

00322

135



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"RESPUESTAS A BIOTINA DE ALGUNAS MUTACIONES PRESENTES EN UNA SECUENCIA MINIMA FUNCIONAL DE HOLOCARBOXILASA SINTETASA. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA DEFICIENCIA MÚLTIPLE DE CARBOXILASAS"

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A:

ABRIL NAVARRETE MENA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALONSO LEÓN DEL RÍO

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



2003 FACULTAD DE CIENCIAS SECCION LABORAL





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.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AZUAYA
LOJA

Envío a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional
NOMBRE: Abriel Navarrete

FECHA: 03/02/03

FIRMA: Abriel Navarrete

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Respuestas a biotina de algunas mutaciones presentes en una secuencia mínima funcional de Holocarboxilasa --- Sintetasa. Caracterización molecular de la deficiencia múltiple de carboxilasas".

realizado por ABRIL NAVARRETE MENA

con número de cuenta 9211610-4, quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de Tesis Propietario	Dr. Alfonso León del Río	
Propietario	Dr. Ignacio Camacho Arroyo	
Propietario	M. en I.B.B. Gustavo Jesús Ortega Lule	
Suplente	M. en I.B.B. Saúl Cano Colín	
Suplente	M. en I.B.B. Laura del Carmen Vargas Parada	

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.

Consejo Departamental de BIOLOGIA.


M en e Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**CARACTERIZACIÓN DE LA
DEFICIENCIA MÚLTIPLE DE
CARBOXILASAS:**

**Aplicación de un modelo bacteriano de
biotinilación.**

ABRIL NAVARRETE MENA

2003

in memoriam

JOSÉ NAVARRETE RODRÍGUEZ

DEDICATORIAS

A mi madre, **Lic. Celia Mena de Navarrete** por su inmenso apoyo y cariño incondicionales con la esperanza de ser cada vez mejor.

A mis hermanos por compartir con ellos el espacio efímero y de ellos aprender, por su apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por mi formación académica.

Al **Dr. Alfonso León Del Río** por su orientación y apoyo en la realización de este trabajo.

A la **Dra. Blanca Ruiz Ordaz** y el **M. en I. B. B. Gustavo Ortega Lule** por su colaboración en la realización de los modelos moleculares e interpretación de los mismos.

Al **Biol. Exp. Rafael Cervantes Roldan** por su paciencia y excelente asesoría técnica en la realización de los experimentos.

Al **Dr. Michael Kriegmaier** por su ayuda invaluable en la realización escrita de este trabajo.

Al **Dr. Ignacio Camacho Arroyo**, al **M. en I. B. B. Saúl Cano Colín** y **Dra. Laura Vargas Parada** por sus valiosos comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo.

ÍNDICE

I.- RESUMEN	8
II.- INTRODUCCIÓN	9
1.- BIOTINA	9
Ciclo de la biotina	7
Deficiencia de biotina	10
2.- BIOTINILACIÓN DE CARBOXILASAS	11
3.- HOLOCARBOXILASA SINTETASA HUMANA (HCS)	12
Características	12
Deficiencia Múltiple de Carboxilasas Neonatal (DMC)	14
Sintomatología y tratamiento de la DMC	15
Deficiencia Múltiple de Carboxilasas Juvenil	16
Sintomatología y tratamiento	17
Secuencia mínima funcional de HCS	17
4.- HOLOCARBOXILASA SINTETASA BACTERIANA (Bir A)	18
5.- SEMEJANZAS ENTRE HCS Y Bir A	19
6.- RUTAS METABÓLICAS REGULADAS POR HCS HUMANA	20
7.- PROPUESTA DE TRABAJO	22
III.- HIPÓTESIS	23
IV.- OBJETIVO GENERAL	24
V.- OBJETIVOS PARTICULARES	24
VI.- DISEÑO EXPERIMENTAL	24

1.- Generación de mutaciones dentro de la secuencia génica de HCS24	
1.1- Obtención de DNA de los plásmidos portadores de las mutaciones	27
1.2- Obtención de las secuencias correspondientes para cada mutación	28
2.- Ensayo de expresión de proteínas recombinantes	28
3.- Ensayo de complementación funcional con la cepa bacteriana BirA 104	30
4.- Modelaje molecular	30
VII.- RESULTADOS	33
1.- Mutagénesis dirigida	33
2.- Expresión de HCS no mutada y de las diferentes mutaciones generadas	35
3.- Expresión de proteína con anti-histidina	36
4. Complementación funcional de proteína con BirA 104	36
5. Biotinilación semi – cuantitativa de BCCP	41
6. Modelaje molecular	43
VIII.- ANÁLISIS DE RESULTADOS	50
IX.- DISCUSIÓN	53
X.- CONCLUSIONES	56
XI.- APORTACIONES DEL PROYECTO	57
XII.- REFERENCIAS	58

I. RESUMEN

La vitamina H o biotina, forma parte del grupo de las vitaminas hidrosolubles y es esencial en el funcionamiento de las carboxilasas, ya que se instituye como su grupo prostético. Las carboxilasas humanas son enzimas que intervienen en reacciones clave de las rutas metabólicas de lípidos y carbohidratos y en el catabolismo de algunos aminoácidos.

La holocarboxilasa sintetasa humana (HCS), es la encargada de catalizar la unión covalente de la vitamina biotina a las carboxilasas humanas, mediante una reacción de biotinilación dependiente de ATP.

La HCS tiene similitud con proteínas ligasas de biotina que llevan a cabo la misma función, catalizar la unión de biotina en las carboxilasa de procariontes y eucariontes; como son las bacterias, levaduras y plantas (Suzuki, 1994; Tissot, 1997, Polyak, 1999).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar mutaciones homocigas y heterocigas presentes, frecuentemente, en pacientes con Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC). Para esto, se generó una serie de mutaciones, presentes en la DMC en un fragmento de DNA que codifica para una secuencia mínima funcional de la HCS.

Una vez obtenidas las mutaciones se realizaron ensayos de complementación funcional en *E. coli* BirA 104, una cepa termosensible que presenta una mutación en la ligasa de biotina BirA, (proteína similar a la HCS). En esta misma cepa se realizaron ensayos de biotinilación para determinar cuantitativamente la incorporación de biotina marcada a la BCCP bacteriana (Biotin Carboxyl Carrier Protein).

El diseño de las estructuras moleculares de la proteína normal y de cada una de las mutaciones generadas se realizó tomando como referencia a la estructura cristalográfica de la proteína bacteriana BirA. Esto permitió estudiar los efectos de las mutaciones sobre la estructura espacial de HCS humana complementando su caracterización fisiológica y bioquímica.

II. INTRODUCCIÓN

1.- BIOTINA

En 1935, Kögl aisló por primera vez la biotina a partir de un concentrado de hígado que contenía factores de crecimiento para levadura (Lehninger, 1982). Esta vitamina es hidrosoluble y se presenta en dos formas: libre como la vitamina D-biotina, también llamada vitamina H y fijada al aminoácido lisina como biocitina.

La biotina presenta ocho posibles estereoisómeros de los cuáles sólo la D-biotina es la forma activa (Rechigl, 1977).

Se trata de un compuesto bicíclico, con un anillo de imidazolina fusionado a un anillo de tiofeno y una cadena alifática que porta el grupo carboxilo, como se ve en la figura 1 (Bender, 1992).

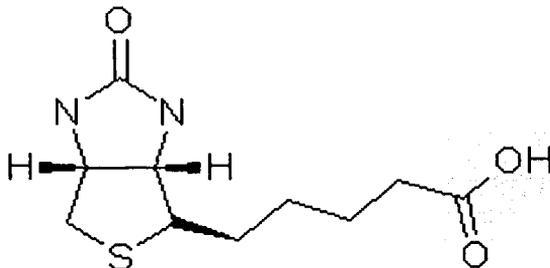


Figura 1. Estructura de la biotina).

La biotina juega un papel esencial como cofactor de las carboxilasas, que son enzimas que intervienen en el metabolismo síntesis de ácidos grasos, en el catabolismo de algunos aminoácidos y en gluconeogénesis.

La formación de las holocarboxilasas, ocurre mediante reacciones de biotilación, catalizadas en humanos por la holocarboxilasa sintetasa (HCS) y en bacterias por la ligasa de biotina, conocida como BirA.

Ciclo de la biotina.

Los organismos procariontes, a diferencia del humano, son capaces de sintetizar su propia biotina. En los eucariontes, se ha perdido la capacidad de sintetizar biotina, por lo que se tiene que adquirir mediante la dieta en diversos alimentos. Las mejores fuentes de biotina en alimentos son el hígado, riñón, yema de huevo, legumbres, carnes, pescado, cereales y nueces. La cantidad de biotina que se debe consumir diariamente en la dieta es de 150 a 300 μg (Rechcigl, 1977). En mamíferos se absorbe en el intestino delgado a través de un transportador con 12 dominios transmembranales (Zempleni and Mock, 1999), cuya función es la de transportar ácido lipoico y pantotenato además de biotina. Por esta razón se le ha denominado transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT) (Wolf, B. en Scriver, 1995).

Una vez que la biotina es transportada al interior de la célula, se une de forma covalente a las carboxilasas por acción de la HCS. Las carboxilasas son sintetizadas como precursores inactivos o apocarboxilasas, que requieren ser biotiniladas para activarse o convertirse en holocarboxilasas mediante dos reacciones de biotinilación (antes mencionadas) que son catalizadas por las ligasas de biotina, esenciales para todos los organismos. Estas proteínas llevan a cabo la reacción de biotinilación de una forma similar a la HCS. Sin la unión de esta vitamina a sus respectivas carboxilasas dependientes de biotina, no se llevan a cabo las funciones metabólicas en las que intervienen.

La biotina debe consumirse en la dieta, pero el organismo también cuenta con un sistema de recambio de biotina, el cual se lleva a cabo mediante la hidrólisis de biocitina (biotin-N-lisina) que resulta de la degradación proteolítica de las carboxilasas llevado a cabo por la biotinidasa. En casos de ayuno prolongado se emplea la biotina reciclada como fuente de esta vitamina.

Deficiencia de biotina

En adultos, un factor que produce la deficiencia de biotina es el consumo excesivo de la clara de huevo crudo rica en avidina, una glicoproteína básica. La avidina es un homotetrámero que interactúa estequiométricamente con la biotina,

debido a que tiene una interacción de alta afinidad ($K_d = 1 \cdot 10^{-15}M$), uniendo una molécula de biotina por subunidad (Bender, 1992; Goldman, R. E. et. al.; 2002), formándose así un complejo avidina–biotina que es resistente al calor, a un amplio intervalo de pH y a la digestión por enzimas proteolíticas, propiciando su excreción e inhibiendo su absorción. También el uso de drogas anticonvulsivas inhibe la absorción, de la biotina, a nivel intestinal (Wolf, B. En Scriver, 1995).

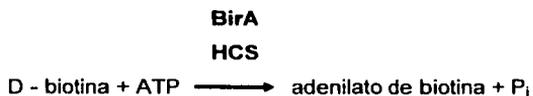
La deficiencia de biotina tiene un efecto indirecto sobre algunas reacciones enzimáticas involucradas en las rutas metabólicas de lípidos, carbohidratos y proteínas, antes mencionados. Un ejemplo de esto es la disminución de la actividad de la piruvato carboxilasa (PC) lo cual provoca hipoglucemia. Además, la deficiencia de biotina en el adulto también ocasiona dermatitis, glositis atrófica (inflamación de la lengua con pérdida total o parcial de las papilas gustativas), anorexia, náusea, dolor muscular, palidez y parestesias (sensaciones de hormigueo a nivel cutáneo) (Rechcigl, 1977). A este tipo de deficiencia se le llama deficiencia adquirida.

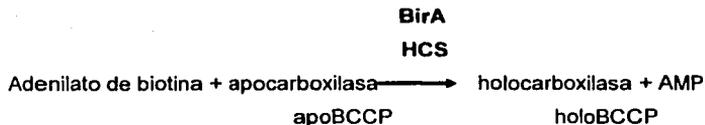
2.- BIOTINILACIÓN DE CARBOXILASAS

La unión covalente de la biotina a las carboxilasas, también llamada biotinilación, es catalizada por proteínas a las que se les llama ligasas de biotina, esenciales para todos los organismos. En organismos inferiores como las bacterias y las levaduras recibe el nombre de BirA y proteína ligasa de biotina, respectivamente. En los organismos superiores, esta proteína recibe el nombre de HCS.

Estas proteínas llevan a cabo la reacción de biotinilación de una forma similar y es necesaria para las funciones metabólicas en las que intervienen las carboxilasas.

Dicha biotinilación se lleva a cabo en dos reacciones separadas, ambas catalizadas por la misma enzima.





En la primera parte de la reacción la biotina es utilizada, junto con el ATP, como co-sustrato por la HCS o por la BirA para formar adenilato de biotina, del cual se transfiere el grupo biotinil del adenilato a un residuo específico de lisina de la apocarboxilasa, localizado en el tetrapéptido AMKM (ala-met-lys-met) que está conservado en todas las especies (Leon-Del-Rio, 1994). El tetrapéptido se encuentra en la BCCP o subunidad aceptora de biotina de la acetil CoA carboxilasa bacteriana, resultando en una holocarboxilasa activa (Chiba, 1994).

