



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**HOLOCARBOXILASA SINTETASA PARTICIPA EN EVENTOS DE REPRESIÓN
TRANSCRIPCIONAL EN EL NÚCLEO DE CÉLULAS HUMANAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA

ISIS DEYANIRA TRUJILLO GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITE TUTOR

DR. DAVID ROMERO CAMARENA

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

NOVIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo de investigación fue realizado bajo la asesoría del Dr. Alfonso León Del Río, en el departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Este proyecto fue financiado parcialmente por el CONACyT (127606) y el PAPIIT (IN-206912).

La alumna agradece al CONACyT por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado (No de becario. 371711) y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por brindarme de manera gratuita formación académica, por ser espacio transformante, plural e incluyente.

Agradezco a mi tutor el **Dr. Alfonso León Del Río**, por permitirme desarrollar mi tesis doctoral como parte de su grupo de investigación, por su asesoría, por el interés mostrado hacia el proyecto y por permitirme iniciar el camino de la docencia.

Agradezco también a los miembros de mi Comité Tutorial, **Dr. Rafael Camacho Carranza y el Dr. David Romero Camarena**, quienes realizaron un excelente trabajo académico a lo largo de mi formación doctoral, nutriendo la conducción de este trabajo de investigación.

Agradezco al **Dr. Alfonso González Noriega** y la **bióloga Colette Ginette Michalak Sudomirska** por su asesoría y apoyo técnico durante el desarrollo de los experimentos de inmunofluorescencia.

Agradezco también a los miembros del laboratorio del Dr. León Del Río, de manera muy particular al **M. en C. Rafael Cervantes Roldán** por su apoyo técnico y por su colaboración en los ensayos de rescate de fenotipo. Al **Dr. Iván Meneses Morales** y a la **M. en C. Vanía Gómez Romero**, por la constante discusión de resultados, por sus comentarios siempre necesarios, porque junto a ustedes aprendí que la crítica es a las ideas no a las personas. Por la amistad inquebrantable. Al **biólogo Mario Román**, por permitirme colaborar con él en la caracterización de proteínas asociadas a HCS y por las largas conversaciones dentro y fuera del laboratorio.

A mi comité doctoral que con su valiosa lectura permitieron la consolidación de este trabajo de tesis:

Dr. Félix Recillas-Targa, por su incansable compromiso académico y por contagiar el ambiente con su ejemplo y dedicación.

Dr. David Romero-Camarena, por su ánimo, confianza y responsabilidad con la ciencia.

Dra. Leticia Rocha-Zavaleta, por su profesionalismo, iniciativa y objetividad.

Dra. Tzvetanka Dinkova, por las aportaciones a esta tesis y por transmitir su gusto por la docencia.

Dr. Fabio Salamanca, por sus comentarios y disposición para revisar este trabajo.

ÍNDICE

Prefacio	5
Resumen	7
Abstract	8
Capítulo I	9
I. Proteínas ligasas de biotina	10
II. Holocarboxilasa sintetasa y ciclo de biotina en humanos	12
III. Holocarboxilasa sintetasa estructura del gen y estructura proteica	14
IV-Defectos en el ciclo de utilización de biotina	16
V. Holocarboxilasa sintetasa participante obligatorio en la regulación transcripcional mediada por biotina	19
VI. Expresión diferencial de genes mediados por HCS-biotina en tejidos periféricos y cerebro	22
Capítulo II	24
Holocarboxilasa sintetasa en el núcleo	25
Hipótesis	28
Objetivo	29
Resultados	30
Discusión	52
Anexos	60
Anexo I. Proteínas asociadas a HCS en el núcleo	61
Anexo II. Metodología (Protocolos ampliados)	67
Anexo III. Publicaciones	76
Bibliografía	81

Abreviaturas

ACC-1	acetil coenzima A carboxilasa 1
ACC-2	acetil coenzima A carboxilasa 2
B-AMP	adenilato de biotina
BTD	biotinidasa
BLP	proteína ligasa de biotina
Ct-HCS	carboxilo terminal de holocarboxilasa sintetasa
DBD	dominio de unión a DNA
GCS	guanilato ciclasa soluble
GMPc	guanosín monofostato cíclico
GST	glutation S transferasa
Gly	aminoácido glicina
H3K9ac	acetilación de la lisina 9 en la histona 3
H3K9me3	trimetilación de la lisina 9 en la histona 3
H4k20me3	trimetilación de la lisina 20 en la histona 4
HCS	holocarboxilasa sintetasa
MCC	metil crotonil carboxilasa
MNT	proteína de unión a MAX
MCD	Deficiencia múltiple de carboxilasas
Nt-HCS	amino terminal de HCS
NL	lámina nuclear
HDAC	desacetilasa de histonas
HepG2	Línea celular de hepatocarcinoma humano
PC	Piruvato Carboxilasa
PCC	Propionil conenzima A carboxilasa
SMVT	transportador multivitamínico dependiente de sodio
delThr	delección de aminoacido Treonina
UAS	sitio de activación río arriba

PREFACIO

La enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS) es la encargada de unir biotina a las carboxilasas, siendo su función más conocida y ampliamente caracterizada. En los últimos 15 años diversos grupos de investigación observaron que la biodisponibilidad del sustrato de esta enzima, la vitamina biotina, modificaba la expresión de distintos genes. Al investigar sobre el mecanismo por el cual la biotina actuaba como un regulador de la expresión, nuestro grupo de investigación encontró que la Holocarboxilasa sintetasa era un participante obligatorio para que se desencadenara la vía de señalización que resulta en la fosforilación de factores de transcripción y por consecuencia en la expresión de genes dependientes de biotina.

Fue recientemente cuando se identificó a la holocarboxilasa sintetasa en el núcleo de células humanas y aunado al crecimiento científico en áreas como la epigenética, se propuso que la HCS podía actuar como una enzima modificadora de las histonas y fue incluso planteado que esta modificación era parte de llamado código de histonas. Sin embargo diferentes grupos de investigación demostraron que la biotinilación no era una modificación natural de las histonas, lo que dejaba abierto el cuestionamiento acerca de cual era la función de la HCS en el núcleo.

Nuestro grupo, comenzó a desarrollar investigaciones al respecto y utilizando a *Drosophila melanogaster* como modelo, demostramos que la HCS es una proteína asociada a cromatina, que colocaliza con marcas de represión transcripcional como la trimetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9me3) y que se encuentra enriquecida en el promotor del gen que codifica para la proteína HSP70, cuando el gen no está transcripcionalmente activo.

Estos antecedentes son los que nos llevaron a plantear la siguiente pregunta: ¿Cuál es la función de la HCS en el núcleo de células humanas? ¿HCS se encuentra asociada a eventos de represión transcripcional?

La presente tesis se encuentra dividida en 3 capítulos. El primero, denominado **"Holocarboxilasa sintetasa: de la biotinilación de carboxilasas a la regulación transcripcional"**, en el cual se plantea un panorama general acerca de lo que está reportado en artículos científicos acerca de la HCS como proteína ligasa de biotina y su papel como regulador de la transcripción .

El segundo capítulo llamado **"Holocarboxilasa sintetasa, una enzima bifuncional que actúa como corepresor en el núcleo celular"** se compone de la parte central de este trabajo de doctorado, lo que nos permitió caracterizar a la HCS como un corepresor de la transcripción, además de disectar el mecanismo: interacción con desacetilasas de histonas. Demostramos también que esta función de corepresión es independiente de su actividad catalítica como proteína ligasa de biotina ya que la HCS reprime la transcripción, aún en presencia de mutaciones en su sitio catalítico. Estos resultados permitieron publicar esta investigación original en la revista *Molecular Genetics and Metabolism*, y nuestro artículo fue merecedor de la portada de la revista en esa edición, además de un comentario editorial. Tanto el artículo original como el comentario editorial se encuentran en el anexo final de esta tesis.

Por último, en la tercera parte de esta tesis se encuentra una sección de anexos, el primero denominado **"Identificación y caracterización de proteínas asociadas a Holocarboxilasa sintetasa en el núcleo celular"**, comprende un ensayo de captura de proteínas unidas a HCS y su subsecuente caracterización mediante espectrometría de masas en tandem (LC/ESI-MS/MS). De una de las proteínas obtenidas se generó como parte de la investigación del Biólogo Mario Román, de la Universidad Autónoma Metropolitana, quién realizó su tesis de licenciatura en nuestro laboratorio.

En el segundo Anexo se incluye la metodología con sus protocolos ampliados de las técnicas utilizadas a lo largo de esta tesis. Y en un tercer anexo encontrarán las versiones originales de las publicaciones realizadas durante mi formación doctoral bajo la asesoría del Dr. Alfonso León-Del-Río.

RESUMEN

La enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS) cataliza la biotinilación de carboxilasas dependientes de biotina. Además es capaz de regular la transcripción de genes que participan en el metabolismo de biotina, esto al formar parte de una cascada de transducción de señales dependiente de GMP cíclico. Se ha descrito que en el núcleo celular la enzima HCS está asociada a la lámina B, lo cual sugiere que pudiera tener algunas otras funciones regulatorias en este compartimento celular.

Nuestro grupo de investigación demostró en cromosomas politénicos de *D. melanogaster*, que la HCS se colocaliza con bandas de heterocromatina, las cuales están enriquecidas con histonas trimetiladas en la lisina 9 (H3K9me3), esta marca epigenética en las histonas está caracterizada por ser de represión transcripcional. Resultados adicionales demostraron que la HCS es reclutada al promotor hsp70 cuando no se encuentra transcripcionalmente activo. Estos antecedentes nos sugirieron que la HCS podría estar asociada a represión transcripcional. En el presente trabajo, expresamos a la HCS como proteína de fusión al dominio GAL4 para evaluar su efecto sobre un gen reportero. Demostramos que la HCS tiene actividad de corepresor transcripcional en células HepG2 y que este efecto de corepresión es mediado por la interacción con desacetilasas de histonas (HDAC1, HDAC2, y HDAC7). Estas interacciones fueron corroboradas por distintas técnicas de interacción proteína-proteína y mediante ensayos funcionales de transfección.

Adicionalmente demostramos que la función que tiene la HCS como corepresor transcripcional no se ve afectada cuando se muta el sitio activo de la enzima encargado de la biotinilación.

Por lo anterior proponemos que la HCS participa en eventos de represión transcripcional, en donde la biotinilación no es requerida, y que este mecanismo está mediada por la interacción con complejos multiproteicos de represión transcripcional, incluidas las desacetilasas de histonas.

ABSTRACT

In human cells, HCS catalyzes the biotinylation of biotin-dependent carboxylases and mediates the transcriptional control of genes involved in biotin metabolism through the activation of a cGMP-dependent signal transduction pathway. HCS also targets to the cell nucleus in association with lamin-B suggesting additional gene regulatory functions. Studies from our laboratory in *D. melanogaster* showed that nuclear HCS is associated with heterochromatin bands enriched with the transcriptionally repressive mark histone 3 trimethylated at lysine 9 (H3K9me3). Furthermore, HCS was shown to be recruited to the core promoter of the transcriptionally inactive *hsp70* gene suggesting that it may participate in the repression of gene expression, although the mechanism involved remained elusive. In this work, we expressed HCS as a fusion protein with the DNA-binding domain of GAL4 to evaluate its effect on the transcription of a luciferase reporter gene. We show that HCS possesses transcriptional repressor activity in HepG2 cells. The transcriptional function of HCS was shown by *in vitro* pull down and *in vivo* co-immunoprecipitation assays to depend on its interaction with the histone deacetylases HDAC1, HDAC2 and HDAC7. We show further that HCS interaction with HDACs and its function in transcriptional repression is not affected by mutations impairing its biotin-ligase activity. We propose that nuclear HCS mediates events of transcriptional repression through a biotin-independent mechanism that involves its interaction with chromatin-modifying protein complexes that include histone deacetylases.

CAPÍTULO I

Holocarboxilasa sintetasa: de la biotinilación de carboxilasas a la regulación transcripcional.

*Nothing in biology makes sense,
except on the light of evolution.*

Dobzhansky, (1973)

I. Proteínas ligasas de biotina

Las proteínas con actividad enzimática de ligasas de biotina (BPL), son indispensables para organismos procariontes y eucariontes, ya que catalizan la unión de la vitamina biotina a carboxilasas. La biotina o vitamina H, tiene una estructura química particular que consta de un anillo bicíclico: uno de los anillos es un ureido heterocíclico mientras que el otro contiene azufre y es un anillo tetraiofeno, de forma lateral se encuentra una cadena de ácido valérico. Algunas bacterias como *Escherichia coli* tienen la capacidad de sintetizar biotina *de novo*, sin embargo los humanos no tenemos la capacidad de sintetizarla por lo que es necesario obtenerla de la dieta. En humanos la enzima encargada de unir biotina a las carboxilasas es la denominada holocarboxilasa sintetasa (HCS). En *E. coli*, la proteína BirA tiene actividad de ligasa de biotina y su dominio catalítico fue el primero en ser cristalizado (Wilson, et al; 1992). Los dominios catalíticos de las BPLs de distintas especies fueron comparados posteriormente con BirA, proponiendo que en general las proteínas ligasas de biotina se dividen en 3 dominios importantes: el amino terminal (N-terminal), el dominio central en el cual se encuentra el sitio catalítico de la enzima y un dominio carboxilo terminal (C-terminal).

Al realizarse la comparación de los dominios catalíticos de las BLPs se ha encontrado homología que abarca desde el dominio central donde se encuentra el sitio de unión a ATP y el sitio de unión a biotina, hasta el C-terminal. Se ha reportado que tanto para BirA como para HCS la región carboxilo tiene la función de reconocer a su sustrato. (Fig.1)

La región altamente variable entre las BLPs es la del dominio N-terminal. En la región N-terminal de *E. coli* se presenta un motivo hélice-vuelta-hélice, el cual le otorga una función adicional como represor transcripcional, al usar este motivo para reconocer en el DNA el sitio de inicio de la transcripción y reprimir la transcripción del operón de biotina.

El cambio de BirA como ligasa de biotina a un represor transcripcional, está dado por la biodisponibilidad de biotina para la bacteria, cuando las subunidades BCCP de la

carboxilasa dependiente de biotina ya han sido biotiniladas, se favorece la formación del complejo BirA-biotinil AMP el cual reconoce una secuencia específica en el operón de biotina y funciona como un represor de este operón (Brown, et al; 2004).

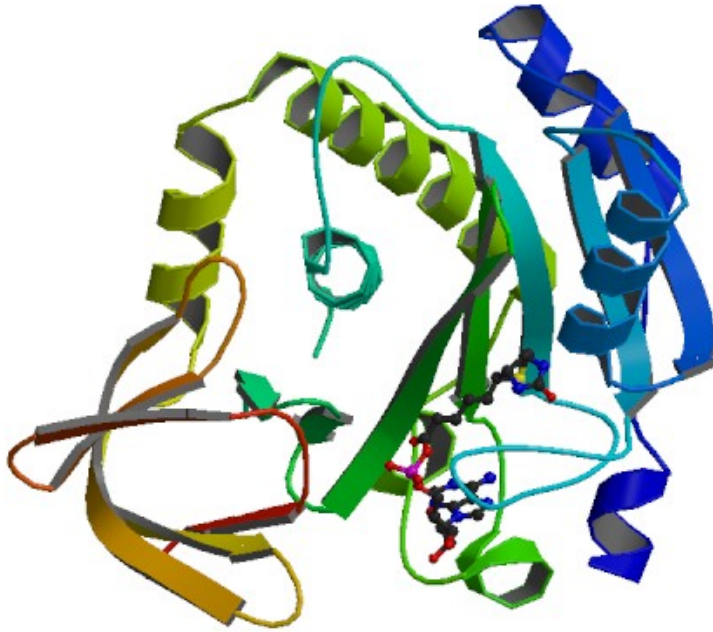


Figura 1. Topología de BirA. Estructura de BirA de *Escherichia coli* unida a su sustrato biotinil AMP. Tomado de base de datos: <http://www.rcsb.org/pdb/>

En humanos la región N-terminal de HCS no presenta homología con BirA, pero se ha observado mediante ensayos de cinética enzimática que tienen un papel en el reconocimiento del sustrato (Ingaramo & Beckett, 2009).

II. Holocarboxilasa sintetasa y ciclo de biotina, en humanos.

La función ampliamente caracterizada para la holocarboxilasa sintetasa (HCS), está dada por su actividad de ligasa de biotina debido a que cataliza la unión de esta vitamina a distintas apocarboxilasas.

HCS se expresa de manera ubicua, siendo el hígado y el páncreas los tejidos en donde se ha encontrado con mayor abundancia; también se ha identificado la presencia de la proteína en músculo esquelético (Hiratsuka et al., 1998).

En humanos, existen 4 carboxilasas dependientes de biotina (Piruvato carboxilasa (PC), propinil coenzima A carboxilasa (PCC), metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC) y dos isoformas de la acetil CoA carboxilasa (ACC-1 y ACC-2) estas enzimas tienen funciones vitales en distintas vías metabólicas. La enzima PC se encuentra en el citoplasma celular y su función consiste en tomar como sustrato a piruvato y dar como producto oxaloacetato. Por lo tanto es fundamental en la síntesis de glucosa. La enzima propinil coenzima A carboxilasa (PCC) participa en el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y ácidos grasos de cadena larga, mediante la transformación del propionil CoA a metilmalonil Coa. La enzima metil crotonil carboxilasa (MCC) está implicada en la síntesis del aminoácido leucina, llevando a cabo la carboxilación del 3-metil crotonil CoA para obtener como producto al 3-metillutacrotonil CoA. La acetil coenzima A carboxilasa (ACC), se encuentra en el citoplasma y en la mitocondria celular. Existen un par de isoformas descritas, las cuales participan en la formación de malonil CoA, sustrato para síntesis de ácidos grasos.

El evento decisivo para la activación de estas enzimas es la unión covalente de la vitamina biotina como grupo prostético. Esta reacción es llevada a cabo en dos pasos: el primero ocurre en presencia de adenosín trifosfato (ATP), donde la biotina es convertida en un producto intermediario denominado biotinil-5-AMP o adenilato de biotina (B-AMP), y en el segundo paso la HCS toma al producto intermediario para unirlo a residuos ϵ -amino de las lisinas conservadas en las carboxilasas, teniendo como consecuencia la transformación de apocarboxilasa a holocarboxilasas.

El papel de cofactor enzimático que desempeña la biotina, la pone en un papel esencial para la activación de carboxilasas.

Los humanos obtenemos la biotina de dos fuentes: la microbiota intestinal, y principalmente la dieta. Sin embargo esta vitamina se encuentra en cantidades traza, por lo tanto existe un mecanismo de "reciclamiento" para la reutilización de biotina. Después de activar a las carboxilasas y que estas lleven a cabo su función en las distintas vías antes mencionadas, son degradadas a péptidos. En el intestino la enzima biotinidasa (BTD) proteoliza péptidos de lisina que tienen unida a la biotina, estos péptidos denominados biocitina y la biotina libre en el medio, son absorbidos por que el transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT), aquí nuevamente la HCS toma como sustrato a la biotina, cerrando el denominado ciclo de reutilización de biotina (Fig. 2).

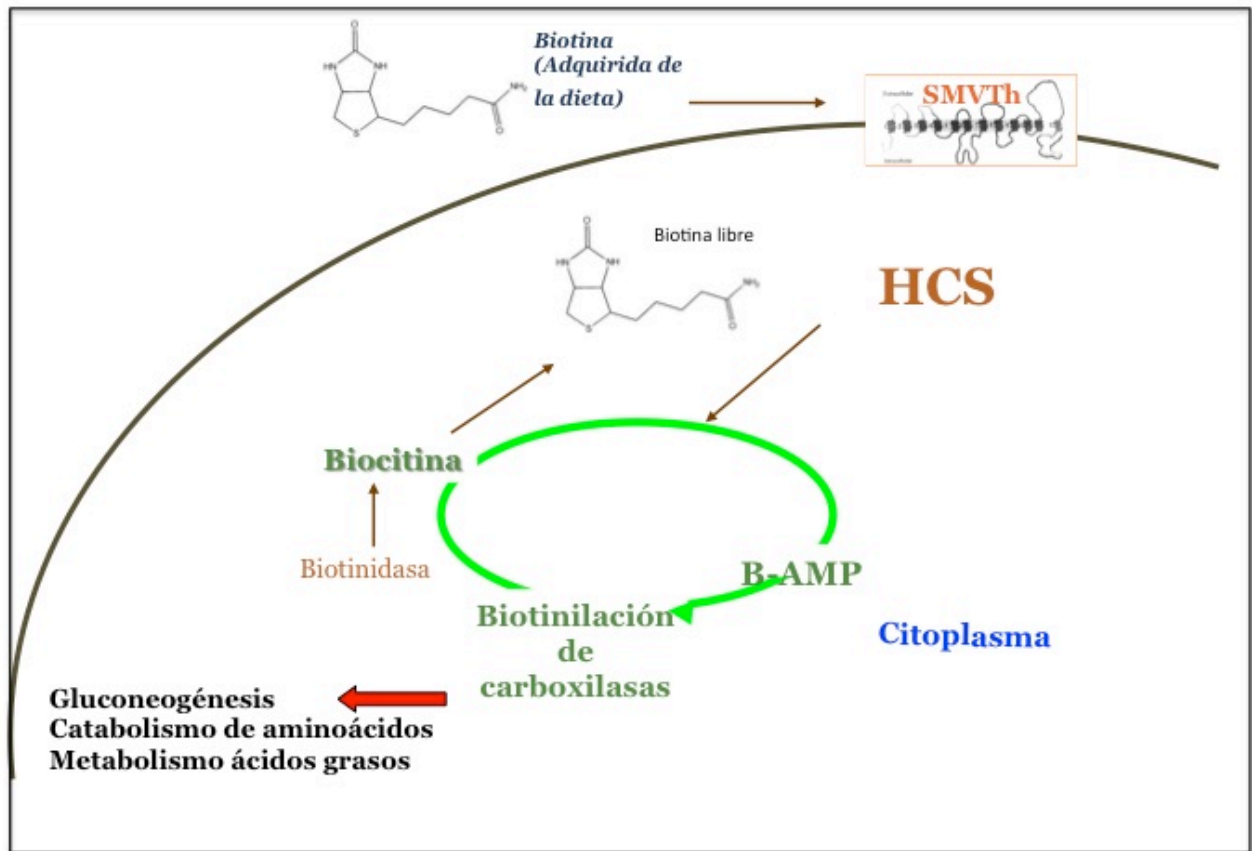


Figura 2. Ciclo de biotina en mamíferos. (Imagen modificada de Pacheco-Álvarez, et al., 2002).

III. Holocarboxilasa sintetasa , estructura del gen y estructura protéica.

El gen que codifica a la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS) en humanos, se localiza en el cromosoma 21q22.13, comprende una región de 240 kb y consta de 14 exones. El cDNA de HCS fue clonado por complementación bacteriana (León-Del-Río, et al; 1995) y ha sido aislada tanto en hígado como en linfocitos humanos (Suzuki et al., 1994). La HCS esta sujeta a un procesamiento alternativo de RNAm de la HCS, sin embargo los eventos celulares específicos bajo los cuales ocurre este procesamiento alternativo, son aún desconocidos. La especie más abundante de este RNAm es de 5.8 kb, y en menor abundancia especies de 4.5 y 4.0 kb. (Fig.3; León-Del- Río, et al; 1999)

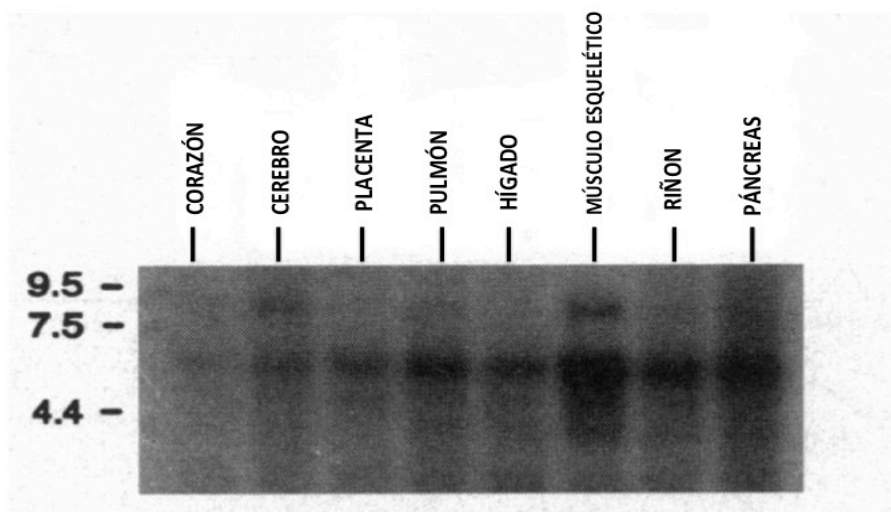


Figura 3. RNA mensajeros en distintos tejidos humanos. Se analizó mediante *Northern Blot*, muestras de RNA obtenidas de diferentes tejidos contra la región carboxilo terminal de la enzima HCS. En la parte superior se indican los tejidos analizados y a la izquierda los pesos en kilobases (kb).

Se ha reportado que la inmunodetección de la HCS mediante anticuerpos específicos, detecta una proteína de 82 kDa, sin embargo se ha observado que existen al menos 4 isoformas. Los sitios que se han propuesto como de inicio de la traducción, se presentan en los codones Met¹, Met⁷ y Met⁵⁸ (Hiratsuka, et al., 1998).

Al usar un anticuerpo para la detección específica de HCS en extractos totales de células hepáticas, hemos podido observar que estas isoformas presentan un peso de 82 kDa, 80 kDa, 70 kDa y una banda menos abundante en 62 kDa (Fig.4; Reyes-Carmona, et al. 2011)

Hasta ahora la relevancia biológica de la existencia de estas isoformas no ha sido completamente descrita. Mucho se especuló que posiblemente estas isoformas podían dimerizar, ya sea entre sí o con la HCS en su forma más larga, aunque hay pocos estudios al respecto. Recientemente en ensayos de equilibrio de sedimentación se demostró que la HCS se encuentra en forma monomérica y que además las isoformas podían tener actividades catalíticas distintas. Esto se demostró al comparar la capacidad de HCS completa (HCS-FL) y la isoforma HCS δ -58 (HCS-met58) de transferir biotina a una subunidad de la enzima PCC. Se observó que la HCS-FL biotinilaba más rápido que la HCS δ -58 (Ingaramo & Beckett, 2009).

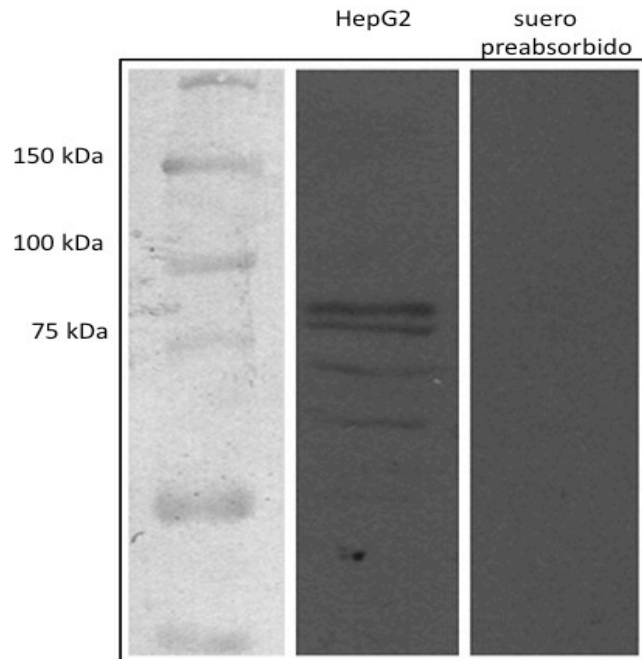


Figura 4. Isoformas de la Holocarboxilasa sintetasa en extractos totales de células HepG2. En extractos totales de células de hepatocarcinoma (HepG2), se analizó mediante Western blot usando un anticuerpo específico α -HCS que reconoce la región carboxilo terminal, en el primer panel de izquierda a derecha se observa el marcador de peso molecular, en el segundo panel las isoformas de la HCS y en el tercer panel se observa el control usando el suero preabsorbido.

IV. Defectos en el ciclo de utilización de biotina.

Como se ha mencionado anteriormente, en humanos la biotina es un nutriente fundamental para la activación de las carboxilasas y por lo tanto del funcionamiento de estas enzimas en las vías metabólicas en las que participan. Los requerimientos de biotina en la dieta están basados en los promedios de ingesta de población sana. La ingesta recomendada es de 30 mg/día para hombres y mujeres, se propone que los adultos mayores y las mujeres embarazadas deben aumentar su ingesta a 35 mg /día. La deficiencia de esta vitamina tiene como consecuencia que los pacientes tengan dolor muscular, depresión, letargia, síntomas que regularmente son revertidos con la suplementación de biotina (Genetics Home Reference, www.ghr.nlm.nih.gov/condition/holocarboxilase-synthetase-deficiency).

Sin embargo existen un par de desórdenes autosómicos recesivos del metabolismo de biotina, ambos son diagnosticados como deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC). Este padecimiento puede tener dos vertientes distintas debido a mutaciones en dos genes diferentes: la biotinidasa (BTD) u Holocarboxilasa sintetasa. Como ya se ha mencionado antes estas enzimas son fundamentales para el óptimo funcionamiento del ciclo de biotina, mostrado en la Fig.2.

Las manifestaciones clínicas de los pacientes incluyen: pérdida del cabello, sarpullido en la piel (que en ocasiones la gravedad es tal que lleva a descamación de la piel), bajo tono muscular, vómitos, falta de apetito, problemas respiratorios, convulsiones y en casos severos, coma y posteriormente la muerte (Baumgartner & Suormala, 1997). En la mayoría de los pacientes el tratamiento con suplementación 10 mg/día de biotina, que tiene que administrarse de por vida, ha resultado suficiente y responden favorablemente.

