



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**LA DEFICIENCIA DE BIOTINA PRODUCE
EFECTOS SIMILARES EN MARCADORES
DEL ESTADO ENERGÉTICO CELULAR Y
SOBRE LOS TRANSCRIPTOMAS DEL
METABOLISMO DEL CARBONO EN TRES
EUCARIONTES DIFERENTES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

DANIEL DAGOBERTO ORTEGA CUELLAR

TUTOR PRINCIPAL: Dr. ANTONIO VELÁZQUEZ ARELLANO

COMITÉ TUTOR: Dra. CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA
Dr. RAFAEL CAMACHO CARRANZA

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de noviembre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **ORTEGA CUELLAR DANIEL DAGOBERTO** con número de cuenta **501093587** con la tesis titulada **"LA DEFICIENCIA DE BIOTINA PRODUCE EFECTOS SIMILARES EN MARCADORES DEL ESTADO ENERGÉTICO CELULAR Y SOBRE LOS TRANSCRIPTOMAS DEL METABOLISMO DEL CARBONO EN TRES EUCARIONTES DIFERENTES"**, realizada bajo la dirección del **Dr. Antonio Velázquez Arellano**:

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Vocal: DRA. KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA
Vocal: DR. JUAN MIRANDA RÍOS
Secretario: DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de enero de 2011.

María del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
Coordinadora del Programa

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, por haberme albergado como estudiante de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (número de becario 163096) y el financiamiento (número de proyecto 57597) otorgados para desarrollar éste trabajo, así como al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT IN225508-3).

Al Director esta tesis: Dr. Antonio Velázquez Arellano.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra Cristina Fernández Mejía y Dr. Rafael Camacho Carranza.

Agradezco también a los Drs. Armando Hernández, Victoriano Pérez, Karla Carbajal Aguilera, Rosa Navarro, Antonio Peña, por su valiosa colaboración en la realización de éste trabajo.

A todos los integrantes del laboratorio, especialmente a Elizabeth Moreno Arriola por su ayuda en la realización de varios experimentos que forman parte de ésta tesis.

ABREVIATURAS

ACC: acetil CoA carboxilasa

ADP: adenosín difosfato

AMP: adenosín monofosfato

AMPK: proteína cinasa dependiente de AMP

Arc1p: aminoacil tRNA sintetasa cofactor 1

ATP: trifosfato de adenosina

BPL: proteína ligasa de biotina

BT: Biotina

GK: glucocinasa

KEGG: Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto

MCC: metilcrotonil-CoA carboxilasa

mTOR: blanco de la Rapamicina en mamíferos

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido oxidado

PC: piruvato carboxilasa

PCC: propionil CoA carboxilasa

PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxicinasa

SMVT: transportador multivitamínico dependiente de sodio

Snf1: proteína cinasa no fermentadora de sacarosa

TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT	9-10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Química y fuentes de biotina obtenidas de la dieta.	11
1.2. Absorción y distribución de la biotina en organismo	13
1.3. Funciones de la biotina como grupo prostético	14
1.4. Regulación genética por biotina en <i>E. coli</i>	16
1.5. Regulación genética por biotina en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
1.6. Componentes de la regulación por biotina en levadura.....	20
1.7. Regulación genética por biotina en mamíferos	20
1.8. Proteínas para el metabolismo de carbohidratos	20
1.9. Proteínas dependientes de biotina	22
1.10. Otros genes afectados por biotina.....	22
1.11. Regulación de genes por biotina a nivel pos-transcripcional	23
1.12. Mecanismos de regulación	23
1.13. Vía de señalización GCs-PKG	23
1.14. Biotinilación de histonas	25
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVO GENERAL	29

5.	OBJETIVOS PARTICULARES	29
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1.	Organismos deficientes de biotina.....	30
6.2.	Análisis de la deficiencia de biotina.....	31
6.3.	Medición de las concentraciones de los metabolitos.....	32
6.4.	Consumo de oxígeno.....	32
6.5.	Análisis de expresión génica por microarreglos en los tres organismos.....	33
6.6.	Análisis de expresión por qRT-PCR.....	34
6.7.	Análisis de expresión de proteínas por Western-blot.....	34
6.8.	Análisis Estadístico.....	35
7.	RESULTADOS	36
7.1.	Fenotipos en la deficiencia de biotina.....	36
7.2.	Efectos metabólicos en la deficiencia de biotina.....	38
7.3.	La deficiencia de biotina afecta la expresión de genes en los tres organismos estudiados.....	41
7.4.	Efectos de la deficiencia de biotina sobre diversos transcritos en hígado de rata.....	43
7.5.	Efectos de la deficiencia de biotina sobre diversos transcritos en <i>C. elegans</i>	45
7.6.	Efectos de la deficiencia de biotina sobre diversos transcritos en levadura.....	47
7.7.	Efectos de la deficiencia de biotina sobre transcritos de vías de transducción de señales en los tres organismos estudiados.....	50
7.8.	Anaplerosis del ciclo de TCA y detección de energía en deficiencia de biotina.....	52
7.9.	Activación de la AMPK/Snf1 en la deficiencia de biotina.....	52

8. DISCUSIÓN	54
8.1. Circuito regulador en hígado de rata	55
8.2. Circuito regulador en el nematodo.....	57
8.3. Circuito regulador en la levadura.....	58
REFERENCIAS	64
TABLAS DE SUPLEMENTO	74
Tabla suplementaria 1	74
Tabla suplementaria 2	80
Tabla suplementaria 3	85
APÉNDICE 1.....	88
APÉNDICE 2.....	101

RESUMEN

La deficiencia de biotina afecta la expresión de enzimas reguladoras del metabolismo de la glucosa y otras proteínas no relacionadas con su función de cofactor. Como inicio, para obtener avances en el entendimiento de estos efectos, nosotros comparamos algunos cambios metabólicos y transcriptómicos durante la deficiencia de biotina en tres eucariontes diferentes: *Rattus norvegicus* (rata), *Caenorhabditis elegans* (nematodo) y *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), todos crecidos con abundante glucosa. El consumo de esta hexosa y la concentración de lactato o etanol disminuyeron, indicando una disminución del flujo glucolítico/fermentativo. También hubo un incremento del NAD^+ , la relación ADP/ATP y una disminución del consumo de oxígeno, evidenciando profundas alteraciones energéticas y metabólicas. Varios transcritos de genes para la utilización de glucosa y lipogénesis disminuyeron en la deficiencia de biotina, mientras que algunos para la oxidación de ácidos grasos y gluconeogénesis aumentaron. La readministración de biotina revierte varios de los cambios descritos anteriormente. Nosotros hipotetizamos que el déficit energético en la deficiencia de biotina se debe a un mal funcionamiento de ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y concomitantemente a una anaplerosis deficiente, consecuencia de la deficiencia de la piruvato carboxilasa (PC) que es una de las enzimas dependientes de biotina. Algunos de los cambios mencionados anteriormente también se revirtieron en levadura por aspartato, precursor del oxaloacetato y producto de la PC. El déficit de ATP activa a la cinasa dependiente de AMP (AMPK) en la rata, en el nematodo y a su homólogo en levadura (Snf1), que es un sensor del estrés energético. Nosotros proponemos un modelo general para integrar estos resultados en circuitos reguladores de acuerdo a la biología de cada especie, para explicar la regulación de los transcriptomas del metabolismo del carbono a través de circuitos reguladores desencadenados por la activación de la AMPK/Snf1. Nuestros hallazgos pueden contribuir a la comprensión de las complejas redes que unen el metabolismo y la función genómica, así como las alteraciones en los trastornos de gestión de energía tales como la diabetes y el cáncer.

ABSTRACT

Biotin starvation affects the expression of crucial glucose metabolism enzymes and several other proteins, none directly related to its cofactor function. To advance in the understanding of these effects we compared some metabolic and transcriptomic changes during biotin deficiency among three different eukaryotes: *R. norvegicus* (rat), *C. elegans* (worm) and *S. cerevisiae* (yeast), all provided with glucose. Consumption of this hexose and the concentrations of lactate or ethanol were reduced, indicating reduction of glycolytic/fermentative flow. Increased NAD^+ and ADP/ATP ratio and diminished oxygen consumption evidenced profound energy metabolism alterations. Several transcripts of genes for glucose utilization and lipogenesis were lowered, and some for fatty acid β -oxidation and gluconeogenesis were raised. Biotin administration reversed several of the above changes. We hypothesize cellular energy shortage on biotin starvation due to defective tricarboxylic acid cycle (TCA) functioning by impaired anaplerosis, a consequence of biotin-dependent pyruvate carboxylase (PC) deficiency. Several of the mentioned changes were also reversed in yeast by aspartate, precursor of the PC product oxaloacetate. The ATP deficit activated rat and worm AMP kinase (AMPK) and its yeast homologue Snf1, cellular energy stress sensors. We propose a general model for integrating these results in regulatory circuitries according to the biology of each species, in order to explain the regulation of the carbon metabolic transcriptoms through regulatory circuitries set off by AMPK/Snf1 activation. Our findings may contribute to the understanding of the complex networks linking metabolism and genome function, as well as their derangements in energy management disorders such as diabetes and cancer.

1. INTRODUCCIÓN

La biotina, también conocida como vitamina H o B₇ es un micronutriente esencial para los seres vivos. Esta vitamina fue identificada por Kögl y Tönnis en 1936 (1), mientras estudiaban los requerimientos nutrimentales de la levadura, y encontraron que ésta era un factor indispensable para su crecimiento en un medio de cultivo sintético. Posteriormente en 1950, se evidenció que la biotina era un componente necesario para las reacciones de carboxilación; sin embargo, fue hasta 1958 cuando se demostró que existía una asociación de la biotina con una proteína, la acetil CoA carboxilasa (2), y este hallazgo sugirió que la biotina podría funcionar como cofactor de esta enzima; investigaciones posteriores lo confirmaron y además demostraron que también es cofactor de otras enzimas que participan en reacciones de carboxilación importantes para el metabolismo intermediario (3).

Además de su función como cofactor, evidencias mas recientes sugieren que la biotina tiene otras funciones celulares, especialmente la de regulador de la expresión genética en diferentes organismos (4-6). En *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, la biotina regula al operón y a los genes *Bio* (en ambos organismos participan en la síntesis de biotina) respectivamente; mientras que en mamíferos regula la expresión de cientos de genes (7).

1.1. Química y fuentes de biotina obtenidas de la dieta.

La estructura molecular de la biotina consiste de dos anillos fusionados, uno llamado imidazol (ureido) y otro de tetrahidrotiofeno, que contiene un átomo de azufre, éste anillo tiene unida una cadena lateral compuesta por cinco carbonos denominada ácido valérico y que termina en un grupo carboxilo (8) (figura 1). La estabilidad química de la biotina depende de las condiciones en las que se encuentre, por ejemplo en soluciones ácidas y neutras es moderadamente estable, mientras que en condiciones alcalinas la pierde totalmente. Es de

destacar que esta vitamina resiste altas temperaturas, y en solución puede ser esterilizada por autoclave sin alterar sus propiedades físico-químicas (9).

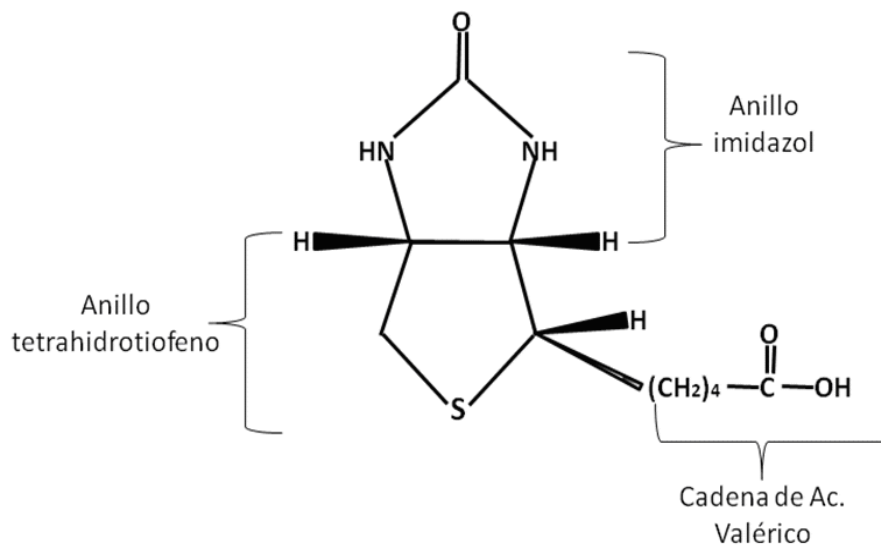


Figura 1. Estructura de la d-biotina.

La síntesis de la biotina está circunscrita a las plantas, la mayoría de las bacterias y ciertos hongos, por lo tanto los organismos auxótrofos, que incluyen a los mamíferos, la obtienen de fuentes exógenas como la dieta o a partir de la flora microbiana intestinal que la sintetizan *de novo* (10). En la dieta, la biotina generalmente se encuentra unida a proteínas y algunos de los productos alimenticios naturales que la contienen en abundancia son: la yema de huevo, carne, cereales y algunos vegetales (11). Se ha estimado que la ingesta de biotina a través de la dieta en poblaciones occidentales es de 35-70 µg/día (143-287nmol/día) (11).

Aunque es poco común en humanos, la deficiencia de biotina se puede generar debido al consumo excesivo de clara de huevo cruda, la cual contiene altos niveles de la proteína avidina. Esta glicoproteína tiene alta afinidad por la biotina (10^{-15}M) impidiendo su absorción intestinal (12).

1.2. Absorción y distribución de la biotina en el organismo

La mayor parte de la biotina ingerida de la dieta se encuentra unida a residuos de lisina en proteínas (13) y una vez dentro del organismo la unión es degradada por proteasas para generar biocitina (biotinil- ϵ -lisina) y péptidos unidos a biotina, posteriormente la enzima llamada biotinidasa libera a la biotina de la biocitina de los péptidos biotinilados para ser absorbida en el intestino.

El transporte de la biotina al interior de la célula se realiza mediante transporte pasivo y activo. La difusión pasiva se lleva a cabo cuando la concentración de biotina extracelular excede $25\ \mu\text{mol/L}$. Por el contrario, cuando la concentración de la vitamina es menor a $5\ \mu\text{mol/L}$ predomina el transporte activo en donde la captación está mediada por dos transportadores; uno conocido como transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT) y en menor medida por otro llamado transportador de monocarboxilatos MCT1 (14-15). Se ha observado que después de la administración intravenosa de biotina en ratas, una fracción importante de la vitamina se acumula en el hígado, consistente con el papel que se le ha atribuido a este órgano de ser reservorio de biotina que puede potencialmente distribuirla a otros órganos como el cerebro, y probablemente podría explicar el por qué el sistema nervioso central de ratas que se someten a deficiencia de biotina, mantiene los niveles normales de la vitamina (16).

1.3. Funciones de la biotina como grupo prostético

La función de la biotina como grupo prostético se identificó por la unión covalente que existe entre la vitamina y un residuo de lisina de las carboxilasas. En mamíferos existen cinco carboxilasas: la piruvato carboxilasa (E.C. 6.A.1.1), la acetil-CoA carboxilasa 1 y 2 (E.C. 6.4.1.2), la propionil-CoA carboxilasa (E.C. 6.4.1.3) y la metilcrotonil-CoA carboxilasa (E.C. 6.4.1.4). Estas proteínas se sintetizan como apoenzimas (sin actividad), y para ser activadas se requiere la unión de la biotina. Esta unión está mediada por una enzima específica: la proteína ligasa de biotina (BPL) u holocarboxilasa sintetasa (HCS), por medio de una reacción que requiere de ATP y que ocurre en dos pasos: (17-18).

Paso 1: $\text{ATP} + \text{Biotina} + \text{HCS} \rightarrow \text{Biotina-AMP-HCS} + \text{PPi}$

Paso 2: $\text{Biotina-AMP-HCS} + \text{Apocarboxilasa} \rightarrow \text{Holocarboxilasa} + \text{AMP} + \text{PPi} + \text{HCS}$

Las reacciones que catalizan las carboxilasas dependientes de biotina es la unión covalente del bicarbonato a ácidos orgánicos y se produce mediante la siguiente secuencia de reacciones de carboxilación (figura 2). En una primera fase, el bicarbonato es activado al reaccionar con el ATP produciendo un intermediario llamado carboxifosfato, que se descompone en bióxido de carbono. En realidad el bicarbonato se deshidrata por su reacción con el ATP y el CO_2 reacciona con el nitrógeno 1' (1'-N) del motivo del biotinil en la holocarboxilasa (biotinil carboxilasa) para formar 1'-N-carboxibiotinil carboxilasa (carboxibiotina) con la liberación de fosfato inorgánico (P_i). Subsecuentemente, la biotina actúa como un acarreador para transportar el CO_2 desde un sitio activo a otro en la misma enzima. En una segunda fase, el 1'-N-carboxibiotinil carboxilasa incorpora al CO_2 a un aceptor específico para cada carboxilasa que se libera en el segundo sitio activo (19). Finalmente las holocarboxilasas son degradadas proteolíticamente generándose péptidos de biotinil, los cuales son degradados

por la biotinidasa para liberar a la biotina que es reciclada para ser usada nuevamente por las carboxilasas (20).

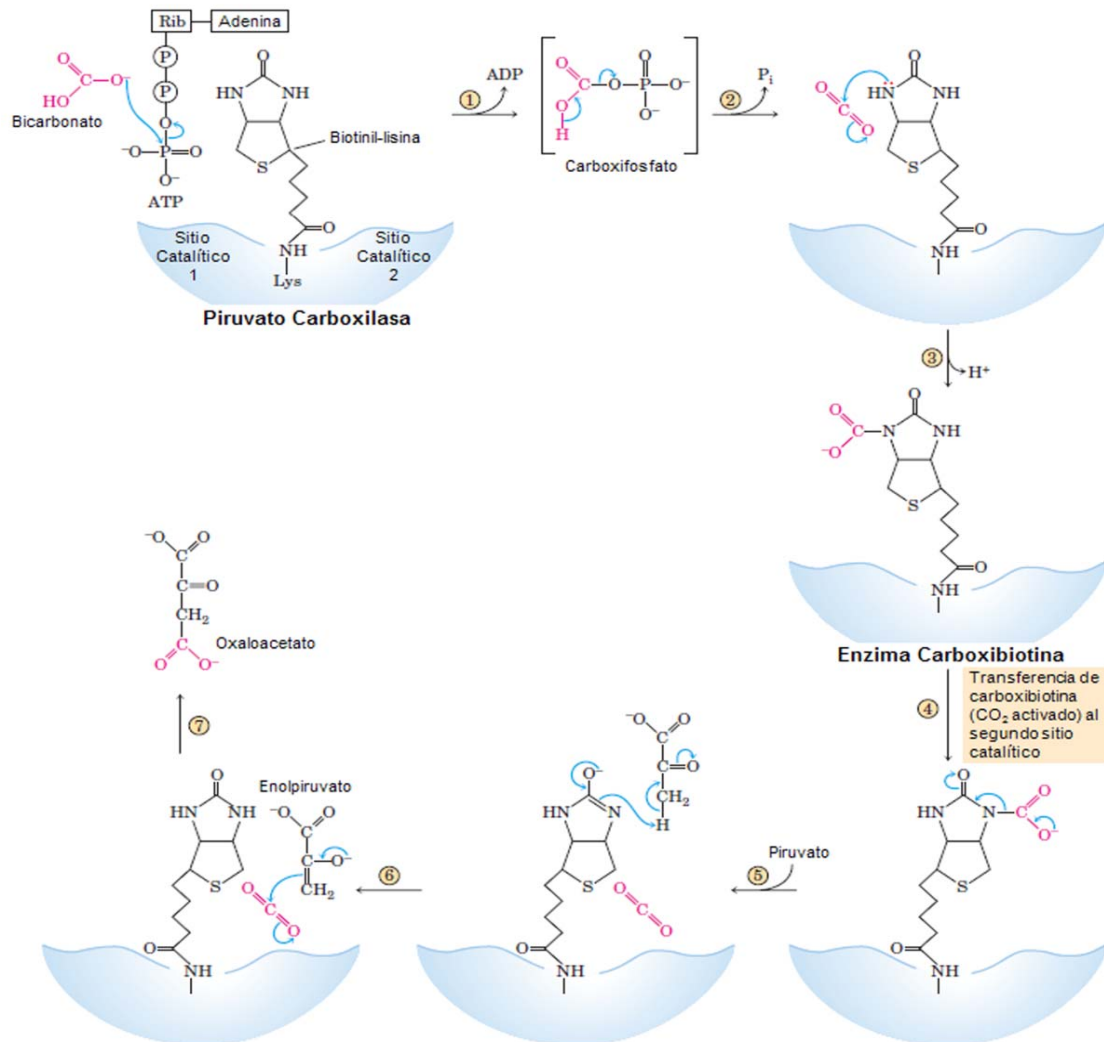


Figura 2. Reacciones de las carboxilasas dependientes de biotina. Las carboxilasas dependientes de biotina median la unión covalente del bicarbonato a ácidos orgánicos mediante la siguiente secuencia de carboxilación. Primero, el bicarbonato y el ATP forman un intermediario llamado carboxifosfato (paso 1- 3). Posteriormente, el CO_2 formado puede reaccionar con la biotina para formar carboxibiotina (paso 3). En la segunda fase de la reacción (pasos 5-7), el CO_2 reacciona con el piruvato para formar oxaloacetato (ejemplo de la reacción

catalizada por la piruvato carboxilasa). El piruvato se convierte en su forma enólica en el paso 6, transfiriendo un protón a la biotina. El enolato ataca el CO₂ para generar oxalacetato en la etapa final de la reacción (paso 7). (Imagen tomada y modificada del libro Principios de Bioquímica de Lehninger 4^a edición 2007).

1.4. Regulación genética por biotina en *E. coli*

Además de su rol como grupo prostético, la biotina está involucrada en otras funciones biológicas, tales como la regulación de genes a nivel transcripcional y/o postranscripcional que participan en diversos procesos metabólicos como el metabolismo de la glucosa.

La bacteria *E.coli* puede sintetizar a la biotina de *novo* mediante el operón llamado *Bio*. El sistema de regulación genética por biotina del operón *Bio* es el mejor caracterizado, en éste participa la enzima biotina proteína ligasa (que en los procariontes se conoce como proteína BirA). Esta enzima es bifuncional, por una parte cataliza la unión de la biotina a las carboxilasas, y por otra puede reprimir la expresión del operón *Bio*, que es el responsable de la síntesis de la biotina (18, 21-23). La regulación de la expresión del operon *Bio* está dada en razón de la cantidad de las apoenzimas y del intermediario BirA-bio-5'-AMP que se forma durante las reacciones de carboxilación. Brevemente, cuando las células se están dividiendo rápidamente, la concentración de apocarboxilasa es muy alta y por lo tanto se deben de activar, para que esto ocurra, la proteína BirA se une a la biotina y forman un complejo BirA-bio-5'-AMP el cual va a biotinilar a las apocarboxilasa para activarlas. En estas condiciones y dado el alto requerimiento de biotina, la transcripción del operón *Bio* está activo y por lo tanto hay un aumento en la producción de biotina. Por el contrario, cuando la síntesis de las apoenzimas es reducida, el complejo BirA-bio-5'-AMP se acumula a altas concentraciones, lo que provoca que aumente la afinidad por el promotor del operón *Bio* y como consecuencia reprime la síntesis de biotina (figura 3).

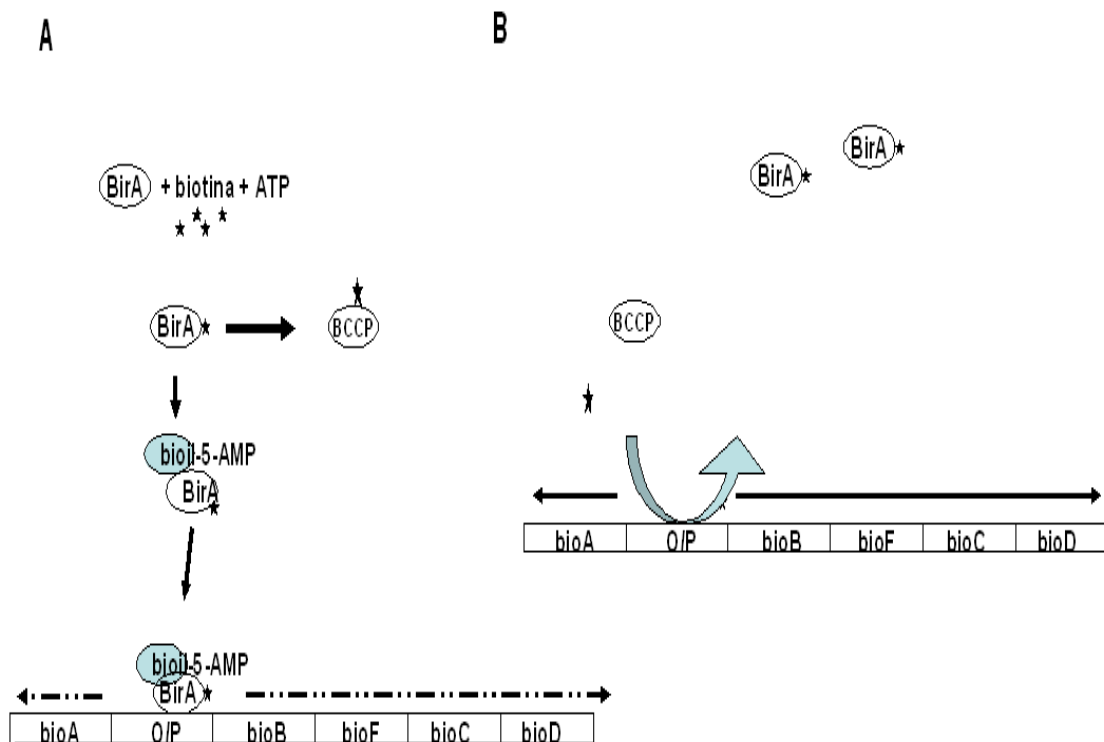


Figura 3. Modelo de regulación del operón *Bio* en *E. coli*. La proteína BirA activa a la biotina y al ATP formando un complejo biotinil-5-AMP. **A)** Cuando la concentración de biotina es alta hay también un incremento en la cantidad del complejo BirA-biotinil-AMP, el cual actúa como un correpresor que se une a la secuencia del operador del operón *Bio*. **B)** Si la cantidad de biotina es baja, las proteínas dependientes de biotina (apoenzimas) promueven la liberación del represor (BirA-biotinil-AMP) y se inicia la transcripción del operador para la síntesis de biotina.

1.5. Regulación genética por biotina en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Dada la función reguladora de la expresión genética de la biotina en procariontes, recientemente se ha comenzado a investigar esta función en organismos modelo como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Similar a la

mayoría de los eucariontes, *S. cerevisiae* no puede sintetizar biotina *de novo*. Sin embargo, este organismo aún conserva genes que le permiten sintetizarla a partir de precursores como el pimeloil-CoA o el ácido 7-ceto-8-aminopelargónico (KAPA) (figura 4) (24). Estos son introducidos a la célula mediante los transportadores Bio5p y la proteína permeasa de biotina (vht1) (25-26), y posteriormente son metabolizados hasta formar biotina por las proteínas que están codificadas por los genes Bio1 que transforma al pimeloil-CoA en KAPA, el BIO3 (aminotrasferasa DAPA) que forma ácido 7,8- diamino pelargónico (DAPA) a partir de KAPA, el BIO4 (destiobiotina sintasa) que sintetiza destiobiotina y finalmente el gen BIO2 (biotina sintasa) que forma a la biotina (figura 4) (27). En conjunto a estos genes se les denomina como genes *Bio*.

Estudios recientes han evidenciado que la concentración intracelular de biotina en *S. cerevisiae* afecta la transcripción de los genes *Bio*. Específicamente, estudios sobre el sistema de transporte de biotina revela que éste se incrementa cuando las levaduras se crecen a bajas concentraciones de biotina (28-29). Consistente con lo anterior, también se incrementó la transcripción de los genes *Bio*, así como del gen que codifica para la proteína ligasa de biotina (BPL) (6). Mediante el uso de una cepa de levadura mutante para BPL se demostró que esta proteína es indispensable para censar los niveles de biotina extracelular y desencadenar la transcripción de los genes *Bio*.

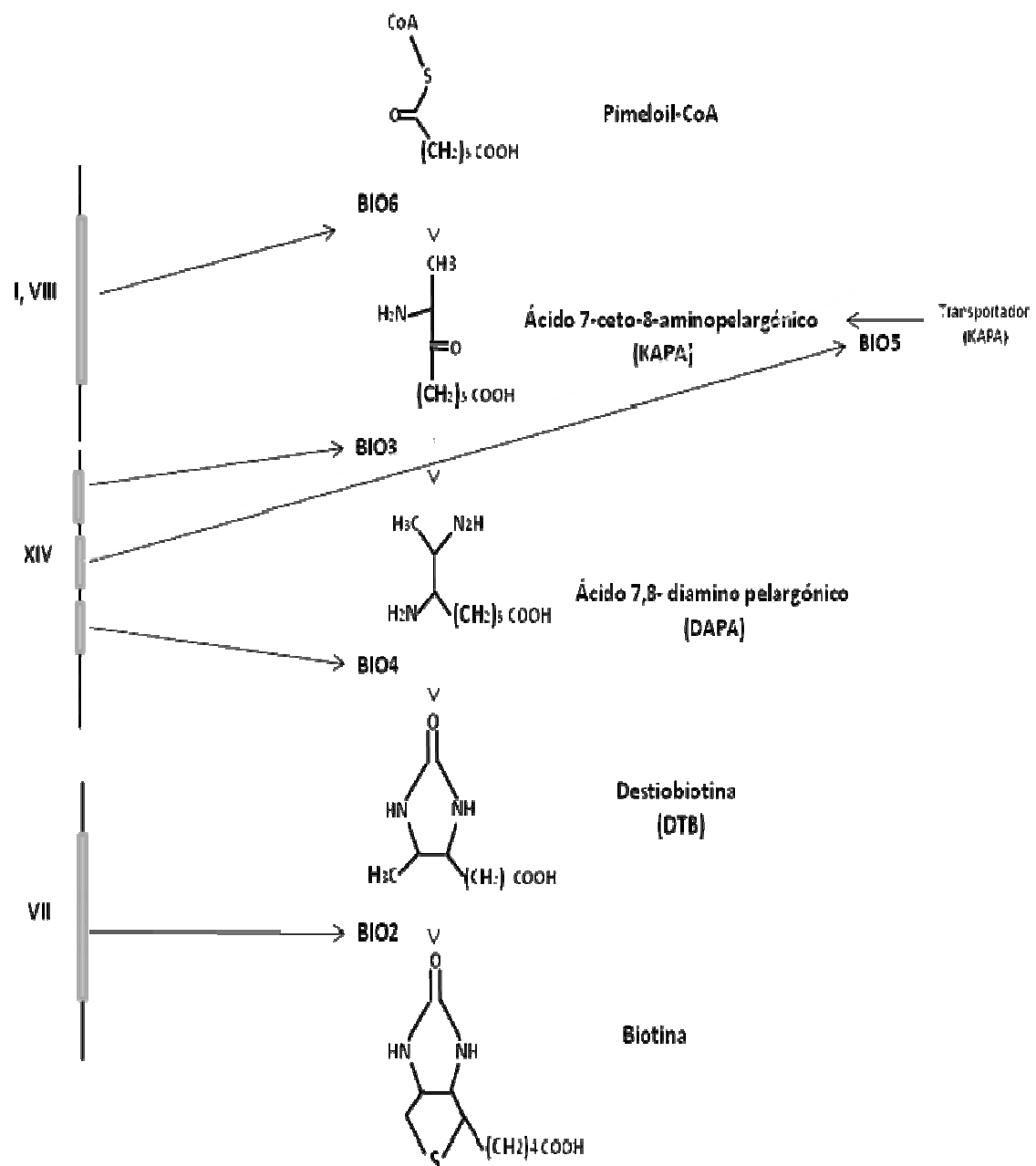


Figura 4. Ruta de síntesis de biotina en la levadura *S. cerevisiae*. Aunque la levadura *S. cerevisiae* es auxótrofa para biotina, este organismo la puede sintetizar a partir de precursores como el pimeloil-CoA o el ácido 7-ceto-8-aminopelargónico (KAPA).

1.6. Componentes de la regulación por biotina en levadura

Como inicio, para establecer el mecanismo de regulación mediado por biotina en levadura, se realizó un análisis de los genes que responden a biotina, y se determinó que en todos ellos existe una secuencia común de 20 pares de bases llamada BRE (biotin-responsive element) o VHRE (vitamin H-responsive element), conservada en varias especies de levadura, (6, 30). Estudios en los que se fusionaron las regiones promotoras de los genes *Bio* a un gen reportero, revelaron que se requiere de la secuencia BRE para la activación transcripcional en condiciones de bajos niveles de biotina (6, 30). Subsecuentemente se identificó y caracterizó el factor transcripcional Vhr1p que censa los niveles de biotina y que reconoce al elemento BRE. Además, se identificó que este factor tiene dos dominios importantes, el amino terminal que se une al DNA y el carboxilo que es el de activación de las secuencias promotoras.

