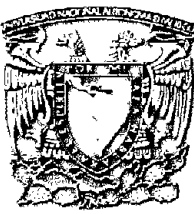


11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**LA UTILIZACIÓN DE BIOTINA EN HÍGADO
Y CEREBRO ES REGULADA
TRANSCRIPCIONALMENTE POR UN
MECANISMO DE ALTRUISMO TISULAR.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA:**

Biol. Diana Pacheco Alvarez

México, D. F.

2005

m340452



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

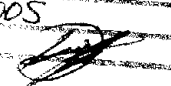


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

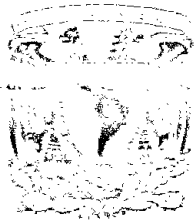
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

Autoriza a la Dirección General de Administración de la
UNAM a otorgar el apoyo económico a través del
anexo de la Ley de Ingresos de la Federación.
Nombre: DIANA PACHECO ALVAREZ
Fecha: 27-ENERO-2005
Firma: 

**Este proyecto de investigación fue realizado bajo la asesoría del
Dr. Alfonso León Del Río,
en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología
del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
y financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (40001-
Q) y Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación
Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México
(IN235202).**



Doctorado
en Ciencias Biomédicas
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

pdcbb/grad/183Jur/2004.

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ
Director General de la
Administración Escolar
Presente.

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas que tuvo lugar el 6 de octubre de 2004, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Biol. **DIANA PACHECO ALVAREZ** con no. de cuenta 500033074 con la tesis titulada: "La utilización de la vitamina biotina en hígado y cerebro es regulada transcripcionalmente por un mecanismo de altruismo tisular", dirigida por el Dr. Alfonso León Del Río.

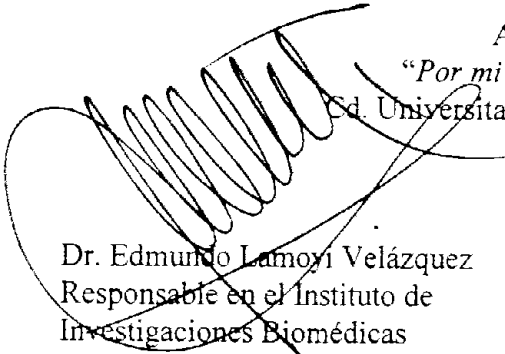
Presidente:	Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas
Secretario:	Dr. Alfonso León Del Río
Vocal:	Dra. Alicia González Manjarrez
Vocal:	Dra. María de Lourdes Massieu Trigo
Vocal:	Dr. Luis Servín González
Suplente:	Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Alvarez
Suplente:	Dr. Sergio Encarnación Guevara

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

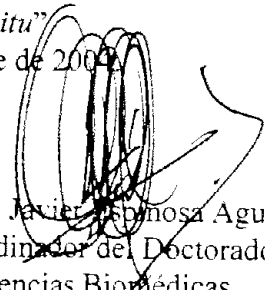
Atentamente

"Por mi raza hablará el espíritu"

Cd. Universitaria, D.F., 6 de octubre de 2004.



Dr. Edmundo Lamoxy Velázquez
Responsable en el Instituto de
Investigaciones Biomédicas



Dr. J. Javier Espinosa Aguirre
Coordinador del Doctorado
en Ciencias Biomédicas

c.c.p. - Secretaría de Asuntos Escolares

AGRADECIMENTOS

Con un profundo agradecimiento y compromiso con la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Alfonso León Del Río por su apoyo incondicional, por permitirme realizar este proyecto de investigación y forjarme como investigadora.

Al Dr. Sergio Solórzano Vargas, por todo su apoyo, los conocimientos transmitidos y por los buenos momentos.

Al Dr. Roy Gravel, por su confianza, su apoyo y por transmitirme esa pasión por ser Investigador.

Al Dr. Alfonso González Noriega y Collete Michalack por la asesoría en cultivos celulares.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Ignacio Camacho Arroyo y Dr. Fernando López Casillas.

A los miembros del jurado de obtención de grado: Dra. Victoria Eugenia Chagoya, Dra. Alicia González, Dra. Lourdes Massieu, Dr. Luis Servín, Dra. Clorinda Arias y Dr. Sergio Encarnación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Dirección General de Estudios de Posgrado; UNAM, por permitirme continuar mi preparación a través de los programas de becas nacionales.

Al Dr. Roberto Hernández, por sus buenos consejos

A los miembros de mi laboratorio: Tonatiuh Barrios y Rafael Cervantes.

A mi "otro" laboratorio, con mucho cariño y agradecimiento, por ser mi refugio en todo momento: Elisa, Ana María, Rosalía, Julieta, Juliana, Marisela, Mariana y Julio.

DEDICATORIA

A mis padres Yclanda y Tino, con todo mi cariño y profunda gratitud por el apoyo incondicional que he tenido por parte de ustedes en todo momento y que no sé como pagar. Por todos los valores que me inculcaron desde pequeña y su ejemplo para vivir con ellos. Por estar conmigo siempre.