La subunidad BCCP de la ACC bacteriana interviene en la síntesis de ácidos grasos, así como en la formación de pared celular (Xu, et. al. 1995; Kwon, et. al. 2000; Chapman-Smith, 2001).

Cambios en la secuencia primaria de la enzima HCS pueden disminuir la afinidad por biotina afectando la biotilación de las carboxilasas. Consecuentemente, en humanos se puede presentar la deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC), que se diagnostica mediante la presencia en la orina de los metabolitos que resultan de la disminución en la actividad de las carboxilasas, el ácido 3-hidroxiisovalérico, ácido 2-metil cítrico, ácido 3-hidroxiisovalérico y 3-metil crotonil glicina (Thoene et. al., 1983; Zemleni and Mock, 1999).

3.- HOLOCARBOXILASA SINTETASA HUMANA (HCS)

Características

La clonación del gen de la HCS humana mostró que es una proteína monomérica de 726 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 80.76 kDa (Suzuki et. al., 1994; Leon-Del-Rio et. al., 1995). El gen humano que codifica

para esta proteína se encuentra en el cromosoma humano 21q22.1 (Suzuki, et. al. 1994; Zhang, et. al. 1997). Como se mencionó previamente existen proteínas homólogas en otros organismos como bacterias (Suzuki et. al., 1994), levaduras (Polyak et. al., 1999) y plantas (Tissot et. al., 1997), a las que se les llama ligasas de biotina y presentan la función de unir biotina a las carboxilasas correspondientes para cada especie.

Recientemente, se determinó una posible bifuncionalidad de la HCS, debido a que interviene en la transcripción de ciertos genes y en una cascada de señalización que lleva a la transcripción de genes nucleares (Solórzano et. al., 2002).

La proteína HCS presenta tres dominios funcionales; el dominio amino terminal, que no presenta una función determinada, aunque mutaciones en el cDNA codificante alteran la función enzimática de la proteína. Esto debido a que, al plegarse la proteína, estas mutaciones interactúan con el sitio de unión a biotina impidiendo la unión de la misma. El dominio central y el dominio carboxilo terminal, contienen la región homóloga a las ligasas de biotina de otros organismos incluyendo la región de biotinilación. En el dominio carboxilo terminal también se han reportado mutaciones presentes en pacientes, como G581S, entre otras.

Las mutaciones en HCS y sus características más notables se presentan en la tabla 1.

Mutación	Respuesta a biotina <i>in vitro</i> en líneas celulares humanas	% de disminución de la función (mutante vs. normal)
R183P	No reportada	1.7%
L216R	Nula	0.6%
L237P	No reportada	6%
V333E	No reportada	1-10%
V363D	Baja	0.14-40%
T462I	No reportada	1-10%
R508W	Excelente	25%
G518E	Moderada	5.1%
V550M	Moderada	0.14-40%
D571N	Baja	0.14-40%
G581S	No reportada	1-10%

Tabla 1: Características más importantes de las mutaciones presentes en HCS.

Estas mutaciones ocasionan el síndrome llamado Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC). Este tipo de deficiencia se conoce como temprana o neonatal, y se debe a mutaciones presentes en la secuencia de la HCS. La DMC se presenta desde primeros días de vida hasta antes de los tres meses.

La deficiencia múltiple de carboxilasas tardía o juvenil surge como consecuencia de mutaciones en la secuencia génica de la biotinidasa, que es la enzima encargada de reciclar la biotina. Se presenta después de los tres meses de vida, aunque algunos síntomas se presentan a los 3 años o en algunos casos en la adolescencia. Ambas enfermedades son de carácter autosómico recesivas.

Deficiencia Múltiple de Carboxilasas Neonatal (DMC)

En la DMC intervienen varios factores como: la deficiencia de biotinidasa, la deficiencia de biotina (que es suministrada en la dieta), y/o un mal funcionamiento de la enzima HCS caracterizadas por una baja afinidad por la biotina.

La DMC se presenta generalmente en neonatos antes de los tres meses y se origina como consecuencia de mutaciones en la secuencia génica de HCS, estas mutaciones han sido previamente identificadas y reportadas en pacientes con esta enfermedad.

Las mutaciones que se encuentran fuera del sitio de biotinylación hacia el extremo amino terminal son R183P (Sakamoto et. al. 1999), L216R, L237P en la que se forma un codón de paro en la lectura de la proteína (Yang et. al., 2001), V333E (Aoki, et. al., 1999), V363D (Dupuis et. al.,1996), (Suzuki et. al., 1994), (Sakamoto et. al., 1998), (Dupuis et. al., 1999), T462I y delG1067 (Aoki et. al., 1999). Las mutaciones que se presentan dentro del dominio catalítico de biotinylación en HCS son R508W, que se encuentra cerca del sitio de unión a ATP, G518E, V550M (Dupuis et. Al., 1996), D571N (Dupuis et. al., 1999), G581S y delT610 que se encuentra fuera del sitio de biotinylación, hacia el extremo carboxilo terminal, como se muestra en la figura 2 (Chiba et. Al., 1994).

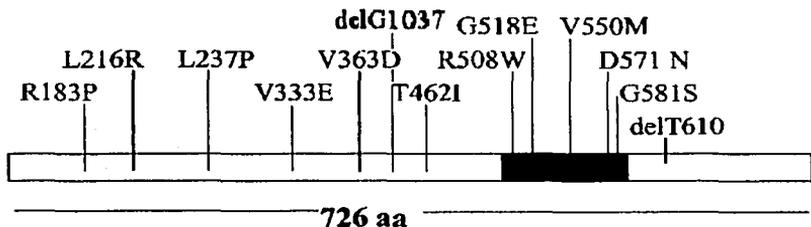


Figura 2: Distribución de las mutaciones presentes en holocarboxilasa sintetasa humana. Enmarcado en negro se presenta la región de biotinylación.

Sintomatología y tratamiento de la DMC

Los síntomas que se presentan a nivel bioquímico incluyen aciduria orgánica, hiperamonemia moderada, acidemia láctica y aciduria orgánica masiva, así como la excreción de metabolitos como ácido 3-hidroxiipropiónico, ácido 2-metil cítrico, ácido 3-hidroxiisovalérico y 3-metil crotonil glicina.

Entre las características de los pacientes hay problemas respiratorios, respiración rápida e hiperventilación, salpullido en la piel, alopecia, letargia, irritabilidad, problemas alimenticios acompañados de vómito, hipotonía (disminución del tono y la resistencia muscular) e hipertonia (aumento del tono muscular), crisis convulsivas y trombocitopenia (disminución en la cantidad de plaquetas circulantes), hipotermia, hiporeflexia (disminución de los reflejos), retraso en el desarrollo, y ataxia (presencia de movimientos descoordinados), temblores y en casos extremos estado de coma (Thoene, et. al. 1981; Thoene, et. al. 1983; Wolf en Scriver, 1995; Suormala, et. al. 1997).

La DMC puede detectarse durante el embarazo, demostrándose la baja actividad de las carboxilasas de amniocitos en cultivo. En tal caso, se administra a la madre dosis farmacológicas de biotina y no se presentan problemas al nacer (Wolf en Scriver, 1995).

En caso de presentarse problemas después del nacimiento o en los primeros años de vida, se regulan las funciones metabólicas dañadas mediante la administración oral de biotina en dosis farmacológicas, en ocasiones de 10 hasta 100 mg por kg de peso del paciente, durante toda su vida. En pacientes con DMC que presentan una actividad enzimática con una Km alta para la biotina se les administran dosis de 60 a 80 mg por día (Suormala et. Una al., 1997).

Deficiencia Múltiple de Carboxilasas Juvenil

La DMC juvenil se debe a defectos en el funcionamiento de la biotinidasa. Debido a la presencia de mutaciones dentro de la secuencia génica de la misma, que disminuyen la afinidad por biotina y es la encargada de reciclar la biotina resultante de la degradación proteolítica de las holocarboxilasas, la cual se lleva a cabo mediante la hidrólisis de biocitina (biotin - N - lisina) (Zempleni and Mock, 1999).

La biotinidasa se encuentra en todos los tejidos, incluyendo el jugo pancreático y la mucosa intestinal (Bender, 1992), teniendo una alta actividad en el hígado, riñón, suero y glándula adrenal (Wolf, B; en Scriver, 1995; Pomponio, 1998; Sakamoto, 1998).

Sintomatología y tratamiento

La DMC por deficiencia de biotinidasa se caracteriza por anomalías cutáneas y neurológicas, y algunos de los síntomas son muy parecidos a los que se presentan en la deficiencia causada por el mal funcionamiento de HCS, como convulsiones, hipotonía, ataxia, dermatitis, pérdida del cabello, retraso mental, acidosis cetoláctica y aciduria orgánica.

Un tratamiento con dosis farmacológicas de biotina a razón de 10 a 100 mg/kg de peso, durante toda la vida del paciente, puede revertir todos los problemas que se presentan en la deficiencia de biotinidasa (Wolf en Scriver, 1995; Hymes, 1995; Baumgartner, 1997; Hymes, 1999). El gen para biotinidasa se encuentra en el cromosoma humano 3p25 (Cole, 1994).

Secuencia mínima funcional de HCS

En estudios recientes, se obtuvieron varias formas truncadas de la HCS (Campeau, 2001). Entre estas variantes se encuentra una región que va del aminoácido lisina (K) 378 hasta el codón de término, residuo 726. Este fragmento se obtuvo mediante la pérdida del extremo amino terminal de la HCS con el empleo de exonucleasas.

Esta proteína truncada es de 349 aminoácidos, con un peso molecular de 41.5 kDa. Presenta el dominio carboxilo terminal de la proteína completa, en el que se encuentra la región consenso de biotilación. Ésta contiene también la región de contacto con la biotina, en el complejo de la estructura cristalográfica de *Escherichia coli* BirA–biotina, el sitio de unión al ATP y el segmento de secuencia (P/D)DGN(S/T) que también se presenta en plantas y levaduras. En esta secuencia mínima de 348 aminoácidos, la expresión de la proteína es igual a la proteína completa de 726 aminoácidos, así como la actividad de biotilación tanto *in vivo* como *in vitro*.

4.- HOLOCARBOXILASA SINTETASA BACTERIANA (Bir A)

La bacteria *E. coli* presenta una sola carboxilasa, la acetil CoA carboxilasa (ACC) con tres dominios funcionales: la carboxibiotina, una subunidad carboxilo de biotina (BC, biotin carboxylase) que es dependiente de biotina y ATP y que une la biotina de forma covalente a la subunidad acarreadora de grupos biotinilo a las proteínas biotinilables (BCCP, biotin carboxylase carrier protein), y la subunidad que transfiere grupos carboxilo (conocida como TC o transcarboxylase), a Acetil CoA para formar malonil CoA, que es el primer paso en la biosíntesis de ácidos grasos, como se puede ver en la figura 3 (Janiyani, et. al. 2001). Aquí la biotina actúa como cofactor enzimático de la ACC bacteriana.

A la ligasa de biotina bacteriana se le conoce como BirA, la cual está formada por 321 residuos de aminoácidos. Esta proteína BirA, además de biotinilar a la ACC, también actúa como represor de la transcripción de los genes involucrados en la biosíntesis del operón de biotina (Barker and Campbell 1981; León-Del-Río et. al. 1995; Streaker. al. 1999).

Dominios presentes en la ACC bacteriana

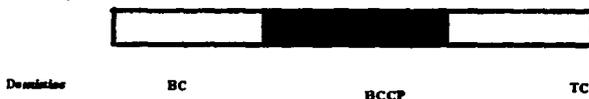


Figura 3. Dominios que conforman a la proteína ACC. BC, biotin carboxilasa; BCCP, subunidad acarreadora de grupos biotinilo a las proteínas biotinilables; TC, transcarboxilasa.

La estructura tridimensional de la holoproteína BirA se ha elucidado por cristalografía de rayos X, observándose que presenta conformaciones de un barril β , con la biocitina expuesta en una vuelta dentro del dominio conservado de biotinilación AMKM (Ala, Met, Lys, Met), en la subunidad BCCP (Wilson, et al. 1992; Chapman-Smith, et al. 1999). La proteína BirA plegada consiste de tres

dominios; el amino terminal que se une al DNA y presenta una conformación HLH (hélice, vuelta, hélice). El dominio central que contiene el sitio activo de la enzima, en este caso el dominio de biotilación y el dominio carboxilo terminal (Wilson, Shewchuk et al. 1992; Kwon and Beckett 2000).

La proteína BirA, es una proteína bifuncional, en las reacciones de biotilación forma el complejo adenilato de biotina-BirA que a mayores concentraciones favorece la función de catalizador en la unión de biotina a ACC (la única carboxilasa presente en bacteria). Así mismo a bajas concentraciones de la proteína apoBCCP, este complejo se acumula a niveles suficientes para saturar el operón de biotina y reprimir la transcripción de los genes que codifican para la biosíntesis de enzimas dependientes de biotina (Suzuki, et al. 1994; Xu and Beckett 1996).