1.7. Regulación genética por biotina en mamíferos

Investigaciones en las que se estudió la regulación genética por biotina en mamíferos, indican que la vitamina modifica la expresión de diversos genes (31). Aunque las bases bioquímicas de ésta regulación apenas comienzan a ser dilucidadas, las evidencias sobre la biotina como modulador de la expresión genética se conocen desde finales de la década de los 60'S. A continuación se realiza una descripción de las proteínas que son modificadas por la concentración de biotina intracelular.

1.8. Proteínas para el metabolismo de carbohidratos

Estudios pioneros realizados por Dakshinamurti (32) sobre el efecto que causa la deficiencia de biotina en enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, como la la glucocinasa (GK), indican que la deficiencia disminuye su actividad específica entre un 40-45% respecto al control y que el efecto se

revirtió al administrar dosis farmacológicas de biotina al incrementar su actividad a niveles aún mayores que el control (33). En un trabajo posterior también demostró que el efecto se observa a nivel de su transcripción, ya que la vitamina aumentó hasta 4 veces la expresión del RNA mensajero de ratas en ayuno, estos resultados indican que existe una correlación entre el aumento del RNA mensajero con la actividad de la enzima (5). Resultados similares se obtuvieron en cultivos de hepatocitos e islotes pancreáticos de rata (34-35), además se evidenció que a una concentración de 10^{-6} M la biotina fue capaz de incrementar los niveles del segundo mensajero guanosil monofosfato cíclico (GMPc), sugiriendo que los efectos de la biotina sobre la GK están mediados por los niveles intracelulares del GMPc (36).

Otra enzima importante en el metabolismo de la glucosa es la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) que participa en la gluconeogénesis y es considerada una de las enzimas limitantes para esta vía metabólica. En condiciones de ayuno o en animales diabéticos ésta proteína se expresa abundantemente, y por el contrario en condiciones posprandiales o con una dieta rica en carbohidratos, su expresión disminuye hasta ser casi imperceptible (37). Estudios realizados en ratas diabéticas indicaron que la expresión del RNA mensajero de la PEPCK aumentó hasta 10 veces en comparación al control, y que la administración de biotina la disminuyó; estos resultados sugieren que la biotina tiene efectos negativos sobre la expresión de la PEPCK (38).

De manera similar a la GK y PEPCK, la piruvato cinasa y la fosfofructocinasa I modifican su actividad enzimática en respuesta a la administración de biotina (39). En ratas diabéticas la actividad enzimática de la piruvato cinasa se encontró disminuida en un 70%, y la adición de biotina la incrementó hasta un 130% sobre el nivel del estado diabético. De igual forma, la actividad de la fosfofructocinasa I en el hígado de ratas diabéticas está reducida en un 35% y se restablece por la adición de biotina (39).

1.9. Proteínas dependientes de Biotina

En el laboratorio del Dr. Velázquez y colaboradores (40) , empleando un modelo de ratas deficientes de biotina, mostraron que la vitamina regula la expresión de la holocarboxilasa sintetasa (HCS) y las carboxilasas PC y PCC en varios tejidos como el hígado, el riñón y el músculo esquelético. El efecto observado fue la disminución de los niveles de sus RNA mensajeros, los cuales se restablecieron con la administración de la vitamina en un lapso de 24 horas (40). Resultados similares se obtuvieron en la línea celular HepG2 (células de hepatoma humano) crecidas en deficiencia de biotina durante 15 días, notándose una disminución de los RNA mensajeros para la HCS y las carboxilasas (ACC1 y PCC) (41). Además, en leucocitos provenientes de humanos que presentaban deficiencia apenas marginal de biotina, se encontró que las carboxilasas (MCC, PCC, PC, ACC1, ACC2), HCS, biotinidasa, y SMVT disminuyeron aproximadamente hasta un 80% (42). Estos datos indican que la biotina afecta la expresión de las proteínas que se relacionan directamente con dicha vitamina.

1.10. Otros genes afectados por biotina

Al menos en mamíferos hay un número muy grande de genes que son afectados por la deficiencia de biotina, por ejemplo; algunos oncogenes como N-myc, C-myb, N-ras y raf. Al estudiar a dichos genes, se encontró que su expresión disminuye hasta en un 47%, cuando las células se crecieron a la concentración de 25 pM de biotina (43). De manera similar, disminuyó la expresión de varios factores transcripcionales como NF-kB, SP1 y SP3 así como también para el receptor de la interleucina 2 (IL-2) y la interleucina 4 (IL-4) en células Jurkat (44-45).

En un análisis más extenso, mediante microarreglos, en células polimorfonucleares humanas, mostró que de los 14 mil genes estudiados, 139 aumentan y 131 disminuyeron su expresión en respuesta a la adición de 8.8 µM

de biotina (46), mientras que en las células HepG2 la deficiencia de biotina modifica la expresión de 1800 proteínas (47).

1.11. Regulación de genes por biotina a nivel pos-transcripcional

Otros estudios en células HepG2 evidenciaron que la biotina también afecta la expresión de proteínas a nivel post-transcripcional. En un cultivo de estas células se encontró que para la expresión normal de los receptores para asialoglicoproteínas y el de insulina se requiere de una concentración de 10^{-7} M de biotina, esta modificación podría estar mediada por el GMPc y la proteína cinasa G (PKG) (48).

1.12. Mecanismos de regulación

Recientemente se han comenzado a estudiar los mecanismos de regulación mediados por la biotina sobre la expresión genética y hasta ahora se ha propuesto que la regulación ocurre mediante la vía de señalización que está integrada por la guanilato ciclasa soluble (GCs), el GMPc y la proteína PKG, que en su conjunto la llamaré (vía GCs-PKG) y mediante la biotinilación de histonas.

1.13. Vía de señalización GCs-PKG

La vía de señalización GCs-PKG propone que la biotina puede modificar la expresión genética en células de mamíferos vía la activación de una cascada de transducción de señales en la que participan la biotina (como molécula activadora), la guanilato ciclasa soluble (GCs) y la proteína cinasa G dependiente de GMPc (PKG). Estudios realizados por Spence y colaboradores utilizando un modelo de hepatocitos primarios, evidenciaron que la biotina puede incrementar los niveles del segundo mensajero guanosil monofosfato cíclico

(GMPc) (36). Por otra parte Vesely (49) identificó que la biotina es capaz de aumentar la actividad de la GCs, que es la enzima productora de GMPc. Basados en estos antecedentes de la Vega y colaboradores mostraron que la adición de biotina a células en cultivo también activa a la PKG y que este efecto era bloqueado al adicionar un inhibidor de la GCs (48). Finalmente Solorzano-Vargas y colaboradores propusieron que el biotinil-AMP, producto de la reacción catalizada por la HCS participa como intermediario en la expresión genética. De acuerdo con este modelo el biotinil-AMP activa a la GCs (por un mecanismo aún desconocido), provocando un aumento en la producción de GMPc. El GMPc activa a la PKG, conduciendo a la fosforilación y activación de otras proteínas, posiblemente factores de transcripción, cuyo blanco son los genes que codifican para la HCS, ACC1 y PCC, entre otros (Figura 5) (41). La activación transcripcional de estos genes es afectada por la falta de biotina y por la actividad de la HCS, produciendo un fenotipo similar al de pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas (figura 5).

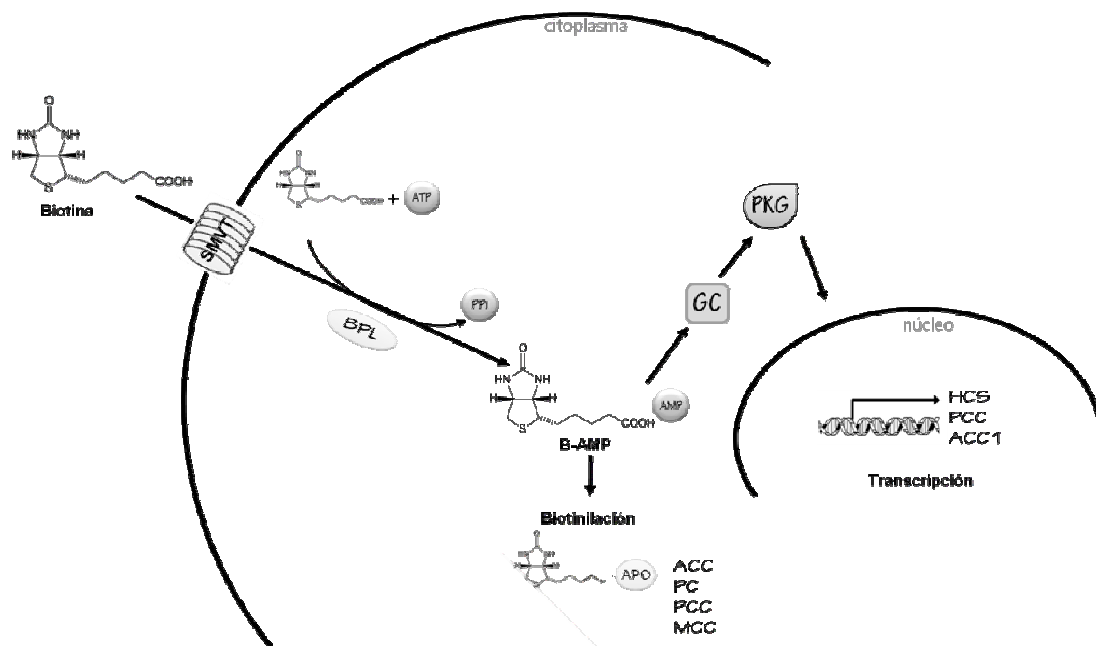


Figura 5. La biotina afecta la expresión de genes mediante la vía GCs-PKG. La biotina extracelular es transportada por el SMVT, que se activa por la BLP (HCS en mamíferos) y ATP, produciendo Biotinil-AMP. Este intermediario provoca un aumento en la concentración de la guanilato ciclasa, que a su vez incrementa al GMPc y activa a PKG que fosforila a otras proteínas que tienen efecto en los genes de HCS, PCC, ACC1.

1.14. Biotinilación de histonas

Reportes recientes indican que la biotina también se localiza en el núcleo celular (30). Consistente con esta observación, Hymes y cols., evidenciaron que la biotina se une a las histonas en un residuo de lisina y que dicha unión esta catalizada por la biotinidasa (7). Por otro lado, estudios por inmunofluorescencia en varias líneas celulares provenientes de humanos, indican que la HCS se localiza primordialmente en el núcleo, y ahí mantiene su actividad catalítica biotinilando a las histonas (31). Con estos hallazgos, se propuso que esta modificación postraduccional realizada por la biotinidasa o bien por la HCS, es

de importancia biológica ya que presumiblemente puede modificar la estructura de la cromatina y facilitar la activación o represión de genes (32). Sin embargo, estudios recientes ha puesto en duda la existencia de la biotinilación de histonas (50-51), esta aseveración se sustenta porque en un cultivo celular crecido con bajas concentraciones de biotina la biotinilación de histonas no se modificó, mientras que los sustratos naturales, las carboxilasas, si disminuyeron su grado de biotinilación.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La función de la biotina como reguladora de la expresión genética es enigmática, dada la diversidad de proteínas sobre las que tiene efecto y la poca o nula relación fisiológica aparente entre muchas de ellas, por lo que investigar esta función podría ayudar a identificar si existen redes de regulación genética que permitan entender los mecanismos involucrados en ésta regulación.

Theodosius Dobzhansky propuso que “nada en biología es comprensible sino a la luz de la evolución”. Por ello, para intentar comprender si existe una red de regulación controlada por la biotina en eucariontes filogenéticamente distantes entre sí y de diferente complejidad, decidimos realizar estudios comparativos en tres eucariontes modelo como: la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el nematodo *Caenorhabditis elegans* y la rata *Rattus norvegicus*. Este trabajo permitirá entender como es que una molécula como la biotina interviene en procesos de regulación genómica en los tres eucariontes estudiados que son distantes en aproximadamente mil millones de años.

3. HIPÓTESIS

Dado que la biotina afecta la expresión de múltiples genes, incluyendo algunos relacionados al metabolismo de carbohidratos, es probable que exista una red de regulación controlada por la biotina que provoque alteraciones genéticas y metabólicas similares en eucariontes filogenéticamente distantes entre sí y de diferente complejidad.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la deficiencia de biotina provoca alteraciones genéticas y metabólicas análogas en tres eucariontes que abarcan un amplio rango de la escala filogenética: la levadura *S. cerevisiae*, el nematodo *C. elegans*, la rata *R. norvegicus*, así como proponer la(s) vía(s) de señalización en la(s) que participa.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer y validar los organismos modelos deficientes de biotina, determinando el grado de biotinilación de las carboxilasas
2. Identificar si la deficiencia de biotina causa alteraciones metabólicas y genéticas similares en los tres organismos estudiados.
3. Determinar la(s) vía(s) de señalización que se modifican en la deficiencia de biotina.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Organismos Deficientes de Biotina

A cinco ratas de la cepa Wistar con una edad de 21 días y 50 gramos de peso, se les indujo la deficiencia de biotina mediante la alimentación con una dieta comercial que contenía 30% de clara de huevo como fuente de avidina (TD. 81079, Harlan Teklad, Madison WI, USA), esta proteína se une de manera covalente a la biotina, formando un complejo proteínico que no es absorbido de la sangre. Las ratas utilizadas como control se alimentaron con la dieta que contiene la misma cantidad de avidina más un suplemento de 0.03 g de biotina /Kg dieta (TD. 97126, Harlan Teklad, Madison WI, USA). Brevemente cada rata fue individualmente alojada en una jaula con ciclos 12hrs oscuridad/12hra luz y con acceso libre al alimento y agua. Después de 6-7 semanas, las ratas (suficientes y deficientes de biotina) se sacrificaron. Para analizar la recuperación de los efectos de la deficiencia de biotina, cinco ratas con deficiencia de biotina se inyectaron por vía intraperitoneal con biotina (1 mg/kg de peso corporal) o con solución salina (control) y luego se sacrificaron a las 0 y las 24 horas por decapitación. A cada rata se le extrajo el hígado y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 ° C hasta su utilización.

Los nematodos deficientes de biotina se obtuvieron de la siguiente manera: organismos de *C. elegans* de la cepa silvestre (N2) se sincronizaron en la etapa larvaria L1 de su crecimiento y se alimentaron con un cultivo de *Escherichia coli* auxótrofa de biotina (MG1655bioB:kan, donada por el Dr. John E. Cronan, Universidad de Illinois, Urbana) que se creció en un medio mínimo (MM) con biotina 0.05 nM (deficiente de biotina). Para generar una deficiencia más profunda, se les adicionó avidina (1 U/mL), esta cantidad de avidina es suficiente para atrapar la biotina en los medios deficientes. Los nematodos controles se crecieron en las mismas condiciones con la adición de 5 nM de biotina

(suficiente de biotina). A los experimentos en los que se readministró biotina, los nematodos deficientes fueron colocados con *E. coli* auxótrofa de biotina crecida en medio que contenía 5.0 nM de biotina; se cosecharon después de 0 y 4 horas. El contenido de lípidos en los nematodos se determinó mediante la tinción con Negro de Sudan B, aproximadamente 500 nematodos deficientes y controles se lavaron con amortiguador M9. Posteriormente los nematodos se fijaron con 10% de paraformaldehído con tres ciclos de congelamiento y descongelamiento y se deshidrataron con etanol primero al 50% y después al 70%. Finalmente se realizó la tinción con una solución saturada de Negro de Sudan durante toda la noche.

Los cultivos de levaduras *S. cerevisiae* (cepa W303A) deficientes de biotina, se obtuvieron al crecerlas en medio mínimo sintético (SD) que contiene 2% de glucosa como fuente de carbono y concentraciones de biotina de 0.4 y 8.0 nM de biotina (deficientes y suficientes de biotina respectivamente). El efecto de la readministración de biotina (8.0 nM) o aspartato (25 mM) se evaluó en las levaduras deficientes de biotina.

6.2. Análisis de la deficiencia de biotina

La deficiencia de biotina se evaluó en los tres organismos mediante Western-blot de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina. Alícuotas que contienen 30µg de proteína total se sometieron a SDS-PAGE y posteriormente se transfirió a membranas de nitrocelulosa con una cámara de transferencia semiseca (Biorad) a 20 V durante 30 minutos. Subsecuentemente la membrana se incubó con estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina durante 1 hora. El color de la reacción se desarrolló incubando a las membranas en la oscuridad con el amortiguador A-P que contiene 10Mm de Tris base (pH 9.5), 10 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂ y 50µl de una solución que contiene cloruro de nitrazolium y 50 µl de 5-bromo-4-cloro-3-idol fosfato. La intensidad de bandas generadas se cuantificaron por densitometría con el software Quantity one (Biorad). Las

proteínas se cuantificaron por el método de Bradford utilizando albumina sérica bovina como estándar.

6.3. Medición de las concentraciones de los metabolitos

Las concentraciones de los nucleótidos: ATP, ADP y NAD⁺ se cuantificaron en los tres organismos como se describe en (52). Los extractos de éstos se obtuvieron como en (52-54). Brevemente, aproximadamente 20 mg de peso húmedo de hígado de rata, de nematodos y levaduras se homogenizaron en un mortero con nitrógeno líquido. Los homogenados obtenidos se recolectaron con una solución de ácido perclórico/EDTA (0.6 M y 20mM respectivamente). Los extractos se incubaron en hielo por 30 minutos y posteriormente se desproteinizaron mediante centrifugación de 15 minutos a 12,000 rpm, seguido de la neutralización con KOH 4M. La concentración de cada uno de los nucleótidos se determinó espectrofotométricamente a 340nm. Cada extracto fue analizado para el contenido de los nucleótidos por triplicado.

Por otra parte, el consumo de glucosa y la producción de etanol por la levadura se midieron de acuerdo a los métodos de Bergmeyer (52) y de Beutler (55) respectivamente. A la misma cantidad de peso húmedo (500 mg) de levadura en la fase exponencial, se le adicionó el amortiguador MES-TEA (pH 6.0) que contenía 20 mM de glucosa. Posteriormente las células se incubaron a 30°C durante 30 min. La glucosa se midió en el sobrenadante por el método de glucosa oxidasa (GO), utilizando un Kit para cuantificar glucosa (GAGO-20, Sigma). El etanol se determinó mediante la adición de NAD⁺ y la enzima alcohol deshidrogenasa.

6.4. Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno para los tres organismos se midió con un electrodo de oxígeno tipo Clark, como se describió previamente (53-54, 56). Brevemente,

organismos completos, nematodos (aproximadamente 1000) y levaduras (25 mg de peso húmedo), se resuspendieron en 1 ml de buffer M9 y MES-TEA (pH 6), respectivamente, y se transfirieron a la cámara y la respiración fue determinada a 24°C (en el nematodo) y 30°C (en las levaduras) durante al menos 10 minutos. Para el hígado de rata, primero se obtuvieron las mitocondrias y posteriormente se colocaron en un buffer SHE pH 7.3 (sacarosa 250mm, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM) y la proteína extraída (0.5 mg/ml) se resuspendió en buffer KME (glutamato, malato y NaH₂PO₄ 5 mM de cada uno) pH 7.2. La proporción de consumo de oxígeno se midió a 30°C. Las pendientes se utilizaron para calcular las tasas de consumo de oxígeno.

6.5. Análisis de expresión génica por microarreglos en los tres organismos

La extracción del RNA total para el análisis de expresión genética del hígado de rata y del nematodo se extrajo con el reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la levadura, la extracción se realizó con fenol ácido de acuerdo con protocolos estándar (57). El RNA de los tres organismos, se purificó con el kit RNeasy de QIAGEN (Qiagen, Valencia, CA) para eliminar la contaminación con DNA genómico y proteínas. Todos los procedimientos para el análisis de expresión por microarreglos se realizó en la Universidad de Boston (Microarray Resource center) como lo describe el Manual Técnico de Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA). El análisis para establecer los cambios de expresión genética con significancia estadística entre los grupos control y experimentales incluyó la prueba t-test, mientras que para los cambios de expresión de los diferentes conjuntos de genes (metabolismo de glucosa, síntesis de lípidos etc.) se determinó mediante el software GSEA v. 2.0, (Broad Institut Cambridge, MA) y dichos conjuntos se generaron a partir de los datos proporcionados por la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEEG).

6.6. Análisis de expresión por qRT-PCR

El RNA de los tres organismos fue identificado como se mencionó anteriormente. El DNA complementario fue generado por la enzima Superscript II (Invitrogen) y hexámeros al azar (desoxi-NTP6) (Amersham Bioscience), empleando el protocolo establecido para dicha enzima. El análisis de expresión relativa se realizó por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real, utilizando el método descrito por Applied Biosystems y mediante el uso de sondas TaqMan. La expresión de cada RNA mensajero fue examinado y normalizado con el RNA ribosomal (rRNA) 18S con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (58). La eficacia de nuestras reacciones fue probada mediante curvas de concentración de RNA.

6.7. Análisis de expresión de proteínas por Western-blot.

Las muestras de los tres organismos se homogenizaron con un amortiguador de extracción que contiene 50mM de HEPES, 50mM de KCl, 1mM de EDTA, 1mM de EGTA, 5mM de fosfato β -glicerol, 0.1% (v/v) de Triton X-100, Inhibidores de proteasas (Complete, Roche), 50 mM de fluoruro de sodio, 1 mM de ortovanadato de sodio, 5 mM de pirofosfato de sodio, 0.2mM PMSF (todos de Sigma-Aldrich). Subsecuentemente, los homogenados se centrifugaron a 12,000 xg durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se recolectó en tubos nuevos y se cuantifico la concentración de proteína por el método de Bradford, usando BSA como estándar. Se separaron las proteínas (25 μ g de proteína total) mediante SDS-PAGE en un gel al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF(0.45 μ M). Para detectar las proteínas de interés, anticuerpos que reconocen a la AMPK total y AMPK fosforilada (Thr172) se utilizaron en una dilución de 1:1000 cada uno (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). La visualización de las bandas se realizó a través de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (dilución 1:2000, de Cruz biotechnology) que se reveló con lo reactivos de detección ECL plus Western Blot (Amersham). Las

bandas observadas se cuantificaron usando el analizador de imágenes Quantity one (Bio-Rad).

6.8. Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y por lo menos en tres ocasiones diferentes, con diferentes muestras para cada organismo. Los datos se presentan como la media de tres experimentos diferentes y la significancia estadística se evaluó mediante un análisis de ANOVA y la prueba de t (t-test), y comparaciones ajustadas de Bonferroni entre los distintos grupos experimentales. El nivel de significación fue de $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Fenotipos en la deficiencia de biotina

Para determinar los efectos metabólicos que causa la deficiencia de biotina, primero establecimos los modelos deficientes de esta vitamina, la cual se evaluó midiendo el grado de biotinilación de las proteínas dependientes de biotina. En los tres organismos encontramos una disminución considerable de las holocarboxilasas (piruvato carboxilasa, propionil CoA carboxilasa, 3-metilcrotonil CoA carboxilasa) y la proteína Arc1p (aminoacil tRNA sintetasa cofactor 1, identificada sólo en levadura). Aunque a esta proteína se le une la biotina, no tiene la función de carboxilasa y aun se desconoce si tiene alguna relevancia biológica (59) (figura 6; carriles 2, 5 y 8 *versus* 3, 6 y 9). Estas proteínas dependientes de biotina se restablecieron a los niveles del control después de la administración de biotina (figura 6, carriles 4, 7 y 10). El fenotipo observado para las ratas deficientes es la disminución de su peso, (figura 7A), caída de pelo, conjuntivitis periorificial y erupciones cutáneas. Sin embargo estos animales continuaron con sus actividades normales y aparentemente no presentaban otras anormalidades. Para la levadura hubo una disminución del crecimiento en la deficiencia de la vitamina (figura 7B). Finalmente, en el caso del nematodo deficiente de biotina, además de la disminución de su crecimiento, también presentó una reducción en su contenido de lípidos, como lo indicó la tinción con el negro de Sudan (figura 7C).

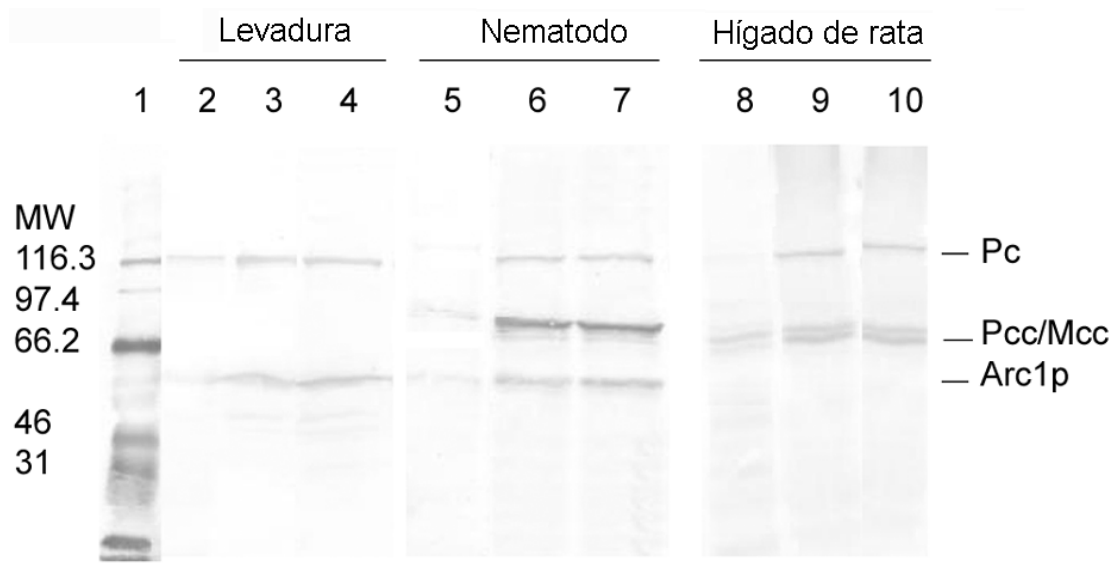


Figura 6. Identificación del grado de biotinilación de las proteínas dependientes de biotina mediante Western-blot, revelado con estreptavidina. 1: marcador de peso molecular, 2, 5 y 8: deficientes de biotina, 3, 6 y 9: suficientes de biotina, 4, 7 y 10: reposición de la biotina. PC= Piruvato carboxilasa, PCC= Propionil CoA carboxilasa, MCC= 3-metilcrotonil CoA carboxilasa y Arc1p= aminoacil tRNA sintetasa cofactor 1.

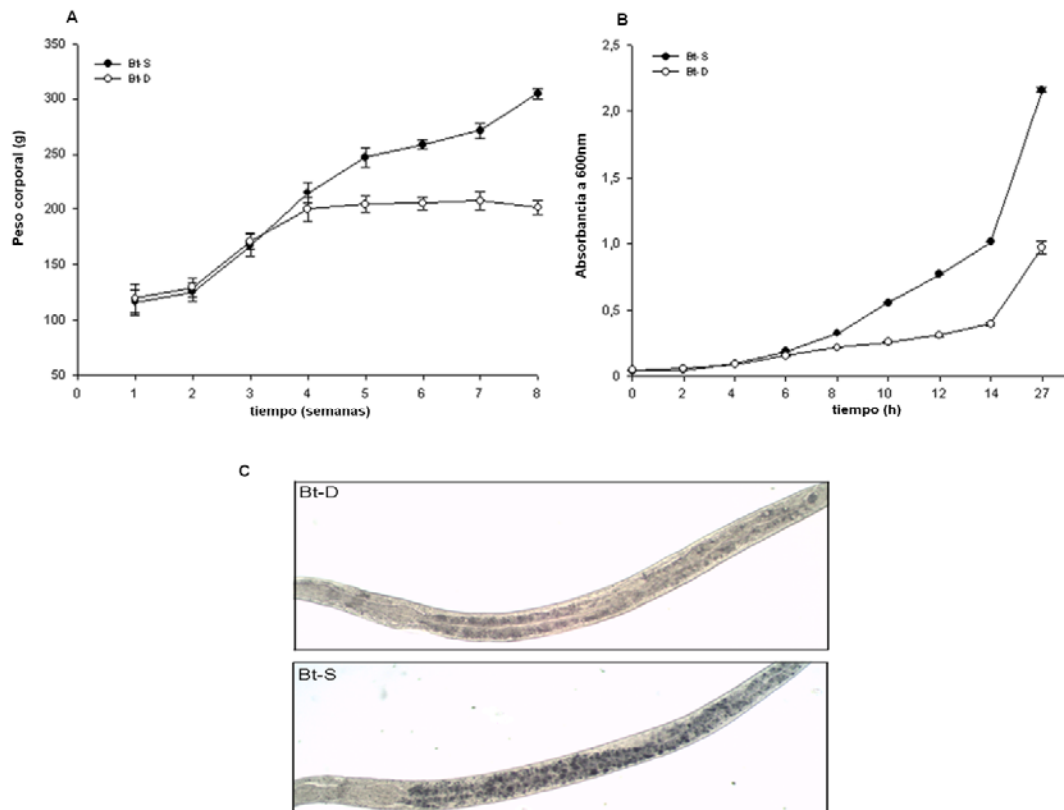


Figura 7. Fenotipos de los organismos deficientes de Biotina. Efecto de la deficiencia de biotina en: a) el peso corporal de las ratas, b) el crecimiento de *S. cerevisiae* y c) cantidad de lípidos en el nematodo mediante la tinción con Sudán Negro. Bt-S: suficiente de biotina; Bt-D: deficiente de biotina.

7.2. Efectos metabólicos en la deficiencia de biotina.

Aunque existen algunos estudios reportados acerca de los efectos de la biotina sobre genes importantes de la glucólisis y de la gluconeogénesis, hasta ahora no se sabía si la deficiencia de la vitamina provoca alteraciones metabólicas. Así nosotros primero evaluamos algunos efectos metabólicos relacionados a la utilización de glucosa que fueron afectados por la deficiencia de biotina (figura

8). Aunque el consumo de glucosa sólo se determinó en levadura, encontramos que disminuyó significativamente en la deficiencia (figura 8A). Por otra parte, en las tres especies el flujo glucolítico/fermentativo fue presumiblemente reducido, como lo indica la disminución de la concentración de lactato en la rata y en el nematodo y la producción de etanol en levadura (figura 8B). Además y de manera importante, en los tres organismos hubo cambios en los niveles energéticos, como lo indica la disminución de los niveles de ATP y un aumento en el ADP, así como en los niveles de NAD^+ (figura 8C-E); también para los tres disminuyó el consumo de oxígeno (figura 8F).

Estos resultados indican que existen alteraciones en el metabolismo energético, y que son normalizados cuando la biotina o aspartato (utilizado como fuente anaplerótica de TCA en levadura) fueron readministrados (figura 8A-F).

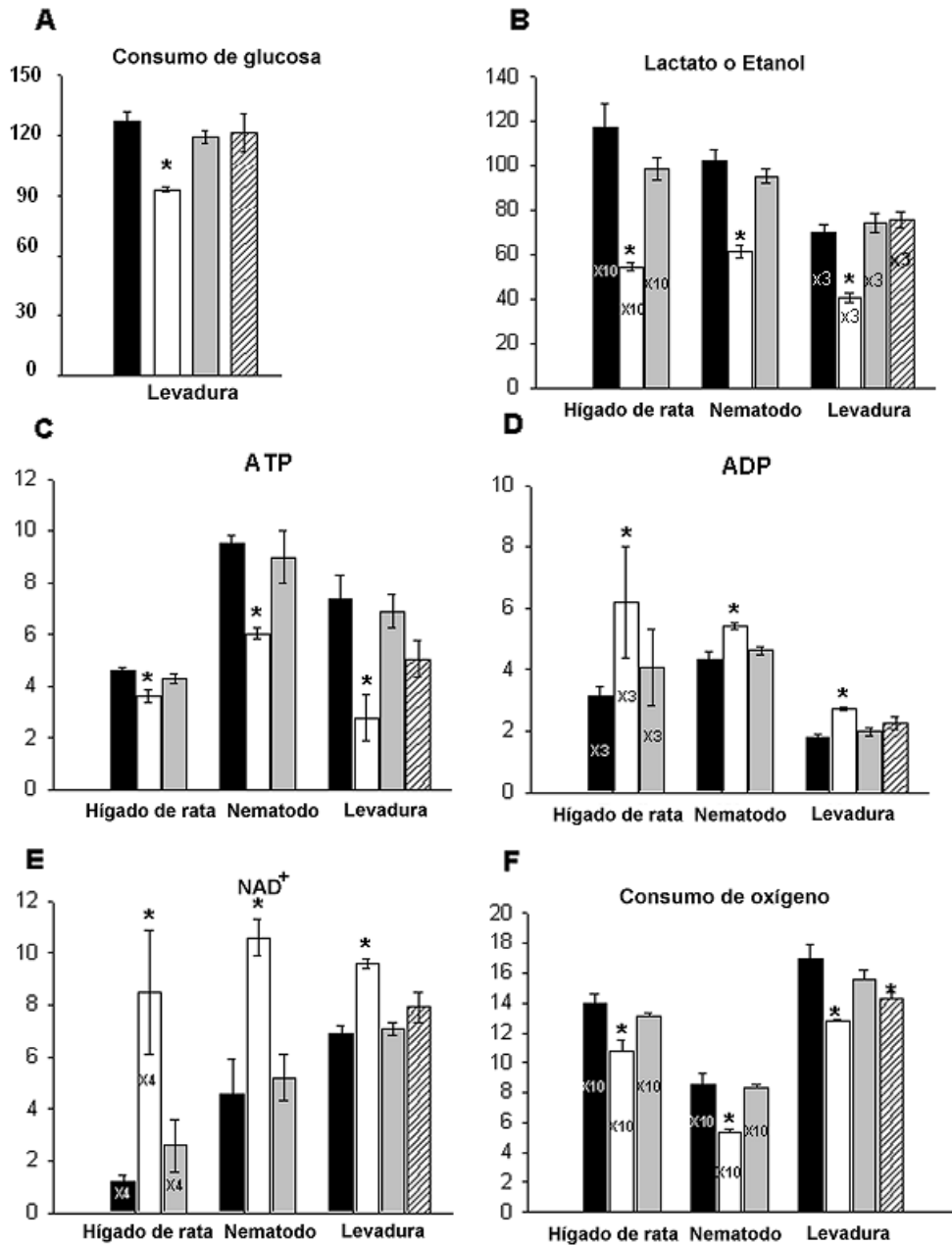


Figura 8. La deficiencia de biotina afecta la utilización de glucosa en los tres eucariontes y puede ser restablecida por la administración de aspartato en levadura. Todos los metabolitos en hígado de rata y el nematodo se expresan en nmol/mg de proteína, mientras que para la levadura se expresan en nmol/mg de peso húmedo. **■**: suficiente de biotina, **□**: deficiente de biotina, **▒**: deficiente más biotina y **▨**: deficiente de biotina más aspartato. Los barras de los gráficos con la leyenda "X veces", indican que cada valor

asignado se debe multiplicar por su factor correspondiente. Todos los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar y representan el promedio de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas por ANOVA ($p \leq 0.05$).