A mis hermanos Isabel, Eduardo, Juan Pablo y Benjamín. Los quiero mucho, gracias por estar conmigo en todo momento, por sus buenos consejos y por ser en ocasiones mis hermanos mayores.

A Javier, el amor de mi vida...

Con todo mi cariño por apoyarme en esta etapa importante en mi desarrollo profesional y ser paciente con los resultados.

Por lo que estamos forjando juntos día con día. Gracias por estar conmigo y ser parte fundamental de mi existencia.

INDICE

RESUMEN
ABSTRACT

CAPÍTULO I. Biotina y metabolismo

Prefacio al capítulo I	2
1. Biotina	3
2. Ciclo de utilización de biotina en organismos superiores	5
Transporte celular de biotina	5
Carboxilasas dependientes de biotina	12
a. Acetil-CoA carboxilasa	14
b. Piruvato carboxilasa	15
c. Propionil-CoA carboxilasa	16
d. β -metilcrotonil-CoA carboxilasa	17
Biotinilación de carboxilasas	18
La proteína BirA, una ligasa de biotina con actividad transcripcional	18
Holocarboxilasa sintetasa	20
El reciclamiento de la biotina es mediado por la enzima biotinidasa	22
3. Enfermedades del ciclo de utilización de biotina	23
Deficiencia múltiple de carboxilasas	23
a. Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa	24
b. Deficiencia de biotinidasa	25
c. Enfermedad de ganglio basal	28
d. Efectos teratogénicos causados por la deficiencia de biotina	29
4. Más allá del papel enzimático de la biotina	30
a. Expresión genética dependiente de biotina	30
Glucocinasa hepática	30
Fosfofructocinasa y Piruvato kinasa	32
Ornitina transcarbamilasa	32
Guanilato ciclasa soluble y GMPc	33
Fosfoenolpiruvato carboxikinasa	33
Receptor de asiologlicoproteínas	34
Interleucinas y oncogenes	34
Carboxilasas dependientes de biotina y holocarboxilasa sintetasa	35
b. Efecto de la biotina sobre la síntesis de ADN, ARN y proliferación celular	36
c. Modificaciones de histonas como un proceso dependiente de biotina	37
La enzima biotinidasa implicada en la biotinilación de histonas	37
La enzima holocarboxilasa sintetasa en el núcleo	38
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
OBJETIVOS	40

CAPÍTULO II. La regulación transcripcional dependiente de biotina y la holocarboxilasa sintetasa

Prefacio al capítulo II	42
Introducción	44
Material y métodos	46
Resultados	49
-Efecto de la deficiencia de biotina sobre los niveles de ARNm en células HepG2.	49
-Efecto de la suplementación de biotina sobre los niveles de ARNm de HCS y carboxilasas.	50
-Efecto de GMPC sobre los niveles de ARNm en células deficientes de biotina.	50
-La enzima GCs media el efecto de biotina sobre los niveles de ARNm.	52
-La proteína cinasa dependiente de GMPC puede estar involucrada en la recuperación dependiente de biotina de los niveles de ARNm, como blanco de la actividad de GCs.	52
-La actinomicina-D impide la recuperación dependiente de biotina de los niveles de ARNm.	54
-La actividad de la holocarboxilasa sintetasa es requerida para la recuperación dependiente de biotina de los niveles de ARNm de HCS.	54
-Efecto de GMPC sobre la recuperación de los niveles de ARNm en células MCD-MK.	56
Discusión	59
Agradecimientos	63
Bibliografía	64

CAPÍTULO III. Altruismo tisular: mecanismo de regulación de la utilización de biotina en hígado y cerebro

Prefacio al capítulo 3	67
Introducción	69
Material y métodos	71
Resultados	75
-La disponibilidad de biotina regula los niveles de ARNm de las enzimas participantes en el ciclo de utilización de biotina en células HepG2.	75
-Determinación de los niveles de ARNm de las enzimas del ciclo de biotina en células de pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas.	77
-Determinación de los niveles de ARNm de enzimas implicadas en el ciclo de biotina en tejidos de rata.	81
-El contenido de biotina en carboxilasas cerebrales es preservado selectivamente en ratas deficientes de biotina	85
Discusión	87
Agradecimientos	93
Bibliografía	94

