vitro*, biotinylation of native histones could not be detected in cell cultures from various sources to a sensitivity of at least one part per 100,000. Instead, its detection on native histones was shown to be due to the ability of streptavidin to interact with biotin-free histones, to a non-enzymatic reaction [14,15], and to antibodies raised against biotinylated histones shown to crossreact with acetylated histones [13–16]. These studies demonstrated that biotin is not a natural histone modification, leaving unexplained the targeting of HCS to the nucleus [13].

In this work, we sought to gain insight into the possible role of nuclear HCS by investigating the distribution and behavior of HCS in *Drosophila melanogaster*, specifically to study the dynamics of HCS cellular localization and its association to chromatin during different stages of development and under conditions of transcriptional activation or repression. Our results show that in the early *Drosophila* embryo HCS is a cytoplasmic protein and, as development progresses, it migrates to the nucleus until it becomes predominantly a nuclear protein in differentiated tissues. We show, further, that nuclear HCS becomes associated with the chromocenter and heterochromatin bands where it colocalizes with histone 3 trimethylated at lysine 9 (H3K9me3). Chromatin immuno-precipitation (ChIP) assays demonstrate the association of HCS with the core promoter region of the inactive *hsp70* gene and that it is displaced upon heat-shock-induced transcriptional activation. These results contrast with those obtained for elongating active RNA pol II and the TFIID subunits XPD and XPB, which become enriched at the *hsp70* promoter region only after transcriptional activation is induced. We propose that nuclear HCS is recruited to heterochromatin domains during events of transcriptional repression.

2. Materials and methods

2.1. Fly stocks

Wild type *D. melanogaster* strain W¹¹¹⁸ was used in all experiments. Flies were maintained under standard conditions at 25 °C.

2.2. Immunofluorescence

Drosophila embryos were dechorionated in 50% bleach, fixed in formaldehyde-heptane and devitellinized with methanol. Embryos and salivary glands were blocked with 10% goat serum in TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5% Tween-20). Polyclonal rabbit anti-human full length HCS (HCS-FL) (donated by Roy Gravel [8]) was added at 1:2000 dilution and incubated at 4 °C. After washing with TBS-T, secondary antibody Cy3 goat anti-rabbit (Rockland) was added at 1:1000 dilution. DNA was counterstained with 15 nM Sytox Green (Roche).

Salivary glands were fixed in solution 1 (PBS, 3.7% paraformaldehyde, and 1% Triton X-100) and then in solution 2 (3.7% paraformaldehyde, 50% acetic acid). The chromosomes were spread on poly-L-lysine-coated microscope slides. The chromosomes were blocked with 10% dry milk in PBS-Tween 1%. For double-immunostaining, the following primary antibodies were used: HCS-FL (1:2500) [8], TBP (1:100) (Santa Cruz Biotechnology), XPB [17] and XPD (1:250) [18], RNA pol II ser 5 (1:500) (Covance), H3K93me3 and H3K9ac (1:100) (Upstate). After washing in PBST, secondary antibodies were added: Cy3 goat anti-rabbit (1:1500), Cy2 goat anti-mouse (1:500), Cy2 anti-rat (1:50) (Rockland) or Rodamine X red goat anti-mouse (1:1000) (Jackson ImmunoResearch), Alexa fluor 488 and 568 (1:100) (Invitrogen). DNA was visualized as described above with 15 nM Sytox Green (Roche). Embryos, salivary glands and polytene chromosomes were visualized by Bio-Rad MRC600 Laser Scanning Confocal Microscope.

2.3. HCS purification

Clone BL-11 containing the full length HCS cDNA [19] was used to amplify the 2.2 kb coding sequence with the following primers: sense: 5'-ttgagctcatggaggatagactcc-3' and antisense 5'-gtttgccgcccattacagctggcac-3'. The PCR product was subcloned into the pQE30 vector (Quiagen) to express HCS as a fusion protein with six His residues in the amino terminal region. His₆-HCS was expressed in *E. coli* DH5 α and the hybrid protein purified using a nickel-agarose column following the manufacturer's instructions. The protein bound to the nickel column was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. The purity of recombinant HCS was verified by staining the gel with Coomassie blue and by Western blot analysis using anti-HCS antibody. Highly purified His₆-HCS was used to pre-adsorb the anti-HCS antibody to verify the antibody specificity towards HCS in Western blot and immuno-fluorescence analysis.

2.4. Western blot

HepG2 cells and *Drosophila* larvae protein extracts (80 μ g) were resolved by 8% SDS-PAGE. The proteins were transferred to a PVDF membrane (Millipore). Western blot analysis was performed using the Protein Detection System SNAP id (Millipore) using 1:2000 anti-HCS or HCS-pre-adsorbed anti-HCS antibody in blocking solution (0.01% casein (Roche) in TBST). The secondary antibody a goat anti-rabbit-peroxidase (Invitrogen) was used at a dilution of 1:15,000.

2.5. Heat shock

Salivary glands were dissected from third-instar larvae in Sf-900 II SFM medium (Gibco) on ice followed by heat shock at 42 °C for 5 min to induce puff formation. Squashes for immunofluorescence analysis or ChIP assays were performed immediately.

2.6. Chromatin immunoprecipitation

One-hundred pairs of salivary glands dissected in SF900 medium, were used for each ChIP assay. Crosslinking was performed with 1.2% formaldehyde in PBS for 15 min at room temperature followed by washing with PBS-T 0.01%. Salivary glands were suspended in lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8.0) with protease inhibitors cocktail (Roche). Chromatin was disrupted by sonication (Sonic) to obtain DNA fragments between 100 bp and 500 bp. Cell lysates were diluted 10-fold in ChIP buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 0.1% sodium deoxycholate, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.0) with protease inhibitors. For PCR amplification, 5% of total chromatin was used as positive control (input). Pre-clearing of samples was carried out twice by incubating the chromatin fragments with sepharose in the absence of antibodies, followed by incubation with specific antibodies against full length HCS (2 μ g) or RNA pol II ser 2 (20 μ g) (Covance). As a negative control, mock treated chromatin (incubated without specific antibodies) was used for PCR amplification. DNA-protein complexes were precipitated with 50 μ l of Sepharose-Protein A/G (Invitrogen) or Rat anti-mouse IgM sepharose 4B (Zymed) followed by centrifugation at 1200 rpm (Eppendorf 5415R). The antibody-chromatin-sepharose complex was washed five times with ChIP buffer, twice with low and high-salt buffers (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0 with 150 mM or 500 mM NaCl, respectively), twice with LiCl buffer (250 mM LiCl, 1% Igepal, 1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8) and twice with TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8). The precipitated complex was resuspended in TE and incubated with RNase for 30 min at 37 °C, followed by 0.5% SDS and 0.5 mg/ml Proteinase K for 1 h at 45 °C. The crosslinking was reversed by heat treatment at 65 °C overnight. The released DNA was extracted twice with phenol-chloroform and precipitated with

ethanol. Each sample was subjected to PCR amplification of a fragment of ~110 bp of the *hsp70* promoter (+4 to +113) using the following specific primers: sense: 5'-ctattcaacaagtaagtgaacac-3'; antisense 5'-actaagtgaattgaacgtgaaat-3'.

2.7. Statistical analysis

Each ChIP assay was performed in three different experiments using different chromatin preparations. PCR products were quantitated using a FX-Molecular Imager (BIORAD) and the results were normalized to the density of PCR products obtained from non treated *Drosophila* larvae. Data are presented as mean ± S.E. unless otherwise indicated. Statistical significance obtained with not treated and heat treated larvae were analyzed at 0.05 levels of significance using Student's *t* test.

3. Results

3.1. Characterization of holocarboxylase synthetase antibodies

To explore if antibodies raised against human HCS could be used to study the cellular localization of HCS during development of *D. melanogaster* embryo, we first determined the extent of sequence homology between the fly and human biotin-ligases. Comparison of the predicted *Drosophila* HCS sequence (1041 amino acids) with human HCS (726 amino acids) in the GenBank (accession number

X80160.1) and EMBL (accession number X80160) databases showed that they share specific areas of homology. The two proteins share 43% identity across their catalytic domains located at positions 466–726 and 782–1041 in the human and *Drosophila* enzymes, respectively (Fig. 1A and B). Previous studies using X-ray crystallography and NMR analysis, have identified two structural domains (amino acids 460–669 and 670–726) in the carboxyl terminus of human HCS that are highly conserved among all biotin ligases [20]. Outside the catalytic domain the homology between the two proteins falls to less than 30% identity in the mid section and less than 10% identity at the amino terminal domain (Fig. 1A). Anticipating the potential for common epitopes in the catalytic domain, we determined whether anti-human HCS antibody could detect *Drosophila* HCS by Western blot. To do this, we subjected human cells and fly total protein extracts to SDS-PAGE electrophoresis and probed the resulting blots with the anti-human HCS antibody. In the HepG2 extract, we identified two major bands of 82 and 80 kDa and two less abundant bands of 70 and 62 kDa (Fig. 1C). The apparent molecular weight of reactive bands compares favorably with the different HCS isoforms previously reported in different human cell lines and human placenta [8,21,22]. Analysis of the *Drosophila* larvae protein extract using the same antibody revealed a single band of about 125 kDa (Fig. 1D). The specificity of the anti-HCS antibody was confirmed by pre-adsorbing the serum with purified recombinant full-length HCS bound to a solid support as described in Materials and methods. The pre-adsorbed antibody did not detect any of the bands found with the untreated antibody by Western blot

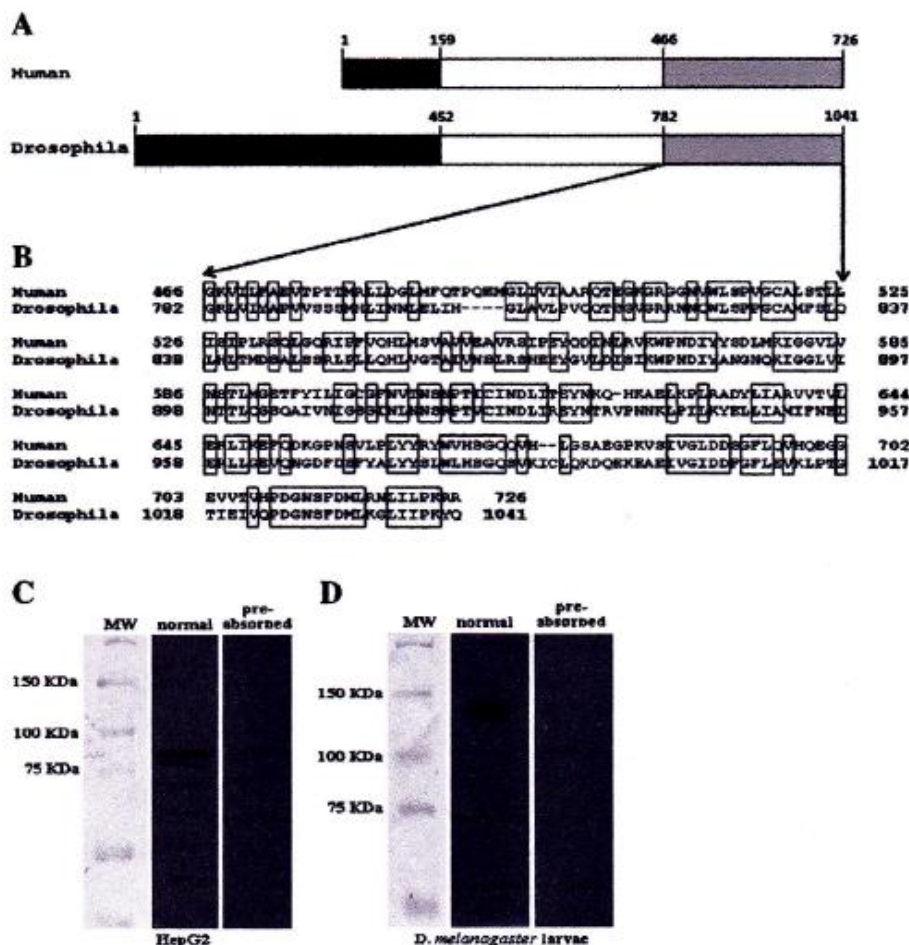


Fig. 1. Amino acid sequence conservation and protein expression profile of HCS in human and *Drosophila melanogaster*. (A) Schematic representation of human and *Drosophila* HCS showing sequence homology: amino terminal domain, <10% identity (■); middle domain, <30% identity (□); carboxyl terminal domain, 43% identity (▨). (B) Sequence alignment of carboxyl terminal domains of human and fly HCS. (C, D) Western blot analysis of human HepG2 cell extracts (C) and *D. melanogaster* extracts (D), using normal anti-HCS (αHCS) or anti-HCS pre-adsorbed with purified full length recombinant HCS (PA αHCS). Protein molecular weight markers (MW) are indicated on the left of each panel.

analysis of human and fly larvae protein extracts (Fig. 1C and D, PA α HCS).

3.2. Holocarboxylase synthetase migrates to the cell nucleus after gastrulation stage in *D. melanogaster* embryos

To determine the sub-cellular localization of HCS during *D. melanogaster* development, we examined its distribution in embryos by immunocytochemistry. Immunostaining of embryos with the anti-HCS antibody shows that HCS is initially deposited in the early syncytial blastoderm by maternal contribution and is evenly distributed in the cytoplasm (Fig. 2A). Between nuclear divisions 10

and 13, the nuclei migrate towards the periphery of the embryo as evidenced by sytox staining of nuclear DNA. At this stage, HCS begins to be displaced to the periphery of the embryo surrounding the nuclei as a dense band (Fig. 2B and C). During the cellularization stage, at nuclear divisions 13–14, the nuclei are separated by membranes and HCS still shows a cytoplasmic localization (Fig. 2D). During gastrulation, HCS begins to be present in the nucleus of some cells co-localizing with genomic DNA (Fig. 2E), suggesting that HCS localizes to cell nucleus after the beginning of cellular differentiation. To confirm the nuclear localization of HCS, we examined the location of HCS in the salivary glands of *Drosophila* larvae. The immunostaining showed that, although still clearly detectable in the cytoplasm, HCS is found predominantly in the cell nucleus showing a strong co-localization with genomic DNA (Fig. 3A).

3.3. Nuclear HCS is localized in chromatin domains enriched with the transcriptionally repressive epigenetic mark H3K9met3 in *Drosophila* polytene chromosomes

To explore if nuclear HCS is associated with chromatin in differentiated cells, we examined polytene chromosomes isolated from salivary glands of *Drosophila* larvae by immunostaining with the anti-HCS antibody. These experiments revealed that HCS is a chromatin-associated protein that seems to be enriched at discrete regions in all chromosomes. HCS appears located at heterochromatin bands flanking interbands, which are less condensed and likely represent transcriptionally more active chromatin (Fig. 3B). The specificity of the anti-HCS antibody was confirmed by pre-adsorbing the antiserum with purified recombinant full-length HCS bound to a solid support as described in Materials and methods. As it was shown in Western blots pre-adsorbing the antiserum with purified HCS resulted in the complete loss of anti-HCS reactive material in polytene chromosomes (data not shown).

To discriminate between the recruitment of chromosomal HCS to heterochromatin or euchromatin domains, we assessed its co-localization with some histone modification marks like trimethylated (H3K9met3) or acetylated (H3K9ac) lysine 9 in histone H3. H3K9met3 and H3K9ac have been linked to transcriptionally repressive and permissive chromatin structures, respectively [23]. Immunostaining of polytene chromosomes with antibodies to H3K9met3 or H3K9ac (red in each case) compared to the distribution obtained with anti-HCS (green) is shown in Fig. 4 panels A and B, respectively. Immunostaining for H3K9met3 revealed strong co-localization with HCS at the chromocenter and at several bands in all chromosomes of *D. melanogaster* (Fig. 4A). These results contrast with the immunodetection of HCS compared to H3K9ac. In this instance, HCS (green) and H3K9ac (red) are distributed in bands throughout all chromosomes, but they do not colocalize. The red and green bands are discrete and evidence of yellow, indicating superimposed staining, is absent (Fig. 4B). The independent localization of HCS and H3K9ac is strongly evident at the chromocenter of polytene chromosomes where the HCS signal is highly enriched while H3K9ac is absent from this heterochromatic region (Fig. 4B). These data support the concept that nuclear HCS is associated with transcriptionally inactive heterochromatin domains in polytene chromosomes.