7.3. La deficiencia de biotina afecta la expresión de genes en los tres organismos estudiados.

Evidencias bien documentadas indican que la biotina afecta la expresión genética. Para identificar los efectos que causa la deficiencia de biotina sobre transcritos del metabolismo intermediario del carbono, realizamos un análisis mediante microarreglos en los tres organismos. Los genes que se expresaron diferencialmente, se organizaron en grupos de acuerdo con sus procesos biológicos por medio de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG). Para determinar si hubo cambios en la expresión en alguno de los grupos KEGG, se utilizó el software *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) (60).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1, y corresponden para cada especie. Varios grupos de genes que participan en el metabolismo intermediario del carbono y diversas vías de señalización fueron modificadas diferencialmente a niveles estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$, $FDR > 0.25$) en la deficiencia de biotina; para el hígado de la rata: 4 grupos de genes disminuyeron su expresión y 4 la aumentaron, para el nematodo, 6 disminuyeron y 1 aumentó y para la levadura 1 disminuyó y 3 aumentaron (tabla 1 y tablas de suplemento que muestran la composición de cada grupo). Estos resultados indican alteraciones similares en los tres organismos muy probablemente causados por la deficiencia de biotina.

Tabla 1. La deficiencia de biotina modifica la expresión de genes participantes en varias vías metabólicas y de señalización en los tres eucariontes estudiados.

	Hígado de rata				Nematodo				Levadura			
	N	NES	p-val	FDR [†]	N	NES	p-val	FDR [†]	N	NES	p-val	FDR [†]
VÍAS METABÓLICAS												
METABOLISMO DE GLUCOSA	40	-1.58	0.03	0.06	35	-1.4	0.08	0.13	81	1.5	0.04	0.17
CICLO DE TCA	18	0.84	0.69	0.84	29	-1.79	0	0.09	30	1.7	0.01	0.05
FOSFORILACIÓN OXIDATIVA	68	0.57	1	0.98	80	-1.57	0	0.10	64	-1.33	0.06	0.29
OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS	13	1.39	0.12	0.14	45	1.42	0.03	0.09	45	2.2	0	0
-CICLO DEL GLIOXILATO ⁺												
SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS	5	-1.60	0.02	0.07	7	-1.63	0.06	0.09	5	-1	0.05	0.06
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN												
DE LA INSULINA	97	-1.23	0.13	0.236	30	-1.46	0.074	0.12	NA	NA	NA	NA
TOR	28	-1.29	0.15	0.223	19	-1.51	0.054	0.11	14	1.25	0.53	0.37
DE LA ADIPONECTINA	53	1.83	0.00	0.01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
RECEPTOR DE CITOCINAS	70	1.68	0.00	0.03	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
JAK-STAT	68	1.40	0.04	0.16	6	0.85	0.685	0.72	NA	NA	NA	NA

Los datos de la tabla muestran los cambios de los diferentes grupos de genes agrupados por vías metabólicas y de señalización que modificaron su expresión en la deficiencia de biotina. Los valores negativos resaltados en negritas indican la disminución significativa de la expresión génica, por el contrario los valores positivos representan aumento de la expresión. Los grupos cuyos cambios no son estadísticamente significativos se muestran en gris.

⁺ El ciclo del glioxilato no está en la rata; N, el número de genes de cada grupo, NES, clasificación de enriquecimiento normalizado, e indica si el grupo aumentó o disminuyó su expresión; [†] FDR, la tasa de falso descubrimiento, p-val, valor de p, NA, no aplicable.

7.4. Efectos de la deficiencia de biotina sobre diversos transcritos en hígado de rata

Después de realizar el análisis de expresión génica, comparamos los grupos obtenidos mediante KEEG de los hígados de ratas deficientes de biotina versus los controles. Encontramos que aquellos para el metabolismo de glucosa y para la síntesis de lípidos disminuyeron significativamente, mientras que aquellos para la β -oxidación de ácidos grasos se incrementaron, aún cuando las ratas se sacrificaron inmediatamente después del periodo posprandial. Cabe mencionar que en el hígado de mamíferos, a diferencia de otros órganos, la glucosa se usa como fuente de almacenamiento de energía en forma de glucógeno y triglicéridos (61). Los genes individuales para la utilización de glucosa y para la lipogénesis cuyos transcritos disminuyeron incluyen al transportador de glucosa 1 (glut1), la glucocinasa (GK), 6-fosfofructo-2-cinasa, piruvato cinasa hepática (L-PK), la piruvato carboxilasa (PC), lactato deshidrogenasa D, la acetil-CoA carboxilasa (ACC1) y la sintetasa de ácidos grasos (FAS). En contra parte, el transcrito para la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCK), que es una enzima gluconeogénica, aumentó significativamente (tabla suplementaria 1). Estos datos transcriptómicos pueden sugerir que hubo una disminución en la captación de glucosa, disminuyendo el flujo del carbono a través de la glucólisis y lipogénesis e incrementó el flujo vía la gluconeogénesis en la deficiencia de biotina, y que concuerdan con los cambios metabólicos descritos anteriormente.

Con el fin de confirmar algunos de los resultados obtenidos con los microarreglos de los hígados de ratas deficientes de biotina, los RNAs mensajeros de la GK, L-PK, PEPCK y también de la biotina proteína ligasa (usado como marcador positivo (62)) se cuantificaron por medio de PCR en tiempo real (qRT-PCR), también se cuantificaron los mismos RNAs mensajeros en los hígados de ratas deficientes a los que se les readministró biotina mediante inyección intraperitoneal. Los resultados obtenidos son consistentes

con los obtenidos a partir de los microarreglos y fueron revertidos después de la aplicación de la vitamina (figura 9). Estos hallazgos indican que la deficiencia de una vitamina como la biotina produce extensas modificaciones en la expresión de genes que participan en el metabolismo intermediario del carbono, como se observó por la reducción de los transcritos para la glucólisis y lipogénesis, y un incremento de varios para la β -oxidación y gluconeogénesis, incluso aún si los animales se encontraban en el periodo posprandial inmediato.

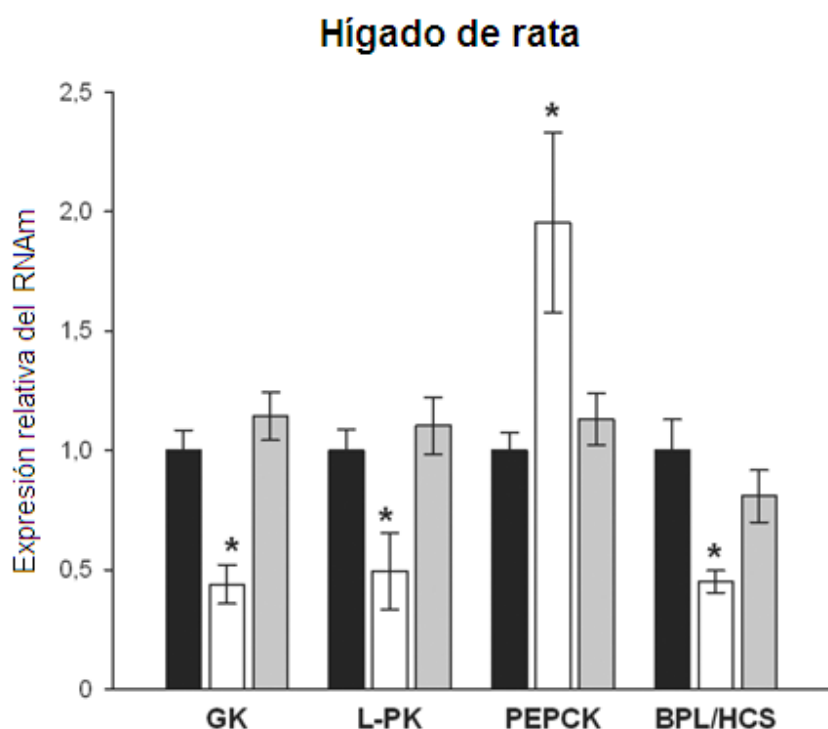


Figura 9. Los cambios de algunos transcritos seleccionados durante la deficiencia de biotina fueron confirmados por qRT-PCR y se revirtieron con la suplementación de la vitamina en las ratas deficientes de biotina. ■: Suficiente de biotina, □: deficiente de biotina y ▒: deficiente de biotina más biotina. GK: glucocinasa, L-PK: piruvato cinasa hepática, PEPCK: fosfoenol piruvato carboxicinasa, BPL / HCS: biotina proteína ligasa (holocarboxilasa sintetasa). Todos los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar y representan el promedio de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas por ANOVA ($p \leq 0.05$).

7.5. Efectos de la deficiencia de biotina sobre diversos transcritos en *C. elegans*

A diferencia de los estudios en la rata, donde sólo usamos el hígado, el estudio en el nematodo se realizó en el organismo completo. Sin embargo, los resultados fueron similares a los obtenidos en la rata, aunque hubo mayor cantidad de grupos de genes que modificaron su expresión a niveles estadísticamente significativos (tabla 1). Los grupos de genes para el metabolismo de glucosa, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), la fosforilación oxidativa, y para la síntesis de ácidos grasos redujeron su expresión, mientras que para la β -oxidación de ácidos grasos y ciclo del glioxilato la aumentaron (tabla 1). Respecto a los genes individuales, la hexocinasa F14B4.2 (que inferimos que es la ortóloga a la glucocinasa de mamíferos, debido a su localización citoplasmática, mientras que las otras hexocinasas se ubican en la mitocondria (63)), la 6-fosfofructo-1-cinasa (K02B2.1), dos isoformas de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (gpd-1 y gpd-4) y la fosfoglicerato cinasa (T03F1.3) disminuyeron su expresión (tabla suplementaria 2).

Otros transcritos que mostraron una disminución significativa fueron aquellos para las enzimas que participan en el ciclo de TCA como son: la piruvato carboxilasa (pyc-1), aconitasa (aco-1), isocitrato deshidrogenasa (F59B8.2), dos isoformas de la succinil-CoA sintetasa (F23H11.3, C50F7.4), succinato deshidrogenasa (C34B2.7) y la malato deshidrogenasa (mdh-1), así como alrededor de 40 genes para la fosforilación oxidativa (tabla suplementaria 2). Varios transcritos para la síntesis de ácidos grasos también disminuyeron: la ATP-citrato liasa, ACC, FAS, enzima málica y varias desaturasas y elongasas de ácidos grasos (tabla suplementaria 2). Contrariamente, hubo un aumento de los transcritos para enzimas de la β -oxidación de ácidos grasos como algunos miembros de la familia de las acil-CoA sintetetas (acs-2, acs-11 y acs-17) y de la carnitina palmitoil-transferasa-1 (CPT-4 y 6) y de enzimas que facilitan la transferencia de ácidos grasos a la matriz mitocondrial para su β -oxidación (tabla

suplementaria 2). Efectos similares tuvieron los transcritos para algunas enzimas del ciclo del glioxilato como la isocitrato liasa/malato sintasa (gei-7) y la malato deshidrogenasa citosólica (F46E10.10), así como la PEPCK que es una enzima gluconeogénica (W05G11.6) (tabla suplementaria 2).

Algunos de los datos obtenidos por los microarreglos en el nematodo se corroboraron por medio de qRT-PCR, estos fueron la hexocinasa F14B4.2, la succinil CoA sintetasa (participante en el ciclo de TCA), isocitrato liasa/malato sintetasa (participante en el ciclo del glioxilato) y la PEPCK. Dichos cambios se revirtieron cuando se readministró biotina al nematodo (figura 10). Así en el *C. elegans* deficiente de biotina, como en *R. norvegicus*, los transcritos de los genes para la utilización de glucosa y para la síntesis de ácidos grasos disminuyeron mientras que varios para la β -oxidación de ácidos grasos y la producción de glucosa aumentaron.

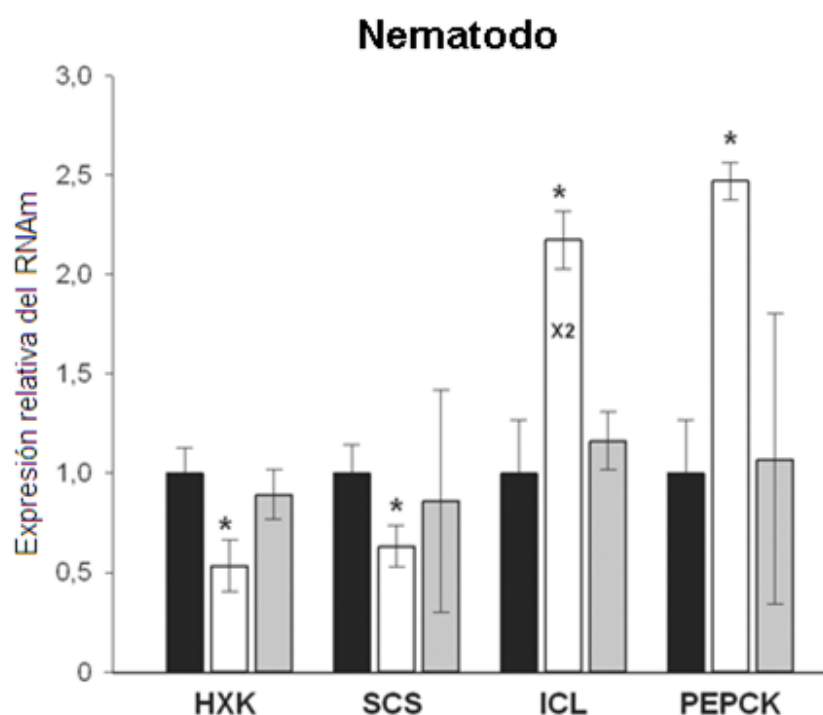


Figura 10. Los cambios de algunos transcritos seleccionados durante la deficiencia de biotina fueron confirmados por qRT-PCR y se revirtieron con la suplementación de la vitamina a nematodos deficientes de biotina. ■■: Suficiente de biotina, □: deficiente de biotina y ■: deficiente más biotina. HXK: hexocinasa F14B4.2, SCS: succinil CoA sintetasa, ICL: isocitrato liasa/malato sintasa, PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxicinasa. Todos los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar y representan el promedio de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas por ANOVA ($p \leq 0.05$).

7.6. Efectos de la deficiencia de biotina sobre diversos transcritos en levadura.

Contrariamente a los otros dos organismos estudiados, el metabolismo oxidativo de la levadura *S. cerevisiae* es diferente. En gran parte debido a que la glucosa,

fuerza de carbono preferida, reprime a los genes para el uso de otras fuentes de carbono y su metabolismo es fermento-respiratorio (64). En la levadura deficiente de biotina (con abundante glucosa) los grupos de genes para el metabolismo de glucosa, el ciclo de TCA, la β -oxidación de ácidos grasos y el ciclo del glioxilato aumentaron su expresión (tabla 1); sin embargo, se debe notar que el grupo de genes para la utilización de glucosa incluye tanto aquellos para su utilización así como para su producción (tabla suplementaria 3).

Respecto a los transcritos para el transporte (HXT1) y la fosforilación (HXKII, el ortólogo a la glucocinasa de hígado de mamíferos (65)) de baja afinidad de glucosa, disminuyeron su expresión significativamente. Por el contrario aquellos de alta afinidad (HXT2 y HXKI) la aumentaron (tabla suplementaria 3).

Otros transcritos para enzimas glucolíticas no cambiaron, aunque aquel para la 6-fosfofructo-2-cinasa se incrementó. También se incrementaron los transcritos para la piruvato carboxilasa 1 (PYC1) y dos subunidades de la piruvato deshidrogenasa (PDB1, PDX1), así como para varias enzimas para el ciclo de TCA: citrato sintasa (CIT 1 y 3), isocitrato deshidrogenasa (IDP1, 2 y 3), succinil-CoA liasa (LSC2), succinato deshidrogenasa (SDH 3 y 4) y fumarasa (FUM1) (tabla suplementaria 3). Por otra parte, transcritos de los genes lipogénicos ACC1, FAS1 y FAS2 disminuyeron, mientras que algunos para la oxidación de ácidos grasos (PXA2, FAA2, POX1, FOX2, POT1) y para la vía del glioxilato (CIT2, ICL1 and MLS1) aumentaron (tabla suplementaria 3). El mismo efecto se observó para el transcrito de la fosfoenolpiruvato carboxicinas (PCK1).

Algunos de los cambios observados en los microarreglos se cuantificaron por qRT-PCR. Estos corresponden a los RNAs mensajeros para el transportador de glucosa 2 (HXT2), la hexocinasa II (HXKII), la isocitrato liasa (ICL1), la fosfoenolpiruvato carboxicinas (PCK1), la succinil CoA liasa (CIT3), y la BPL (control positivo) (figura 11). De manera similar a los otros dos organismos, la readministración de la biotina a la levadura deficiente, restablece a los RNAs mensajeros probados e indican que existe una disminución en la utilización de glucosa como principal fuente energética y que para reponerla probablemente la

podría obtener de los ácidos grasos. Estos datos también sugieren una disminución paradójica de la fermentación en condiciones de alta glucosa en el medio (figura 8B).

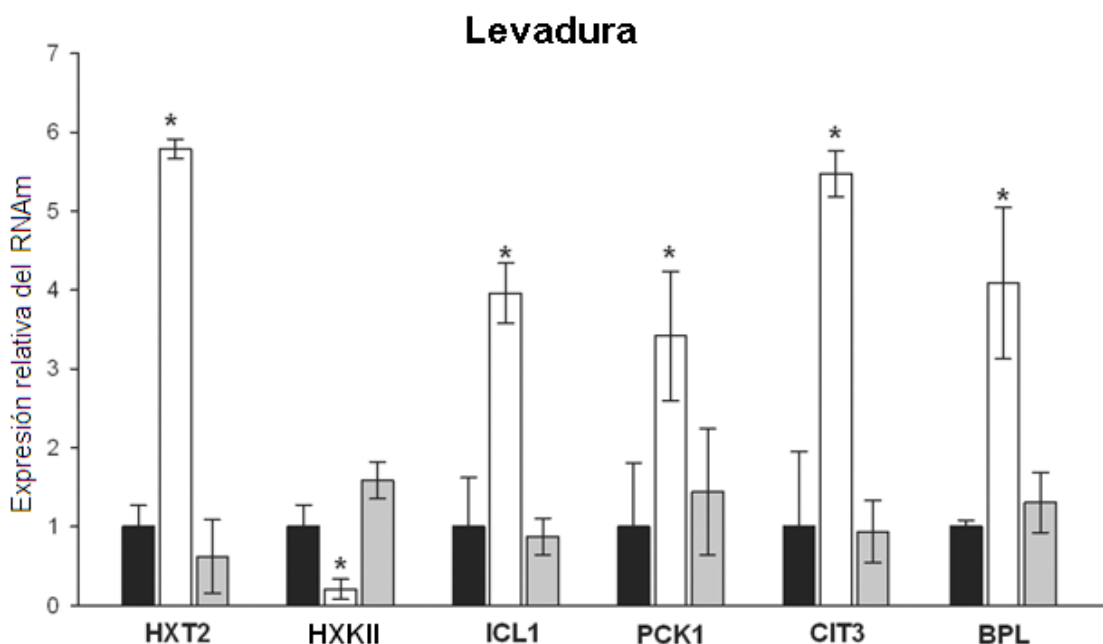


Figura 11. Los cambios de algunos transcritos seleccionados durante la deficiencia de biotina fueron confirmados por qRT-PCR y se revirtieron con la suplementación de la vitamina a levaduras deficientes de biotina. ■: Suficiente de biotina, □: deficiente de biotina y ▒: deficiente más biotina. HXT2: transportador de glucosa de alta afinidad 2, HXKII: hexocinasa II, ICL1: isocitrato liasa, PCK1: fosfoenol piruvato carboxicina, CIT3: citrato sintasa, y BPL: biotina proteína ligasa. Todos los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar y representan el promedio de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas por ANOVA ($p \leq 0.05$).

7.7. Efectos de la deficiencia de biotina sobre transcritos de vías de transducción de señales en los tres organismos estudiados

De manera similar, en el análisis del perfil de expresión genética de los organismos deficientes de biotina, identificamos múltiples alteraciones en varias vías de transducción de señales en comparación a los controles. En la tabla 1 se muestran cinco vías de señalización que cambiaron significativamente en el hígado de rata. La vía de la insulina y la de TOR disminuyeron su expresión significativamente, mientras que las de adiponectinas, receptores de citocinas y la vía de JAK/STAT aumentaron su expresión. En el nematodo, sólo las vías de la insulina (insulin-like) y la de TOR se expresan, y ambas también disminuyeron significativamente (Tabla 1). En la levadura sólo la vía de TOR se expresa y no se alteró en la deficiencia de biotina.

Algunos de los transcritos individuales de las diferentes vías de señalización y que modificaron su expresión por microarreglos en la deficiencia de biotina en los tres organismos se cuantificaron por qRT-PCR. Éstos corresponden a los RNAs mensajeros de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK α 1, aak-2 y Snf1), la proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides (SREBP-1C y sbp-1), blanco de rapamicina (mTOR), coactivador del receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa (PGC-1 α y mdt15), regulador de la alcohol deshidrogenasa (Adr1), regulador del transporte de glucosa 1(Rgt1) y el represor catabólico (Cat8). Importantemente, la readministración de biotina o aspartato en el caso de la levadura normaliza a los RNAs mensajeros probados (figura 12).

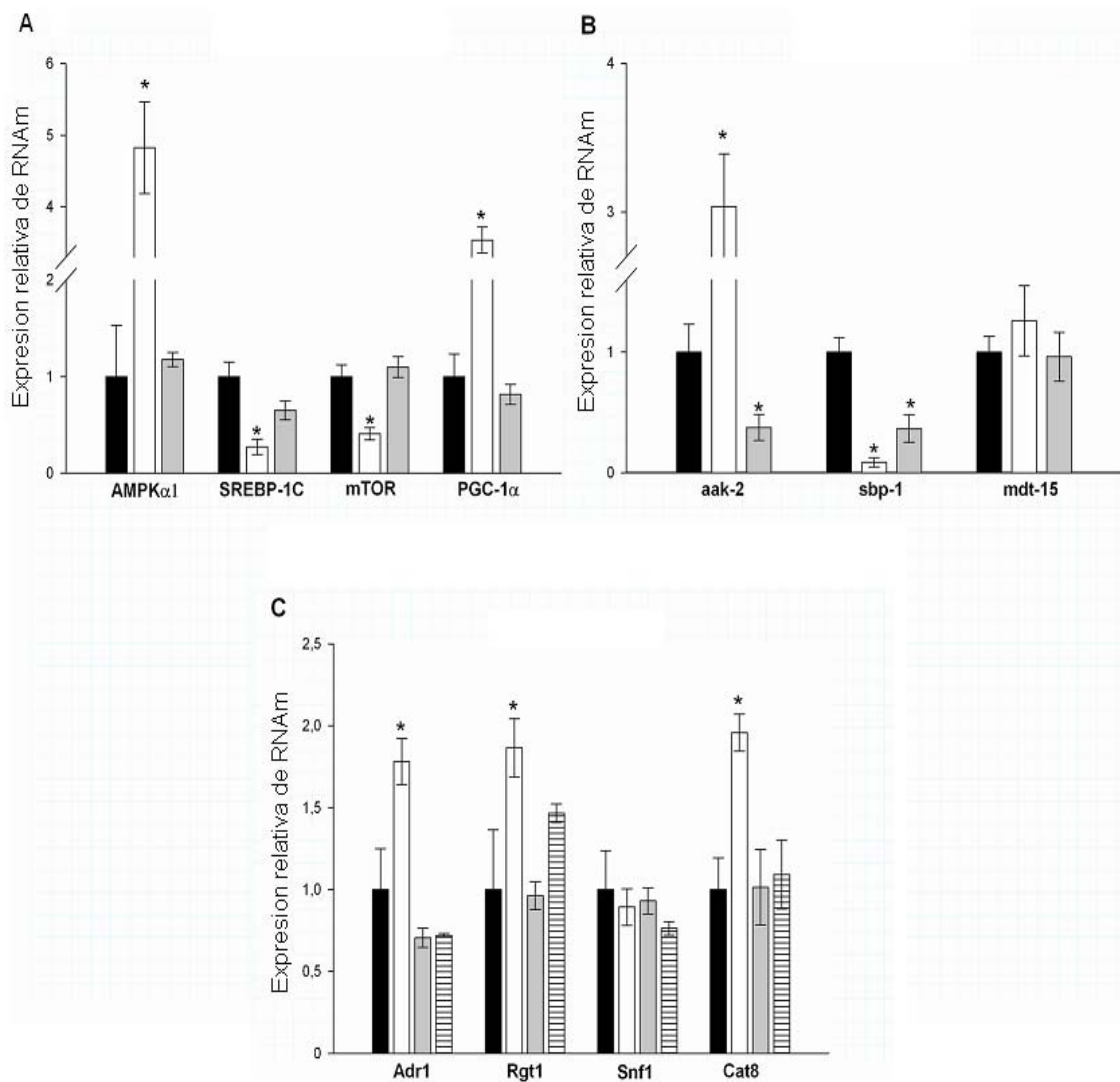


Figura 12. Cambios de algunos transcritos seleccionados en la deficiencia de biotina fueron confirmados por qRT-PCR y se revirtieron con la suplementación de la vitamina en las tres especies y por aspartato en levadura. A) *R. norvegicus*, B) *C. elegans* y C) *S. cerevisiae* ■■■■: Suficiente de biotina, □□□□: deficiente de biotina, ▒▒▒▒: deficiente de biotina más biotina y ▨▨▨▨: deficiente de biotina más aspartato. AMPK α 1, aak-2 y Snf1: proteína cinasa dependiente de AMP, SREBP-1C y sbp-1: proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides, mTOR: Blanco de rapamicina, PGC-1 α y mdt15: coactivador del receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa, Adr1: regulador de la alcohol deshidrogenasa, Rgt1: regulador del transporte de glucosa 1, Cat8: represor catabólico. Todos los valores se expresan como la

media \pm la desviación estándar y representan el promedio de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas por ANOVA ($p \leq 0.05$).

7.8. Anaplerosis del ciclo de TCA y detección de energía en deficiencia de biotina

Dado que la deficiencia de biotina provoca alteraciones del estado energético en los organismos estudiados (bajos niveles de ATP, aumento de NAD^+), dichas alteraciones nos condujeron a hipotetizar que presumiblemente se deben a la reducción de la anaplerosis y subsecuente disminución del ciclo TCA, provocado por la disminución de la actividad de la PC (enzima anaplerótica principal y que es dependiente de biotina (66-67)). En este trabajo, realizamos un ensayo preliminar para poner a prueba esta hipótesis en la levadura deficiente de biotina, mediante la administración de aspartato, un aminoácido interconvertible por transaminación a oxaloacetato, y que se ha demostrado que es anaplerótico en cepas de *S. cerevisiae* mutantes para la PC (68-69).

Nuestros resultados muestran que el aspartato normaliza los niveles de ATP, ADP, NAD^+ y el consumo de oxígeno, así como la captación de glucosa y la producción de etanol en las levaduras deficientes de biotina (figura 8 C-E). Estos resultados sugieren que la administración de aspartato, probablemente incrementa los niveles de oxaloacetato provocados por la deficiencia de PC y restablece los niveles de ATP, así como los efectos sobre genes del metabolismo intermediario del carbono. Por lo tanto, los resultados apoyan la hipótesis de la disminución de la anaplerosis.

7.9. Activación de la AMPK/Snf1 en la deficiencia de biotina

El déficit de ATP, es detectado por proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK). Esta proteína es un miembro de la familia de sensores y reguladores

celulares que responden al estrés energético (70). Consistente con lo anterior, nosotros encontramos que en los tres organismos la proteína AMPK/Snf1 fue activada durante la deficiencia de biotina, como lo indicó el sustancial incremento en su fosforilación, y que retorna al nivel del control después de la readición de biotina o de aspartato en la levadura (figura 13). Estos resultados son consistentes con nuestra hipótesis de un defecto en la anaplerosis del ciclo de TCA, debido a la disminución de los niveles de ATP.

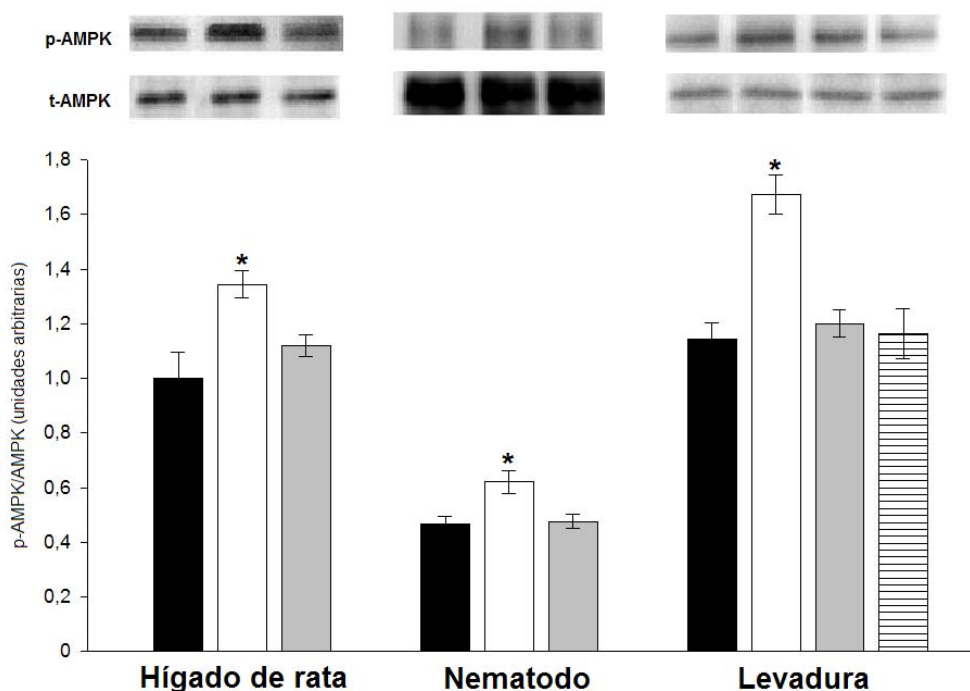


Figura 13. La deficiencia de biotina aumenta la fosforilación de la AMPK en los tres eucariontes estudiados. Relación entre la cantidad de la AMPK fosforilada (p-AMPK) respecto a la total (t-AMPK) cuantificada mediante densitometría a partir de inmunoblots en diferentes condiciones experimentales: ■: suficiente de biotina, □: deficiente de biotina, ▒: deficiente más biotina y ▨: deficiente de biotina más aspartato. Los resultados son media ± desviación estándar y representan el promedio de tres experimentos independientes; los asteriscos indican diferencias significativas por ANOVA ($p \leq 0.05$).