Cabe mencionar que clínicamente los pacientes con mutaciones en BTD o HCS presentan síntomas altamente similares, sin embargo los pacientes con deficiencia de HCS presentan los síntomas cuando son neonatos o dentro de las primeras horas de

nacimiento, mientras que en los pacientes con deficiencia de biotinidasa presentan la enfermedad en estados tardíos, incluso en la adolescencia (Van Hove, et al., 2008).

A) Mutaciones en el gen de biotinidasa (BTD)

En el caso de la biotinidasa, enzima encargada de reciclar la biotina, se han encontrado más de 150 mutaciones a lo largo de toda la secuencia, estas mutaciones incluyen inserciones, deleciones, inserciones y deleciones de un solo nucleótido, mutaciones puntuales y formación de codones de paro prematuros (Hymes & Wolf, 1996).

Estas mutaciones tienen como consecuencia la disminución de la actividad catalítica de la enzima y por lo tanto un decremento en la concentración de péptidos que contienen biotina para ser reciclada. La dosis farmacológicas de biotina pueden ir de los 5-20 mg/día permiten que estos pacientes ya no presenten los síntomas asociados a la enfermedad. (Hymes & Wolf, 1996).

B) Deficiencia de Holocarboxilasa sintetasa

Esta enfermedad se caracteriza por un decremento en la actividad enzimática de la HCS debido a mutaciones que se encuentran a lo largo de la enzima y muy particularmente en el sitio activo. Los tipos de mutaciones que se han encontrado son deleciones de un solo aminoácido, inserciones, y solo ha sido reportado una mutación en un intrón.

Mutaciones en HCS, particularmente en el sitio de unión a biotina, generan cambios sobre la velocidad inicial de la reacción o sobre la afinidad por biotina, de las mutaciones que se han reportado en diversos grupos étnicos están la Gly581Ser, Val550Met, Arg508Trp y delThr610. En la fig. 5 se pueden observar las mutaciones que han sido reportadas para este gen (Suzuki, et al; 2005).

Como consecuencia de estas mutaciones, existe una disminución en la actividad enzimática de las carboxilasas dependientes de biotina, provocando aciduria, hiperamonemia y acidosis láctica. Estos datos destacan la importancia de la biotina como un nutriente esencial resaltando la importancia de la HCS en el mantenimiento de la homeostasis y metabolismo intermediario.

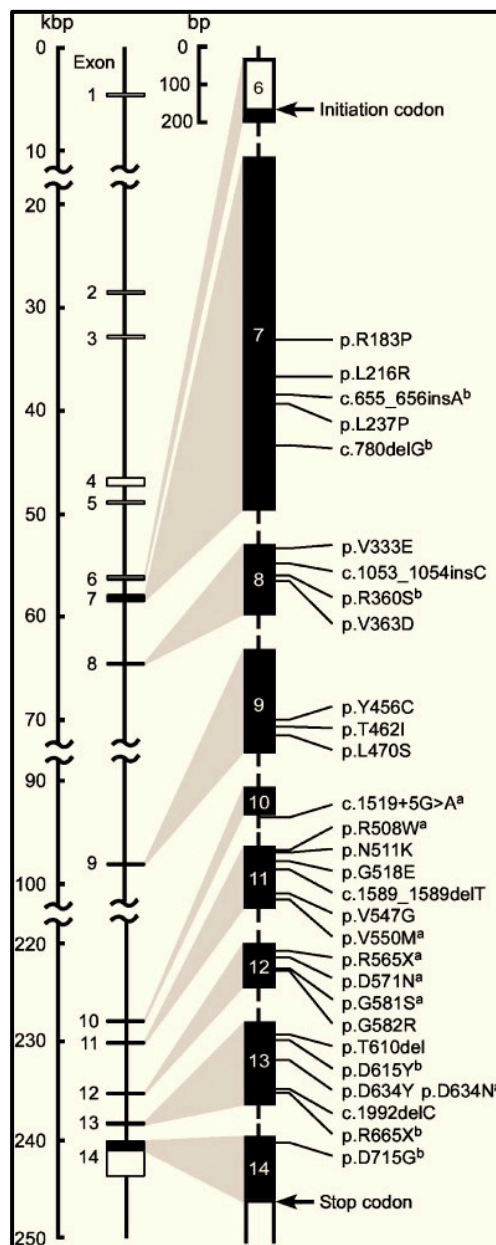


Figura 5. Estructura del gen de la enzima Holocarboxilasa sintetasa y las mutaciones que se han reportado para este gen (Tomado de Suzuki et al., 2005)

V. Holocarboxilasa sintetasa es un participante obligatorio en la regulación transcripcional mediada por biotina.

La regulación de la expresión genética durante las distintas fase del ciclo celular está determinada por diversas señales provenientes de hormonas y factores de crecimiento, entre otros, siendo una de las respuestas celulares cambios en los patrones de expresión. Otros factores que son capaces de modificar la expresión, son sin duda los compuestos obtenidos de la dieta, tales como vitaminas. Se ha observado que la biotina afecta la expresión de distintos genes de proteínas involucradas en metabolismo intermediario y transducción de señales (Dakshinamurti & Cheah-Tan, 1968; Romero-Navarro, et al., 1999).

El mecanismo responsable de esta regulación mediada por biotina era desconocido, por lo que nuestro grupo de investigación realizó diversas estrategias experimentales para poder elucidar los pasos que llevaban a cabo esta fina regulación.

Nuestro grupo de investigación decidió tomar a las carboxilasas (ACC-1 y PC) y a la misma HCS, como modelo de estudio. Al analizar los RNA mensajeros obtenidos de cultivos celulares de hepatocitos, mantenidos en medio libre de biotina durante 15 días, se observó que existía una disminución en la concentración de mensajeros para las 3 proteínas y que esta disminución era dependiente del tiempo transcurrido. Este efecto era revertido al poner biotina en el medio (0.01mM). Al usarse fibroblastos de pacientes con enfermedad múltiple de carboxilasas, específicamente con una mutación en el sitio activo de la HCS (lo cual disminuye la afinidad de esta enzima por biotina), se observó que los bajos niveles de mensajero no eran revertidos con las concentraciones normales de biotina, es decir, fue necesario aumentar 100 veces la concentración de esta vitamina (1 mM) para restituir los niveles de los mensajeros.

Lo anterior llevó a proponer que la HCS, la biotina y el producto intermediario adenilato de biotina, eran fundamentales para la regulación de la expresión de estos genes.

También en este estudio se determinó que los siguientes pasos que proseguían a la formación del biotinil-5'-AMP era la activación de la enzima a la guanilato ciclasa soluble (GCs). La consecuencia inmediata de la activación de esta enzima, es la activación del guanosín monofosfato cíclico (GMPc). Por lo tanto se verificó en los cultivos crecidos en medio libre de biotina era posible restablecer los niveles de RNA mensajero al estimular las células con 8-bromo-GMPc, un análogo no hidrolizable del GMPc. Lo que se observó fue un efecto similar al que se obtuvo cuando se estimuló con biotina: se recuperaron los niveles de RNA mensajero de las HCS, ACC-1 y PC.

El papel del GMPc consiste en activar a proteínas cinasas dependientes de GMP (PKGs). Estas últimas son las encargadas de entrar al núcleo y modificar postraduccionalmente a factores de transcripción, para activarlos y que actúen sobre sus genes blanco (Fig.6; Solórzano-Vargas, et al, 2002).

Por lo tanto, aunado a su papel de proteína ligasa de biotina, la HCS es una proteína ineludible en la vía de transducción de señales para la correcta expresión de genes que participan en el ciclo de biotina, poniendo al binomio HCS-biotina como un regulador de la expresión de genes.

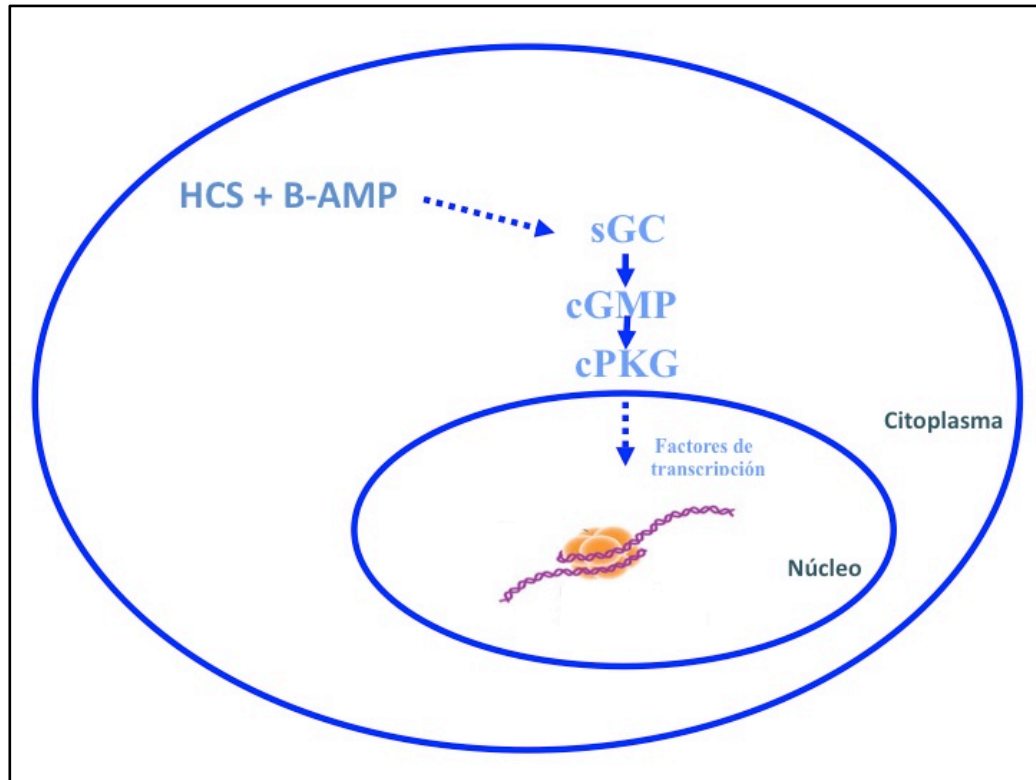


Figura 6. La HCS es un participante obligatorio en la activación de la vía de señalización HCS-GCs-GMPc-PKG, lo cual regula la expresión de genes que participan en el ciclo de biotina. Nuestro grupo de investigación propone el siguiente modelo: la HCS activa una vía de señalización hacia el núcleo, aquí la proteína cPKG fosforila a factores de transcripción activándolos y promoviendo su unión al DNA. De esta manera se activa la transcripción de genes dependientes del binomio HCS-biotina.

VI. Expresión diferencial de genes mediada por HCS-biotina, en tejidos periféricos y cerebro.

Al explicar el mecanismo mediante el cual la biotina y la holocarboxilasa sintetasa se encontraban relacionadas a procesos de expresión génica, nuestro grupo abordó una pregunta concisa alrededor de estos hallazgos, ¿cuál es la relevancia fisiológica de esta regulación mediada por HCS-biotina?

Para abordar este cuestionamiento se utilizó como modelo de ratas alimentadas con una dieta normal y dieta deficiente de biotina. Se extrajeron hígado, riñón y cerebro y el RNA mensajero de cada órgano fue comparado. Los resultados obtenidos revelaron que los niveles de RNA mensajero en hígado, riñón y cerebro de ratas con dieta normal de biotina, presentaban niveles normales de HCS y PC. Mientras que en hígado y riñón de ratas con dieta deficiente de biotina hubo una disminución en los niveles de los mensajeros de HCS y PC, cuando se evaluaron estos mismos mensajeros en cerebro, no se presentaron cambios significativos al comparar ratas con dieta normal de biotina contra ratas con dieta deficiente de biotina. (Fig. 7; Pacheco-Alvarez et al., 2004).

Proponemos que este mecanismo regulatorio favorece el adecuado funcionamiento del cerebro, ya que en este órgano la enzima PC es importante para la generación de glutamato mediante transaminaciones de cetoácidos involucrados en el ciclo de Krebs, lo cual es fundamental para la sinapsis neuronal mediada por glutamato.

Este fenómeno de expresión diferencial de genes en tejidos periféricos y cerebro, ha sido reportado con anterioridad para la glucosa. Es sabido que cuando la célula se encuentra en un ambiente limitado de este monosacárido, hay un fenómeno de internalización de sus transportadores como GLUT4, dejando así la glucosa libre para que sea aprovechada por el cerebro (Schulinkamp, et al, 2000).

La vía de señalización reguladora de genes aunada al mecanismo de expresión diferencial permite asegurar el funcionamiento cerebral. La holocarboxilasa sintetasa junto con la biotina son medulares para la homeostasis celular, debido al papel que desempeñan las distintas carboxilasas en puntos clave del metabolismo intermediario.

Además se ha hecho notar cómo la ingesta de biotina está relacionada con la expresión genética, lo cuál nos permite ampliar el conocimiento generado al reconocer a los nutrientes obtenidos de la dieta como moduladores de mecanismos moleculares. Estos hallazgos coadyuvan a la ampliación de los descubrimientos alrededor de la nutriogenómica y la nutrigenética.

Nuestro grupo de investigación elucidó además el mecanismo bajo el cual la regulación diferencial favorece el adecuado funcionamiento del cerebro, esto destaca el papel de la holocarboxilasa sintetasa para el correcto funcionamiento de esta vía de señalización.

Estas aportaciones nos muestran una visión global de cómo la dieta está relacionada con la expresión de genes y la importancia de la holocarboxilasa sintetasa en la regulación transcripcional.

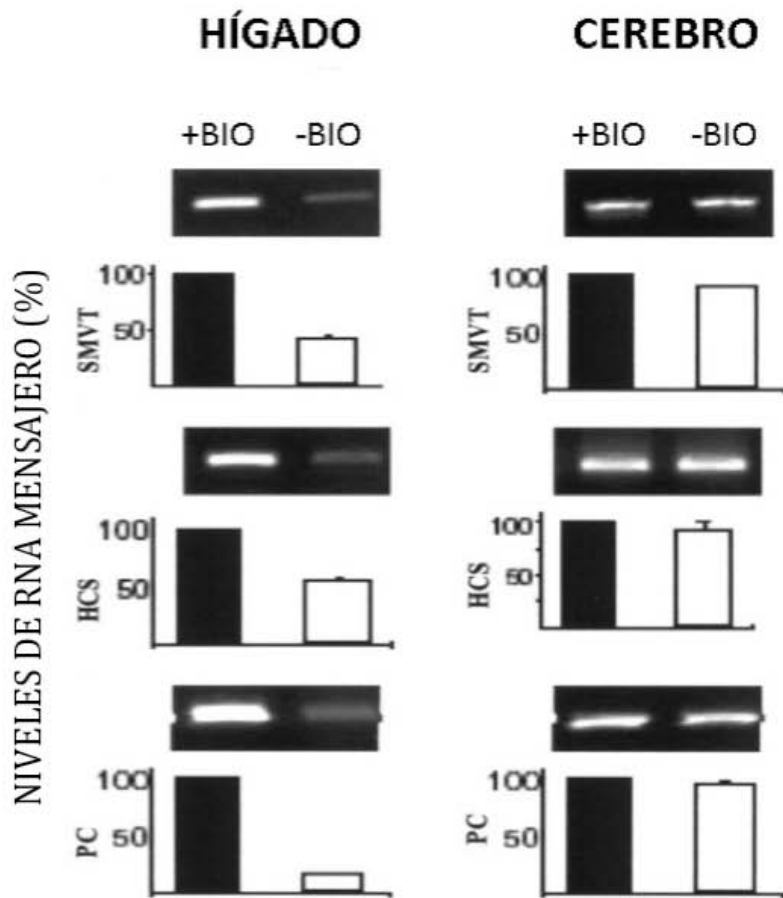


Figura 7. Regulación de la expresión de genes dependientes de HCS- biotina en hígado y cerebro. A la izquierda se muestran los niveles de RNA mensajero de HCS y PC en hígado. En el lado derecho se muestran los niveles de RNA mensajero de HCS y PC en cerebro. En ambos casos se comparan la dieta con biotina (+BIO) y deficiencia de biotina (-BIO).

CAPÍTULO 2

Holocarboxilasa sintetasa: una enzima bifuncional que actúa como corepresor en el núcleo celular.

The few really big steps in evolution clearly required the acquisition of new information. But specialization and diversification took place using differently the same structural information.

Francois Jacob, The possible and the actual, (1982)

I. Holocarboxilasa sintetasa en el núcleo celular de células humanas.

Además de su papel como proteína ligasa de biotina y como regulador de la transcripción a nivel citoplasmático, recientemente se detectó la presencia de la HCS en el núcleo de células humanas (Narang, et al; 2004). Distintos cuestionamientos surgieron alrededor de este hallazgo, los primeros estudios se basaron en estudiar la secuencia proteica de la HCS sin embargo no se ha encontrado una secuencia típica de translocación nuclear. Hasta ahora el mecanismo que lleva a la HCS al núcleo no ha sido elucidado y no se tienen datos consistentes al respecto.

Los siguientes pasos se enfocaron en la función que desempeñaba la HCS en este compartimento celular, por lo que estudios de inmunofluorescencia y fraccionamiento celular permitieron determinar que la HCS se encontraba asociada a cromatina. (Narang, et al., 2004). Siguiendo la premisa de que la cromatina incluye ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas histonas y no histonas, se especuló que la HCS podía estar unida a alguno de estos componentes.

Es bien sabido que las histonas permiten el empaquetamiento del ADN y entre una de sus diversas funciones está la de la regulación de la expresión transcripcional. Las histonas identificadas son la H1, H2A, H2B, H3 y H4. Estas coinciden en un dominio amino terminal que sobresale de la estructura del nucleosoma. Estas son colas de histonas y tienen un alto contenido de lisinas que puede ser modificado postraduccionalmente, mediante acetilación, desacetilación, ubiquitinación, fosforilación, entre otras modificaciones (Jenuwein & Allis, 2001).

Estas marcas o modificaciones postraduccionales son reconocidas por distintas proteínas que a su vez reclutan a complejos proteicos específicos. Dichos complejos son los encargados de permitir la apertura o el cierre de la cromatina y como consecuencia la expresión o represión de genes específicos.

El hecho de que las regiones amino de las histonas tengan motivos de lisina, llevó a proponer que posiblemente la HCS unía biotina a estas lisinas, como lo hace en las lisinas de las carboxilasas, sugiriendo que esto tendría como consecuencia la modificación de la estructura de la cromatina y los patrones de expresión. Incluso fue sugerido que esta adición de biotina a las histonas formaba parte del llamado código de histonas (Hassan & Zemleni, 2008).

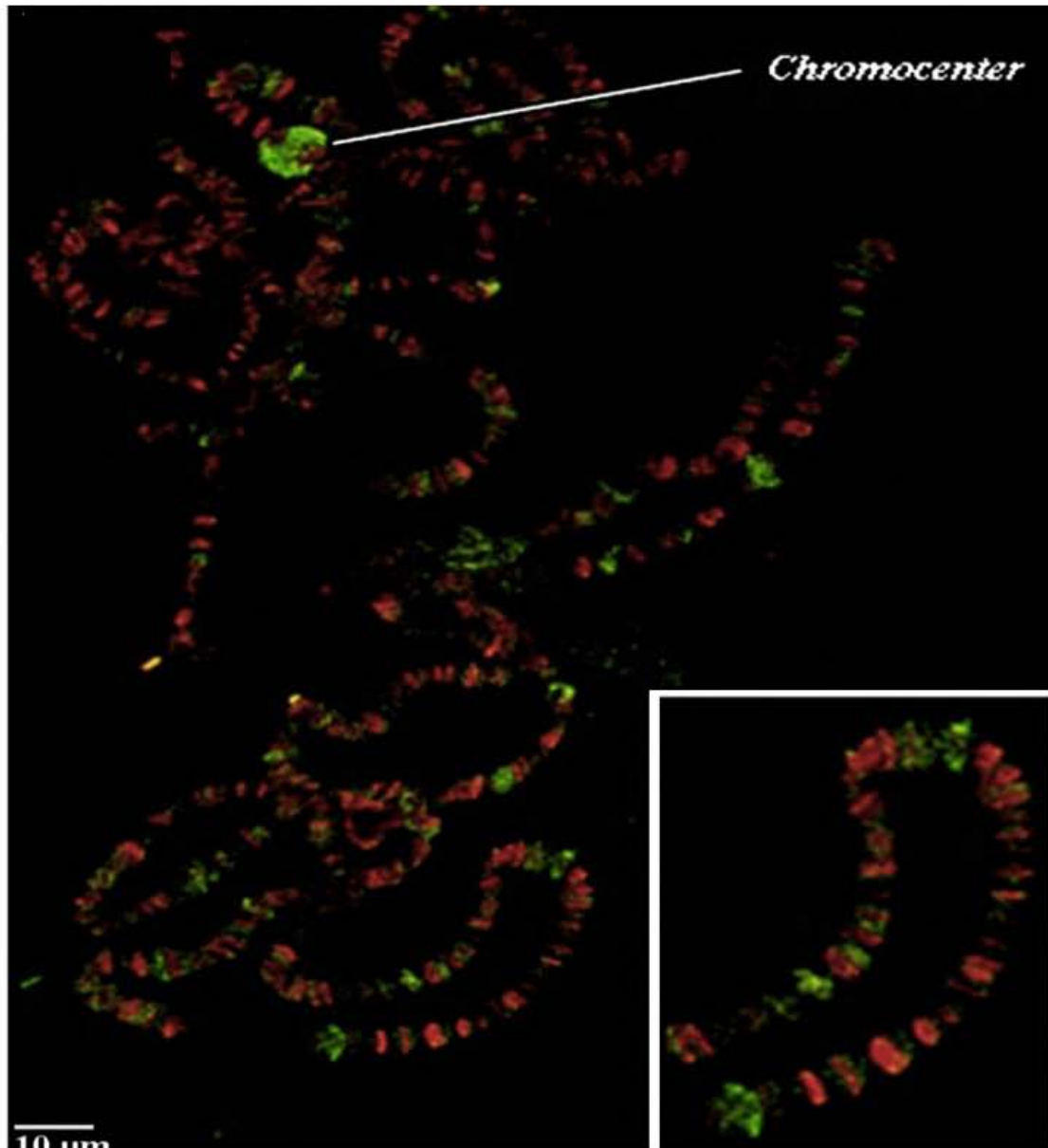
Estudios posteriores descartaron esta hipótesis cuando distintos grupos de investigación demostraron con diferentes técnicas altamente sensibles, como la espectrometría de masas, que en diversas líneas celulares *in vivo*, no era posible detectar histonas biotiniladas. Además otros estudios determinaron que el anticuerpo para la detección de la biotinilación de histonas generaba una reacción cruzada con la marca de histonas acetiladas (Bailey, et al; 2008).

Sin embargo un hecho ineludible era la asociación de la HCS con cromatina y particularmente con lámina B en el núcleo. Se sabe que las láminas juegan un papel en la compartimentalización nuclear atando DNA y complejos protéicos a la periferia nuclear, limitando así su accesibilidad a los sitios donde se encuentran los factores y la maquinaria basal de la transcripción evitando por lo tanto su expresión (Reddy, et al; 2008). Esto llevó a nuestro grupo a proponer que la Holocarboxilasa sintetasa podría estar asociada a eventos de represión transcripcional.

Para abordar esta hipótesis utilizamos como modelo a *Drosophila melanogaster* (la mosca de la fruta), para observar su localización en los cromosomas politénicos (Reyes-Carmona et al., 2011). Nuestro grupo determinó que la enzima HCS estaba asociada a cromatina, sobre todo en regiones de heterocromatina o cromatina inactiva y que además colocalizaba con la marca de la trimetilación de la lisina 9 en la histona 3, (H3K9me3), la cual es una marca epigénética de represión transcripcional. (Fig. 8)

Además encontramos, en este mismo modelo, que en el promotor del gen *hsp70*, se podía localizar a HCS cuando no estaba transcripcionalmente activo. Estos hallazgos en

D. melanogaster sugirieron fuertemente la asociación de HCS con represión transcripcional.



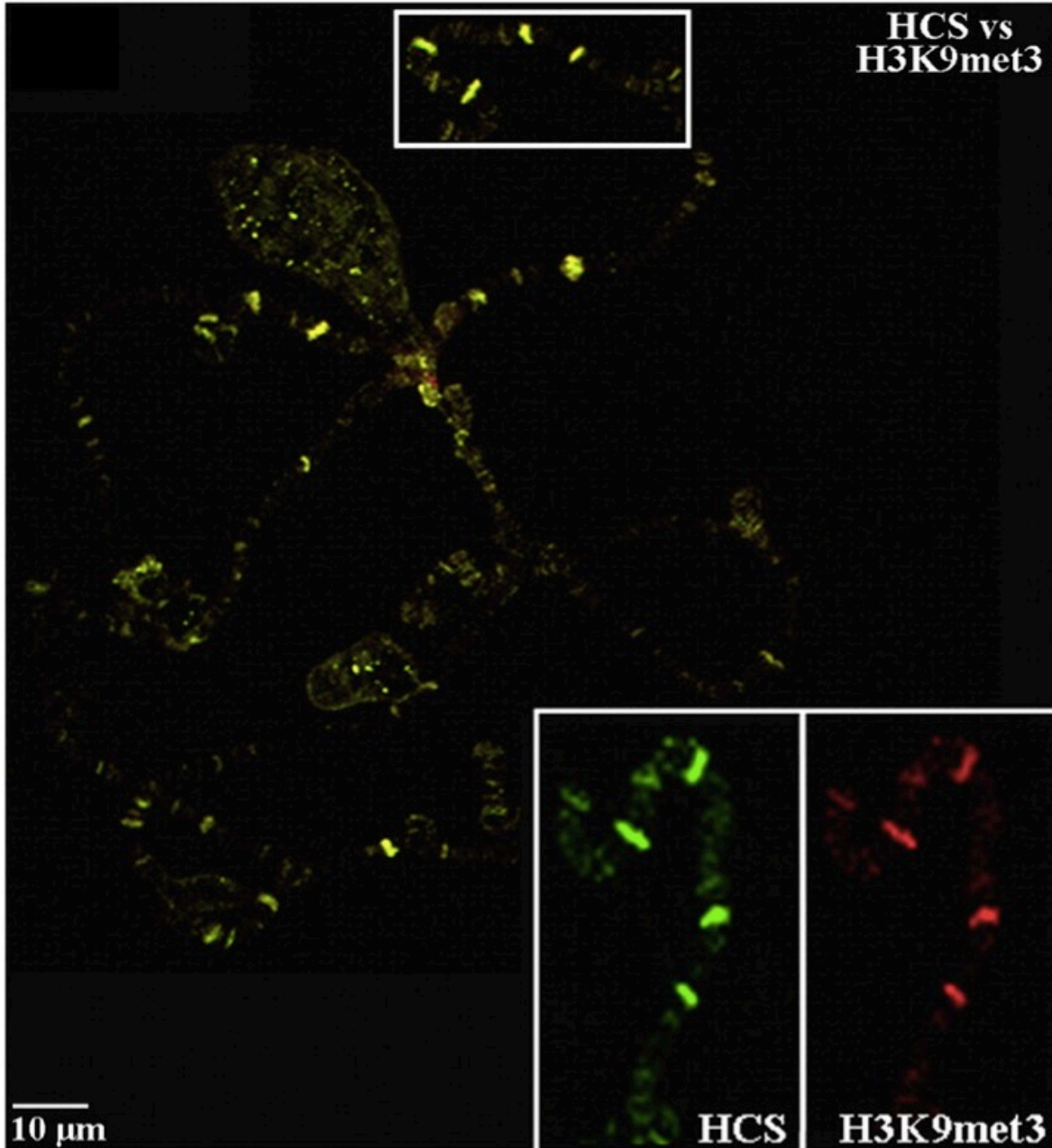


Figura 8. Colocalización de HCS con marcas de histonas. *Panel superior.* Se observan los cromosomas politenicos de *D. melanogaster* usando un anticuerpo anti H3K9ac en rojo y anti HCS en verde. Se encuentra indicado con una línea blanca el cromocentro. *Panel inferior.* Se observan a los cromosomas politénicos teñidos con anticuerpo anti H3K9me3 en rojo y anti HCS en verde. Dentro de la figura se hace un acercamiento de la zona indicada en recuadro blanco.

El papel de HCS en el metabolismo es ampliamente comprendido, sin embargo la función de esta proteína dentro del núcleo celular y su asociación a marcas de represión transcripcional en *D. melanogaster*, no había sido elucidado. Por lo que la evidencia planteada al inicio de este capítulo con los hallazgos que descartaron la biotinylación de histonas mediada por HCS y la investigación llevada a cabo en nuestro grupo en *D. melanogaster*, sentaron las bases para el planteamiento de este proyecto de investigación doctoral.

Hipótesis

La regulación transcripcional mediada por la holocarboxilasa sintetasa, se lleva a cabo por dos mecanismos distintos:

-Vía no genómica (citoplasma): mediante transducción de señales que incluye HCS- 5 biotinil AMP- GCs- GMPc- PKGc.

- Vía genómica (núcleo): mediante el requerimiento de la translocación de HCS al núcleo y su asociación regulada y específica con cromatina.

Objetivo general

Determinar la función de la holocarboxilasas sintetasa en el núcleo de células humanas.

RESULTADOS.

La holocarboxilasa sintetasa actúa como un represor transcripcional independiente de biotina, mediante el reclutamiento de desacetilasas de histonas.

I.- La holocarboxilasa sintetasa se encuentra en el núcleo de células HepG2

Para determinar la función de la holocarboxilasa sintetasa en el núcleo celular, propusimos utilizar como modelo a las células de HepG2 provenientes de hígado y que se caracterizan por tener una alta expresión de esta enzima. Además fue en esta misma línea celular donde se realizaron los estudios de nuestro grupo de investigación que determinaron el papel de la HCS en la vía de transducción de señales o vía no genómica. La presencia de la HCS en el núcleo había sido reportado por otros grupos, los cuales habían encontrado a la HCS en el núcleo de células Hela provenientes de epitelio cervical, (Narang et al., 2004) y en células 293T provenientes de riñón (Bailey, et al; 2010).