3.4. Heat-induced transcription activation displaces holocarboxylase synthetase from the *hsp70* locus in *Drosophila* polytene chromosomes

To explore the dynamics of HCS association to chromatin during transcription activation, we studied the presence of this protein at the *hsp70* locus of polytene chromosomes in normal and heat exposed salivary glands of *Drosophila* larvae. The *hsp70* locus is located at position 87A of chromosome 3R (Fig. 5, panel PC (phase contrast) not treated). The dynamics of heat-inducible *hsp70* expression have been used as a tool to determine the association of different proteins with

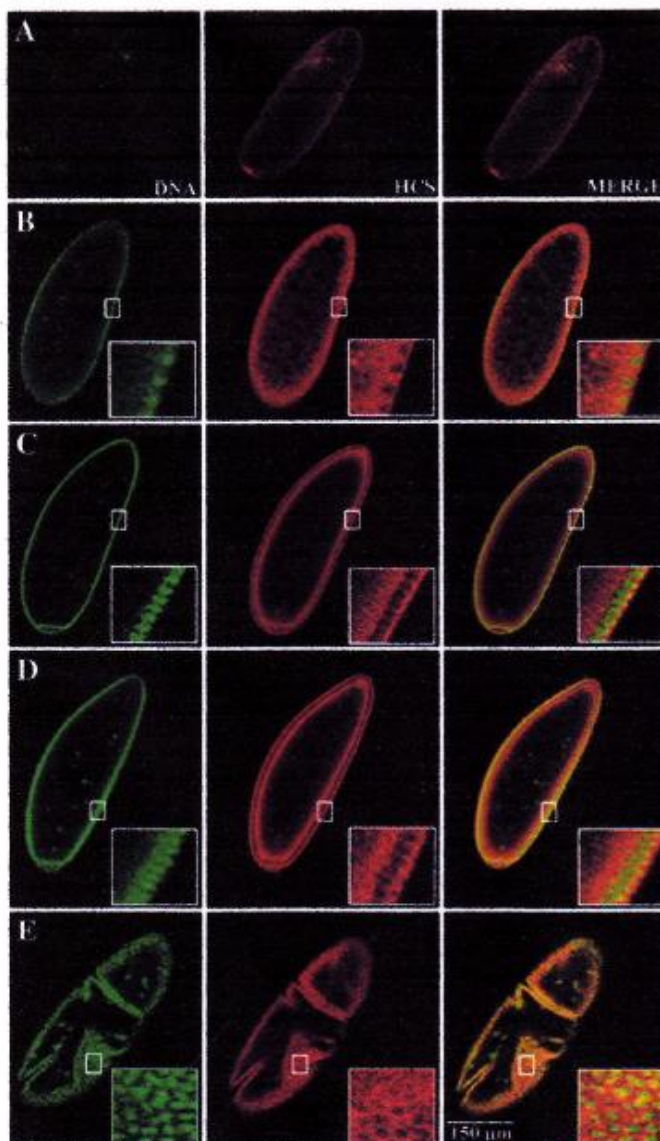


Fig. 2. Trafficking of HCS during early development of *Drosophila melanogaster*. HCS localization in embryos at different stages of development was determined using anti-HCS antibody (red) to detect HCS and sytox (green) to visualize genomic DNA, as described in Materials and methods. Co-localization of HCS and genomic DNA appears yellow after superimposing both images (Merge). (A) Syncytial blastoderm: HCS is distributed in the cytoplasm. (B) Syncytial blastoderm embryo at nuclear division 10: Nuclei move to the periphery of the embryo and HCS becomes concentrated around the nuclei. (C, D) Embryos at nuclear division 13 and cellularization stage: HCS appears located mainly in the periphery of the embryo surrounding nuclei. (E) Gastrulated embryo: HCS is localized in the cytoplasm, but it begins to appear in the nucleus of some cells. Selected areas of embryos, indicated by white squares, were enlarged to show localization of HCS with respect to genomic DNA.

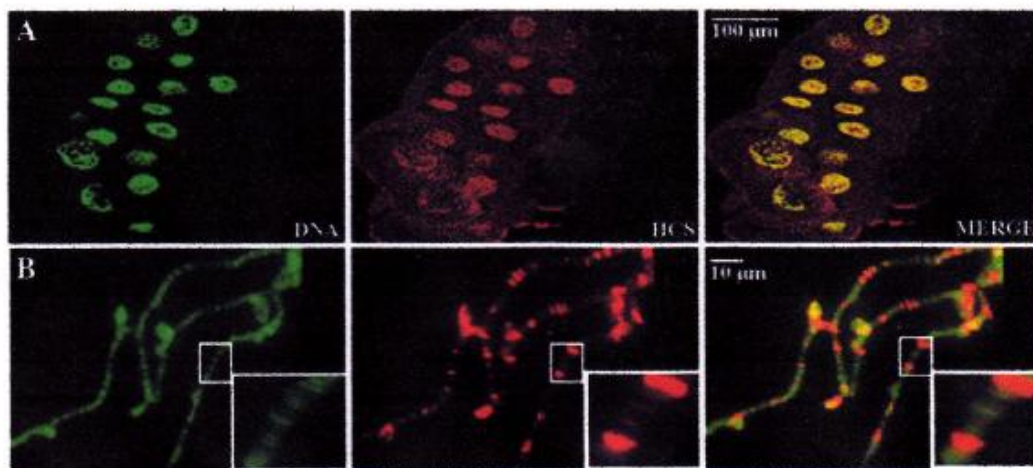


Fig. 3. Subcellular and chromosomal localization of HCS in salivary glands and polytene chromosomes of *Drosophila* larvae. DNA (green) and HCS (red) were visualized in salivary glands (A) and polytene chromosomes (B), as described in Materials and methods. (A) In salivary gland cells, HCS is more abundant in the nucleus than in the cytoplasm and shows a strong co-localization (merge) with genomic DNA. (B) Immuno-fluorescence analysis of polytene chromosomes with anti-HCS antibody shows that this protein is located at discrete bands across all chromosomes. Selected areas in polytene chromosomes, indicated by white squares, were enlarged to show heterochromatic localization of HCS.

members of the basal transcription machinery [24–26]. Exposure of the larvae to 42 °C for 5 min produced the classical puff structure at the *hsp70* locus of polytene chromosomes that indicates this domain is being actively transcribed (Fig. 5, PC heat treated). Our results show that while HCS is present at the inactive *hsp70* locus of *Drosophila* chromosomes (Fig. 5, HCS not treated), heat-induced puff formation results in the displacement of HCS from this domain (Fig. 5, HCS heat treated). In these experiments, TATA-binding protein (TBP) was used as an internal control since it has been shown to be present at the promoter of the non-transcribed *hsp70* gene (Fig. 5, TBP not treated) and displaced from this domain following heat shock (Fig. 5, TBP, heat treated) [25]. Merging of the HCS and TBP images shows that both proteins co-localize at the inactive *hsp70* locus (Fig. 5 not treated, merged). As a control of the specificity of our results, we incubated heat-shock-treated chromosomes with antibodies against HCS and components of the RNA polymerase II preinitiation complex, including transcription factor II H (TFIIH) subunits XPB and XPD [24,26] and phosphorylated Ser 5 of the C-terminal domain (CTD) of the large subunit of RNA polymerase II (RNA Pol II) (Fig. 6). As expected, the actively transcribed *hsp70* locus showed strong signals for XPB, XPD and RNA Pol II, while HCS was again absent from this domain (Fig. 6). Together, these results suggest that the presence of HCS in the *hsp70* locus is disrupted after transcriptional activation.

3.5. Holocarboxylase synthetase is recruited to the promoter region of transcriptionally inactive *hsp70* gene

To explore if nuclear HCS is associated with regulatory DNA sequences, we investigated the recruitment of this protein at the core promoter of the *hsp70* gene in not treated and heat-shock treated *Drosophila* larvae by chromatin immunoprecipitation (ChIP). After ChIP analysis of larvae using anti-HCS antibody, a fragment of ~110 bp (+4 to +113) of the *hsp70* promoter [27] could be amplified by PCR, indicating the presence of HCS at the *hsp70* promoter in the absence of transcriptional activation (Fig. 7A and B, HCS not treated). The band was essentially absent following PCR when ChIP was conducted in the absence of HCS antibody (Fig. 7A, HCS Mock). When ChIP was conducted on heat-shock treated larvae the *hsp70* promoter fragment obtained after PCR was 45% less abundant than in not-treated larvae (Fig. 7A and B). As a positive control, the experiment was repeated using the anti-Ser 2-CTD-RNA pol II antibody (Ser 2 phosphorylation occurs after transcriptional activation of the *hsp70* gene allowing the escape of the polymerase from the promoter). The results showed the

almost absence of product in the PCR performed on ChIP material derived from non heat-shock treated *Drosophila* larvae (Fig. 7A and C, RNA Pol II not treated). However, a strong band was observed in the PCR from ChIP of heat-shock treated larvae (Fig. 7A and C, RNA Pol II heat treated), confirming the presence of phosphorylated Ser-2 of the RNA II pol CTD after transcription activation of the *hsp70* gene (Fig. 7A and C).

4. Discussion

It has been suggested that biotin, in addition to its roles as cofactor of carboxylases and activator of the HCS–sGC–PKG pathway, could act as an epigenetic mark of histones. The isolation of HCS from the cell nucleus led to the hypothesis that this enzyme was responsible for histone biotinylation [28–31]. However, the recent demonstration that biotinylation is not a natural histone modification has left the function of nuclear HCS unexplained [13]. We approached this question by examining the trafficking and sub-cellular localization of HCS during development of the early *D. melanogaster* embryo.

Our results show that HCS is deposited by maternal contribution in the early syncytial blastoderm where it is evenly distributed in the cytoplasm. In these initial stages of development, HCS function may be limited to ensuring carboxylase biotinylation and metabolic homeostasis. As development continues, HCS starts to appear in the nuclei at the stage of development when zygotic transcription initiates in the embryo. In the early development of *Drosophila*, many proteins involved in regulation of gene expression show an early cytoplasmic phase followed by late migration to the nucleus at different stages. For example, while the TATA binding protein (TBP) enters the nuclei at mitotic division 8 [32], members of the TFIIH complex and RNA polymerase II migrate to the nuclei at divisions 8–10 and the CDK-activating kinase complex enters the nucleus only during cellularization [26]. The multiple protein re-localization events that precede gene expression in the early fly embryo are gradual and stochastic and are part of a mechanism of transcription activation mediated by their nucleus to cytoplasm ratio [33]. The re-localization of HCS during fly development may control its transition from participating in the cytoplasmic biotinylation and activation of carboxylases to its proposed regulatory role in the nucleus.

In differentiated cells, nuclear HCS is associated with heterochromatin domains of polytene chromosomes. HCS is particularly abundant in the chromocenter and appears as multiple bands in all chromosomes where it co-localizes with the heterochromatic mark

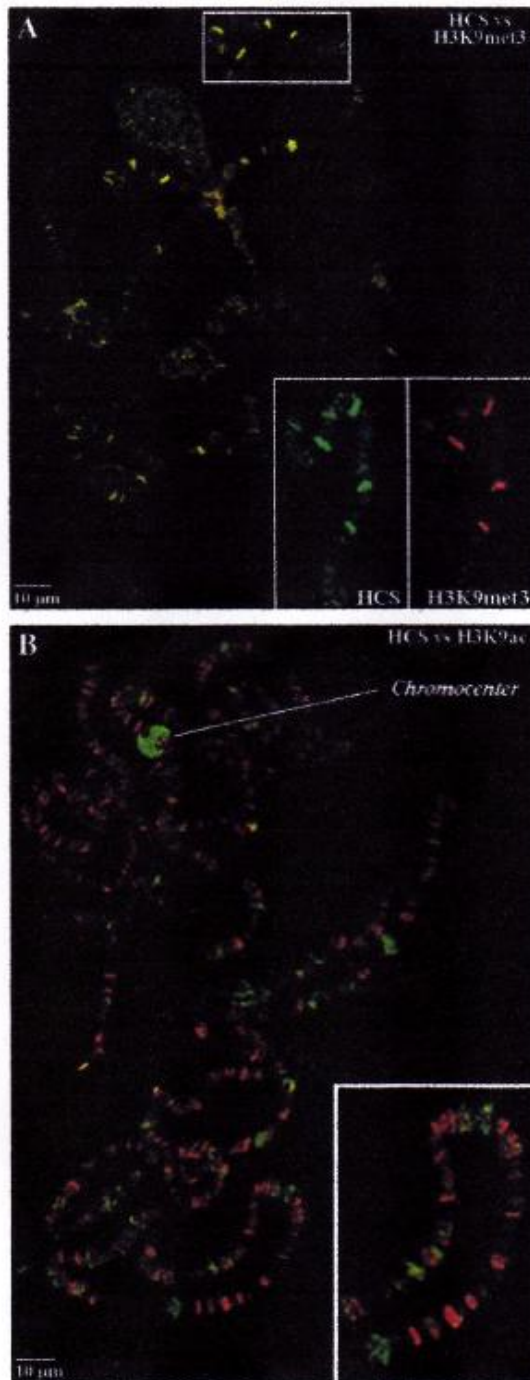


Fig. 4. HCS co-localization with epigenetic marks H3K9me3 and H3K9ac in polytene chromosomes. *Drosophila* polytene chromosomes were immuno-stained with anti-HCS antibody (green) and antibodies against the epigenetic marks (red) H3K9me3 (A) or H3K9ac (B) and shown as merge figures to show co-localization (yellow). (A) Selected areas in polytene chromosomes, showing localization of HCS (green) relative to heterochromatic mark H3K9me3 (red) were enlarged within a white square. (B) Localization of HCS (green) with respect to the euchromatic mark H3K9ac (red). Selected areas showing that HCS do not co-localize (absence of yellow) with H3K9ac were enlarged within white squares.

K3K9me3 but not with the euchromatic mark H3K9ac. These results may suggest that chromatin-associated HCS could be involved in mechanisms of repression of transcription or in heterochromatin formation. This hypothesis is supported by the analysis of HCS localization in the *hsp70* domain, a large chromosome region resulting from the amplification of the *hsp70* gene. The heat-dependent

transcriptional activation of *hsp70* can be monitored by the formation of a characteristic puff structure that has been used in numerous studies to determine the presence of different transcription factors during transcription activation or repression. Our results showed that while HCS is present at the inactive *hsp70* locus, heat-treated transcription of this gene results in its displacement from its DNA domain. In contrast, heat-shock treatment of polytene chromosomes resulted in enrichment of the *hsp70* domain with elongating RNA pol II and the helicases XPD and XPB, subunits of the TFIIH complex, as expected for an actively transcribed DNA region. Interestingly, HCS and TBP, a factor required for transcription initiation, have similar chromatin dynamics during heat-induced transcription. This observation can be understood by the previous demonstration that TBP is preassembled in the inactive *hsp70* domain to ensure a rapid transcription activation of the gene [25]. Once transcription initiates, TBP is no longer required and is disengaged from the *hsp70* promoter [25].