CAPÍTULO IV Discusión general	96
--------------------------------------	----

BIBLIOGRAFÍA GENERAL	103
-----------------------------	-----

ABREVIATURAS	108
---------------------	-----

APÉNDICE. PUBLICACIONES	109
--------------------------------	-----

RESUMEN

La biotina es una vitamina hidrosoluble que actúa como cofactor de enzimas conocidas como carboxilasas dependientes de biotina. En humanos existen cinco carboxilasas dependientes de biotina: propionil-CoA carboxilasa (PCC), piruvato carboxilasa (PC), 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) y dos isoformas de acetil-CoA carboxilasa (ACC-1 y ACC-2). Estas enzimas catalizan reacciones clave en gluconeogénesis, metabolismo de ácidos grasos y catabolismo de aminoácidos. La biotinilación de carboxilasas es catalizada por la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS) a través de una reacción de dos etapas en la que la biotina es transformada a biotinil 5'-AMP (B-AMP) para luego ser transferida a una secuencia específica en las carboxilasas. Debido a la importancia de la biotina en el mantenimiento de la homeostasis metabólica y a que los mamíferos han perdido la capacidad de sintetizarla, los eucariontes han desarrollado un mecanismo de utilización de biotina conocido como ciclo de biotina. Este sistema está compuesto por el transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT), carboxilasas dependientes de biotina y la enzima biotinidasa responsable del reciclamiento de biotina. Durante los últimos 30 años, se ha demostrado la participación de biotina en varios procesos celulares además de su papel como cofactor de carboxilasas. En este trabajo se propuso identificar el mecanismo por el cual la biotina actúa como un activador transcripcional de enzimas implicadas en el ciclo de utilización de biotina y determinar el papel fisiológico de este tipo de regulación transcripcional. Los resultados obtenidos demuestran que la transcripción de los genes que participan en el ciclo de utilización de biotina (ACC-2, PCC, HCS, PC y SMVT) es regulada por la disponibilidad de esta vitamina mediante una cascada de transducción de señales en la que participan la enzima HCS, la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs), GMPc, y la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG). Sin embargo, la enzima biotinidasa no obedece a este tipo de regulación. Estos datos sugieren que la deficiencia de biotina reduce el transporte y utilización de biotina proveniente de la dieta mientras que la habilidad de reciclar biotina endógena no se ve afectada. Para explorar el papel metabólico de este mecanismo se utilizó un modelo animal de deficiencia de biotina, en el cual, ratas alimentadas con una dieta deficiente de biotina mostraron una reducción del 70%-80% en los niveles de ARNm de HCS, PC y SMVT en hígado y riñón. Sin embargo, en cerebro, la expresión de estos genes no fueron afectados por la deficiencia o suplementación de biotina. El papel regulador de la biotina parece estar limitado a genes que codifican enzimas necesarias para la utilización de biotina exógena sin afectar el mecanismo de reciclamiento catalizado por la enzima biotinidasa. En este trabajo propongo que durante el ayuno prolongado la deficiencia de biotina disminuirá la capacidad de órganos como el hígado para transportar y utilizar biotina. Este mecanismo aparentemente paradójico tiene por objeto el permitir un suministro continuo de biotina al cerebro. A este mecanismo de regulación diferencial de la utilización de biotina se le ha denominado "altruismo tisular". La existencia de este mecanismo puede estar relacionada con la importancia del papel fundamental que desempeñan algunas carboxilasas dependientes de biotina en el cerebro, como la PC y la PCC que suministran el 25% de la energía utilizada por el cerebro vía anaplerosis del ciclo de Krebs.

ABSTRACT

Biotin is a water-soluble vitamin that functions as a cofactor of enzymes known as biotin dependent carboxylases. In humans there are five biotin dependent carboxylases: propionyl-CoA carboxylase (PCC), pyruvate carboxylase (PC), 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC) and two isoforms of acetyl-CoA carboxylase (ACC-1 and ACC-2). These enzymes catalyze key reactions in gluconeogenesis, fatty acid synthesis and amino acid catabolism. Carboxylase biotinylation is catalyzed by holocarboxylase synthetase (HCS) in a two step reaction, first, biotin is transformed to biotinyl-5'-AMP (B-AMP) and then transferred to an specific carboxylase sequence. Mammals have lost their capacity to synthesize biotin and now satisfy their need for the vitamin through a biotin utilization cycle. This cycle is supported by the participation of the sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT), biotin-dependent carboxylases and biotinidase, responsible for releasing biotin. During the last 30 years biotin has been implicated in a number of other cellular processes. In these work we propose to identify the mechanism by which biotin acts as a transcriptional activator of enzymes involved in the biotin utilization cycle and to determine the physiological role of these type of transcriptional regulation. The results showed that the transcription of genes involved in the biotin utilization cycle (ACC-2, PCC, HCS, PC and SMVT) are regulated by the amount of biotin into the cell by triggering a signal transduction pathway, involving HCS, soluble guanylate cyclase (sGC), cGMP and cGMP-dependent protein kinase (PKG) whereas biotinidase does not respond to these type of regulation. These data suggests that biotin deficiency reduces transport and utilization of dietary biotin since endogenous biotin recycling is not affected. To explore the metabolic role of these mechanism we used a biotin deficiency animal model, rats fed with a biotin-free diet showed a 70-80% decrease in HCS, PC, and SMVT mRNA levels in liver and kidney while brain, were not affected by biotin deficiency or supplementation. The biotin regulation function seems to be directed just to exogenous biotin utilization enzymes, but had no effect on biotin recycling by biotinidase. In these work, I propose that during biotin deficiency, such organs like kidney will reduce their capacity to use and transport biotin. These mechanism will permit a continuous supply of biotin to the brain. We have called these mechanism "tissue altruistic". The importance of these mechanism underscores the importance of biotin dependent carboxylases in brain, such as PC and PCC which operate as much as 25% of the energy used by the brain through Krebs' cycle anaplerosis.