Lo primero que realizamos fue corroborar por medio de inmunofluorescencia que la enzima holocarboxilasa sintetasa se encontraba presente en el núcleo de las células HepG2 y lo que observamos al usar un anticuerpo específico anti-HCS, fue que la enzima se encuentra en los dos compartimentos celulares, núcleo y citoplasma. En rojo se puede observar a HCS (Fig. 9B y D) mientras que en azul se pueden observar los núcleos teñidos con DAPI. (Fig. 9A y C)

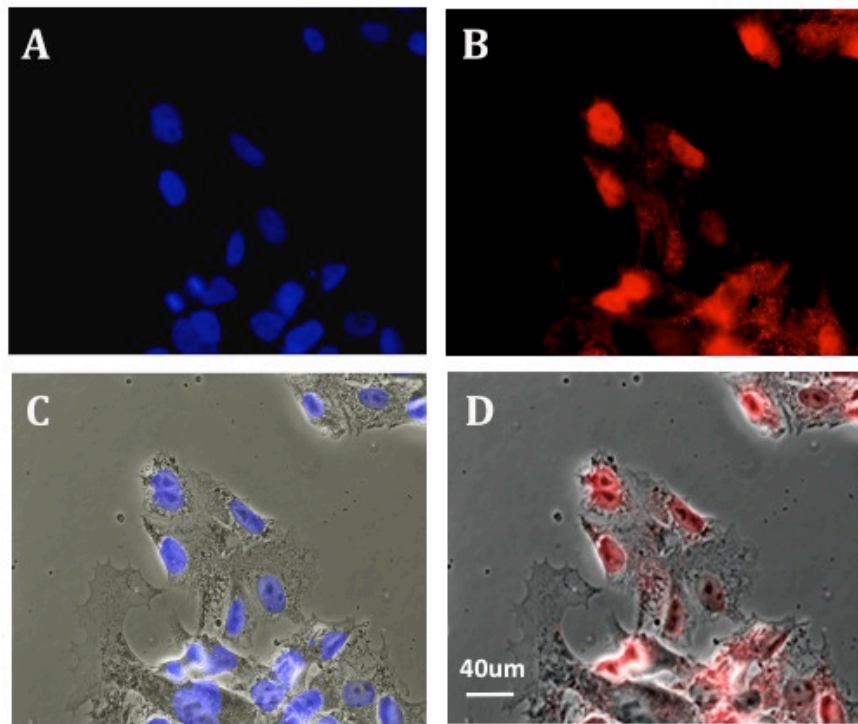


Figura 9. HCS se localiza en citoplasma y núcleo de células HepG2. (A) Células HepG2 fueron tratadas con DAPI para observar en DNA en el núcleo. (B) La HCS es observada al usar un anticuerpo anti-HCS (rojo). (C, D) Imagen de contraste de fases en donde fueron sobrepuestas las imágenes A y B respectivamente, para mostrar la localización de la HCS.

II. La HCS tiene actividad de regulador transcripcional sobre un gen reportero

Habiendo demostrado que la HCS se localiza en el núcleo, deseamos entender cuál era la función que tenía la enzima sobre la actividad transcripcional. Debido a que la HCS carece de un dominio de unión al DNA, decidimos utilizar un sistema heterólogo, en el cual proteínas que carecen de dominio de unión a DNA pueden ser fusionadas al factor de transcripción GAL-4 de levadura y se cotransfectó junto con el vector 5XUAS-TK-LUC, el cual contiene al gen reportero luciferasa bajo el control de un promotor constitutivo de timidina cinasa (Tk). El promotor se localiza río abajo de los elementos de respuesta a GAL4, (upstream activating sequence, UAS). (Fig.10A)

Para determinar la funcionalidad del sistema heterólogo usamos un par de proteínas coreguladoras de receptor a estrógenos α caracterizados por nuestro laboratorio, estas no tienen dominio de unión a DNA por lo cual requieren de su asociación con otras proteínas para llevar a cabo su función. La proteína coactivadora GAL4-NHERF-1, la cual forma parte de un complejo que contiene a la proteína SRC-1 y es reclutada al DNA mediante el receptor a estrógenos (Meneses-Morales, et al; 2014) y a la proteína corepresora GAL4-GOS24, la cual interactúa con deacetilasas de histonas también es reclutado a DNA por el receptor de estrógenos (Barrios-García, et al; 2014) ambos coreguladores con el reportero de luciferasa. Al transfectar el coactivador y compararse con el dominio de unión a DNA vacío, hubo un aumento de la actividad de al menos 6 veces, mientras que al transfectar el corepresor y compararse con el dominio de unión a DNA vacío hubo una disminución de la actividad a la mitad del basal. (Fig. 10B)

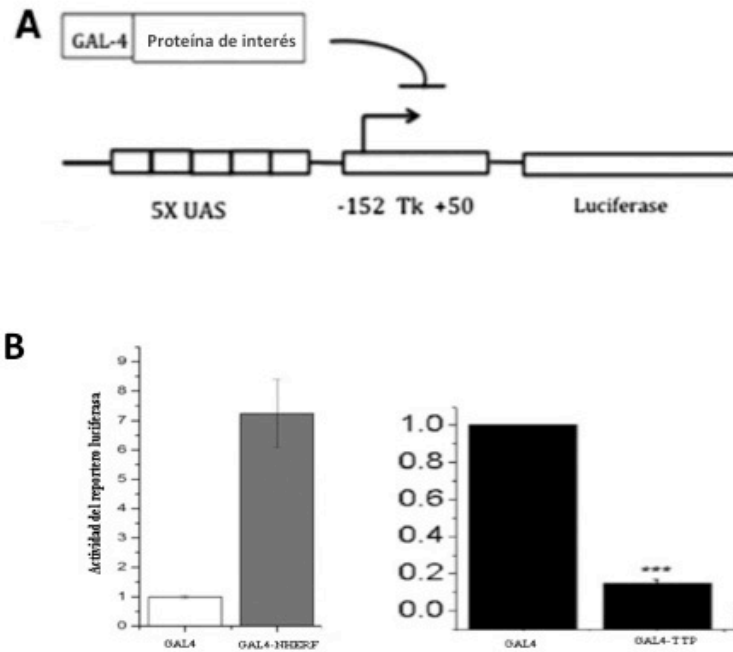


Figura 10. Actividad de coreguladores del receptor de estrógenos α , sobre el sistema heterólogo. A) Esquemas representativos del sistema heterólogo. **B)** A la izquierda se observa el comportamiento del coactivador del receptor a α -estrógenos, NHERF-2. A la derecha se observa el comportamiento de el corepresor del receptor a α -estrógenos, TTP; sobre el gen reportero luciferasa. En ambos casos los ensayos fueron realizados por triplicado y representan el promedio con el error estándar (\pm SE).

Habiendo realizado estos controles para corroborar el funcionamiento del sistema heterólogo, generamos la construcción GAL4-HCS. Esta construcción fue cotransfectada en células HepG2 junto con el vector 5XUAS-TK-LUC (Fig.10 panel superior). Como control adicional decidimos generar la construcción GAL4-histona deacetilasa 1 (GAL4-HDAC1) como referencia de un corepresor transcripcional ampliamente caracterizado. Esta proteína también carece de dominio de unión a DNA y su asociación a cromatina depende de otras proteínas que la reclutan a los sitios donde llevará a cabo su función.

Nuestros resultados mostraron que la transfección de GAL4-HCS en concentraciones de 0.5 µg y 1.0 µg en células HepG2, reprimía la transcripción del reportero de luciferasa de una manera dependiente de la concentración, reduciendo hasta el 50% para la concentración más alta, esto comparado con el control GAL4 (Fig.11). Lo observado para la GAL-4-HDAC1, fue una reducción hasta del 75% de la actividad de la transcripción del gen reportero de luciferasa, comparada con el control (Fig.11)

Estos resultados sugieren que la holocarboxilasa sintetasa actúa como un corepresor transcripcional sobre la transcripción del gen reportero, similar a lo observado para la actividad corepresora de la HDAC1.

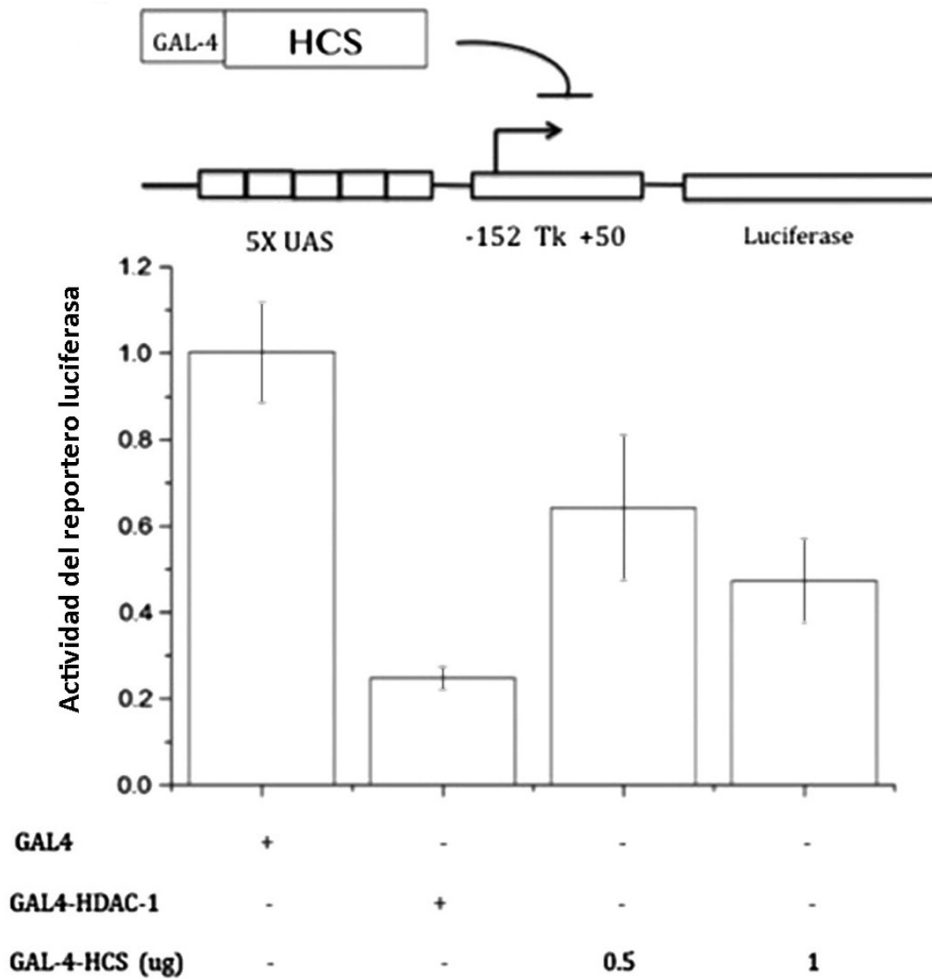


Figura 11. Actividad transcripcional de la holocarboxilasa sintetasa en un sistema heterólogo. En el panel superior se observan los componentes del sistema heterólogo y su funcionamiento. En el panel inferior se observa el resultado de la transfección transitoria. Las células fueron transfectadas con la construcción GAL4-HCS ó GAL4-HDAC1 y con el control GAL4-DBD, en todos los casos se cotransfectó con el reportero que contiene el promotor bajo el control de los sitios de reconocimiento para GAL4 (UAS). Los ensayos fueron realizados por triplicado y representan el promedio con el error estándar (\pm SE).

Después de observar que la holocarboxilasa sintetasa tiene una actividad de corepresor transcripcional, nos propusimos determinar cual era el dominio que poseía la actividad de corepresión dentro de la HCS. Como se menciono anteriormente el dominio amino terminal tiene un papel en el reconocimiento del sustrato sin embargo su rol no está completamente entendido ya que, la actividad catalítica de la enzima se encuentra en la región central y carboxilo terminal.

Por lo anterior decidimos dividir a la HCS en dos dominios estructurales: el primero el amino terminal que abarca hasta el aminoácido 430 (Nt-HCS) y el segundo al dominio carboxilo terminal (Ct-HCS) que contiene al sitio de unión a ATP y biotina, más el último fragmento del carboxilo, con el objetivo para no dañar estructuralmente el sitio catalítico de la enzima (Ct-HCS) comprendiendo así del aminoácido 431-726. Estos dominios fueron subclonados en el vector Gal4 para su transfección en el sistema heterólogo a la par que el reportero antes descrito.

Los resultados mostraron que ambas construcciones Nt-HCS y Ct-HCS reprimen la actividad del gen reportero de la luciferasa. (Fig. 12) Aunque se observa que la región carboxilo terminal reprime la transcripción mejor que el amino terminal, estadísticamente no existieron diferencias significativas entre los dos fragmentos. Mientras que en las tres construcciones de HCS, hubo diferencias significativas al compararse con el control GAL-4 vacío.

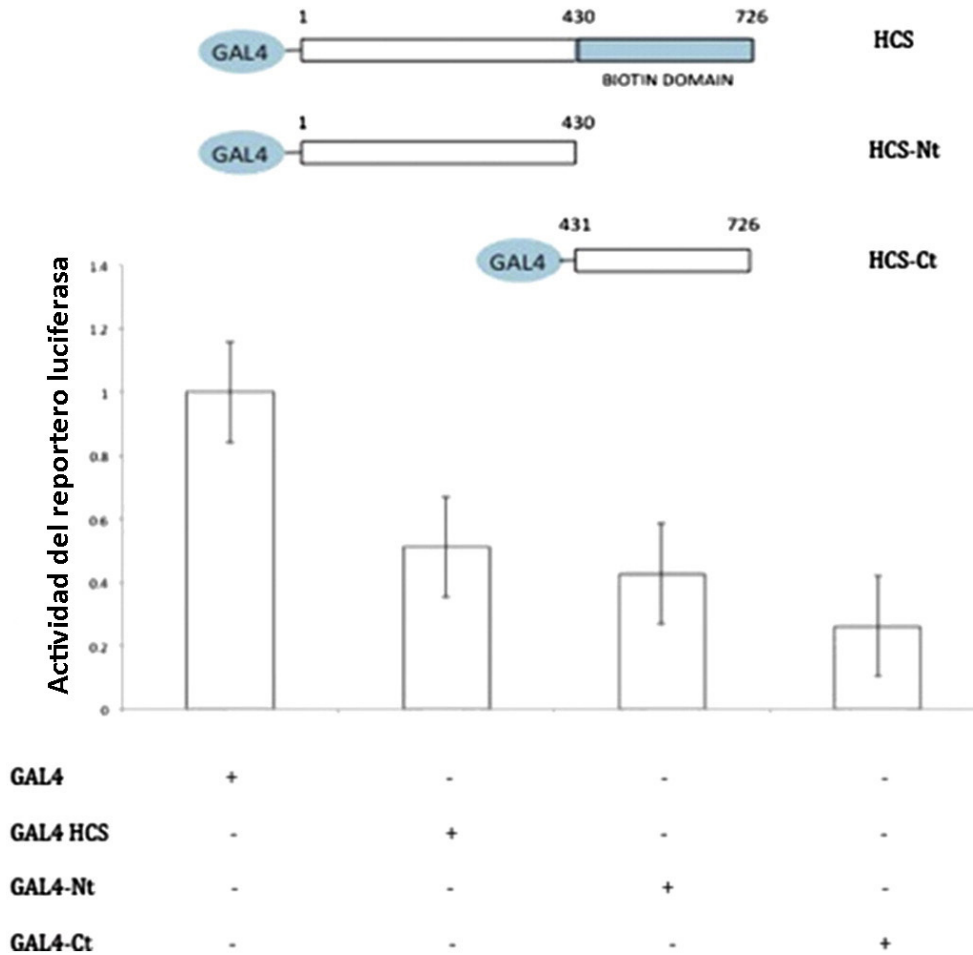


Figura 12. Actividad regulatoria en la transcripción de la holocarboxilasa sintetasa en un sistema heterólogo. Las células fueron transfectadas con la construcción GAL4-HCS, GAL4-Nt-HCS y GAL4-Ct-HCS y con el control GAL4-DBD, en todos los casos se cotransfectó con el reportero que contiene el promotor bajo el control de los sitios de reconocimiento para GAL4 (UAS). Los ensayos fueron realizados por triplicado y representan el promedio con el error estándar (\pm SE). Se encontraron diferencias significativas al compararse con GAL4 vacío. ($p < 0.05$).

III. La HCS requiere de la actividad enzimática de las histona deacetilasas para su actividad corepresora.

Después de observar que la holocarboxilasa sintetasa actuaba como un represor en el sistema heterólogo, decidimos explorar cómo revertir este efecto de corepresión, con la finalidad de indagar mediante que mecanismo ocurría la represión. Uno de los mecanismos más generales es la formación de complejos protéicos que contienen enzimas con actividad de desacetilasas de histonas (HDACs), al remover los grupos acetilo de las histonas estas forman una cromatina compacta y no activa transcripcionalmente. Por eso decidimos transfectar a la GAL4-HCS e incubar las células con un inhibidor de desacetilasas de histonas ampliamente reportado llamado tricostatina a (TSA). Como observamos en nuestros primeros resultados, la transfección de GAL4-HCS disminuyó en 40% la actividad del reportero, esto normalizado contra el GAL-4 vacío. Cuando incubamos a las células HepG2 transfectadas con GAL-4, y concentraciones de TSA crecientes 0.1 μ M, 0.2 μ M, and 0.5 μ M, se observó un efecto de desrepresión en el que hubo un aumento en la transcripción de 1, 5 y hasta 10 veces más que el basal, respectivamente. (Fig. 13)

Estos primeros resultados permitieron especular que posiblemente la represión llevada a cabo por HCS estaba acompañada de la actividad enzimática de las desacetilasas de histonas

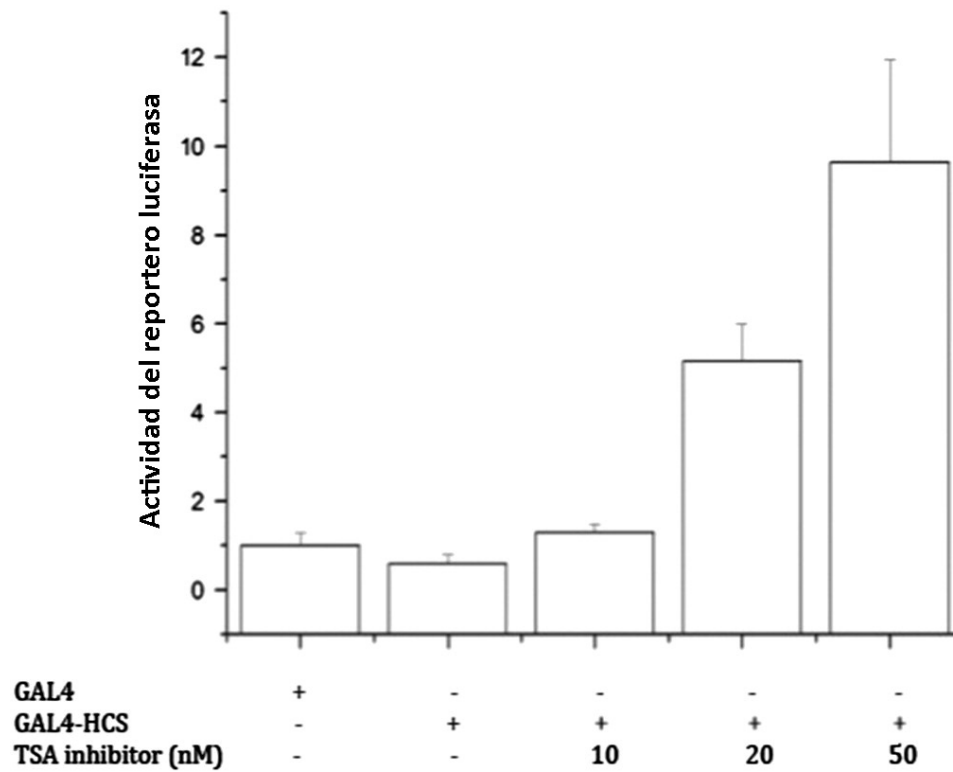


Figura 13. Tricostatina A revierte el efecto de represión de HCS. Células HepG2 fueron transfectadas con GAL-4 vacío y GAL4-HCS, en todos los casos con el reportero de luciferasa (5X UAS-luciferasa). En 3 puntos las células fueron incubadas con 10, 20 y 50 nM de Tricostatina A. Los ensayos fueron realizados por triplicado y representan el promedio con el error estándar (\pm SE). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$).

IV. Holocarboxilasa sintetasa interactúa *in vitro* con deacetilasas de histonas

Con base a los resultados obtenidos en el sistema heterólogo sobre el efecto de represor transcripcional y el hallazgo de que este efecto era revertido al inhibir a las deacetilasas de histonas, decidimos explorar la posibilidad de que la HCS interactuara con estas.

Nuestra primer aproximación fue hacerlo *in vitro* mediante la técnica de GST-*pull down*. Mediante transcripción y traducción *in vitro*, marcamos las metioninas con ³⁵S, de las desacetilasas de histonas HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC7 y HDAC8. Posteriormente se probó la interacción de cada una con GST-HCS y GST como control. En la fig. 13 se observan en la primera línea los inputs de las desacetilasas de histonas, representando el 5% de la cantidad que se puso a interactuar. En la siguiente línea se observan las interacciones con GST y en la tercera con GST-HCS. Cuando se incubaron únicamente con GST la marca radioactiva es negativa, lo que demuestra que no hay interacción con la proteína GST sola. Mientras que cuando se incubó con la holocarboxilasa sintetasa se observó interacción *in vitro* con HDAC1, HDAC2, y HDAC7, esto permite afirmar que la interacción es específica. En el caso de la HDAC3 se observó una banda muy tenue lo que nos exhortó a realizar los experimentos *in vivo* para corroborar las interacciones. En la fig. 14 en el panel inferior se presenta el gel con la expresión y purificación de la proteínas GST y GST-HCS, teñidas con azul coomassie.

Con estos resultados corroboramos que la actividad represora de la holocarboxilasa sintetasa esta asociada a la interacción con desacetilasas de histonas y a la actividad enzimática de estas últimas. La función de estas enzimas es la de revertir la acetilación de histonas lo cual modifica la estructura del nucleosoma y se ha asociado a procesos de transcripción activa, por lo que la desacetilación de histonas y por lo tanto las HDACs han sido correlacionadas con represión ó silenciamiento genetico. (Yang, et al; 2002)

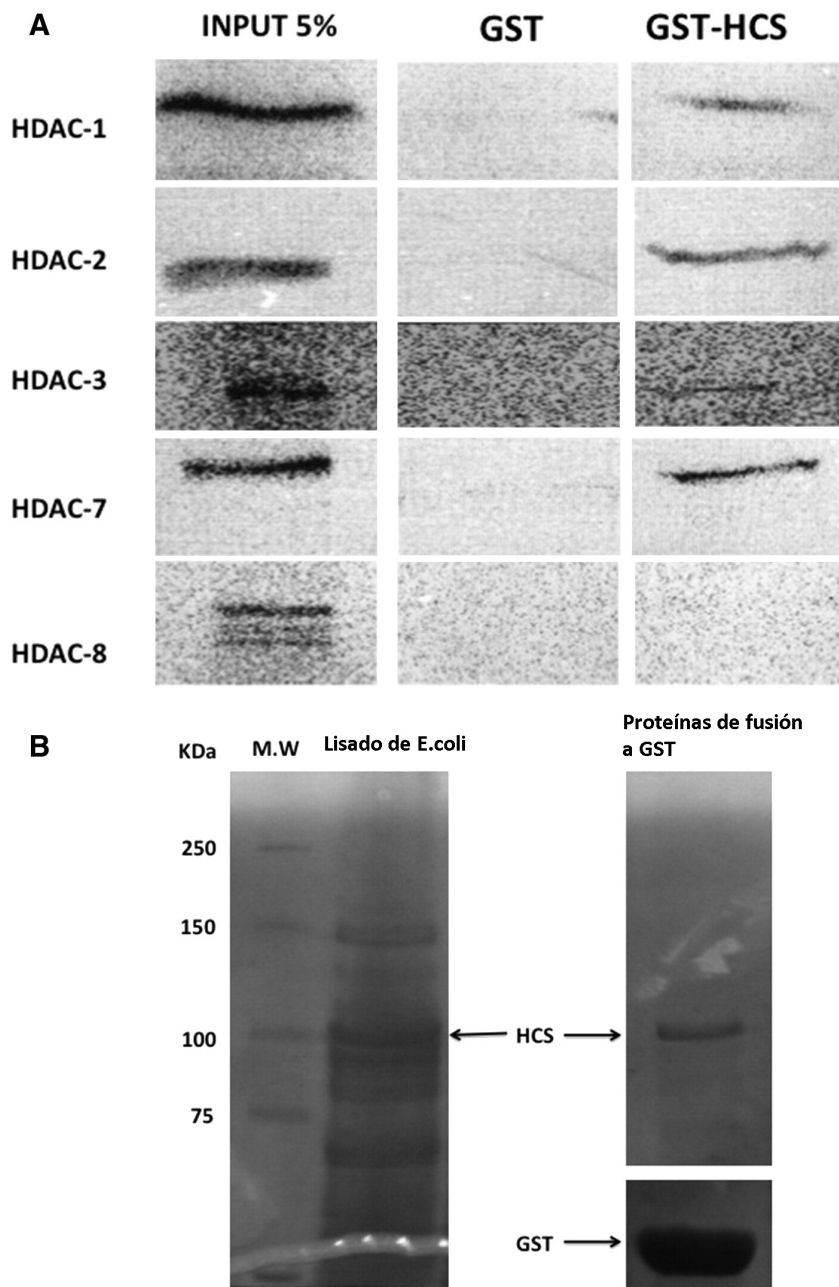


Figura 14. Holocarboxilasa sintetasa interactúa in vitro con desacetilasas de histonas. Panel superior(A). Se observa el input de las distintas desacetilasas de histonas que fueron transcritas y traducidas *in vitro* y las respectivas interacciones con GST o GST-HCS. **Panel inferior (B).** Extractos totales de *Escherichia coli* y la purificación de las proteínas GST y GST-HCS, teñidos con azul Commassie.

V. Holocarboxilasa sintetasa interactúa con deacetilasas de histonas en el núcleo celular.

Al encontrar que HCS interactúa *in vitro* con deacetilasas de histonas mediante *GST pull down*, decidimos evaluar si esto sucedía en contexto celular. El primer acercamiento fue mediante inmunofluorescencia. Tomamos a la HDAC-1 como modelo para evaluar si esta enzima colocalizaba en el núcleo con la HCS. Usamos un anticuerpo específico anti-HCS (rojo) y un anticuerpo específico anti HDAC1 (verde) y observamos que ambas proteínas colocalizaban en el núcleo de células HepG2. Además usamos el colorante azul DAPI, para teñir el DNA (Fig.15)

Lo que observamos fue que HDAC-1 y HCS colocalizan en el núcleo celular, lo cual nos daba indicio de que la interacción entre estas dos proteínas podría estar ocurriendo en este compartimento celular.

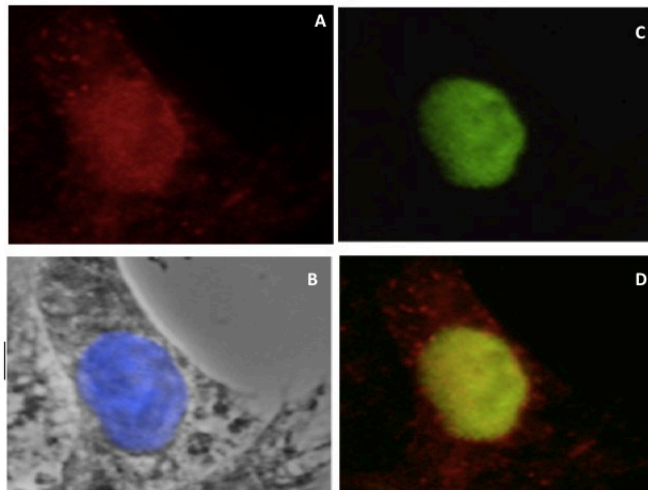


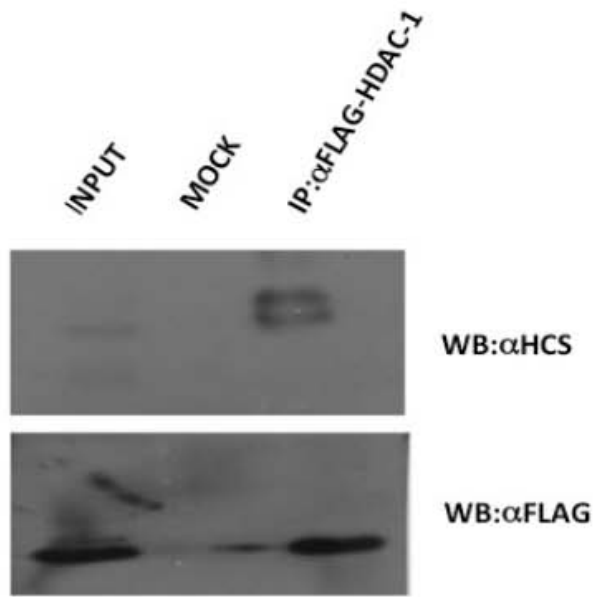
Figura 15. HCS colocaliza con HDAC1 en el núcleo de células HepG2. A) La HCS es observada al usar un anticuerpo anti-HCS rojo. B) Contraste de fases en donde se observa con DAPI núcleo de la célula en azul. C) La HDAC-1 es observada al usar un anticuerpo anti-HDAC-1 verde. D) Imagen de superposición de los paneles A y C.