Our results suggesting an association of HCS to *Drosophila* chromatin partially replicate those previously reported by Zemleni and colleagues [29]. This group, also using a rabbit anti-human HCS antibody for the detection of *Drosophila* HCS, showed that HCS is broadly distributed across the euchromatic arms of all chromosomes of *D. melanogaster*. However, while their results showed intense immunostaining at certain bands, puffs (sites of active transcription), and telomeres, in our work, HCS seems to be localized only to heterochromatic bands. The antibody used by this group was described as raised against a peptide containing the human HCS sequence EHVGRDDPKALGEEPQRRGC (amino acids 58–77) [11] which has no correspondence in *Drosophila* HCS and thus the significance of their findings is uncertain.

In this study, we showed that while human cell extracts exhibit two major HCS reactive bands of 82–80 kDa, *Drosophila* larvae shows a single 125 kDa band. The bands seem to represent different isoforms of HCS since competition of the antibody with purified recombinant HCS abolished their detection by Western blot. Different studies have reported the presence of 82–80, 70 and 60 kDa HCS bands in several human cell lines and human placenta [8,21,22]. It has been recently suggested that there is a link between the cellular localization of human HCS, cytoplasmic or nuclear, and different isoform types, the latter referring to the different N-terminal extensions [21]. The much longer N-terminus of *Drosophila* HCS, relative to alignment of the active site sequences (Fig. 1), suggest a species specific role for the N-terminal region. Interestingly, examination of the N-terminus of other eukaryotic HCS or biotin protein ligase species, such as *C. elegans*, yeast and *D. discoideum* (slime mold), fails to reveal any similarities despite the conservation of the active site sequence.

In our work, immunostaining of *Drosophila* polytene chromosomes was an invaluable tool to study HCS chromatin dynamics. However, it is a limited, low resolution technique that does not allow characterization of the molecular events that occur during promoter activation. To gain insight on the presence of HCS in transcriptional regulatory DNA domains, we took advantage of the puffing activity at the *hsp70* locus of *D. melanogaster* to permit more direct observation of the molecular events surrounding its transcriptional state. We therefore performed ChIP experiments on the core promoter region of the *hsp70* gene to assess the involvement of HCS at this site. The results mimicked the observations made for heat treated polytene chromosomes by showing the presence of HCS in the inactive *hsp70* core promoter. While heat-shock stimulation resulted in the displacement of HCS from the *hsp70* promoter, this domain showed the expected, significant enrichment with active RNA polymerase. These results anchor the participation of HCS at inactive transcriptional sites and confirm its displacement from a transcriptionally active promoter. While we have examined a single gene at this level, its widespread but discrete distribution in heterochromatic regions across all chromosomes and its complete absence in euchromatic regions suggest a

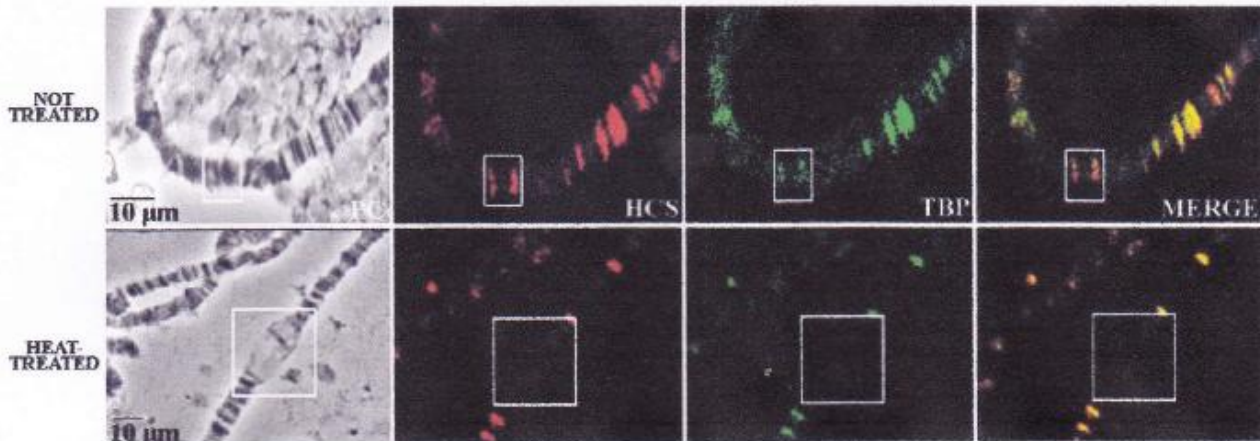


Fig. 5. Immuno-localization of HCS at the *hsp70* locus of polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Polytene chromosomes isolated from control (not treated) and heat shock treated (heat treated) third instar larvae were immunostained with anti-HCS (red) or anti-TBP (green) antibodies. Phase contrast (PC) images of polytene chromosomes showing the *hsp70* locus, enclosed in a white square, before (top panel) and after (bottom panel) heat-shock-dependent puff formation. Remaining panels, co-localization of HCS and TBP (yellow bands) in the inactive *hsp70* domain is shown after superimposing the images (merge).

generalized role for HCS in chromatin dynamics. In the case of *hsp70*, it is possible that it may contribute to maintaining the repressed state of the gene in the absence of heat induction. A larger survey of specific genes showing HCS binding in promoter regions will be required to assess its molecular role.

The participation of HCS in events of repression of transcription or gene silencing may represent a common characteristic among bacterial and eukaryotic biotin-ligases. The BirA protein in *E. coli* catalyzes the biotinylation of acetyl-CoA carboxylase and acts as the repressor of the biotin operon, regulating the synthesis of biotin,

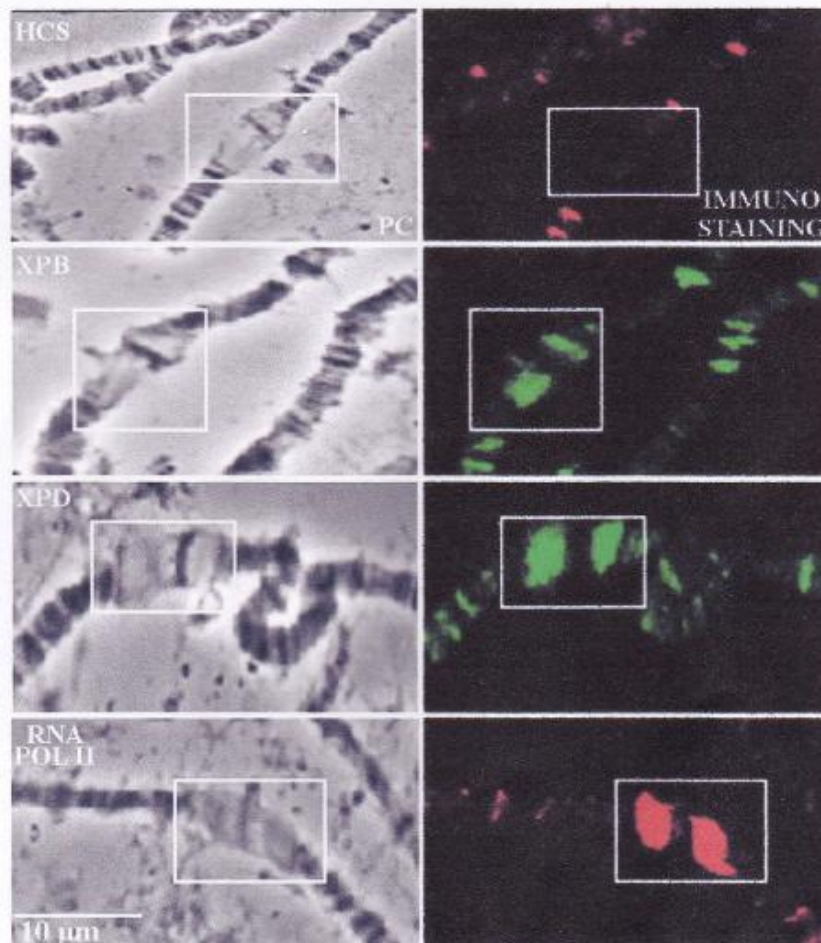


Fig. 6. Localization of HCS, XPB, XPD and RNA pol II at the *hsp70* domain in heat-shock treated polytene chromosomes. Left panels, phase contrast (PC) images of polytene chromosomes isolated from heat-shock treated *Drosophila* larvae showing the formation of puff structure at the *hsp70* domain (enclosed in a white box). Right panels, immunostaining with antibodies against HCS, two helicase subunits of the TFIIH complex, XPB and XPD, and elongating RNA polymerase II (RNA Pol II).

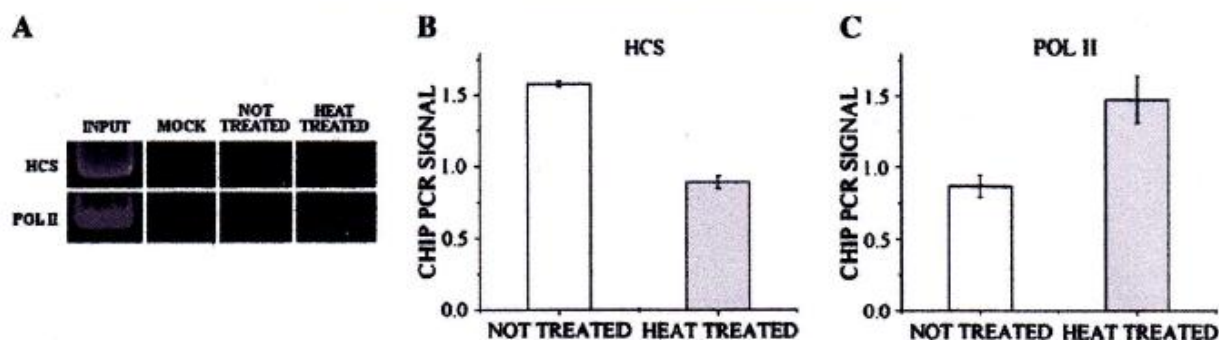


Fig. 7. Localization of HCS and RNA pol II at the core promoter of the *hsp70* gene. (A) ChIP assays were performed as described in Materials and methods. Chromatin from control (untreated) or heat-shock treated (heat-treated) salivary glands isolated from *Drosophila* larvae was immunoprecipitated using anti-HCS or anti-elongating RNA pol II antibodies. PCR amplification of the ~110 bp core promoter of *hsp70* was carried out and DNA products were separated by gel electrophoresis and photographed under UV light. 5% of the chromatin material used in ChIP assays served as a PCR positive control (Input). ChIP conducted in the absence of specific antibodies to determine specific and background PCR amplification products is shown (Mock). Results from three different experiments using anti-HCS (B) or anti-elongating RNA pol II (C) antibodies are presented as mean \pm S.E. Differences between not treated and heat treated larvae are shown to be statistically significant ($p < 0.05$).

through its direct binding to specific DNA sequences in the promoter of the biotin operon [34,35]. However, the lack of a DNA binding domain in HCS suggests that its recruitment to heterochromatin domains and its putative function in gene silencing may require interaction with other cell factors that bind directly to DNA. The targeting of HCS to nuclei in HeLa cells illustrates the expectation of a dual role for the enzyme in humans [8]. In this case, HCS was shown to be associated with chromatin and lamin B, a major component of the nuclear lamina [36]. This finding could be related to the co-localization of HCS with the heterochromatin mark H3K9me3 (discrete chromosome bands) observed in this study. In differentiated nuclei, transcriptionally inactive, repressed multigenic regions are frequently localized to the nuclear periphery suggesting that tethering of genetic loci to nuclear lamina causes their silencing [37,38]. Lamins contribute to gene silencing by providing docking sites for diverse repressors [36]. Some of these proteins are enriched at the chromocenter and telomeric domains of fly polytene chromosomes, and bind to histone H3 N-terminal tails when methylated on lysine 9 [39]. It has been proposed that an expanding number of nuclear lamina-associated proteins recruit H3K9me3-marked chromatin to the nuclear matrix where it is transcriptionally silenced [36,39,40]. The co-localization of nuclear HCS with H3K9me3 at multiple bands in transcriptionally inactive heterochromatin in polytene chromosomes may suggest that this enzyme could participate in the repression of chromatin domains as part of protein complexes that include lamin B and H3K9me3.

Because of the role of HCS in maintaining metabolic homeostasis as the activator of biotin-dependent carboxylases, it is not possible to explore the possibility that mutations including deletions of the HCS gene have a role in suppressing position effect variegation. For this reason, we propose to use the RNAi technology to direct the specific knockdown of HCS to the salivary glands and analyze the effect on the transcriptional activation and repression of the HSP70 locus. These experiments could also identify genetic interactions between HCS and other chromatin associated proteins involved in transcriptional repression such as HP1 or Su(var)3-9.

We have previously shown that in human cells HCS up-regulates the expression of genes involved in biotin utilization through the activation of the biotin-dependent HCS-GCs-PKG signal transduction cascade [4,6]. In this work, we presented evidence for a novel role for HCS in the repression of gene expression through a mechanism involving its trafficking to the nucleus and interaction with heterochromatin domains. These findings have dramatically extended the enzymatic role of HCS in the biotinylation of carboxylases. A more general regulatory role for HCS, at this time, seems enigmatic, since a role for biotin has yet to be implicated. It will be important to identify the cell factors that recruit HCS to chromatin, to identify the genes

affected by this mechanism and to determine if biotin, as a mediator or in relation to metabolic status, has a role in this novel nuclear function of HCS.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Roy A. Gravel from the University of Calgary, Dr. Alfonso González-Noriega, Dr. Iván Meneses-Morales and Dr. Tonatiuh Barrios-García from Universidad Nacional Autónoma de México for comments on this work and Dr. Zoraya Palomera-Sanchez, Rafael Cervantes Roldán and Andrés Saralegui for technical assistance. This work was supported by Grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (127606) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (IN226609). S.R.C., student of Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, was supported by a scholarship from CONACyT.

References

- [1] J. Hymes, B. Wolf, Biotinidase and its roles in biotin metabolism, *Clin. Chim. Acta* 255 (1996) 1–11.
- [2] D. Pacheco-Alvarez, R.S. Solórzano-Vargas, A.L. Del Río, Biotin in metabolism and its relationship to human disease, *Arch. Med. Res.* 33 (2002) 439–447.
- [3] A. Leon-Del-Río, R. Gravel, Sequence requirements for the biotinylation of carboxyl-terminal fragments of human propionyl-CoA carboxylase alpha subunit expressed in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 22964–22968.
- [4] R.S. Solórzano-Vargas, D. Pacheco-Alvarez, A. León-Del-Río, Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 5325–5330.
- [5] A. Perez-Monjaras, R. Cervantes-Roldán, I. Meneses-Morales, R.A. Gravel, S. Reyes-Carmona, S. Solórzano-Vargas, A. González-Noriega, A. Leon-Del-Río, Impaired biotinidase activity disrupts holocarboxylase synthetase expression in late onset multiple carboxylase deficiency, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 34150–34158.
- [6] D. Pacheco-Alvarez, R.S. Solórzano-Vargas, R.A. Gravel, R. Cervantes-Roldán, A. Velázquez, A. Leon-Del-Río, Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 52312–52318.
- [7] A. Velázquez-Arellano, L. Hernández-Esquivel Mde, R.M. Sánchez, D. Ortega-Cuellar, N. Rodríguez-Fuentes, S. Cano, A. Leon-Del-Río, K. Carvajal, Functional and metabolic implications of biotin deficiency for the rat heart, *Mol. Genet. Metab.* 95 (2008) 213–219.
- [8] M.A. Narang, R. Dumas, L.M. Ayer, R.A. Gravel, Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 15–23.
- [9] J. Hymes, K. Fleischhauer, B. Wolf, 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.* 56 (1995) 76–83.
- [10] G. Camporeale, E. Shubert, S. Gautam, C. Ronald, J. Zemleni, K8 and K12 are biotinylated in human histone H4, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 2257–2263.
- [11] Y.C. Chew, G. Camporeale, N. Kothapalli, G. Sarath, J. Zemleni, Lysine residues in N-terminal and C-terminal regions of human histone H2A are targets for biotinylation by biotinidase, *J. Nutr. Biochem.* 17 (2006) 225–233.