8. DISCUSIÓN

Siguiendo el *dictum* de T. Dobzhansky que “nada en biología tiene sentido, sino a la luz de la evolución”(71), en este trabajo mostramos que entre los tres organismos eucariontes estudiados, a pesar que sus líneas filogenéticas divergieron hace aproximadamente 1,000 millones de años, la deficiencia de biotina produce efectos metabólicos similares, como la reducción del consumo de glucosa y la producción de energía (disminución de la concentración ATP), así como de la disminución lactato o etanol que son indicadores del flujo glucolítico. Esto ocurre a pesar de la provisión de suficiente glucosa, y se acompaña de una reducción de los transcritos que codifican para enzimas involucradas en la utilización de glucosa y la lipogénesis, mientras que aumentan aquellos para la oxidación de los ácidos grasos y gluconeogénesis. Inesperadamente y de forma similar, la deficiencia de biotina también modificó la expresión genética de varias proteínas para la transducción de señales, así como de algunos factores de transcripción y que permite explicar los cambios congruentes en los genes que participan en el flujo del metabolismo intermediario del carbono.

En particular, los cambios en la expresión de cientos de genes que ocurren en la deficiencia de biotina podrían estar relacionados con la disminución del ciclo de TCA, provocando la reducción de la anaplerosis. Esto se puede explicar debido a que dicho proceso es catalizado por dos carboxilasas dependientes de biotina (PC y PCC). Es bien sabido que la actividad de estas dos carboxilasas se ve significativamente reducida en organismos con deficiencia sintomática de biotina (72). En nuestro estudio, confirmamos la deficiencia de estas dos carboxilasas mediante Western-blot (figura 6). Otra enzima dependiente de biotina como la ACC, cataliza uno de los principales pasos en la síntesis de ácidos grasos y su deficiencia concebiblemente podría contribuir a un aumento de la oxidación de ácidos grasos y afectar otros transcritos del metabolismo intermediario del

carbono, sin embargo aún no se conoce si pudiera tener algún efecto sobre la anaplerosis del ciclo de TCA.

Para explicar nuestros resultados metabólicos y genómicos, estamos proponiendo un modelo heurístico que integra circuitos reguladores, cuyos detalles varían de acuerdo con la biología de la especie (figura 14). La lógica del modelo consiste en la activación de varias vías de señalización en respuesta al estrés celular de energía, que incluye la activación del sensor maestro AMPK, que es una proteína miembro de la familia de sensores y reguladores celulares que responden al estrés energético, conservada evolutivamente en humanos, roedores, nematodos y levaduras, el homólogo de la AMPK en *S. cerevisiae* se le conoce como proteína Snf1 (73).

El modelo propuesto, está destinado para que se diseñen las pruebas experimentales que puedan aclarar los múltiples efectos sobre vías metabólicas y de señalización que modifica la falta de biotina y que a continuación se describen para cada uno de los organismos.

8.1. Circuito regulador en hígado de rata

En la rata (figura 14A), la activación de AMPK conduce a la reducción de la expresión del factor transcripcional llamado elemento regulador de unión a esteroides (SREBP-1c) (74), que a su vez induce a la glucocinasa (GK), la primera enzima de la glucólisis (61). Nuestros resultados mostraron la disminución de ambos transcritos (Figura 9 y 12A). Es conocido que el incremento de la expresión de estos transcritos sumado con el catabolismo de la glucosa se requieren para inducir la transcripción de la proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos (ChREBP) (75), mismo que también encontramos disminuido (tabla suplementaria 1). Este factor transcripcional induce la expresión de genes lipogénicos como L-PK, ACC, FAS y de la enzima málica (75), por lo tanto y consistente con su disminución, se explicaría la reducción de estos transcritos (tabla suplementaria 1). De manera similar, la

AMPK inhibe a la proteína ACC mediante su fosforilación (76), este efecto junto con el provocado por la deficiencia de biotina (la ACC es una enzima cuya actividad es dependiente de biotina) puede en principio explicar el incremento en el transporte y oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria, como resultado de la disminución en la producción de Malonil CoA y por la reducción de la inhibición sobre la transferasa de palmitoil carnitina (CPT-1) (Figura 14A). Aunque estos efectos son a nivel del metabolismo, nosotros encontramos que muchos de los transcritos para la oxidación de ácidos grasos se incrementaron, por ejemplo: la transferasa de palmitoil carnitina de hígado 1 y 2 (CPT-1 y 2), la acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLACAD), las subunidades α y β de la hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HADHA, HADH respectivamente) (tabla suplementaria 1), indicando que los efectos transcripcionales sobre estos genes, probablemente son debidos a la activación de la proteína AMPK.

Otros de los efectos de la AMPK en mamíferos es la inducción de la transferasa del mononucleótido de nicotinamida (NAMPT) que sintetiza NAD^+ (77); en las ratas deficientes de biotina tanto el transcrito de NAMPT como la cantidad de NAD^+ incrementaron (tabla suplementaria 1 y figura 8E respectivamente). Se sabe que el NAD^+ en mamíferos, activa a la desacetilasa de histonas SIRT1 (78) que entonces desencadena la actividad de sus blancos como coactivador del receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa (PGC-1 α) (78), que entonces incrementa la transcripción del gen para PEPCK (78). Aunque la expresión de SIRT1 no cambió, encontramos que el transcrito de PGC-1 α aumentó en el hígado deficiente de biotina (figura 12A).

En suma, el mecanismo que opera sobre estos genes podría explicarse de la siguiente manera: la activación de AMPK inhibe la expresión de SERBP-1c y activa a PGC-1 α que a su vez activa a PEPCK y explicaría los hallazgos iniciales realizados por Dakshinamurti sobre los efectos de la biotina sobre los genes de GK y PEPCK (figura 14A). Por otra parte, otra vía de señalización que transduce los niveles intracelulares de nutrientes es TOR (mTOR en mamífero). Las

proteínas TOR son proteínas cinasas, conservadas a lo largo de los eucariontes (73). El complejo mTOR 1 (mTORC1) es fosforilado e inhibido por AMPK (79) y detiene la síntesis de proteínas (80) y por lo tanto el crecimiento celular. Aunque nosotros no estudiamos a estas proteínas, inesperadamente encontramos disminuidos algunos de los transcritos que conforman la vía de mTOR en el hígado deficiente de biotina (tabla 1 y figura 14A). Hasta donde sabemos, estos hallazgos transcriptómicos no se han reportado antes y no se sabe como están mediados.

8.2. Circuito regulador en el nematodo

Aunque las vías de señalización en el nematodo aún están poco estudiadas, mecanismos de regulación similares a los de mamíferos pueden operar en el nematodo deficiente de biotina. Es posible proponer que como en la rata, la represión observada de la hexocinasa F14B4.2 de *C. elegans* puede deberse a la activación de AMPK (figura 14B) y que puede ser mediada por SBP-1, un factor transcripcional ortólogo al SREBP-1C de mamíferos (81), cuyo transcrito disminuyó en la deficiencia de biotina (figura 12B). Además, los transcritos para las otras hexocinasas del nematodo (H25P06.1 y Y77E11A.1) no cambiaron en la deficiencia de esta vitamina. Por otra parte, otros estudios han identificado que SBP-1 regula la síntesis de ácidos grasos (81-82) por mecanismos aún no investigados, pero que probablemente pudieran ser similares a los de mamíferos, ya que los transcritos de los genes lipogénicos como la enzima málica, la ATP citrato liasa, ACC y FAS disminuyeron (tabla suplementaria 2 y figura 14B), así como los transcritos para las esteroil-CoA desaturasas (Fat-5 y 7) y para dos enzimas para la elongación de ácidos grasos (elo-5 y 6) (tabla suplementaria 2). Sorprendentemente, al igual que en la rata, en el nematodo también encontramos elevados los transcritos para genes de oxidación de ácidos grasos como: la transferasa de palmitoil carnitina (CPT-4 y 6) y también para varias isoformas de la sintetasa de acil-coA (acs-2, 11, 16 y 17), que catalizan la conversión de ácidos grasos a acil-CoA a través de la β -oxidación.

En *C. elegans* el gen Sir2.1, el ortólogo de SIRT-1 de mamíferos (83) y que también responde a los niveles de NAD^+ , aunque no modificó su expresión, es probable que sea el responsable de la activación del transcrito MDT-15, que codifica para el coactivador transcripcional que es funcionalmente ortólogo a PGC-1 α de mamíferos (84) y que posiblemente explicaría el incremento del gen PEPCCK en el nematodo tal como ocurre en la rata (figura 14B). Similarmente, en el nematodo, la vía de señalización de TOR (ceTOR) fue disminuida (tabla1); en este organismo el estrés energético derivado de los cambios en ceTOR ya se han reportado (85). Como en la rata, probablemente la disminución de algunos miembros de esta vía fue debida a la activación de la AMPK (figura 14B). Dado que se sabe bien que mTOR y ceTOR activan la síntesis de proteínas, sus cambios en la deficiencia de biotina podrían también explicar el crecimiento retardado que se observó en los nematodos deficientes de biotina.

8.3. Circuito regulador en la levadura

Aunque muchas proteínas de señalización en levadura se han conservado a lo largo de los eucariontes y especialmente debido a sus necesidades metabólicas, los circuitos reguladores en este organismo son un tanto diferentes en comparación con los mamíferos. Mas específicamente, en levadura la glucosa es la fuente de carbono preferida y cuando está disponible, mas allá de operar como un sistema complejo de represión catabólica del carbono (86), *S. cerevisiae* produce su ATP principalmente por fermentación, pero conserva un metabolismo aeróbico con respiración, un fenómeno conocido como efecto Crabtree (87). Este incluye una anaplerosis activa que depende principalmente de la piruvato carboxilasa (PC) (68).

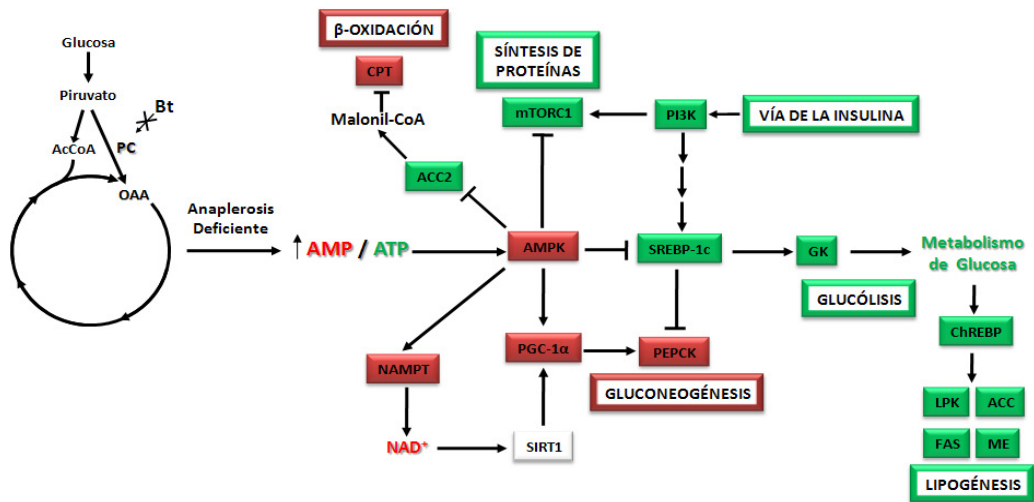
Como se ha mencionado previamente, la deficiencia de biotina afecta a la PC y probablemente conduce al estrés energético observado (figura 8) que consecuentemente provoca la activación de Snf1, debido a la disminución del ATP (figura 13). Este efecto fue revertido después de la administración de la

vitamina o como se describió anteriormente, por la adición de aspartato (figura 13). Snf1 modula la expresión de genes para el transporte de glucosa y su fosforilación. Nuestros resultados indican que hubo un incremento de los transcritos para el transportador y la hexocinasa de alta afinidad (HXT2 y HXK1 respectivamente), que son activos en baja glucosa. Por otra parte, los transportadores de baja afinidad por glucosa (HXT1 y HXK2) disminuyeron significativamente (tabla suplementaria 3 y figura 11), este último es el ortólogo a la glucocinasa de mamíferos (65). Como se propone en nuestro modelo (figura 14C), Snf1 reprime a HXT1 mediante la activación del factor transcripcional Rgt1 que también reprime a HXK2 (64). Snf1 también fosforila al factor transcripcional Mig1, inhibiendo su efecto represor sobre HXT1, y se piensa que actúa en asociación con HXT2 (64). Por lo tanto, una consecuencia plausible de la activación de Snf1 (que es inducida por el estrés energético) sería la reducción de la utilización de glucosa que es eliminada no solo por la biotina, sino también por el aspartato (figura 8A). De manera similar, inesperadamente en las condiciones del crecimiento en altas concentraciones de glucosa encontramos que los transcritos para varias enzimas de TCA aumentaron, y si la anaplerosis se afectó de acuerdo con nuestra hipótesis, el flujo a través del ciclo de TCA se habría reducido, a pesar del probable incremento de las proteínas del ciclo.

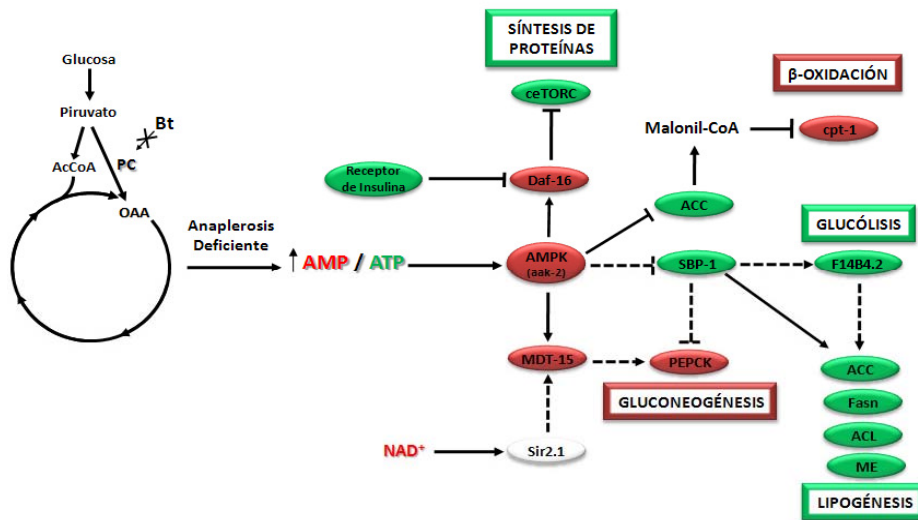
Por otra lado, también encontramos un incremento en los transcritos de algunos factores de transcripción como Adr1, Cat8 y Sip4 (figura 12C y tabla suplementaria 3) que son inducidos por Snf1, el homólogo de AMPK en la levadura que se activa por la falta de glucosa (88) y que hemos encontrado que se fosforila (activa) en la deficiencia de biotina (figura 13), a pesar de la abundante glucosa. Consistente con lo anterior, la activación de Adr1 explicaría el aumento de la expresión de varios genes para la oxidación de ácidos grasos (POT1, POX1, FAA1, CTA1, PEX2, ver tabla suplementaria 3), mientras que la activación de Cat8 y Sip4 para el aumento de las enzimas gluconeogénicas (88). Así, esto puede explicar nuestras observaciones paradójicas del aumento en los transcritos de estos dos procesos metabólicos de la levadura crecida en alta

glucosa. También se sabe que Snf1 activa el factor de transcripción Rgt1 y reprime al de Mig1, ambos a nivel postraducciona (88). Cabe destacar que el RNA mensajero de Rgt1 aumentó durante la deficiencia de biotina (Figura 12C). Rgt1 también disminuye la expresión del transportador de glucosa HXT1 y de la hexocinasa, HXK2 (que es el ortólogo de la glucocinasa hepática de mamíferos (89)), ambos tienen baja afinidad por la glucosa y se activan a altas concentraciones de este azúcar (90). Sin embargo, en nuestros resultados a ambos los encontramos reprimidos. Por otra parte, en abundante glucosa; Mig1 se asocia con HXK2 y reprime al transportador HXT2 (88). Inesperadamente, en la deficiencia de biotina y con abundante glucosa, encontramos elevada la expresión de HXT2 y por lo tanto puede ser consecuencia de la inactivación de Mig1 por Snf1. Cabe señalar que Mig1 reprime a Cat8 y Sip4 (91) este efecto está probablemente ausente en la deficiencia de biotina debido a la activación de Snf1 que a su vez inactiva Mig1 (92). En resumen, si bien la levadura responde de manera muy diferente del nematodo y la rata a los cambios de disponibilidad de glucosa, la activación de Snf1 debido al estrés metabólico conduce a cambios en genes del metabolismo del carbono, cuyos efectos son similares a los observados en los otros dos organismos deficientes de biotina. En contraste a los otros dos metazoarios, la vía de señalización TOR (TORC1) no se alteró en la levadura deficiente de biotina. Cabe señalar que TORC1 no está bajo el control de Snf1, y es principalmente un sensor de la calidad de la fuente de nitrógeno en *S. cerevisiae* (93).

A



B



C

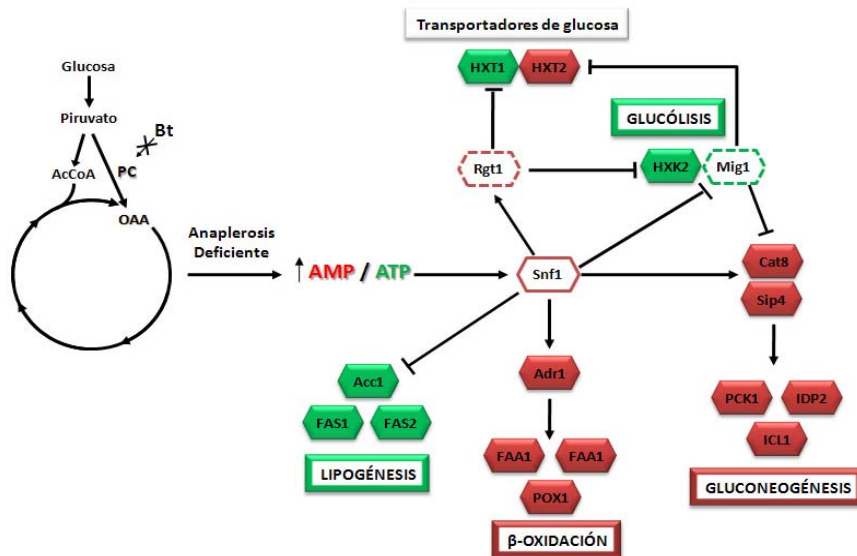


Figura 14. La deficiencia de biotina revela circuitos reguladores en los tres eucariontes estudiados. A) *R. norvegicus*, B) *C. elegans* y C) *S. cerevisiae*. La reducción de la anaplerosis causada por la deficiencia de biotina aumenta la relación AMP/ATP, este cambio activa a la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK, AAK-2 y Snf1p en ratas, nematodos y levadura respectivamente), provocando cambios concertados en la expresión de genes de vías de señalización y del metabolismo intermediario del carbono. Las flechas indican vías que se estimulan, las líneas cubiertas muestran efectos inhibitorios mientras que las líneas semicontinuas indican conjetura. El color rojo significa aumento de la transcripción; verde significa disminución de la transcripción y blanco, sin cambio.

No obstante a la congruencia de los resultados que propone nuestro modelo, éste tiene que ser sometido a pruebas experimentales rigurosas, pero su concordancia con la realidad puede evidenciarse por la corrección de las alteraciones metabólicas y transcriptómicas en la levadura al agregar aspartato, el precursor de oxalacetato, a las células deficientes de biotina (figura 8A-F). Al proponer nuestro modelo, estamos asumiendo que la mayoría de los efectos globales resultan de la disminución de la actividad de las enzimas dependientes de biotina y no de una actividad reguladora de la biotina en sí (como está documentado en los procesos para la síntesis de biotina en el operón BIO de *E. coli* (4)). Las pruebas experimentales podrían incluir el silenciamiento de genes anapleróticos mediante RNA de interferencia, como de la piruvato carboxilasa. Por otra parte, se ha demostrado que la biotina modifica la expresión genética de la glucocinasa hepática a través de cambios en los niveles de GMPc, como resultado de la activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC) y por la fosforilación de la proteína Cinasa G (PKG), que es dependiente de GMPc (36). Más recientemente, se demostró que la sGC es un sensor de ATP "acoplado la señalización del óxido nítrico con el metabolismo celular" en las células endoteliales (94). Si un mecanismo similar opera en los hepatocitos puede ser estudiado en el futuro.

Estos resultados proporcionan una nueva perspectiva sobre el papel del ciclo de TCA y en particular el de la anaplerosis sobre la modulación de estado energético celular, así como del el control que ejerce sobre las adaptaciones genómicas concomitantes y que podrían tener implicaciones importantes para entender mejor algunos trastornos provocados por el déficit energético en los humanos.

Esta investigación proporcionó la información necesaria para la publicación de dos artículos en revistas indizadas (95-96).

REFERENCIAS

1. Kögl F TB (1936) About the bios-problem. Representation of crystallized biotin from Yolk. *Z. Physiol. Chem* 242:43-73.
2. Wakil SJ, Titchener EB, & Gibson DM (1958) Evidence for the participation of biotin in the enzymic synthesis of fatty acids. *Biochimica et biophysica acta* 29(1):225-226.
3. Moss J & Lane MD (1971) The biotin-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 35:321-442.
4. Cronan JE, Jr. (1989) The *E. coli* bio operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. *Cell* 58(3):427-429.
5. Chauhan J & Dakshinamurti K (1991) Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *The Journal of biological chemistry* 266:10035-10038.
6. Pirner HM & Stolz J (2006) Biotin sensing in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a conserved DNA element and requires the activity of biotin-protein ligase. *The Journal of biological chemistry* 281(18):12381-12389.
7. Wiedmann S, Rodriguez-Melendez R, Ortega-Cuellar D, & Zempleni J (2004) Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr Biochem* 15(7):433-439.
8. Schneider G & Lindqvist Y (2001) Structural enzymology of biotin biosynthesis. (Translated from eng) *FEBS Lett* 495(1-2):7-11.
9. O`Neil MJ SA, Heckelman PE (eds) (2001) Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. *Merck, Whitehouse Station, N.J.*
10. Hill MJ (1997) Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev* 6 Suppl 1:S43-45 (in eng).
11. Zempleni J & Mock DM (1999) Biotin biochemistry and human requirements. *Journal of Nutritional Biochemistry* 10(3):128-138.
12. Gitlin G, Bayer EA, & Wilchek M (1990) Studies on the biotin-binding sites of avidin and streptavidin. Tyrosine residues are involved in the binding site. *Biochem J* 269(2):527-530.

13. Wolf B, Heard GS, McVoy JR, & Grier RE (1985) Biotinidase deficiency. *Ann N Y Acad Sci* 447:252-262.
14. Daberkow RL, White BR, Cederberg RA, Griffin JB, & Zemleni J (2003) Monocarboxylate transporter 1 mediates biotin uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr* 133(9):2703-2706.
15. Wang H, *et al.* (1999) Human placental Na⁺-dependent multivitamin transporter. Cloning, functional expression, gene structure, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 274(21):14875-14883.
16. Pacheco-Alvarez D, *et al.* (2004) Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency. *The Journal of biological chemistry* 279(50):52312-52318.
17. Lane MD, Young DL, & Lynen F (1964) The enzymatic synthesis of holotranscarboxylase from apotranscarboxylase and (+)-biotin. I. Purification of the apoenzyme and synthetase; characteristics of the reaction. *The Journal of biological chemistry* 239(9):2858-2864.
18. Barker DF & Campbell AM (1981) Genetic and biochemical characterization of the birA gene and its product: evidence for a direct role of biotin holoenzyme synthetase in repression of the biotin operon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 146(4):469-492.
19. Jitrapakdee S & Wallace JC (2003) The biotin enzyme family: conserved structural motifs and domain rearrangements. *Current protein & peptide science* 4(3):217-229.
20. McMahon RJ (2002) Biotin in metabolism and molecular biology. *Annual Review of Nutrition* 22:221-239.
21. Barker DF & Campbell AM (1980) Use of bio-lac fusion strains to study regulation of biotin biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 143(2):789-800.
22. Campbell A, Chang R, Barker D, & Ketner G (1980) Biotin regulatory (bir) mutations of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 142(3):1025-1028.

23. Prakash O & Eisenberg MA (1979) Biotinyl 5'-adenylate: corepressor role in the regulation of the biotin genes of *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(11):5592-5595.
24. Cronan JE, Jr. & Wallace JC (1995) The gene encoding the biotin-apoprotein ligase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 130(2-3):221-230.
25. Stolz J, Hoja U, Meier S, Sauer N, & Schweizer E (1999) Identification of the plasma membrane H⁺-biotin symporter of *Saccharomyces cerevisiae* by rescue of a fatty acid-auxotrophic mutant. *The Journal of biological chemistry* 274(26):18741-18746.
26. Stolz J (2003) Isolation and characterization of the plasma membrane biotin transporter from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 20(3):221-231.
27. Phalip V, Kuhn I, Lemoine Y, & Jeltsch JM (1999) Characterization of the biotin biosynthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and evidence for a cluster containing BIO5, a novel gene involved in vitamer uptake. *Gene* 232(1):43-51.
28. Stolz J (2003) Isolation and characterization of the plasma membrane biotin transporter from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. 20(3):221-231.
29. Rogers TO & Lichstein HC (1969) Regulation of biotin transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 100(2):565-572.
30. Weider M, Machnik A, Klebl F, & Sauer N (2006) Vhr1p, a new transcription factor from budding yeast, regulates biotin-dependent expression of VHT1 and BIO5. *J Biol Chem* 281(19):13513-13524.
31. Pacheco-Alvarez D, Solorzano-Vargas RS, & Del Rio AL (2002) Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Arch Med Res* 33(5):439-447.
32. Dakshinamurti K (1994) Vitamin receptors: vitamins as ligands in cell communication (Cambridge University Press, Cambridge) 1st published Ed p 259.

33. Dakshinamurti K & Cheah-Tan C (1968) Liver glucokinase of the biotin deficient rat. *Can J Biochem* 46(1):75-80.
34. Spence JT & Koudelka AP (1984) Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 259(10):6393-6396.
35. Romero-Navarro G, *et al.* (1999) Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology* 140(10):4595-4600.
36. Spence JT, Merrill MJ, & Pitot HC (1981) Role of insulin, glucose, and cyclic GMP in the regulation of glucokinase in cultured hepatocytes. *J Biol Chem.* 256(4):1598-1603.
37. Hopgood MF & Ballard FJ (1973) Synthesis and degradation of phosphoenolpyruvate carboxylase in rat liver and adipose tissue. Changes during a starvation-re-feeding cycle. *Biochem J* 134(2):445-453.
38. Dakshinamurti K & Li W (1994) Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 132(2):127-132.
39. Dakshinamurti K & Ho Chong H (1970) Regulation of key hepatic glycolytic enzymes. *Enzymol Biol Clin (Basel)*. 11(5):423-428.
40. Rodriguez-Melendez R, Cano S, Mendez ST, & Velazquez A (2001) Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J Nutr* 131(7):1909-1913.
41. Solorzano-Vargas RS, Pacheco-Alvarez D, & Leon-Del-Rio 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. *PNAS* 99(8):5325-5330.
42. Vlasova TI, Stratton SL, Wells AM, Mock NI, & Mock DM (2005) Biotin deficiency reduces expression of SLC19A3, a potential biotin transporter, in leukocytes from human blood. *J Nutr* 135(1):42-47.

43. Scheerger SB & Zempleni J (2003) Expression of oncogenes depends on biotin in human small cell lung cancer cells NCI-H69. *Int J Vitam Nutr Res* 73(6):461-467.
44. Rodriguez-Melendez R, Schwab LD, & Zempleni J (2004) Jurkat cells respond to biotin deficiency with increased nuclear translocation of NF-kappaB, mediating cell survival. *Int J Vitam Nutr Res* 74(3):209-216.
45. Griffin JB, Rodriguez-Melendez R, & Zempleni J (2003) The nuclear abundance of transcription factors Sp1 and Sp3 depends on biotin in Jurkat cells. *J Nutr* 133(11):3409-3415.
46. Wiedmann S, Eudy JD, & Zempleni J (2003) Biotin supplementation increases expression of genes encoding interferon-gamma, interleukin-1beta, and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, and decreases expression of the gene encoding interleukin-4 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr* 133(3):716-719.
47. Rodriguez-Melendez R, Griffin JB, & Zempleni J (2006) The expression of genes encoding ribosomal subunits and eukaryotic translation initiation factor 5A depends on biotin and bisnorbiotin in HepG2 cells. *J Nutr Biochem.* 17(1):23-30.
48. De La Vega LA & Stockert RJ (2000) Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279(6):C2037-2042.
49. Vesely DL (1982) Biotin enhances guanylate cyclase activity. *Science.* 216(4552):1329-1330.
50. Bailey LM, Ivanov RA, Wallace JC, & Polyak SW (2008) Artifacts detection of biotin on histones by streptavidin. *Anal Biochem* 373(1):71-77.
51. Healy S, et al. (2009) Biotin is not a natural histone modification. *Biochimica et biophysica acta* 1789(11-12):719-733.
52. Bergmeyer HU (1974) *Methods in Enzymatic Analysis* (Verlag Chemie, Weinheim, United States of America) 2nd. Ed.
53. Grad LI & Lemire BD (2004) Mitochondrial complex I mutations in *Caenorhabditis elegans* produce cytochrome c oxidase deficiency,

- oxidative stress and vitamin-responsive lactic acidosis. *Hum Mol Genet* 13(3):303-314.
54. Sanchez NS, Calahorra M, Gonzalez-Hernandez JC, & Pena A (2006) Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23(5):361-374.
 55. Bergmeyer HU & Beutler HO (1984) Ethanol. *Methods in Enzymatic Analysis*, ed Bergmeyer HU (VCH Verlagsgesellschaft), 3rd. Ed Vol VI, pp 598-606.
 56. Moreno-Sanchez R (1985) Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 260(23):12554-12560.
 57. Schmitt ME, Brown TA, & Trumpower BL (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 18(10):3091-3092.
 58. Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-408.
 59. Kim HS, Hoja U, Stolz J, Sauer G, & Schweizer E (2004) Identification of the tRNA-binding protein Arc1p as a novel target of in vivo biotinylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 279(41):42445-42452.
 60. Subramanian A, *et al.* (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(43):15545-15550.
 61. Foufelle F & Ferre P (2002) New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* 366(Pt 2):377-391.
 62. Anonymous (The inheritance of quantitative characters.

63. Henderson ST, Bonafe M, & Johnson TE (2006) daf-16 protects the nematode *Caenorhabditis elegans* during food deprivation. from eng) *The journals of gerontology* 61(5):444-460.
64. Johnston M (1999) Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet* 15(1):29-33.
65. Mayordomo I & Sanz P (2001) Human pancreatic glucokinase (GlKB) complements the glucose signalling defect of *Saccharomyces cerevisiae* hxx2 mutants. *Yeast* 18(14):1309-1316.
66. Jitrapakdee S, *et al.* (2008) Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* 413(3):369-387.
67. Fransson U, Rosengren AH, Schuit FC, Renstrom E, & Mulder H (2006) Anaplerosis via pyruvate carboxylase is required for the fuel-induced rise in the ATP:ADP ratio in rat pancreatic islets. *Diabetologia* 49(7):1578-1586.
68. de Jong-Gubbels P, *et al.* (1998) Physiological characterisation of a pyruvate-carboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* mutant in batch and chemostat cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74(4):253-263.
69. Brewster NK, Val DL, Walker ME, & Wallace JC (1994) Regulation of pyruvate carboxylase isozyme (PYC1, PYC2) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and nonfermentative growth. *Arch Biochem Biophys* 311(1):62-71.
70. Hardie DG, Hawley SA, & Scott JW (2006) AMP-activated protein kinase – development of the energy sensor concept *J Physiol* 574(1):7-15.
71. Dobzhansky T (1973) Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution. *The American Biology Teacher* 35:125-129.
72. Rodriguez-Melendez R, *et al.* (1999) Differential effects of biotin deficiency and replenishment on rat liver pyruvate and propionyl-CoA carboxylases and on their mRNAs. *Molecular genetics and metabolism* 66(1):16-23.
73. Hardie DG (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10):774-785.

74. Zhou G, *et al.* (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108(8):1167-1174.
75. Dentin R, *et al.* (2004) Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *The Journal of biological chemistry* 279(19):20314-20326.
76. Winder WW, *et al.* (1997) Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A. *J Appl Physiol* 82(1):219-225.
77. Fulco M, *et al.* (2008) Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. (*Developmental cell* 14(5):661-673.
78. Canto C, *et al.* (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458(7241):1056-1060.
79. Gwinn DM, *et al.* (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30(2):214-226.
80. Miron M, *et al.* (2001) The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 3(6):596-601.
81. McKay RM, McKay JP, Avery L, & Graff JM (2003) *C elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. *Developmental cell* 4(1):131-142.
82. Kniazeva M, Crawford QT, Seiber M, Wang CY, & Han M (2004) Monomethyl branched-chain fatty acids play an essential role in *Caenorhabditis elegans* development. *PLoS Biol* 2(9):E257.
83. Wood JG, *et al.* (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430(7000):686-689.
84. Taubert S, Hansen M, Van Gilst MR, Cooper SB, & Yamamoto KR (2008) The Mediator subunit MDT-15 confers metabolic adaptation to ingested material. *PLoS Genet* 4(2):e1000021.
85. Narbonne P & Roy R (2009) *Caenorhabditis elegans* dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival. *Nature* 457(7226):210-214.