La holocarboxilasa sintetasa interactúa *in vivo* con HDAC1, HDAC2 y HDAC7, en el núcleo de células HepG2

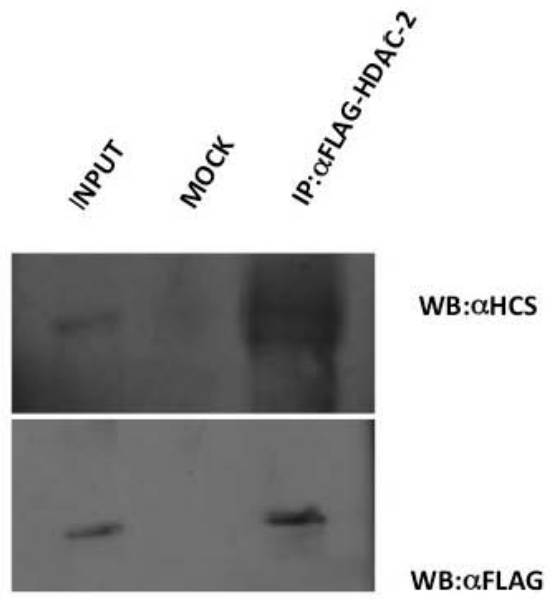
Como segundo estrategia para confirmar que la interacción entre la holocarboxilasa sintetasa y las deacetilasas de histonas ocurría *in vivo* realizamos ensayos de coimmunoprecipitación y Western blot en extractos nucleares de células HepG2. Para esto transfectamos a las deacetilasas de histonas con un vector de expresión que contenía un epítoto denominado Flag. La inmunoprecipitación fue llevada a cabo con el anticuerpo anti-Flag y se realizó una inmunodetección con un anticuerpo anti-HCS. Como control se usó el 5% de los extractos nucleares para analizar por Western blot y confirmar la presencia de la proteína. El resultado que obtuvimos fue que HCS es capaz de interactuar con HDAC1, HDAC2 y HDAC7. En la coimmunoprecipitación se observan un par de bandas correspondientes a HCS y sus isoformas de 82 kDa y 80 kDa, esto puede ser debido al enriquecimiento de la proteína con respecto al input, durante la inmunoprecipitación (Fig. 16 A, B y C, paneles superiores). La HCS no fue detectada en células en las que no fueron transfectadas, confirmando la especificidad del ensayo. Para confirmar la presencia de las deacetilasas de histonas que expresan el epitoto Flag, se realizó un Western blot control. (Fig. 16 A, B y C, paneles inferiores)

Este resultado de interacción *in vivo*, más el efecto que se observó de desrepresión al utilizar el inhibidor de desacetilasas de histonas, indican que la interacción de HCS con estas enzimas, es esencial para este mecanismo de represión ya que se induce la formación de una cromatina cerrada y por lo tanto transcripcionalmente inactiva.

A)



B)



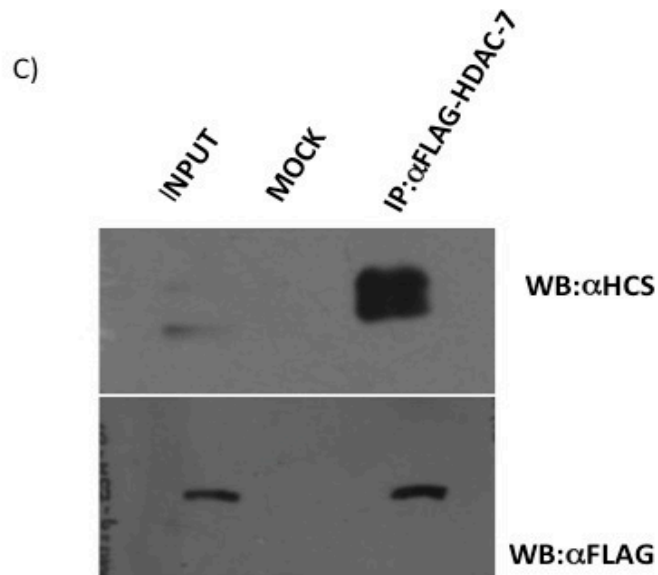


Figura 16. HCS interactúa con HDACs en el núcleo de células HepG2. Las células fueron transfectadas con HDAC1 (A), HDAC2 (B) o HDAC7 (C). De extractos nucleares se inmunoprecipitó a las HDACs mediante el epítipo FLAG, se corrió un gel de proteína, se transfirió y se realizó la inmunodetección anti-HCS. (Geles superiores). Cada uno de ellos tiene 5% de input del extracto nuclear y la línea Mock se refiere a células no transfectadas. La presencia de Flag-HDACs fue confirmada por análisis de Western blot con un anticuerpo anti-flag (Geles inferiores).

VI. La represión transcripcional por holocarboxilasa sintetasa se incrementa con la presencia de la desacetilasa de histonas 1

Habiendo demostrado que la HCS interactuaba con HDACs por distintas técnicas, decidimos evaluar la relevancia de esta interacción sobre el sistema heterólogo. Para esto transfectamos en células HepG2 a GAL4 vacío como control y la construcción GAL4-HCS, además incluimos a la HDAC1 en el vector pcDNA3.1+, en el cual se expresa la proteína sin dominio de unión a DNA y por lo tanto no reconoce los UAS del reportero. Cuando evaluamos el efecto de HCS observamos una represión de aproximadamente el 50%, mientras que la transfección de pcDNA-HDAC1 no tuvo un efecto sobre la transcripción; sin embargo al cotransfectar a la HCS con concentraciones crecientes de HDAC-1 (0.5 μ g y 1 μ g) observamos una represión del 35% y 20% dependiente del aumento de la concentración. Estos resultados sugieren que la represión mediada por HCS es aumentada con la presencia de la HDAC1 (Fig. 17)

Posteriormente evaluamos si este efecto era similar cuando la proteína que estaba unida al promotor era la GAL-4-HDAC-1, por lo que cotransfectamos a GAL-4-HDAC-1 y a la construcción pcDNA 3.1+ HCS. Encontramos que la HCS al no tener el dominio de unión a DNA es incapaz de reprimir, mientras que GAL4-HDAC1 redujo la transcripción en un 40%, y al cotransfectar a las dos proteínas hubo una disminución aún más pronunciada (Fig. 18)

Ambos experimentos sugieren que la interacción de la HCS con la HDAC1 reprime de manera aditiva la transcripción en células HepG2. Sin embargo cabe mencionar que ambas proteínas requieren de una tercera que las reclute al DNA.

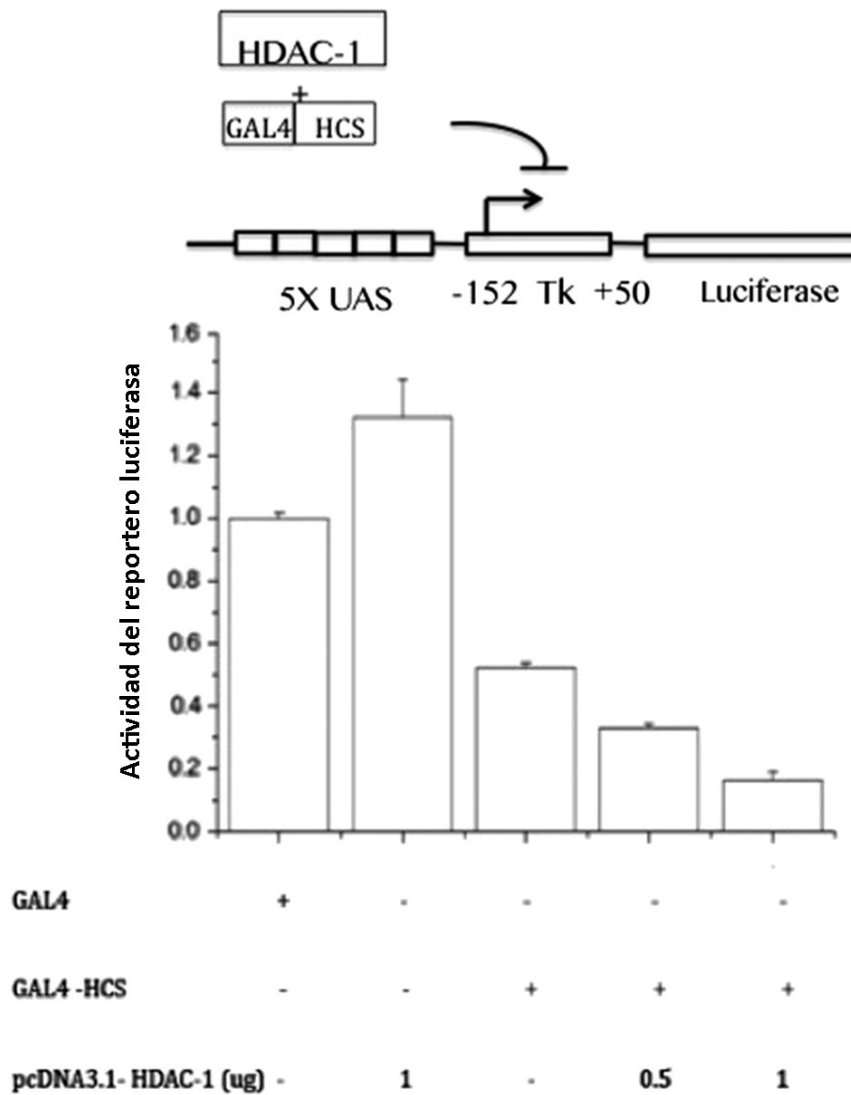


Figura 17. La HDAC1 aumenta la represión mediada por HCS. Representación esquemática del reportero 5XUAS-TK-LUC y a la HCS que es expresada como una proteína de fusión con el dominio de unión a GAL4. En la parte inferior de la figura se observa el resultado de la transfección de células HepG2 GAL-4, GAL4-HCS ó pcDNA 3.1 HDAC1, todas fueron transfectadas con el reportero que contiene los UAS. Los ensayos fueron realizados por triplicado y representan el promedio con el error estándar (\pm SE). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$)

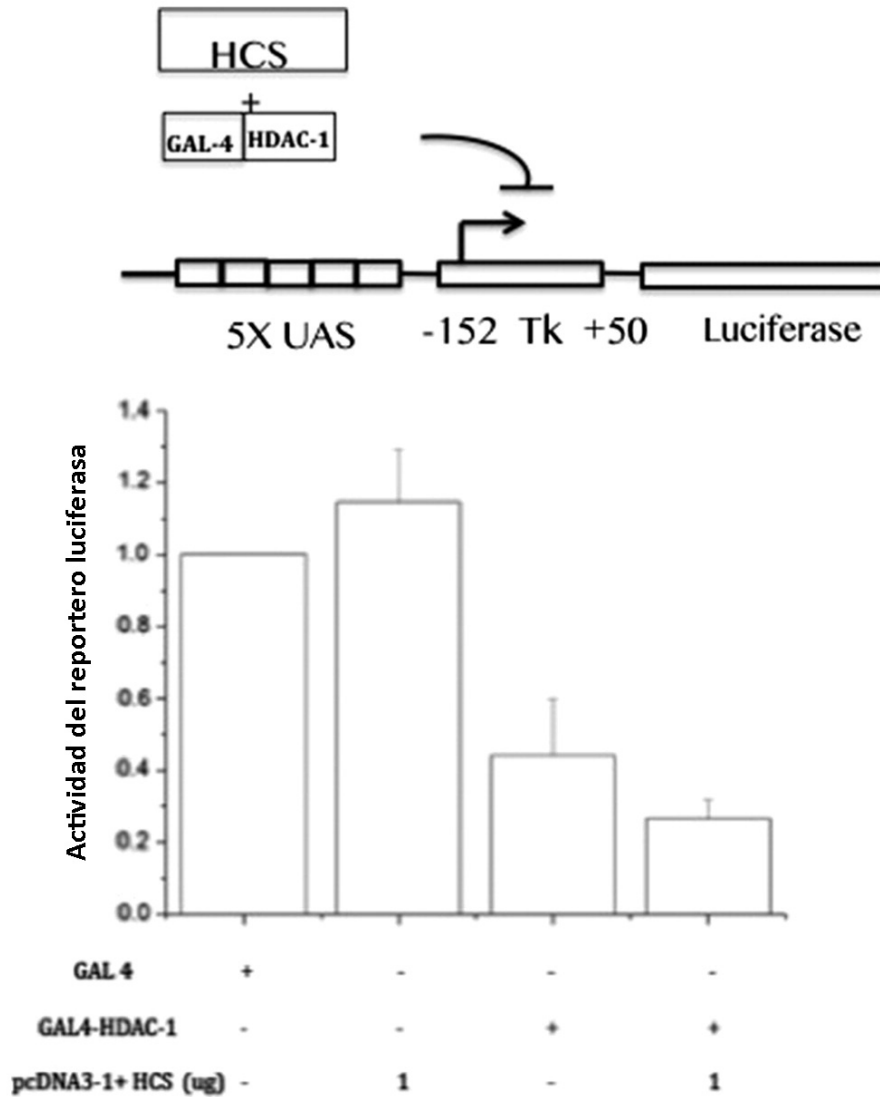


Figura 18. La HDAC1 aumenta la represión mediada por HCS. Representación esquemática del reportero 5XUAS-TK-LUC y a la HDAC1 que es expresada como una proteína de fusión con el dominio de unión a GAL4. En la parte inferior de la figura se observa el resultado de la transfección de células HepG2 GAL-4, GAL4-HDAC1 ó pcDNA 3.1 HCS, todas fueron transfectadas con el reportero que contiene los UAS. Los ensayos fueron realizados por triplicado y representan el promedio con el error estándar (\pm SE). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$)

VII. La actividad de represión de la holocarboxilasa sintetasa no requiere de su actividad catalítica de ligasa de biotina.

Una pregunta que quedaba abierta a lo largo de nuestra investigación, fue si la actividad de proteína ligasa de biotina que tiene la HCS, era necesaria para llevar a cabo su función de represor transcripcional.

Para abordar este cuestionamiento decidimos introducir mutaciones en el sitio activo de la enzima. Las mutaciones que escogimos habían sido reportadas para pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas, padecimiento que fue abordado en el primer capítulo de esta tesis. Por medio de mutagénesis dirigida y usando como templado la construcción GAL4-HCS, decidimos cambiar una glicina en la posición 581 por una serina (Gly581Ser) y una delección del aminoácido treonina en la posición 610 (delThr610). Ambas mutaciones reducen la afinidad de la enzima por biotina 45 y 3 veces, respectivamente. Estas mutaciones fueron corroboradas por secuenciación.

Después de introducir las mutaciones decidimos corroborar que la enzima no uniera biotina y para eso usamos dos estrategias experimentales. La primera, los cDNA de HCS con las mutaciones, fueron subclonados en el vector de expresión bacteriana pGEX-HCS y se transformaron en la cepa BirA104, esta es una cepa termosensible que en un medio bajo en biotina es capaz de crecer a 30°C pero que a 42°C no es capaz de formar colonias. Las bacterias de la cepa BirA104 transformadas con la HCS silvestre, fueron capaces de formar colonias en ambas temperaturas, 30°C y a 42°C. Estos resultados indicaron que la HCS silvestre es capaz de complementar el fenotipo para la cepa termosensible BirA104. Por otro lado las bacterias transformadas con las mutaciones en HCS, crecieron únicamente a 30°C y no formaron colonias a 42°C, lo cual indicaba que las mutaciones en el sitio activo de la HCS no eran capaces de complementar el fenotipo (Fig. 19). Posteriormente, quisimos comprobar que las proteínas HCS con las mutaciones no fueran capaces de biotinilar. Para esto utilizamos nuevamente a la cepa BirA104 y evaluamos su capacidad de biotinilar a una subunidad de la ACC denominada BCCP. Cuando BirA104 no era transformada con ningún plásmido incorporaba [³H]

biotina a la subunidad BCCP solo a 30°C y no a 42°C. Al transformar las células con la HCS silvestre, las células pudieron biotinar a ambas temperaturas. En el caso de las células transformadas con las mutantes Gly581Ser y delThr610 se observó el comportamiento esperado: éstas no fueron capaces de biotinar a 42°C. De esta manera confirmamos que las mutaciones que introdujimos en HCS afectaban su actividad de proteína ligasa de biotina (Fig. 19).

Habiendo comprobado esto, utilizamos nuevamente el sistema heterólogo y transfectamos células HepG2. La HCS silvestre reprimió la actividad transcripcional del reportero, lo cual concuerda con los experimentos previos, mientras que ambas mutantes reprimieron la transcripción de la expresión de luciferasa, sin diferencias significativas con respecto a la HCS silvestre (Fig. 20). Estos resultados nos sugieren que la actividad de proteína ligasa de biotina de la HCS, no es requerida para actuar como un represor transcripcional en el sistema heterólogo.

En conjunto con estos resultados, demostramos que la HCS es capaz de reprimir la actividad del reportero luciferasa en un sistema heterólogo. Este efecto era revertido al inhibir la actividad enzimática de desacetilasas de histonas y además demostramos que la HCS interactúa con estas enzimas en el núcleo celular. Además demostramos que la actividad de proteína ligasa de biotina de esta enzima, no es necesaria para llevar a cabo su función de represión transcripcional.

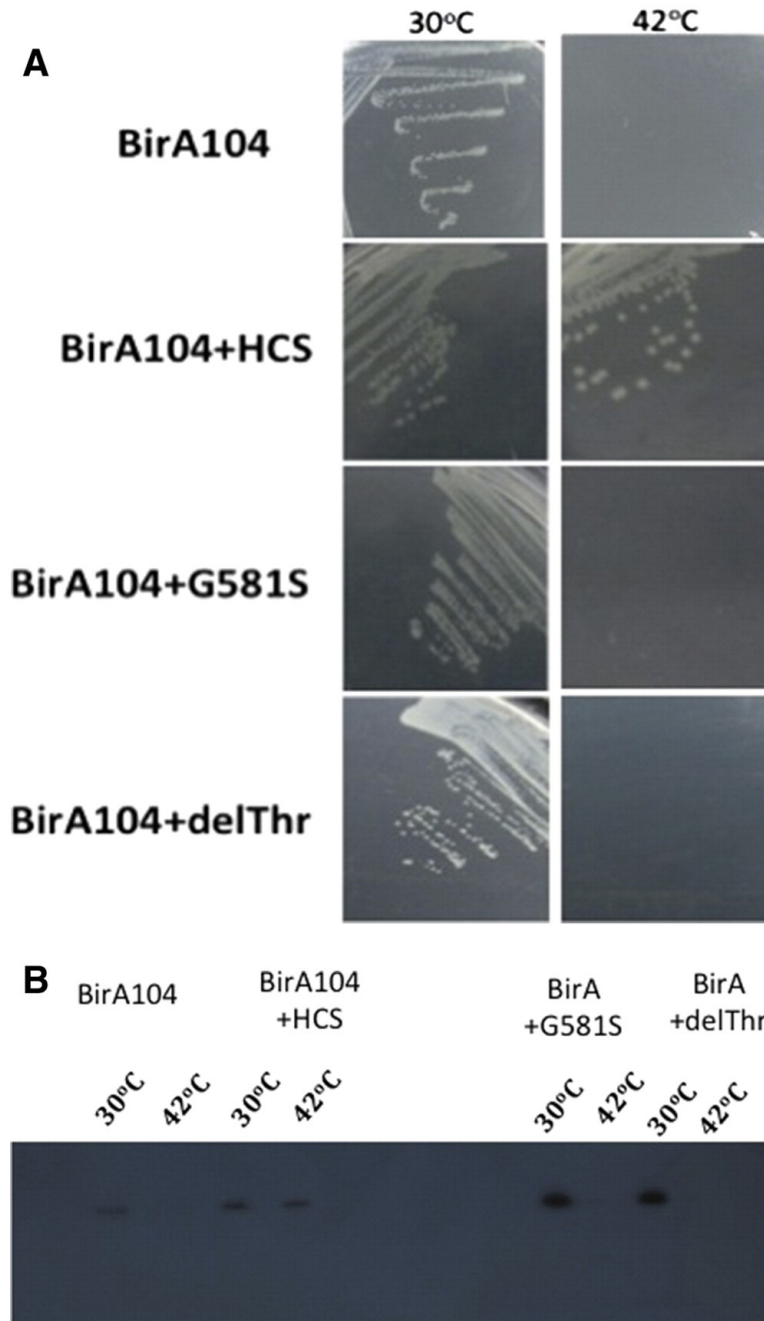


Figura 19. Caracterización funcional de las mutaciones en HCS. *Panel superior (A).* Complementación de la cepa de *E. coli*, BirA104 con HCS silvestre y mutaciones. En el panel superior se observa el comportamiento de la cepa BirA104 a 30°C y a 42°C. Cuando se complementa con la HCS silvestre es capaz de formar colonias a 30°C y a 42°C, mientras que al realizar la complementación con las mutaciones en el sitio catalítico de HCS, la cepa BirA104 solo forma colonias a 30°C y no a 42°C. *Panel inferior(B).* Autoradiografía de la incorporación de [³H] biotina por BirA104 a la subunidad BCCP, se observa el comportamiento normal de la cepa, la complementación con HCS, y las mutaciones que a 42°C no fueron capaces de biotinilar.

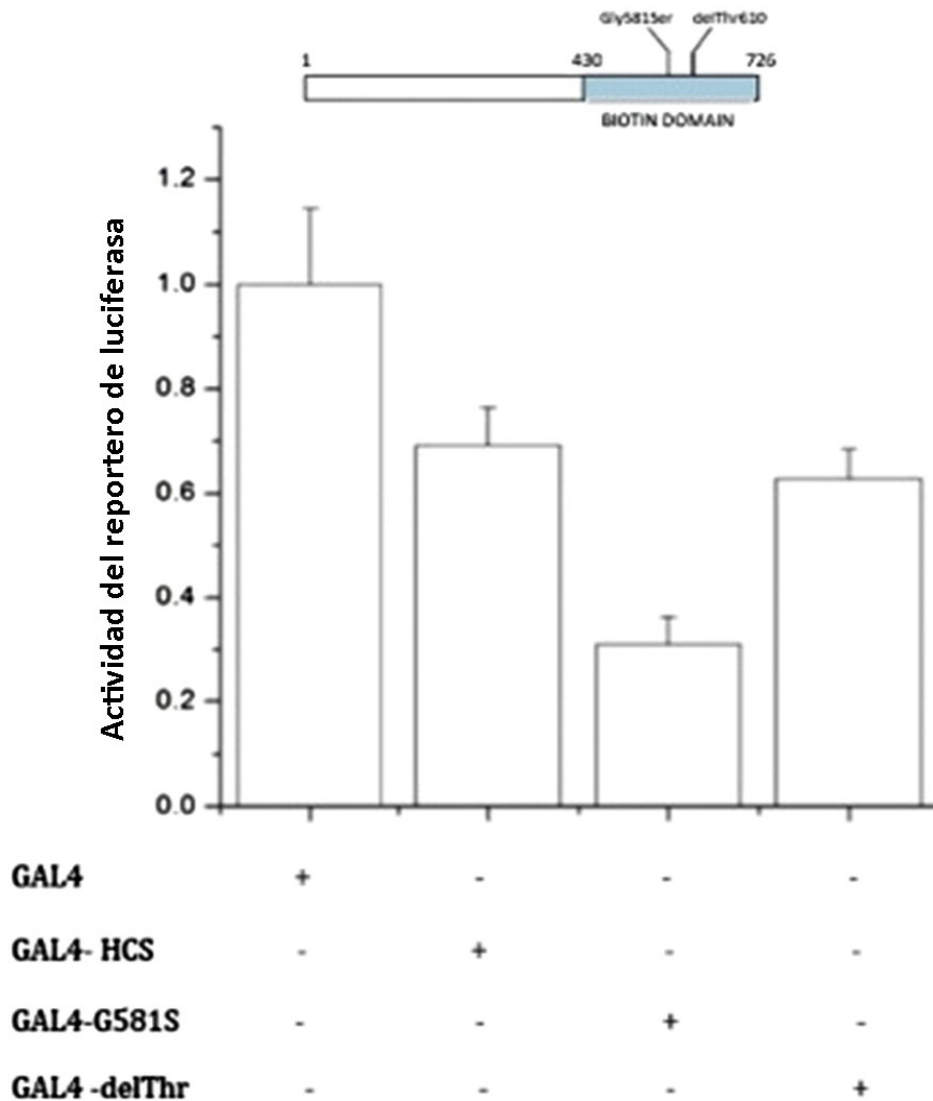


Figura 20. Las mutaciones en HCS Gly581Ser y delThr610 mantienen la actividad de corepresor transcripcional. En la parte superior del panel se observa la representación esquemática del sitio activo donde se realizaron las mutaciones en GAL4-HCS. En la parte inferior del panel se observa el resultado de la transfección de células HepG2 GAL-4, GAL4-HCS, GAL4-G581s ó GAL4-delThr. Todas fueron transfectadas con el reportero que contiene los UAS. Los ensayos fueron realizados por triplicado y representan el promedio con el error estándar (\pm SE). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Discusión

La holocarboxilasa sintetasa es la enzima encargada de unir biotina a 5 carboxilasas en humanos activándolas para que lleven a cabo su función en distintas vías metabólicas. Ha sido demostrado que además la HCS participa en un paso fundamental en la vía citoplasmática de transducción de señales HCS-GCs-GMPc-PKG. La PKG migra hacia el núcleo y fosforila factores de transcripción regulando así la expresión de genes, entre ellos los del ciclo de utilización de biotina.

En años recientes se reportó que la holocarboxilasa sintetasa no estaba únicamente en el citoplasma de la célula ya que se observó por medio de inmunofluorescencia que se encontraba en el núcleo. Con los avances en el campo de investigación, acerca de la organización nuclear y su relación con la regulación transcripcional, nuestro grupo pudo generar la primera hipótesis respecto al papel de la HCS en este compartimento celular.

El hallazgo del grupo de Roy Gravel reportó que la HCS está asociada a la lámina B nuclear. Se sabe que esta lámina forma parte de la lámina nuclear (NL) que se encuentra en la periferia del núcleo y que es en esta zona donde se distribuyen regiones de DNA ancladas que están bajo represión transcripcional. En esta misma zona se ha observado que está la cromatina electrónica densa o heterocromatina la cual se caracteriza por no estar transcripcionalmente activa.

Con estos antecedentes nuestra hipótesis sugiere que la HCS tiene una función represora a nivel transcripcional, esto fue indagado en *Drosophila melanogaster*, en donde reportamos que la HCS se asocia a la cromatina y que además colocalizaba con la marca de represión transcripcional en la histona H3K9me3.

Además en este mismo modelo probamos un gen inducible por choque térmico, el gen *HSP70*, donde se observó que la HCS estaba presente en el promotor cuando no estaba siendo transcrito y al inducir su transcripción con calor, la HCS ya no se encontraba posicionada sobre el promotor, sugiriendo que podría estar asociada a eventos de represión transcripcional (Reyes-Carmona et al., 2011).

Estos hallazgos marcaron la pauta para el planteamiento de este proyecto de investigación. Nos preguntamos si la HCS estaba asociada a eventos de represión en células humanas y además intentar disectar a qué proteínas se estaba asociando la HCS. Este último punto era clave para nuestro estudio, debido a que la HCS no tiene dominio de unión a DNA como lo tiene su homólogo en procariontes BirA. Así que HCS debía estar asociando a otras proteínas y formar juntas un complejo de represión transcripcional.

Con esta premisa propusimos generar una proteína quimérica, en la cual se fusionó el dominio de unión a DNA de levadura GAL4 a HCS. De esta manera solo reconocería al reportero que cotrasfectáramos en células HepG2, que contenía los UAS. Lo que observamos fue una disminución de la actividad transcripcional hasta del 50% en la actividad del reportero de luciferasa, esto sugería que la HCS en el núcleo de células humanas, estaba asociada a eventos de represión transcripcional.

Tomando en cuenta que los genes que se encuentran bajo represión transcripcional están asociados con histonas hipoacetiladas (Li & Arnosti, 2011), pensamos que este mecanismo general podía estar asociado también a HCS por lo cual buscamos si existía interacción con desacetilasas de histonas. Mediante ensayos de interacción *in vitro* y ensayos de coimmunoprecipitación en extractos nucleares, corroboramos que la HCS era capaz de interactuar con HDAC1, HDAC2 y HDAC7.

Estas enzimas se encuentran en complejos represores como Sin3, RBap48 y NCoR por mencionar algunos, los cuáles son reclutados a promotores de genes para ser reprimidos (Peinado, et al., 2008). Además pudimos probar en el sistema heterólogo que la interacción entre HCS y HDAC1 tiene un efecto funcional ya que al cotransfectar ambas proteínas encontramos que existía un efecto aditivo de represión mediado por ambas proteínas.

Es importante mencionar que no necesariamente las marcas de represión observadas en *D. melanogaster* serán las mismas que recluten al complejo en células humanas, sin embargo está ampliamente reportado que las marcas en las histonas que se pueden asociar a represión son la H3K9me, H3K9me_{2/3} y la H4K20me₃. Aunado a esto recientemente se publicó que en *Arabidopsis thaliana*, la HCS se encontraba asociada a la histona 3 (H3) (Chen, et al; 2013).

Por ello estos antecedentes nos permiten especular con la posibilidad de que sean las marcas H3K27me₉ o H3K9me₃ las que recluten al complejo represor de la transcripción que contiene a las HDACs y a la HCS, a los promotores de los genes blanco.

Otros grupos de investigación habían propuesto que el papel de la HCS en el núcleo está asociada a su actividad catalítica, es decir a su capacidad de unir biotina a distintos sustratos. Fue entonces propuesto que la HCS biotinilaba histonas. Esta hipótesis surgió al encontrar a la HCS asociada a cromatina y al hecho de que las regiones amino de las histonas que sobresalen de la estructura del nucleosoma tienen un alto contenido de lisinas, y son sujetas a modificaciones postraduccionales, sugiriendo que las lisinas eran biotiniladas y formaban parte del mecanismo regulatorio denominado código de histonas.