- [12] K. Kobza, G. Camporeale, B. Rueckert, A. Kueh, J. Griffin, G. Sarath, J. Zemleni, K4, K9 and K18 in human histone H3 are targets for biotinylation by biotinidase, *FEBS J.* 272 (2005) 4249–4259.
- [13] S. Healy, B. Perez-Cadahia, D. Jia, M.K. McDonald, J.R. Davie, R.A. Gravel, Biotin is not a natural histone modification, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gene Regul. Mech.* 1789 (2009) 719–733.
- [14] E.D. Streaker, D. Beckett, Nonenzymatic biotinylation of a biotin carboxyl carrier protein: unusual reactivity of the physiological target lysine, *Protein Sci.* 15 (2006) 1928–1935.
- [15] L.M. Bailey, R.A. Ivanov, J.C. Wallace, S.W. Polyak, Artifactual detection of biotin on histones by streptavidin, *Anal. Biochem.* 373 (2008) 71–77.
- [16] H. Shannon, D.H. Tom, H. Laura, S. David, R.A. Gravel, Nonenzymatic biotinylation of histone H2A, *Protein Sci.* 18 (2009) 314–328.
- [17] C. Merino, E. Reynaud, M. Vazquez, M. Zurita, DNA repair and transcriptional effects of mutations in TFIH in *Drosophila* development, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 3246–3256.
- [18] E. Reynaud, H. Lomeli, M. Vazquez, M. Zurita, The *Drosophila melanogaster* homologue of the Xeroderma pigmentosum D gene product is located in euchromatic regions and has a dynamic response to UV light-induced lesions in polytene chromosomes, *Mol. Biol. Cell* 10 (1999) 1191–1203.
- [19] A. León-Dei-Río, B. Akerman, N. Wakamatsu, R.A. Gravel, Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of *Escherichia coli*, *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 4626–4630.
- [20] N.R. Pardini, L.M. Bailey, G.W. Booker, M.C. Wilce, J.C. Wallace, S.W. Polyak, Microbial biotin protein ligases aid in understanding holocarboxylase synthetase deficiency, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Proteins Proteomics* 1784 (2008) 973–982.
- [21] L.M. Bailey, J.C. Wallace, S.W. Polyak, Holocarboxylase synthetase: correlation of protein localisation with biological function, *Arch. Biochem. Biophys.* 496 (2010) 43–52.
- [22] M. Hiratsuka, O. Sakamoto, X. Li, Y. Suzuki, Y. Aoki, K. Narisawa, Identification of holocarboxylase synthetase (HCS) proteins in human placenta, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1385 (1998) 165–171.
- [23] E. Rampakakis, D.D. Paola, M.K. Chan, M. Zannis-Hadjopoulos, Dynamic changes in chromatin structure through post-translational modifications of histone H3 during replication origin activation, *J. Cell. Biochem.* 108 (2009) 400–407.
- [24] A.K. Boehm, A. Saunders, J. Werner, J.T. Lis, Transcription factor and polymerase recruitment, modification, and movement on dhsp70 in vivo in the minutes following heat shock, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 7628–7637.
- [25] L.A. Lebedeva, E.N. Nabirochkina, M.M. Kurshakova, F. Robert, A.N. Krasnov, M.B. Evgen'ev, J.T. Kadonaga, S.G. Georgieva, L. Tora, Occupancy of the *Drosophila* hsp70 promoter by a subset of basal transcription factors diminishes upon transcriptional activation, *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 18087–18092.
- [26] J. Aguilar-Fuentes, V. Valadez-Graham, E. Reynaud, M. Zurita, TFIH trafficking and its nuclear assembly during early *Drosophila* embryo development, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 3866–3875.
- [27] S.J. Petesch, J.T. Lis, Rapid, transcription-independent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at Hsp70 Loci, *Cell* 134 (2008) 74–84.
- [28] Y.I. Hassan, J. Zemleni, Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin, *J. Nutr.* 136 (2006) 1763–1765.
- [29] G. Camporeale, E. Giordano, R. Rendina, J. Zemleni, J.C. Eissenberg, *Drosophila melanogaster* holocarboxylase synthetase is a chromosomal protein required for normal histone biotinylation, gene transcription patterns, lifespan, and heat tolerance, *J. Nutr.* 136 (2006) 2735–2742.
- [30] G. Camporeale, J. Zemleni, J.C. Eissenberg, Susceptibility to heat stress and aberrant gene expression patterns in holocarboxylase synthetase-deficient *Drosophila melanogaster* are caused by decreased biotinylation of histones, not of carboxylases, *J. Nutr.* 137 (2007) 885–889.
- [31] I.H. Yousef, J. Zemleni, A novel, enigmatic histone modification: biotinylation of histones by holocarboxylase synthetase, *Nutr. Rev.* 66 (2008) 721–725.
- [32] Z. Wang, S. Lindquist, Developmentally regulated nuclear transport of transcription factors in *Drosophila* embryos enable the heat shock response, *Development* 125 (1998) 4841–4850.
- [33] D.K. Pritchard, G. Schubiger, Activation of transcription in *Drosophila* embryos is a gradual process mediated by the nucleocytoplasmic ratio, *Genes Dev.* 10 (1996) 1131–1142.
- [34] J.E. Cronan, The *E. coli* bio operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme, *Cell* 58 (1989) 427–429.
- [35] D. Beckett, The *Escherichia coli* biotin regulatory system: a transcriptional switch, *J. Nutr. Biochem.* 16 (2005) 411–415.
- [36] A. Taddei, F. Hediger, F.R. Neumann, S.M. Gasser, The function of nuclear architecture: a genetic approach, *Annu. Rev. Genet.* 38 (2004) 305–345.
- [37] A. Akhtar, S.M. Gasser, The nuclear envelope and transcriptional control, *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 507–517.
- [38] F.M. Heessen, The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place, *EMBO Rep.* 8 (2007) 914–919.
- [39] S.R. Schulze, L.L. Wallrath, Gene regulation by chromatin structure: paradigms established in *Drosophila melanogaster*, *Annu. Rev. Entomol.* 52 (2007) 171–192.
- [40] T. Dechat, K. Pfliegerhaer, K. Sengupta, T. Shimi, D.K. Shumaker, L. Solimando, R.D. Goldman, Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin, *Genes Dev.* 22 (2008) 832–853.

Impaired Biotinidase Activity Disrupts Holocarboxylase Synthetase Expression in Late Onset Multiple Carboxylase Deficiency*

Received for publication, September 9, 2008. Published, JBC Papers in Press, October 9, 2008, DOI 10.1074/jbc.M806985200

Anyly Pérez-Monjaras^{†1}, Rafael Cervantes-Roldán[†], Iván Meneses-Morales^{†1}, Roy A. Gravel[‡], Sandra Reyes-Carmona[†], Sergio Solórzano-Vargas[†], Alfonso González-Noriega[‡], and Alfonso León-Del-Río^{†2}

From the [†]Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, and Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México and the [‡]Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 4N1, Canada

Biotinidase catalyzes the hydrolysis of the vitamin biotin from proteolytically degraded biotin-dependent carboxylases. This key reaction makes the biotin available for reutilization in the biotinylation of newly synthesized apocarboxylases. This latter reaction is catalyzed by holocarboxylase synthetase (HCS) via synthesis of 5'-biotinyl-AMP (B-AMP) from biotin and ATP, followed by transfer of the biotin to a specific lysine residue of the apocarboxylase substrate. In addition to carboxylase activation, B-AMP is also a key regulatory molecule in the transcription of genes encoding apocarboxylases and HCS itself. In humans, genetic deficiency of HCS or biotinidase results in the life-threatening disorder biotin-responsive multiple carboxylase deficiency, characterized by a reduction in the activities of all biotin-dependent carboxylases. Although the clinical manifestations of both disorders are similar, they differ in some unique neurological characteristics whose origin is not fully understood. In this study, we show that biotinidase deficiency not only reduces net carboxylase biotinylation, but it also impairs the expression of carboxylases and HCS by interfering with the B-AMP-dependent mechanism of transcription control. We propose that biotinidase-deficient patients may develop a secondary HCS deficiency disrupting the altruistic tissue-specific biotin allocation mechanism that protects brain metabolism during biotin starvation.

In humans, the vitamin biotin is an essential micronutrient that has two different functions in the cell (1). First, it is the cofactor of five biotin-dependent carboxylases: pyruvate carboxylase (PC),³ propionyl-CoA carboxylase (PCC), methyl-

crotonyl-CoA carboxylase (MCC), and two forms of acetyl-CoA carboxylase (ACC-1 and ACC-2) (2). These enzymes catalyze key reactions in gluconeogenesis, branched chain amino acid catabolism, and fatty acid synthesis and underscore the importance of biotin to metabolic homeostasis (2). Second, biotin is a regulator of the expression of several hepatic proteins that include glucokinase, phosphoenol pyruvate carboxykinase, and most of the proteins involved in biotin metabolism (1, 3–13).

Because of the importance of biotin in cell metabolism, higher organisms face a constant threat to their survival because they are incapable of synthesizing the vitamin. The situation is further complicated by the limited availability of biotin in nature, most of which is protein-bound and not directly accessible (2, 14). During evolution, mammals developed what is known as the biotin cycle, which allows them to cope with the low availability of this critical nutrient (Fig. 1). This system depends on two enzymes; holocarboxylase synthetase (HCS) and biotinidase (1, 2). HCS is responsible for the activation, via biotinylation, of all biotin-dependent carboxylases in human cells. The process takes place in a two-step, ATP-dependent reaction in which biotin is first activated to 5'-biotinyl-AMP (B-AMP) and then transferred to a specific and highly conserved lysine residue in all biotin-dependent carboxylases (2, 15, 16). Biotinidase catalyzes the release of biotin from biotinylated peptides or biocytin (biotinyl-lysine), products generated by intestinal digestion of nutrient proteins or during carboxylase turnover (endogenous biotin recycling) (2, 17).

We recently showed that HCS is an obligate participant in biotin-mediated transcriptional regulation (Fig. 1). The underlying mechanism requires B-AMP, the product of the HCS reaction, which activates a signal transduction cascade involving soluble guanylate cyclase (sGC) and cGMP-dependent protein kinase (PKG) (4, 7). In the presence of biotin, the HCS-sGC-PKG pathway induces the expression of the components of the biotin cycle required for its transport and utilization: the sodium-dependent multivitamin transporter, PC, PCC, MCC, ACC, and HCS (3, 5, 13). Paradoxically, biotin deficiency results

*This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 48862 and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica Grant IN220206-3 and funds from the Universidad Nacional Autónoma de México. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[†]Recipients of doctoral scholarships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

[‡]To whom correspondence should be addressed: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México. Tel.: 5255-5622-8940; E-mail: leon@biomedicas.unam.mx.

³The abbreviations used are: PC, pyruvate carboxylase; HCS, holocarboxylase synthetase; MCD, multiple carboxylase deficiency; B-AMP, 5'-biotinyl-

AMP; PCC, propionyl-CoA-carboxylase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; MCC, methylcrotonyl-CoA carboxylase; sGC, soluble guanylate cyclase; PKG, cGMP-dependent protein kinase; ODO, 1-H(1,2,4)-oxadiazolo-[4,3-a]quinaxolin-1-one; 8-Br-cGMP, 8-bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate; PVDF, polyvinylidene difluoride.

Deficiency of Biotinidase Activity Disrupts HCS Expression

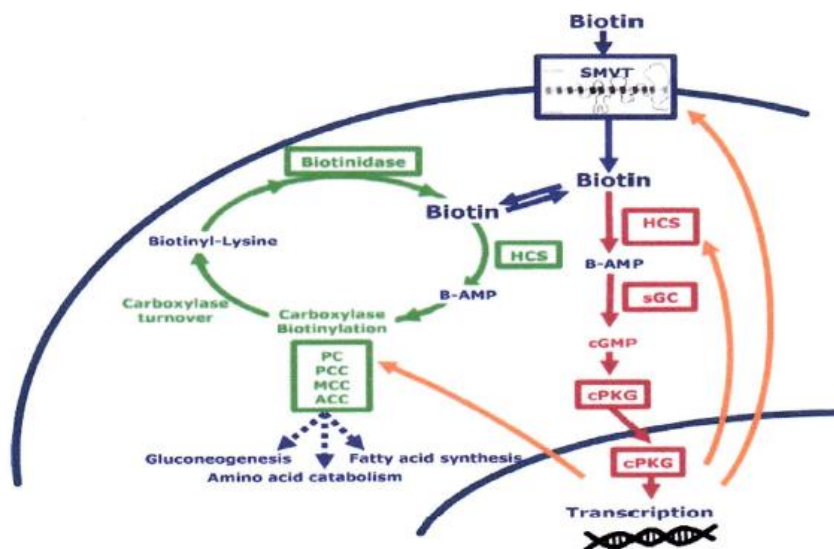


FIGURE 1. **The biotin cycle and the HCS-dependent transcriptional regulation in human cells.** Shown is a schematic representation of the biotin cycle (green arrows) and the HCS-dependent signal transduction pathway (red arrows) responsible for the transcriptional regulation of PC, PCC, MCC, ACC, sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT), and HCS. The enzymes participating in the HCS pathway are sGC and PKG.

in reduced expression of these genes in tissues such as liver, kidney, and muscle but not brain. Although this would seem to be contrary to the need for scavenging biotin during limited supply, we showed that this pattern of gene repression is an altruistic tissue-specific contingency mechanism that, by down-regulating biotin utilization in selected tissues, allows a concerted supply of the remaining vitamin to the brain (3). In this organ, PC plays two essential roles: as a key player in anaplerosis of the Krebs cycle through pyruvate carboxylation and in the restoration of α -ketoglutarate lost during the release of glutamate and γ -aminobutyric acid from neurons and glutamine export from glia (18, 19).

In humans, the biotin cycle can be disrupted by genetic deficiency of holocarboxylase synthetase (HCS deficiency (MIM 253270)) or biotinidase (BTD deficiency (MIM 253260)), resulting in neonatal or juvenile onset forms, respectively, of the disease multiple carboxylase deficiency (MCD) (2, 20, 21). Although the two diseases differ in the age of onset of symptoms, they share a number of clinical and biochemical manifestations, including decreased activities of all carboxylases, organic acidemia, hyperammonemia, dermatitis, alopecia, seizures, and coma. In biotinidase-deficient patients, neurological damage may also include mental retardation, hearing loss, and optic nerve atrophy (2). Although potentially lethal, most of clinical and biochemical manifestations of neonatal and juvenile MCD can be successfully treated with pharmacological doses of biotin.

The biotin-responsiveness of neonatal MCD patients is associated primarily with having at least one allele expressing a mutant HCS with an elevated K_m for biotin, which allows for increased functional activity at high concentrations of biotin (1–5). However, based on the participation of HCS in the biotin-dependent transcriptional regulation of the biotin cycle, we have suggested that the clinical and biochemical deficits in

HCS-deficient patients reflect the combined effects of the low affinity of the mutant enzyme for biotin and the concomitant reduction in carboxylase and HCS mRNA levels (3, 4). In biotinidase-deficient patients, the biotin cycle is largely intact because free biotin can be successfully utilized for the biotinylation of carboxylases. Here the deficit has been thought to be in the inadequacy of the biotin supply because of the inability to recycle protein-bound biotin from endogenous or nutrient sources (2). Therefore, supplementation with biotin at pharmacologic doses is thought to compensate for the loss of access to the additional biotin that would normally be available from protein sources (2). Although the ultimate consequence of biotinidase deficiency is the interruption of the metabolic pathways where biotin-

dependent carboxylases participate, the clinical manifestations that distinguish this disorder from HCS deficiency, especially in relation to neurological presentation, are not fully understood (22).