5.- SEMEJANZAS ENTRE HCS Y BirA

La similitud entre estas dos proteínas se extiende 256 aminoácidos hacia el extremo carboxilo terminal. En este dominio hay una similitud de 120 aminoácidos y una identidad del 30% (Blast 2.0) con la ligasa de biotina bacteriana BirA como se puede ver en la figura 4. Dentro de esta región, tanto bacterias como humanos muestran un consenso en la secuencia que contiene la región de biotilación, que en bacterias también es el sitio de unión al ATP (Wilson, et al. 1992; Suzuki, et al. 1994; Chapman-Smith and Cronan 1999). Debido a estas semejanzas, se pueden dar reacciones cruzadas entre especies, en este caso, que la carboxilasa bacteriana pueda ser sustituida por la carboxilasa humana, en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.

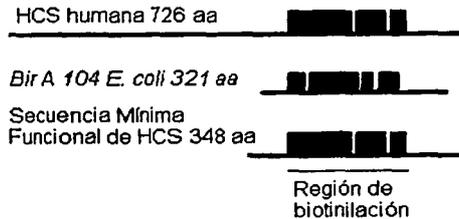


Figura 4. Regiones homólogas entre las ligasas de biotina bacteriana y humana.

6.- RUTAS METABÓLICAS REGULADAS POR HCS HUMANA

El papel bioquímico de la biotina en el metabolismo humano es como cofactor o grupo prostético para varias enzimas que llevan a cabo reacciones para la fijación de dióxido de carbono. A estas enzimas metabólicas se les llama carboxilasas, están implicadas en una variedad de reacciones que incluyen reacciones de desaminación, síntesis de purinas, síntesis de ácidos nucleicos, así como metabolismo de lípidos y carbohidratos, llevan unida biotina siendo así funcionales (Rechcigl, 1977).

En el humano existen cinco diferentes carboxilasas que son:

- La acetil coenzimaA carboxilasa 1 (ACC1), que interviene en la síntesis de ácidos grasos en el citosol y es abundante en tejidos lipogénicos. Esta carboxilasa cataliza la formación de malonilCoA a partir de acetilCoA, la ACC1 es activada alostéricamente por citrato e isocitrato y es inhibida por derivados de acetilCoA de ácidos de cadena larga, su activación está acompañada por polimerización y la inactivación es el resultado de la desagregación del polímero activo (Bender, 1992).
- La acetil coenzima A carboxilasa 2 (ACC2), presente en tejidos de escasa síntesis de ácidos grasos, como el corazón y el músculo, en los cuales se encarga de la oxidación de ácidos grasos, debido a la capacidad de malonil

CoA de inhibir a la enzima carnitil palmitoil transferasa 1, que internalisa los ácidos grasos a la mitocondria (Ha et. al., 1996). Esta enzima responde a fosforilación y desfosforilación, así como a una activación con citrato de forma similar a ACC1. Ambas enzimas son citosólicas (Abu-Elheiga, 1997; Zempleni and Mock, 1999; Boone, A. et. al.; 1999; Abu-Elheiga, et. Al. 2000). Las carboxilasas ACC1 y ACC2 están constituidas por una sola cadena polipeptídica.

- La β metil crotonil coenzimaA carboxilasa (MCC) cataliza en una reacción reversible la conversión de metilcrotonilCoA a metilglutaconilCoA (Bender, 1992), que es un paso esencial en el catabolismo de la leucina, así como de isoprenoides (Wolf, B. en Scriver, 1995; Praul et. al., 1998; McKean, et. Al., 2000). La MCC presenta una subunidad α larga, a la cual se le une biotina covalentemente y una subunidad β pequeña. Se localiza en la membrana interna de la mitocondria y se expresa en riñón e hígado (Baumgartner, 2001).
- La propionil CoA carboxilasa (PCC) es dimérica, siendo la subunidad α a la que se le une biotina (Campeau et al., 1999; Baumgartner et al. 2001). Esta carboxilasa interviene en el catabolismo de isoleucina, valina y lisina (Bonafe et al., 2000), así como de metionina y treonina. También interviene en la degradación de ácidos grasos de cadena impar (Lehninger, 1982) y del colesterol (Bender, 1992).
- La piruvato carboxilasa (PC) que es monomérica e interviene en la gluconeogénesis (Baumgartner et. al., 1997), sintetizando oxaloacetato a partir de piruvato, el oxaloacetato va directamente al ciclo de Krebs. Esta reacción es anaplerótica para órganos no gluconeogénicos. Esta enzima es activada alostéricamente por acetil CoA (Bender, 1992). También provee fuentes de carbono para la síntesis de aspartato y glutamato (Wolf, B. en Scriver, 1995), glutamina y sus derivados incluyendo urea (Wallace et al., 1998).

En el cerebro, la PC participa, a través del ciclo de glutamina y glutamato, en la formación de neurotransmisores como acetilcolina y ácido γ -aminobutírico

En algunos pacientes se presentan las mutaciones de manera heterociga, lo que impide diferenciar cuál de las dos mutaciones es responsable del fenotipo de dependencia de biotina del paciente. Sólo las mutaciones R508W, V550M y G581S se presentan en pacientes de manera homociga.

En este trabajo, se evaluó el efecto de una selección de las mutaciones en base a un alineamiento de secuencias, sobre la actividad de biotilación; así como la diferenciación de mutaciones heterocigas presentes en el cDNA codificante para HCS. También se determinó cuáles son las responsables del fenotipo de dependencia de biotina. Para esto se realizó un compendio de algunas de las mutaciones en HCS como T461I, R508W, V550M, D571N y G581S, presentes en esta secuencia mínima funcional de HCS. Reproduciendo cada una mediante técnicas de mutagénesis dirigida sobre el cDNA que codifica para la proteína HCS, ensayos de biotilación y un modelo de complementación funcional con *E. coli* BirA 104, una cepa termosensible que pierde la capacidad de biotilar a Acetil CoA Carboxilasa a 42° C.

Además, se elaboraron modelos moleculares de la proteína a partir de la estructura cristalográfica de BirA (Wilson et al., 1992), en la región de similitud para la secuencia de 348 residuos de aminoácidos de HCS, obteniendo modelos de la proteína normal, así como de las mutaciones localizadas dentro de la región de similitud. Esto permitió determinar si la producción de impedimentos estéricos en los sitios mutados, coincide con un mal funcionamiento de HCS.

III. HIPÓTESIS

La deficiencia múltiple de carboxilasas es una enfermedad autosómico recesiva, por lo que pacientes afectados tienen dos mutaciones diferentes en el gen de la HCS. Es posible que algunas mutaciones contribuyan al fenotipo de dependencia de biotina característica de la DMC.

La expresión del cDNA mutado de la HCS humana, en *Escherichia coli* permitirá la evaluación del efecto de estas mutaciones sobre la actividad de la HCS humana, mediante el empleo de un modelo bacteriano de biotilación de la subunidad BCCP.

IV. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fué caracterizar el efecto de las mutaciones elegidas presentes en el fragmento mínimo biotinilable de HCS sobre la actividad de biotinilación, aislando cada una de las mutaciones por separado y estudiando su efecto mediante la utilización de un modelo bacteriano.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener mediante mutagénesis dirigida, mutaciones representativas presentes en una secuencia mínima funcional de HCS comprendida entre el aminoácido lisina 378 y arginina 726.
- Expresar en un modelo bacteriano el cDNA que codifica para cada una de las mutaciones de forma independiente.
- Analizar en ensayos de biotinilación el comportamiento *in vivo* de cada una de las mutaciones generadas.
- Construir modelos estructurales enfatizando el efecto de cada una de las mutaciones sobre el sitio activo de biotinilación de HCS.
- Establecer un modelo bacteriano termosensible que permita diferenciar y analizar el efecto de mutaciones heterocigotas presentes en HCS.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

1.- Generación de mutaciones dentro de la secuencia génica de HCS

Para generar cada una de las mutaciones se utilizó una secuencia mínima de HCS humana de 348 aminoácidos (clonado en el vector de expresión pQE30 en los sitios *Sma I* y *Hind III* de la región de clonación múltiple) (Campeau and Gravel, 2001), con el sitio específico para cada mutación la cual mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), utilizando oligonucleótidos que contienen el cambio en la secuencia resultante de la reacción.

Los oligonucleótidos utilizados se presentan en la tabla 2 y están diseñados con base en la secuencia de cDNA de HCS y se nombraron de acuerdo al número de residuo de aminoácido a mutar utilizando la notación bioquímica de una sola letra para los residuos de aminoácidos. Cada oligonucleótido se diseño en sentido y en antisentido con el fin de recorrer el plásmido en direcciones opuestas.

Nombre	Secuencia
T462I sentido	5' aat ctg cag atc aag cag 3'
T462I anti sentido	5' gct tga tct gca gat ttt g 3'
R508W sentido	5' gag ggc aaa gga tgg gga ggg aat gtg 3'
R508W anti sentido	5' cac att ccc tcc cca tcc ttt gcc ctc 3'
V550M sentido	5' gtg gct gtc atg gaa gca 3'
V550M anti sentido	5' gct tcc atg aca gcc ac 3'
D571N sentido	5' gaa gtg gcc caa caa tat tta tta cag tg 3'
D571N anti sentido	5' cac tgt aat aaa tat tgt tgg gcc act tc 3'
G581S sentido	5' atg aag atc agc gga gtt 3'
G581S anti sentido	5' ccg ctg atc ttc atg ag 3'

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de mutagénesis dirigida a partir del fragmento mínimo de la HCS.

Las condiciones para cada reacción fueron: 5 μ l de amortiguador de reacción 10X, 50 ng de plásmido pQE30, 125 ng del oligonucleótido sentido, 125 ng del oligonucleótido anti sentido, 1 μ l de dNTP mix (di nucleótidos trifosfatados) y agua estéril a un volumen final de 50 μ l y 1 μ l de Pfu ADN polimerasa (2.5 U/ μ L). Las condiciones de temperaturas para las PCR's efectuadas en un Gene Amp PCR System 2400 para mutaciones puntuales fueron: 1 ciclo de 95°C por 30 segundos, 12 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto y 68°C por 12 minutos (2 minutos por cada mil pb del plásmido). Después con 1 μ l de Dpn1 se digirió toda la reacción a 37°C durante una hora. Este procedimiento se repitió una vez por cada mutación, siendo un total de cinco diferentes mutaciones. Para

obtener el DNA mutado se realizó una transformación en células competentes cepas XL1 Blue derivadas de *E. coli*.

A 90 μ l de células competentes se les agregó de 2 a 4 μ l de la muestra previamente digerida, que se agitó e incubó en hielo durante 30 minutos. Se dio un pulso de temperatura a 42°C durante 2 minutos. Se agregó 0.5 ml de medio NZY (10 g de NZ caseína hidrolizada, 5 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio + broth o un suplemento rico en sales = 12.5 ml MgCl₂ 1M, 12.5 ml MgSO₄ 1M y 20 ml de glucosa 20% por litro de medio), a las células competentes dejándolas crecer durante una hora a 37°C, en una incubadora con agitación a 225 (rpm). Se centrifugó un minuto, resuspendiéndose el botón en 100 μ l que se sembraron en placas de LB-agar (10 g de cloruro de sodio, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 20 g de agar por litro de medio) con ampicilina a 100 μ g/ml, incubándose a 37°C alrededor de 16 horas, siguiendo el protocolo de mutagénesis de Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene, mostrado en la figura 6.



Figura 6. Esquema de mutagénesis dirigida

1.1- Obtención de DNA de los plásmidos portadores de las mutaciones

Para cada una de las mutaciones se crecieron tres colonias, previamente obtenidas en la transformación del producto de PCR, en 200 ml de LB con ampicilina a 100 µg/ml toda la noche (16 horas) a 37°C en agitación a 225 rpm. Se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos en una centrifuga Sorvall RT7 dejándose a temperatura ambiente por 5 minutos y en hielo durante diez minutos, se resuspendió el botón en un amortiguador de lisis (50 mM de glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0) y se dejaron reposar 10 minutos en hielo. Se agregaron 8 ml de una solución 0.2 M NaOH/1% SDS y se dejaron reposar diez minutos en hielo. Se agregaron 8 ml de acetato de sodio 3 M pH 4.7 y reposaron 10 minutos en hielo. Se centrifugó 20 minutos a 4000 rpm. Se recuperó el sobrenadante, pasándolo por una gasa y al volumen obtenido se le agregaron 3/5 de isopropanol incubándose a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugaron 20 minutos a 4000 rpm. Se lavó el botón con 2 ml de alcohol etílico al 100% frío, resuspendiéndose el botón en 2 ml de una solución de cloruro de cesio (1 g de CsCl/ml de TE-10 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) y se agregaron 100 µl de Bromuro de Etidio (10 mg/ml), se pasó la solución a un tubo de ultra centrifuga Quickseal sellándose cada tubo por calor. Se centrifugaron en una ultra centrifuga Beckman 90 a 85000 rpm durante 3:30 horas. Se recuperó la banda inferior plasmídica la cual se hace visible iluminándose con un transiluminador de UV, (en este tipo de extracciones se obtiene DNA plasmídico y cromosómico, el correspondiente al plásmido se visualiza como la banda superior) (Ausubel et. Al. 1988), extrayéndose el bromuro de etidio con butanol en una proporción de dos volúmenes de butanol por volumen de DNA plasmídico. Al volumen obtenido se agrega TE hasta llegar a 4 ml que se precipitan con 1/10 de acetato de sodio 3 M pH 4.7 y 2 volúmenes de etanol frío al 100%. Se incubó toda la noche a 4°C. Se centrifugaron a 5000 rpm en una centrifuga Beckman con rotor SS34 con tubos de 50 ml por 20 minutos, se decantó y agregó etanol al 80% centrifugándose nuevamente en las mismas condiciones durante 10 minutos. El botón final se resuspendió en agua estéril o TE y se cuantificó en un espectrofotómetro Ultrospec 2000 a 260 nm (Ausubel et. al. 1988).