Sin embargo muchas dudas surgieron alrededor de esta propuesta, la primera era una fundamental, ¿qué enzima removía las marcas de biotinilación de las histonas?, por lo cual esta propuesta ha sido controvertida y en ciertos casos poco apoyada.

Es bien sabido que dos grupos de enzimas con actividades catalíticas distintas son las que llevan a cabo la modificación postraducciona de las histonas, por ejemplo la acetilación por acetilasas de histonas (HATs) que genera una cromatina más permisiva para la transcripción, coloca marcas que después son retiradas por desacetilasas de histonas (HDACs). Otras enzimas que llevan a cabo modificaciones en las histonas, son cinasas y fostatasas, que producen fosforilaciones y desfosforilaciones a las histonas.

Fue entonces que se propuso a la biotinidasa como la enzima que retiraba la marca de biotinilación (Ballard et al., 2002) esto por observaciones *in vitro*, sin tomar en cuenta que esta enzima no ha sido localizada en el núcleo celular. El hecho de que la biotinilación de histonas solo ocurriera *in vitro* y de manera no enzimática y que no fuera posible detectarla en células *in vivo* llevó a plantear que la biotinilación no era una modificación natural de las histonas (Healy, et al; 2009; Healy & Perez-Cadahia., 2009).

En este contexto de antecedentes, decidimos probar sí la actividad catalítica de la HCS era requerida para su efecto de represor transcripcional. Para esto introdujimos por mutagénesis dirigida un par de cambios en los aminoácidos G581S y delThr610, ambos en el sitio activo de la enzima. Las mutaciones fueron reportadas en pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas, en el caso de la G581S aumenta 45 veces la Km por biotina, mientras que la elThr610 la aumenta 3 veces. El resultado que obtuvimos fue que las mutaciones en el sitio activo de la enzima no afectan su actividad de corepresor transcripcional sobre el reportero. Esto podría explicar de alguna manera por qué los pacientes que tienen MCD, solamente presentan un cuadro de afecciones a nivel bioquímico que puede ser explicado con la falta de funcionamiento de las carboxilasas.

Esta contribución de nuestro trabajo es de suma relevancia dada la controversia que se encontraba en el campo de investigación de HCS, sin embargo hay algo que no podemos descartar y que hasta ahora no tenemos respuesta ¿HCS necesita al producto intermediario adenilato de biotina para entrar al núcleo? y otro cuestionamiento que se

puede abordar en este punto es ¿cuál es el mecanismo particular que lleva a la HCS al núcleo?

Otro de los debates a los que nos enfrentamos al someter a la crítica nuestros resultados, fue el cómo es que una enzima que tiene un papel clave en el metabolismo pueda tener una función en el núcleo tan distinta y además sin requerir de su actividad catalítica, sin embargo esta característica de doble función es ampliamente reconocida en la naturaleza y justamente algunas proteínas que la llevan a cabo son enzimas metabólicas.

Las características de estas enzimas bifuncionales o *moonlighting proteins*, es que las dos funciones que realizan no se encuentran relacionadas entre si. Quedan excluidas las proteínas que son homólogas o las que tienen actividad enzimática promiscua. Tampoco entran en esta categoría enzimas que llevan a cabo la misma función en distintos tipos celulares o la misma función en distintos compartimentos celulares. (Jeffery, 2009)

Así pues la HCS cumple con estas características al tener una doble función: una en citoplasma asociada a su actividad catalítica y otra en el núcleo donde nosotros demostramos que mutaciones en su sitio activo no genera un cambio en su actividad de corepresor transcripcional. Otra de las características de proteínas bifuncionales y que cumple la HCS, es que el cambio entre una función y otra puede estar dada con la formación de complejos proteicos y la evidencia que tenemos hasta ahora incluye al menos a las HDACs y a otras proteínas que forman parte de complejos corepresores (Ver anexo I). Un ejemplo cercano al comportamiento específico de HCS, es la enzima hRoDh-E2, una enzima deshidrogenasa cuya función fue caracterizada en el citoplasma y que recientemente fue reportada como un represor transcripcional en el núcleo celular.

hRoDh-E2 tampoco tiene dominio de unión a DNA por lo que su función de impedir la unión del factor de transcripción Sp1, la lleva a cabo mediante su asociación con un complejo protéico que desacetila histonas. Esta enzima también fue mutada en su sitio activo y mantuvo su función como corepresor transcripcional. De acuerdo a la evidencia que presentamos proponemos que la HCS es una enzima bifuncional o moonlighting protein, que actúa como un corepresor transcripcional en el núcleo de células humanas asociándose a desacetilasas de histonas. (Fig. 21)

Consideramos importante realizar estudios con la proteína HCS endógena para validar que estas interacciones proteína-proteína con las desacetilasas de histonas, ocurren de la misma manera en el contexto de cromatina. Además nuestro grupo de investigación se encuentra en la búsqueda y validación de interacción de HCS con factores de transcripción que sean los que la lleven al DNA. (Ver Anexo)

Las aportaciones puntuales de este trabajo son:

- La holocarboxilasa sintetasa actúa como un corepresor transcripcional en células humanas.
- Holocarboxilasa sintetasa interactúa con desacetilasas de histonas para llevar a cabo esta función.
- La actividad de proteína ligasa de biotina no es requerido para la represión transcripcional.

Perspectivas

Algunos de los cuestionamientos que queda por abordar es ¿cuáles son las proteínas a las que se asocia HCS en el núcleo celular?

Lo anterior se desprende porque ha sido reportado que el reclutamiento de desacetilasas de histonas a una secuencia específica en el DNA (por proteínas represoras que sí tienen dominio de unión a DNA), tiene un óptimo efecto al encontrarse en contexto con el complejo multiproteico que incluso pueden contener dentro de él a proteínas con actividad redundante (Li & Arnosti, 2011). Parte de ese planteamiento ha comenzado a ser abordado por nuestro grupo de investigación y hemos logrado aislar al menos 10 proteínas que forman parte de complejos represores y que se encuentran asociadas a HCS (ver anexo I). Una de ellas es la proteína de unión a Max o MNT. Esta proteína forma parte de complejos corepresores y ha sido probado que interactúa con el represor Sin3, el cual forma parte de un complejo que incluye a desacetilasas de histonas 1 y 2 (HDAC-1 y HDAC-2) (Peinado et al., 2004). Esto nos da una idea de cuáles son los posibles genes que se encuentran bajo represión transcripcional por el complejo que contiene a HCS, es decir los blancos de myc, debido a que es la formación del complejo Myc:Max:Mnt el que reprime la transcripción al reconocer la secuencia conocida como E-box (CACGTG) (Hurlin, et al; 1997).

Por lo anterior proponemos como perspectiva de esta línea de investigación un par de estrategias: la primera realizar inmunoprecipitación de la cromatina en plásmido que contenga la secuencia E-box (CACGTG) para explorar si la HCS es reclutada a este promotor.

La segunda estrategia que proponemos es la de realizar un estudio masivo en cual se inmunoprecipite a la HCS unida a cromatina para secuenciar los promotores a los que se encuentra unido (ChIP-seq). Esto permitiría no sólo centrarnos en un complejo proteico, sino tener una panorama amplio en posibilidades en cuanto a los promotores a los que está unido la HCS. Es decir saber si participa de manera muy particular de ciertos genes o tal vez forma parte de un mecanismo general de represión transcripcional.

ANEXOS

ANEXO I

Identificación de proteínas nucleares que interactúan con la holocarboxilasa sintetasa.

En este primer anexo se presenta la información referente experimentos que se llevaron a cabo para identificar proteínas que se asocian a HCS en el núcleo celular. Con la estrategia experimental que aquí ampliaré, nos fue posible detectar al menos 10 proteínas que se asocian a HCS durante eventos de represión transcripcional. Además vierto aquí la información de algunas de ellas que nos parecieron las más relevantes para su estudio.

Con la caracterización de una de estas proteínas (Max-Binding Protein) el alumno Mario Román se graduó como biólogo por la Universidad Autónoma Metropolitana.

Identificación de proteínas que interactúan con la enzima Holocarboxilasas sintetasa en el núcleo celular.

La represión transcripcional está dada por complejos multiprotéicos compuestos por diferentes proteínas, cada una de estas tiene funciones específicas, tales como andamiaje, proteínas de unión a DNA, proteínas de unión a enhancers, remodelamiento de la cromatina, etc.

Al demostrarse que la HCS está en el núcleo de células humanas (Bailey et al., 2010) y que está asociada a eventos de represión transcripcional (Trujillo-Gonzalez et al., 2014) nos propusimos identificar a que otras proteínas además de desacetilasas de histonas se encuentra en asociación con HCS. Identificar proteínas que interactúen con la HCS en el núcleo nos permitirá caracterizar si esta forma parte de algún complejo represor y aún más importante: ¿cuáles son los genes que son regulados por este complejo? Esto incluso permitiría indagar cuáles son los genes que están regulados negativamente por el complejo que contiene a la HCS, bajo qué mecanismo funcionan y estos datos sin duda ampliarían nuestro conocimiento acerca de la regulación transcripcional de la HCS como corepresor.

Para esto decidimos realizar un ensayo de captura usando células HepG2. Se cultivaron las células para obtener al menos 5mg de proteína nuclear, a la cual se agregó la proteína de fusión GST-HCS. Después de 3 horas de interacción se realizaron lavados exhaustivos para eliminar interacciones inespecíficas.

Para el análisis de las proteínas purificadas se corrieron en un gel PAGE-SDS 8%, este se tiñó con azul de Coomassie de alto brillo y se cortaron cada una de las bandas. Las proteínas se digirieron con tripsina para finalmente ser analizadas por LC/ESI-MS/MS. Esta técnica nos permitió identificar la secuencia primaria de cada uno de los péptidos.

Todos estos pasos fueron realizados con todos los cuidados necesarios para evitar contaminación por proteínas inespecíficas.

Las proteínas obtenidas del ensayo de captura, fueron:

- Max-binding protein (MNT)
- Retinoblastoma binding protein (RBP2 ó Jarid1A)
- histona H2A.2,
- Lamina B1
- protocaderina LKC
- p600.

Con la primera proteína que decidimos empezar nuestra investigación fue con la proteína de unión a Max, debido a su característica de factor de transcripción y su asociación a represión transcripcional.

Proteína de unión a Max y holocarboxilasa sintetasa.

La proteína de unión a Max, fue encontrada al realizar una búsqueda de proteínas que se unen a Max. Max es una proteína que se caracteriza por formar heterodímeros que se unen a secuencias específicas en el DNA. El heterodímero Myc:Max forma parte de un complejo de represión transcripcional mientras que el heterodímero Mad:Max actúa como un represor transcripcional. Se ha observado que este complejo represor tiene como consecuencia biológica un efecto antiproliferativo. La proteína de unión a Max o Mnt, forma heterodímero con Max (Mnt:Max) actuando como un muy eficiente represor transcripcional de los genes responsivos a Myc. (Hurlin, et al; 1997)

Ha sido probado que Mnt interactúa con el represor Sin3, el cual las deacetilasas de histonas 1 y 2 (HDAC1 y HDAC2) forman parte. (Lai, et al., 2001)

El hecho de que en el ensayo de captura hayamos encontrado a Mnt y que esta proteína forme parte de un complejo que contiene HDACs que ya han sido corroboradas como proteínas que interactúan con HCS, nos propusimos investigar si MNT y HDAC forman parte del mismo complejo. Para lo anterior lo primero que se realizó fue una coimmunoprecipitación en células HEPG2 transfectadas con pcDNA3.1+HCS y pcDNA-HA-MNT. Se obtuvieron extractos totales y se usó un

anticuerpo anti HA para inmunoprecipitar a MNT, los resultados que obtuvimos fueron que en contexto celular estas proteínas interactúan (Fig. 22).

Posteriormente transfectamos en células HepG2 a GAL4 vacío como control y la construcción GAL4-HCS, además incluimos a la MNT en el vector pcDNA3, en el cual se expresa la proteína sin dominio de unión a DNA y por lo tanto no reconoce los UAS del reportero. Cuando evaluamos el efecto de HCS observamos una represión de aproximadamente 60%, mientras que la transfección de pcDNA3-MNT no tuvo un efecto sobre la transcripción. Sin embargo al cotransfectar a la HCS con concentraciones crecientes de MNT (1 μ g) observamos una represión del 50% dependiente del aumento de la concentración. Estos resultados sugieren que la represión mediada por HCS es aumentada con la presencia de la MNT (Fig.23).

Con estos resultados proponemos que la HCS y la MNT forman parte de un complejo represor que contine a HDACs y que reprimen la transcripción de genes regulados a Myc. Proponemos que al conocer la secuencias unión de este heterodímero (MAX:MNT) se realicen ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), para corroborar que la HCS se encuentra en los promotores de genes regulados por Myc:MAX:MNT.

Esto permitirá ampliar nuestro conocimiento sobre los genes regulados por este complejo y además permitirá determinar que papel juega la HCS dentro de este complejo represor.

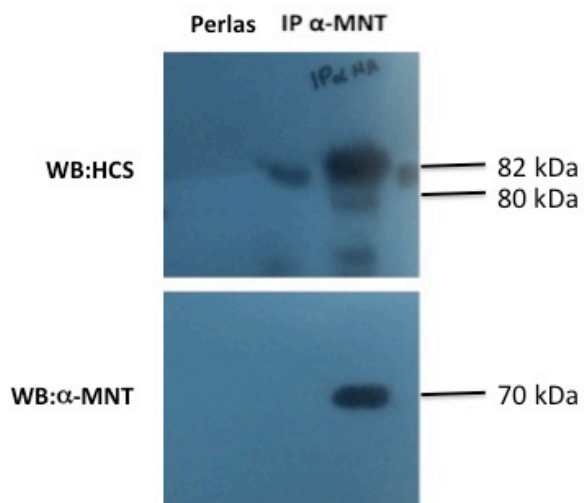


Fig. 22 HCS interactúa con MNT en células HepG2. Las células fueron transfectadas con HA-MNT. De extractos totales se inmunoprecipitó a las MNT mediante el epítotope HA, se corrió un gel de proteína, se transfirió y se realizó la inmunodetección anti-HCS (Geles superiores). La presencia de HA-MNT fue confirmada por análisis de Western blot con un anticuerpo anti-flag (geles inferiores)

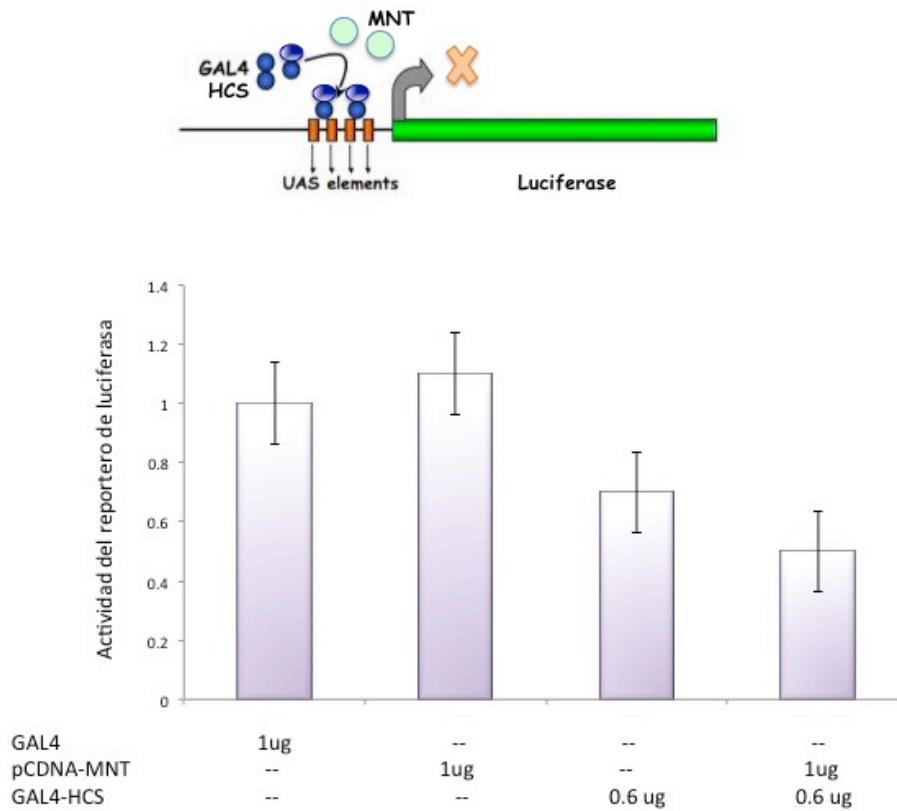


Figura. 23 La MNT aumenta la represión mediada por HCS. Resultado de la transfección de células HepG2 GAL-4, GAL4-HCS ó pCDNA3-MNT, todas fueron transfectadas con el reportero que contiene los UAS. Los ensayos fueron realizados por triplicado y representan el promedio con el error estándar (\pm SE). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$).

El papel de la Holocarboxilasa sintetasa en el metabolismo intermediario ha sido ampliamente descrito. En años recientes, investigaciones de diversos grupos reportaron la presencia de la HCS en el núcleo. Han surgido diferentes propuestas alrededor de la función que esta enzima pudiera tener. En el presente trabajo se demuestra que la HCS es un corepresor transcripcional que forma parte de un complejo proteico que contiene a la desacetilasas de histonas. En datos que obtuvimos de espectrometría de masas, la lámina B se encuentra asociada a HCS; este hallazgo ya había sido reportado por el grupo del Dr. Roy Gravel (Narang, et al; 2004). En este mismo ensayo obtuvimos al factor de transcripción Max-Binding-protein, el cual fue corroborado por otras metodologías. Esto último abre el panorama para la búsqueda de genes endógenos que sean regulados por este complejo.

Durante la realización de esta tesis se publicó un artículo del grupo del Dr. Janos Zemleni, en donde corroboran lo reportado por nuestro grupo: la HCS se encuentra asociada a desacetilasas de histonas. Además reporta que la HCS interactúa con la proteína N-CoR, esta última tiene una función de andamiaje que es fundamental para el ensamblaje del complejo de represión transcripcional.

Con nuestros hallazgos y los de otros grupos de investigación, proponemos que la HCS es parte de un complejo de represión transcripcional representada por el modelo siguiente:

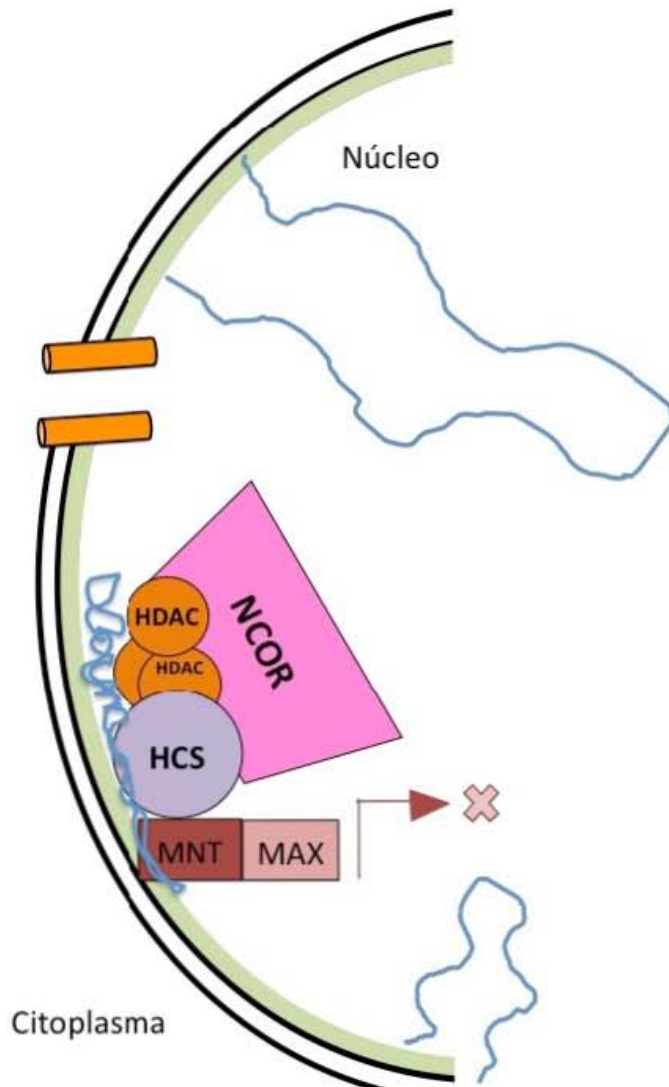


Figura 21. Representación gráfica del modelo propuesto de represión transcripcional en el que participa la holocarboxilasa sintetasa.

ANEXO II

Metodología.

(Protocolos ampliados)

I. Cultivo celular

Medio de cultivo 10% FBS (Estreptomicina-Penicilina)

Preparación para un litro de α -MEM

A 900 ml de agua bidestilada esterilizada, se le agrega un sobre de α -MEM.

NaHCO ₃	2.2 gramos/litro
Piruvato Sodio	0.1 gramos/litro

Ajustar pH. 7.3

Suero fetal bovino

Inactivar la alícuota de suero fetal bovino, a 70°C , durante 20 minutos y agregar al medio.

Trasfecciones con Lipofectamina 2000

- Para transfectar DNA por lipofección se requiere crecer las células al 80% de confluencia en un plato de 6 pozos, (six-well). Dos horas antes de la transfección cambiar el medio en el que se están creciendo las células y agregar 800µL de OPTI-MEM (sin suero, ni antibiótico).
- Se coloca en un tubo eppendorf 100 µL de OPTI-MEM y se agregan los plásmidos a la concentración de DNA que se haya estandarizado. Mezclar con vórtex. Agregar la lipofectamina para 1µg de DNA agregar 2 µL de lipofectamina. (IMPORTANTE: no poner la lipofectamina en OPTI-MEM previamente sin el DNA por más de 5 minutos)
- Incubar durante 20-25 minutos a temperatura ambiente. (No exceder 25 minutos)
- Agregar los contenidos de los tubos, después de mezclar un par de veces con la punta de la pipeta, en cada uno de los pozos como se deseé transfectar.
- Dejar los platos en la incubadora durante 4 horas
- Después de transcurrido el tiempo, lavar con PBS 2 veces y agregar el medio normal.
- Leer a las 48 horas.

Protocolo GST pull down

- Preparar precultivos de pGEX-HCS en 5 ml de LB
- Inocular un cultivo de 40 ml en medio 2xYTA con antibiótico a 30°C hasta alcanzar densidad óptica de 0.6 a 0.8 y la lectura se realiza a 600 nm.
- Inducir cultivo con 1 mM de IPTG durante la noche a temperatura ambiente, en agitación a 2500rpm
- Colectar las bacterias en tubos falcon estériles de 50ml y centrifugar a 3000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Lavar las células una vez con PBS 1X/PMSF sol. Sat. 1:500 (200ul:100ml). Re-suspender las bacterias en 2.5 ml de Buffer de Lisis I y pasar a tubos falcón de 15ml. Dejar lisar las células durante 15min a 4°C con movimiento rotatorio.
- Agregar 2.5ml de buffer de Lisis II mezclar bien.
- Dejar lisando las células durante 45 min a 4°C con movimiento rotatorio, sonicar hasta ver fluidez del extracto (4 pulsos de 10 sec 4 veces a una amplitud de 40).
- Hacer alícuotas en tubos eppendorff de 1.5ml y centrifugar 10 min a 4°C 15 rpm. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y almacenar a -70°C hasta su análisis. (analizar la fracción del pellet y sobrenadante en un gel SDS-PAGE 10%).
- Agregar 300 µl de perlas de proteína G agarosa, bloqueadas con BSA 1 mg/ml e incubar durante toda la noche a 4°C con movimiento rotatorio.

- Lavar las perlas 3 veces con 40ml de buffer de lavado, y analizar una fracción de las perlas (10 μ l) y el sobrenadante (20-30 μ l) en un gel SDS-PAGE 10%.
- Ensayo de interacción. Tomar 40 μ l de perlas adsorbidas con las proteínas recombinantes y colocarlas en tubos eppendorff de 1.5 ml, llevar a 350 μ l finales con PPI. Apartar un set de para el control de carga (teñir con coomassie).
- Bloquear con BSA 1mg/ml final y mezclar durante 30min a 4°C con movimiento rotatorio (3.5ul de BSA 10X/350 μ l). Agregar a las perlas bloqueadas 4 μ l de la proteína marcada. Incubar 4hr a 4°C con movimiento rotatorio.
- Bajar las perlas a 2000 rpm 3 min, y lavar 5 veces con 1.5 ml de PPI buffer.
- Dejar las perlas en un volumen de 30-40ul Agregar 15ul de buffer de carga 5x, hervir las muestras junto con el input 10% (0.4ul + 10ul de buffer de carga 5x) durante 10 min (a los 2 min mezclar con el vortex y bajar las perlas, hacer lo mismo a los 5 min y volver a hervir hasta alcanzar los 10 min.
- Bajar las muestras con un spin y cargar todo (perlas) al gel (SDS-PAGE al 8%).
- Deshidratar el gel en 20ml de solución de destañir durante 20 min, agregar 2 ml de glicerol 100% (concentración final 1%) y mezclar durante otros 10min. Secar en el Gel Dryer (Bio-Rad) durante 2 hrs a 80°C (precalentar).
- Exponer el gel en pantalla radiactiva Kodak durante 10 a 15 hrs.
- Leer la pantalla y analizar datos en el Molecular Imager FX. Quantity-One Fx, Radioisotopos, KODAK.

Buffers

2X YTA medium (1L)

- 16 g triptone
- 10 g yeast extract
- 5 g NaCl

Ajustar pH a 7.0 con NaOH

Lysis Buffer I (5ml)

-100 mM Tris pH8.0 500 µl de 1M

-1.5 mM EDTA 15 µl de 0.5M

-150 mM NaCl 150 µl de 5M

Lizosima 0.1mg/ml final

Bufen de lisis II (5ml)

-30mM trietanolamina 150 µl de 1M

-50mM NaCl 50 µl de 5M

-2mM DTT 10 µl de 1M

-0.5mM EDTA 5 µl de 0.5M

2 pastillas de inhibidores de proteasas

Buffer de dilución III (100ml)

-50mM tris pH8 5 ml de 1M

-100mM NaCl 2 ml de 5M

-0.5% triton X-100 500 µl

PMSF 1:500 200 µl sol sat

Washing Buffer IV (250ml)

-50mM tris pH8	12.5 ml de 1M
-200mM NaCl	10 ml de 5M
-1% triton X-100	2.5 ml
PMSF	500 µl sol sat

Ppi Buffer (100ml)

-20mM HePes pH8	2 ml de 0.5M
-100mM NaCl	1 ml de 5M
-1mM EDTA	100 µl de 0.5M
-4mM MgCl ₂	200 µl de 1M
-1mM DTT	50 µl de 1M
-0.02% NP-40	10 µl
-10% glycerol	5 ml de 100%
PMSF	100 µl sol sat

*** Todos los Buffers prepararlos al momento y mantenerlos en hielo**

Obtención de extracto nuclear (NCE)

Se aspira el medio y se lavan 2x con PBS frío, se aspira bien el PBS y se lisan con el siguiente buffer (4ml x plato 15cm)

Para 10 ml de buffer I

10 mM 100 uL	1 M	KCl	50 mM 500 µl	1 M	Tris pH 7.5	5mM 100 µl	0.5 M	EDTA pH 8.0
20mM 200 uL	1 M	NaF	20mM 200 µl	1 M	Beta-glicerofosfato	2mM 20 µl	1 M	Ortovanadato de sodio pH 10.0
0.1% 10 uL		NP40	1X 1 tableta mini Roche		Inhibidores de proteasas			

Incubar 10 min 4°C, y se ven al microscopio para seguir la lisis de la membrana citoplasmática y ver la liberación de núcleos, esto se ve al teñir 10uL de las células con 1 µl de azul de tripano, los núcleos se ven azules, las células intactas no. Después con cuidado se colecta el sobrenadante con los núcleos en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugan 5 min 4°C a 1000 rpm, se colecta el SN (Extracto citoplasmático) en tubos nuevos y se cuantifica la cantidad de proteínas citoplasmáticas por Bradford.

El pellet nuclear se lisa 1h 4°C en rotación con el siguiente buffer, mínimo 3 ml (1 ml por plato 15 cm)

Para 10 mL de Buffer de lisis II :

NaCl	100 mM	1 mL	1 M
KCl	10 mM	100 µl	1 M
Tris pH 7.5	50 mM	500 µl	1 M
EDTA pH 8.0	5mM	100 µl	0.5 M
NaF	20mM	200 µl	1 M
Beta-glicerofosfato	20mM	200 µl	1 M
Ortovanadato de sodio pH 10.0	2mM	20 µl	1 M
Ortovanadato de sodio pH 7.6	2mM	40 µl	0.5 M fresco
NP40	1%	100 µl	
Inhibidores de proteasas	1x	1 tableta mini Roche	

Se centrifuga 1h a 100,000 x g (28 krpm en SW 50.1) y se colecta el sobrenadante (fraccion S-100), se cuantifican las proteínas nucleares por Bradford.