86. Gancedo JM (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(2):334-361.
87. van Dijken JP, Weusthuis RA, & Pronk JT (1993) Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 63(3-4):343-352.
88. Zaman S, Lippman SI, Zhao X, & Broach JR (2008) How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* 42:27-81.
89. Epstein PN, Boschero AC, Atwater I, Cai X, & Overbeek PA (1992) Expression of yeast hexokinase in pancreatic beta cells of transgenic mice reduces blood glucose, enhances insulin secretion, and decreases diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(24):12038-12042.
90. Rodriguez A, De La Cera T, Herrero P, & Moreno F (2001) The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 355(Pt 3):625-631.
91. Bonander N, *et al.* (2008) Transcriptome analysis of a respiratory *Saccharomyces cerevisiae* strain suggests the expression of its phenotype is glucose insensitive and predominantly controlled by Hap4, Cat8 and Mig1. *BMC Genomics* 9:365.
92. Zaman S, Lippman SI, Schnepfer L, Slonim N, & Broach JR (2009) Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways. *Mol Syst Biol* 5:245.
93. Rohde JR, Bastidas R, Puria R, & Cardenas ME (2008) Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* 11(2):153-160.
94. Ruiz-Stewart I, *et al.* (2004) Guanylyl cyclase is an ATP sensor coupling nitric oxide signaling to cell metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(1):37-42.
95. Ortega-Cuellar D, *et al.* (2010) Biotin Starvation with Adequate Glucose Provision Causes Paradoxical Changes in Fuel Metabolism Gene Expression Similar in Rat (*Rattus norvegicus*), Nematode (*Caenorhabditis elegans*) and Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *J Nutrigenet Nutrigenomics* 3(1):18-30.

96. Velazquez-Arellano A, Ortega-Cuellar D, Hernandez-Mendoza A, & Moreno-Arriola E (2010) A heuristic model for paradoxical effects of biotin starvation on carbon metabolism genes in the presence of abundant glucose. *Molecular genetics and metabolism*.

TABLAS DE SUPLEMENTO

Tabla suplementaria 1

Nombre del gen	Símbolo del gen	Rank metric score
Glucose metabolismo		
Glucokinase	Gck	-2.9
Pyruvate kinase, liver	Pklr	-1.2
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1	Pfkfb1	-0.9
Pyruvate carboxylase	Pc	-0.7
Liver glycogen phosphorylase	Pygl	-0.7
Phosphoglycerate kinase 1	Pgk1	-0.6
Lactate dehydrogenase D	Ldhd	-0.6
Na dependent glucose transporter 1	Naglt1	-0.6
Transketolase	Tkt	-0.5
*Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Pck1	1.34
*Nicotinamide mononucleotide phosphoribosyl transferase (Nampt)	Pbef1	1.1
Fatty acid synthesis		
ATP citrate lyase	Acly	-1.8
Fatty acid synthase	Fasn	-1.5
Solute carrier family 25, member 1	Slc25a1	-0.5
Acetyl-coenzyme A carboxylase alpha	Acaca	-0.4
Fatty acid oxidation		
Carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	Cpt1a	0.6
Carnitine acetyltransferase	Crat	0.4

Carnitine palmitoyltransferase 2	Cpt2	0.4
Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein	Slc25a2 0	0.4
Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase β subunit	Hadhb	0.3
Coenzyme A dehydrogenase α subunit	Hadha	0.3
Acyl-coa synthetase long-chain family member 4	Acsl4	0.2
Acyl-coa synthetase long-chain family member 3	Acsl3	0.1
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	Acadvl	0.1
Acyl-coa synthetase long-chain family member 5	Acsl5	0.1

Adipocytokine signaling pathway

Similar to fatty acid translocase	Cd36	2.1
Insulin receptor substrate 2	Irs2	1.8
Suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	1.5
Leptin receptor	Lepr	1.4
Janus kinase 3	Jak3	1.3
Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α	Ppargc1 a	1.1
Neuropeptide Y	Npy	1.0
Signal transducer and activator of transcription 3	Stat3	0.8
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	Tnfrsf1a	0.8
Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2	Pck2	0.6
Carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	Cpt1a	0.6

Cytokine-cytokine receptor interaction

Ciliary neurotrophic factor receptor	Cntfr	2.6
Similar to T-cell antigen 4-1BB precursor	LOC500 590	2.3
Prolactin receptor	Prlr	1.4
Leptin receptor	Lepr	1.4
Cardiotrophin-like cytokine factor 1	Clcf1	1.1

Burkitt lymphoma receptor 1	Blr1	1.1
Anti-Mullerian hormone	Amh	0.9
Interleukin 13 receptor, alpha 1	Il13ra1	0.9
Interleukin 1 receptor, type I	Il1r1	0.9
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	Tnfrsf1a	0.8
Thymic stromal-derived lymphopoietin, receptor	Tslpr	0.7
Lymphotoxin A	Lta	0.7
Chemokine (C-X3-C) receptor 1	Cx3cr1	0.7
Similar to Interferon- α/β receptor chain precursor	LOC686326	0.7
Colony stimulating factor 1 (macrophage)	Csf1	0.7
Interleukin 1 β	Il1b	0.6
Hepatocyte growth factor	Hgf	0.6
Colony stimulating factor 1 receptor	Csf1r	0.6
Granulocyte-macrophage colony stimulating receptor α	Csf2ra	0.6
Interleukin 18	Il18	0.5
Thyroid peroxidase	Tpo	0.5
Similar to class II cytokine receptor 4 (predicted)	RGD1560373	0.5
Kinase insert domain protein receptor	Kdr	0.5
Interleukin 7	Il7	0.4
Interleukin 6 signal transducer	Il6st	0.4
Interleukin 1 alpha	Il1a	0.4
Interleukin 1 receptor accessory protein	Il1rap	0.4
Chemokine (C-C motif) receptor 5	Ccr5	0.4
Interferon gamma receptor 1	Ifngr	0.4
Jak-stat signaling pathway		
Ciliary neurotrophic factor receptor	Cntfr	2.7
Suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	1.5

Prolactin receptor	Prlr	1.4
Leptin receptor	Lepr	1.4
Janus kinase 3	Jak3	1.3
Cardiotrophin-like cytokine factor 1	Clcf1	1.1
Interleukin 13 receptor, alpha 1	Il13ra1	0.9
Signal transducer and activator of transcription 3	Stat3	0.8
Signal transducer and activator of transcription 4	Stat4	0.8
Thymic stromal-derived lymphopoietin, receptor	Tslpr	0.7
Similar to Interferon-alpha/ (IFN-alpha-REC)	LOC686 326	0.7
Similar to signal transducing adaptor	RGD156 4499	0.6
Granulocyte-macrophage colony stimulating receptor alpha	Csf2ra	0.6
Thyroid peroxidase	Tpo	0.5
E3 ubiquitin-protein ligase CBL-b	Cblb	0.5
Similar to class II cytokine receptor 4 (predicted)	RGD156 0373	0.5
Interleukin 7	Il7	0.4
Interleukin 6 signal transducer	Il6st	0.4
mTOR signaling pathway		
Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1	Pik3r1	-1.5
Ribosomal protein S6 kinase polypeptide 2	Rps6ka2	-1.1
Protein kinase LYK5	Lyk5	-0.7
Phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 3	Pik3r3	-0.6
Insulin-like growth factor 1	Igf1	-0.4
Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, α polypeptide	Pik3ca	-0.4
Tuberous sclerosis 2	Tsc2	-0.4
3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	Pdpk1	-0.3

Ribosomal protein S6 kinase polypeptide 1	Rps6ka1	-0.2
Vascular endothelial growth factor C	Vegfc	-0.2
Mitogen activated protein kinase 1	Mapk1	-0.2
Eukaryotic translation initiation factor 4E	Eif4e	-0.2
Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2	Pik3r2	-0.2
Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	Hif1a	-0.1
FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1	Frap1	-0.1
*AMPK α 1	Prkaa1	1.2

Insulin signaling pathway

Glucokinase	Gck	-2.9
Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B	Ppp1r3b	-2.5
Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	Ppp1r3c	-1.5
Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1	Pik3r1	-1.5
Fatty acid synthase	Fasn	-1.4
Pyruvate kinase, liver and red blood cell	Pklr	-1.2
Sterol regulatory element binding factor 1	Srebf1	-0.9
*ChREBP	Wbscr14	-0.9
Exocyst complex component 7	Exoc7	-0.8
Liver glycogen phosphorylase	Pygl	-0.7
Phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 3	Pik3r3	-0.6
Protein kinase, AMP-activated, β 2 non-catalytic	Prkab2	-0.6
Calmodulin 3	Calm3	-0.5
Protein kinase C, iota	Prkci	-0.5
Mitogen-activated protein kinase 8	Mapk8	-0.4

Growth factor receptor bound protein 2	Grb2	-0.4
Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	Pik3ca	-0.4
V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Kras	-0.4
Tuberous sclerosis 2	Tsc2	-0.4

Tabla S1. **Genes individuales afectados por la deficiencia de biotina en hígado de rata.** Lista de genes individuales ordenados y agrupados en vías bioquímicas por GSEA sobre la base de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG).

Tabla suplementaria 2

Nombre del gen	Símbolo del gen	Rank metric score
Glucose metabolism		
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gpd-4)	F33H1.2	-1.9
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gpd-1)	T09F3.3	-1.6
Phosphoacetylglucosamine mutase	F21D5.1	-1.4
6-phosphofructo-1-kinase	K02B2.1	-1.4
Glucose-6-phosphate-1-dehydrogenase	B0035.5	-1.2
L-lactate dehydrogenase	F13D12.2	-1.1
Hexokinase	F14B4.2	-1.1
6-phosphogluconate dehydrogenase	T25B9.9	-1.1
Phosphoglucomutase	R05F9.6	-1.1
6-phosphogluconolactonase	Y57G11C.3	-0.9
Phosphoglycerate Kinase	T03F1.3	-0.8
Transketolase	F01G10.1	-0.8
Glycogen phosphorylase	T22F3.3	-0.8
*Phosphoenolpyruvate carboxykinase	W05G11.6	1.9
TCA cycle		
Succinate dehydrogenase complex subunit A	C34B2.7	-2.1
Citrate lyase β chain	C01G10.7	-1.6
Succinyl-coa synthetase β chain	C50F7.4	-1.4
ATP citrate lyase	B0365.1	-1.4
Aconitase (aco-1)	ZK455.1	-1.1
Malate dehydrogenase (mdh-1)	F20H11.3	-1.0

Succinyl-coa synthetase, alpha subunit	F23H11.3	-1.0
Isocitrate dehydrogenase	F59B8.2	-0.8
ATP citrate lyase	D1005.1	-0.7
Pyruvate carboxylase	D2023.2	-0.5

Oxidative phosphorylation

Flavoprotein	C34B2.7	-2.1
NADH-ubiquinone oxidoreductase	T26A5.3	-1.3
ATPase	F52E1.10	-1.3
Ubiquinol-Cytochrome c oxidoreductase complex	T24C4.1	-1.2
NADH-ubiquinone oxidoreductase B8 subunit	C25A1.13	-1.2
Acyl-carrier protein	Y56A3A.19	-1.1
ATP Synthase B homolog	F35G12.10	-1.1
Vacuolar H ⁺ -ATPase V1 sector, subunit B	Y110A7A.1	-1
Vacuolar H ATPase	C26H9A.1	-0.9
Acyl carrier protein/NADH-ubiquinone oxidoreductase	F37C12.3	-0.9
Cytochrome c oxidase	F40G9.2	-0.8
Dehydrogenase (ubiquinone) complex	Y63D3A.7	-0.8
ATP Synthase G homolog	K07A12.3	-0.6
NADH ubiquinone oxidoreductase subunit	F22D6.4	-0.6
LiPid Depleted	ZK973.10	-0.6
Cytochrome oxidase assembly factor	T06D8.5	-0.6
Ubiquinol-cytochrome c reductase complex	T27E9.2	-0.5
ATP synthase epsilon chain	F32D1.2	-0.5
Succinate DeHydrogenase complex subunit D	F33A8.5	-0.4
Vacuolar ATP synthase (strong)	F20B6.2	-0.4
Dehydrogenase (ubiquinone) complex	W01A8.4	-0.4
NADH:ubiquinone oxidoreductase	Y54F10AM	-0.3
NADH:ubiquinone oxidoreductase	C18E9.4	-0.2
Vacuolar H ATPase	T01H3.1	-0.2

Vacuolar H ATPase	Y49A3A.2	-0.2
NADH:ubiquinone oxidoreductase	Y71H2AM.4	-0.2
Succinate DeHydrogenase complex subunit B	F42A8.2	-0.2
NADH-ubiquinone dehydrogenase	F53F4.10	-0.2
Succinate dehydrogenase cytochrome b chain	T07C4.7	-0.2
Vacuolar H ATPase	ZK970.4	-0.2
NADH:ubiquinone oxidoreductase	T20H4.5	-0.2
NADH-ubiquinone oxidoreductase	C09H10.3	-0.1
NADH:CoQ oxidoreductase subunit B	D2030.4	-0.1
NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit	F45H10.3	-0.1
Vacuolar ATPase G subunit	F46F11.5	-0.1
NADH Ubiquinone Oxidoreductase	Y57G11C.1	-0.1
NADH ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein	Y54E10BL	-0.1
NADH-ubiquinone oxidoreductase	C33A12.1	-0.1
Vacuolar H ATPase	C17H12.14	-0.1
NADH-ubiquinone oxidoreductase B	C16A3.5	-0.1

Fatty acid synthesis

Fatty acid desaturase (fat-7)	F10D2.9	-3.9
Fatty acid elongation (elo-5)	F41H10.7	-1.6
Fatty acid desaturase (fat-5)	W06D12.3	-1.3
Fatty acid elongation (elo-6)	F41H10.8	-1.3
Acetyl-coa carboxylase (acc)	W09B6.1	-1.0
NADP+-dependent malic enzyme	Y48B6A.12	-0.7
Malonyl-coa:ACP transacylase	C50D2.9	-0.7
ATP citrate lyase	D1005.1	-0.6
Mitochondrial tricarboxylate/dicarboxylate carrier proteins	K11H3.3	-0.4
3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase	F10G8.9	-0.3
Fatty acid synthase (Fas)	F32H2.5	-0.2

Fatty acid oxidation and glyoxylate cycle

Enoyl- CoA Hydratase	F01G10.3	3.9
Fatty Acid CoA synthetase family (acs-2)	F28F8.2	3.7
Fatty Acid CoA synthetase family (acs-16)	F47G6.2	3.3
Acyl- CoA thioesterase	F25E2.3	3.1
Fatty Acid CoA synthetase family (acs-17)	C46F4.2	2.8
Acyl- CoA oxidase I	C48B4.1	2.7
Carnitine Palmitoyl Transferase (cpt-4)	K11D12.4	2.4
Long-chain fatty-acid CoA ligase	T08B1.6	2.2
Isocitrate lyase/malate synthase (gei-7)	C05E4.9	2.0
Functionally analogous PGC-1 α (MDT-15)	R12B2.5	2.0
Pristanoyl- CoA /acyl- CoA oxidase	F58F9.7	1.9
Peroxisomal membrane protein related	T02D1.5	1.8
Acyl- CoA oxidase I	F59F4.1	1.7
Enoyl- CoA hydratase	F01G10.2	1.5
Peroxisome assembly factor	F32A5.6	1.4
Peroxisomal long chain acyl- CoA thioesterase	T05E7.1	1.4
Peroxisome assembly factor	ZK809.7	1.3
Peroxisome assembly factor	F39G3.7	1.2
Fatty acid CoA synthetase family (acs-11)	F41C3.3	1.2
Peroxisome assembly factor	C15H9.8	1.2
Peroxisome assembly factor	C34C6.6	1.1
Peroxisome assembly factor	F08B12.2	1.1
Fumarate reductase flavoprotein	F48E8.3	1.1
Peroxisome assembly factor	C11H1.6	1.1
Carnitine palmitoyltransferase (cpt-6)	W01A11.5	1.1
Acyl- CoA dehydrogenase	T25G12.5	1.0
Fatty acid transport protein	F28D1.9	1.0
Cytosolic malate dehydrogenase	F46E10.10	1.0

ceTOR

Rapamycin-Insensitive Companion of TOR	F29C12.3	-1.2
Initiation Factor 4E (eif4e) family	B0348.6	-1.2
Initiation Factor 4E (eif4e) family	Y57A10A.30	-1.2
RHEB (Ras Homolog)	F54C8.5	-1.2
Ribosomal protein S6 kinase	T01H8.1	-1.0
Ageing alteration / phosphatidylinositol 3-kinase	B0334.8	-0.9
*AMP-dependent kinase (AMPK)	aak-2	1.9

IGF pathway

6-phosphofructo-1-kinase	K02B2.1	-1.4
Abnormal dauer Formation	T07A9.6	-1.2
Initiation Factor 4E (eif4e) family	B0348.6	-1.2
Initiation Factor 4E (eif4e) family	Y57A10A.30	-1.2
Ras family	F54C8.5	-1.2
*Sterol regulatory element Binding Protein (sbp-1)	Y47D3B.7	-1.1
Lipid Depleted	C48E7.3	-1.1
Hexokinase	F14B4.2	-1.1
Polarity and Osmotic /ACC	W09B6.1	-1.0
Ageing alteration / phosphatidylinositol 3-kinase	B0334.8	-0.9
Fructose-bisphosphatase	K07A3.1	-0.8
Glycogen synthase	Y46G5A.31	-0.8
Protein kinase c	F09E5.1	-0.8
Phosphoinositide kinase adapter subunit	Y110A7A.10	-0.8
*Transcription factor HNF-3/forkhead family (Daf-16)	R13H8.1	0.9

Tabla S2. **Genes individuales afectados por la deficiencia de biotina en *C. elegans*.** Lista de genes individuales ordenados y agrupados en vías bioquímicas por GSEA sobre la base de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG).

Tabla suplementaria 3

Nombre del gen	Símbolo del gen	Rank metric score
Glucose metabolism		
Phenylpyruvate decarboxylase	ARO10	2.4
Glycogen synthase with similarity to Gsy2p	GSY1	1.1
Zinc cluster transcriptional activator	CAT8	1.3
C6 zinc cluster transcriptional activator	SIP4	1.1
Pyruvate carboxylase isoform	PYC1	0.9
Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	ALD4	0.9
Pyruvate kinase	PYK1	0.9
Self-glucosylating initiator of glycogen synthesis	GLG1	0.7
Glycogen branching enzyme	GLC3	0.7
Putative neutral trehalase	NTH2	0.6
Glycogen debranching enzyme containing glucanotransferase and alpha-1,6-amylglucosidase activities	GDB1	0.6
Acid trehalase required for utilization of extracellular trehalose	ATH1	0.5
Glycogen synthase	GSY2	0.5
Acetyl-coA synthetase isoform	ACS1	0.5
Phosphoenolpyruvate carboxykinase,	PCK1	0.5
Hexokinase isoenzyme 1	HXK1	0.5
6-phosphofructo-2-kinase	PFK26	0.5
High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily	HXT2	0.5
Plasma membrane glucose sensor	SNF3	0.5
Alcohol dehydrogenase isoenzyme V	ADH5	0.4

Glycogen Phosphorylase	GPH1	0.4
Fructose-2,6-bisphosphatase	FBP26	0.4
Cytoplasmic aldehyde dehydrogenase	ALD3	0.4
*High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily	HXT6/7	-0.9

TCA cycle

Citrate synthase	CIT3	2.0
Isocitrate dehydrogenase, NADP-specific	IDP3	0.6
Citrate synthase	CIT1	0.5
Pyruvate dehydrogenase complex protein X	PDX1	0.5
Succinyl-CoA ligase β subunit	LSC2	0.5
Isocitrate Dehydrogenase, NADP-specific	IDP1	0.4
Succinate dehydrogenase	SDH4	0.4
Citrate synthase	CIT2	0.3
Fumarase	FUM1	0.2
Pyruvate dehydrogenase B subunit	PDB1	0.2
Succinate dehydrogenase Cytochrome b subunit	SDH3	0.2
Isocitrate Dehydrogenase, NADP-specific	IDP2	0.2

Fatty acid oxidation- Glyoxylate cycle

Carnitine carrier	CRC1	4.3
Outer mitochondrial carnitine acetyltransferase	YAT1	2.6
Malate synthase	MLS1	2.4
Carnitine acetyltransferase	YAT2	2.2
Citrate synthase	CIT3	2.0
Fatty-acyl coenzyme A oxidase	POX1	1.7
Carnitine acetyl-CoA transferase	CAT2	1.6
Long chain fatty acyl-CoA synthetase	FAA2	1.4
Malate synthase	DAL7	1.4
Peroxisomal membrane signal receptor	PEX5	0.7

Peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	IDP3	0.6
3-ketoacyl-CoA thiolase	POT1	0.6
Isocitrate lyase	ICL1	0.6
Carbon source-responsive zinc-finger transcription factor	ADR1	0.6
Peroxisomal ABC-transporter	PXA2	0.6
Citrate synthase	CIT1	0.5
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	FOX2	0.5
Enoyl-CoA Isomerase	ECI1	0.5
Peroxin 4	PEX4	0.5
Peroxin 12	PEX12	0.4

Tabla S3. **Genes individuales afectados por la deficiencia de biotina en *C. elegans*.** Lista de genes individuales ordenados y agrupados en vías bioquímicas por GSEA sobre la base de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG).

Biotin Starvation with Adequate Glucose Provision Causes Paradoxical Changes in Fuel Metabolism Gene Expression Similar in Rat (*Rattus norvegicus*), Nematode (*Caenorhabditis elegans*) and Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)D. Ortega-Cuellar^{a-c} A. Hernandez-Mendoza^{a,b} E. Moreno-Arriola^{a,b}
K. Carvajal-Aguilera^c V. Perez-Vazquez^{a,b} R. Gonzalez-Alvarez^{a,b}
A. Velazquez-Arellano^{a,b}^aUnidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, ^bInstituto Nacional de Pediatría, y ^cDepartamento de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, México, México**Key Words**

Biotin starvation · Gene expression · Carbon metabolism · Glucose consumption · Eukaryotes

Abstract

Background/Aim: Biotin affects the genetic expression of several glucose metabolism enzymes, besides being a cofactor of carboxylases. To explore how extensively biotin affects the expression of carbon metabolism genes, we studied the effects of biotin starvation and replenishment in 3 distantly related eukaryotes: yeast *Saccharomyces cerevisiae*, nematode *Caenorhabditis elegans* and rat *Rattus norvegicus*. **Methods:** Biotin starvation was produced in Wistar rats, in *C. elegans* N2 and *S. cerevisiae* W303A fed with abundant glucose. High-density oligonucleotide microarrays were used to find gene expression changes. Glucose consumption, lactate and ethanol were measured by conventional tests. **Results:** In spite of abundant glucose provision, the expression of fatty oxidation and gluconeogenic genes was augmented, and the transcripts for glucose utilization and lipogenesis were

diminished in biotin starvation. These results were associated with diminished glucose consumption and glycolysis products (lactate and ethanol in yeast), which was consistent across 3 very different eukaryotes. **Conclusion:** The results point toward a strongly selected role of biotin in the control of carbon metabolism, and in adaptations to variable availability of carbon, conceivably mediated by signal transduction including soluble guanylate cyclase, cGMP and a cGMP-dependent protein kinase (PKG) and/or biotin-dependent processes.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Introduction

The biotin structure is well suited to transfer carboxyl moieties, such as the prosthetic group of carboxylases, decarboxylases and transcarboxylases. The N¹ of its ureido ring facilitates an amide formation with CO₂, and its lateral carbon chain, covalently linked to lysine residues of these enzymes, allows it to catalyze carboxyl group

KARGERFax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com© 2010 S. Karger AG, Basel
1661–6499/10/0031–0018\$26.00/0Accessible online at:
www.karger.com/jnnAntonio Velazquez
Torre de Investigación INP, Av. del IMAN No. 1, 4º. Piso
Col. Insurgentes-Cuicuilco, Delegación Coyoacán
México, DF 04530 (Mexico)
Tel. +52 55 5606 3489, E-Mail velare@servidor.unam.mx

transfers in important reactions of intermediary metabolism [1]. In mammals they are pyruvate carboxylase for TCA cycle anaplerosis, gluconeogenesis and fatty acid synthesis; propionyl-CoA carboxylase for catabolism of several amino acids and odd-chain fatty acids, contributing also to anaplerosis; methylcrotonyl-CoA carboxylase for leucine catabolism, and acetyl-CoA carboxylase (ACC) for fatty acid synthesis [2]. In *Saccharomyces cerevisiae* propionyl-CoA carboxylase is absent [3].

Biotin functions also as regulator of genetic expression. It participates in the control of the bio operon in *Escherichia coli* [4]. In rat liver our group discovered that biotin affects the genetic expression of holocarboxylase synthetase (a.k.a. biotin protein ligase, BPL) and of the mitochondrial carboxylases [5, 6]. It also controls the expression of the biotin transporter (SMVT) gene in transformed human hepatoma cultured cells [6]. More recently, it was reported that in yeast its deficiency induces genes for its synthesis (although few are not present in the yeast genome, thus its auxotrophy for biotin), as well as for transport of precursors and for transcription factor Vhr1p, which binds to biotin-regulatory elements [7], not present in mammals.

Surprisingly, this vitamin increases the transcription of liver glucokinase (GK; hexokinase IV) and decreases that of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) genes in starved rats [8, 9]. It also raises the activities of phosphofructokinase 1 and pyruvate kinase, although their mRNAs were not raised [10]. The potential metabolic consequences of these opposite genetic effects might be quite significant for the regulation of carbon fluxes. GK is the first enzyme of glycolysis and is very important for the regulation of this pathway flow [11]. It is also the main blood glucose sensor in pancreas beta cells and in brain regions like the hypothalamus [12]. PEPCK functions in gluconeogenesis [13].

These findings are enigmatic in that there is no discernible relation between the structure and known functions of biotin, and the genetic expression of these glucose metabolism enzymes. To explore how extensively biotin affects the expression of carbon metabolism genes, we studied the effects of biotin starvation and replenishment using a high-density oligonucleotide microarray approach in 3 eukaryotes, which diverged over a 1,000 million years' time lapse: the baker's yeast *S. cerevisiae*, the nematode *Caenorhabditis elegans* and the rat *Rattus norvegicus* fed with abundant glucose. Paradoxically, in the 3 biotin-starved organisms the genomic expression corresponded to (false) scant glucose conditions.

Material and Methods

Biotin-Deficient Organisms

Biotin-deficient rats were obtained as follows: 5 male rats (Wistar strain), aged 21 days and 50 g of weight, were made biotin deficient and another 5 rats, of similar gender, age and weight, served as controls (biotin sufficient). Biotin deficiency was induced by feeding them with a commercial biotin-deficient diet containing 30% of white egg as source of avidin (TD.81079 ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland, Ohio, USA). The control animals were fed with a similar diet that lacked avidin (TD.97126, ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland, Ohio, USA). Each rat was housed individually in an air-filtered cage under 12-hour light/dark cycles and was allowed free access to water. Sufficient and deficient rats were sacrificed at 6–7 weeks; at this time, all biotin-deficient rats had developed features of biotin deficiency as previously described [14]. To analyze the recovery of the effects of biotin deficiency, 5 biotin-deficient rats were injected intraperitoneally with biotin (1 mg/kg of body weight, B4639, ≥ 99%, powder from Sigma-Aldrich) or with saline solution (control) and then sacrificed at 0 and 24 h by decapitation before isolation of the liver, which was then placed in liquid nitrogen and stored at -70°C before utilization.

C. elegans strain N2 was made biotin deficient by feeding nematodes synchronized at the L1 stage with an overnight culture of biotin auxotrophic *E. coli* (MG1655bioB:kan, kindly donated by Dr. John E. Cronan, University of Illinois, Urbana, Ill., USA) grown in minimal medium with 5.0 and 0.05 nM of biotin (sufficient and deficient, respectively). To generate a more profound deficiency in worms, avidin (1 U/ml) was added in each condition; this amount is enough to trap biotin in the deficient but not in the sufficient media. In the experiments of biotin replacement, deficient worms were replated with biotin-auxotroph *E. coli* that had been grown in 5.0 nM biotin-containing medium; they were harvested at 0 and 4 h afterwards. When necessary, biotin-starved worms were placed in agar plates that contained 1 mM of 8-Br-cGMP for 3 h. After this period the worms were recollected and kept at -80°C until use.

For biotin-deficient cultures of yeast, *S. cerevisiae* (strain W303A) was grown in synthetic minimal media (SD media) containing 2% glucose as carbon source, with biotin 0.4 or 8.0 nM (biotin deficient and biotin sufficient, respectively). After defined times after inoculation (0 and 2 h) biotin (8.0 nM) was added.

Biotin Deficiency Analysis

To verify biotin deficiency in the 3 organisms, we determined the degree of carboxylase biotinylation by streptavidin Western blots. Aliquots containing 30 µg of total protein were subjected to SDS-PAGE. The gel was blotted on a 0.45-µm nitrocellulose membrane, using a semidry transfer cell (Bio-Rad), at 20 V for 25 min. The membrane was incubated with streptavidin-alkaline phosphatase for 2 h [15]. Color development was performed incubating the membrane in the dark, in A-P buffer containing 10 mM Tris base (pH 9.5), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ and 50 µl nitroblue tetrazolium chloride solution plus 50 µl 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine salt solutions. Holoenzyme mass was quantified by densitometry of the bands using the Dolphin-1D gel analysis software (Wealtec, Nev., USA). Protein was determined by the Bradford method using BSA as the standard.

RNA Extraction of 3 Organisms

RNA for microarray analysis from rat liver and worm was extracted with the TRIzol method (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For yeast, RNA was extracted with acid phenol according to standard protocols [16]. For the three organisms, RNA was subsequently loaded onto RNA-binding columns from QIAGEN's RNeasy kit (Qiagen, Valencia, Calif., USA) to remove contamination with genomic DNA and proteins before further processing.

Gene Array Experiments

All procedures were performed at Boston University Microarray Resource Facility exactly as described in the Affymetrix GeneChip Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix, Santa Clara, Calif., USA, current version available at www.affymetrix.com). Briefly, the integrity of total RNA for each sample was verified using RNA 6000 Nano Assay RNA chips run in Agilent 2,100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, Calif., USA). Total RNA (5 μ g) was reverse transcribed using the One Cycle cDNA Synthesis kit (Affymetrix) and the obtained double-stranded cDNA was purified with GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix). The obtained cDNA was used as template for in vitro transcription using GeneChip IVT Labeling kit (Affymetrix). The resulting biotin-labeled cRNA was purified using GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix), fragmented and hybridized (15 μ g) to the microarrays GeneChip *C. elegans* Genome Array, GeneChip Yeast Genome 2.0 Array and GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) for 16 h in the GeneChip Hybridization Oven 640 at 45°C with rotation (60 rpm). IVT and cRNA fragmentation quality controls were carried out by running an mRNA Nano assay in the Agilent 2100 Bioanalyzer. The hybridized samples were washed and stained using Affymetrix Fluidics Station 450 with streptavidin-R-phycoerythrin, and the signal was amplified using a biotinylated goat antistreptavidin antibody followed by another streptavidin-phycoerythrin staining (Hybridization, Washing and Staining Kit, Affymetrix). Microarrays were immediately scanned using Affymetrix GeneArray Scanner 3000 7G Plus (Affymetrix). All cell culturing, RNA isolation, and array hybridization steps were performed in parallel, and scanning of hybridized microarrays was performed on the same scanner. Analysis of the data was performed with Affymetrix GCOS 1.4 software by comparing means of signal intensity from RNA samples derived from sufficient and deficient organisms.

Statistical analysis included the t test comparing condition control to condition-deficient, false discovery rate calculation to control for multiple hypothesis testing and calculation of fold change (expressed as \log_2) value between the two conditions. We used these data to produce preordered ranked gene lists of the 3 organisms' datasets, which were then tested for enrichment by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA v. 2.0, Broad Institute, Cambridge, Mass., USA) [17]. Gene sets were generated and modified with biochemical pathway data publicly available from Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; www.genome.jp/kegg).

Gene Expression Analysis

RNA was isolated from the 3 organisms as mentioned above. Complementary DNA was generated by Superscript II enzyme (Invitrogen) and random hexamers (deoxy-NTP6; Amersham Bioscience). The analysis was performed by quantitative reverse-transcriptase PCR (qRT-PCR) on ABI PRISM 7700 Real Time

PCR machine (Applied Biosystems) using Taqman probes. The level of each target mRNA was examined and normalized to 18S rRNA using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [18]. The efficacies of our reactions were tested by dilution experiments and melting curves.