1.2- Obtención de las secuencias correspondientes para cada mutación

Para obtener las secuencias del cDNA de HCS portador de cada una de las mutaciones, se enviaron alícuotas de cada uno de los plásmidos (tres clonas por cada mutación diferente) al DNA Sequencing Facility en Northridge California U. S. A., junto con oligonucleótidos que se sintetizaron con base a la secuencia de cDNA de HCS que se presentan en la tabla 3. Cada secuencia se analizó mediante Blast 2.0 para verificar el cambio de aminoácido.

Nombre	Secuencia	Mutación obtenida
50pb462 anti sentido	5' atc gtt gtg ggg gtc act t 3'	T462I
70pb518 sentido	5' ctt aat agt gat cgc ggc 3'	R508W, V550M
60pb581 anti sentido	5' att gta ttc tgt gat gag gtc 3'	D571N, G581S

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos internos de HCS empleados para secuenciar cada una de las mutaciones generadas.

Con las muestras obtenidas (HCS no mutada, T462I, R508W, V550M, D571N y G581S así como el vector pQE30), se transformó la cepa bacteriana BirA 104 derivada de *E. coli* la cual presenta mayores requerimientos de biotina a 30°C (es auxótrofa para biotina) y es termosensible (Baker and Campbell 1981) a 42°C. Esta cepa presenta actividad de la carboxilasa bacteriana ACC a 30°C, pero ésta se inactiva a 42°C permitiendo actuar a la secuencia mínima de HCS humana en sus formas no mutada y mutadas para biotinilar BCCP. Todas las alícuotas de cultivos de BirA 104 se guardaron a -80°C en glicerol al 20%.

2.- Ensayo de expresión de proteínas recombinantes

Se partió de un cultivo de toda la noche a 30°C en medio LB, con o sin antibiótico, según sea el caso de portar o no un plásmido resistente a dicho antibiótico. Se hizo una dilución 1:500 en 50 ml del mismo tipo de medio hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 0.5 a 600 nm. Aquí se tomó una alícuota de 10 ml y se agregó IPTG (1-Isopropil-Beta-D-1-Tiogalactopiranosido) a una concentración de 1 mM dejándose a la misma temperatura por 2 horas 30

minutos. Se centrifugaron y resuspendieron en 100 μ l de amortiguador de fosfatos PBS 10X con inhibidor de proteasas a una concentración de 50 μ l/ml, se obtuvo el extracto de proteínas solubles mediante sonicación. Una vez sonicadas las muestras se centrifugaron para desechar restos celulares, trabajándose únicamente con las proteínas de la fracción soluble. Se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida de 40 μ g de proteínas totales, en un gel de acrilamida 4.5%-12% (Laemmli, U. K. 1970), la concentración de la proteína fue determinada por el método de Bradford, utilizándose una curva de Albúmina Sérica Bovina como estándar; las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) por duplicado, una de las membranas se tiñó con azul de Coomassie, para determinar que la cantidad de proteína fuera homogénea en todas las muestras y la otra membrana se incubó para detección de la proteína con el anticuerpo anti-histidina, debido a que el vector presenta un tallo de histidina, lo que facilita la detección de la proteína. Se incubó una hora con anti-histidina a una dilución de 1:1000 en BSA3%/PBST (amortiguador de fosfatos con 0.05% de Tween 20), se lavó con PBS dos veces y se incubó una hora con anti-ratón conjugado a peroxidasa en una dilución 1:2000 en BSA3%/PBST y para revelar la reacción y obtener una señal colorimétrica se utilizó aminobenzidina.

3.- Ensayo de biotinilación *in vivo* de las mutaciones obtenidas en HCS

Se partió de un cultivo de toda la noche, el cual se diluyó 1:500 en 50 ml de medio LB, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 0.5 a 600 nm.

De aquí se tomó una alícuota de 10 ml y se lavó dos veces en un medio mínimo en nutrientes llamado medio mínimo A 1X (medio mínimo 5X/ litro: 5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 22.5g KH_2PO_4 , 52.5g K_2HPO_4 y 2.5g de citrato de sodio dihidratado, (Ausubel et. al. 2000) y una vez en el mismo medio con suplementos (10 ml de Glucosa 20% y 1 ml de MgSO_4 1M) dejándose 20 min a 30°C.

Después se agregó IPTG en condiciones de esterilidad a una concentración de 1 mM incubándose por 40 min a 30°C, cambiándose la temperatura a 42°C durante 15 min, aquí se agregó biotina marcada (^{14}C -Biotin 50 μ Ci) a una

concentración final de 1.0 $\mu\text{Ci/ml}$ dejándose a esta misma temperatura por 2 horas 30 minutos.

Se hicieron tres lavados con agua estéril para eliminar la biotina marcada no incorporada, después se centrifugaron y resuspendieron en 100 μl de PBS 1X y se obtuvo el extracto crudo de proteínas mediante sonicación.

La concentración de proteína se obtiene de la misma manera que para la expresión antes mencionada.

Se hizo electroforesis con 30 μg de proteínas totales en un gel de poliacrilamida 4.5%-15% por duplicado, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF que se tiñó con Coomassie para determinar si la cantidad de proteínas era homogénea en todas las muestras. Esta misma membrana se puso a exponer en una pantalla sensible a radioisótopos durante cinco días, después de los cuales se determinó la cantidad de biotina incorporada con ayuda de un Analizador de Imágenes FX, Software Quantity One.

4.- Ensayo de complementación funcional en la cepa bacteriana BirA 104

Cada una de las construcciones en BirA 104 se crecieron en medio LB a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 – 0.5 a 600 nm.

De cada una de las muestras se hizo una dilución 1:500, de estas diluciones se tomó un μl en 50 μl y se esparcieron en placas de LB agar que contenían ampicilina a 100 $\mu\text{g/ml}$, IPTG a 2 mM con y sin biotina a una concentración de 5 μM .

Las placas se incubaron 1 h a 30°C, para que comenzara a actuar el IPTG y alrededor de 16 h a la temperatura de 42°C, para permitir inactivar a la BirA bacteriana y que el efecto observable fuera como consecuencia de la función enzimática de la secuencia mínima de HCS.

5.- Modelaje molecular

Con la finalidad de determinar de forma teórica los cambios que se presentan en el sitio activo de la proteína, se realizaron modelos moleculares de la

secuencia mínima funcional de HCS, y de cuatro mutaciones que están dentro de la región de similitud con la ligasa de biotina de *E. coli* conocida como BirA.

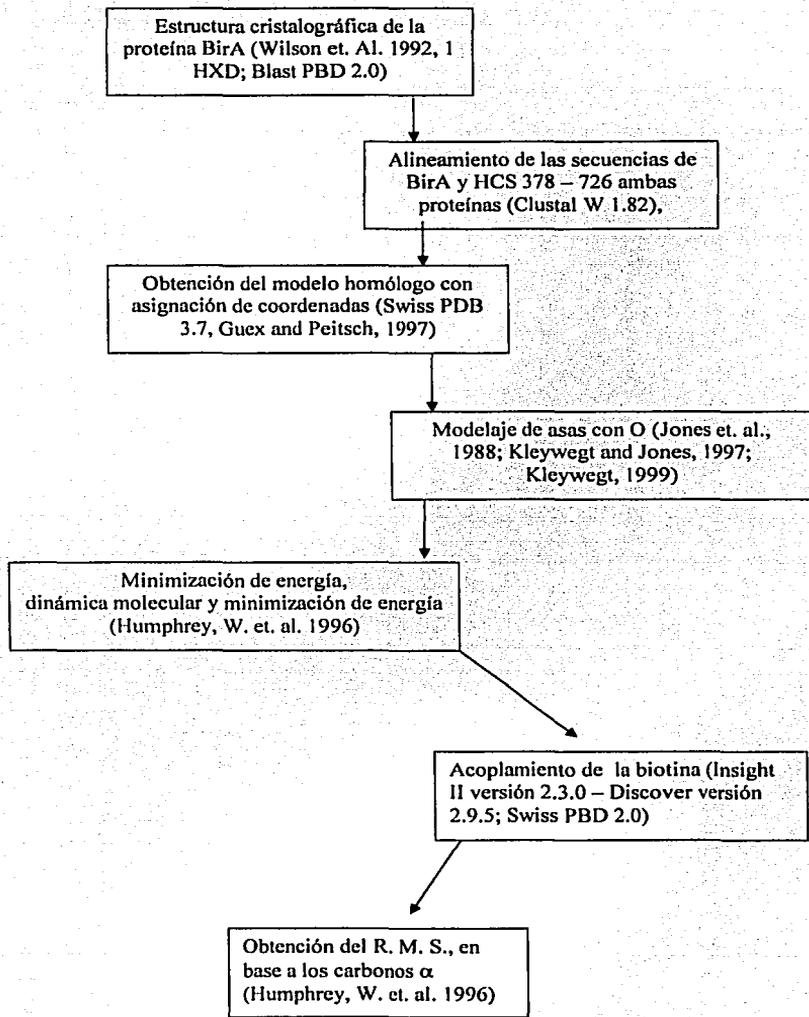
A partir de la estructura cristalográfica de la proteína BirA (Wilson et. Al. 1992, 1HXD; Blast PDB 2.0) la cual se tomó como estructura patrón, como paso inicial se tuvo el alineamiento de las secuencias de ambas proteínas (Clustal W 1.82), para obtener un modelo homólogo.

Una vez obtenido el modelo homólogo, se realizó una asignación de coordenadas (Swiss PDB 3.7, Guex and Peitsch, 1997), como el modelo presenta asas abiertos se realizó un modelaje de asas con O (Jones et. al. 1988, Kleywegt and Jones, 1997; Kleywegt, 1999). Una vez que se obtuvieron estas asas, se realizó un ciclo de minimización de energía, dinámica molecular y minimización de energía, lo que nos dio una molécula con mínima energía, a esta molécula se acopla la biotina (Insight II versión 2.3.0—Discover versión 2.9.5; Swiss PDB 2.0).

Para cada una de las versiones mutadas de la proteína se realizaron minimización de energía, dinámica molecular y minimización de energía (Humphrey, W. et. al. 1996).

Una vez obtenidos los modelos se procedió a obtener el R. M. S. (raíz por mínimos cuadrados), que es la medida de afinidad entre la estructura patrón y cada uno de los modelos, tomando en cuenta los carbonos α .

De una forma esquemática:



VII. RESULTADOS

Para seleccionar las mutaciones a realizar se determinó que fueran residuos conservados entre las proteínas ligasas de biotina de diferentes organismos, para lo que se realizó un alineamiento de secuencias, sólo de la secuencia mínima funcional de 348 aminoácidos que comienza en la lisina 378, se presenta en la figura 6.

H. s	358	FRRYEVLREILTLGLSCDMKQVPAITPLYLLSAEEIRDPTMOWLGKHVDSGIIKSKQ
S. c	273	LTPLEFAS-----AFNKRNYLQEVENNLAAHFCVHANNVELCSELNAET-DSECFYRY
A. t	13	FHLNLL-----VLRSLKPLHRSFSPFSASAVESDASCSLVLCGKSS-VETVAKC-
E. c	1	-----PKDNTVPLKLIALLAN---GFHSSP
*		
H. s	418	-----SLRFVSSYVSEVEITPSCPVPVTVNEAFSSSEH-FNDEIIPROVLCN-QEAKVI
S. c	325	RASYDAASSLLHKEPDEVFKTVIFPGVDEDLPPFYQTPNDEKVEFYINVQVNTLSSK
A. t	63	-----DKNNSLKLDPNTKVSLLLESEAKNIVKDDNS-FNLSLNSLITHT-RETRFL
E. c	24	Q-----GKETLGMRAAINKHITQLRLRDGWDVFTVPGKG-VSLEPEPIQLANAKOILSOD
*		
H. s	470	LEAEVTTPTMRLDGL--MEPTPQEMGLVTAARTECKSRGKRVLSVCAASLILIS
S. c	385	LYGEVAVSTSTILNNKSLSSIEPSTLDRVCTLVSGRGRGNTMININVCASHAVVT
A. t	115	LWSPLRSTTHLVG---HNFSELPVSEVYVTDIHFKCRVTRTKVWESKQCLIMYSFTE
E. c	78	GGSAVLPVVIDSTNOYLLDRIGELKSDACLAEYQADRRRRKKESEFANLYLSYFW
*		
H. s	528	ILPLRSQLG---QRIPFVHILMSVAVVEAVRSHP-----EYQDINLRVQVWNEITVYSD----
S. c	445	VPLQSPVTVNRNISVVFVYLSMLAYCKAKLSYAP-----GFSDIPKIKWIKELVALSPTYTK
A. t	171	VED---G-----RVPLICVYVSLAVISAVDYCDKKGLPYDCKKIKWIKELVFN
E. c	138	RLEQ---GP-----AAAIGSLVIGIVVAEIVLRQLG-----ADKVVKRWIKELVQLQ-----
*		
H. s	577	-----LKKIGVIVNNSHLM-GETSYILLICDFPVTNSNFI
S. c	503	RKNLKLVTGFEHTKPLGDIEPAYLISRLNTHFI-NNKYCLLLCQVITSDGQPT
A. t	218	-----GLVVGRIICTSYR-SKKNVSVVVLVINDGQPT
E. c	181	-----DRKLAHLELIGKTKGDAACVLEAHRAMRR--V
*		
H. s	612	GINDLITEYSKQ---HKAELKPLRATYIARVVTVEKLIKGFQDKKPNVPLPLRYK
S. c	562	SUCWIDILNEERQQLHLDLLPAKAKKCALYNNLEVILKGINYAAAEITPSPTEK
A. t	253	CLN-----AVLKG---MAPESNLKREITLCAFFHKFEGFDLDMQCFKSELERTV
E. c	215	EES---VVLQG-WITLQEAGINDRNTLARMLEIRRAAEISEQEL---EAPLISRN
*		
H. s	668	VHSCQQLIC-----SAEGPKVSIVLDSDSFFLVQVCE-----GPEVTVVHFNSEMLR
S. c	622	LHNSVIVLDPHGNTQAMITGITDYGLLTAKELVSGSSQTQFTNVMYVNOPTNITPIFK
A. t	305	LHSQRVIVEDKVEDQVVQVNVVITQITSSVYLVAVGSD---DNOYELHFNSEMLR
E. c	266	EKLDFNINRPVKLLIGDKEIFGISRHLDKCAALDECD-----SIKPKVWGGEISLRSAE
*		
H. s	719	NLILKRRR-
S. c	682	SLIAKRVQS
A. t	361	GLVRRKI--
E. c	321	K-----