Coinmunoprecipitación

- Los ensayos de co-inmunoprecipitación requirieron un par de platos de células HepG2 con confluencia del 80% y fueron transfectadas con pcDNA-HCS y pcMV3tag-HDACs, dependiendo de cual sería la interacción a evaluar. La transfección de los plásmidos fue de acuerdo al protocolo **Trasfección con lipofectamina 2000**.
- A las 48 horas de expresión de las proteínas, se removió el medio de las células, estas se lavaron con PBS 2 veces y se siguió el protocolo **Obtención de extracto nuclear**.
- La cantidad total de proteínas fue medida usando el método de Bradford con el reactivo ensayo de proteínas Bio-Rad, de acuerdo al protocolo del proveedor.
- Posteriormente, 2 mg de proteínas fue usada para la inmunoprecipitación y 80 ug fueron usados como input.
- El lisado celular se incubó con perlas de proteínas G agarosa bloqueadas por 4 horas, para reducir la inespecificidad, y se centrifugaron a 15000 rpm, 4°C por 15 minutos.
- El sobrenadante fue incubado toda la noche con el anticuerpo anti-FLAG para inmunoprecipitar las deacetilasas de histonas correspondientes y con 30ul de perlas de proteína G agarosa, bloqueadas.
- Se dejó a rotación durante al menos 4 horas hasta toda la noche, a 4°C y posteriormente. la columna de agarosa fue lavada 3 veces con el buffer de lisis usado para lisar los núcleos y 2 veces con PBS e inhibidor de proteasas.
- Para eluir las proteínas inmunoprecipitadas de la columna de agarosa, esta se incubó con buffer 5x β -mercaptoetanol, para ser desnaturalizadas a 100°C por 5 minutos. Posteriormente, las proteínas eluidas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida más SDS al 8% y transferidas a una membrana de PVDF

Ensayo de complementación de la cepa de *E.coli* BirA104

- La cepa de *E. coli*, BirA104 se transforma con las construcciones de HCS o HCS-Gly581Ser o HCS-delThr610 que se encuentran en el vector pGEX.
- Las células se crecieron en placas LB-agar con 2 mM de IPTG y ampicilina. Se crecen a una temperatura dos temperaturas distintas, una permisiva de 30°C y a 42°C.
- Se observó la formación de colonias a las 24 horas.

Incorporación de ³H biotina en la subunidad BCC en la cepa de *E.coli* BirA104

- La cepa de *E. coli*, BirA104 fue transformada con las construcciones de HCS o HCS-Gly581Ser o HCS-delThr610 que se encuentran en el vector pGEX.
- Las colonias se crecen en medio LB a 30°C hasta alcanzar una DO de 0.4-0.5.
- Se induce la expresión de HCS con IPTG y se incuban con 1μL de ³H-biotina a 30°C y a 42°C por 2 horas.
- El cultivo se centrifuga y se lava con buffer de fosfato de potasio, pH 6 y se sónica.
- Los lisados son desnaturalizados 5 minutos a 100°C y se corre una gel de acrilamida por electroforesis.
- Se secan los geles y posteriormente son expuestos en una pantalla Kodak toda la noche y analizados con el analizador FX de BIORAD

Plásmidos utilizados

PLÁSMIDO	REPORTADO EN/DONADO
PM-HCS	Trujillo-González, et al MGM.2014
GAL-4 PM	Donado por Xiang-Jiao Yang
5x-UAS-TK-LUC	Donado por Xiang-Jiao Yang
PM-HDAC	Barrios-García, et al. JBC.2014
PM-Nt-HCS	Trujillo-González, et al MGM.2014
PM-Ct-HCS	Trujillo-González, et al MGM.2014
pCMV3tag-HDAC1	Donado por Ron Evans
pCMV3tag-HDAC2	Donado por Ron Evans
pCMV3tag-HDAC3	Donado por Ron Evans
pCMV3tag-HDAC7	Donado por Ron Evans
pCMV3tag-HDAC8	Donado por Ron Evans
pcDNA3-HCS	Trujillo-González, et al MGM.2014
pcDNA3-HDAC1	Barrios-García, et al. JBC.2014
pcDNA3-HDAC2	Barrios-García, et al. JBC.2014
pcDNA3-HDAC3	Barrios-García, et al. JBC.2014
pcDNA3-HDAC7	Barrios-García, et al. JBC.2014
pcDNA3-HDAC8	Barrios-García, et al. JBC.2014
pGEX-HCS	Reyes-Carmona, et al. MGM. 2011
pGEX-HCSG581S	Trujillo-González, et al MGM.2014
pGEX-delThr610	Trujillo-González, et al MGM.2014
PM-HCSG581S	Trujillo-González, et al MGM.2014
PM-CSdel Thr610	Trujillo-González, et al MGM.2014
HA-MNT	Donado por Carrozo, R

OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS

CONTRUCCIÓN	OLIGONUCLEÓTIDO
PM-Nt-HCS (sentido)	5´AAG AAT TCA TGG AAG ATA GAC TCC ACA T
PM-Nt-HCS (antisentido)	5´AAC TCG AGG CCC TCC TGG TGA ACC TG
PM-Ct-HCS (sentido)	5´AAG AAT TCG CCT TCT CAT CAG AAC ATT TCA
PM-Ct-HCS (antisentido)	5´AAC TCG AGT TAC CGC CGT TTG GGG AGG
PM-HCSG581S* (sentido)	: 5´ AAC CAG AAC TCC GCT GAT CTT CAT GAG
PM-HCSG581S* (antisentido)	5´ CTC ATG AAG ATC AGC GGA GTT CTG GTT
PM-HCSdel Thr610* (sentido)	5´TGA TGC AGA TAG GGT TAC TGT TAG TCAC
PM-HCSdel Thr610* (antisentido)	5´GTG ACT AAC AGT AAC CCT ATC TGC ATC A

*(Para la mutagénesis dirigida se siguió el protocolo del Kit SITE DIRECTED MUTAGENESIS, Quick change)

ANEXO III

Artículos publicados y distinciones.

En este anexo adjunto los artículos publicados durante mi formación académica bajo la tutoría del Dr. Alfonso León Del Río. El primer artículo es en el que aparezco como primer autor y contiene la parte medular del trabajo aquí presentado, este artículo fue publicado en la revista *Molecular Genetics and Metabolism*. El comité editorial de la revista, distinguió nuestro artículo con el comentario editorial, debido a la relevancia de nuestros hallazgos acerca de la holocarboxilasa sintetasa en el núcleo, el comentario editorial también se encuentra adjunto.

Durante mi estancia en este laboratorio tuve la oportunidad de colaborar con otros proyectos en la línea de investigación de coreguladores del receptor de estrógenos, lo cuál me permitió aparecer como coautora en un artículo publicado en la revista *Nucleic Acid Research*. Debido a que forma parte del trabajo que realicé durante mi formación académica, anexo al final el artículo original del que soy coautora.

Bibliografía

- Bailey, L. M., Ivanov, R. A., Wallace, J. C., & Polyak, S. W. (2008). Artifacts detection of biotin on histones by streptavidin. *Analytical Biochemistry*, 373, 71–77. doi:10.1016/j.ab.2007.09.003
- Bailey, L. M., Wallace, J. C., & Polyak, S. W. (2010). Holocarboxylase synthetase: Correlation of protein localisation with biological function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 496, 45–52. doi:10.1016/j.abb.2010.01.015
- Ballard, T. D., Wolff, J., Griffin, J. B., Stanley, J. S., van Calcar, S., & Zempleni, J. (2002). Biotinidase catalyzes debiotinylation of histones. *European Journal of Nutrition*, 41, 78–84. doi:10.1007/s003940200011
- Baumgartner, E. R., & Suormala, T. (1997). Multiple carboxylase deficiency: inherited and acquired disorders of biotin metabolism. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International de Vitaminologie et de Nutrition*, 67, 377–384.
- Brown, P. H., Cronan, J. E., Gr??tli, M., & Beckett, D. (2004). The biotin repressor: Modulation of allostery by corepressor analogs. *Journal of Molecular Biology*, 337, 857–869. doi:10.1016/j.jmb.2004.01.041
- Chen, X., Chou, H.-H., & Wurtele, E. S. (2013). Holocarboxylase synthetase 1 physically interacts with histone h3 in Arabidopsis. *Scientifica*, 2013, 983501. doi:10.1155/2013/983501
- Dakshinamurti, K., & Cheah-Tan, C. (1968). Liver glucokinase of the biotin deficient rat. *Canadian Journal of Biochemistry*, 46, 75–80. doi:10.1139/o68-012
- Hassan, Y. I., & Zempleni, J. (2008). A novel, enigmatic histone modification: biotinylation of histones by holocarboxylase synthetase. *Nutrition Reviews*, 66, 721–725. doi:10.1111/j.1753-4887.2008.00127.x
- Healy, S., Heightman, T. D., Hohmann, L., Schriemer, D., & Gravel, R. A. (2009). Nonenzymatic biotinylation of histone H2A. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 18, 314–328. doi:10.1002/pro.37
- Healy, S., Perez-Cadahia, B., Jia, D., McDonald, M. K., Davie, J. R., & Gravel, R. A. (2009). Biotin is not a natural histone modification. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1789, 719–733. doi:10.1016/j.bbagr.2009.09.003
- Hiratsuka, M., Sakamoto, O., Li, X., Suzuki, Y., Aoki, Y., & Narisawa, K. (1998). Identification of holocarboxylase synthetase (HCS) proteins in human placenta.

Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1385, 165–171. doi:10.1016/S0167-4838(98)00032-6

- Hurlin, P. J., Quéva, C., & Eisenman, R. N. (1997). Mnt, a novel Max-interacting protein is coexpressed with Myc in proliferating cells and mediates repression at Myc binding sites. *Genes & Development*, 11, 44–58. doi:10.1101/gad.11.1.44
- Hurlin, P. J., Quéva, C., & Eisenman, R. N. (1997). Mnt: a novel Max-interacting protein and Myc antagonist. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 224, 115–121.
- Hymes, J., & Wolf, B. (1996). Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clinica Chimica Acta*. doi:10.1016/0009-8981(96)06396-6
- Ingaramo, M., & Beckett, D. (2009). Distinct amino termini of two human HCS isoforms influence biotin acceptor substrate recognition. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 30862–30870. doi:10.1074/jbc.M109.046201
- Jeffery, C. J. (2009). Moonlighting proteins--an update. *Molecular bioSystems*, 5, 345–350. doi:10.1039/b900658n
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)*, 293, 1074–1080. doi:10.1126/science.1063127
- Lai, A., Kennedy, B. K., Barbie, D. A., Bertos, N. R., Yang, X. J., Theberge, M. C., ... Branton, P. E. (2001). RBP1 recruits the mSIN3-histone deacetylase complex to the pocket of retinoblastoma tumor suppressor family proteins found in limited discrete regions of the nucleus at growth arrest. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 2918–2932. doi:10.1128/MCB.21.8.2918-2932.2001
- León-Del-Río, A., Leclerc, D., Akerman, B., Wakamatsu, N., & Gravel, R. A. (1995). 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 of the United States of America*, 92, 4626–4630. doi:10.1073/pnas.92.10.4626
- Li, L. M., & Arnosti, D. N. (2011). Long- and short-range transcriptional repressors induce distinct chromatin states on repressed genes. *Current Biology*, 21, 406–412. doi:10.1016/j.cub.2011.01.054
- Narang, M. A., Dumas, R., Ayer, L. M., & Gravel, R. A. (2004). Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase. *Human Molecular Genetics*, 13, 15–23. doi:10.1093/hmg/ddh006

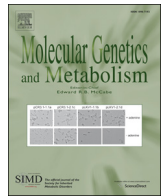
- Pacheco-Alvarez, D., Solórzano-Vargas, R. S., Gravel, R. A., Cervantes-Roldán, R., Velázquez, A., & León-Del-Río, A. (2004). Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 52312–52318. doi:10.1074/jbc.M407056200
- Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M., & Cano, A. (2004). Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 306–319. doi:10.1128/MCB.24.1.306-319.2004
- Reddy, K. L., Zullo, J. M., Bertolino, E., & Singh, H. (2008). Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature*, 452, 243–247. doi:10.1038/nature06727
- Reyes-Carmona, S., Valadéz-Graham, V., Aguilar-Fuentes, J., Zurita, M., & León-Del-Río, A. (2011). Trafficking and chromatin dynamics of holocarboxylase synthetase during development of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Genetics and Metabolism*, 103, 240–248. doi:10.1016/j.ymgme.2011.03.005
- Romero-Navarro, G., Cabrera-Valladares, G., German, M. S., Matschinsky, F. M., Velázquez, A., Wang, J., & Fernandez-Mejia, C. (1999). Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology*, 140, 4595–4600. doi:10.1210/en.140.10.4595
- Schulingkamp, R. J., Pagano, T. C., Hung, D., & Raffa, R. B. (2000). Insulin receptors and insulin action in the brain: Review and clinical implications. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. doi:10.1016/S0149-7634(00)00040-3
- Solórzano-Vargas, R. S., Pacheco-Alvarez, D., & León-Del-Río, A. (2002). 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 of the United States of America*, 99, 5325–5330. doi:10.1073/pnas.082097699
- Suzuki, Y., Aoki, Y., Ishida, Y., Chiba, Y., Iwamatsu, A., Kishino, T., ... Narisawa, K. (1994). Isolation and characterization of mutations in the human holocarboxylase synthetase cDNA. *Nature Genetics*, 8, 122–128. doi:10.1038/ng1094-122
- Suzuki, Y., Yang, X., Aoki, Y., Kure, S., & Matsubara, Y. (2005). Mutations in the holocarboxylase synthetase gene HLCS. *Human Mutation*, 26, 285–290. doi:10.1002/humu.20204

- Trujillo-Gonzalez, I., Cervantes-Roldan, R., Gonzalez-Noriega, A., Michalak, C., Reyes-Carmona, S., Barrios-Garcia, T., ... Leon-Del-Rio, A. (2014). Holocarboxylase synthetase acts as a biotin-independent transcriptional repressor interacting with HDAC1, HDAC2 and HDAC7. *Molecular Genetics and Metabolism*, 111(3), 321–330.
- Van Hove, J. L. K., Josefsberg, S., Freehauf, C., Thomas, J. A., Thuy, L. P., Barshop, B. A., ... Leon-Del-Rio, A. (2008). Management of a patient with holocarboxylase synthetase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 95, 201–205. doi:10.1016/j.ymgme.2008.09.006
- Wilson, K. P., Shewchuk, L. M., Brennan, R. G., Otsuka, A. J., & Matthews, B. W. (1992). Escherichia coli biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 9257–9261. doi:10.1073/pnas.89.19.9257
- Yang, S.C Tsai, Y. D Wen, G. Fejer, E Seto. (2002). Functional domains of histone deacetylase-3. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 9447-9454.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

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

Holocarboxylase synthetase acts as a biotin-independent transcriptional repressor interacting with HDAC1, HDAC2 and HDAC7

Isis Trujillo-Gonzalez^{a,b}, Rafael Cervantes-Roldan^{a,b}, Alfonso Gonzalez-Noriega^c, Colette Michalak^c, Sandra Reyes-Carmona^{a,b}, Tonatiuh Barrios-García^{a,b}, Ivan Meneses-Morales^{a,b}, Alfonso Leon-Del-Río^{a,b,*}

^a Programa de Investigación de Cáncer de Mama, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico

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

^c Departamento de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2013

Received in revised form 25 October 2013

Accepted 25 October 2013

Available online xxxxx

Keywords:

Holocarboxylase synthetase

Transcriptional repression

Histone deacetylases

H3K9me3

Biotin-ligase

Moonlighting enzyme

ABSTRACT

In human cells, HCS catalyzes the biotinylation of biotin-dependent carboxylases and mediates the transcriptional control of genes involved in biotin metabolism through the activation of a cGMP-dependent signal transduction pathway. HCS also targets to the cell nucleus in association with lamin-B suggesting additional gene regulatory functions. Studies from our laboratory in *Drosophila melanogaster* showed that nuclear HCS is associated with heterochromatin bands enriched with the transcriptionally repressive mark histone 3 trimethylated at lysine 9. Further, HCS was shown to be recruited to the core promoter of the transcriptionally inactive hsp70 gene suggesting that it may participate in the repression of gene expression, although the mechanism involved remained elusive. In this work, we expressed HCS as a fusion protein with the DNA-binding domain of GAL4 to evaluate its effect on the transcription of a luciferase reporter gene. We show that HCS possesses transcriptional repressor activity in HepG2 cells. The transcriptional function of HCS was shown by in vitro pull down and in vivo co-immunoprecipitation assays to depend on its interaction with the histone deacetylases HDAC1, HDAC2 and HDAC7. We show further that HCS interaction with HDACs and its function in transcriptional repression is not affected by mutations impairing its biotin-ligase activity. We propose that nuclear HCS mediates events of transcriptional repression through a biotin-independent mechanism that involves its interaction with chromatin-modifying protein complexes that include histone deacetylases.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In human cells, the enzyme holocarboxylase synthetase (HCS) catalyzes the covalent attachment of the vitamin biotin to five biotin-dependent carboxylases [1–3]. Carboxylase biotinylation occurs as a two-step, ATP-dependent, reaction that generates 5'-biotinyl-AMP as an intermediary product [2]. The relevance of HCS in maintaining metabolic homeostasis was first recognized through the study of the genetic disorder multiple carboxylase deficiency (MCD). MCD patients express a HCS protein with reduced affinity for biotin, with the Km of the mutant enzyme elevated up to 70 times over the normal enzyme [4,5]. The resulting disruption in gluconeogenesis, amino acid catabolism and fatty acid metabolism leads affected individuals to develop life treating ketoacidosis and organic acidemia that requires life-long pharmacological doses of biotin to be resolved [1,2].

Our laboratory demonstrated that HCS also participates in the transcriptional regulation of genes involved in biotin transport and metabolism [6].

Mechanistically, 5'-biotinyl-AMP activates a signal transduction cascade involving soluble guanylate cyclase (sGC) and cGMP-dependent protein kinase (PKG) [6–8]. The HCS–cGMP–PKG pathway has a seemingly paradoxical role because under conditions of biotin deficiency it reduces the expression of genes required for biotin utilization in the liver, kidney and muscle but not in the brain [7]. We proposed that this mechanism of regulation is aimed at sparing the essential function of biotin in the brain at the expense of the liver and other organs during biotin deprivation [7]. In cells from MCD patients, we found a reduced expression of genes involved in biotin utilization suggesting that some of the biochemical manifestations of the disease may be associated with down-regulation of biotin utilization in the liver because of the impaired activity of HCS.

In addition to its roles in carboxylase activation and transcriptional expression, HCS has also been found localized in the nucleus of human cells in association with the nuclear lamina [9]. Several studies have proposed that nuclear HCS could affect gene expression through histone biotinylation and modification of chromatin structure [10–13]. However, the participation of biotin in the post-translational modification of

* Corresponding author at: Programa de Investigación de Cáncer de Mama y Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico.

E-mail address: leon@biomedicas.unam.mx (A. Leon-Del-Río).

histones has been challenged [14–17]. While histone biotinylation can be observed in vitro, it does not appear to be a modification of native histones. This leaves enigmatic a role for HCS in the nucleus in the absence of its biotin ligase function.

Previously, we explored the function of HCS in the nucleus by examining its distribution and cellular trafficking in *Drosophila melanogaster* embryos [18]. We showed that HCS is a chromatin-associated protein particularly abundant in the chromocenter and heterochromatin bands of all chromosomes where it colocalizes with the repressive epigenetic mark histone 3 trimethylated at lysine 9 (H3K9me3) [18]. Using chromatin immune-precipitation (ChIP) assays, we showed that HCS is recruited to the core promoter region of the transcriptionally inactive hsp70 gene. Upon heat-shock-induced transcriptional activation, HCS is displaced and the hsp70 promoter region becomes enriched with the TFIID subunits XPD and XPB and elongating RNA pol II [18]. Based on these results, we proposed that HCS may have a role in the repression of gene expression through a mechanism involving its trafficking to the nucleus. However, the lack of a DNA binding domain in HCS suggested that its recruitment to heterochromatin domains and its putative function in gene silencing may require interaction with other cell factors.

In this work, we evaluate the effect of HCS, expressed as a fusion protein with the heterologous DNA-binding domain of GAL4, on transcription of a luciferase reporter gene. We show that HCS possesses transcriptional repressor activity in HepG2 cells. The transcriptional function of HCS was shown by in vitro pull down and in vivo co-immunoprecipitation assays to depend on its interaction with the histone deacetylases HDAC1, HDAC2 and HDAC7. We show further that HCS interaction with HDACs and its function in transcriptional repression is not affected by mutations impairing its biotin-ligase activity. We propose that nuclear HCS mediates transcriptional repression through a biotin-independent mechanism that involves its interaction with chromatin-modifying protein complexes that include histone deacetylases.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and antibodies

d-[8,9-³H]biotin (34.0 Ci/mmol) was purchased from Amersham Biosciences. Rabbit anti-HCS antibody was provided by R.A. Gravel from the University of Calgary and has been reported previously [19]. Anti-Flag antibody was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). *Escherichia coli* strain BIA104 was provided by R.A. Gravel.

2.2. Plasmids

Human full-length HCS cDNA and HDAC1 cDNA were amplified by PCR and cloned into the mammalian expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). The PM vector and the 5XUAS-Tk-LUC reporter construct used to express HCS and HDAC1 as a fusion proteins with the heterologous DNA-binding domain of GAL4 were a gift from Dr. Xiang-Jiao Yang from McGill University [20]. Flag-tagged HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC7 and HDAC8 in the mammalian expression vector pCMV-3Tag-1A were kindly provided by Ron Evans from University of California, San Diego [21]. Glutathione S-transferase (GST)-HCS full-length was generated by subcloning into glutathione S-transferase (GST) pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The sequences of all constructs were verified by DNA sequencing at LARAGEN Inc. (Culver City, CA).

2.3. Immunofluorescence microscopy studies

The subcellular localization of HCS in HepG2 cells was determined by indirect immunofluorescence microscopy. Briefly, HepG2 cells were grown on glass coverslips and fixed for 15 min with freshly prepared 2% paraformaldehyde. In the first step cells were incubated with rabbit

anti HCS antibodies. In the second step, the cells were rinsed and incubated with goat anti-rabbit Alexa 594 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). The cover slips were mounted in Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA, USA) containing DAPI to counterstain the DNA. The slides were examined using an Olympus BX51 microscope (Tokyo, Japan) equipped for epifluorescence with an UPlanAPO 100×.

2.4. Cell culture and transfection assays

HepG2 cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in α -MEM supplemented with 5% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 ug/mL streptomycin in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. HepG2 cells were transfected using lipofectamine and following the manufacturer's instructions. A typical transfection assay was performed using 1 ug of 5xUAS-TK-Luc reporter, 100 ng pCMV- β Gal (transfection control), 750 ng of GAL4-HCS, and 100–500 ng of pcDNA3.1-HDAC-1. After transfection the cells were washed and disrupted in potassium phosphate lysis buffer containing 1% Triton X-100. Luciferase and B-galactosidase activities were measured using a moonlight 3010 luminometer (Pharmingen).

2.5. GST pull-down assay

In vitro transcription and translation of HDAC proteins were done using the TNT transcription/translation system (Promega) in the presence of [³⁵S]-methionine. The GST pull-down assays were done by incubating equal amounts of GST or GST-HCS, immobilized on GST beads (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), with in vitro-translated recombinant histone deacetylases. Bound proteins were isolated by incubating the mixture for 3 h at 4 °C and then washing five times with NP40 elution buffer (20 mM Hepes pH 7.9, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.02% NP40, 10% glycerol and 0.5 mM PMSF).

2.6. Immunoprecipitations and western blots

HepG2 cells were transfected with FLAG-tagged HDACs expressed from the constructs pCMV-HDAC1, pCMV-HDAC2, pCMV-HDAC3, pCMV-HDAC7 each at 10 ug. Forty-eight hours post-transfection cells were lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.1 mM orthovanadate, 0.2% Nonidet P-40, 5% glycerol and protease inhibitor cocktail (Roche). The lysates were incubated at 4 °C, with monoclonal Flag-antibody and protein G-sepharose. Untransfected HepG2 cells (Mock) were processed as above to determine the specificity of the coimmunoprecipitation assay. Samples were washed five times in the same lysis buffer and then boiled for 10 min. Samples were analyzed by electrophoresis using an SDS 6%-polyacrylamide gel and then transferred to PVDF membranes. Western blot analysis was performed using anti-HCS antibody or anti-FLAG antibody. The proteins were visualized using a chemiluminescence detection system (Roche).

2.7. Expression of N-terminal and C-terminal fragments of HCS. Full length HCS cDNA cloned in pcDNA3.1 was used to amplify cDNA fragments encoding the N-terminal (1-430) or C-terminal (431-726) by PCR

The oligonucleotides used to amplify the N-terminal fragment were: 5'AAG AAT TCA TGG AAG ATA GAC TCC ACA T and 5'AAC TCG AGG CCC TCC TGG TGA ACC TG. Amplification of the C-terminal fragments was performed using the oligonucleotides: 5'AAG AAT TCG CCT TCT CAT CAG AAC ATT TCA and 5'AAC TCG AGT TAC CGC CGT TTG GGG AGG. The PCR products were subcloned into the GAL4. The sequence of all constructs was verified by DNA sequencing at LARAGEN Inc. (Culver City, CA).

2.8. Expression of HCS mutant proteins with reduced affinity towards biotin

HCS proteins containing the mutations Gly581Ser or delThr610 were generated by site directed mutagenesis of the HCS cDNA using the Phusion Site Directed Mutagenesis Kit and following the manufacturer's instructions. The oligonucleotides used for the Gly581Ser mutation were: 5' AAC CAG AAC TCC GCT GAT CTT CAT GAG and 5' CTC ATG AAG ATC AGC GGA GTT CTG GTT. The oligonucleotides used for the delThr610 mutation were: 5'TGA TGC AGA TAG GGT TAC TGT TAG TCAC and 5'GTG ACT AAC AGT AAC CCT ATC TGC ATC A.

2.9. Functional complementation assays in *E. coli* BirA104

To determine the biological activity of normal and mutant HCS proteins, we used a growth complementation assay in temperature sensitive *E. coli* BirA104 cells, as previously described [3]. Briefly, *E. coli* BirA104 cells were transformed with pGEX constructs expressing wild type HCS, or HCS mutant proteins Gly581Ser or delThr610. The *E. coli* cells were streaked onto LB-agar plates containing 2 mM IPTG and 100 mg/mL ampicillin and incubated at permissive temperature 30 °C or at restrictive temperature of 42 °C. In these conditions growth of the bacteria at 42 °C correlates directly with HCS biotin protein ligase activity.

2.10. 3H-biotin incorporation into biotin carboxyl carrier protein (BCCP) in *E. coli* BirA104

To evaluate the ability of normal and mutant HCS proteins to restore BCCP biotinylation in BirA104 cells, we used a radioactive assay as previously described [3]. *E. coli* BirA104 cells transformed with wild type HCS or mutant HCS constructs were grown in LB medium at

30 °C until they reached an A600 of 0.4–0.5. The expression of HCS was induced by adding 2 mM IPTG and incubating with 1 µL of 3H-biotin at 30 °C or 42 °C for 2 h. The cells were centrifuged and washed with phosphate-buffered saline and then resuspended in buffer 50 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1 mM dithiothreitol, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, followed by sonication. The lysates were denatured 5 min at 100 °C and subjected to electrophoresis on an 8% SDS-polyacrylamide gel. The gels were exposed to a Kodak trans-screen overnight and analyzed with a FX-phosphor image analyzer (BIORAD).

2.11. Statistical analysis

All experiments were performed at least by triplicate. Statistical significance of results was analyzed at 0.05 level of significance using Student's *t* test or one-way ANOVA.

3. Results

3.1. Holocarboxylase synthetase is located in the cytoplasm and nucleus of human HepG2 cells

We selected the human liver hepatocellular cell line HepG2 as experimental model based on its high HCS expression levels and because we have used them to characterize both HCS metabolic and gene expression regulatory functions [6–8]. As a first step in this study, we confirmed the presence of HCS in the nucleus of HepG2 cells by immunofluorescence microscopy. Immunostaining with anti-HCS antibody (red) showed that HCS is localized both in the cytoplasm and nucleus of HepG2 cells, but it is seemingly more abundant in the cell nucleus where it colocalizes with DAPI stained nuclear DNA (Figs. 1A–D).