Measurements of Metabolite Concentrations

The concentrations of lactate in the rat and worm was directly measured as described by Bergmeyer [19]. The acid extracts were obtained as described previously [19–21]. Briefly, approximately 20 mg wet weight of each organism was ground in a nitrogen-chilled mortar and collected in perchloric acid solution (0.6 M in 20 mM EDTA). Extracts were deproteinized by centrifugation after 30 min incubation on ice and then neutralized with KOH 4 M. The concentration of metabolites was measured spectrophotometrically and detected within the linear range. Each extract was assayed in triplicate. Ethanol production for yeast was measured according to Beutler's method [22]. Briefly, 500 mg of cells were incubated in 10 mM MES-TEA buffer (morpholinoethanesulfonic acid, taken to pH 6.0 with triethanolamine), 20 mM glucose, 0.02 M cyanide, and 25 μ M octylgalate, in 10 ml final volume. Subsequently, ethanol was measured by the addition of NAD⁺ and alcohol dehydrogenase.

Glucose Consumption

Glucose levels were determined essentially as described by Bergmeyer [19] with modifications. Briefly, glucose concentration in the growth media was quantified using the Glucose (GO) Assay Kit based on the method of glucose oxidase (GAGO-20, Sigma). Equal amounts of wet weigh (500 mg) of yeast from exponential growth cultures were added to 10 mM MES-TEA buffer pH 6.0 containing 65 mM glucose in 3 ml. Glucose consumption was calculated from the disappearance rate of glucose under incubation at 30°C during 30 min.

Sudan Black Staining of *C. elegans*

Control and biotin-deficient worms were washed in M9 for 30 min and fixed in 1% paraformaldehyde in M9. The worms were then subjected to 3 freeze-thaw cycles and dehydrated through washes with 25, 50 and 70% ethanol. The worms were stained overnight in a 50% saturated solution of Sudan black in 70% ethanol, rehydrated, and photographed. Stained animals were visualized with a Zeiss Axioplan microscope [23].

Statistical Analysis

All experiments were done in triplicate and at least 3 different times with different samples for each organism. Data are presented as the mean of 3 different experiments and statistical significance was evaluated by ANOVA at $p < 0.05$.

Results

Biotin-Deficient Phenotypes

In the 3 studied organisms, bands corresponding to biotin holoproteins were greatly attenuated by biotin starvation and became visible after the vitamin was replaced (fig. 1). At 6–7 weeks of treatment, deficient rats exhibited clear deficiency signs including low body

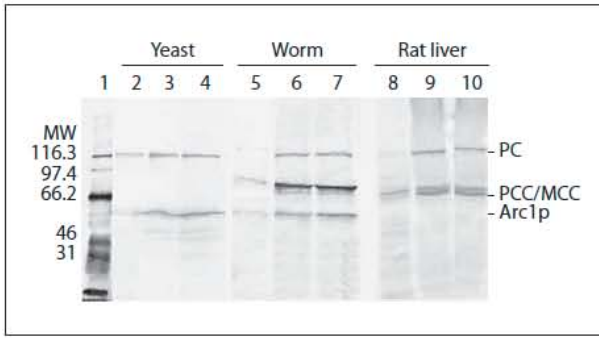


Fig. 1. Biotin deficiency and its replacement are corroborated by streptavidin Western blots. 1: Molecular weight standard; 2, 5 and 8: biotin deficient; 3, 6 and 9: biotin sufficient; 4, 7 and 10: biotin replenishment. PC = Pyruvate carboxylase; PCC = propionyl-CoA carboxylase; MCC = 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase; Arc1p = aminoacyl tRNA synthetase cofactor 1.

weight, hair loss, conjunctivitis and periorificial skin rash (data not shown). However, they continued showing normal activity, appetite, sleep/wake cycle, and no apparent neurological abnormalities. Their weight was significantly reduced (fig. 2a). Growth of yeast was also diminished (fig. 2b). The worms' growth was reduced and their appearance was translucent, a likely consequence of diminished lipid content indicated by reduced Sudan black staining (fig. 2c).

Gene Expression in the 3 Organisms Fed the Biotin-Deficient Diet

To study the extent of the effects of biotin starvation on carbon metabolism transcriptomes, microarray data were first organized in biological process clusters according to the KEGG. We tested the KEGG gene sets of the 3 organisms' microarray data for enrichment by GSEA. The overall results of the 3 species are depicted in table 1. Several metabolic gene sets were differentially enriched ($p \leq 0.05$, $FDR > 0.25$) in the 3 organisms fed the biotin-deficient diet. Two gene sets were negatively enriched (repressed) and 1 was positively enriched (activated) in rat liver, 4 were repressed and 1 was activated in worm and 1 was repressed and 3 were activated in yeast. Table 1 shows the results for glucose metabolism and fatty acid oxidation and synthesis. The analysis identified similar alterations in the gene sets of rat and worm when these species were biotin-starved; they differed in yeast regarding glucose metabolism, TCA cycle and oxidative phosphorylation, but were analogous with respect to fatty acid synthe-

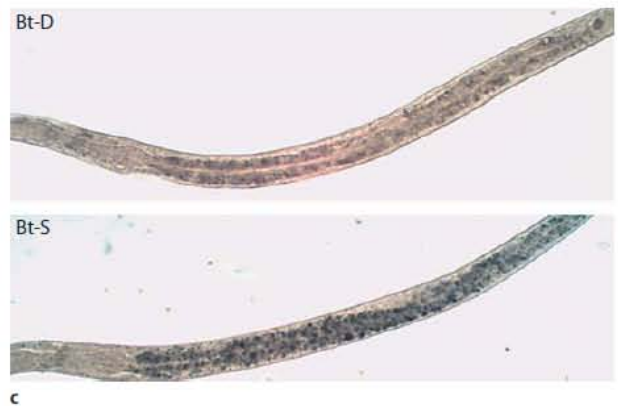
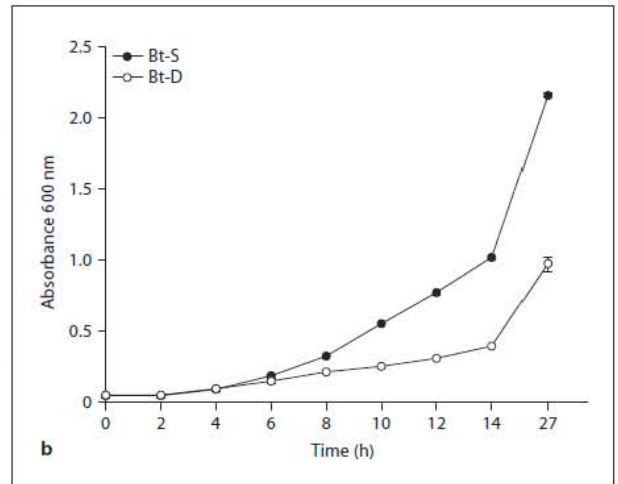
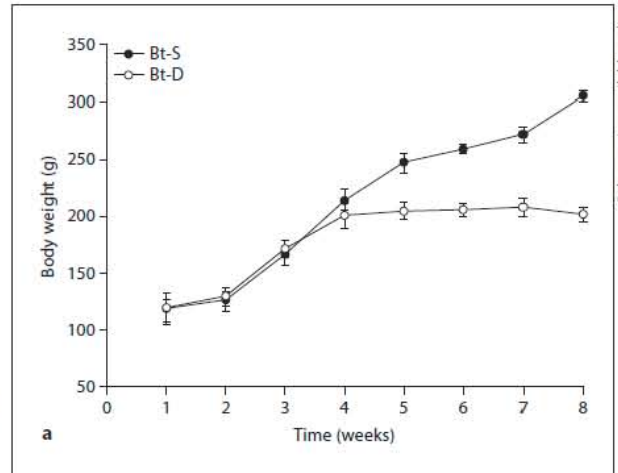


Fig. 2. Biotin-deficient phenotypes. Effect of biotin deficiency on body weight in rats (a). Bt-S = Biotin sufficient; Bt-D = biotin deficient. Worm's fat stained with Sudan black (c) and the growth of *S. cerevisiae* (b).

Table 1. Biotin deficiency modifies gene transcript sets of biochemical pathways in each of 3 biotin-starved eukaryotes

Metabolic pathways	Rat liver				Worm				Yeast			
	n	NES	p value	FDR	n	NES	p value	FDR	n	NES	p value	FDR
Glucose metabolism	40	-1.58	0.03	0.06	35	-1.4	0.05	0.13	81	1.5	0.04	0.17
TCA cycle	18	0.84	0.69	0.84	29	-1.79	0	0.09	30	1.7	0.01	0.05
Oxidative phosphorylation	68	0.57	1	0.98	80	-1.57	0	0.10	64	1.33	0.06	0.29
Fatty acid oxidation-glyoxylate cycle ^a	13	<i>1.39</i>	<i>0.02</i>	<i>0.14</i>	45	<i>1.42</i>	<i>0.03</i>	<i>0.09</i>	45	<i>2.2</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
Fatty acid synthesis	5	-1.60	0.02	0.07	7	-1.63	0.06	0.09	5	-1	0.05	0.06

Data obtained by GSEA [17]. n = Number of genes in each gene set; NES = normalized enrichment score (likelihood genes comprising a given cluster are overrepresented at a given end of the rank list); FDR = q value, false discovery rate. Positive enrichment (biotin-deficient set with more transcripts with a higher ranking than the control) is depicted in italics; negative enrichment (more transcripts with a lower ranking) in bold. The genes were ranked

according to \log_2 of differences between deficient and sufficient states. This ranking was then used in modified GSEA for cluster analysis. Gene sets were curated from biochemical pathway data publicly available from the KEGG; cluster composition is described in table 2. Results are from 3 independent experiments for each experimental condition.

^a Glyoxylate cycle is not present in the rat.

sis and oxidation. Results for individual genes will be described for each organism.

Effects of Biotin Starvation on Rat Liver Metabolic Transcripts

When we compared KEGG sets from deficient animals with those from controls, the ones for glucose metabolism and fatty acid synthesis were significantly decreased whereas the one for fatty acid oxidation was increased, in spite of the rats having been sacrificed in the immediate ingestive phase after a carbohydrate-containing meal (postprandial period). It must be recalled that in the mammalian liver, in contrast with other organs, the main use of glucose is for fuel storage in the form of glycogen and fatty acids [24]. Individual genes for glucose utilization and lipogenesis whose transcripts were diminished included those for glucose transporter 1, GK, 6-phosphofructo-2-kinase, liver pyruvate kinase (L-PK), pyruvate carboxylase, lactate dehydrogenase D, ACC1 and fatty acid synthase (FAS). On the other hand, the transcript for gluconeogenic PEPCK was augmented (table 2a).

In order to confirm some of the microarray results, the mRNAs of GK, L-PK, PEPCK and BPL (a.k.a. holocarboxylase synthetase) were quantified by real-time RT-PCR (qRT-PCR) in the biotin-deficient livers and in those of deficient rats that had been injected with biotin. The results agree with those by microarrays and were reversed after biotin was administered to the deficient animals (fig. 3a). The findings indicate that starvation of a vitamin-like biotin leads to extensive modifications

of carbon metabolism gene expression, with a reduction of transcripts for glycolysis and lipogenesis, and an increase of several for β -oxidation and gluconeogenesis, even if the animals were in the immediate postprandial period.

Effects of Biotin Starvation on Worm Metabolic Transcripts

When we studied worms we used whole organisms, in contrast to having used only the rat liver. In the biotin-deficient worm, the results were similar to those of the rat, although more gene sets were changed at a statistically significant level (table 1). The sets of glucose metabolism, TCA cycle, oxidative phosphorylation and fatty acid synthesis were downregulated, whereas those of fatty acid oxidation-glyoxylate cycle were upregulated (table 1). Regarding individual genes of the 3 hexokinases present in the worm, hexokinase F14B4.2 may correspond to the mammalian GK since it is located in the cytoplasm, the other 2 being mitochondrial [25], 6-phosphofructo-1-kinase (K02B2.1), two isoforms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gpd-1 and gpd-4) and phosphoglycerate kinase (T03F1.3) were downregulated (table 2b). Other transcripts that were diminished were those for the TCA cycle enzymes, pyruvate carboxylase (pyc-1), aconitase (aco-1), isocitrate dehydrogenase (F59B8.2), two isoforms of succinyl-CoA synthetase (F23H11.3, C50F7.4), succinate dehydrogenase (C34B2.7) and malate dehydrogenase (mdh-1), as well as 40 genes for oxidative phosphorylation (table 2b).

Table 2. Individual genes affected by biotin deficiency in 3 organisms**a** Rat liver

Gene name	Gene symbol	Rank metric score
<i>Glucose metabolism</i>		
Glucokinase	Gck	-2.9
Pyruvate kinase, liver	Pklr	-1.2
6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1	Pfkfb1	-0.9
Pyruvate carboxylase	Pc	-0.7
Liver glycogen phosphorylase	Pygl	-0.7
Phosphoglycerate kinase 1	Pgk1	-0.6
Lactate dehydrogenase D	Ldhd	-0.6
Na-dependent glucose transporter 1	Naglt1	-0.6
Transketolase	Tkt	-0.5
*Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Pck1	1.34
<i>Fatty acid synthesis</i>		
ATP citrate lyase	Acly	-1.8
Fatty acid synthase	Fasn	-1.5
Solute carrier family 25, member 1	Slc25a1	-0.5
Acetyl-coenzyme A carboxylase α	Acaca	-0.4
<i>Fatty acid oxidation</i>		
Carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	Cpt1a	0.6
Carnitine acetyltransferase	Crat	0.4
Carnitine palmitoyltransferase 2	Cpt2	0.4
Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein	Slc25a20	0.4
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase β subunit	Hadhb	0.3
Coenzyme A dehydrogenase α subunit	Hadha	0.3
Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	Acsl4	0.2
Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	Acsl3	0.1
Acyl-coenzyme A dehydrogenase, very long chain	Acadvl	0.1
Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	Acsl5	0.1

b Worm

<i>Glucose metabolism</i>		
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gpd-4)	F33H1.2	-1.9
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gpd-1)	T09F3.3	-1.6
Phosphoacetylglucosamine mutase	F21D5.1	-1.4
6-Phosphofructo-1-kinase	K02B2.1	-1.4
Glucose-6-phosphate-1-dehydrogenase	B0035.5	-1.2
L-Lactate dehydrogenase	F13D12.2	-1.1
Hexokinase	F14B4.2	-1.1
6-Phosphogluconate dehydrogenase	T25B9.9	-1.1
Phosphoglucomutase	R05F9.6	-1.1
6-Phosphogluconolactonase	Y57G11C.3	-0.9
Phosphoglycerate kinase	T03F1.3	-0.8
Transketolase	F01G10.1	-0.8
Glycogen phosphorylase	T22F3.3	-0.8
*Phosphoenolpyruvate carboxykinase	W05G11.6	1.9
<i>TCA cycle</i>		
Succinate dehydrogenase complex subunit A	C34B2.7	-2.1
Citrate lyase β chain	C01G10.7	-1.6
Succinyl-CoA synthetase β chain	C50F7.4	-1.4
ATP citrate lyase	B0365.1	-1.4
Aconitase (aco-1)	ZK455.1	-1.1

Table 2 (continued)

Gene name	Gene symbol	Rank metric score
Malate dehydrogenase (mdh-1)	F20H11.3	-1.0
Succinyl-CoA synthetase, α subunit	F23H11.3	-1.0
Isocitrate dehydrogenase	F59B8.2	-0.8
ATP citrate lyase	D1005.1	-0.7
Pyruvate carboxylase (pyc-1)	D2023.2	-0.5
<i>Oxidative phosphorylation</i>		
Flavoprotein	C34B2.7	-2.1
NADH-ubiquinone oxidoreductase	T26A5.3	-1.3
ATPase	F52E1.10	-1.3
Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex	T24C4.1	-1.2
NADH-ubiquinone oxidoreductase B8 subunit	C25A1.13	-1.2
Acyl-carrier protein	Y56A3A.19	-1.1
ATP synthase B homolog	F35G12.10	-1.1
Vacuolar H ⁺ -ATPase V1 sector, subunit B	Y110A7A.12	-1
Vacuolar H ATPase	C26H9A.1	-0.9
Acyl carrier protein/NADH-ubiquinone oxidoreductase	F37C12.3	-0.9
Cytochrome c oxidase	F40G9.2	-0.8
Dehydrogenase (ubiquinone) complex	Y63D3A.7	-0.8
ATP synthase G homolog	K07A12.3	-0.6
NADH ubiquinone oxidoreductase subunit	F22D6.4	-0.6
Lipid depleted	ZK973.10	-0.6
Cytochrome oxidase assembly factor	T06D8.5	-0.6
Ubiquinol-cytochrome c reductase complex	T27E9.2	-0.5
ATP synthase epsilon chain	F32D1.2	-0.5
Succinate dehydrogenase complex subunit D	F33A8.5	-0.4
Vacuolar ATP synthase (strong)	F20B6.2	-0.4
Dehydrogenase (ubiquinone) complex	W01A8.4	-0.4
NADH:ubiquinone oxidoreductase	Y54F10AM.5	-0.3
NADH:ubiquinone oxidoreductase	C18E9.4	-0.2
Vacuolar H ATPase	T01H3.1	-0.2
Vacuolar H ATPase	Y49A3A.2	-0.2
NADH:ubiquinone oxidoreductase	Y71H2AM.4	-0.2
Succinate dehydrogenase complex subunit B	F42A8.2	-0.2
NADH-ubiquinone dehydrogenase	F53F4.10	-0.2
Succinate dehydrogenase cytochrome b chain	T07C4.7	-0.2
Vacuolar H ATPase	ZK970.4	-0.2
NADH:ubiquinone oxidoreductase	T20H4.5	-0.2
NADH-ubiquinone oxidoreductase	C09H10.3	-0.1
NADH:CoQ oxidoreductase subunit B	D2030.4	-0.1
NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit	F45H10.3	-0.1
Vacuolar ATPase G subunit	F46F11.5	-0.1
NADH ubiquinone oxidoreductase	Y57G11C.12	-0.1
NADH ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein	Y54E10BL.5	-0.1
NADH-ubiquinone oxidoreductase	C33A12.1	-0.1
Vacuolar H ATPase	C17H12.14	-0.1
NADH-ubiquinone oxidoreductase B	C16A3.5	-0.1
<i>Fatty acid synthesis</i>		
Fatty acid desaturase (fat-7)	F10D2.9	-3.9
Fatty acid elongation (elo-5)	F41H10.7	-1.6
Fatty acid desaturase (fat-5)	W06D12.3	-1.3
Fatty acid elongation (elo-6)	F41H10.8	-1.3
Acetyl-CoA carboxylase (acc)	W09B6.1	-1.0
NADP ⁺ -dependent malic enzyme	Y48B6A.12	-0.7

Table 2 (continued)

Gene name	Gene symbol	Rank metric score
Malonyl- CoA:ACP transacylase	C50D2.9	-0.7
ATP citrate lyase	D1005.1	-0.6
Mitochondrial tricarboxylate/dicarboxylate carrier proteins	K11H3.3	-0.4
3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase	F10G8.9	-0.3
Fatty acid synthase (Fas)	F32H2.5	-0.2
<i>Fatty acid oxidation and glyoxylate cycle</i>		
Enoyl-CoA hydratase	F01G10.3	3.9
Fatty acid CoA synthetase family (acs-2)	F28F8.2	3.7
Fatty acid CoA synthetase family (acs-16)	F47G6.2	3.3
Acyl-CoA thioesterase	F25E2.3	3.1
Fatty acid CoA synthetase family (acs-17)	C46F4.2	2.8
Acyl-CoA oxidase I	C48B4.1	2.7
Carnitine palmitoyl transferase (cpt-4)	K11D12.4	2.4
Long-chain fatty-acid CoA ligase	T08B1.6	2.2
Isocitrate lyase/malate synthase (gei-7)	C05E4.9	2.0
Functionally analogous PGC-1 α (MDT-15)	R12B2.5	2.0
Pristanoyl-CoA/acyl-CoA oxidase	F58F9.7	1.9
Peroxisomal membrane protein related	T02D1.5	1.8
Acyl-CoA oxidase I	F59F4.1	1.7
Enoyl-CoA hydratase	F01G10.2	1.5
Peroxisome assembly factor	F32A5.6	1.4
Peroxisomal long-chain acyl-CoA thioesterase	T05E7.1	1.4
Peroxisome assembly factor	ZK809.7	1.3
Peroxisome assembly factor	F39G3.7	1.2
Fatty acid CoA synthetase family (acs-11)	F41C3.3	1.2
Peroxisome assembly factor	C15H9.8	1.2
Peroxisome assembly factor	C34C6.6	1.1
Peroxisome assembly factor	F08B12.2	1.1
Fumarate reductase flavoprotein	F48E8.3	1.1
Peroxisome assembly factor	C11H1.6	1.1
Carnitine palmitoyltransferase (cpt-6)	W01A11.5	1.1
Acyl-CoA dehydrogenase	T25G12.5	1.0
Fatty acid transport protein	F28D1.9	1.0
Cytosolic malate dehydrogenase	F46E10.10	1.0

c Yeast

<i>Glucose metabolism</i>		
Phenylpyruvate decarboxylase	ARO10	2.4
Glycogen synthase with similarity to Gsy2p	GSY1	1.1
Zinc cluster transcriptional activator	CAT8	1.3
C6 zinc cluster transcriptional activator	SIP4	1.1
Pyruvate carboxylase isoform	PYC1	0.9
Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	ALD4	0.9
Pyruvate kinase	PYK1	0.9
Self-glucosylating initiator of glycogen synthesis	GLG1	0.7
Glycogen branching enzyme	GLC3	0.7
Putative neutral trehalase	NTH2	0.6
Glycogen debranching enzyme-containing glucanotransferase and α -1,6-amyloglucosidase activities	GDB1	0.6
Acid trehalase required for utilization of extracellular trehalose	ATH1	0.5
Glycogen synthase	GSY2	0.5
Acetyl-CoA synthetase isoform	ACS1	0.5
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	PCK1	0.5

Table 2 (continued)

Gene name	Gene symbol	Rank metric score
Hexokinase isoenzyme 1	HXK1	0.5
6-Phosphofructo-2-kinase	PFK26	0.5
High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily	HXT2	0.5
Plasma membrane glucose sensor	SNF3	0.5
Alcohol dehydrogenase isoenzyme V	ADH5	0.4
Glycogen phosphorylase	GPH1	0.4
Fructose-2,6-bisphosphatase	FBP26	0.4
Cytoplasmic aldehyde dehydrogenase	ALD3	0.4
*High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily	HXT6/7	-0.9
*Low-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily	HXT1	-0.4
<i>TCA cycle</i>		
Citrate synthase	CIT3	2.0
Isocitrate dehydrogenase, NADP-specific	IDP3	0.6
Citrate synthase	CIT1	0.5
Pyruvate dehydrogenase complex protein X	PDX1	0.5
Succinyl-CoA ligase β subunit	LSC2	0.5
Isocitrate dehydrogenase, NADP-specific	IDP1	0.4
Succinate dehydrogenase	SDH4	0.4
Citrate synthase	CIT2	0.3
Fumarase	FUM1	0.2
Pyruvate dehydrogenase B subunit	PDB1	0.2
Succinate dehydrogenase cytochrome b subunit	SDH3	0.2
Isocitrate dehydrogenase, NADP-specific	IDP2	0.2
<i>Fatty acid oxidation-glyoxylate cycle</i>		
Carnitine carrier	CRC1	4.3
Outer mitochondrial carnitine acetyltransferase	YAT1	2.6
Malate synthase	MLS1	2.4
Carnitine acetyltransferase	YAT2	2.2
Citrate synthase	CIT3	2.0
Fatty acyl-CoA oxidase	POX1	1.7
Carnitine acetyl-CoA transferase	CAT2	1.6
Long-chain fatty acyl-CoA synthetase	FAA2	1.4
Malate synthase	DAL7	1.4
Peroxisomal membrane signal receptor	PEX5	0.7
Peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	IDP3	0.6
3-Ketoacyl-CoA thiolase	POT1	0.6
Isocitrate lyase	ICL1	0.6
Carbon source-responsive zinc-finger transcription factor	ADR1	0.6
Peroxisomal ABC transporter	PXA2	0.6
Citrate synthase	CIT1	0.5
3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	FOX2	0.5
Enoyl-CoA isomerase	ECl1	0.5
Peroxin 4	PEX4	0.5
Peroxin 12	PEX12	0.4

List of individual genes, ranked by \log_2 (rank metric score) of their mean ($n = 3$ for each condition) differences between biotin sufficiency and deficiency, were grouped ('gene sets') in manually curated biochemical pathways based on KEGG. Genes included in this list were those belonging to the leading edge subset of GSEA. Also included are genes marked by *, which were not part of gene sets but which changed 2-fold or over with $p \leq 0.05$.

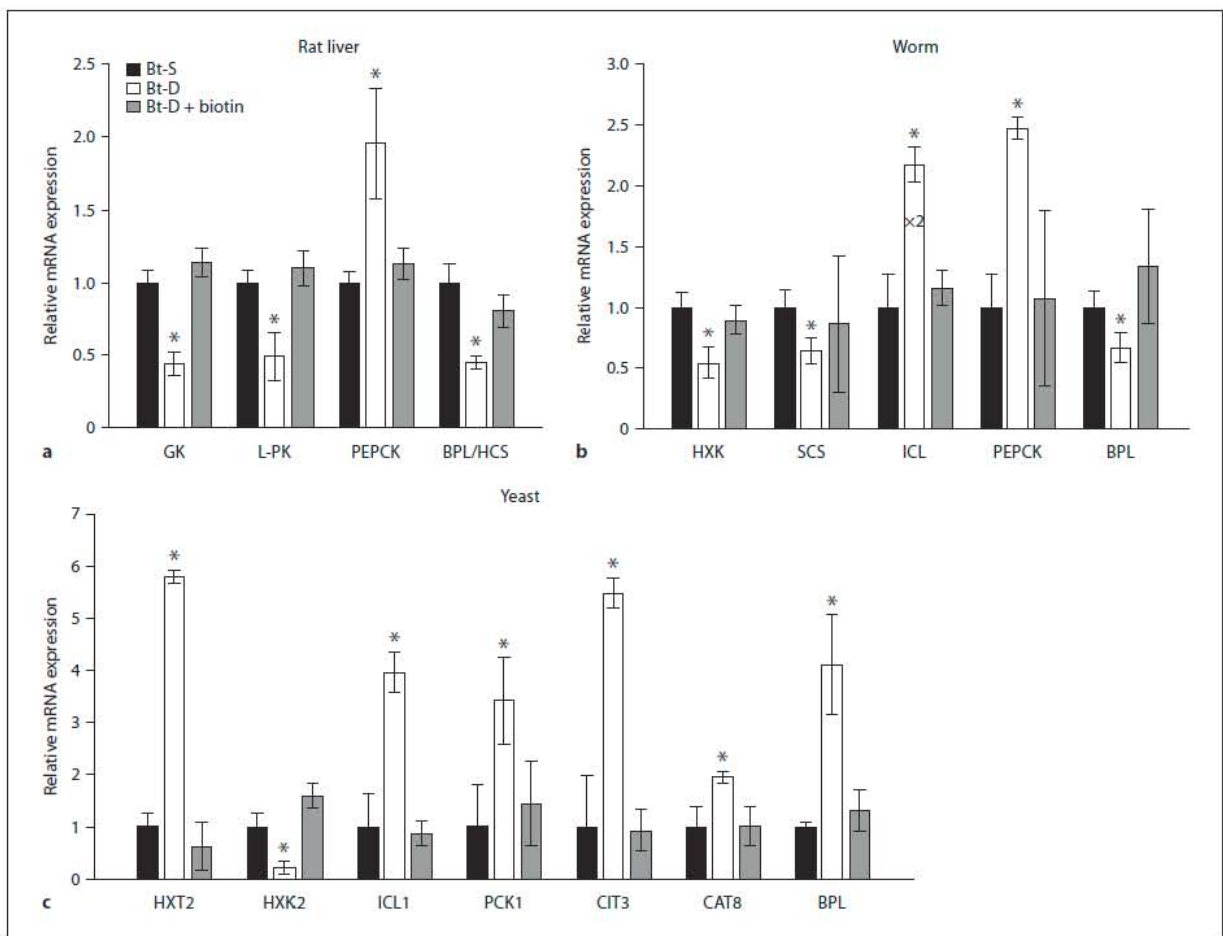


Fig. 3. Biotin starvation changes of selected transcripts were confirmed by qRT-PCR and were reversed by this vitamin replacement in the three species. GK = Glucokinase; L-PK = liver pyruvate kinase; PEPCK or PCK1 = phosphoenolpyruvate carboxykinase; BPL/HCS = biotin protein ligase (holocarboxylase synthetase); HXK = hexokinase F14B4.2; SCS = succinyl-CoA synthetase; ICL or ICL1 = isocitrate lyase; HXK2 = hexokinase 2;

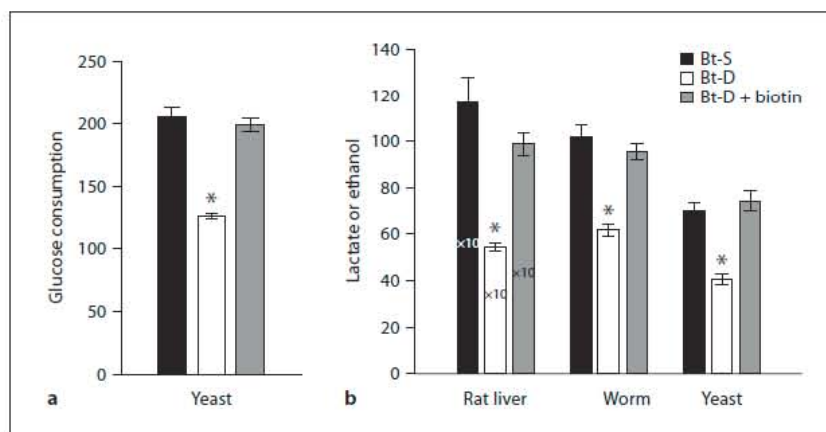
HXT2 = high-affinity glucose transporter 2; CIT3 = citrate synthase; CAT8 = zinc cluster transcriptional activator. Results are mean \pm SD and represent the average of 3 independent experiments. When the results were too high to graph, they are shown minimized and are labeled 'X-fold'. Statistical difference by ANOVA: * $p \leq 0.05$. Bt-S = Biotin sufficient; Bt-D = biotin deficient.

Several transcripts for fatty acid synthesis were down-regulated: ATP-citrate lyase, ACC, FAS, malic enzyme and fatty acid elongation and desaturase. Conversely, there was an increase in transcripts for fatty acid oxidation enzymes: some members of the acyl-CoA synthetase family (*acs-2*, *acs-11* and *acs-17*) and carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-4 and 6), an enzyme that enhances the transfer of fatty acids into the mitochondrial matrix for β -oxidation (table 2b). The transcripts for the glyoxylate pathway enzymes isocitrate lyase/malate synthase

(*gei-7*) and cytosolic malate dehydrogenase (F46E10.10) and for the gluconeogenic PEPCK (W05G11.6) were also upregulated. Transcripts for both glycogen synthesis and degradation were downregulated (table 2b). In lower eukaryotes the glyoxylate pathway is anaplerotic [26, 27] linked to β -oxidation and to gluconeogenesis.

There was confirmation by qRT-PCR quantization of the mRNAs for hexokinase F14B4.2, succinyl-CoA synthetase (marker for the TCA cycle), isocitrate lyase/malate synthetase (marker for the glyoxylate pathway),

Fig. 4. Biotin modulates glucose utilization in 3 eukaryotes: glucose consumption (a) and lactate or ethanol (b). Lactate in rat liver and worm is expressed as nmol/mg protein, whereas for yeast, ethanol and glucose consumption are expressed in nmol/mg wet weight. When the results were too high to graph, they are shown minimized and are labeled 'X-fold'. All values are expressed as mean \pm SD and represent the average of 3 independent experiments. Statistical difference by ANOVA: $p \leq 0.05$. Bt-S = Biotin sufficient; Bt-D = biotin deficient.



PEPCK and BPL, whose transcripts showed similar changes by microarray analyses (fig. 3b). These changes were reversed when biotin was administered to the worm (fig. 3b). Thus, in the biotin-deficient *C. elegans*, as in *R. norvegicus*, transcripts of genes for glucose utilization and for fatty acid synthesis were reduced, whereas several for fatty acid oxidation and glucose production were augmented.