In this work, we use fibroblasts from a biotinidase-deficient patient as an experimental model to study the role of this enzyme in carboxylase biotinylation and in HCS-sGC-PKG-dependent expression of biotin-dependent carboxylases and HCS under conditions of biotin deficiency and supplementation. Our results show that in biotinidase-deficient cells, biotin starvation results in a more rapid reduction in carboxylase biotinylation and in the expression of PC and MCC than in normal fibroblasts. We also demonstrate that in biotinidase-deficient cells the expression and activity of HCS is lower than in control cells. We propose that, in the absence of biotin supplementation, biotinidase-deficient patients may develop a secondary HCS deficiency that, combined with the primary biotinidase deficiency, may disrupt the altruistic regulation of biotin utilization that protects brain metabolism against vitamin starvation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Biotin, biocytin, 1-H(1,2,4)-oxadiazolo-[4,3-a]quinaxolin-1-one (ODQ), and 8-bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-Br-cGMP) were from Sigma-Aldrich. d-[8,9-³H]biotin (34.0 Ci/mmol) was purchased to Amersham Biosciences. The biotinidase-deficient cell line MCD-BD was from the Montreal Children's Hospital Cell Repository for Mutant Human Cell Strains, and the HCS-deficient cell line MCD-MK (23) and the rabbit antibody to HCS (24) were reported previously. Human normal fibroblasts were obtained from G. Soldevila (Universidad Nacional Autónoma de México). *Escherichia coli* C-124 cells have been previously described (16, 25). Cell cultures were maintained in α -minimum Eagle's

Deficiency of Biotinidase Activity Disrupts HCS Expression

medium containing high glucose (Invitrogen; biotin concentration, 0.40 μM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (biotin-replete medium). Biotin-deficient medium was prepared using biotin-free minimum Eagle's medium, dialyzed fetal bovine serum (Invitrogen), and the same antibiotic concentration.

Cell Culture Experiments—The methods for biotin starvation of cell cultures are essentially as described previously (3, 4). Briefly, the cells were grown in biotin-replete or biotin-deficient medium at 37 °C with 5% CO_2 for up to 13 days. The medium was changed at 3-day intervals. For carboxylase biotinylation recovery experiments, the cells grown in biotin-deficient medium were stimulated with biotin or biocytin, at concentrations from 1 to 100 nM for 24 h.

Western Blot Analysis for HCS Expression and Carboxylase Biotin Content—Crude extracts from human cell cultures (30–100 μg of total protein) were fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore). The membranes were incubated in a 1:3000 solution of rabbit HCS antibody or with a 1:2000 solution of streptavidin-AP conjugate (Roche Applied Science) or with a 1:500 solution of goat MCC or PCC antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Visualization of HCS bands was performed using a BM chemiluminescence Western blotting kit (Roche Applied Science). Biotin-containing bands were quantitated using an FX image analyzer (Bio-Rad) as described above. The protein concentration used in these experiments was determined using a ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Inc.), and confirmation of equal amounts of total protein in every lane was done by staining the gels with Coomassie Blue before protein transfer to PVDF membranes.

Effect of Biotin and cGMP on Carboxylase Expression in Biotin-starved Cells—To determine the involvement of sGC on the recovery of biotinylation and carboxylase protein levels, biotin-starved normal fibroblasts were treated with 50 μM ODQ, a specific inhibitor of sGC, for 3 h (4). After this period, 1 μM biotin was added to the medium for 48 or 72 h, and the effect on MCC protein levels was compared with biotin-deficient cells stimulated by biotin without ODQ and cells grown continuously in normal medium (control cells). Alternatively, MCD-BD cells grown in biotin-free medium for 13 days were stimulated with 1 μM biotin or 1 mM 8-Br-cGMP, a nonhydrolyzable analogue of cGMP. The cells were harvested after 48 or 72 h, and the MCC protein levels were determined as described above.

Reverse Transcription-PCR—Procedures for RNA isolation, cDNA synthesis, and PCR have been previously described (3, 4). 5 μg of total RNA and 0.5 μM gene-specific oligonucleotide primers were used for cDNA synthesis and 0.3 μM specific sense and antisense primers were used to give 200–300 bp of PCR products. The oligonucleotides used to amplify human mRNA were: HCS: 5'-CCC GAG CTC CGT CTC CTG GAT CGG-3' and 5'-CCC AAG CCT TTT ACC GCC GTT TGG GGA-3' ($T_m = 58$ °C); Biotinidase, 5'-ATC TAT GAA CAG CAA GTG ATG ACT-3' ($T_m = 66$ °C) and 5'-AGG GAC CAG GGT GAA ATT GTC ATA-3' ($T_m = 70$ °C); β -actin: 5'-GGG

TCA GAA TTC CTA TG-3' and 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' ($T_m = 58$ °C). PCR products were separated on 1% agarose gels and stained with ethidium bromide. The amount of PCR product was determined by densitometry by using a FluorS-imager (Bio-Rad) as previously described (3, 4). The procedure was validated in prior studies by PCR amplification of different concentrations of cDNA fragments of HCS, biotinidase, and β -actin (data not shown). The number of PCR cycles was also varied and plotted against fluorescence intensity to ensure that experiments were done within the exponential phase. For every experiment, the constitutive β -actin mRNA was used as the reference cellular transcript. It was present at equivalent levels in all RNA samples.

HCS Activity Assay Using p67 as Biotinylation Substrate—To determine HCS activity in normal and MCD-BD fibroblasts, we used a modification of the protocol described previously (16, 25). Briefly, a pFLAG vector (Sigma) containing a cDNA fragment encoding the last 67 amino acids (640–703) of the α subunit of human PCC was used to transform wild type *E. coli* XL1 Blue and *E. coli* C-124, a mutant strain unable to synthesize dethiobiotin, an essential intermediate in the production of biotin. Log phase XL-1 and C-124 cultures in L-broth medium were transferred to a biotin-free medium (7.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 33 mM KH_2PO_4 , 60 mM K_2HPO_4 , 1.7 mM sodium citrate, 1 mM MgSO_4 , 0.2% dextrose, 0.1% casamino acids) and 2 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside and incubated at 37 °C for 4 h. The cells were sonicated three times with 10-s pulses and centrifuged at 15,000 rpm for 20 min. The proteins in the supernatant were resolved by 12% acrylamide gel electrophoresis (100 μg of total protein/lane) and transferred to a PVDF membrane. Two biotinylated proteins are possible in cells expressing p67: p67, at 14 kDa, and BCCP, the 18-kDa subunit of *E. coli* ACC. To detect their positions on the gel, one lane containing proteins expressed by XL1 cells transformed with p67 was cut off from the membrane and incubated with streptavidin-AP to detect the biotinylated proteins (see Fig. 6A). The lower band, corresponding to p67, was used as a reference to cut out the section of the membrane in adjacent lanes containing unbiotinylated or apo-p67 expressed by *E. coli* C-124. The membrane pieces containing apo-p67 were used, in solid phase format, for HCS assays. HCS activity was monitored by incubating the membrane pieces for 1 h at 25 °C in 150 μl of reaction buffer containing Tri-HCl, pH 8.0, 50 mM reduced glutathione, 22.5 mM MgCl_2 , 5 mM ATP, 1–3 μCi of [^3H]biotin, and 100 μg of total protein of crude extracts from normal or MCD-BD fibroblasts. For these experiments cells grown in biotin-supplemented medium were preincubated for 6 h with 1 μM nonradioactive biotin and 63 μM cycloheximide to block free biotinylation sites and prevent *de novo* carboxylases synthesis (5). Crude extracts were prepared as previously described and passed twice through an Amicon ultra centrifugal device (Millipore) to eliminate nonradioactive biotin. The radioactive biotin incorporated into the membrane-bound p67 was estimated using a Beckman LS 6500 scintillation counter. Under these conditions, the p67 was in excess, and the assay was linear for the 1 h of incubation.

cDNA and Genomic DNA Sequencing—To determine the mutations responsible for the phenotype of MCD-BD cells, the

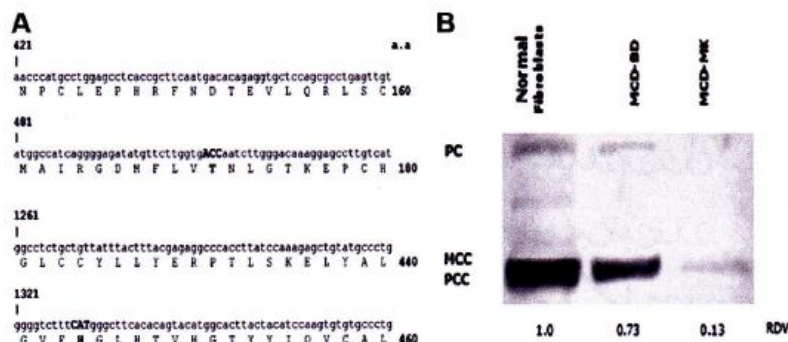


FIGURE 2. Molecular and functional characterization of cell line MCD-BD. *A*, partial biotinidase amino acid sequence (residues 140–180 and 420–460) localizing substitutions A171T and D444H found in the cell line MCD-BD. The corresponding nucleotide sequence is shown above the amino acid sequences with mutations indicated in *bold characters*. *B*, representative Western blot experiment showing the effect of biotinidase deficiency (MCD-BD cells) in the biotinylation of PC, MCC, and PCC following growth in biotin replete (0.40 μ M biotin) medium. The MCD-MK cells are from a patient with HCS deficiency (3). The changes in streptavidin-AP-reactive MCC/PCC bands were analyzed by densitometry. The values below the lanes correspond to the relative densitometry value (RDV) normalized to the value observed in normal fibroblasts. Each lane contains 50 μ g of crude cell lysate.

biotinidase cDNA was cloned in the pGEM vector (Promega). Biotinidase exons were amplified from genomic DNA as previously described (26, 27) and subcloned also in pGEM. Both cDNA and exons were sequenced at Laragen (Los Angeles, CA).

Statistical Analysis—All of the experiments were done in triplicate and at least three different times. The results of biotin starvation on mRNA were normalized to β -actin mRNA and expressed as a percentage of mRNA levels observed in cells grown in biotin-replete medium. The data are presented as the mean of three different experiments \pm S.E. unless otherwise indicated. Statistical significance of p67 biotinylation results obtained with normal or MCD-BD cells were analyzed at 0.05 and 0.01 levels of significance using Student's *t* test one-way ANOVA.

RESULTS

Molecular and Functional Characterization of the Biotinidase-deficient Cell Line MCD-BD—To characterize the cell line MCD-BD used as an experimental model in this study, we first identified the mutations responsible for biotinidase deficiency by sequencing the cDNA encoding this enzyme. This procedure resulted in the identification of a transversion 1330G \rightarrow C, which causes a substitution of His for Asp⁴⁴⁴ (D444H), and a single base transition 511G \rightarrow A, resulting in a substitution of Thr for Ala¹⁷¹ (A171T) (Fig. 2A). These mutations have been previously reported (26) and are considered a common cause of profound biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in the United States (28). Because these mutations were originally described as a double mutation allele (28), we sequenced all four biotinidase exons from genomic DNA to search for another mutation. This procedure confirmed the identified mutations and did not reveal the presence of any other mutation.

To verify the impact of these mutations, we tested the biotinylation status of the carboxylases PC, PCC, and MCC in MCD-BD cells and compared the results with normal fibroblasts (positive control) and MCD-MK fibroblasts (negative

control). The latter cells have unbiotinylated carboxylases in the standard biotin-replete medium caused by a homozygous, high K_m , R508W mutation in HCS but are restored to normal in medium containing 100 \times biotin (23). The cells were grown in biotin-replete medium to 80% confluence, and total proteins from cell extracts were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis. The biotin content in carboxylases was visualized by Western blot using streptavidin-AP. Three bands were identified in normal cells corresponding to PC (128 kDa), MCC- α subunit (76 kDa), and PCC- α subunit (72 kDa). As we previously reported, ACC (265 kDa) is not detected using this colorimetric assay (3). PCC and

MCC appear as a broad band or doublet, clearly distinguishable from the fainter PC band (Fig. 2B). In contrast, MCD-BD cells exhibited reduced MCC-PCC biotinylation in biotin-replete medium, to approximately two-thirds of the levels observed in the normal fibroblasts. As expected, MCD-MK cells showed almost complete absence of biotin incorporation into PC, MCC and PCC (Fig. 2B). These results suggest that profound biotinidase deficiency results in a reduced level of carboxylase biotinylation in human fibroblasts in culture, even when grown in the presence of excess biotin.

Biotinidase Deficiency Hinders Recovery of Carboxylase Biotinylation in Biotin-deficient Cells in Response to Biocytin or Biotin Stimulation—The above experiment demonstrated a biotinylation defect in the MCD-BD cells that extends beyond the immediacy of the defect in releasing protein-bound biotin. To determine whether this is the result of a deficient recycling of biotin, we examined the ability of biotin-starved cells to recover carboxylase biotinylation after stimulation with biotin or biocytin. Previous studies by us and others established that nutrient biotin deficiency results in a reduction in biotinylated PC, PCC, and MCC (3, 29, 30). In this study, we have focused on the combined PCC-MCC biotinylation to monitor biotin status in our experiments. The cells were grown in biotin-deficient medium for 13 days and then stimulated with biotin or biocytin for 24 h at concentrations ranging from physiological to pharmacological (1, 10, and 100 nM). Total protein extracts from the cell cultures were separated by gel electrophoresis, and the recovery in PCC-MCC biotinylation was determined with streptavidin-AP. In these experiments, the results are normalized with respect to the values obtained by normal fibroblasts in normal medium. Normal fibroblasts incubated in biotin-deficient medium showed PCC-MCC biotinylation of less than 25% of the level observed in control cells. When the biotin-starved cells were stimulated with 1, 10, and 100 nM biotin, the biotin content in PCC-MCC increased to 26 ± 2 , 87 ± 14 , and $103 \pm 11\%$ of control values, respectively (Fig. 3A). Similar results were obtained when biocytin, instead of biotin, was used as the