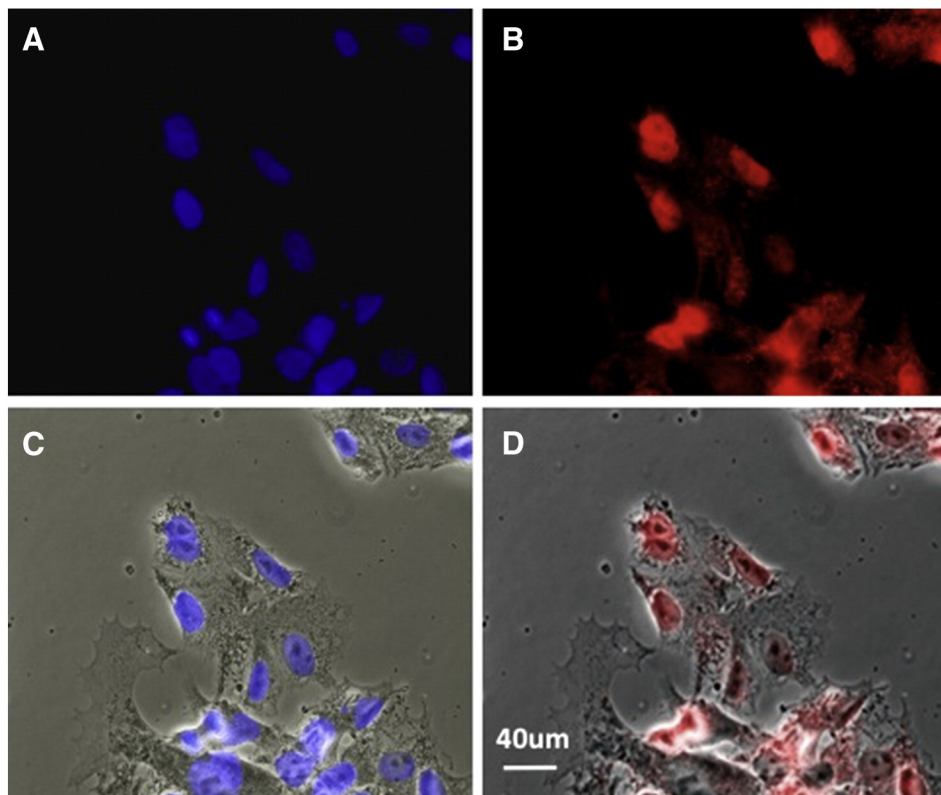


Fig. 1. Subcellular localization of HCS in HepG2 cells. (A) HepG2 cells were treated with DAPI to visualize nuclear DNA. (B) HCS was visualized using anti-HCS antibody (red) as described in the Materials and methods section. (C and D) Phase contrast image of HepG2 cells was merged with images A and B, respectively, to show localization of HCS. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.2. HCS exhibits transcriptional regulation activity

To test whether HCS possesses transcriptional activity, it was expressed as a fusion protein with the heterologous DNA-binding domain of the yeast transcription factor GAL4 (GAL4–HCS). GAL4–HCS was cotransfected into HepG2 cells with the vector 5XUAS–Tk–LUC containing the luciferase reporter gene under the control of the constitutive

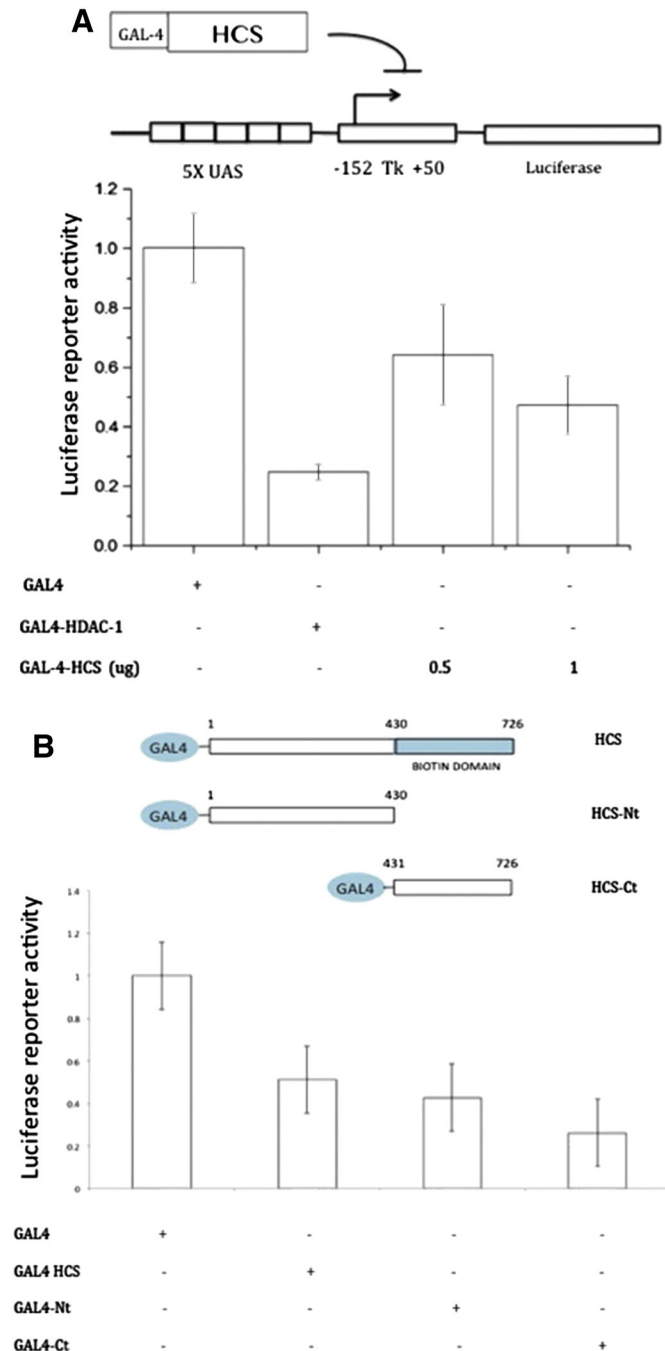


Fig. 2. HCS exhibits transcriptional repressor activity. HCS transcriptional activity was assayed using the GAL4–UAS system. (A) HepG2 cells were transfected with GAL4–HCS (shown at top), GAL4–HDAC1 or GAL4–DBD alone (GAL4), as the control, and a luciferase reporter containing a promoter with five UAS elements in tandem (5xUAS–luciferase, shown at top). Bar chart shows vector selection (+, –) at bottom, with GAL4–HCS indicated as ug vector. Luciferase activity, from three experiments assayed in triplicate, was normalized with respect to cells expressing GAL4 alone and represented as mean \pm S.E. (B) Same as in panel A, except that test is of N-terminal (GAL4–Nt) or C-terminal (GAL4–Ct) domain of HCS, shown in schematic at top with GAL4 fusion. Differences between control GAL4 and HCS constructs were shown to be statistically significant ($p < 0.05$).

Tk promoter which is located downstream of five GAL4 responsive element repeats (upstream activating sequence, UAS) (Fig. 2A, top panel). The luciferase activity of GAL4–HCS expressing cells was compared to the activity observed in control HepG2 cells transfected with the pMGal4–DBD construct expressing the GAL4–DNA-binding domain alone (GAL4). HepG2 cells were also transfected with a GAL4 construct of histone deacetylase 1 (GAL4–HDAC1) as a reference transcriptional corepressor factor. In eukaryotic cells HDAC1 promotes transcriptional repression through enzymatic histone deacetylation [22–24]. However, because HDAC1 lacks a DNA-binding domain, its catalytic activity depends on interacting with corepressor protein complexes that mediate its recruitment to chromatin. In this assay, expressing HDAC1 with a Gal4 DNA-binding domain bypassed its need to interact with a DNA-binding transcription factor. Our results showed that the presence of GAL4–HCS in HepG2 cells repressed transcription of the luciferase reporter gene in a dose-dependent manner. Transfection of 0.5 ug and 1.0 ug of the GAL4–HCS construct reduced luciferase activity by 35% and 50%, respectively, compared to HepG2 cells transfected with the control GAL4 (Fig. 2A, GAL4–HCS). Transfection of GAL4–HDAC1 into HepG2 cells reduced luciferase transcription by 75% with respect to control HepG2 cells (Fig. 2A, GAL4–HDAC1). These results suggest that the effect of HCS on transcription of the luciferase reporter gene was similar to that observed by HDAC1 transfection, acting as a transcriptional repressor.

3.3. Identification of the holocarboxylase synthetase domains involved in transcriptional repression

Functional characterization of human HCS protein has revealed that its biotin-ligase activity, responsible for apocarboxylase biotinylation, is located in a C-terminal 200 amino acid domain (Fig. 2B, top panel) which is highly conserved between eukaryotic HCS and the bacterial BirA protein [3]. The function of the HCS N-terminal region is not fully understood but it has been suggested that it participates in the recognition of the biotinylation-acceptor substrate [25]. To identify the HCS domain involved in its transcriptional activity, we expressed N-terminal (amino acids 1–430, Nt-HCS) and C-terminal (amino acids 431–726, Ct-HCS) fragments of HCS as GAL4DBD fusion proteins in HepG2 cells

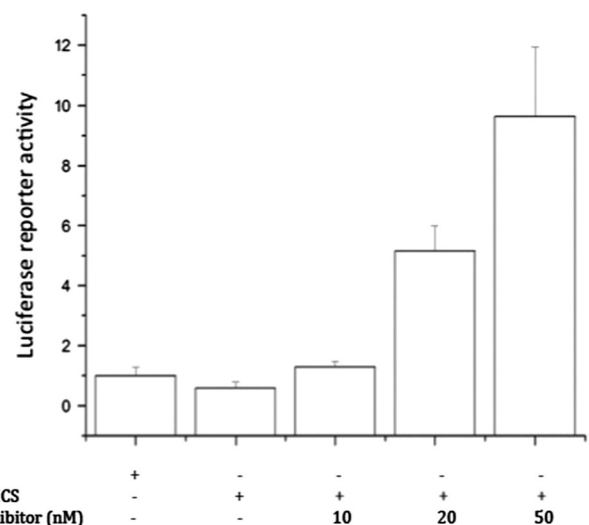


Fig. 3. Treatment of HepG2 cells with trichostatin A derepresses luciferase transcription in the presence of GAL4–HCS. HepG2 cells were transfected with Gal4–HCS or GAL4 alone as the control, without or with (at 10, 20 or 50 nM) trichostatin A, and a luciferase reporter containing a promoter with five UAS elements in tandem (5xUAS–luciferase, top panel Fig. 2A). Luciferase activity was assayed in three experiments in triplicate, and normalized with respect to cells expressing Gal4–DBD and represented as mean \pm S.E. Differences between treatments are shown to be statistically significant ($p < 0.05$).

(Fig. 2B, top panel). The transcriptional activity of the protein fragments was compared to control HepG2 cells expressing GAL4 alone or full length GAL4–HCS. The results showed that both the N-terminal and C-terminal fragments of HCS repressed luciferase expression, but the C-terminal fragment, containing the biotinylation domain, exhibited a stronger repressor activity. While expression of the HCS-Ct fragment reduced luciferase transcription by 70%, the expression of full-length HCS or its HCS-Nt fragment reduced luciferase activity by 50% and 58%, respectively (Fig. 2B).

3.4. HCS mediated transcriptional repression requires the enzymatic activity of histone deacetylases

To explore the mechanism responsible for the transcriptional repression activity of HCS, we determined whether the effect of HCS on transcription is mediated by the enzymatic activity of histone deacetylases. HepG2 cells were transfected with GAL4–HCS and the 5XUAS-LUC reporter and different concentrations of trichostatin A (TSA), a specific inhibitor of class I and class II histone deacetylases.

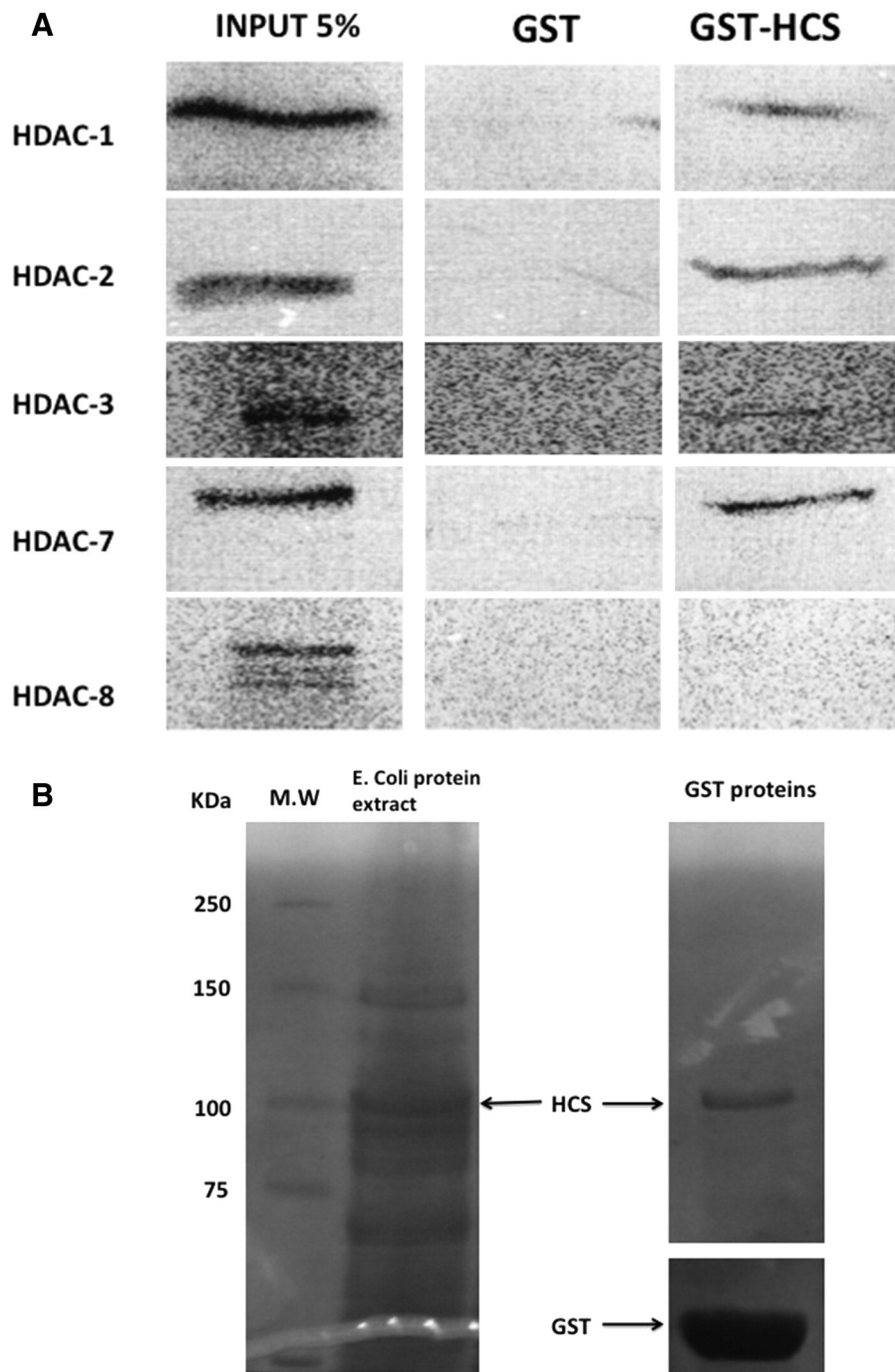


Fig. 4. In vitro interaction between HCS and histone deacetylases. (A) The interaction between HCS and different histone deacetylases was evaluated by pull-down assays. [35 S]methionine-labeled-histone deacetylases (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC7 and HDAC8, generated by in vitro transcription/translation, were resolved by PAGE following capture by GST–HCS (lane on far right) or GST (middle lane) control. Input (far left) represents 10% of the labeled HDAC used in the assay. (B) Expression and purification of GST fusion proteins. Total protein extracts from GST–HCS expressing *E. coli* cells and purified GST–HCS and control GST proteins purified using glutathione–agarose as described in the Materials and methods section were analyzed by PAGE and visualized by coomassie staining. Molecular weight markers are shown in kilodaltons (M.W.).

Incubations were for 24 h and luciferase activity was determined and normalized with respect to control HepG2 cells transfected with GAL4 alone. As before, the presence of GAL4–HCS in HepG2 cells grown in normal medium reduced luciferase transcription by 40% compared to HepG2 cells transfected with the control GAL4 construct (Fig. 3). Treatment of GAL4–HCS HepG2 cells with 0.1 μ M, 0.2 μ M, and 0.5 μ M TSA produced de-repression of luciferase transcription of about 1.2-fold, 5-fold, and 10-fold, respectively, with respect to untreated GAL4–HCS cells (Fig. 3, TSA inhibitor). Our results suggest that HCS dependent transcriptional repression is mediated by the enzymatic activity of histone deacetylases.

3.5. Holocarboxylase synthetase interacts with histone deacetylases *in vitro* and *in vivo*

Given that TSA treatment suggests that HCS-mediated transcriptional repression requires HDAC activity, we explored if HCS physically interacts with histone deacetylases. First, we performed GST-pull down assays. In these experiments we evaluated the ability of a GST–HCS fusion protein to interact with different [³⁵S]-methionine-labeled histone deacetylases, generated by *in vitro* transcription/translation, whose activities are known to be inhibited by trichostatin A (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC7 and HDAC8). Our results showed direct interaction of HCS with HDAC1, HDAC2, HDAC3 and HDAC7 (Fig. 4A, GST–HCS). In contrast, HCS failed to interact with HDAC8. Binding of HDACs was absent when they were incubated with GST alone, suggesting that the interaction between HCS and HDACs is specific (Fig. 4A, GST). Expression and purity of GST and GST–HCS proteins were evaluated by PAGE and visualized by coomassie staining (Fig. 4B).

To confirm the interaction between HCS and HDACs in HepG2 cells *in vivo*, we performed co-immunoprecipitation assays and western blot analysis using HepG2 nuclear protein extracts. FLAG-tagged HDAC1, HDAC2, HDAC3 and HDAC7 were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody and the interaction with HCS was evaluated by immunoblotting with anti-HCS antibody. As a control, 5% (0.08 g) of the nuclear extracts used in each immunoprecipitation assay were analyzed by western blot using anti-HCS to confirm the presence of the protein (Figs. 5A–C, INPUT). In nuclear protein extracts, HCS appears as an 80 kDa protein band or as a doublet of about 80 kDa and 82 kDa, with the 80 kDa band more easily detected in whole nuclear extracts. These bands correspond to the molecular weight of the two major HCS isoforms previously described in total protein extracts prepared from HepG2 cells (18). The co-immunoprecipitation assay revealed that HCS interacts with HDAC1, HDAC2 and HDAC7 (Figs. 5A–C, IP lanes) but it did not interact with HDAC3 (data not shown). The co-immunoprecipitated HCS appears as two strong bands of 80 kDa and 82 kDa due to the enrichment of both HCS isoforms during the immunoprecipitation from 2 mg of nuclear protein extract. HCS was not detected after mock co-immunoprecipitation was performed in untransfected HepG2 cells, suggesting that the interaction between HCS and HDACs is specific (Figs. 5A–C, MOCK). Western blot analysis was performed using anti-FLAG antibody to confirm the immunoprecipitation of FLAG-tagged HDACs (Figs. 5A–C, WB:αFLAG).

3.6. Transcriptional repression by holocarboxylase synthetase is synergistically enhanced by histone deacetylase 1

To study the functional interaction between HCS and histone deacetylases, we determined the effect of HDAC1 overexpression on the transcriptional repression mediated by GAL4–HCS in HepG2 cells (Fig. 6A, top panel). The luciferase activity of GAL4–HCS expressing cells was compared to the activity in control HepG2 cells transfected with the GAL4–DNA-binding domain alone (GAL4) or with the construct pcDNA–HDAC1 that directs the expression of HDAC1 without a GAL4 DNA-binding domain (Fig. 6A). While transfection of HepG2 cells with GAL4–HCS reduced luciferase transcription by 50%, transfection of 1 μ g of pcDNA–HDAC1 did not reduce the luciferase expression in

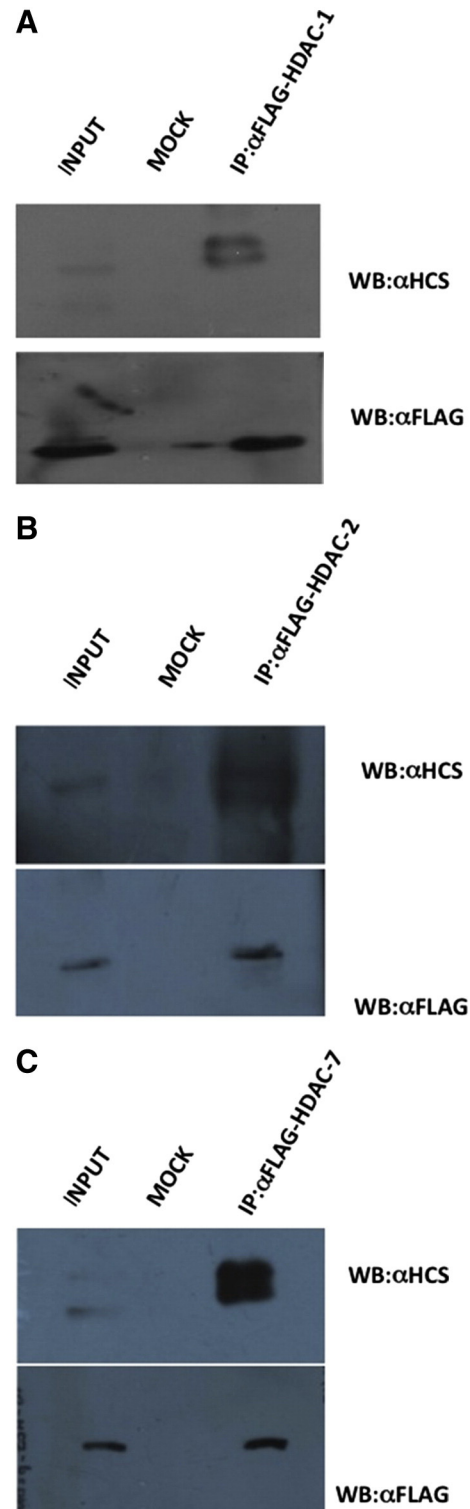


Fig. 5. *In vivo* interaction between HCS and histone deacetylases. HepG2 cells were independently transfected with Flag-tagged HDAC1 (panel A), HDAC2 (panel B), HDAC3 or HDAC7 (panel C). FLAG-HDACs were immunoprecipitated from nuclear extracts prepared from transfected HepG2 cells using anti-FLAG antibody and protein G-sepharose as described in the *Materials and methods* section followed by western blot probed with anti-HCS antibody (upper blots). Input represents 5% of the nuclear extract used in co-immunoprecipitations. MOCK refers to incubation of nuclear protein extracts prepared from untransfected control HepG2 cells with G-sepharose and anti-flag antibody. The presence of FLAG-HDACs in nuclear extracts (input) and co-immunoprecipitated material was confirmed by western blot analysis using anti-FLAG antibody (lower blots).

keeping with its lack of a DNA binding domain (Fig. 6A, GAL4–HCS and HDAC1). When HepG2 cells were cotransfected with GAL4–HCS and 0.5 ug or 1.0 ug of pcDNA-HDAC1, the transcription of the luciferase reporter gene was repressed even further to 35% and 20% of the activity observed in control GAL4 transfected HepG2 cells (Fig. 6A, GAL4HCS + HDAC1). These results suggest that GAL4–HCS bound to the promoter region of the luciferase reporter was able to recruit

HDAC1, increasing the transcriptional repression of the luciferase reporter. To test the functional reproducibility of the HCS–HDAC1 interaction, we performed a reciprocal experiment in which we transfected HepG2 cells with a pcDNA3.1-HCS construct that expresses HCS without the GAL4 DNA-binding domain and evaluated its effect on GAL4–HDAC1-mediated repression of luciferase transcription (Fig. 6B, top panel). Our results showed that HCS lacking the GAL4-DBD binding domain did not repress the transcription of the luciferase reporter gene (Fig. 6B, HCS). In contrast, expression of GAL4–HDAC1, as previously shown in Fig. 2B, reduced luciferase activity to 40% with respect to control HepG2 cells transfected with GAL4 alone (Fig. 6B, GAL4–HDAC1). When Gal4–HDAC1 expressing HepG2 cells were transfected with pcDNA-HCS, the transcription of the luciferase reporter gene exhibited a 55% reduction in comparison to control HepG2 cells transfected with GAL4 (Fig. 6B, GAL4–HDAC1 + pcDNA-HCS). The outcome is a similar reduction in luciferase activity when HCS and HDAC are co-transfected regardless of which component carries the GAL4 DNA binding domain. Taken together, these results suggest that the interaction of nuclear HCS with HDAC1 synergistically represses transcription in human HepG2 cells in vivo.

3.7. The function of HCS as a transcriptional repressor does not require its biotin-ligase activity

To explore whether the biotin-ligase activity of HCS is involved in its function as a transcriptional repressor, we introduced mutations in the HCS active site and tested the effect of these mutant proteins on luciferase expression. The amino acid changes introduced in the HCS sequence mimicked two of the mutations found in patients with multiple carboxylase deficiency (MCD) in which there is deficient biotin ligase activity. Using site-directed mutagenesis on the construct GAL4–HCS we substituted the amino acid glycine at position 581 by serine (Gly581Ser) and deleted the amino acid threonine at position 610 (delThr610). The Gly581Ser and delThr610 mutations, are located in the HCS biotinylation domain, and have been shown to increase the Km of the enzyme towards biotin 45 fold and 3 fold, respectively [26]. The functional characterization of the mutant proteins Gly581Ser and delThr610 was performed using two complementary experiments. First, the cDNA encoding normal HCS and each of the two mutant HCS proteins was subcloned into the bacterial expression vector pGEX and transformed into the temperature sensitive *E. coli* BirA104 mutant (BirA104) to assess whether they could complement the bacterial enzyme defect. This was done by evaluating the ability of the pGEX–HCS constructs to promote the growth of BirA104 at 30 °C or 42 °C in low biotin medium (Fig. 7A). While control BirA104 cells formed colonies at 30 °C but not at 42 °C, the BirA104 cells transformed with wild-type HCS were able to grow both at 30 °C or 42 °C (Fig. 7A, BirA104 and HCS). These results indicated that human normal HCS is able to complement the temperature sensitive phenotype of BirA104. In contrast, BirA104 cells transfected with HCS mutants Gly581Ser or delThr610 grew only at 30 °C but not at 42 °C (Fig. 7A, Gly581Ser, delThr610). Second, the behavior

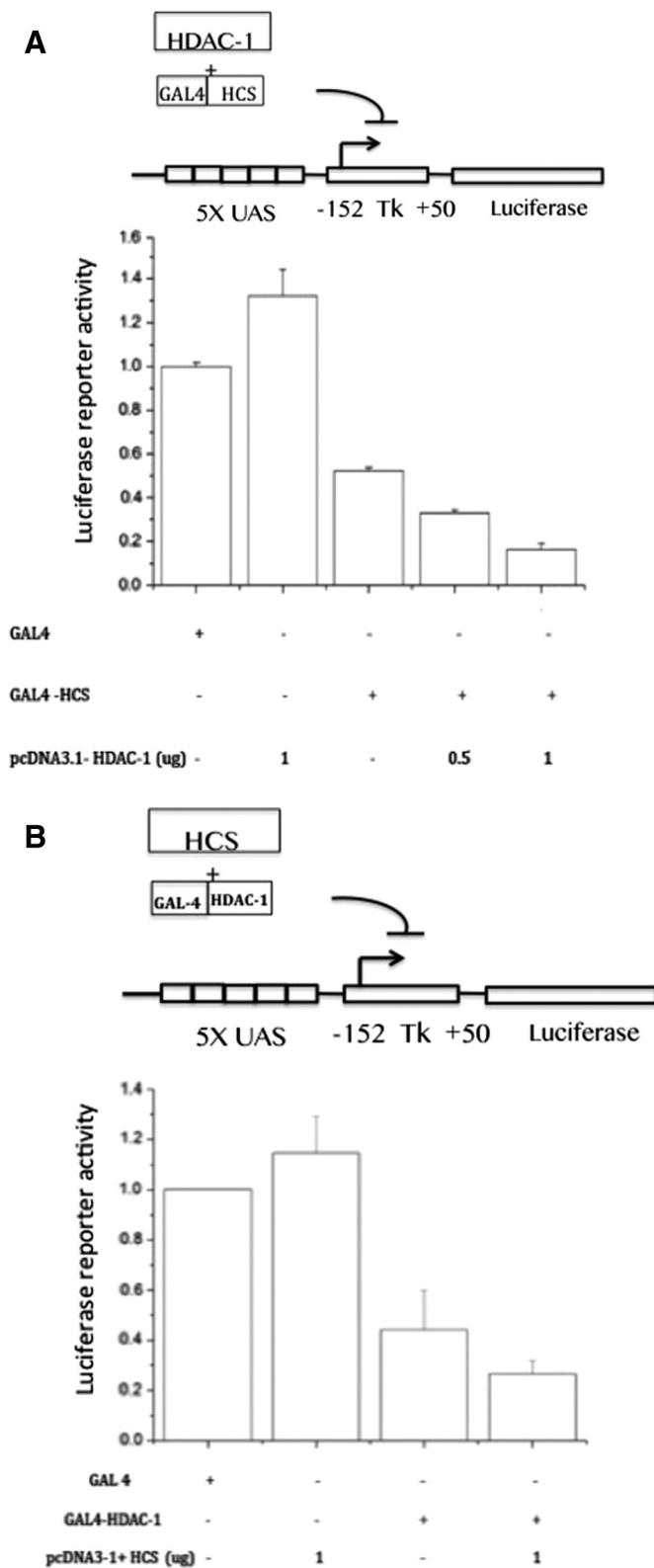
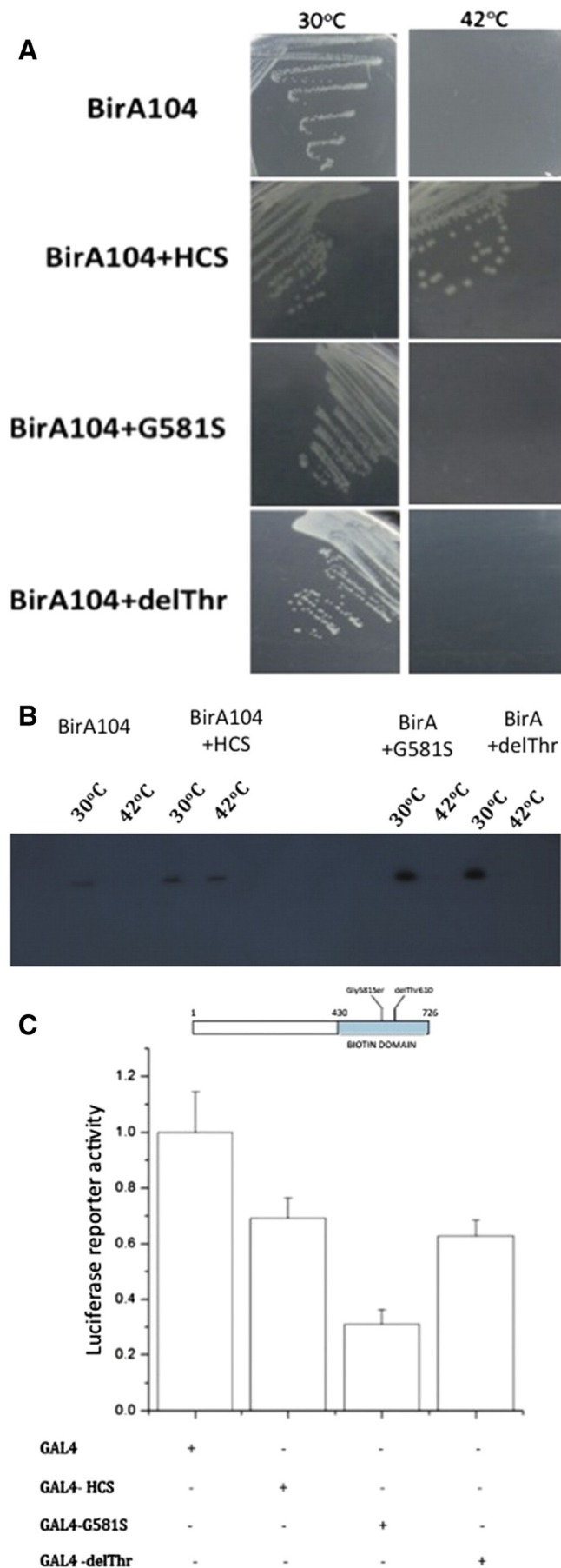


Fig. 6. Expression of HCS and HDAC1 in HepG2 cells synergistically represses transcription of the luciferase reporter gene. (A, top panel) Schematic representation of the 5XUAS-Tk-LUC reporter vector, HCS expressed as a fusion protein with the DNA-binding domain of GAL4 (GAL4–HCS) and HDAC1 expressed from the pcDNA3.1 vector. (A, bottom panel) HepG2 cells were transfected with Gal4–HCS, pcDNA3.1-HDAC1 or Gal4-DBD alone (GAL4), as the control, and the luciferase reporter containing a promoter with five UAS elements in tandem. (B, top panel) Schematic representation of the 5XUAS-Tk-LUC reporter construct, HDAC-1 expressed as a fusion protein with the DNA-binding domain of GAL4 (GAL4–HDAC1) and HCS expressed from the pcDNA3.1-HCS construct. (B, bottom panel) HepG2 cells were transfected with Gal4–HDAC1, pcDNA3.1-HCS or Gal4-DBD alone (GAL4), as the control, and the luciferase reporter containing a promoter with five UAS elements in tandem. In panels A and B, bar chart shows vector selection as + or – or in ug plasmid at bottom. Luciferase activity, from three experiments assayed in triplicate, was normalized with respect to cells expressing Gal4-DBD and represented as mean \pm S.E. The differences between transfection with HCS or with HCS and HDAC1 are shown to be statistically significant ($p < 0.05$).



of the mutant HCS proteins was confirmed by evaluating their ability to restore biotinylation of the acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein (BCCP) in BirA104 cells incubated at 30 °C or 42 °C in low biotin medium. The untransformed BirA104 cells showed incorporation of [¹⁴C]biotin into BCCP at 30 °C but not at 42 °C, as expected due to the deficient activity of the temperature-labile biotin-ligase in these cells (Fig. 7B, BirA104). In contrast, BirA104 cells transformed with human normal HCS could biotinylate BCCP at either temperature (Fig. 7B, HCS – normal). However, the presence of mutant HCS proteins Gly581Ser or delThr610 failed to restore the biotinylation of BCCP at 42 °C (Fig. 7B, Gly581Ser and delThr610). These results confirm that the two HCS mutant proteins Gly581Ser and delThr610 are defective with respect to their biotin ligase activity. We next compared the effect of wild-type HCS and the HCS mutants on the transcription of the luciferase promoter gene using the ERE-Tk-LUC vector in HepG2 cells. Our results showed that luciferase transcription was reduced in the presence of the normal and mutant HCS proteins. While normal HCS reduced luciferase activity by 35%, expression of the mutant proteins Gly581Ser and delThr610 resulted in 70% and 37% reduction in luciferase transcription, respectively (Fig. 7C). Significantly, the two mutant HCS proteins showed a similar if not a stronger transcriptional repressor activity than the wild-type HCS. The fact that Gly581Ser and delThr610 have a Km for biotin 45 times or 3 times higher than normal HCS suggests that biotinylation activity is not required for HCS to function as a transcriptional repressor.