CAPÍTULO I

Biotina y Metabolismo Celular

PREFACIO AL CAPÍTULO I

La función de la biotina en el organismo, ha sido estudiada desde hace 70 años, sin embargo, en las últimas décadas la función clásica de la biotina como cofactor de carboxilasas, ha sido rebasada por los hallazgos publicados que indican que esta vitamina parece participar en la regulación de la expresión genética, desarrollo embrionario y otros procesos celulares fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis metabólica. El estudio molecular de los mecanismos dependientes de biotina es de enorme importancia para entender el verdadero impacto de la biotina en nuestro metabolismo y el papel que tiene en el desarrollo de diversas enfermedades humanas.

El primer capítulo de mi tesis está dedicada a una revisión sobre el papel de la vitamina biotina y de las enzimas involucradas en su utilización en el metabolismo, desarrollo de enfermedades en humanos, regulación de la expresión genética y modificación de ácidos nucleicos e histonas. El objetivo de esta sección es presentar el estado en el que se encontraba este campo de investigación al principio de mi trabajo doctoral con el fin de evidenciar el impacto de mi trabajo sobre el conocimiento de las funciones de la biotina en células humanas.

La información contenida en este capítulo ha sido previamente publicada de manera parcial en los artículos:

1... Pacheco-Alvarez, D., Solórzano-Vargas S., León-Del-Río A., (2002) Biotin in metabolism and its Relationship to Human Disease. *Archives of medical Research*. 33:439-447.

2... Pacheco-Alvarez, D., León-Del-Río, A.,. 2002. La biotina, una vitamina multifuncional. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 5(1):39-46.

1. Biotina.

La biotina ó vitamina H, es una vitamina hidrosoluble perteneciente al complejo B y es esencial para el crecimiento y el mantenimiento de la homeostasis metabólica en todos los seres vivos (1). Estructuralmente la biotina se compone de un anillo bicíclico conformado por un anillo ureido y un anillo de tiofano unido a una cadena lateral de valerato (2) (Fig.1). Esta vitamina fue descubierta en 1935 por Kogl cuando se le caracterizó como un factor indispensable para el crecimiento de levadura (3). La importancia de esta vitamina en organismos superiores fue reconocida cuando se demostró que protegía a ratas de laboratorio contra los efectos tóxicos de una dieta rica en clara de huevo (4, 5). Este efecto tóxico se debe a la presencia de avidina, una proteína con extraordinaria afinidad por la biotina (4). Los organismos superiores, desde las levaduras hasta el hombre, dependen por completo de la dieta para satisfacer sus requerimientos de biotina, sin embargo, microorganismos como *E. coli* son capaces de sintetizar biotina. La auxotrofia de las bacterias con respecto a la biotina, ha conducido a varios investigadores a proponer que la flora intestinal pudiera jugar un papel relevante en suministrar parte de la vitamina requerida para el metabolismo humano (1).

La función de la biotina en el metabolismo celular permaneció desconocida hasta que en 1953 Lardy y Peanasky reportaron que la deficiencia de biotina en ratas de laboratorio reducía la capacidad de la enzima hepática propionil-CoA carboxilasa (PCC) para catalizar la carboxilación dependiente de ATP de propionato a succinato (6). Otra observación importante fue realizada en 1958 al demostrarse que la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC), purificada a partir de extractos hepáticos de aves, estaba enriquecida con biotina y su actividad podía ser reducida por la presencia de avidina (7). Finalmente, Lane y Lynen (8) demostraron que la biotina se encuentra covalentemente unida a la enzima propionil-CoA carboxilasa y es utilizada como grupo prostético de enzimas involucradas en reacciones de decarboxilación, carboxilación y transcarboxilación en donde actúa como vector para la transferencia de grupos carboxilo (4, 9). En mamíferos, la importancia de la biotina se deriva del hecho de que funciona como cofactor de 5 carboxilasas; piruvato carboxilasa (PC), propionil-CoA carboxilasa (PCC), metilcrotonil-

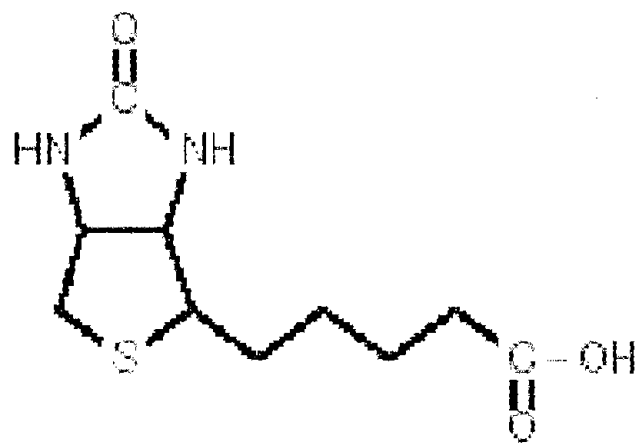


Fig. 1. Estructura molecular de la vitamina biotina.

CoA carboxilasa y dos isoformas de acetyl-CoA carboxilasa (ACC-1 y ACC-2). Estas enzimas catalizan reacciones clave en la síntesis de ácidos grasos, catabolismo de aminoácidos y gluconeogénesis (1) (Fig. 2.).