Deficiency of Biotinidase Activity Disrupts HCS Expression

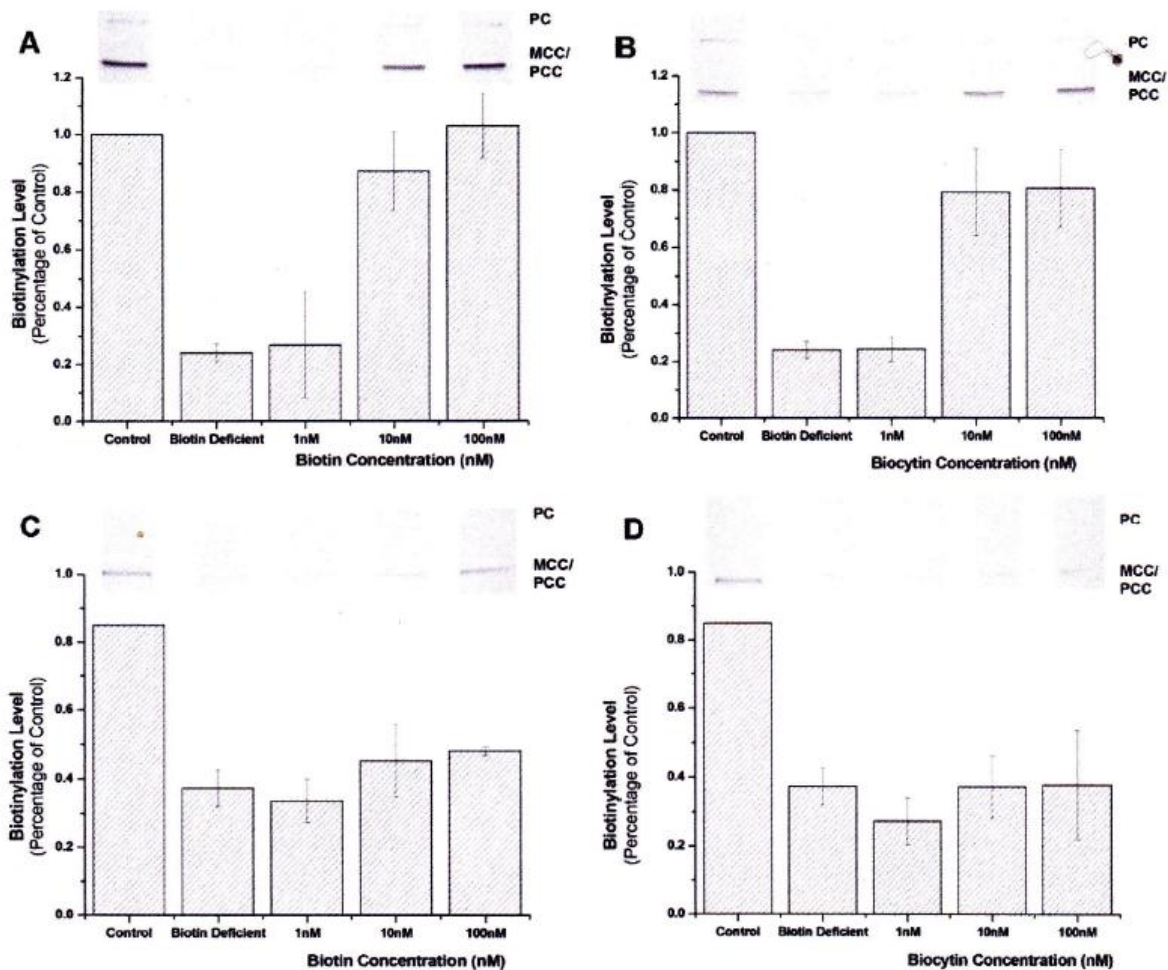


FIGURE 3. Effect of biocytin (biotinyl-lysine) and biotin concentration in carboxylase biotinylation of normal and MCD-BD fibroblasts cultivated in biotin-deficient medium. Normal (A and B) and MCD-BD fibroblasts (C and D) were incubated in biotin-deficient medium for 13 days (biotin deficient cell) to reduce the amount of biotin present in carboxylases. The cells were then transferred to a medium containing 1, 10, or 100 nM of biotin (A and C) or biocytin (B and D) for 24 h. Recovery of carboxylase biotinylation was determined by densitometric analysis of the streptavidin-AP reactive Western blot MCC/PCC band, as described under "Experimental Procedures." Representative Western blots are shown above their corresponding histogram bars. The data were normalized with respect to the MCC/PCC biotin content of each cell line grown in biotin-replete medium (control) and shown as the means \pm S.E. of three independent experiments.

supplement at the same concentrations, with the cells reaching 24 ± 3 , 79 ± 15 , and $80 \pm 13\%$ of control values, respectively (Fig. 3B). These results confirm that normal cells are equally efficient in promoting carboxylase biotinylation using free biotin or biocytin as the biotin source. Next, we determined the recovery of carboxylase biotinylation in MCD-BD cells under the same experimental conditions. Biotin starvation reduced carboxylase biotin content to $37 \pm 5\%$ of that observed in biotin-replete medium. Strikingly, biotinidase-deficient cells showed a poor response to biotin. When the biotin-starved cultures were stimulated with 1, 10, and 100 nM biotin, PCC-MCC biotinylation values were 33 ± 6 , 45 ± 10 , and $48 \pm 2\%$, respectively (Fig. 3C). When 1, 10, and 100 nM biocytin was added to the medium, carboxylase biotinylation was not significantly affected (27 ± 7 , 37 ± 9 , and $38 \pm 16\%$) (Fig. 3D). These results are consistent with the block in biotinidase, resulting in the

inability to release biotin from biocytin for use in the biotinylation of the carboxylases. However, the reduced biotinylation in biotin-replete medium and the failure to readily respond to free biotin following biotin starvation implicates a more complex process.

Effect of Biotin Deficiency and Supplementation on Carboxylase Protein Levels in Normal and Biotinidase-deficient Cells—We explored the relationship between the lack of response to biotin stimulation observed in MCD-BD cells and the size of the pool of apocarboxylases available for biotinylation. In this experiment we studied the effect of biotin on the recovery of carboxylase biotinylation and PC and MCC protein levels in biotin-starved normal and MCD-BD cells. As described above, Western blot analysis using streptavidin-AP revealed that biotin deficiency reduced the level of biotinylated PC, MCC and PCC in normal cells. The addition of $1 \mu\text{M}$ biotin (concentra-

Deficiency of Biotinidase Activity Disrupts HCS Expression

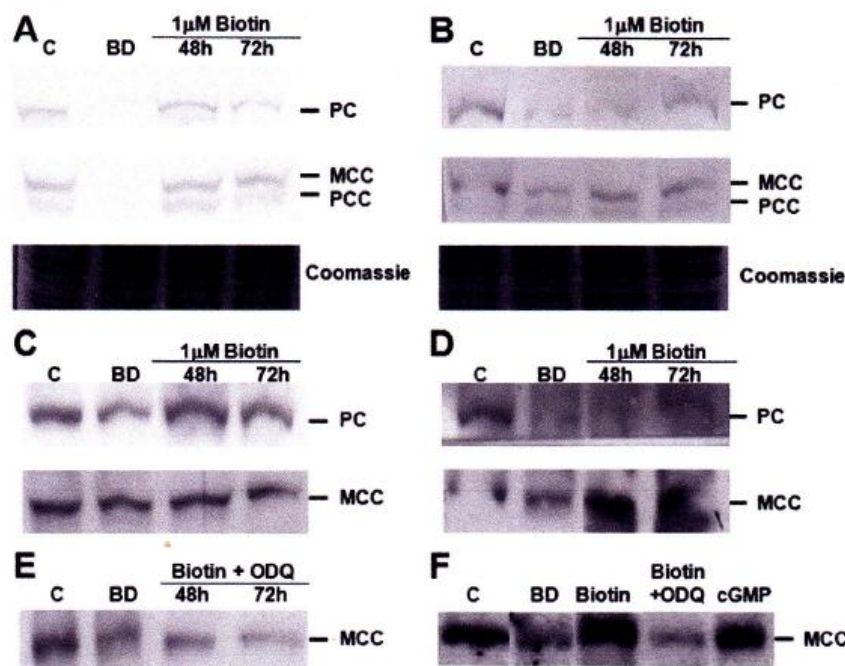


FIGURE 4. Effect of biotin, ODQ and 8-Br-cGMP on carboxylase biotinylation and PC and MCC protein levels in normal and MCD-BD fibroblasts. Normal (A, C, and E) and MCD-BD fibroblasts (B, D, and F) were grown in normal biotin containing medium (N) or biotin-free medium (B def) for 13 days. After this period the cells were stimulated with 1 μM biotin for 48 or 72 h. A and B, cell extracts were prepared from the cell cultures, and the status of carboxylases biotinylation was determined by Western blot using streptavidin-AP as described under "Experimental Procedures." C and D, the effect biotin deficiency and restoration of PC and MCC protein levels was determined by Western blot using polyclonal antibodies directed against these carboxylases. E, to explore the role of the HCS-sGC-PKG pathways on the biotin-dependent restoration of MCC protein levels, we studied the effect of inhibiting sGC on biotin-starved normal fibroblasts stimulated with 1 μM biotin. Alternatively, biotin-starved MCD-BD fibroblasts were stimulated with 1 μM biotin or 8-Br-cGMP, and the levels of MCC protein determined by Western blot analysis as previously described. To verify that differences in biotinylation or protein levels were not related to the amount of protein present in the samples, all of the gels were Coomassie-stained before transferring of the proteins to membranes. An example of these loading controls is depicted in A under streptavidin-AP bands.

tion 10 times higher than used above) restored carboxylase biotinylation in normal cells to control levels at 48 h. Extension of the incubation time to 72 h did not result in a significant further increase in carboxylases biotinylation (Fig. 4A). To assess the effect on carboxylase protein, Western blot analysis was performed using PC and MCC antibodies, showing that biotin deficiency in normal fibroblasts did not significantly affect the levels of these proteins. Stimulation with 1 μM biotin resulted in a moderate increase in PC and MCC levels at both 48 and 72 h (Fig. 4C). In MCD-BD cells, biotin deficiency also reduced the apparent biotin content of PC, MCC, and PCC. However, unlike control cells, the reduction in carboxylase biotinylation status was matched by the level of carboxylase protein (Fig. 4, B versus D). On incubation of the biotin-starved MCD-BD in 1 μM biotin, an increase in PC biotinylation could be observed at 72 h, whereas MCC biotinylation showed a significant increase at 48 h of treatment (Fig. 4B). Again, the changes in biotinylation status were matched by changes in protein levels. Although biotin deficiency reduced PC and MCC protein levels, the addition of 1 μM biotin increased the amount of MCC and PC at 48 and 72 h, respectively (Fig. 4D). These results suggest that recovery of

carboxylase biotinylation in normal biotin-starved fibroblasts is achieved through biotinylation of pre-existing apocarboxylases, whereas the recovery of biotinylation in MCD cells requires *de novo* protein synthesis.

Biotin-dependent Restoration of MCC Protein Levels Requires a Functional sGC Pathway—We have previously shown that in human cells biotin deficiency reduces the expression of most of the genes of the biotin cycle by disrupting the function of the HCS-sGC-PKG signal transduction pathway. We therefore examined the integrity of this pathway in biotin-starved normal and MCD-BD fibroblasts. First, we examined the effect of sGC inhibition on MCC expression by incubating biotin-starved normal fibroblasts in a medium containing 1 μM biotin and ODQ as described under "Experimental Procedures." In these experiments, we focused on MCC protein levels because of the low PCC expression observed in MCD-BD cells. Our results show that although biotin deficiency had little effect on MCC protein levels, inhibition of sGC for 48 or 72 h results in a progressive reduction in the amount of this protein (Fig. 4E). This result suggest that in normal cells the HCS-sGC-PKG pathway is

required to maintain the pool of apocarboxylases. Next, we explored the role of sGC in the recovery of MCD-BD cells. Unlike normal cells, because MCD-BD cells show reduced MCC in biotin-deficient medium, inhibition of sGC would not be informative about the involvement of the sGC pathway in maintaining carboxylase protein levels. Instead, we grew MCD-BD cells in biotin-deficient medium for 13 days and then stimulated the cells for 48 h with 1 μM biotin or 8-Br-cGMP. The MCC protein levels, assessed by Western blot, show that MCC levels in biotin-starved MCD-BD cells can be restored in an equally effective way by 1 μM biotin or 8-Br-cGMP. The role of cGMP as an intermediate between biotin stimulation and the synthesis of MCC was confirmed by incubating biotin-starved MCD-BD cells in a medium containing 1 μM biotin and ODQ. Under these conditions, the level of MCC protein was not increased (Fig. 4F). The results indicate that the HCS-sGC-PKG pathway is required for the restoration of carboxylase protein levels in biotin-deficient normal and MCD-BD fibroblasts. However, the poor response of MCD-BD cells to biotin suggests that expression of HCS, the key component of the pathway, may be impaired in biotinidase-deficient cells.

Deficiency of Biotinidase Activity Disrupts HCS Expression

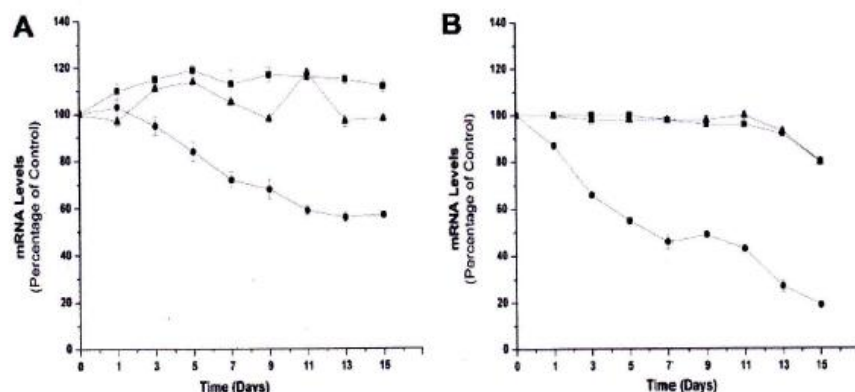


FIGURE 5. Time course of the effect of biotin deficiency on holocarboxylase synthetase, biotinidase, and β -actin mRNA levels in normal and MCD-BD fibroblasts. Normal (A) and MCD-BD cells (B) were grown in biotin-deficient medium for up to 13 days, and the mRNA levels for HCS (●), biotinidase (▲), and β -actin (■) were determined by reverse transcription-PCR analysis at various times, as described under "Experimental Procedures." The results are presented as percentages of mRNA values in cells grown in biotin-replete medium and normalized to initial (time 0) β -actin mRNA levels. The data are from three different experiments and shown as the means \pm S.E.

Effect of Biotin Deficiency on HCS and Biotinidase mRNA Levels in Normal and Biotinidase-deficient Fibroblasts—To test this hypothesis, we examined the impact of biotin deficiency on the level of HCS mRNA to determine whether the biotin-dependent transcriptional regulation of the biotin cycle is impaired in these cells. We used HCS mRNA as the indicator for this experiment because HCS is the key regulatory enzyme in biotin-dependent transcription and is the first enzyme of the biotin cycle subject to transcriptional control via the HCS-sGC-PKG pathway. First, we examined the time course of the effect of biotin starvation on the level of HCS mRNA, as well as biotinidase and β -actin mRNA, in normal cells. This was done by growing the cells in biotin-deficient medium for 13 days and assessing the mRNA levels at intervals during the course of the experiment, as described under "Experimental Procedures." The results were normalized with respect to initial mRNA levels for each culture to facilitate comparison of the results obtained with different cultures. In normal cells, biotin starvation reduced the level of HCS mRNA in a gradual manner, with 95% of the starting level remaining at day 3 and leveling off at 55–60% by days 11–15 (Fig. 5A). No significant change was observed in biotinidase or β -actin mRNA level during the course of the experiment. In MCD-BD cells, the level of HCS mRNA in biotin-replete medium was $52 \pm 3\%$ lower than in normal fibroblasts (data not shown). Normalized to the starting level, HCS mRNA levels also fell more rapidly following the shift to biotin-deficient medium, showing a detectable reduction in the first day of the experiment and reaching 60% of the starting level by day 3 and 20% by day 15 (Fig. 5B). These results suggest that HCS mRNA levels are more easily reduced by biotin starvation in biotinidase-deficient cells than in normal fibroblasts and revealed the unexpected result that HCS mRNA was reduced even in high biotin medium. Biotinidase and β -actin mRNA levels, as observed for normal fibroblasts, were not affected by biotin deficiency, consistent with our previous finding that biotinidase expression is not regulated by biotin availability and the HCS-sGC-PKG pathway (3).

HCS Protein Levels and Biotinylation Activity in Biotinidase-deficient Cells—The rapid reduction in HCS mRNA in MCD-BD cells during biotin starvation provides an explanation for the reduced level of biotinylated carboxylases in these cells compared with normal cells, because B-AMP produced by HCS is required to maintain the HCS-sGC-PKG-dependent expression of carboxylases (3, 4). We therefore determined whether the reduction in HCS mRNA translated into a lower level of enzyme function. To determine HCS activity, we made use of p67, the carboxyl-terminal 67-amino acid fragment of human α subunit of PCC, as the substrate for biotinylation (16, 25) (Fig. 6A).