Figura 6. Alineamiento de secuencia de las diferentes ligasas de biotina en donde se muestran en cajas negras los residuos idénticos y en cajas grises los residuos similares. H. s, *Homo sapiens*; S. c, *Saccharomyces cerevisiae*; A. t, *Arabidopsis thaliana*; E. c, *Escherichia coli*. Marcado con un asterisco esta sitio de cada mutación trabajada. Boxshade 3.21

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.- Mutagénesis dirigida.

En este trabajo mediante el empleo de mutagénesis dirigida se obtuvieron las siguientes mutaciones dentro de una secuencia mínima funcional de 348 residuos en la que está presente una región consenso de biotilación así como el sitio de unión a ATP (residuo 508).

Residuo mutado	Base cambiada	Residuo resultante.
Treonina 462	acc → act	Isoluecina
Arginina 508	cgg → tgg	Triptofano
Valina 550	gtg → atg	Metionina
Ácido aspártico 571	gat → aat	Asparagina
Glicina 581	ggc → agc	Serina

Tabla 4. Secuencia donde se muestra el cambio de base (en negritas), para cada una de las mutaciones generadas en HCS (tomado de Yang, et. al. 2001).

Para distinguir físicamente la distribución de las mutaciones dentro del cDNA de la secuencia mínima funcional de HCS, éstos se presentan en un mapa lineal, donde se determina la región de biotilación como se ve en la figura 7.

Holocarboxilasa sintetasa (fragmento mínimo funcional de 348 aa)

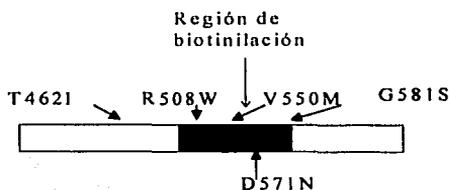


Figura 7. Mapa lineal de las mutaciones en un fragmento mínimo funcional de holocarboxilasa sintetasa obtenidas por mutagénesis dirigida.

Una vez obtenidas todas las mutaciones deseadas, se transformaron células BirA 104, una cepa derivada de *E. coli* que presenta ACC que es biotinilada por la proteína BirA 104.

Esta proteína BirA 104 se inactiva a altas temperaturas de crecimiento como 42°C y es comúnmente activa a temperaturas de 30°C, debido a una mutación que la hace termosensible e incapaz de recuperar sus funciones enzimáticas y de represor del operón de biotina (Barker and Campbell, 1981).

2.- Expresión de HCS no mutada y de las diferentes mutaciones generadas

Con la finalidad de determinar el efecto de las mutaciones en la producción de la proteína se realizaron experimentos de expresión de la proteína la cuál se detectó por anticuerpos, en este caso, anti-histidina, en la figura 8 podemos ver que la carga de proteínas es homogénea.

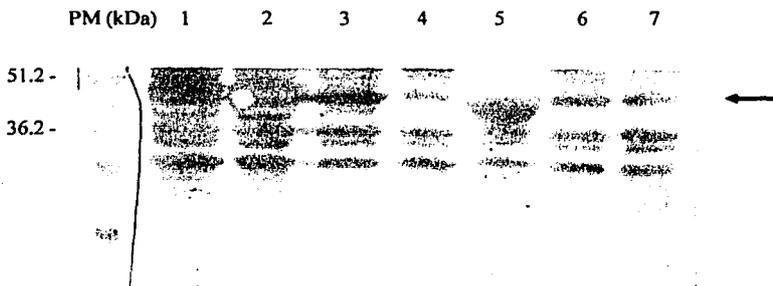


Figura 8. Tinción con azul de Cómase. En cada uno de las muestras se fraccionaron 50 µg de proteínas totales. 1) BirA 104 – p QE30, 2) BirA 104 – HCS N, 3) BirA 104 – HCS T462I, 4) BirA 104 – HCS R508W, 5) BirA 104 – HCS V550M, 6) BirA 104 – HCS D571N, 7) BirA 104 – HCS G581S. La flecha indica la altura en donde se debe de encontrar la proteína HCS, a 41.5 KDa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.- Expresión de proteína con anti-histidina.

Con el propósito de determinar la expresión de HCS y de cada una de las mutaciones generadas, se fraccionaron 50 µg en gel de poliacrilamida 12%.

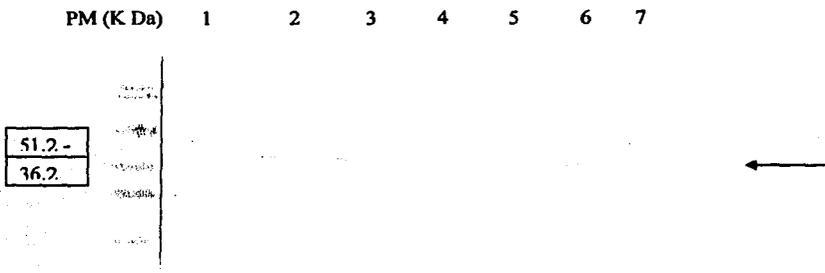


Figura 9. Expresión de HCS mediante detección con anti-histidina. En cada una de las muestras se fraccionaron 50 µg de proteínas totales. 1) BirA 104 – p QE30, 2) BirA 104 – HCS N, 3) BirA 104 – HCS T4621, 4) BirA 104 – HCS R508W, 5) BirA 104 – HCS V550M, 6) BirA 104 – HCS D571N, 7) BirA 104 – HCS G581S. La flecha indica el tamaño correspondiente a HCS de 41,5 K Da.

En este ensayo, se empleó BirA 104 transformada sólo con el vector p QE30, como un control negativo de expresión, como se puede ver en el carril 1.

4.- Complementación funcional de proteína con BirA 104

Los ensayos de complementación funcional se realizan a 42°C (temperatura no permisiva para BirA 104), con IPTG y en presencia y ausencia de biotina.

Este ensayo determinó si la biotilación observada en las diferentes formas de HCS no mutada y mutadas es suficiente para complementar la función de BirA bacteriana para lo cual se realizaron experimentos de crecimiento a 42° C (figuras 10 a 16).

BirA 104

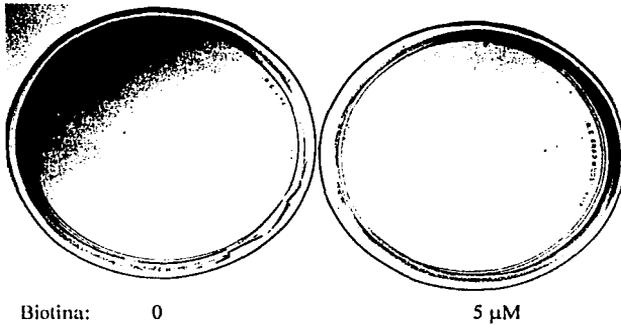


Figura 10. Esta figura representa el crecimiento de BirA 104, en la parte izquierda está el crecimiento en medio LB sólido sin adicionarle biotina y en el lado derecho se muestra el crecimiento, una vez que se le adicionó a una concentración de 5 μ M, tomándose esto como un control negativo.

HCS no mutada

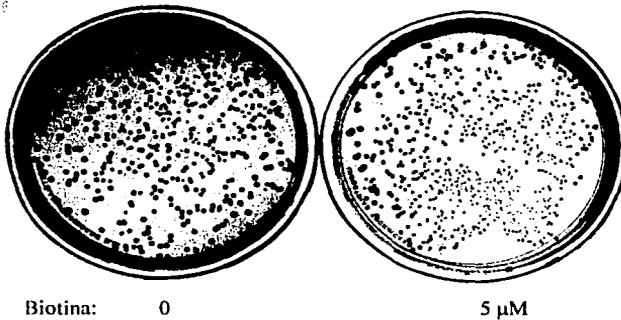


Figura 11. Esta figura representa el crecimiento de HCS no mutada, en la parte izquierda está el crecimiento en medio LB sólido sin adicionarle biotina y en el lado derecho se muestra el crecimiento, una vez que se le adicionó a una concentración de 5 μ M, tomándose esto como un control positivo.

T462I

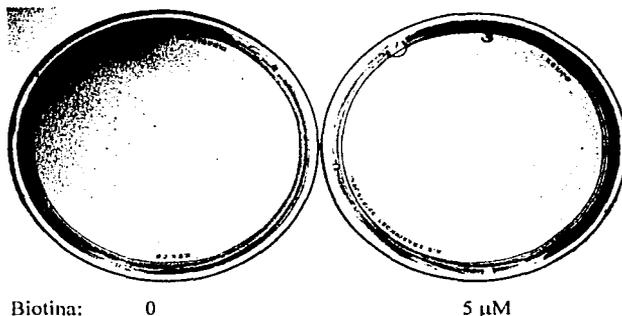


Figura 12. Esta figura representa el crecimiento de la mutación T462I, en la parte izquierda está el crecimiento en medio LB sólido sin adicionarle biotina y en el lado derecho se muestra el crecimiento, una vez que se le adicionó a una concentración de 5 μ M.

R508W

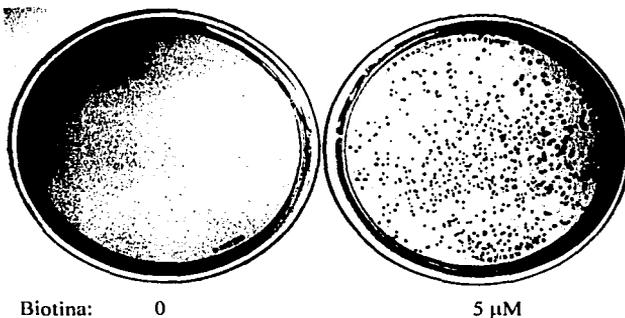


Figura 13. Esta figura representa el crecimiento de la mutación R508W, en la parte izquierda está el crecimiento en medio LB sólido sin adicionarle biotina y en el lado derecho se muestra el crecimiento, una vez que se le adicionó a una concentración de 5 μ M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V550M

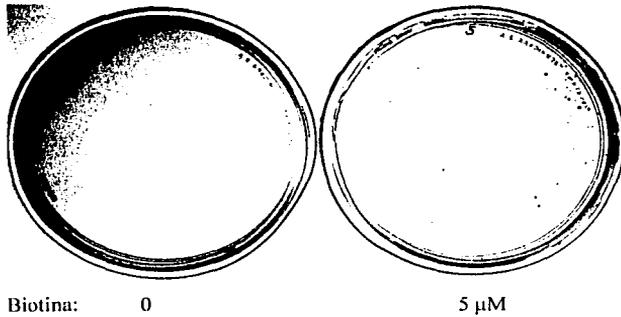


Figura 14. Esta figura representa el crecimiento de la mutación V550M, en la parte izquierda está el crecimiento en medio LB sólido sin adicionarle biotina y en el lado derecho se muestra el crecimiento, una vez que se le adicionó a una concentración de 5 μ M.