2. Ciclo de utilización de biotina en organismos superiores.

A diferencia de las bacterias, los mamíferos, incluyendo al hombre, no pueden sintetizar biotina, por lo que dependen completamente de la dieta para satisfacer sus necesidades de esta vitamina. Sin embargo, la biotina está presente en cantidades traza en los alimentos y en su mayor parte se encuentra unida a proteínas lo que limita su disponibilidad para ser utilizada en el metabolismo. Por esta razón, durante la evolución, los organismos superiores desarrollaron un mecanismo extraordinariamente eficaz para maximizar la utilización de esta vitamina. Este mecanismo se conoce como ciclo de utilización de biotina y está compuesto por diversas proteínas que incluyen transportadores de membrana, ligasas de biotina, aceptores de biotinilación (carboxilasas) y una enzima que hidroliza la unión entre la biotina y las carboxilasas y que juega un papel importante en el reciclamiento de la vitamina (1, 10) (Fig. 3).

Transporte celular de biotina.

La cinética del transporte de biotina ha sido estudiada extensivamente en los últimos 40 años en organismos procariontes y eucariontes. Como resultado, ahora se sabe que en todos los organismos estudiados el transporte de esta vitamina es mediado por un acarreador y en la mayoría de los casos este proceso es dependiente de sodio. En organismos superiores, el transporte a través de membrana celular ha sido estudiado en diferentes órganos tales como intestino, hígado, riñón, placenta y cerebro y se han utilizado una gran variedad de métodos y sistemas experimentales que incluyen ensayos de perfusión, sacos y anillos evertidos de intestino, vesículas membranales basolaterales y apicales de enterocitos, así como cultivos celulares de queratinocitos, hepatocitos y

astrocitos (11-18). En enterocitos, la K_m para el transporte de biotina es de 5-15 μM mientras que en hepatocitos es de ~1.2-20 μM (14).

Recientemente, Zemleni y cols. demostraron la existencia de un transporte de biotina de alta afinidad en células sanguíneas mononucleares de sangre periférica (PBMC). La K_m estimada para este transportador es de 2.6 nM, valor cercano a los niveles de biotina reportados en plasma de individuos sanos. Otros sistemas semejantes de transporte de biotina de alta afinidad han sido reportados en keratinocitos y astrocitos (17, 19). Estos datos sugieren que la biotina puede ser transportada por uno o más acarreadores de biotina, sin embargo, hasta el momento sólo uno ha sido clonado y estudiado molecularmente.

El transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT) en humanos es una proteína transmembranal de aproximadamente 69 kDa, constituida de 635 aminoácidos que internaliza biotina, ácido lipoico y ácido pantoténico. La naturaleza Na^+ dependiente de este transportador fue evidenciada a partir de ensayos de sustitución de Na^+ extracelular por otro catión monovalente. El transporte del SMVT es de tipo electrogénico, con una estequiometría Na^+ :substrato de 2:1, en otras palabras, por cada molécula de vitamina que entra a la célula, dos iones de Na^+ son cotransportados al interior de la misma, (20, 21).

La afinidad del SMVT reportada para pantotenato y ácido lipoico es de 1~4.9 μM y 1.6~5 μM respectivamente, mientras que para la biotina es de 3-20 μM (20, 22, 23). La baja afinidad del SMVT por biotina ha generado cuestionamientos acerca de la relevancia fisiológica del SMVT en el transporte de biotina (19). Sin embargo, recientemente Said y cols. demostraron por medio de la técnica de RNA de interferencia que el silenciamiento selectivo del ARNm del SMVT en células HepG2 y CaCo2 causa una disminución drástica de un 90% en el transporte de biotina al interior de la célula. Estos datos sugieren que el SMVT es el responsable principal del transporte de biotina al menos en hígado e intestino (24). A pesar de que el transportador SMVT ha sido localizado en