Total cell extracts prepared from normal or MCD-BD fibroblasts were incubated in the presence of p67 bound to PVDF membrane and $1 \mu\text{Ci}$ of [^3H]biotin and ATP, as described under "Experimental Procedures." The amount of membrane-fixed radioactivity, corresponding to the amount of [^3H]biotin incorporated in p67, was taken as a measure of HCS activity present in the different cell extracts. In this experiment, extracts from biotin-replete cells were used to minimize the presence of apocarboxylases in the samples, which would otherwise compete for substrate (5, 29). Extracts from normal cells catalyzed the incorporation of 5000 ± 500 cpm of [^3H]biotin in p67, whereas MCD-BD cell extracts showed 50% reduction in biotinylation activity, incorporating 2320 ± 300 cpm into the p67 substrate (Fig. 6B). By Western blot analysis using HCS antibody, we confirmed that the reduction in biotinylation activity is associated with a reduction in the amount in HCS protein. Biotinidase-deficient cells showed one-third of the HCS immunoreactive material expressed by normal cells (Fig. 6C).

DISCUSSION

In this work, we investigated the impact of biotinidase deficiency on the maintenance of biotinylation and expression of carboxylases and regulation of the biotin cycle in human cells under conditions of biotin starvation and replenishment. Our results show that biotin deficiency, as expected, reduces carboxylase biotinylation in both normal and biotinidase-deficient cells. However, whereas in normal fibroblasts this effect is efficiently reversed after incubation with physiological concentrations of biotin or biocytin, in biotinidase-deficient cells it is not. These cells are unable to recover carboxylase biotinylation levels with biocytin and showed only partial recovery after a prolonged incubation with pharmacological doses of free biotin. The lack of response to biocytin is understood because biotinidase is required to release biotin from this compound, but the reduced response to free biotin demonstrates a more complex impact of biotinidase deficiency than is anticipated from a simple functional defect in the enzyme. Here we showed that MCD-BD behavior is associated with dimin-

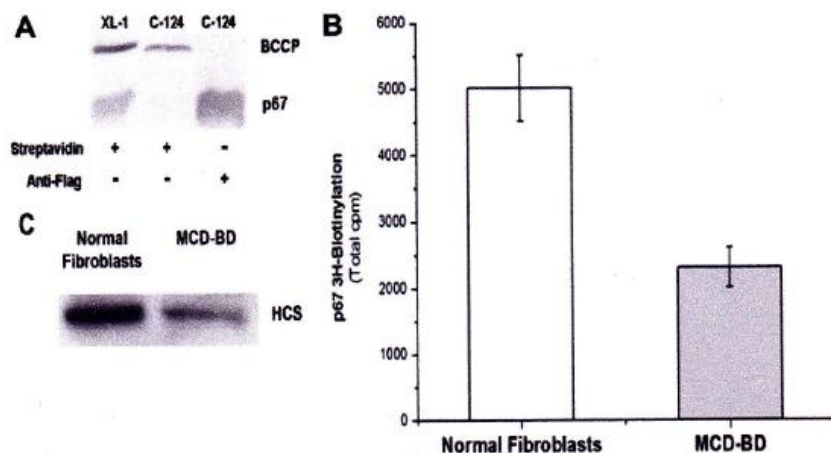


FIGURE 6. Holocarboxylase synthetase activity and protein in MCD-BD cells. HCS activity was determined in a solid phase assay in which p67 bound to PVDF membrane was used as substrate for biotinylation. **A**, preparation of p67 substrate. A PVDF membrane was prepared by transfer from a polyacrylamide gel following electrophoresis of extracts of *E. coli* XL-1 (wild type) or C-124 cells (biotin auxotroph) expressing p67. The two protein bands correspond to BCCP (upper band, 18 kDa) and p67 (lower band, 14 kDa). The membrane was developed with streptavidin-AP (left two lanes) to detect biotinylated proteins or anti-FLAG antibody (right lane) to detect unbiotinylated p67. In XL-1 cells both bands are biotinylated because of endogenously synthesized biotin. In C-124 cells, in which p67 expression was induced in biotin-free medium, only the upper band is biotinylated. The lane on the right confirms the presence of unbiotinylated p67 in the C-124 cells using the FLAG antibody. **B**, HCS activity of fibroblast cultures. PVDF membrane-bound p67 was incubated in the presence of [³H]biotin, ATP, and total protein extracts from human fibroblasts. The amount of [³H]biotin incorporated in p67 by normal fibroblasts (white bar) or MCD-BD cells (black bar) was determined using a liquid scintillation counter. Differences between normal and MCD-BD cells shown to be statistically significant ($p < 0.05$). **C**, detection of HCS protein in fibroblast cultures. The level of HCS protein in normal fibroblasts and MCD-BD cells was visualized by Western blot using an antibody against the amino-terminal region of HCS.

ished expression of biotin acceptor carboxylases and HCS, the enzyme responsible for biotinylating activity and the key component of the HCS-sGC-PKG signal transduction pathway.

MCD-BD cells were expected to express normal levels of HCS, because this enzyme is not directly affected by biotinidase mutations (31). Instead, we observed a reduced level of HCS mRNA and protein and a reduced level of HCS enzyme activity in MCD-BD cells, even in high biotin medium. Further, MCD-BD cells were found to recover poorly on return to biotin-rich medium, despite a seemingly intact ability to utilize free biotin. We propose that biotinidase deficiency produces a cascade of events that begins with a block in the utilization of protein-bound biotin. The reduced access to this biotin source mimics a partial, intracellular biotin deficiency which in turn reduces the availability of B-AMP required to fuel the HCS-sGC-PKG pathway sufficiently to maintain the optimal expression of HCS and apocarboxylase genes, resulting in continued down-regulation of the pathway. A similar outcome in wild type cells, illustrated by reduction in MCC protein, could be obtained by ODQ inhibition of sGC, and full restoration of MCC protein in MCD-BD cells could be obtained on incubation of cells in 8-Br-cGMP. We surmise that once *de novo* synthesis of carboxylases is halted, the apparent reduction in carboxylase protein is likely the result of intracellular protein turnover. Because in normal cells, the MCC protein level was not affected by biotin deficiency, we suggest that MCC expression is maintained through endogenous biotin recycling via biotinidase activity. On the other hand, MCD-BD cells, unable to recycle protein-bound biotin, are prone to exhibit this

decrease in carboxylase and HCS protein levels by their inability to fuel the HCS-sGC-PKG pathway during biotin deficiency. In MCD-BD cells, the need for a pharmacological concentration of biotin might be related to the low expression of HCS, which in turn is unable to synthesize enough biotin-BMP to activate the transcription of genes involved in the biotin cycle. However, the ability of MCD-BD cells to increase MCC protein levels when stimulated by normal concentration of 8-Br-cGMP revealed that once the block in biotin processing is bypassed, the integrity of the rest of the HCS-sGC-PKG pathway is intact. This is confirmed by the observation that 1 μ M biotin is unable to stimulate the increase in MCC levels in biotin-starved MCD-BD cells in the presence of ODQ.

The outcome of the effect of biotinidase deficiency on the regulation of the HCS-sGC-PKG pathway is reduced expression of HCS, PC, PCC, ACC, and sodium-dependent multivitamin transporter (3–5), producing a net deficiency of biotinylated carboxylases below the threshold required for effective contribution to intermediary metabolism. This disruption in the regulation of the biotin cycle provides an explanation for the compromised clinical state of patients with biotinidase deficiency. Although most dietary biotin is protein-bound (2, 14), a simple supplementation of equivalent amounts of free biotin would have been expected to be sufficient to treat the disease. Instead, as with HCS deficiency, persistent treatment with pharmacologic doses of biotin is required to keep patients free of metabolic symptoms (2). Our studies suggest that the role of biotin supplementation is not simply to provide the product of the defective biotinidase, but it is also to overcome the repression of HCS and apocarboxylase expression that accompanies dietary biotin deficiency or genetic defects of HCS.

We are led to propose, therefore, that the constitutive expression of biotinidase may contribute to cell survival by becoming, during periods of insufficient free biotin, the primary source of biotin to fuel carboxylase biotinylation. Biotinidase is the only enzyme of the biotin cycle that is not under the transcriptional control of the HCS-sGC-PKG pathway and thus endogenous biotin recycling is expected to continue independently of biotin availability in the cell. However, in biotinidase deficiency, the brain remains as susceptible as other tissues to biotin insufficiency, resulting in a constellation of neurological abnormalities, including hearing loss, optic atrophy, loss of vision, basal ganglia calcifications, cerebral edema, cerebral atrophy, and subacute necrotizing encephalopathy (Leigh syndrome) (32, 33), that are not normally observed either in nutri-

Deficiency of Biotinidase Activity Disrupts HCS Expression

ent biotin deficiency or in HCS deficiency. Although biotinidase mRNA and protein are expressed throughout the brain, they are most abundant in centers of the auditory and visual activity, including dorsal and ventral cochlear nuclei, superior olivary complex, and vestibular nucleus (34). Because these areas also seem to contain more biotin than other regions of the brain, it is possible that regulation of the biotin cycle may be of particular relevance for these cells (26, 35). We suggest that biotinidase deficiency in combination with limited amounts of biotin may lead to the development of a secondary HCS deficiency that may compromise the survival of cells with a higher metabolic demand such as neurons. The loss of the privileged status of the brain in biotinidase deficiency is supported by necropsy data, showing an almost nonexistent PCC activity in the brain, whereas in kidney and liver, this enzyme activity is only moderately reduced (29 and 42%, respectively), with respect to the levels observed in control individual (33).

Recently, other biotin-responsive disorders have been described, including biotin-responsive basal ganglia disease and biotin-responsive limb weakness (36–39). These diseases are characterized by subacute encephalopathy, mental retardation, severe cogwheel rigidity, dystonia, and quadripareisis. Because symptoms can be prevented or reversed with pharmacological doses of biotin and because some cases of biotinidase deficiency have been associated with progressive encephalopathy (40, 41), it has been suggested that the biotin pathway is involved in these disorders. Yet the relationship to abnormalities in biotinidase, HCS, or even biotin transport has been elusive (36, 37, 42). It is possible that these disorders represent different degrees of the same disease in which the delicate balance between utilization of exogenous biotin and the recycling of the endogenous vitamin have been disrupted, affecting the expression of HCS and the biotin cycle.

Acknowledgments—We thank Dr. Diana Pacheco-Alvarez (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México), Shannon Healy (University of Calgary), and María Del Río Salazar for comments on this work. We are also grateful for the technical assistance of Colette Michalak, Luz María Chiu Velázquez, and Jorge Armando Valdés Contreras.

REFERENCES

- Pacheco-Alvarez, D., Solórzano-Vargas, R. S., and Leon-Del-Rio, A. (2002) *Arch. Med. Res.* **33**, 439–447
- Wolf, B. (2001) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C., Beaudet, A. L., William, S., and Valle, D., eds) pp. 3935–3962, McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York
- Pacheco-Alvarez D., Solórzano-Vargas, R. S., Gravel, R. A., Cervantes-Roldán, R., Velázquez, A., and León-Del-Río, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 52312–52318
- Solórzano-Vargas, R. S., Pacheco-Alvarez, D., and Leon-Del-Rio, A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 5325–5330
- Pacheco-Alvarez, D., Solórzano-Vargas, R. S., González-Noriega, A., Michalak, C., Zempleni, J., and León-Del-Río, A. (2005) *Mol. Genet. Metab.* **85**, 301–307
- Chauhan, J., and Dakshinamurti, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10035–10038
- Collins, J., Paitetta, E., Green, R., Morell, A., and Stockert, R. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 11280–11283
- Deodhar, A. D., and Mistry, S. P. (1970) *Life Sci.* **9**, 581–588
- Dakshinamurti, K., Tarrago-Litvak, L., and Hong, H. C. (1970) *Can. J. Biochem.* **48**, 493–500
- Borboni, P., Magnaterra, R., Rabini, R. A., Staffolani, R., Porzio, O., Sesti, G., Fusco, A., Mazzanti, L., Lauro, R., and Marlier, L. N. (1996) *Acta Diabetol.* **33**, 154–158
- De la Vega, L. A., and Stockert, R. J. (2000) *Am. J. Physiol.* **279**, C2037–C2042
- Maeda, Y., Kawata, S., Inui, Y., Fukuda, K., Igura, T., and Matsuzawa, Y. (1996) *J. Nutr.* **126**, 61–66
- Rodríguez-Melendez, R., Cano, S., Mendez, S. T., and Velázquez, A. (2001) *J. Nutr.* **131**, 1909–1913
- Pispa, J. (1965) *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* **43**, 1–39
- Chapman-Smith, A., and Cronan, J. E., Jr. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 359–363
- Leon-Del-Rio, A., and Gravel, R. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 22964–22968
- Cole, H., Reynolds, T. R., Lockyer, J. M., Buck, G. A., Denson, T., Spence, J. E., Hymes, J., and Wolf, B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6566–6570
- Chiang, G., and Mistry, S. (1974) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **146**, 21–24
- Hassel, B. (2000) *Mol. Neurobiol.* **22**, 21–40
- Wolf, B., Grier, R., Secor McVoy, J. R., and Heard, G. (1985) *J. Inher. Metab. Dis.* **8**, 53–58
- Dupuis, L., Campeau, E., Leclerc, D., and Gravel, R. A. (1999) *Mol. Genet. Metab.* **66**, 80–90
- Sander, J. E., Packman, S., and Townsend, J. J. (1982) *Neurology* **32**, 878–880
- Dupuis, L., Leon-Del-Rio, A., Leclerc, D., Campeau, E., Sweetman, L., Saudubray, J. M., Herman, G., Gibson, K. M., and Gravel, R. A. (1996) *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1011–1016
- Narang, M. A., Dumas, R., Ayer, L. M., and Gravel, R. A. (2004) *Hum. Mol. Genet.* **13**, 15–23
- Leon-Del-Rio, A., Leclerc, D., Akerman, B., Wakamatsu, N., and Gravel, R. A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 4626–4630
- Wolf, B., Jensen, K. P., Barshop, B., Blitzer, M., Carlson, M., Goudie, D. R., Gokcay, G. H., Demirkol, M., Baykal, T., Demir, F., Quarry, S., Shih, L. Y., Pedro, H. F., Chen, T. H., and Slonim, A. E. (2005) *Hum. Mutat.* **25**, 413
- Knight, H., Reynolds, T. R., Meyers, G. A., Pomponio, R. J., Buck, G. A., and Wolf, B. (1998) *Mamm. Genome* **9**, 327–330
- Norrgard, K. J., Pomponio, R. J., Swango, K. L., Hymes, J., Reynolds, T., Buck, G. A., and Wolf, B. (1998) *Hum. Mutat.* **11**, 410
- Weiner, D., and Wolf, B. (1991) *Biochem. Med. Metab. Biol.* **46**, 344–363
- Rodríguez-Melendez, R., Pérez-Andrade, M. E., Díaz, A., Deolarte, A., Camacho-Arroyo, I., Cicerón, I., Ibarra, I., and Velázquez, A. (1999) *Mol. Genet. Metab.* **66**, 16–23
- Burri, B., Sweetman, L., and Nyhan, W. (1985) *Am. J. Hum. Genet.* **37**, 326–337
- Schulz, P. E., Weiner, S. P., Belmont, J. W., and Fishman, M. A. (1988) *Neurology* **38**, 1326–1328
- Baumgartner, E. R., Suormala, T. M., Wick, H., Probst, A., Blauenstein, U., Bachmann, C., and Vest, M. (1989) *Pediatr. Res.* **26**, 260–266
- Heller, A. J., Stanley, C., Shaia, W. T., Sismanis, A., Spencer, R. F., and Wolf, B. (2002) *Hear. Res.* **173**, 62–68
- Bhagavan, H. N., and Coursin, D. B. (1970) *J. Neurochem.* **17**, 289–290
- Ozand, P. T., Gascon, G. G., Al Essa, M., Joshi, S., Al Jishi, E., Bakheet, S., Al Watban, J., Al-Kawi, M. Z., and Dabbagh, O. (1998) *Brain* **121**, 1267–1279
- Subramanian, V. S., Marchant, J. S., and Said, H. M. (2006) *Am. J. Physiol.* **291**, C851–C859
- Adhisivam, B., Mahto, D., and Mahadevan, S. (2007) *Indian Pediatr.* **44**, 228–230
- Straussberg, R., Shorer, Z., Weitz, R., Basel, L., Kornreich, L., Corie, C. I., Harel, L., Djaldetti, R., and Amir, J. (2002) *Neurology* **59**, 983–989
- Suchy, S. F., McVoy, J. S., and Wolf, B. (1985) *Neurology* **35**, 1510–1511
- Héron, B., Gautier, A., Dulac, O., and Ponsot, G. (1993) *Arch. Fr. Pediatr.* **50**, 875–878
- Lo, W., Kadlecsek, T., and Packman, S. (1991) *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **37**, 567–572