D571N

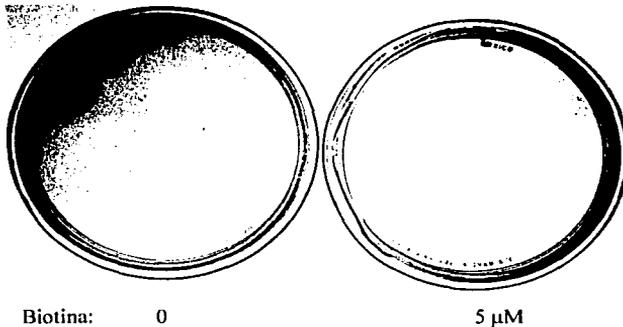


Figura 15. Esta figura representa el crecimiento de la mutación D571N, en la parte izquierda está el crecimiento en medio LB sólido sin adicionarle biotina y en el lado derecho se muestra el crecimiento, una vez que se le adicionó a una concentración de 5 μ M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

G581S

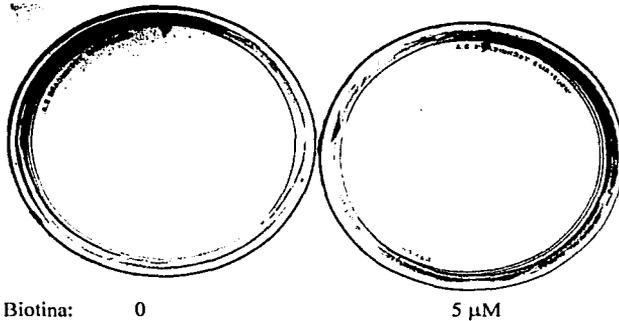


Figura 16: Esta figura representa el crecimiento de la mutación G581S, en la parte izquierda está el crecimiento en medio LB sólido sin adicionarle biotina y en el lado derecho se muestra el crecimiento, una vez que se le adicionó a una concentración de 5μM.

En los ensayos de complementación funcional, se tomó como un control negativo a la cepa BirA 104 y como un control positivo a la misma cepa transformada con HCS K378-726.

En la tabla 5 se presenta un resumen de las figuras 10 a 16, este experimento es únicamente cualitativo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Mutación	Crecimiento	Observaciones
BirA 104	-	Control negativo
HCS no mutada	+++	Control positivo
T462I	-	No hay complementación
R508W	++	Buena complementación
V550M	+	Complementación regular
D571N	-	No hay complementación
G581S	-	No hay complementación

Tabla 5. Resumen de los resultados de crecimiento a 42°C en BirA104. "-": sin crecimiento, "+++": colonias con diámetro de 3 mm, "++": colonias de 1.5 mm de diámetro.

5.- Biotinilación semi- cuantitativa de BCCP.

En este experimento de biotinilación cuantitativa se intentó determinar el efecto sobre la biotinilación, de cada una de las construcciones en BirA 104, para ello se realizó un ensayo de biotinilación *in vivo* empleando biotina marcada, a una temperatura de 42°C. La biotinilación observada se debió a la actividad de HCS sobre BCCP. La actividad de BirA queda inactivada como se puede ver en la figura 17 A y B.

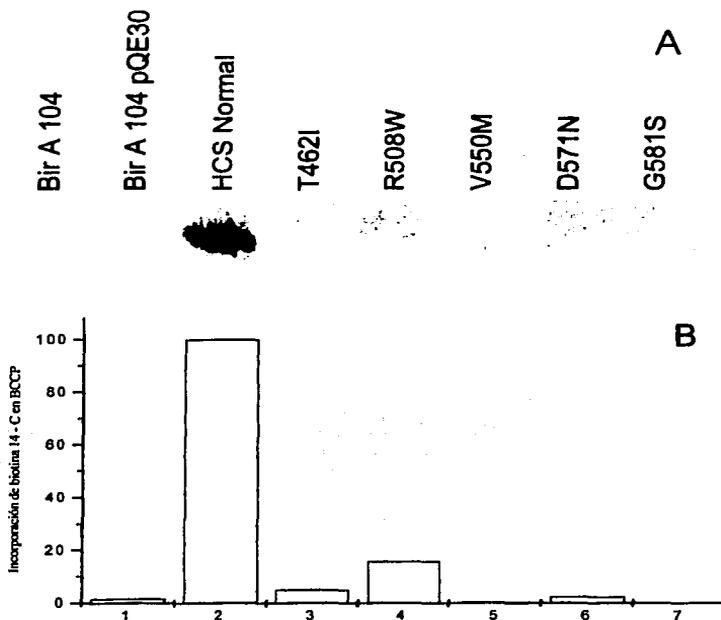


Figura 17. En el panel A, se presenta el autorradiografía de biotinilación de HCS no mutada y de las diferentes mutaciones. El panel B nos muestra la gráfica de biotinilación, en donde se presenta el mismo orden que en el auto radiografía. Se omitieron los datos correspondientes a la biotinilación de BirA 104 sin vector. Esta gráfica fue obtenida a partir de datos de cuantificación densitométrica de cada una de las muestras presentes en el panel A.

Aquí, HCS humana no mutada y las diferentes mutaciones generadas son las que biotinilan a BCCP, ya que la carboxilasa bacteriana se inactivó al ser incubada a 42°C aún en presencia de biotina marcada. HCS normal se toma como un control positivo.

En este ensayo, la mutación R508W, biotinila en un 15.7% la mutación T462I biotinila en un 5%, la mutación V550M no presenta biotinilación ya que está

por debajo del control negativo, la mutación D571N biotinila en un 2.4%. Puede decirse que las mutaciones que presentan actividad residual son R508W y D571N. Comparando a cada una de las mutaciones generadas con la proteína HCS no mutada, a la cual se consideró como un 100% de actividad.

6.- Modelaje molecular

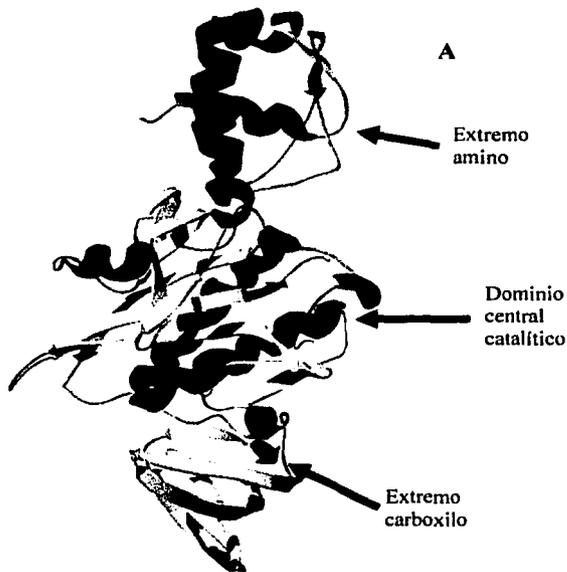
Como una explicación teórica a los experimentos anteriores, se realizaron modelos estructurales de cada una de las construcciones, a partir de la estructura cristalográfica de BirA 104, en una técnica de modelaje por homología. Esto para determinar las interacciones de las formas de HCS humana mutadas con el sitio de unión a biotina del modelo homólogo.

Para obtener las estructuras de cada una de las mutaciones se hicieron alineamientos con la estructura molde (BirA), una medida de similitud estructural es el R. M. S. (raíz por mínimos cuadrados), que se obtiene tomando en cuenta los carbonos α de las moléculas afines, cuyos valores se presentan en la tabla 6.

Molécula	Valores de R. M. S.
HCS Normal	1.85
HCS C/ mutación R508W	1.25
HCS C/ mutación V550M	1.26
HCS C/ mutación D571N	1.86
HCS / mutación G581S	1.24

Tabla 6. Valores de R. M. S. entre las estructuras de las formas mutadas y no mutadas de la HCS.

El modelaje estructural del fragmento mínimo y de las mutaciones que están dentro de la región de homología con BirA 104, se presenta en las figuras 18 a 22.



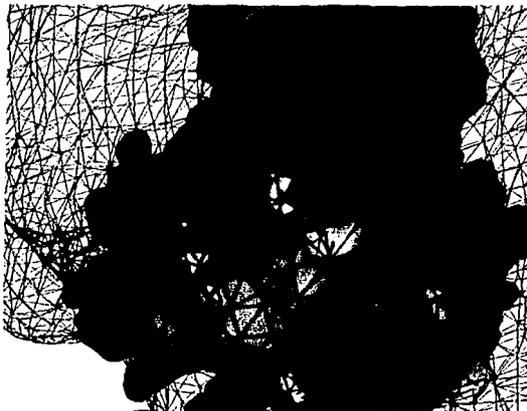
B



Figura 18. Modelos estructurales de la proteína HCS no mutada, en donde se muestra la estructura secundaria del modelo homólogo en A y en el panel B, se presenta la distribución de cargas en el sitio de unión a biotina. En A; rojo, alfa hélices; amarillo, hojas β . En B; rojo, cargas negativas; azul, cargas positivas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



B

Figura 19. Modelos estructurales de la mutación R508W. En el panel A, se presenta la estructura secundaria de la mutación, enfatizando la interacción del triptofano con la biotina. En el panel B, el sitio de unión a biotina se encuentra obstruido por cargas negativas (malla roja).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 20: Representación esquemática de la estructura secundaria en la mutación V650M, en donde se define la fragmentación de cavidades intraproteínicas. En el panel A, están las cavidades internas de la proteína no mutada en azul turquesa enmarcado se distingue la valina. En el panel B, hay fragmentación de cavidades debido a la mutación de valina por metionina. Enmarcado se distingue la metionina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

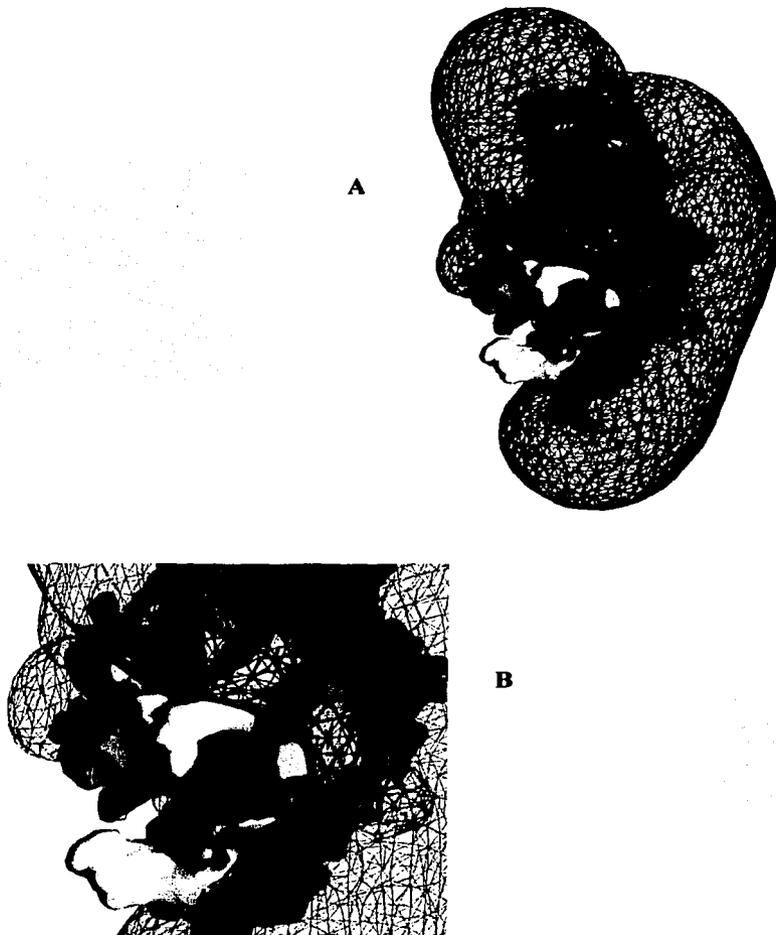


Figura 21. Representación del mapa de isotencial correspondiente a la mutación D571N. El panel A muestra la distribución de cargas a lo largo de toda la proteína y el panel B, es un acercamiento del sitio de unión a biotina, en donde, se da un cambio de cargas locales, lo que impide de biotina al sitio catalítico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



A

B

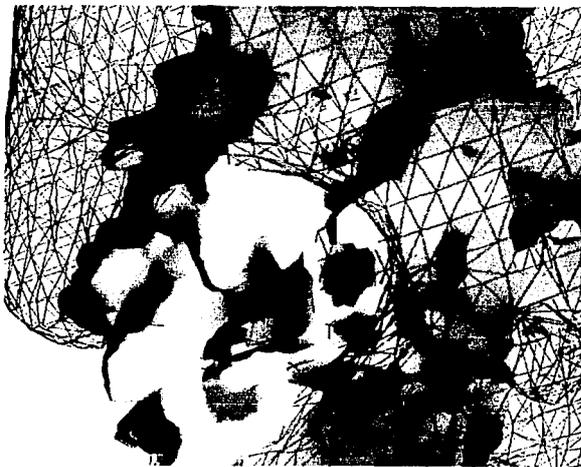


Figura 22. Mutación G581S. En el panel A se muestra la estructura secundaria del sitio de unión a biotina, enfatizando la serina al interactuar con la biotina. En el panel B, se presenta el mapa de isopotencial en donde se distingue el cambio de carga en el sitio de unión a biotina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para la realización de las estructuras correspondientes, se utilizó la técnica de modelaje por homología, por lo cual no se pudo obtener el modelo estructural de la mutación T462I, que se encuentra fuera de la región homóloga con la proteína BirA (1HXD, Weaver, et. al. 2001) que sirvió como estructura molde.

El modelo homólogo resultante está conformado por tres dominios que son, el dominio amino terminal, que en el modelo templado es el dominio de unión a DNA (Streaker and Becket, 1999). Un dominio central en donde se encuentran todas las construcciones de mutaciones de la proteína HCS K378-726, en este dominio también se encuentra el sitio de unión a biotina del modelo homólogo y un dominio carboxilo terminal como se puede ver en la figura 18, panel A. En cuanto a la distribución de cargas en modelo homólogo, el sitio de unión a biotina presenta carga positiva de forema localizada y se encuentra rodeado por cargas positivas (malla azul, figura 18, panel B).