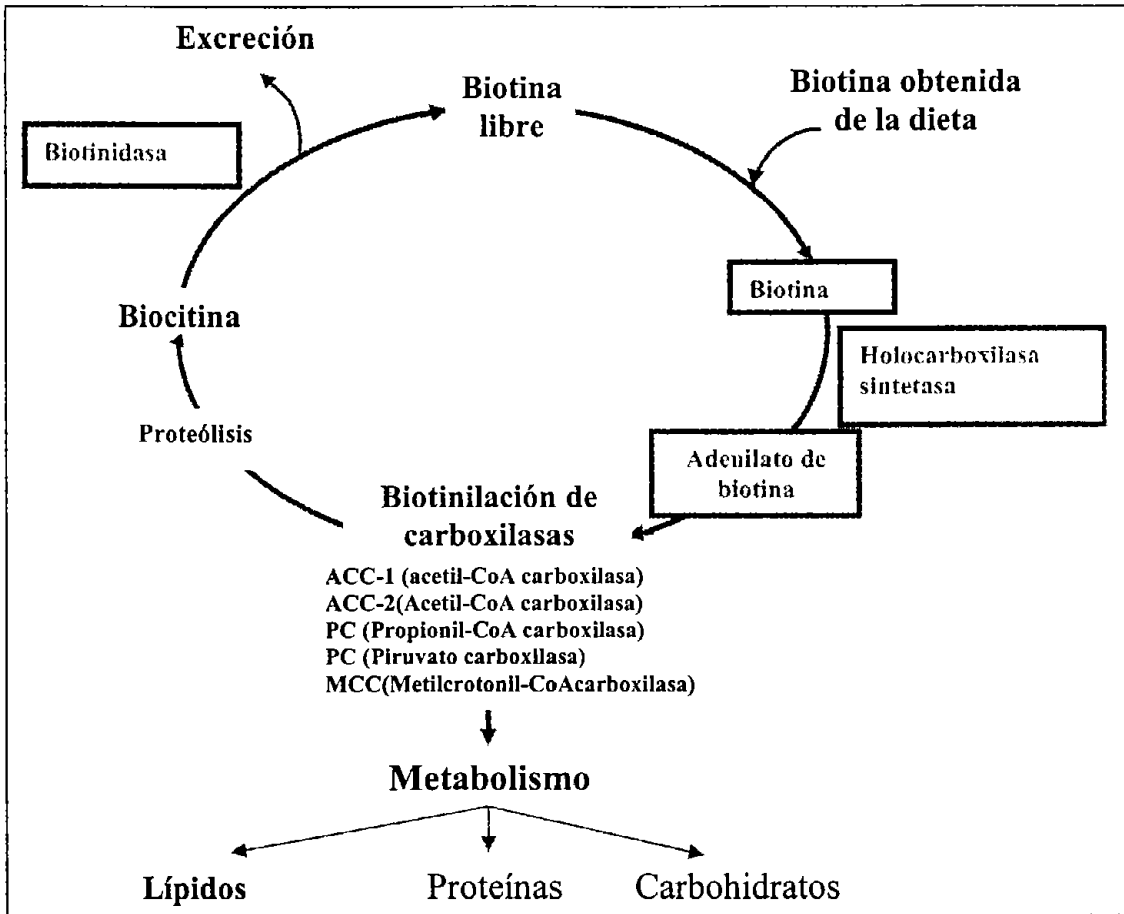


Fig. 3. Ciclo de utilización de biotina en células eucariontes.

corazón, cerebro, hígado, músculo, riñón, páncreas y células epiteliales del colon, su abundancia es mayor en tejidos epiteliales como intestino, hígado y placenta (20).

El SMVT ha sido clonado y la secuencia de aminoácidos de este transportador es altamente conservada entre especies. La proteína humana presenta una identidad del 87% y similitud del 92% con su ortólogo en conejo, y 84% de identidad y 89% de similitud con su ortólogo en rata. De manera similar, conejo y rata comparten 84% de identidad y 90% de similitud entre ellos. Los tres ortólogos, son altamente hidrofóbicos y por medio del algoritmo Kyte-Doolittle se predijo una conformación estructural de 12 dominios transmembranales, con los extremos amino y carboxilo terminal localizados en el citoplasma. (23) (Fig 4).

La comparación de la secuencia del SMVT en la base de datos muestra que este transportador presenta gran homología con miembros de la familia de transportadores de glucosa dependientes de sodio, de manera particular con el transportador de yoduro dependiente de sodio, proteína implicada en el transporte de aniones inorgánicos (40% identidad y 64% similitud a nivel de amino ácidos con el SMVT) (20, 25).

El gen de SMVT esta localizado en el brazo corto del cromosoma 2 humano y sus 17 exones cubren una región de aproximadamente 14.3 kpb. El cDNA de SMVT humano consta de 3162 pb con un marco de lectura abierta de 1908 pb, flanqueado en el extremo 5' por una secuencia no codificadora de 391pb y en el extremo 3' por una secuencia de 863pb (20). El cDNA contiene una cola de poly(A)⁺ y señal de poliadenilación (AATAAA) en la región no codificadora 3' (20). La región genómica situada 50' del sitio de inicio de la transcripción del gen SMVT humano ha sido caracterizada y se han identificado dos regiones con actividad promotora denominadas como P1 y P2 (26). La región promotora del SMVT humano, carece de cajas TATA y CAAT y contiene secuencias ricas en GC asociadas a genes housekeeping. En esta región se han identificado posibles sitios de reconocimiento de varios factores de transcripción en los que se incluyen AP1, AP2, C/EBP, SP1, NF1 y GATA (26). En rata, el promotor del gen

SMVT esta compuesto de tres cajas denominadas P1, P2 y P3 con actividad promotora (27).

Diferentes observaciones han puesto de manifiesto que el transporte intestinal de biotina es un proceso regulado y que presenta cambios durante el desarrollo. Utilizando vesículas de membrana apical de células de epitelio de yeyuno de ratas recién nacidas y adultas, se demostró cambios en los valores de la velocidad máxima (V_{max}) y K_m aparente del transporte (28). Esto en principio podría sugerir que durante diferentes etapas del desarrollo el transporte de biotina es mediado por diferentes transportadores. Sin embargo, el mecanismo o la identidad de estos acarreadores permanece desconocida.