4. Discussion

It has been shown that the enzyme HCS not only is responsible for the activation of biotin-dependent carboxylases but also is an obligate participant in the transcriptional regulation of genes involved in biotin metabolism through the activation of the HCS-sGC-PKG signal transduction pathway [6–8]. However, the recent isolation of HCS associated with lamin-B in the cell nucleus suggested the possibility that this protein may affect gene expression through an alternative mechanism [9]. This hypothesis is supported by studies on the subcellular localization of HCS in *D. melanogaster*. In this organism, HCS is a chromatin-associated protein, particularly abundant in heterochromatin bands that are enriched with the transcriptionally repressive epigenetic mark H3K9me3 [18]. These results and the demonstration that HCS is recruited to the promoter region of transcriptionally inactive hsp70 gene led us to hypothesize that nuclear HCS may have a role in transcriptional repression or gene silencing. However, because HCS lacks a DNA binding domain, its chromatin association and transcriptional activity may depend on its interaction with different nuclear factors.

Fig. 7. HCS transcriptional function does not require its biotin-ligase activity. (A) Functional complementation of a BirA mutant *E. coli* strain with normal and mutant HCS proteins. Wild type HCS and HCS proteins containing the mutations Gly581Ser or delThr610 were expressed in temperature sensitive *E. coli* BirA104 to evaluate their ability to complement the bacterial growth phenotype at 30 °C and 42 °C. The results show that only the BirA104 transformed with normal HCS was able to grow at 42 °C. (B) The mutant HCS proteins Gly581Ser or delThr610 are unable to biotinylate the BCCP subunit of acetyl-CoA carboxylase in BirA104 *E. coli* cells. *E. coli* BirA104 transformed with normal HCS or the mutant HCS proteins, Gly581Ser or delThr610, were grown in LB medium containing ³H-biotin at 30 °C or 42 °C. Total protein extracts were resolved by PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Biotinylation of the BCCP subunit was determined by autoradiography. (C) Mutant HCS proteins Gly581Ser and delThr610 exhibit transcriptional repressor activity in HepG2 cells. (Top panel) Schematic representation of the mutations Gly581Ser and delThr610 introduced in the HCS protein sequence. (Lower panel) The transcriptional activity of wild type HCS and mutant HCS proteins, Gly581Ser and delThr610, was assayed using the GAL4-UAS system. HepG2 cells were transfected with normal HCS or mutant proteins Gly581Ser or delThr610, expressed as fusion proteins with the DNA-binding domain of GAL4, Gal4-HDAC1 or Gal4-DBD alone (GAL4), as the control, and the luciferase reporter containing a promoter with five UAS elements in tandem (5xUAS-luciferase, top panel). Luciferase activity, from three experiments assayed in triplicate, was normalized with respect to cells expressing Gal4 alone and represented as mean ± S.E. Differences shown to be statistically significant ($p < 0.05$). Bar chart shows vector selection (+, –) at bottom.

In this study we used a luciferase reporter gene driven by a UAS-tk promoter to determine whether HCS, expressed as a fusion protein with the heterologous GAL4 DNA-binding domain, possesses transcriptional regulatory activity. This transcriptional assay has been used in the functional characterization of transcriptional coregulators that act as docking platforms to bridge transcription factors and chromatin-modifying enzymes but do not bind to DNA directly [27–29]. Our results showed that transient transfection of GAL4–HCS in HepG2 cells produced a 50% reduction in the transcription of luciferase that was similar to the effect produced by transfection of GAL4–HDAC1. In the past we have used cells from MCD affected patients as a tool to characterize the function of biotin and HCS in different cellular processes such as carboxylase biotinylation and the activation of the HCS–sGC–PKG signal transduction pathway. In this study, we used a similar approach to determine whether biotin and the biotin-ligase activity of HCS are involved in its transcriptional activity. Two mutations found in patients with MCD, Gly581Ser and delThr610, were introduced into HCS. The mutant HCS proteins, as expected from their high Km value for biotin, were unable to promote biotinylation of the BCCP subunit of ACC in a temperature sensitive BirA mutant of *E. coli*. However, when the mutant proteins were transfected into HepG2 cells, they efficiently repressed luciferase expression from the 5XUAS-Tk-LUC vector. Remarkably, the HCS Gly581Ser protein showed a stronger transcriptional repressor activity than the normal HCS. These results suggest that the HCS function in luciferase transcriptional repression is unrelated to its biotin-ligase activity.

The HCS amino acid sequence does not contain a domain with an enzymatic activity, different to its biotin-ligase activity, which could suggest that its transcriptional effect is achieved via direct chromatin modification. Instead, we propose that HCS acts as a transcriptional corepressor whose activity depends on its interaction with different histone deacetylases. The association of HCS with HDACs was confirmed in this study using different experimental approaches. First, treatment of GAL4–HCS expressing HepG2 cells with TSA, an inhibitor of class I and II mammalian HDACs, impaired the ability of HCS to repress luciferase transcription. We showed further, by performing pull-down assays, that HCS interacts in vitro with HDAC1, HDAC2, HDAC3 and HDAC7. Co-immunoprecipitation assays confirmed that in HepG2 cells in vivo, HCS is associated with endogenous HDAC1, HDAC2 and HDAC7.

In eukaryotic cells the epigenetic modification of nucleosomes catalyzed by histone deacetylases leads to transcriptional repression by reducing access of the basal transcriptional machinery to promoters and coding regions in the DNA. However, histone deacetylases do not exhibit catalytic activity unless they interact with corepressors, such as NCoR or SMRT or with protein complexes like Sin3, NuRD and Co-REST that mediate their recruitment to the promoters of genes [30,31]. In our experiments, transient transfection of HDAC1 in the absence of a DNA-binding protein did not affect luciferase expression from the 5XUAS-tk-LUC vector in HepG2 cells. However, when HDAC1 was transfected into GAL4–HCS expressing HepG2 cells we observed an enhancement in the repression of luciferase transcription compared to cells transfected with GAL4–HCS alone. The synergistic transcriptional effect of HCS and HDAC1 confirms their functional interaction in HepG2 cells in vivo and provides a rationale for the co-localization of HCS with the heterochromatin mark H3K9met3.

In eukaryotic cells, transcriptionally inactive DNA domains are frequently localized to the nuclear periphery suggesting that tethering of genetic loci to nuclear lamina causes their silencing [32,33]. Lamins have been shown to provide docking sites for diverse corepressor proteins whose function is to recognize and relocate H3K9met3-marked chromatin to the nuclear matrix where it is transcriptionally silenced through the recruitment of histone deacetylases [34–36]. The HCS ability to interact with different histone deacetylases and its association with H3K9met3-marked chromatin suggest that it may participate in transcriptional repression or silencing of DNA domains as part of a protein complex that includes lamin B, HDAC1, HDAC2 and HDAC7.

The results presented in this report have substantially extended the known functions of HCS in human cells. In the cytoplasm, HCS plays a major role in maintaining metabolic homeostasis catalyzing the biotinylation of five biotin-dependent carboxylases. Also in the cytoplasm, the biotin-ligase activity of HCS is a key component of the HCS–sGC–PKG pathway that regulates the transcription of genes involved in biotin transport and metabolism. Here we have presented evidence of a novel function for nuclear HCS as a biotin-independent transcriptional corepressor. The functional plasticity of HCS is a common characteristic of several metabolic enzymes including glycerol kinase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and pyruvate kinase [37]. These enzymes which, by performing multiple and often unrelated functions, have been referred as moonlighting proteins [37–39]. A key characteristic of these multitasking enzymes is that their functions are independent and the inactivation of one of their functions by mutations does not affect the other. In our studies we have shown that the C-terminal fragment of HCS, containing the biotinylation domain, exhibited a stronger transcriptional corepressor activity than the full length HCS. However, mutations in the biotin-ligase domain had no effect on its ability to act as a transcriptional corepressor suggesting that both HCS functions are independent. Further, the evidence presented in this study indicate that the transcriptional repressor function of nuclear HCS is mediated by the recruitment of histone deacetylases and does not involve histone biotinylation as it was previously suggested [11–13].

Our previous studies showing that the abundance of HCS in H3K93met enriched heterochromatin bands in all chromosomes of *D. melanogaster* [18] combined with this new finding of HCS corepressor function, suggest that, unlike its role in the cytoplasmic HCS–sGC–PKG pathway, the function of nuclear HCS is not restricted to the transcriptional control of a limited number of genes. Instead nuclear HCS seems to be part of a general transcriptional repressor mechanism.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Roy A. Gravel from the University of Calgary for comments on this work. 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 (IN266912). I.T.G., S.R.C., T.B.G. and I.M.N. are students of Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, and were supported by a scholarship from CONACYT.

References

- [1] D. Pacheco-Alvarez, R. Solórzano-Vargas, A. Del Río, Biotin in metabolism and its relationship to human disease, *Arch. Med. Res.* 33 (5) (2002) 439–447.
- [2] B. Wolf, *The Molecular Basis of Inherited Disease*, vol. 3Mc-Graw-Hill Professional, New York, 2001.
- [3] A. León-Del-Río, et al., 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 (10) (1995) 4626–4630.
- [4] L. Dupuis, et al., Clustering of mutations in the biotin-binding region of holocarboxylase synthetase in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency, *Hum. Mol. Genet.* 5 (7) (1996) 1011–1016.
- [5] Y. Suzuki, et al., Mutations in the holocarboxylase synthetase gene HLCS, *Hum. Mutat.* 26 (4) (2005) 285–290.
- [6] R. 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 (8) (2002) 5325–5330.
- [7] D. Pacheco-Alvarez, et al., Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency, *J. Biol. Chem.* 279 (50) (2004) 52312–52318.
- [8] D. Pacheco-Alvarez, et al., Biotin availability regulates expression of the sodium-dependent multivitamin transporter and the rate of biotin uptake in HepG2 cells, *Mol. Genet. Metab.* 85 (4) (2005) 301–307.
- [9] M. Narang, et al., Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase, *Hum. Mol. Genet.* 13 (1) (2004) 15–23.
- [10] 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 (1) (1995) 76–83.
- [11] G. Camporeale, et al., K8 and K12 are biotinylated in human histone H4, *Eur. J. Biochem.* 271 (11) (2004) 2257–2263.
- [12] Y.C. Chew, et al., Lysine residues in N-terminal and C-terminal regions of human histone H2A are targets for biotinylation by biotinidase, *J. Nutr. Biochem.* 17 (4) (2006) 225–233.
- [13] K. Kobza, et al., K4, K9 and K18 in human histone H3 are targets for biotinylation by biotinidase, *FEBS J.* 272 (16) (2005) 4249–4259.
- [14] S. Healy, et al., Biotin is not a natural histone modification, *Biochim. Biophys. Acta* 1789 (11–12) (2009) 719–733.
- [15] E.D. Streaker, D. Beckett, Nonenzymatic biotinylation of a biotin carboxyl carrier protein: unusual reactivity of the physiological target lysine, *Protein Sci.* 15 (8) (2006) 1928–1935.
- [16] L.M. Bailey, et al., Artfactual detection of biotin on histones by streptavidin, *Anal. Biochem.* 373 (1) (2008) 71–77.
- [17] S. Healy, et al., Nonenzymatic biotinylation of histone H2A, *Protein Sci.* 18 (2) (2009) 314–328.
- [18] S. Reyes-Carmona, et al., Trafficking and chromatin dynamics of holocarboxylase synthetase during development of *Drosophila melanogaster*, *Mol. Genet. Metab.* 103 (3) (2011) 240–248.
- [19] A. Pérez-Monjaras, et al., Impaired biotinidase activity disrupts holocarboxylase synthetase expression in late onset multiple carboxylase deficiency, *J. Biol. Chem.* 283 (49) (2008) 34150–34158.
- [20] S. Grégoire, X.-J. Yang, Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors, *Mol. Cell. Biol.* 25 (6) (2005) 2273–2287.
- [21] C.-C. Tsai, et al., Ataxin 1, a SCA1 neurodegenerative disorder protein, is functionally linked to the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (12) (2004) 4047–4052.
- [22] G. Delcuve, D. Khan, J. Davie, Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors, *Clin. Epigenetics* 4 (1) (2012) 5.
- [23] A.J.M. de Ruijter, et al., Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family, *Biochem. J.* 370 (3) (2003) 737–749.
- [24] E.Y. Hsia, et al., Nuclear receptor coregulators as a new paradigm for therapeutic targeting, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (13) (2010) 1227–1237.
- [25] E. Campeau, R. Gravel, Expression in *Escherichia coli* of N- and C-terminally deleted human holocarboxylase synthetase. Influence of the N-terminus on biotinylation and identification of a minimum functional protein, *J. Biol. Chem.* 276 (15) (2001) 12310–12316.
- [26] B. Burri, L. Sweetman, W. Nyhan, Mutant holocarboxylase synthetase: evidence for the enzyme defect in early infantile biotin-responsive multiple carboxylase deficiency, *J. Clin. Invest.* 68 (6) (1981) 1491–1495.
- [27] Y.-B. Xie, B. Nedumaran, H.-S. Choi, Molecular characterization of SMILE as a novel corepressor of nuclear receptors, *Nucleic Acids Res.* 37 (12) (2009) 4100–4115.
- [28] E. Valls, et al., Involvement of chromatin and histone deacetylation in SV40 T antigen transcription regulation, *Nucleic Acids Res.* 35 (6) (2007) 1958–1968.
- [29] I. Logan, et al., Human PIRH2 enhances androgen receptor signaling through inhibition of histone deacetylase 1 and is overexpressed in prostate cancer, *Mol. Cell. Biol.* 26 (17) (2006) 6502–6510.
- [30] E. Hervouet, et al., Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer, *Epigenetics* 8 (3) (2013) 237–245.
- [31] A. Mottis, L. Mouchiroud, J. Auwerx, Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis, *Genes Dev.* 27 (8) (2013) 819–835.
- [32] S. Heessen, M. Fornerod, The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place, *EMBO Rep.* 8 (10) (2007) 914–919.
- [33] A. Akhtar, S. Gasser, The nuclear envelope and transcriptional control, *Nat. Rev. Genet.* 8 (7) (2007) 507–517.
- [34] A. Taddei, et al., The function of nuclear architecture: a genetic approach, *Annu. Rev. Genet.* 38 (2004) 305–345.
- [35] S. Schulze, L. Wallrath, Gene regulation by chromatin structure: paradigms established in *Drosophila melanogaster*, *Annu. Rev. Entomol.* 52 (2007) 171–192.
- [36] T. Dechat, et al., Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin, *Genes Dev.* 22 (7) (2008) 832–853.
- [37] G. Sriram, et al., Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes play? *Am. J. Hum. Genet.* 76 (6) (2005) 911–924.
- [38] C.J. Jeffery, Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks, *Trends Genet.* 19 (8) (2003) 415–417.
- [39] D.H.E.W. Huberts, I.J. van der Klei, Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell. Res.* 1803 (4) (2010) 520–525.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

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

Commentary

Holocarboxylase synthetase: A multitasking protein with roles in biotin transfer, gene regulation and chromatin dynamics

Roy A. Gravel*

Departments of Biochemistry & Molecular Biology and of Medical Genetics and the Alberta Children's Hospital Research Institute for Child and Maternal Health, Faculties of Medicine and Kinesiology, University of Calgary, Room 250 Heritage Medical Research Building, 3330 Hospital Drive N.W., Calgary, Alberta, Canada T3H-1C1

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 November 2013

Accepted 16 November 2013

Available online xxx

Keywords:

Biotin

Holocarboxylase synthetase

Regulation

Chromatin

Histone deacetylase

The human requirement for the vitamin biotin dates back to 1942 with the demonstration that “egg-white injury” could be corrected with a biotin concentrate [1]. Yet, it was not till 30 years later that a nutrient deficiency of biotin or genetic defects in its utilization could be demonstrated [2–4], in part because much of our biotin stores can be recycled through a utilization–reutilization pathway described as the biotin cycle [5]. Biotin is now well known as the covalently-bound carboxyl-carrier in biotin-dependent carboxylases, and its attachment to apocarboxylases is catalyzed by holocarboxylase synthetase (HCS). Mutations in HCS produce a devastating “multiple carboxylase deficiency” and a consequent multipathway, metabolic impairment resulting from the remarkable attribute that HCS is the universal biotin transfer enzyme for all five biotin-dependent carboxylases in mammals. While these are the classical substrates for HCS, there has also been the persistent suggestion that HCS can catalyze the biotinylation of histones, giving the protein and biotin enigmatic roles beyond carboxyl transfer [6]. Further, beyond its role as a biotin–protein ligase, HCS has a repressor function, acting to down-regulate biotin utilization in a tissue specific manner [7,8]. Now, Leon-Del-Rio and colleagues [9] have added a more complex twist to the regulatory role of HCS, providing evidence for its functional contribution to a chromatin-based regulatory complex in association with histone deacetylases.

HCS catalyzes biotin transfer to apocarboxylases in a two-step ATP-dependent reaction. First, biotin is adenylated to form biotinyl-5'-

AMP. In the second reaction, biotin is transferred from biotinyl-AMP to the ϵ amino group of a lysine residue of apocarboxylases within a near universal biotin acceptor sequence, (A/V)MKM, found in carboxylases from bacteria to mammals [5]. The five biotin-dependent carboxylases in mammals are mitochondrial propionyl-CoA, β -methylcrotonyl-CoA, and pyruvate carboxylases and mitochondrial and cytosolic forms of acetyl-CoA carboxylase, and all are substrates for biotinylation by HCS. The paradigm biotin ligase for HCS is the orthologous *Escherichia coli* protein, BirA, which catalyzes biotin transfer to the biotin carboxyl carrier protein (BCCP) subunit of acetyl-CoA carboxylase, the sole biotin-dependent carboxylase in these cells [10]. Significantly, BirA is also the regulator of its own synthesis, acting as the repressor of the biotin biosynthetic operon under biotin-replete conditions. To accomplish this, its regulatory role is intimately linked to its enzymatic function. In the *E. coli* system in biotin excess, a stable BirA-biotinyl-AMP complex is formed which, on shifting to a protein-dimer, constitutes the active repressor of the biotin operon [11].

By analogy with the regulatory role of BirA, it seems remarkable that HCS also has repressor function. In mammalian cells, HCS acts to down-regulate its own expression and that of biotin transport and of apocarboxylases through a cGMP-dependent signaling pathway that utilizes biotinyl-AMP as an essential corepressor [7,8,12]. The role is novel and paradoxical in producing repression of HCS and carboxylase gene expression in conditions of low biotin, seemingly in order to direct circulating biotin to the brain, a sparing mechanism designed to preserve brain metabolism at the expense of peripheral tissues. Thus BirA and HCS both have repressor functions and both utilize biotinyl-AMP as corepressors, but here the analogy ends. BirA in complex with biotinyl-AMP binds to DNA to effect transcriptional repression of the biotin operon to reduce biotin synthesis, while HCS, via biotinyl-AMP synthesis, acts through a cGMP signaling pathway to divert biotin utilization.

Histone biotinylation is an enticing but controversial role for HCS [13–16]. The presence of biotin on native histones was first described in 2001 and was found to increase with cell proliferation [17]. Detailed studies, centered around the use of streptavidin or antibodies generated against biotinylated histone peptides, identified multiple biotinylation sites on histones H1, H2A, H2B, H3 and H4 [17–19]. Recent, more refined experiments narrowed the observation so that histone biotinylation may be a rare histone mark aimed primarily at histones H2A, H3 and H4 [20]. However, the *in vivo* biotinylation of histones has been put into question by the demonstration that avidin, the egg-white component causing egg white injury, and streptavidin, both which can detect biotin regardless of the nature of the protein to

* Fax: +1 403 210 8115.

E-mail address: rgravel@ucalgary.ca.

which it is attached, appear to have an affinity for histones which complicates their use in the detection of histone-biotin [21]. Further, it was shown that histone biotinylation by HCS is not a direct activity of HCS but the product of nonenzymatic transfer of biotin from biotinyl-AMP to histone lysines, a reaction that could only be demonstrated *in vitro* [22]. The role of HCS was shown to be the synthesis of the biotinyl-AMP transfer substrate. Efforts to identify biotinylated histones made *in vivo* were unsuccessful and the phenomenon was ascribed instead to cross-specificities of avidins and anti-biotin antibodies [23]. Nevertheless, using improved antibodies and focusing on H3 and H4 as substrates, Zemleni and colleagues continue to detect biotin on histones in cells *in situ*, localizing them to regions of gene silencing, and suggest that studies to the contrary suffer from technical limitations [20,24]. While these studies have yet to be replicated broadly, they fill a need for a rationale for the involvement of HCS in gene regulation.

The study by Leon-Del-Rio and colleagues [9] places HCS as a biotin-independent, functioning part of a chromatin-based regulatory complex in association with histone deacetylases. The origin of this study lies in the discovery that HCS localizes to the nucleus of cells, attached to the nuclear lamina [13]. Studies in *Drosophila melanogaster* by Leon-Del-Rio and colleagues [25] had shown that nuclear HCS localized to heterochromatin bands and associated with the transcriptionally repressive mark H3K9me3 while it was absent from euchromatic bands and the transcriptionally active mark H3K9ac. At the gene level, HCS was found associated with the core promoter of hsp70 but was displaced on heat shock and its transcriptional activation. To pursue the mechanism in the current study, HCS was fused with the DNA-binding domain of the yeast transcription factor GAL4, to enable a DNA binding capacity, and transfected into HepG2 cells containing a luciferase reporter attached to a promoter with multiple GAL4 response elements. Under these conditions, the HCS–GAL4 fusion protein repressed the expression of the luciferase reporter and repression was further enhanced by co-transfection with any of several histone deacetylases. *In vitro* and in cells *in situ*, the repressor activity of HCS was shown to depend on direct interaction with HDAC1, HDAC2 or HDAC7. Surprisingly, while the C-terminal half of HCS, which includes the biotin transfer domain, had the most potent repressor activity, repression did not depend on its biotin ligase activity. Mutations in HCS associated with multiple carboxylase deficiency in patients resulting from defective biotinylation activity failed to influence repressor function. HCS, containing these same mutations, was unable to rescue an *E. coli* strain with defective BirA, an assay originally used to clone HCS through complementation of the BirA defect. While these experiments do not show HCS to bind directly to promoter DNA (thus the Gal4 fusion component), they place HCS in a protein complex with HDACs that directly demonstrates repressor function in the heterologous luciferase reporter system. These studies coupled with the *Drosophila* experiments that showed association of native HCS to heterochromatic regions extend the role of HCS as a multitasked molecule. It is a biotin ligase, a biotin-dependent regulator of its own and carboxylase transcription, and now a possibly general co-transcriptional repressor.

References

- [1] V.P. Sydenstricker, S.A. Singal, A.P. Briggs, N.M. DeVaughn, H. Isbell, Observations on the “egg white injury” in man, *JAMA* 118 (1942) 199–200.
- [2] D. Gompertz, G.H. Draffan, J.L. Watts, D. Hull, Biotin-responsive beta-methylcrotonylglycinuria, *Lancet* 2 (1971) 22–24.
- [3] M. Saunders, et al., Biotin-response organicaciduria. Multiple carboxylase defects and complementation studies with propionicacidemia in cultured fibroblasts, *J. Clin. Invest.* 64 (1979) 1695–1702.
- [4] D.M. Mock, A.A. de Lorimer, W.M. Liebman, L. Sweetman, H. Baker, Biotin deficiency: an unusual complication of parenteral alimentation, *N. Engl. J. Med.* 304 (1981) 820–823.
- [5] B. Wolf, et al., Multiple carboxylase deficiency: clinical and biochemical improvement following neonatal biotin treatment, *Pediatrics* 68 (1981) 113–118.
- [6] J. Zemleni, S.S. Wijeratne, Y.I. Hassan, Biotin, *Biofactors* 35 (2009) 36–46.
- [7] D. Pacheco-Alvarez, et al., Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 52312–52318.
- [8] D. Pacheco-Alvarez, et al., Biotin availability regulates expression of the sodium-dependent multivitamin transporter and the rate of biotin uptake in HepG2 cells, *Mol. Genet. Metab.* 85 (2005) 301–307.
- [9] I. Trujillo-Gonzalez, et al., Holocarboxylase synthetase acts as a biotin-independent transcriptional repressor interacting with HDAC1, HDAC2 and HDAC7, *Mol. Genet. Metab.* (2013) (in press).
- [10] J.E. Cronan Jr., The *E. coli* bio operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme, *Cell* 58 (1989) 427–429.
- [11] E.D. Streaker, D. Beckett, The biotin regulatory system: kinetic control of a transcriptional switch, *Biochemistry* 45 (2006) 6417–6425.
- [12] R.S. Solorzano-Vargas, D. Pacheco-Alvarez, A. Leon-Del-Rio, 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] M. Gralla, G. Camporeale, J. Zemleni, Holocarboxylase synthetase regulates expression of biotin transporters by chromatin remodeling events at the SMVT locus, *J. Nutr. Biochem.* 19 (2008) 400–408.
- [16] Y.C. Chew, et al., Biotinylation of histones represses transposable elements in human and mouse cells and cell lines and in *Drosophila melanogaster*, *J. Nutr.* 138 (2008) 2316–2322.
- [17] J.S. Stanley, J.B. Griffin, J. Zemleni, Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 5424–5429.
- [18] 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.
- [19] G. Camporeale, E.E. Shubert, G. Sarath, R. Cerny, J. Zemleni, K8 and K12 are biotinylated in human histone H4, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 2257–2263.
- [20] T. Kuroishi, L. Rios-Avila, V. Pestinger, S.S. Wijeratne, J. Zemleni, Biotinylation is a natural, albeit rare, modification of human histones, *Mol. Genet. Metab.* 104 (2011) 537–545.
- [21] 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.
- [22] S. Healy, T.D. Heightman, L. Hohmann, D. Schriemer, R.A. Gravel, Nonenzymatic biotinylation of histone H2A, *Protein Sci.* 18 (2009) 314–328.
- [23] S. Healy, et al., Biotin is not a natural histone modification, *Biochim. Biophys. Acta* 1789 (2009) 719–733.
- [24] Y. Li, Y.I. Hassan, H. Moriyama, J. Zemleni, Holocarboxylase synthetase interacts physically with euchromatic histone-lysine N-methyltransferase, linking histone biotinylation with methylation events, *J. Nutr. Biochem.* 24 (2013) 1446–1452.
- [25] S. Reyes-Carmona, V. Valadez-Graham, J. Guilar-Fuentes, M. Zurita, A. Leon-Del-Rio, Trafficking and chromatin dynamics of holocarboxylase synthetase during development of *Drosophila melanogaster*, *Mol. Genet. Metab.* 103 (2011) 240–248.