En el caso de la mutación R508W; se pudo determinar que la interacción de los anillos del triptofano que es el aminoácido resultante debido a la mutación con los anillos de tiofeno de la biotina. Esta mutación presenta un efecto de eliminación de la carga positiva lo que se puede ver en la figura 19 panel B, de igual manera, el sitio de unión a biotina se encuentra rodeado por cargas negativas (malla roja) y por consiguiente una modificación en la polaridad del sitio de reconocimiento a biotina. De igual manera, el sitio de unión a biotina se encuentra rodeado por cargas negativas.

En el caso de la mutación V550M, esta mutación se encuentra muy lejos del sitio de unión a biotina, atrás de la hoja β del sitio de unión a biotina lo que se puede ver en la figura 20, esto estructuralmente no afecta la funcionalidad de la proteína pero si se presenta la mutación provoca la modificación y fragmentación de una cavidad intraproteínica en tres partes, esta mutación lo que modifica es la cantidad de agua intraproteínica que provoca una diosminución del sitio de unión a biotina y consecuentemente su rechazo.

En el caso de la mutación D571N, se presenta una modificación global en la distribución de las cargas dejando libre el sitio de unión a biotina, también en esta mutación se presenta una pérdida de la carga negativa en el sitio de reconocimiento a biotina quedando igual que la proteína no mutada lo que se

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

puede ver en el panel B de la figura 21. No existe impedimento estérico pero se ve afectada la capacidad de reconocimiento de la biotina.

En el caso de la mutación G581S, la presencia de la glicina por serina provoca modificaciones en el volumen del sitio de reconocimiento de la biotina (panel A, figura 22). Presentándose también cargas negativas localizadas en el sitio catalítico. Esta mutación provoca impedimentos estéricos que impiden la entrada de la biotina al sitio de unión, ya que reducen el volumen del sitio de unión que se distingue en el panel B de la figura 22.

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el alineamiento de secuencias observamos que el aminoácido treonina 462 se encuentra conservado solo en *Arabidopsis thaliana* y *Homo sapiens*, pero lo interesante de estudiar este residuo, es que se encuentra fuera de la región de biotilación así como de la región de similitud con BirA y también es un sitio donde la mutación por isoleucina tiene muy baja incidencia en pacientes con DMC. El residuo arginina 508 se encuentra conservado en todos los organismos, siendo este en bacteria el sitio de biotilación y en humanos en sitio de unión al ATP. El residuo valina 550 no se encuentra conservado en las secuencias analizadas, sin embargo, la mutación en este sitio es muy común en pacientes con DMC. El residuo de ácido aspártico en el sitio 571, se encuentra conservado en todos los organismos de las secuencias analizadas y el residuo de glicina 581 solo se encuentra conservado en *Arabidopsis thaliana* y *Homo sapiens*, (figura 6) con estos criterios se realizaron ensayos de mutagénesis dirigida y después cada una de las mutaciones se analizó funcionalmente.

En las construcciones de cada una de las mutaciones en HCS, se expresa la proteína en igual cantidad. Lo que nos determina que la presencia de la mutación en el gen no afecta la traducción de la proteína (figura 9), pero sí puede afectar la función de la misma. Lo cual se determinó con ensayos de biotilación, tanto bacteriano como radioactivo cuantificable (*in vivo* e *in vitro*).

El ensayo bacteriano al que hemos llamado de complementación funcional, se desea establecer como un sistema de diagnóstico intrahospitalario para la deficiencia múltiple de carboxilasas.

En este ensayo, la densidad de crecimiento bacteriano es directamente proporcional a la actividad residual de la proteína. Por lo que podemos decir, que las mutaciones en HCS que presentan una actividad residual son R508W y V550M en presencia de biotina (5 μ M) (figuras 13 y 14). Las que no responden a biotina son T462I, D571N y G581S), debido a que no presentan un crecimiento bacteriano a 42°C (figuras 12, 15 y 16). En *E. coli* se inactiva la actividad de la ligasa de biotina BirA a 42°C, que es necesaria para la función enzimática de la carboxilasa ACC e interviene en la formación de pared celular. La cepa BirA 104 no presenta crecimiento a la temperatura trabajada y se emplea como un control negativo (figura 10).

Los experimentos de complementación funcional permitieron de una forma sencilla, determinar el papel de cada mutación dentro de la secuencia del cDNA del fragmento mínimo funcional de la HCS humana. Este tipo de ensayo puede ser utilizado para la determinación funcional de nuevas mutaciones en la secuencia del cDNA codificante para HCS, que pudieran ser detectadas posteriores a este trabajo. Este experimento, nos da una idea de la presencia de una mutación en el gen de HCS, y si esta mutación es responsable del fenotipo presente en los pacientes que presentan la deficiencia múltiple de carboxilasas.

Para observar el efecto que tuvieran estas mutaciones en la función de la proteína HCS humana, se realizaron ensayos de biotilación, que pudieran ser cuantificables, utilizando la cepa bacteriana BirA 104. En este experimento se utilizó la cepa BirA 104 transformada con el vector pQE30 como un control negativo, esto con la finalidad de que todas las muestras estuvieran en las mismas condiciones. Como un control positivo se utilizó la HCS no mutada transformada en BirA 104 a lo que se va a tomar como el 100% de biotilación de la proteína (figura 17 A y B).

De acuerdo a los resultados de biotilación y a la actividad residual de las mutaciones se pueden ordenar de la siguiente forma: R508W, T462I, D571N, V550M y G581S. La actividad de biotilación se da en forma descendente.

En una conjunción de los resultados de ambas maneras de determinar la biotinilación tenemos que para las mutaciones D571N y para T462I esta biotinilación no es suficiente para presentar un crecimiento bacteriano, como se dio en la mutación V550M. Esta mutación, responde ligeramente a la adición de biotina, al medio de crecimiento a una temperatura de 42°C, por lo que se presentan resultados incongruentes ya que no biotinila pero presenta crecimiento bacteriano como se puede ver en las figuras 14 y 17. Esto puede ser debido a que se produce una proteína inestable que se degrada muy fácilmente cuando las células bacterianas que la portan son sometidas a un proceso de lisis. G581S es la mutación, que se ve más afectada ya que no biotinila ni se presenta crecimiento bacteriano a 42°C.

La modelación del fragmento mínimo de HCS humana permitió vincular los estudios de mutagénesis a nivel de biotinilación con cambios en la estructura espacial de HCS. En el diseño de estructuras moleculares tenemos que la mutación R508W es la que mejor responde a biotina presentando una mayor actividad, debido a que el triptofano presenta anillos aromáticos que favorecen la interacción con los anillos de la biotina debido al reconocimiento hidrofóbico entre anillos que se puede ver en la figura 19, panel A. Los pacientes que presentan esta mutación requieren una mayor cantidad de biotina en forma de dosis farmacológicas. El exceso de biotina nos dice que el proceso de incorporación de biotina a las respectivas carboxilasas humanas es más lento y por consiguiente se requiere mayor concentración de biotina para que la carboxilasa tenga tasas de absorción más eficientes.

En el caso de la mutación V550M hay distancia espacial del sitio de unión a biotina que se puede ver en la figura 20, así como de 172 pb de la lisina 378, que es donde comienza la secuencia del fragmento mínimo de la HCS humana. Estructuralmente no se ve afectada la funcionalidad de la proteína HCS humana, pero si se presenta la mutación se provoca la modificación y fragmentación de cavidades intraproteínicas, modificándose la cantidad de agua intraproteínica; esto probablemente provoca una restricción en el movimiento de las cadenas laterales y una disminución en la flexibilidad del sitio de unión a biotina con posterior rechazo de la misma, durante su incorporación en BCCP. Esto explica la falta de

incorporación de biotina marcada en la biotilación *in vivo* de la mutación V550M de la HCS humana, así como el crecimiento bacteriano observado en los ensayos de complementación funcional.

En la mutación D571N no existe impedimento estérico por interacción de aminoácidos con el sitio de unión a biotina, pero sí se ve afectada la capacidad de reconocimiento de la biotina (figuras 17 y 21), por lo que podemos decir que se requieren de dosis de biotina más elevadas de las empleadas en los experimentos previos (5 μ M) para manifestar una recuperación del fenotipo en pacientes con DMC. Esto debido a cambios en la distribución de cargas localizadas en el sitio de unión a biotina (figura 21) lo que explica la ausencia de un crecimiento bacteriano (figura 15) y la escasa actividad de biotilación (figura 17).

En el caso de la mutación G581S, la presencia de serina por glicina provoca modificaciones en el volumen del sitio de reconocimiento de la carboxilasa como se puede ver en el panel A de la figura 22. Esta mutación provoca impedimentos estéricos que impiden la entrada de la biotina al sitio de unión, ya que reducen el volumen del sitio de unión a biotina. Esto explica que no se presente crecimiento bacteriano (figura 16) ni actividad de biotilación (figura 17) a las concentraciones de biotina utilizadas en los experimentos previos.

En todas de las mutaciones existen cambios en el potencial electrostático tanto a nivel local como de la proteína (figuras 18 a 22). Pero los más evidentes son los que se encuentran localizados en el sitio de reconocimiento de la carboxilasa ya que estas modificaciones de pérdida de cargas alteran la capacidad de reconocimiento de la proteína por la biotina.

IX. DISCUSIÓN.

La mayoría de los estudios realizados sobre las mutaciones presentes en holocarboxilasa sintetasa han sido realizados en líneas celulares de pacientes que presentan deficiencia múltiple de carboxilasas, principalmente fibroblastos (Dupuis, 1999; Suzuki, 1994). Para la detección de las mutaciones se han empleado ensayos de actividades enzimáticas, así como HPLC.

La presencia de estas mutaciones en la secuencia génica de HCS da origen a la deficiencia múltiple de carboxilasas en pacientes neonatos. Esta enfermedad se diagnostica mediante la detección de la presencia de metabolitos resultantes de la baja o nula actividad de las carboxilasas, como es el ácido hidroxiiisovalérico y otros mencionados anteriormente, o bien, la presencia de los síntomas externos como la alopecia o el salpullido, entre otros.

Una característica de la deficiencia múltiple de carboxilasas es ser de tipo autosómica recesiva. En la mayoría de los casos de tipo heterociga, es decir que los pacientes, presentan dos mutaciones diferentes, una en cada alelo, en estos casos no se puede saber cual de estas dos mutaciones es la responsable de la enfermedad.

En este trabajo, se realizaron mutaciones en un fragmento del extremo carboxilo terminal de HCS que previamente se detectó como funcional (Campeau and Gravel 2001), que va del residuo 378 al 726. Las mutaciones generadas fueron: T462I, R508W, V550M, D571N, G581S. Además de permitirnos comparar los resultados obtenidos con trabajos previos (Dupuis, 1999) mediante el empleo de una cepa termo sensible *E. coli* BirA 104, se pudo establecer un método de diferenciación entre mutaciones heterocigas usando un modelo bacteriano. Este método de complementación funcional, puede ser empleado para mutaciones heterocigas determinadas en el gen de HCS, posteriores a este trabajo. También se puede emplear como método diagnóstico intrahospitalario, fácilmente accesible para los métodos de diagnóstico empleados en la deficiencia múltiple de carboxilasas.

Este trabajo no implica la síntesis y purificación de un péptido tales como p67 o BCCP 87 (Campeau and Gravel 2001; Nenortas and Becket 1996), ni el uso de isótopos radioactivos que puedan ser utilizados en el estudio y diagnóstico bioquímico que determinen la actividad de carboxilasas de pacientes con DMC.

En este trabajo se demuestra que el sistema de expresión *in vivo* de HCS mutante en *E. coli* BirA 104 es un método efectivo para el estudio de mutaciones presentes en el gen de HCS causantes de la DMC.

En este estudio se pudo establecer que no todas las mutaciones trabajadas están involucradas en el fenotipo de los pacientes, ya que no todas responden de

igual manera a las concentraciones de biotina utilizadas; esto nos marca la presencia de una biotilación diferencial dada por una muy buena respuesta a biotina de la mutación R508W. Esto debido a que la presencia de anillos aromáticos en el triptofano favorece la interacción con los anillos de la molécula de biotina permitiéndole más fácilmente el acceso al sitio de unión, como se puede ver en la figura 21.

En la mutación V550M, hay respuesta a biotina en el ensayo de complementación presentándose un crecimiento en menor magnitud que en la mutación anterior y una muy pobre incorporación de biotina radioactiva, esto debido a una disminución en el sitio de unión a biotina como consecuencia de una disminución de las cavidades intraproteínicas como se puede ver en la figura 22.

La mutación G581S, no presenta biotilación y nulifica la actividad de la proteína, esto debido a que el cambio de aminoácido representa un impedimento estérico para la biotina y una consecuente obstrucción del sitio de unión a biotina, como lo marca la figura 24.

Las mutaciones que afectan en mayor grado la función de HCS son D571N, debido a un cambio de cargas en el sitio de unión a biotina y G581S.