Una de las características más interesantes del transporte de biotina es que la captación de biotina en células eucariontes parece variar de acuerdo a la concentración extracelular de la vitamina. En hepatocitos aislados de ratas alimentadas con una dieta deficiente de biotina, el transporte de esta vitamina fue 16 veces mayor que el observado en hepatocitos de ratas alimentadas con una dieta normal. En este mismo modelo, se cuantificó la cantidad de biotina unida, siendo 19 veces mayor en células deficientes con respecto a las normales (12). Resultados semejantes fueron obtenidos en células mononucleares de sangre periférica (29, 30) y astrocitos de rata (17). Estas observaciones han sugerido que el aumento en el transporte de biotina en células deficientes se debe a un mecanismo de adaptación en el cual la célula "intenta" maximizar las oportunidades de satisfacer sus requerimientos de biotina, aumentando el número de transportadores, cuando la vitamina se encuentra en bajas concentraciones. Sin embargo, Wolf y colaboradores han sugerido que estos resultados pudieran deberse a la mayor cantidad de apocarboxilasas en células deficientes y que pudieran actuar como una "trampa" para la vitamina (12).

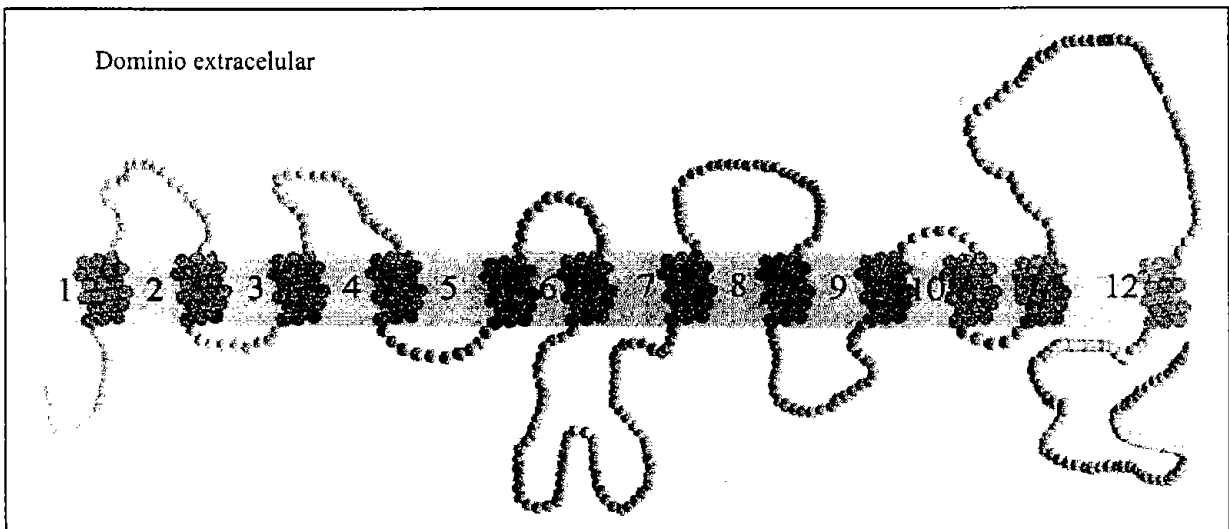


Fig. 4. Representación esquemática de la estructura del transportador multivitamínico dependiente de sodio. Adaptado de los autores Prasad y cols. (21)

Carboxilasas dependientes de biotina.

Como se describió anteriormente, la función de la biotina en el metabolismo de mamíferos es actuando como cofactor de enzimas involucradas en reacciones de carboxilación (1). Las carboxilasas dependientes de biotina son sintetizadas como precursores inactivos que requieren ser biotiniladas para entonces utilizar a esta vitamina como un vector en la transferencia de un grupo carboxilo entre moléculas donadoras yceptoras de carboxilación. En eucariontes superiores existen 5 carboxilasas distribuidas en la mitocondria (PC, PCC y MCC) y el citoplasma (ACC-1 y ACC-2) (1). Aunque todas estas enzimas catalizan reacciones esencialmente similares, su estructura es muy variable incluyendo enzimas mono y polipeptídicas (2). Sin embargo, todas las enzimas dependientes de biotina comparten una región de alta homología de aproximadamente 80 amino ácidos y que es conocida como el dominio de biotinilación. Esta región está delimitada por una región rica en prolina y el extremo carboxilo terminal en las carboxilasas mitocondriales. En ACC-1 y ACC-2 este dominio de biotinilación se encuentra situado hacia el extremo amino terminal. En todas las carboxilasas el sitio aceptor de biotinilación es un amino ácido lisina situado en la secuencia A-M-L-M universalmente conservada (2, 31) (Fig. 5). Es interesante hacer notar que el dominio de biotinilación de las carboxilasas es estructural y funcionalmente independiente y puede ser expresado y biotinilado exitosamente en una gran variedad de organismos, esto incluye la biotinilación de carboxilasas humanas en células bacterianas y la biotinilación de carboxilasas bacterianas por células eucariontes (31-34). Estos resultados sugieren que los mecanismos de biotinilación se han conservado a lo largo de la evolución desde las bacterias hasta el hombre.