Effects of Biotin Starvation on Yeast Metabolic Transcripts

S. cerevisiae differs importantly from the above-studied eukaryotes in that glucose is the preferred carbon source; when available, genes for the use of other carbon sources and for respiration (TCA cycle and oxidative phosphorylation) are repressed and its metabolism is fermentative-respiratory [28]. It is interesting that the capacity of modern yeast living in fruits, to rapidly convert glucose into ethanol through pyruvate, seems to have been selected at the time when fleshy fruits arose in the Cretaceous age, after the rise in angiosperms appeared about 125 million years ago, providing them with ethanol as a defense against many other microorganisms that cannot grow in this alcohol [29]. In the biotin-starved yeast (but with plenty of glucose available) the gene sets for glucose metabolism, TCA cycle and fatty acid oxidation-glyoxylate cycle were upregulated (table 1); however, it should be noted that the KEGG gene set of glucose metabolism includes genes both for its utilization and its production (table 2c). With regard to glucose use, transcripts for low-affinity glucose transport (HXT1 transporter, table 2c) and phosphorylation [the mRNA for hexokinase 2 (HXK2) determined by qRT-PCR, fig. 3c]

were diminished, whereas those for high-affinity glucose transport and phosphorylation (HXT2 and HXK1) were increased (fig. 3c; table 2c). The low glucose affinity hexokinase 2 (HXK2) is the orthologue of mammalian liver GK [30]. Transcripts for other glycolytic enzymes did not change, although those for the regulatory 6-phosphofructo-2-kinase were increased. There was an elevation of transcripts for pyruvate carboxylase 1 (PYC1) and for two subunits of pyruvate dehydrogenase (PDB1, PDX1 as well as for several TCA cycle enzymes: citrate synthase (CIT1 and 3), isocitrate dehydrogenase (IDP1, 2 and 3), succinyl-CoA lyase (LSC2), succinate dehydrogenase (SDH3 and 4) and fumarase (FUM1) (table 2c). Transcripts for the lipogenic genes ACC1, FAS1 and FAS2 were decreased, whereas those for several genes for fatty acid oxidation (PXA2, FAA2, POX1, FOX2 and POT1) and glyoxylate pathway (CIT2, ICL1 and MLS1) were augmented, as were transcripts for gluconeogenic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK1). Some of the observed DNA microarray changes were then tested by quantitative measurements in their mRNAs by qRT-PCR. They corresponded to the genes for hexokinase 2 (HXK2), isocitrate lyase (ICL1), succinyl-CoA lyase (CIT3), PCK1, glucose transporter 2 (HXT2) and BPL (fig. 3c). When biotin was given to biotin-deficient yeasts, their mRNA levels were restored.

Metabolic Effects of Biotin Starvation

Although many studies on the effects of biotin deficiency on key glycolytic and gluconeogenic genes have been reported in the past decades, it is still not known what, if any, may be their metabolic consequences. Thus, we compared some metabolic effects of the vitamin defi-

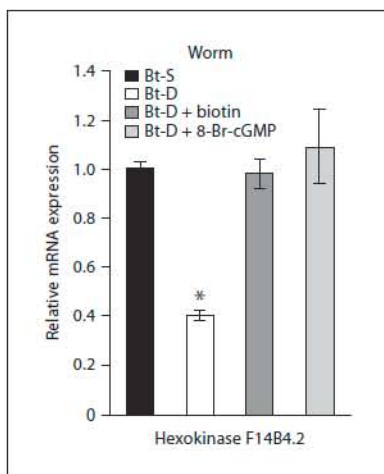


Fig. 5. Effect of cGMP on hexokinase (F14B4.2) mRNA level in biotin-starved worms. Results are mean \pm SD and represent the average of 3 independent experiments. Statistical difference by ANOVA: $p \leq 0.05$. Bt-S = Biotin sufficient; Bt-D = biotin deficient.

ciency related to cellular glucose utilization (fig. 4a). Glucose consumption was measured only in yeast, where it was found to be diminished. In all 3 species, the glycolytic/fermentative flow was presumably reduced, as indicated by diminished concentrations of lactate in rat and worm, and ethanol in yeast (fig. 4b).

Discussion

Beyond the previously known effects of biotin on the expression of GK and PEPCK in the rat, we found that its deficiency has extensive effects on many other carbon metabolism genes that tend to follow a coherent although paradoxical pattern. Because of profound metabolic differences with rat and worm, yeast results will be discussed separately. In spite of abundant glucose provision, in the rat and worm the expression of fatty oxidation and gluconeogenic genes was augmented, and the transcripts for glucose utilization and lipogenesis were diminished in biotin starvation. These transcriptomic data may conceivably lead to a diminished uptake of glucose, decreased carbon flux through glycolysis and lipogenesis, and increased flow through gluconeogenesis in biotin starvation.

Glucose being the preferred carbon source in yeast, when available it operates a complex carbon catabolite

repression system [31]. *S. cerevisiae* produces ATP mostly by fermentation but conserving an aerobic metabolism with a downregulated but still active respiration (TCA cycle and oxidative phosphorylation), a phenomenon known as Crabtree effect [32]. Depending on glucose availability, transporters and hexokinases differing in their affinity for glucose are differentially expressed. In high glucose, the genes for low-affinity proteins are the most active ones whereas the high-affinity ones are repressed [33].

Paradoxically, the transcripts for high glucose affinity were the ones increased on biotin starvation despite abundant glucose availability (table 2c). Thus, as in rat and worm, these yeast results are contrary to expectation. Similarly, the enrichment of TCA cycle (table 1) was unforeseen, since due to the Crabtree effect, it was expected to be reduced in high glucose. Together with the increase of transcripts for fatty acid oxidation and diminished ones for their synthesis, it is evident that changes in carbon metabolism genes in yeast follow a similar logic as in rat and worm.

It has been reported that the effect of biotin on liver GK is preceded by a rise of soluble guanylate cyclase and its product cGMP [34], and is reproduced by the analogue 8-bromo-cGMP, in rat primary hepatocyte cultures, requiring the presence of insulin [35]. Interestingly, biotin stimulates synthesis of insulin receptor at the translation level, an effect mediated by soluble guanylate cyclase, cGMP and a cGMP-dependent protein kinase (PKG) [36]. Thus, these signaling molecules may intervene in our results. Indeed, when we added 8-bromo-cGMP to biotin-deficient *C. elegans*, the biotin-responsive hexokinase F14B4.2 was increased (fig. 5).

These results are more striking since they occurred in 3 very distantly related organisms whose common ancestor existed more than 1,000 million years ago, pointing towards a strongly selected role of biotin (or biotin-dependent processes) in the control of carbon metabolism and in adaptation to the variable availability of carbon. This proposition is reinforced, on one hand, by the many reported similarities between biotin and insulin in both rats and humans [37, 38], and, on the other, by the failure to adapt to CO₂ deprivation of the biotin-deficient plant *Arabidopsis thaliana* [39, 40].

Acknowledgements

We thank Cristina Fernández-Mejía and Silvestre Frenk for discussions, Marni J. Falk and Zhe Zhang for help with Gene Set Enrichment Analysis, and Stephen Cederbaum, Alicia González-

Manjarrez and Juan Miranda for critical review of the manuscript. We also thank Rosa Navarro, Vincent Phalip and John E. Cronnan for supplying *C. elegans*, *S. cerevisiae* and *E. coli* strains, respectively, Salvador Uribe and Sergio Encarnación for providing laboratory facilities and Emmanuel Salazar for technical as-

sistance, and Antonio Peña for glucose consumption determinations. This work was supported in part by grants from DGAPA/PAPIIT (IN225508-3) of the Universidad Nacional Autónoma de México, and from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (57597).

References

- Lynen F: The role of biotin-dependent carboxylations in biosynthetic reactions. *Biochem J* 1967;102:381–400.
- Jitrapakdee S, Wallace JC: The biotin enzyme family: conserved structural motifs and domain rearrangements. *Curr Protein Peptide Sci* 2003;4:217–229.
- Pronk JT, van der Linden-Beuman A, Verdun C, Scheffers WA, van Dijken JP: Propionate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for the metabolon hypothesis. *Microbiology* 1994;140:717–722.
- Cronan JE Jr, Wallace JC: The gene encoding the biotin-apoprotein ligase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 1995;130:221–230.
- Rodríguez-Melendez R, Cano S, Mendez ST, Velázquez A: Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J Nutr* 2001;131:1909–1913.
- Pacheco-Alvarez D, Solorzano-Vargas RS, Gonzalez-Noriega A, Michalak C, Zemleni J, Leon-Del-Rio A: Biotin availability regulates expression of the sodium-dependent multivitamin transporter and the rate of biotin uptake in HepG2 cells. *Mol Gene Metab* 2005;85:301–307.
- Pirner HM, Stolz J: Biotin sensing in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a conserved DNA element and requires the activity of biotin-protein ligase. *J Biol Chem* 2006;281:12381–12389.
- Chauhan J, Dakshinamurti K: Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* 1991;266:10035–10038.
- Dakshinamurti K, Li W: Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1994;132:127–132.
- Dakshinamurti K: *Vitamin Receptors: Vitamins as Ligands in Cell Communication*, ed 1. Cambridge, Cambridge University Press, 1994.
- Ilyndjian PB: Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:27–42.
- Matschinsky FM: Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:399–416.
- Hanson RW, Reshef L: Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* 1997;66:581–611.
- Rodríguez-Fuentes N, López-Rosas I, Román-Cisneros G, Velázquez-Arellano A: Biotin deficiency affects both synthesis and degradation of pyruvate carboxylase in rat primary hepatocyte cultures. *Mol Genet Metab* 2008;92:222–228.
- Praul CA, Brubaker KD, Leach RM, Gay CV: Detection of endogenous biotin-containing proteins in bone and cartilage cells with streptavidin systems. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:312–314.
- Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL: A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 1990;18:3091–3092.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP: Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15545–15550.
- Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25:402–408.
- Bergmeyer HU: *Methods in Enzymatic Analysis*, ed 2. Weinheim, Verlag Chemie, 1974.
- Grad LI, Lemire BD: Mitochondrial complex I mutations in *Caenorhabditis elegans* produce cytochrome c oxidase deficiency, oxidative stress and vitamin-responsive lactic acidosis. *Hum Mol Genet* 2004;13:303–314.
- Sanchez NS, Calahorra M, Gonzalez-Hernandez JC, Pena A: Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2006;23:361–374.
- Bergmeyer HU, Beutler HO: Ethanol; in Bergmeyer HU (eds): *Methods in Enzymatic Analysis*, ed 3. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, 1984, pp 598–606.
- McKay RM, McKay JP, Avery L, Graff JM: *C. elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. *Dev Cell* 2003;4:131–142.
- Foufelle F, Ferre P: New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* 2002;366:377–391.
- Henderson ST, Bonafe M, Johnson TE: daf-16 protects the nematode *Caenorhabditis elegans* during food deprivation. *J Gerontol* 2006;61:444–460.
- McElwee JJ, Schuster E, Blanc E, Thornton J, Gems D: Diapause-associated metabolic traits reiterated in long-lived daf-2 mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 2006;127:458–472.
- de Jong-Gubbels P, Bauer J, Niederberger P, Stuckrath I, Kotter P, van Dijken JP, Pronk JT: Physiological characterisation of a pyruvate-carboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* mutant in batch and chemostat cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998;74:253–263.
- Johnston M: Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet* 1999;15:29–33.
- Thomson JM, Gaucher EA, Burgan MF, De Kee DW, Li T, Aris JP, Benner SA: Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nat Genet* 2005;37:630–635.
- Mayordomo I, Sanz P: Human pancreatic glucokinase (GlbK) complements the glucose signalling defect of *Saccharomyces cerevisiae* hxx2 mutants. *Yeast* 2001;18:1309–1316.
- Gancedo JM: Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:334–361.
- van Dijken JP, Weusthuis RA, Pronk JT: Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1993;63:343–352.
- Ozcan S, Johnston M: Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999;63:554–569.
- Vesely DL: Biotin enhances guanylate cyclase activity. *Science* 1982;216:1329–1330.
- Spence JT, Koudelka AP: Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1984;259:6393–6396.
- De La Vega LA, Stockert RJ: Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C2037–C2042.
- Reddi A, DeAngelis B, Frank O, Lasker N, Baker H: Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci* 1988;42:1323–1330.
- Zhang H, Osada K, Maebashi M, Ito M, Komai M, Furukawa Y: A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1996;42:517–526.
- Che P, Wurtele ES, Nikolau BJ: Metabolic and environmental regulation of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2002;129:625–637.
- Che P, Weaver LM, Wurtele ES, Nikolau BJ: The role of biotin in regulating 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2003;131:1479–1486.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

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

A heuristic model for paradoxical effects of biotin starvation on carbon metabolism genes in the presence of abundant glucose

Antonio Velazquez-Arellano*, Daniel Ortega-Cuellar, Armando Hernandez-Mendoza, Elizabeth Moreno-Arriola

Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, and Instituto Nacional de Pediatría, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2010

Received in revised form 25 August 2010

Accepted 26 August 2010

Available online 24 September 2010

Keywords:

Biotin

Yeast

Saccharomyces cerevisiae

Nematode

Caenorhabditis elegans

Rat

Rattus norvegicus

Glucose

Fatty acid

β -oxidation

Gluconeogenesis

Glycolysis

Fermentation

ATP

AMPK

Snf1

Microarrays

SREBP-1c

ChREBP

NAMPT

PGC-1 α

mTORC1

Adr1

Cat8

Sip4

Mig1

HXX2

Rgt1

Insulin pathway

Adiponectins

JAK/STAT pathway

Carbon metabolism

Insulin resistance

Anaplerosis

Pyruvate carboxylase deficiency

Aspartate

ABSTRACT

We recently showed that in biotin starvation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, nematode *Caenorhabditis elegans* and rat *Rattus norvegicus*, despite abundant glucose provision, the expression of genes for glucose utilization and lipogenesis were lowered, and for fatty acid β -oxidation and gluconeogenesis were raised, and glycolytic/fermentative flow was reduced. This work explored the mechanisms of these results. We show that they are associated with ATP deficit and activation of the energy stress sensor AMP kinase (AMPK; Snf1 in yeast). Analysis of microarray results revealed extensive changes of transcripts for signal transduction pathways and transcription factors AMPK, SREBP-1c, ChREBP, NAMPT, PGC-1 α , mTORC1 in rat, and their homologs in worm. In yeast the altered factor transcripts were Adr1, Cat8, Sip4, Mig1, HXX2, and Rgt1. The insulin pathway was negatively enriched (in rat and worm), whereas the adiponectins and JAK/STAT pathways were increased (present only in the rat; they activate AMPK). Together, all these changes explain the effects of biotin starvation on glucose utilization, energy status and carbon metabolism gene expression in a coherent manner across three phylogenetically distant eukaryotes and may have clinical significance in humans, since the effects are reminiscent of insulin resistance. We propose a general model for integrating these results in regulatory circuitries, according to the biology of each species, based on impaired anaplerosis due to pyruvate carboxylase deficiency, that have a basic underlying logic. In a preliminary test in yeast, aspartate corrects all the alterations produced by biotin starvation.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: velare@servidor.unam.mx (A. Velazquez-Arellano).

1. Introduction

We recently showed that the vitamin biotin has extensive effects on many carbon metabolism genes that follow a coherent although paradoxical pattern, across three very different eukaryotes (yeast *Saccharomyces cerevisiae*, nematode *Caenorhabditis elegans* and rat *Rattus norvegicus*) [1]. In biotin starvation, in spite of abundant glucose provision, the expression of several genes for glucose utilization and lipogenesis were lowered, and some for fatty acid β -oxidation and gluconeogenesis were raised. When we explored some of their metabolic consequences, in all three species glycolytic/fermentative flow was reduced, as indicated by diminished glucose consumption in yeast and low concentrations of lactate in rat and worm, and ethanol in yeast [1].

Biotin's best known function is in the transfer of carboxyl moieties, as the prosthetic group of pyruvate, 3-methylcrotonyl CoA, propionyl CoA and acetyl CoA carboxylases (PC, MCC, PCC and ACC, respectively) [2]. These enzymes catalyze important steps of central carbon metabolism. PC and PCC are important for TCA cycle anaplerosis; PC for gluconeogenesis; ACC for fatty acid synthesis; and MCC and PCC for amino acid catabolism. In lower eukaryotes, like the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, PCC and MCC are not present [3]. Thus, the above-mentioned effects of biotin starvation on carbon metabolism genes may have resulted from changes in the catalytic activity of biotin-dependent enzymes (biotin as cofactor). However, biotin also has regulatory roles as in the control of the *bio* operon in *Escherichia coli* [4] and in yeast and rat (biotin as signal). Indeed, it has previously been shown that biotin affects the genetic expression of several liver enzymes of carbohydrate metabolism [5]; in the case of liver glucokinase (GK) it was shown that cGMP participates in the regulatory effect of this vitamin [6].

Here we show that biotin effects on carbon metabolism gene expression are associated with changes in cellular energy status and in several signal transduction pathway adjustments. These findings were roughly equivalent in the three distant eukaryotes: rat, nematode and yeast. We propose a heuristic model, including some evidence for it, by which TCA cycle-derived ATP production is reduced as a consequence of impaired anaplerosis, with extensive genomic effects resulting from activation of the energy stress sensor AMP kinase (AMPK). Our findings may have implications for human energy management disorders.

2. Methods and materials

2.1. Biotin deficient organisms

Biotin deficient rats were obtained as follows: five male rats (Wistar strain), aged 21 days and 50 g of weight were made biotin-deficient and other five rats, of similar gender, age and weight, served as controls (biotin-sufficient). Biotin deficiency was induced by feeding them with a commercial biotin-deficient diet containing 30% of egg white as a source of avidin (TD.81079 ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland, OH). The control animals were fed with the same diet supplemented with 4 mg biotin per kg (TD.02458 ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland, OH). Each rat was housed individually in an air-filtered cage on 12 h light/dark cycles and was allowed free access to water. Sufficient and deficient rats were sacrificed at 6–7 weeks; at this time, all biotin-deficient rats had developed features of biotin deficiency previously described [7]. To analyze the recovery of the biotin deficiency effects, five biotin-deficient rats were injected intraperitoneally with biotin (1 mg/kg of body weight, B4639, $\geq 99\%$, powder from Sigma-Aldrich) or with saline solution (control) and then sacrificed at 0 and 24 h by decapitation before isolation of the liver, in liquid nitrogen and were stored at -70°C before utilization.

C. elegans strain N2 was made biotin-deficient by feeding nematodes synchronized at the L1 stage, with an overnight culture of biotin auxotrophic *E. coli* (MG1655bioB:kan, kindly donated by Dr. John E. Cronan, University of Illinois, Urbana) grown in minimal medium (MM) with 5.0 and 0.05 nM of biotin (sufficient and deficient, respectively). To generate a more profound deficiency in worms, avidin (1 U/ml; one avidin unit is the amount required to bind 1 μg biotin) was added at each condition; this amount is enough to trap biotin in the deficient but not in the sufficient media. In the experiments of biotin replacement, deficient worms were re-plated with biotin auxotroph *E. coli* that had been grown in 5.0 nM biotin-containing medium; they were harvested at 0 and 4 h afterwards.

For biotin-deficient cultures of yeast, *S. cerevisiae* (strain W303A) was grown in synthetic minimal media (SD) containing 2% glucose as carbon source, with biotin 0.4 or 8.0 nM (biotin-deficient and -sufficient respectively). After defined times after inoculation (0 and 2 h) biotin (8.0 nM) or aspartate (25 mM) were added.

Biotin deficiency was confirmed in the three organisms by streptavidin western blots, as already described [1].

2.2. Measurements of metabolite concentrations

The concentrations of ATP, ADP and NAD^+ in the three organisms were directly measured as described in [8]. The acid extracts were obtained as in [8–10]. Briefly, approximately 20 mg wet weight of each organism was ground in a nitrogen-chilled mortar and collected in perchloric acid solution (0.6 M in 20 mM EDTA). Extracts were deproteinized by centrifugation after 30 min incubation on ice and then neutralized with KOH 4 M. The concentration of nucleotides was measured spectrophotometrically and detected within the linear range. Each extract was assayed for nucleotide content in triplicate.

Finally, glucose consumption and ethanol production by yeast were measured according to Bergmeyer [8] and Beutler [11], respectively. Briefly, equal amounts of wet weight (500 mg) of yeast from exponential growth cultures were added to 10 mM MES-TEA buffer pH 6.0 containing 60 mM glucose in 3 ml and incubated at 30°C during 30 min. Glucose was measured in the supernatant based by the method of glucose oxidase, using the Glucose (GO) Assay Kit (GAGO-20, Sigma); ethanol was measured by the addition of NAD^+ and alcohol dehydrogenase.

2.3. Oxygen consumption

Oxygen consumption rates for the three organisms was measured by Clark-type oxygen electrode, as previously described [9,10,12] respectively. Briefly, whole organisms, worms (approximately 1000) and yeast (25 mg wet weight), were resuspended in 1 ml of buffer M9 and MES-TEA (pH 6) buffers, respectively, transferred into a chamber, and respiration was determined at 24°C (worm) and 30°C (yeast) for at least 10 min. Rat liver mitochondria were obtained in SHE buffer, pH 7.3 (sucrose 250 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM) while the extracted protein (0.5 mg/ml) was resuspended in KME buffer pH 7.2 containing (glutamate, malate and NaH_2PO_4 at 5 mM each one). Oxygen consumption rates were measured at 30°C . The slopes of the linear portions of the plots were used to calculate oxygen consumption rates.

2.4. Immunoblot analysis

Samples of the three organisms that had been frozen in liquid nitrogen immediately after extraction, were homogenized with extraction buffer containing 50 mM HEPES, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM β -glycerol phosphate, 0.1% (v/v) Triton X-100, protease inhibitors (Complete, Roche), 50 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 5 mM sodium pyrophosphate, and 0.2 mM PMSF (all from Sigma-Aldrich). Homogenized extracts were

centrifuged at 12,000 ×g for 30 min and 4 °C and supernatants were collected. Protein concentration was determined by Bradford method. Twenty-five micrograms of each protein sample was separated by 10% SDS-PAGE and transferred on PVDF membrane. Antibodies (1:1000 dilutions) against total AMPK and phosphorylated AMPK (Thr172) were obtained from Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY. Detection of proteins was performed using goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2000, Santa Cruz biotechnology) with ECL plus Western blotting detection reagents (Amersham). Protein was determined by the Bradford method using BSA as the standard.

2.5. RNA extraction of three organisms

RNA for microarray analysis from rat liver and worm was extracted with TRIzol method (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For yeast, RNA was extracted with acid phenol according to standard protocols [13]. For the three organisms, RNA was subsequently loaded onto RNA-binding columns from QIAGEN's RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA) to remove contamination with genomic DNA and proteins before further processing.

2.6. Gene array experiments

All procedures were performed at the Boston University Microarray Resource Facility exactly as described in Affymetrix GeneChip Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix, Santa Clara, CA, current version available at www.affymetrix.com). Briefly, the integrity of total RNA for each sample was verified using RNA 6000 Nano Assay RNA chips run in Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Total RNA (5 µg) was reverse transcribed using One Cycle cDNA Synthesis kit (Affymetrix) and the obtained double-stranded cDNA was purified with GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix). The obtained cDNA was used as template for *in vitro* transcription using GeneChip IVT Labeling Kit (Affymetrix). The resulting biotin-labeled cRNA was purified using GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix), fragmented and hybridized (15 µg) to the microarrays GeneChip *C. elegans* Genome Array, GeneChip Yeast Genome 2.0 Array and GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) for 16 h in the GeneChip Hybridization oven 640 at 45 °C with rotation (60 rpm). IVT and cRNA fragmentation quality controls were carried out by running an mRNA Nano assay in the Agilent 2100 Bioanalyzer. The hybridized samples were washed and stained using the Affymetrix fluidics station 450 with streptavidin-R-phycoerythrin, and the signal was amplified using a biotinylated goat anti-streptavidin antibody followed by another SAPE staining (Hybridization, Washing and Staining Kit, Affymetrix). Microarrays were immediately scanned using Affymetrix GeneArray Scanner 3000 7G Plus (Affymetrix). All cell culturing, RNA isolation, and array hybridization steps were performed in parallel, and scanning of hybridized microarrays was performed on the same scanner. Analysis of the data was performed with Affymetrix GCOS 1.4 software by comparing means of signal intensity from RNA samples derived from sufficient and deficient organisms.

Statistical analysis included a *t*-test comparing condition control to condition deficient, False Discovery Rate calculation to control for multiple hypothesis testing and calculation of fold change (expressed as \log_2) value between both conditions. We used these data to produce pre-ordered ranked gene lists from the three organisms' datasets, which were then tested for enrichment by gene set enrichment analysis (GSEA v. 2.0, Broad Institute, Cambridge, MA). Gene sets were generated and modified from biochemical pathway data publicly available from Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (www.genome.jp/kegg).

2.7. Gene expression analysis

RNA was isolated from the three organisms as mentioned above. Complementary DNA was generated by Superscript II enzyme (Invitrogen) and random hexamers (deoxy-NTP₆) (Amersham Bioscience). The analysis was performed by quantitative reverse-transcriptase PCR (qRT-PCR) on ABI PRISM 7700 RealTime PCR machine (Applied Biosystems) using Taqman probes. The level of each target mRNA was examined and normalized to 18S rRNA using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [14]. The efficacies of our reactions were tested by dilution experiments and melting curves.

2.8. Statistical analysis

All experiments were done in triplicate and at least three different times with different samples for each organism. Data are presented as the mean of three different experiments and statistical significance was evaluated by ANOVA, Bonferroni-adjusted comparisons between individual experimental groups were performed as indicated. The significance level was $p = 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. TCA cycle anaplerosis and energy sensing in biotin starvation

A reduced flow through the TCA cycle due to impaired anaplerosis would result in a disrupted energy state (ATP deficit). We indeed found a diminished ATP/ADP ratio, an increase in NAD⁺ and diminished oxygen consumption, results that were normalized when biotin was replenished (Figs. 1A–D). A preliminary test of the anaplerosis hypothesis was performed in biotin-starved yeast by administering aspartate, an amino acid interconverted by transamination to oxaloacetate, a TCA cycle intermediate that is a product of PC, and that has been shown to be anaplerotic in *S. cerevisiae* mutants lacking its two pyruvate carboxylase genes [15,16]. We found that in biotin-deficient yeast aspartate normalizes the ADP/ATP ratio, NAD⁺, and oxygen consumption, as well as glucose uptake and ethanol production in yeast (Figs. 1A–F). The experiment was performed in yeast because its results are less complicated to interpret in this unicellular fungus than in the worm or the rat. Their meaning is most likely that by increasing low levels of oxaloacetate, the presumptive effects of PC deficiency on ATP and carbon metabolism genes, are neutralized. However, the possibility of non-specific effects of aspartate cannot be discarded. Nevertheless, the findings support the anaplerosis hypothesis.

ATP deficit is sensed by AMP kinase (AMPK), a family of crucial sensors and regulators of cellular response to metabolic stresses like glucose and energy deprivation. AMPK is activated by phosphorylation and allosteric modification by AMP in humans, rodents and worms [17,18]. Its homologue in *S. cerevisiae* is the Snf1 protein kinase complex [19]; although it is not affected by AMP but by glucose starvation [17], it is also activated by energy stress and is associated to AMP/ATP ratio *in vivo* changes [20]. Indeed we found that in all three organisms AMPK/Snf1p are activated during biotin starvation, as indicated by their substantially increased phosphorylation, that gets back to control levels after biotin replacement (Fig. 2). When aspartate was added to biotin-starved yeast, Snf1p was dephosphorylated, consistent with the proposed impaired anaplerosis.

3.2. Effects of biotin starvation on signal transduction gene sets

The GSEA analysis of relevant KEGG clusters that changed significantly between biotin-starved organisms and their controls is available in Supplementary Table 1. Expression profiling of the biotin-starved organisms identified multiple alterations in several signal

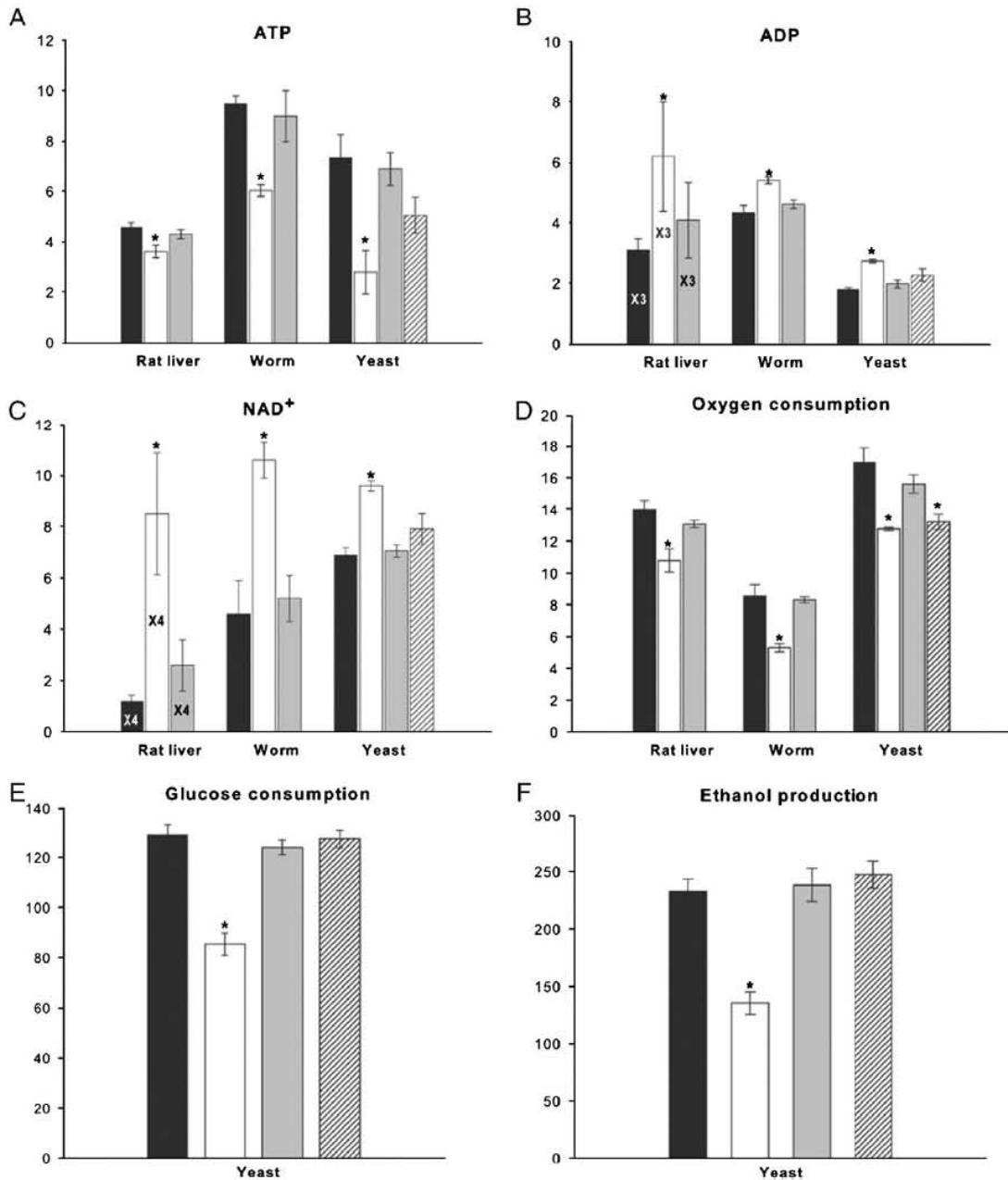


Fig. 1. Biotin modulates glucose utilization in three eukaryotes and can be replaced by aspartate in yeast. All metabolites in rat liver and worm are expressed as nmol/mg protein, whereas for yeast they are expressed in nmol/mg wet weight. ■, biotin-sufficient; □, biotin-deficient; ▒, biotin-deficient plus biotin; ▨, biotin-deficient plus aspartate. When the results were too high to graph, they are shown minimized and are labeled "X-fold". All values are expressed as mean \pm SD and represent the average of three independent experiments. Asterisks indicate statistical difference by ANOVA ($p \leq 0.05$).

transduction pathways in comparison with controls. Table 1 catalogs five KEGG signal transduction pathways that were significantly changed by the deficiency in rat liver. Insulin and TOR pathways were negatively enriched whereas cytokine adiponectins, cytokine receptors and the JAK/STAT pathway were positively enriched in the rat. Since adiponectins induce liver AMPK, probably through the JAK/STAT pathway [21], they may further increase the AMPK master

regulatory effects. Only insulin-like and TOR pathways are expressed in the worm, and both were also negatively enriched (Table 1). In yeast just the TOR pathway is expressed and it did not change in the biotin-starved organisms. However, in *S. cerevisiae* TOR is mainly a sensor of the quality of nitrogen source [22] and therefore these data are not directly relevant to our previously reported findings on the effects of biotin starvation on carbon metabolism gene expression.

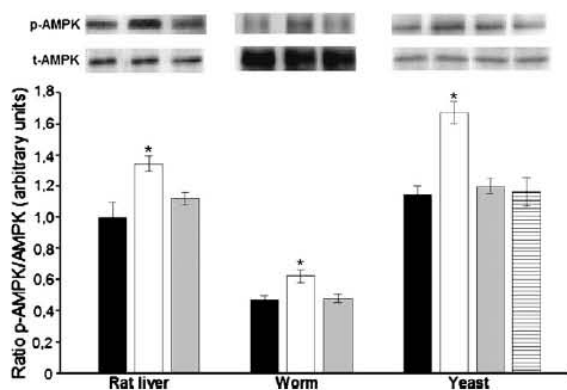


Fig. 2. Biotin starvation increases phosphorylation of AMPK in the three studied eukaryotes. Ratio of amounts of phosphorylated (p-AMPK) versus total AMPK (t-AMPK) determined by densitometry quantization of immunoblots from different experimental conditions: ■ biotin-sufficient, □ biotin-deficient, ▒ biotin-deficient plus biotin, ▨ biotin-deficient plus aspartate. Results are mean \pm SD and represent the average of three independent experiments. Asterisks indicate statistical difference by ANOVA ($p \leq 0.05$).