Según Xu and Becket (1996) cuando se presentan mutaciones en el dominio central de la BirA se ve afectada la capacidad de catalizar la reacción de biotilación en BCCP. Al comparar esto con los resultados obtenidos tanto en los ensayos de complementación como de biotilación, podemos decir que las mutaciones que nulifican en mayor medida la biotilación son T462I, D571N y G581S.

La biotina presenta afinidad por una forma específica de la región consenso de biotilación en HCS. Las mutaciones presentes en esta proteína cambian la orientación de la región de biotilación, que al plegarse la proteína impiden la unión de la biotina. Por este motivo se emplean dosis farmacológicas de biotina en los pacientes afectados por la deficiencia múltiple de carboxilasas. La presencia de biotina en este tipo de dosis hace que algunas de las orientaciones espaciales de esta vitamina sean afines a un sitio activo modificado, recuperando el funcionamiento normal de holocarboxilasa sintetasa.

Los resultados previamente establecen, un estudio comprensivo del efecto de mutaciones presentes en el gen sobre la actividad de la proteína HCS, tanto a nivel de crecimiento en ensayos de complementación a temperaturas específicas como a nivel de los modelos estructurales.

X. CONCLUSIONES.

- La generación de mutaciones puntuales en una secuencia mínima funcional de HCS, no afecta la traducción de la misma.
- Funcionalmente, todas las mutaciones afectan la actividad enzimática de HCS, ya que ninguna presenta una eficiencia de biotinilación semejante al de la proteína normal.
- Dos de estas, D571N y G581S, son mutaciones que al plegarse la proteína se encuentran cerca del dominio catalítico, y el cambio de residuo provoca impedimentos estéricos que impiden el paso de la biotina. Extrapolando, puede ocurrir lo mismo con la mutación T462I, que no es capaz de biotinilar y no complementa a altas temperaturas.
- Todas las mutaciones generan cambios en la distribución de las cargas, tanto en la proteína completa como de forma local en el sitio de unión a biotina.
- El establecer un modelo bacteriano de diferenciación entre mutaciones heterocigotas, puede ser útil para ser empleado como un sistema de diagnóstico intrahospitalario, mucho más accesible que los ya existentes.

XI.- APORTACIONES DEL PROYECTO.

- Determinación de una biotinilación diferencial, en las mutaciones trabajadas, lo que nos ayuda a establecer que **no** todas estas mutaciones son responsables del fenotipo presentado en pacientes con DMC.
- Desarrollo de un sistema bacteriano, que puede ser utilizado intrahospitalariamente como un sistema de diagnóstico para la DMC, cuando no se cuenten con los sistemas tradicionales que se han usado, como es el uso de HPLC.
- Explicación molecular mediante estructuras, del efecto específico de cada mutación trabajada sobre la proteína holocarboxilasa sintetasa.

XII.- REFERENCIAS:

- Abu-Elheiga, L., D. B. Almarza-Ortega, et al. (1997). "Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms." *J Biol Chem* 272(16): 10669-77.
- Abu-Elheiga, L., W. R. Brinkley, et al. (2000). "The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4): 1444-9.
- Aoki, Y., X. Li, et al. (1999). "Identification and characterization of mutations in patients with holocarboxylase synthetase deficiency." *Hum Genet* 104(2): 143-8.
- Ausubel, F. M. (1988). *Current protocols in molecular biology*. New York, Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley.
- Barker, D. F. and A. M. Campbell (1981). "The *birA* gene of *Escherichia coli* encodes a biotin holoenzyme synthetase." *J Mol Biol* 146(4): 451-67.
- Baumgartner, E. R. and T. Suormala (1997). "Multiple carboxylase deficiency: inherited and acquired disorders of biotin metabolism." *Int J Vitam Nutr Res* 67(5): 377-84.
- Baumgartner, M. R., S. Almashanu, et al. (2001). "The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency." *J Clin Invest* 107(4): 495-504.
- Bender David, A. (1992). *Nutritional biochemistry of the vitamins*. Cambridge ; New York, Cambridge University Press c1992.
- Bonafe, L., H. Troxler, et al. (2000). "Evaluation of urinary acylglycines by electrospray tandem mass spectrometry in mitochondrial energy metabolism defects and organic acidurias." *Mol Genet Metab* 69(4): 302-11.
- Boone, C., F. Gregoire, et al. (1999). "Regulation of porcine adipogenesis in vitro, as compared with other species." *Domest Anim Endocrinol* 17(2-3): 257-67.

- Campeau, E., L. Dupuis, et al. (1999). "Coding sequence mutations in the alpha subunit of propionyl-CoA carboxylase in patients with propionic acidemia." *Mol Genet Metab* 67(1): 11-22.
- Campeau, E. and R. A. Gravel (2001). "Expression in *Escherichia coli* of N- and C-terminally deleted human holocarboxylase synthetase. Influence of the N-terminus on biotinylation and identification of a minimum functional protein." *J Biol Chem* 276(15): 12310-6.
- Chapman-Smith, A. and J. E. Cronan, Jr. (1999). "In vivo enzymatic protein biotinylation." *Biomol Eng* 16(1-4): 119-25.
- Chapman-Smith, A. and J. E. Cronan, Jr. (1999). "The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity." *Trends Biochem Sci* 24(9): 359-63.
- Chapman-Smith, A., T. D. Mulhern, et al. (2001). "The C-terminal domain of biotin protein ligase from *E. coli* is required for catalytic activity." *Protein Sci* 10(12): 2608-17.
- Chiba, Y., Y. Suzuki, et al. (1994). "Purification and properties of bovine liver holocarboxylase synthetase." *Arch Biochem Biophys* 313(1): 8-14.
- Dupuis, L., A. Leon-Del-Rio, et al. (1996). "Clustering of mutations in the biotin-binding region of holocarboxylase synthetase in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency." *Hum Mol Genet* 5(7): 1011-6.
- Dupuis, L., E. Campeau, et al. (1999). "Mechanism of biotin responsiveness in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency." *Mol Genet Metab* 66(2): 80-90.
- Goldman, E. R., E. D. Balighian, et al. (2002). "Avidin: a natural bridge for quantum dot-antibody conjugates." *J Am Chem Soc* 124(22): 6378-82.
- Guex, N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling." *Electrophoresis* 18(15): 2714-23.

- Ha, J., J. K. Lee, et al. (1996). "Cloning of human acetyl-CoA carboxylase-beta and its unique features." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11466-70.
- Humphrey, W., A. Dalke, et al. (1996). "VMD: visual molecular dynamics." *J Mol Graph* 14(1): 33-8, 27-8.
- Hymes, J., K. Fleischhauer, et al. (1995). "Biotinylation of biotinidase following incubation with biocytin." *Clin Chim Acta* 233(1-2): 39-45.
- Hymes, J. and B. Wolf (1999). "Human biotinidase isn't just for recycling biotin." *J Nutr* 129(2S Suppl): 485S-489S.
- Janiyani, K., T. Bordelon, et al. (2001). "Function of Escherichia coli biotin carboxylase requires catalytic activity of both subunits of the homodimer." *J Biol Chem* 276(32): 29864-70.
- Kleywegt, G. J. and T. A. Jones (1999). "Software for handling macromolecular envelopes." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55 (Pt 4): 941-4.
- Kleywegt, G. J. (2000). "Validation of protein crystal structures." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 3): 249-65.
- Kwon, K., E. D. Streaker, et al. (2000). "Multiple disordered loops function in corepressor-induced dimerization of the biotin repressor." *J Mol Biol* 304(5): 821-33.
- Kwon, K. and D. Beckett (2000). "Function of a conserved sequence motif in biotin holoenzyme synthetases." *Protein Sci* 9(8): 1530-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(259): 680-5.
- Lehninger, A. L. (1982). *Principles of biochemistry*. New York, Worth Publishers.
- Leon-Del-Rio, A. and R. A. Gravel (1994). "Sequence requirements for the biotinylation of carboxyl-terminal fragments of human propionyl-CoA carboxylase alpha subunit expressed in Escherichia coli." *J Biol Chem* 269(37): 22964-8.

- Leon-Del-Rio, A., D. Leclerc, et al. (1995). "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): 4626-30.
- McKean, A. L., J. Ke, et al. (2000). "Molecular characterization of the non-biotin-containing subunit of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase." *J Biol Chem* 275(8): 5582-90.
- Nenortas, E. and D. Beckett (1996). "Purification and characterization of intact and truncated forms of the *Escherichia coli* biotin carboxyl carrier subunit of acetyl-CoA carboxylase." *J Biol Chem* 271(13): 7559-67.
- Polyak, S. W., A. Chapman-Smith, et al. (1999). "Biotin protein ligase from *Saccharomyces cerevisiae*. The N-terminal domain is required for complete activity." *J Biol Chem* 274(46): 32847-54.
- Pomponio, R. J., J. Hymes, et al. (1998). "Prenatal diagnosis of heterozygosity for biotinidase deficiency by enzymatic and molecular analyses." *Prenat Diagn* 18(2): 117-22.
- Praul, C. A., K. D. Brubaker, et al. (1998). "Detection of endogenous biotin-containing proteins in bone and cartilage cells with streptavidin systems." *Biochem Biophys Res Commun* 247(2): 312-4.
- Rechcigl, M. (1977). *CRC handbook series in nutrition and food*. Cleveland, Ohio, CRC Press c1977-.
- Sakamoto, O. and K. Narisawa (1998). "[Holocarboxylase synthetase deficiency (early-onset multiple carboxylase deficiency)]." *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu*(19 Pt 2): 219-22.
- Sakamoto, O., Y. Suzuki, et al. (1998). "Molecular analysis of new Japanese patients with holocarboxylase synthetase deficiency." *J Inherit Metab Dis* 21(8): 873-4.
- Sakamoto, O., Y. Suzuki, et al. (1999). "Relationship between kinetic properties of mutant enzyme and biochemical and clinical responsiveness to biotin in holocarboxylase synthetase deficiency." *Pediatr Res* 46(6): 671-6.

- Salto, R., M. D. Giron, et al. (1999). "Evolution of pyruvate carboxylase and other biotin containing enzymes in developing rat liver and kidney." *Mol Cell Biochem* 200(1-2): 111-7.
- Scriver, C. R. (1995). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York, McGraw-Hill Health Professions Division.
- Solorzano, V. S., et al. (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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 16;99(8):5325-30.
- Streaker, E. D. and D. Beckett (1999). "Ligand-linked structural changes in the *Escherichia coli* biotin repressor: the significance of surface loops for binding and allostery." *J Mol Biol* 292(3): 619-32.
- Suormala, T., B. Fowler, et al. (1997). "Five patients with a biotin-responsive defect in holocarboxylase formation: evaluation of responsiveness to biotin therapy in vivo and comparative biochemical studies in vitro." *Pediatr Res* 41(5): 666-73.
- Suzuki, Y., Y. Aoki, et al. (1994). "Isolation and characterization of mutations in the human holocarboxylase synthetase cDNA." *Nat Genet* 8(2): 122-8.
- Suzuki, Y., Y. Aoki, et al. (1996). "Enzymatic diagnosis of holocarboxylase synthetase deficiency using apo-carboxyl carrier protein as a substrate." *Clin Chim Acta* 251(1): 41-52.
- Thoene, J., H. Baker, et al. (1981). "Biotin-responsive carboxylase deficiency associated with subnormal plasma and urinary biotin." *N Engl J Med* 304(14): 817-20.
- Thoene, J. G., R. Lemons, et al. (1983). "Impaired intestinal absorption of biotin in juvenile multiple carboxylase deficiency." *N Engl J Med* 308(11): 639-42.
- Tissot, G., R. Douce, et al. (1997). "Evidence for multiple forms of biotin holocarboxylase synthetase in pea (*Pisum sativum*) and in *Arabidopsis*

- thaliana: subcellular fractionation studies and isolation of a cDNA clone." *Biochem J* 323 (Pt 1): 179-88.
- Wallace, J. C., S. Jitrapakdee, et al. (1998). "Pyruvate carboxylase." *Int J Biochem Cell Biol* 30(1): 1-5.
- Weaver, L. H., K. Kwon, et al. (2001). "Corepressor-induced organization and assembly of the biotin repressor: a model for allosteric activation of a transcriptional regulator." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11): 6045-50.
- Wilson, K. P., L. M. Shewchuk, et al. (1992). "Escherichia coli biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(19): 9257-61.
- Xu, Y., E. Nenortas, et al. (1995). "Evidence for distinct ligand-bound conformational states of the multifunctional Escherichia coli repressor of biotin biosynthesis." *Biochemistry* 34(51): 16624-31.
- Xu, Y. and D. Beckett (1996). "Evidence for interdomain interaction in the Escherichia coli repressor of biotin biosynthesis from studies of an N-terminal domain deletion mutant." *Biochemistry* 35(6): 1783-92.
- Yang, X., Y. Aoki, et al. (2001). "Structure of human holocarboxylase synthetase gene and mutation spectrum of holocarboxylase synthetase deficiency." *Hum Genet* 109(5): 526-34.
- Zempleni, J. and Mock, M. M (1999). "Biotin biochemistry and human requirements." *J Nutr Biochem* 10: 128-138
- Zhang, X. X., A. Leon-Del-Rio, et al. (1997). "Assignment of holocarboxylase synthetase gene (HLCS) to human chromosome band 21q22.1 and to mouse chromosome band 16C4 by in situ hybridization." *Cytogenet Cell Genet* 76(3-4): 179.