LITERATURA CITADA

1. Melo, V. and O. Cuamatzi, *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Editorial Reverté, 2007. Second edition.
2. Said, H.M., *Recent Advances in Carrier-Mediated Intestinal Absorption of Water-Soluble Vitamins*. Annual Review of Physiology, 2004. 66(1): p. 419-446.
3. Said, H.M., *Biotin: Biochemical, Physiological and Clinical Aspects Water Soluble Vitamins*, O. Stanger, Editor. 2012, Springer Netherlands. p. 1-19.
4. Prasad, P.D., et al., *Molecular and Functional Characterization of the Intestinal Na⁺-Dependent Multivitamin Transporter*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999. 366(1): p. 95-106.
5. Yang, X., et al., *Structure of human holocarboxylase synthetase gene and mutation spectrum of holocarboxylase synthetase deficiency*. Human Genetics, 2001. 109(5): p. 526-534.
6. León-Del-Río, A. and R.A. Gravel, *Sequence requirements for the biotinylation of carboxyl-terminal fragments of human propionyl-CoA carboxylase alpha subunit expressed in Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 1994. 269(37): p. 22964-22968.
7. León-Del-Río, A., et al., *Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. 92(10): p. 4626-4630.
8. Pacheco-Alvarez, D., R.S. Solórzano-Vargas, and A. León-Del Río, *Biotin in Metabolism and Its Relationship to Human Disease*. Archives of Medical Research, 2002. 33(5): p. 439-447.
9. Chapman-Smith, A. and J.E. Cronan Jr, *Molecular Biology of Biotin Attachment to Proteins*. The Journal of Nutrition, 1999. 129(2): p. 477S-484S.
10. Pardini, N.R., et al., *Microbial biotin protein ligases aid in understanding holocarboxylase synthetase deficiency*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, 2008. 1784(7‐8): p. 973-982.
11. Campeau, E. and R.A. Gravel, *Expression in Escherichia coli of N- and C-terminally Deleted Human Holocarboxylase Synthetase*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(15): p. 12310-12316.
12. Kwon, K. and D. Beckett, *Function of a conserved sequence motif in biotin holoenzyme synthetases*. Protein Science, 2000. 9(8): p. 1530-1539.

13. Bailey, L.M., J.C. Wallace, and S.W. Polyak, *Holocarboxylase synthetase: Correlation of protein localisation with biological function*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010. 496(1): p. 45-52.
14. Hiratsuka, M., et al., *Identification of holocarboxylase synthetase (HCS) proteins in human placenta*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1998. 1385(1): p. 165-171.
15. Sakamoto, O., et al., *Relationship between kinetic properties of mutant enzyme and biochemical and clinical responsiveness to biotin in holocarboxylase synthetase deficiency*. Pediatric research, 1999. 46((6)): p. 671-6.
16. Wakil, S.J. and L.A. Abu-Elheiga, *Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome*. Journal of Lipid Research, 2009. 50(Supplement): p. S138-S143.
17. Val, D.L., et al., *Polymorphism of the yeast pyruvate carboxylase 2 gene and protein: effects on protein biotinylation*. Biochemical Journal, 1995. 312((Pt 3)): p. 817-827.
18. Baumgartner, E.R. and T. Suormala, *Multiple carboxylase deficiency: inherited and acquired disorders of biotin metabolism*. International journal for vitamin and nutrition research, 1997. 67((5)): p. 377-84.
19. Hymes, J. and B. Wolf, *Biotinidase and its roles in biotin metabolism*. Clinica Chimica Acta, 1996. 255((1)): p. 1-11.
20. Wolf, B., *Biotinidase: its role in biotinidase deficiency and biotin metabolism*. The Journal of nutritional biochemistry, 2005. 16(7): p. 441-445.
21. Wolf, B. and K. Jensen, *Evolutionary conservation of biotinidase: Implications for the enzyme structure and subcellular localization*. Molecular Genetics and Metabolism, 2005. 86 p. 44-50.
22. Hymes, J., C.M. Stanley, and B. Wolf, *Mutations in BTB causing biotinidase deficiency*. Human Mutation, 2001. 18((5)): p. 375-381.
23. Beckett, D., *Biotin Sensing at the Molecular Level*. The Journal of Nutrition, 2009. 139(1): p. 167-170.
24. Brown, P., et al., *The Biotin Repressor: Modulation of Allostery by Corepressor Analogs*. Journal of Molecular Biology, 2004. 337(4): p. 857-869.
25. Beckett, D., *The Escherichia coli biotin regulatory system: a transcriptional switch*. The Journal of nutritional biochemistry, 2005. 16(7): p. 411-415.
26. Chapman-Smith A. and J.E. Cronan Jr, *In vivo enzymatic protein biotinylation*. Biomolecular engineering, 1999. 16((1-4)): p. 119-124.

27. Sherwood W. G, et al., *Lactic acidosis in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency caused by holocarboxylase synthetase deficiency of early and late onset*. The Journal of pediatrics, 1982. 101((4)): p. 546-50.
28. Dupuis, L., et al., *Clustering of Mutations in the Biotin-Binding Region of Holocarboxylase Synthetase in Biotin-Responsive Multiple Carboxylase Deficiency*. Human Molecular Genetics, 1996. 5(7): p. 1011-1016.
29. Collins, J.C., et al., *Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2*. Journal of Biological Chemistry, 1988. 263(23): p. 11280-11283.
30. Dakshinamurti, K. and W. Li, *Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats*. Molecular and cellular biochemistry, 1994. 132((2)): p. 127-32.
31. Dakshinamurti K and C. Cheah-Tan, *Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1968. 127((1)): p. 17-21.
32. Rodriguez-Fuentes, N., et al., *Biotin deficiency affects both synthesis and degradation of pyruvate carboxylase in rat primary hepatocyte cultures*. Molecular Genetics and Metabolism, 2007. 92(3): p. 222-228.
33. Rodriguez-Melendez, R. and J. Zempleni, *Regulation of gene expression by biotin*. The Journal of nutritional biochemistry, 2003. 14(12): p. 680-690.
34. Wiedmann, S., J.D. Eudy, and J. Zempleni, *Biotin Supplementation Increases Expression of Genes Encoding Interferon- β , Interleukin- 1β , and 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase, and Decreases Expression of the Gene Encoding Interleukin-4 in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells*. The Journal of Nutrition, 2003. 133(3): p. 716-719.
35. Rodriguez-Melendez, R., et al., *Biotin Regulates the Genetic Expression of Holocarboxylase Synthetase and Mitochondrial Carboxylases in Rats*. The Journal of Nutrition, 2001. 131(7): p. 1909-1913.
36. Vesely, D.L., *Biotin enhances guanylate cyclase activity*. Science, 1982. 216((4552)): p. 1329-1330.
37. Solórzano-Vargas, R.S., D. Pacheco-Alvarez, and A. León-Del-Río, *Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. 99(8): p. 5325-5330.
38. Pacheco-Alvarez, D., et al., *Biotin availability regulates expression of the sodium-dependent multivitamin transporter and the rate of biotin uptake in HepG2 cells*. Molecular Genetics and Metabolism, 2005. 85(4): p. 301-307.

39. Hymes, J., K. Fleischhauer, and B. Wolf, *Biotinylation of Histones by Human Serum Biotinidase: Assessment of Biotinyl-Transferase Activity in Sera from Normal Individuals and Children with Biotinidase Deficiency*. *Biochemical and Molecular Medicine*, 1995. 56(1): p. 76-83.
40. Nakatani, Y., et al., *Pulmonary endodermal tumor resembling fetal lung. The optically clear nucleus is rich in biotin*. *The American journal of surgical pathology*, 1994. 18((6)): p. 637-42.
41. Yokoyama, S., et al., *Biotin-containing intranuclear inclusions in endometrial glands during gestation and puerperium*. *American journal of clinical pathology*, 1993. 99((1)): p. 13-7.
42. Hassan, Y.I. and J. Zempleni, *Epigenetic Regulation of Chromatin Structure and Gene Function by Biotin*. *The Journal of Nutrition*, 2006. 136(7): p. 1763-1765.
43. Stanley, C.M., J. Hymes, and B. Wolf, *Identification of alternatively spliced human biotinidase mRNAs and putative localization of endogenous biotinidase*. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2004. 81(4): p. 300-312.
44. Camporeale, G., et al., *K8 and K12 are biotinylated in human histone H4*. *European Journal of Biochemistry*, 2004. 271(11): p. 2257-2263.
45. Chew, Y.C., et al., *Lysine residues in N-terminal and C-terminal regions of human histone H2A are targets for biotinylation by biotinidase*. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2006. 17(4): p. 225-233.
46. Kobza, K., et al., *K4, K9 and K18 in human histone H3 are targets for biotinylation by biotinidase*. *FEBS Journal*, 2005. 272(16): p. 4249-4259.
47. Kothapalli, N., G. Sarath, and J. Zempleni, *Biotinylation of K12 in Histone H4 Decreases in Response to DNA Double-Strand Breaks in Human JAR Choriocarcinoma Cells*. *J. Nutr.*, 2005. 135(10): p. 2337-2342.
48. Kothapalli, N., et al., *Biological functions of biotinylated histones*. *The Journal of nutritional biochemistry*, 2005. 16(7): p. 446-448.
49. Narang, M.A., et al., *Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase*. *Hum. Mol. Genet.*, 2004. 13(1): p. 15-23.
50. Bailey, L.M., et al., *Artifactual detection of biotin on histones by streptavidin*. *Analytical Biochemistry*, 2008. 373(1): p. 71-77.
51. Streaker, E.D. and D. Beckett, *Nonenzymatic biotinylation of a biotin carboxyl carrier protein: Unusual reactivity of the physiological target lysine*. *Protein Science*, 2006. 15(8): p. 1928-1935.
52. Healy, S., et al., *Nonenzymatic biotinylation of histone H2A*. *Protein Science*, 2009. 18((2)): p. 314-328.

53. Healy, S., et al., *Biotin is not a natural histone modification*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 2009. 1789(11-12): p. 719-733.
54. Perez-Monjaras, A., et al., *Impaired Biotinidase Activity Disrupts Holocarboxylase Synthetase Expression in Late Onset Multiple Carboxylase Deficiency*. *J. Biol. Chem.*, 2008. 283(49): p. 34150-34158.
55. Pacheco-Alvarez, D., et al., *Paradoxical Regulation of Biotin Utilization in Brain and Liver and Implications for Inherited Multiple Carboxylase Deficiency*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(50): p. 52312-52318.
56. Merino, C., et al., *DNA repair and transcriptional effects of mutations in TFIID in Drosophila development*. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(9): p. 3246-56.
57. Reynaud, E., et al., *The Drosophila melanogaster homologue of the Xeroderma pigmentosum D gene product is located in euchromatic regions and has a dynamic response to UV light-induced lesions in polytene chromosomes*. *Mol Biol Cell*, 1999. 10(4): p. 1191-203.
58. Rampakakis, E., et al., *Dynamic changes in chromatin structure through post-translational modifications of histone H3 during replication origin activation*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2009. 108(2): p. 400-407.
59. Aguilar-Fuentes, J., et al., *TFIID trafficking and its nuclear assembly during early Drosophila embryo development*. *J Cell Sci*, 2006. 119(18): p. 3866-3875.
60. Boehm, A.K., et al., *Transcription Factor and Polymerase Recruitment, Modification, and Movement on dhsp70 In Vivo in the Minutes following Heat Shock* *Mol. Cell. Biol.*, 2003. 23(21): p. 7628-7637.
61. Lebedeva, L.A., et al., *Occupancy of the Drosophila hsp70 promoter by a subset of basal transcription factors diminishes upon transcriptional activation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. 102(50): p. 18087-18092.
62. Petesch, S.J. and J.T. Lis, *Rapid, Transcription-Independent Loss of Nucleosomes over a Large Chromatin Domain at Hsp70 Loci*. *Cell*, 2008. 134(1): p. 74-84.
63. Camporeale, G., et al., *Drosophila melanogaster Holocarboxylase Synthetase Is a Chromosomal Protein Required for Normal Histone Biotinylation, Gene Transcription Patterns, Lifespan, and Heat Tolerance*. *J. Nutr.*, 2006. 136(11): p. 2735-2742.
64. Camporeale, G., et al., *K12-biotinylated histone H4 marks heterochromatin in human lymphoblastoma cells*. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007. 18(11): p. 760-768.

65. Hassan, Y.I. and J. Zempleni, *A novel, enigmatic histone modification: biotinylation of histones by holocarboxylase synthetase*. Nutrition Reviews, 2008. 66(12): p. 721-725.
66. Wang, Z. and S. Lindquist, *Developmentally regulated nuclear transport of transcription factors in Drosophila embryos enable the heat shock response*. Development, 1998. 125(23): p. 4841-4850.
67. Pritchard, D.K. and G. Schubiger, *Activation of transcription in Drosophila embryos is a gradual process mediated by the nucleocytoplasmic ratio*. Genes & Development, 1996. 10(9): p. 1131-1142.
68. Cronan, J.E., *The E. coli bio operon: Transcriptional repression by an essential protein modification enzyme*. Cell, 1989. 58(3): p. 427-429.
69. Taddei, A., et al., *The function of nuclear architecture: A Genetic Approach*. Annual Review of Genetics, 2004. 38(1): p. 305-345.
70. Akhtar, A. and S.M. Gasser, *The nuclear envelope and transcriptional control*. Nat Rev Genet, 2007. 8(7): p. 507-517.
71. Heessen, S. and M. Fornerod, *The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place*. EMBO Rep, 2007. 8(10): p. 914-919.
72. Schulze, S.R. and L.L. Wallrath, *Gene Regulation by Chromatin Structure: Paradigms Established in Drosophila melanogaster*. Annual Review of Entomology, 2007. 52(1): p. 171-192.
73. Dechat, T., et al., *Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin*. Genes & Development, 2008. 22(7): p. 832-853.
74. Suzuki, Y., et al., *Isolation and characterization of mutations in the human holocarboxylase synthetase cDNA*. Nat Genet, 1994. 8(2): p. 122-128.
75. Zschoernig, B. and U. Mahlknecht, *SIRTUIN 1: Regulating the regulator*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. 376(2): p. 251-255.
76. Piatigorsky, J., *Gene Sharing and Evolution "The Diversity of Protein Functions"*. Harvard University Press, 2007.
77. *Matchmaker Mammalian two-hybrid Assay Kit*. Clontech, 1996. XI((1)): p. 10-12.
78. J M De Ruijter, A., et al., *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*. Biochemical journal, 2003. 370: p. 737-749.

79. Xue, Y.T., et al., *NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities*. *Molecular Cell*, 1998. 2((6)): p. 851-861.
80. Zhang, Y., et al., *Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex*. *Cell*, 1997. 89((3)): p. 357-364.
81. *MATCHMAKER Two-Hybrid System 2*. Clontech, 1996: p. 1-64.
82. Berger, F., et al., *Subcellular Compartmentation and Differential Catalytic Properties of the Three Human Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase Isoforms*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(43): p. 36334-36341.
83. Feige, J.N. and J. Auwerx, *Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology*. *Current Opinion in Cell Biology*, 2008. 20(3): p. 303-309.