Individual transcripts for several AMPK-related signaling and transcription factors that changed 2-fold or more are described below, first for rat and worm and then for yeast. The microarray results were confirmed for several of them and are shown in Fig. 3. Transcripts for several AMPK-related signaling and transcription factors changed during biotin deficiency and were normalized when biotin was replenished; they were also reverted in yeast when aspartate was added (Fig. 3). Remarkably, in the biotin-starved rat we found elevated the PRKAA1 transcript that codes for the catalytic $\alpha 1$ isoform of AMPK (Table S1, Fig. 3A); similarly, in the worm one of the transcripts encoding AMPK subunits (aak-2) was increased when this organism was deprived of biotin (Table S1, Fig. 3b). We are not aware of reports on AMPK gene changes in addition to their post-transcriptional phosphorylation on energy stress.

3.3. Transcripts for signaling and transcription factors associated with carbon metabolism gene expression in rat and worm

In the biotin-starved rat liver transcripts for sterol-regulatory-element-binding-protein-1c (SREBP-1c) were diminished (Fig. 3A; Table S1). This transcription factor is known to induce the gene for glucokinase (GK), the first enzyme of glycolysis [23] that has long been known to be induced by biotin [1,5]. It is activated by insulin [24] and diminished by AMPK [25]; since the insulin pathway gene set was negatively enriched (Table 1) and AMPK was activated (Fig. 2) in biotin starvation, these findings likely explain the SREBP-1c change

and the concomitant reduction of GK transcripts. Another transcription factor, ChREBP [26], is required for the induction of L-PK, ACC, FAS and malic enzyme lipogenic genes [27]; it is induced by the combination of SREBP-1c and GK together with "glucose metabolism" (whether it is glucose 6-phosphate, metabolites from the hexosaminidase pathway or other products of glycolysis is currently being debated) [23,28]. The ChREBP transcripts were diminished in the biotin-starved liver (Table 1S), as were those for L-PK, ACC, FAS and malic enzyme, which we had previously found to be reduced in biotin deficiency [1]. All these results may explain our previously reported reduction of transcripts for glucose utilization and lipogenesis despite the animals having been in the immediate post-prandial period, with enough glucose provision [1]. Of the above findings, a consequence of the reduced ACC transcript, together with its diminished activity by its reduced cofactor biotin, may augment fatty acid oxidation, whose mitochondrial transport by carnitine palmitoyl transferase (CPT1) is inhibited by the ACC product, malonyl CoA. We previously reported a paradoxical increase of rat liver transcripts for several fatty oxidation genes [1]. Although its mechanism is not yet completely understood, AMPK activation likely plays a role via a pathway that induces fatty oxidation genes and that involves the nuclear receptor response element-1 (NRRE-1) and the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR) coactivator 1 α (PGC-1 α) (see later).

Similar mechanisms may operate in the biotin-starved worm, although their consequences for carbon metabolism have been less well studied than in rodents and humans. SBP-1 is a worm transcription factor ortholog of the mammalian SREBP-1c [29]; its transcripts were severely decreased in biotin deficiency (Fig. 3B; Table S1), possibly as a consequence of AMPK activation by analogy to mammals. SBP-1 may also induce glucokinase expression, as in the rat, its reduction in biotin deficiency leading to our previously observed repression of *C. elegans* hexokinase F14B4.2 [1]. This proposal is reinforced by the sustained levels of the other worm hexokinases (H25P06.1, Y77E11A.1), which did not change on biotin deficiency [1]. On the other hand, it is known that in *C. elegans* SBP-1 regulates fatty acid synthesis [29,30] by mechanisms that have not yet been investigated, but that could conceivably involve a ChREBP homologue as in the rat. If so, this may explain our previous observation of decreased transcripts for lipogenic malic enzyme, ATP citrate lyase, ACC, FAS, as well as stearoyl-CoA desaturases (Fat-5 and -7) and two enzymes (elo-5 and -6) for fatty acid elongation [1]. As in the rat, in the worm we found elevated transcripts for fatty acid oxidation genes too and, although their mechanisms are not understood yet, they may resemble those proposed for these effects in mammals.

Another effect of AMPK in mammals is the induction of nicotinamide mononucleotide phosphoribosyl transferase (NAMPT), an enzyme that synthesizes NAD^+ [31]; in the biotin-starved rats both the NAMPT transcripts (Fig. S1) and the amount of NAD^+ (Fig. 1D) were increased. NAD^+ is known to activate mammalian SIRT1

Table 1
Biotin deficiency modifies gene transcript sets of signaling pathways in rat, worm and yeast.

Signaling pathways	Rat liver				Worm				Yeast			
	N	NES	p-val	FDR	N	NES	p-val	FDR	N	NES	p-val	FDR
Insulin pathway	97	-1.23	0.13	0.236	30	-1.46	0.074	0.12	NA	NA	NA	NA
TOR pathway	28	-1.29	0.15	0.223	19	-1.51	0.054	0.11	14	1.25	0.53	0.37
Adipocytokine pathway	53	1.83	0.00	0.01	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cytokines receptor	70	1.68	0.00	0.03	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
JAK-STAT signaling pathway	68	1.40	0.04	0.16	6	0.85	0.685	0.72	NA	NA	NA	NA

N, number of genes in each gene set; NES, normalized enrichment score (likelihood genes comprising a given cluster are overrepresented at a given end of the rank list); FDR, q-value, false discovery rate; p-val, p-value; NA, non applicable. Positive enrichment (biotin-deficient set with more transcripts with a higher ranking than the control) is depicted in black; negative enrichment (more transcripts with a lower ranking) in bold. The genes were ranked according to \log_2 of differences between deficient and sufficient states. This ranking was then used in modified gene set enrichment analysis (GSEA) for cluster analysis. Gene sets were curated from biochemical pathway data publicly available from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG); clusters composition is described in Supplementary Table 2. Results are from three independent experiments for each experimental condition.

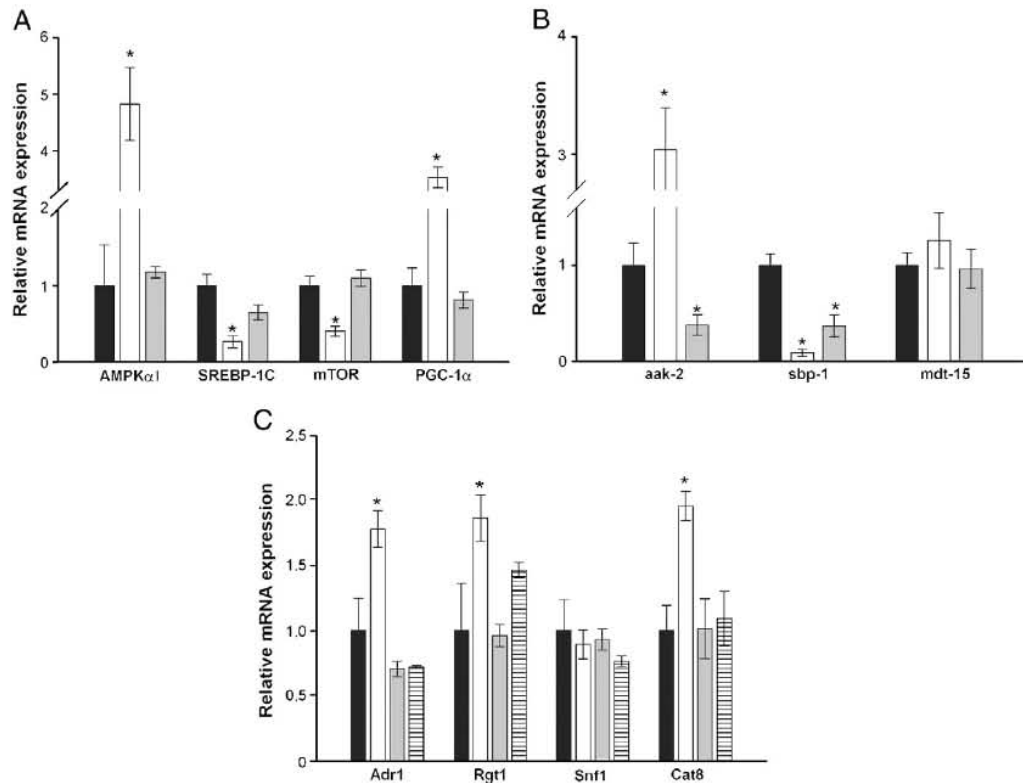


Fig. 3. Biotin-starvation changes of selected transcripts were confirmed by RT-qPCR and were reversed by this vitamin replacement in the three species, and by aspartate in yeast. A) *R. norvegicus*, B) *C. elegans* and C) *S. cerevisiae*. ■: biotin-sufficient, □: biotin-deficient, ▒: biotin-deficient plus biotin, ▨: biotin-deficient plus aspartate. AMPK α 1 and aak-2: AMP-activated protein kinase, SREBP-1c and sbp-1: sterol-regulatory-element-binding-protein 1C, mTOR: mammalian target of rapamycin, PGC-1 α : peroxisome-proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α , mdt-15: mediator subunit orthologous to human MED15, Adr1: alcohol dehydrogenase regulator, Rgt1: restores glucose transport, Snf1: sucrose non fermenting, Cat8: catabolite repression. Results are mean \pm SD and represent the average of three independent experiments. Asterisks indicate statistical difference by ANOVA ($p \leq 0.05$).

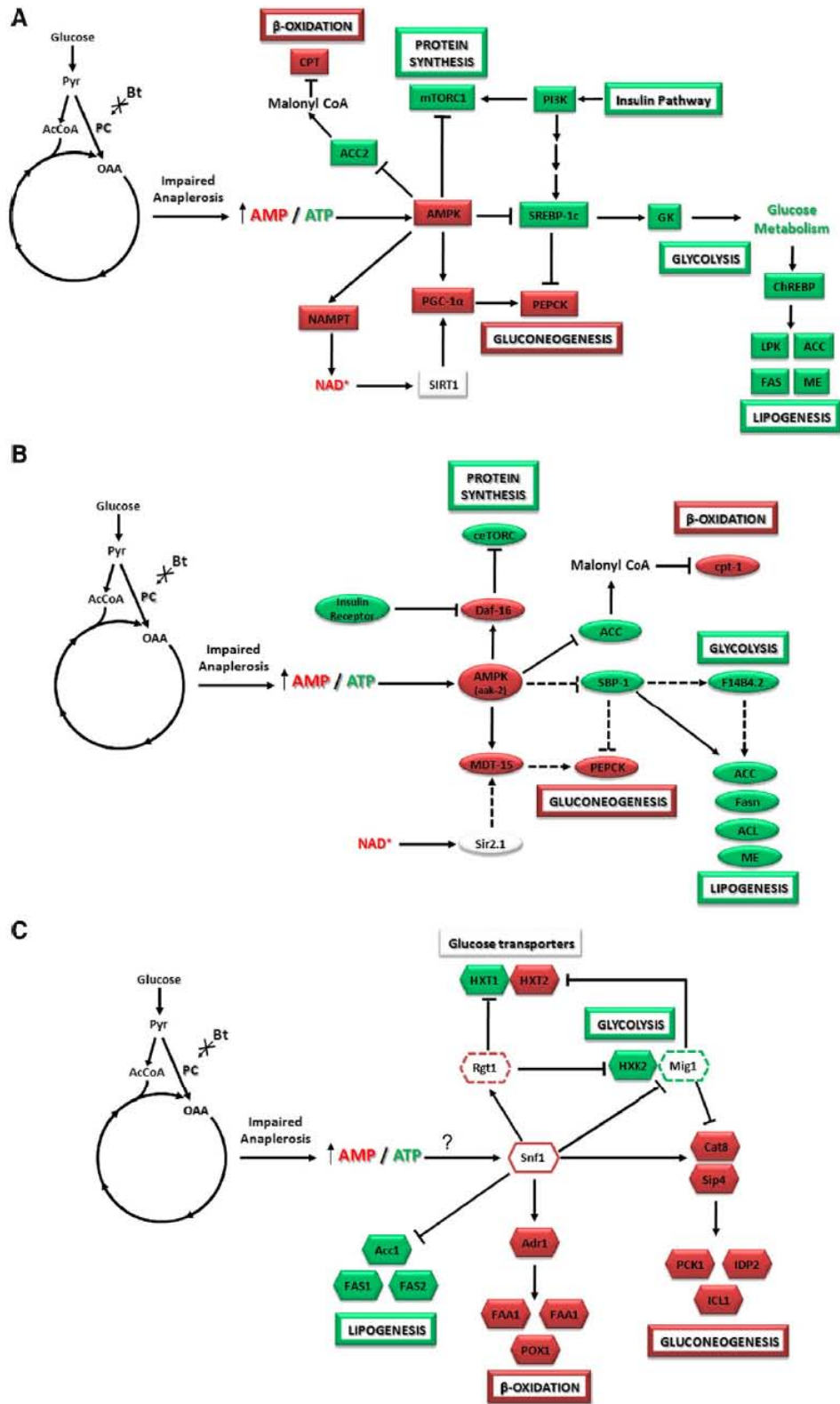
acetylase [32] which is known to trigger the activity of targets that include the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR) coactivator 1 α (PGC-1 α) [32], that in turn increases the PEPCK gene transcription [32]. Although SIRT1 gene expression did not change, we found that the PGC-1 α transcript was augmented in biotin-deficient rat liver (Fig. 3A, Table S1), presumably as a consequence of an increased sirt1 enzymatic activity. This may explain the previously reported increased transcription of the PEPCK gene [1]. This finding would also result from the known AMPK-induced release of the SREBP-1c inhibition of PGC-1 α transcription [33]. Thus, these mechanisms may play a pivotal role in the original findings of Dakshinamurti [5,34] of the effects of biotin on GK and PEPCK gene transcription. As stated above, they may also help explain how AMPK activation induces fatty acid oxidation gene transcripts through deacetylation and activation of PGC-1 α [32,35], and via the steroid/thyroid family of nuclear receptors, including PPAR, by interacting at a well-characterized response element known as the nuclear receptor response element-1 (NRRE-1) [36]. In *C. elegans* Sir2.1 gene, the NAD⁺-respondent ortholog of the mammalian SIRT-1 [37], also was not over expressed, but we found an increase in the expression of MDT-15 transcript in the worm (Fig. 3B), which codes for a transcriptional coactivator functionally analogous to the mammalian PGC-1 α coacti-

ator [38], thus also probably helping to explain the increased transcription of the PEPCK gene in the worm [1].

3.4. Effects of biotin starvation on TOR pathway

Another major transducer of cellular nutrient levels in eukaryotes is TOR (mTOR in mammals); TOR proteins are protein kinases [39]. The mTOR complex 1 (mTORC1) is inhibited by AMPK during ATP shortage by phosphorylating the mTOR binding partner, raptor [40], preventing protein synthesis [41] and cell growth. Although we did not study the proteins themselves, the mTOR gene set and the transcript for the TOR protein were unexpectedly depressed in the biotin-deficient rat liver (Table 1, Fig. 3A), a finding reminiscent of the AMPK transcript increase in addition to this kinase post-transcriptional activation by the ATP deficit. To our knowledge, these transcriptomic findings have not been reported before and it is not clear how they are mediated. Similarly, in *C. elegans* with biotin shortage the ceTOR gene set was diminished (Table 1); in this organism energy stress-derived ceTOR genetic changes have been previously reported [42] and thus they may result from AMPK activation, as in rat. Since it is well known that mTOR and ceTOR activate protein synthesis, their changes in biotin starvation

Fig. 4. Biotin starvation reveals regulatory circuitries in the three studied organisms. A) *R. norvegicus*, B) *C. elegans* and C) *S. cerevisiae*. Impaired anaplerosis, caused by biotin deficiency, augments AMP/ATP ratios that stimulate AMP-activated protein kinase (AMPK, aak-2 and Snf1p in rat, worm and yeast respectively), triggering genomic changes in signaling pathways that affect concerted expression of carbon metabolism genes. Arrows indicate stimulatory pathways, capped lines indicate inhibitory effects while dotted lines indicate conjecture. Red color means increased transcripts; green means decreased transcripts and white, no change transcripts.



may have been reflected in the impaired growth phenotypes of both rat and worm [1].

3.5. Yeast signaling transcripts

Although many yeast signaling proteins have been conserved along eukaryotes, because of its unicellular condition, lower complexity and special metabolic needs, regulatory genomic circuitries are somewhat different in yeast from multicellular animals. More precisely, in yeast glucose is by far the preferred carbon source and when it is available, besides operating a complex carbon catabolite repression system [43], *S. cerevisiae* produces ATP mostly by fermentation while conserving an aerobic metabolism with respiration and a down-regulated but moderately active TCA cycle, a phenomenon known as the Crabtree effect [44]. It is very similar to that known as “aerobic glycolysis” or the Warburg phenomenon shown by cancer cells in higher animals [45].

We found increased transcripts of Adr1, Cat8 (Fig. 3C) and Sip4 transcription factors, which are induced by Snf1, the yeast AMPK homolog that is activated by glucose starvation [46] and that we found phosphorylated (active) in biotin deficiency (Fig. 2), in spite of glucose abundance. Adr1 augments the expression of several genes for fatty acid oxidation (POT1, POX1, FAA1, CTA1, PEX2; see Table S1c), whereas Cat8 and Sip4 have similar effects on gluconeogenesis genes [46]. Thus, they may explain our paradoxical observations of higher transcripts for these two metabolic processes in yeast on high glucose. It is also known that Snf1 activates the Rgt1 transcription factor and represses the transcription factor Mig1, both post-transcriptionally [46]. Remarkably, the Rgt1 mRNA during biotin deficiency was increased (Fig. 3). Rgt1 diminishes the expression of the glucose transporter HXT1 and the hexose HXK2 (which is the ortholog of mammalian liver glucokinase [47]), both of which have low affinity for glucose and are active at high concentrations of this sugar, while were in fact repressed [48]. With abundant glucose Mig1, association with HXK2, represses the high affinity glucose transporter HXT2 (active in low glucose) [46]. The unexpected high transcripts for HXT2 that we found in biotin starvation with high glucose may therefore result from Snf1 inactivation of Mig1. It is noteworthy that Mig1 represses both Cat8 and Sip4 [49]; this effect is probably absent in biotin deficiency because active Snf1 in turn inactivates Mig1 [19]. Summing up, although yeast responds quite differently from worm and rat to glucose availability changes, stress-induced Snf1 activation leads to carbon metabolism gene changes whose effects are similar to the ones observed in the two other biotin-starved organisms.

In contrast to the two metazoans, TORC1 did not change in the biotin-starved yeast. It is noteworthy that TOR is not under Snf1 control, but is mainly a sensor of the quality of nitrogen source in *S. cerevisiae* [22], although it inhibits Snf1 [50]. An analogous effect has been observed in mammals where S6 kinases 1 and 2 (S6K1/2), transducing nutritional anabolic signals mediated by mTOR [51], activate AMPK in association with increased AMP/ATP ratio [52].

3.6. The model

Following Theodosius Dobzhansky's *dictum* that “nothing in Biology can be understood but in the light of Evolution”, in this article and in the previous one we showed that in three different eukaryotes, despite their phylogenetic lines having diverged over 1000 million years ago, biotin starvation reduces glucose consumption and energy production. This occurs despite sufficient glucose provision, accompanied by reduction of transcripts for glucose utilization and lipogenesis, while raising and changing of several for fatty acid oxidation and gluconeogenesis, and change in the genetic expression of several signal transduction proteins and transcription factors, probably with similar changes in carbon metabolism flows.

In particular, the above-mentioned genomic effects of biotin starvation might be related to TCA cycle disturbance caused by anaplerosis impairment, since this process is catalyzed by two biotin-dependent carboxylases (PC and PCC, mainly the former). It is well known that carboxylase activities, including PC and PCC, are severely reduced in symptomatic biotin-deficient organisms. We confirmed their deficiency by streptavidin western blots that reveal holocarboxylases and by DNA microarrays; the data appears in our previous article [1]. Other biotin related functions, like gluconeogenesis, fatty acid synthesis or acyl CoA's catabolism, are not straightforwardly related to our observed changes in carbon metabolism genes nor in glucose consumption. ACC catalyzes one of the main steps of fatty acid synthesis and its deficiency could conceivably contribute to an increase of fatty acid oxidation, but it is not immediately apparent how it could affect the carbon metabolism transcripts.

In order to help explain this paradox, based on our results and on published information, we are proposing a heuristic model for integrating these results in regulatory circuitries, whose details vary according to the biology of the species (Fig. 4). This model is intended to devise experimental tests that may clarify the multiple metabolic and signaling effects of biotin starvation described above. The underlying logic consists of the cellular response to energy stress, activation of a sensor and master switch that triggers several signal transduction pathways affecting a number of transcription factors, with the end result of extensive changes in the expression of carbon metabolism genes. The model has to be put to stringent experimental test, but its concordance with reality is suggested by correction of the metabolic and transcriptomic alterations in yeast when adding aspartate, the oxaloacetate precursor, to biotin-starved cells (Figs. 1, 2 and 3C). By proposing this model we are assuming that most of these global effects result from changes in biotin-containing enzymes rather than from a regulatory activity of biotin itself (as documented for processes directly delivered by biotin, like changes in *E. coli* BIO operon [4]). Tests may include knocking down the anaplerotic genes, especially pyruvate carboxylase. On the other hand, it has been shown that biotin affects liver glucokinase genetic expression through changes in the levels of cGMP, resulting from soluble guanylate cyclase (sGC) activation and phosphorylating cGMP-dependent protein kinase (PKG) [6], an effect that requires carbohydrate metabolism. More recently, it was shown that sGC is an ATP sensor “coupling nitric oxide signaling to cell metabolism” in endothelial cells [53]. Whether a similar mechanism operates in hepatocytes must have to be explored in the future.

These findings provide a fresh insight into the role of the TCA cycle, and particularly of anaplerosis, in cellular energy status and the concomitant genomic adaptations, and thus have important implications for better understanding human energy disorders. In particular, several of the biotin starvation effects are reminiscent of insulin resistance.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.ymgme.2010.08.021.

Acknowledgments

We thank Silvestre Frenk for the critical review of the manuscript. We also thank Rosa Navarro, Vincent Phalip and John E. Cronan for supplying *C. elegans*, *S. cerevisiae* and *E. coli* strains respectively. Karla Carvajal (KC) and Antonio Peña provided invaluable advice and laboratory facilities; KC's help for determining AMPK status was extremely important. This work was supported in part by grants from DGAPA/PAPIIT (IN225508-3) of the Universidad Nacional Autónoma de México, and from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (57597).

References

- [1] D. Ortega-Cuellar, A. Hernandez-Mendoza, E. Moreno-Arriola, K. Carvajal-Aguilera, V. Perez-Vazquez, R. Gonzalez-Alvarez, A. Velazquez-Arellano, Biotin starvation with adequate glucose provision causes paradoxical changes on fuel metabolism gene expression, similar in rat (*Rattus norvegicus*), nematode (*Caenorhabditis elegans*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* 3 (2010) 18–30.
- [2] F. Lynen, The role of biotin-dependent carboxylations in biosynthetic reactions, *Biochem. J.* 102 (1967) 381–400.
- [3] J.T. Pronk, A. van der Linden-Beuman, C. Verduyn, W.A. Scheffers, J.P. van Dijken, Propionate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for the metabolon hypothesis, *Microbiology (Reading, England)* 140 (1994) 717–722.
- [4] J.E. Cronan Jr., The *E. coli* bio operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme, *Cell* 58 (1989) 427–429.
- [5] J. Chauhan, K. Dakshinamurti, Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 10035–10038.
- [6] J.T. Spence, A.P. Koudelka, Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 6393–6396.
- [7] N. Rodríguez-Fuentes, I. López-Rosas, G. Román-Cisneros, A. Velázquez-Arellano, Biotin deficiency affects both synthesis and degradation of pyruvate carboxylase in rat primary hepatocyte cultures, *Mol. Genet. Metab.* 92 (2008) 222–228.
- [8] H.U. Bergmeyer, *Methods in Enzymatic Analysis*, 2nd edn, Verlag Chemie, United States of America, 1974.
- [9] L.L. Grad, B.D. Lemire, Mitochondrial complex I mutations in *Caenorhabditis elegans* produce cytochrome c oxidase deficiency, oxidative stress and vitamin-responsive lactic acidosis, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 303–314.
- [10] N.S. Sanchez, M. Calahorra, J.C. Gonzalez-Hernandez, A. Pena, Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 23 (2006) 361–374.
- [11] H.U. Bergmeyer, H.O. Beutler, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Ethanol*, 3rd edn, *Methods in Enzymatic Analysis*, vol. VI, VCH Verlagsgesellschaft, 1984, pp. 598–606.
- [12] R. Moreno-Sanchez, Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 12554–12560.
- [13] M.E. Schmitt, T.A. Brown, B.L. Trumpower, A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 3091–3092 Order.
- [14] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [15] P. de Jong-Gubbels, J. Bauer, P. Niederberger, I. Stuckrath, P. Kotter, J.P. van Dijken, J.T. Pronk, Physiological characterisation of a pyruvate-carboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* mutant in batch and chemostat cultures, *Antonie Leeuwenhoek* 74 (1998) 253–263.
- [16] N.K. Brewster, D.L. Val, M.E. Walker, J.C. Wallace, Regulation of pyruvate carboxylase isozyme (Pyc1, Pyc2) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and nonfermentative growth, *Arch. Biochem. Biophys.* 311 (1994) 62–71.
- [17] D.G. Hardie, AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 774–785.
- [18] J. Apfeld, G. O'Connor, T. McDonagh, P.S. DiStefano, R. Curtis, The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*, *Genes Dev.* 18 (2004) 3004–3009.
- [19] S. Zaman, S.J. Lippman, L. Schneper, N. Slonim, J.R. Broach, Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways, *Mol. Syst. Biol.* 5 (2009) 245.
- [20] W.A. Wilson, S.A. Hawley, D.G. Hardie, Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio, *Curr. Biol.* 6 (1996) 1426–1434.
- [21] T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B.B. Kahn, T. Kadowaki, Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nat. Med.* 8 (2002) 1288–1295.
- [22] J.R. Rohde, R. Bastidas, R. Puria, M.E. Cardenas, Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Opin. Microbiol.* 11 (2008) 153–160.
- [23] F. Foufelle, P. Ferre, New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c, *Biochem. J.* 366 (2002) 377–391.
- [24] C. Gregori, I. Guillet-Deniau, J. Girard, J.F. Decaux, A.L. Pichard, Insulin regulation of glucokinase gene expression: evidence against a role for sterol regulatory element binding protein 1 in primary hepatocytes, *FEBS Lett.* 580 (2006) 410–414.
- [25] G. Zhou, R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenyk-Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doebber, N. Fujii, N. Musi, M.F. Hirschman, L.J. Goodyear, D.E. Moller, Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action, *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 1167–1174.
- [26] R. Dentin, J.P. Pegorier, F. Benhamed, F. Foufelle, P. Ferre, V. Fauveau, M.A. Magnuson, J. Girard, C. Postic, Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20314–20326.
- [27] C. Postic, R. Dentin, P.D. Denechaud, J. Girard, ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism, *Annu. Rev. Nutr.* 27 (2007) 179–192.
- [28] S. Marshall, Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer, *Sci. STKE* 2006 (2006) re7.
- [29] R.M. McKay, J.P. McKay, L. Avery, J.M. Graff, C. elegans: a model for exploring the genetics of fat storage, *Dev. Cell* 4 (2003) 131–142.
- [30] M. Kniazeva, Q.T. Crawford, M. Seiber, C.Y. Wang, M. Han, Monomethyl branched-chain fatty acids play an essential role in *Caenorhabditis elegans* development, *PLoS Biol.* 2 (2004) E257.
- [31] M. Fulco, Y. Cen, P. Zhao, E.P. Hoffman, M.W. McBurney, A.A. Sauve, V. Sartorelli, Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Namp1, *Dev. Cell* 14 (2008) 661–673.
- [32] C. Canto, Z. Gerhart-Hines, J.N. Feige, M. Lagouge, L. Noriega, J.C. Milne, P.J. Elliott, P. Puigserver, J. Auwerx, AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity, *Nature* 458 (2009) 1056–1060.
- [33] D.G. Hardie, D.A. Pan, Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase, *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 1064–1070.
- [34] K. Dakshinamurti, W. Li, Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxylase by biotin in diabetic rats, *Mol. Cell. Biochem.* 132 (1994) 127–132.
- [35] C. Canto, J. Auwerx, PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure, *Curr. Opin. Lipidol.* 20 (2009) 98–105.
- [36] D.M. Kurtz, L. Tian, B.A. Gower, T.R. Nagy, C.A. Pinkert, P.A. Wood, Transgenic studies of fatty acid oxidation gene expression in nonobese diabetic mice, *J. Lipid Res.* 41 (2000) 2063–2070.
- [37] J.G. Wood, B. Rogina, S. Lavu, K. Howitz, S.L. Helfand, M. Tatar, D. Sinclair, Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans, *Nature* 430 (2004) 686–689.
- [38] S. Taubert, M. Hansen, M.R. Van Gilst, S.B. Cooper, K.R. Yamamoto, The Mediator subunit MDT-15 confers metabolic adaptation to ingested material, *PLoS Genet.* 4 (2008) e1000021.
- [39] V. Flati, E. Pasini, G. D'Antona, S. Specia, E. Toniato, S. Martinotti, Intracellular mechanisms of metabolism regulation: the role of signaling via the mammalian target of rapamycin pathway and other routes, *Am. J. Cardiol.* 101 (2008) 16E–21E.
- [40] D.M. Gwinn, D.B. Shackelford, D.F. Egan, M.M. Mihaylova, A. Mery, D.S. Vasquez, B.E. Turk, R.J. Shaw, AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint, *Mol. Cell* 30 (2008) 214–226.
- [41] M. Miron, J. Verdu, P.E. Lachance, M.J. Birnbaum, P.F. Lasko, N. Sonenberg, The translational inhibitor 4E-BP1 is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 596–601.
- [42] K. Hara, Y. Maruki, X. Long, K. Yoshino, N. Oshiro, S. Hidayat, C. Tokunaga, J. Avruch, K. Yonezawa, Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action, *Cell* 110 (2002) 177–189.
- [43] J.M. Gancedo, Yeast carbon catabolite repression, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998) 334–361.
- [44] J.P. van Dijken, R.A. Weusthuis, J.T. Pronk, Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts, *Antonie Leeuwenhoek* 63 (1993) 343–352.
- [45] M.G. Vander Heiden, L.C. Cantley, C.B. Thompson, Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science (New York, NY)* 324 (2009) 1029–1033.
- [46] S. Zaman, S.J. Lippman, X. Zhao, J.R. Broach, How *Saccharomyces* responds to nutrients, *Annu. Rev. Genet.* 42 (2008) 27–81.
- [47] P.N. Epstein, A.C. Boschoer, I. Atwater, X. Cai, P.A. Overbeek, Expression of yeast hexokinase in pancreatic beta cells of transgenic mice reduces blood glucose, enhances insulin secretion, and decreases diabetes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 12038–12042.
- [48] A. Rodriguez, T. De La Cera, P. Herrero, F. Moreno, The hexokinase 2 protein regulates the expression of the *GLK1*, *HXK1* and *HXK2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.* 355 (2001) 625–631.
- [49] N. Bonander, C. Ferndahl, P. Mostad, M.D. Wilks, C. Chang, L. Showe, L. Gustafsson, C. Larsson, R.M. Bill, Transcriptome analysis of a respiratory *Saccharomyces cerevisiae* strain suggests the expression of its phenotype is glucose insensitive and predominantly controlled by Hap4, Cat8 and Mig1, *BMC Genomics* 9 (2008) 365.
- [50] M. Orlova, E. Kanter, D. Krakovich, S. Kuchin, Nitrogen availability and TOR regulate the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryot. Cell* 5 (2006) 1831–1837.
- [51] C. Selman, J.M. Tullet, D. Wieser, E. Irvine, S.J. Lingard, A.I. Choudhury, M. Claret, H. Al-Qassab, D. Carmignac, F. Ramadan, A. Woods, I.C. Robinson, E. Schuster, R.L. Batterham, S.C. Kozma, G. Thomas, D. Carling, K. Okkenhaug, J.M. Thornton, L. Partridge, D. Gems, D.J. Withers, Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span, *Science* 326 (2009) 140–144.
- [52] V. Aguilar, S. Alliouachene, A. Sotiropoulos, A. Sobering, Y. Athea, F. Djouadi, S. Miraux, E. Thiaudiere, M. Foretz, B. Viollet, P. Diollez, J. Bastin, P. Benit, P. Rustin, D. Carling, M. Sandri, R. Ventura-Clapier, M. Pende, S6 kinase deletion suppresses muscle growth adaptations to nutrient availability by activating AMP kinase, *Cell Metab.* 5 (2007) 476–487.
- [53] I. Ruiz-Stewart, S.R. Tiyyagura, J.E. Lin, S. Kazerounian, G.M. Pitari, S. Schulz, E. Martin, F. Murad, S.A. Waldman, Guanylyl cyclase is an ATP sensor coupling nitric oxide signaling to cell metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 37–42.