|

Sitio aceptor de
biotinilación



PCC	-----EMFGVVAV	SVKPGDAVAEGQEIC	VIEAMKMQNSMTAGK	TGTVKSVHCQAGDTV	GEGDLLVELE-
PC	-----PMPGKVIDI	KVVAGAKVAKGQPLC	VLSAMKMETVVTSPM	EGTVRKVHVTKDMTL	EGDDLILEIE-
ACC1	PSVMRSPSAGKLIQY	IVEDGGHVEFAGQCYA	EIEVMKVMVMTLTAVE	SGCIHYVKR-PGAAL	DPGCVLAKMQL
ACC2	PTVLRSPSAGKLTQI	TVEDGGHVEAGRRYA	EMEVMKMIMTLNVQE	RGRVKYIKR-PGAVL	EAGCVVARLEL
BCCP	-----PSPDAKAFI	EV--GQKVNVDGTLTLC	IVEAMKMMNQIEADK	SGTVKAILVESGQPV	EFDEPLVVIE-

Fig. 5. La secuencia del dominio de biotinilación está altamente conservada en enzimas dependientes de biotina. PCC: subunidad alpha de Propionil-CoA carboxilasa, PC: piruvato carboxilasa, ACC1: isoforma 1 de acetil-CoA carboxilasa, ACC2: isoforma 2 de acetil-CoA carboxilasa, BCCP: subunidad biotinilable de Acetil-CoA carboxilasa en bacteria.

a. Acetil-CoA carboxilasa.

La enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC) es esencial para la síntesis de ácidos grasos de cadena impar ya que cataliza la formación de malonil-CoA a partir de bicarbonato, ATP y acetil-CoA (Fig. 6). En esta reacción el compuesto malonil-CoA es utilizado como un donador activo de dos átomos de carbono en la síntesis de ácidos grasos (35). Recientemente fueron descubiertas dos isoformas de ACC a las que se les ha llamado ACC-1 y ACC-2. La ACC-1 está localizada en el citoplasma mientras que la ACC-2 se encuentra en la mitocondria donde se ha sugerido estar involucrada en la β -oxiación de ácidos grasos(36-39).

En humanos las dos isoformas de ACC son codificadas por genes diferentes localizados en los cromosomas 17q y 12q respectivamente (40). Ambas enzimas están formadas por un solo polipéptido y a nivel de secuencia de aminoácidos presentan un 75% de identidad. La región NH terminal de ACC-1 y ACC-2 es completamente diferente debido a que la ACC-2 tiene un dominio adicional de 200 amino ácidos. La expresión de las dos isoformas es tejido específico. De esta manera se ha encontrado que ACC-1 se expresa principalmente en tejidos con gran capacidad de síntesis *de novo* de ácidos grasos como hígado, tejido adiposo y glándula mamaria. La ACC-2 ha sido localizada preferentemente en tejidos donde el malonil-CoA participa en la regulación de la oxidación de ácidos grasos como corazón y músculo esquelético (41). En hígado, la síntesis de ácidos grasos y la oxidación de los mismos son procesos importantes, por lo que hay una expresión significativa de ambas isoformas.

A diferencia de otras carboxilasas dependientes de biotina, la deficiencia de ACC es extraordinariamente rara. Hasta el momento, sólo un caso ha sido reportado en un recién nacido que presentaba miopatía hipotónica, daño cerebral y crecimiento lento. Análisis bioquímicos revelaron la acumulación de productos derivados de butiril-CoA intermediario en la síntesis de ácidos grasos, así como deficiencia en la actividad de Acetil-CoA carboxilasa en tejido hepático y fibroblastos (42).

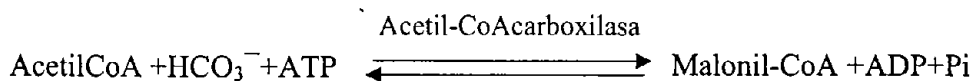


Fig. 6. Reacción catalizada por la acetil-CoA carboxilasa.

b. Piruvato carboxilasa.

La PC es también un enzima mitocondrial que cataliza la formación de oxalacetato a partir de piruvato, ATP y HCO_3^- (Fig. 7). En tejidos gluconeogénicos, como hígado y riñón, la PC cataliza el primer paso en la síntesis de glucosa a partir de piruvato, mientras que en tejidos lipogénicos como hígado, tejido adiposo, glándula mamaria en lactación y glándula adrenal, participa en la exportación de grupos acetilos, en forma de citrato, de la mitocondria al citosol, para su posterior utilización de acetil-CoA en la síntesis de ácidos grasos y del oxaloacetato como precursor de piruvato en el citoplasma (43-45). En tejidos del sistema nervioso central, la PC juega un papel importante en la síntesis de precursores de neurotransmisores como glutamato, GABA y aspartato (46).

La deficiencia genética de la actividad de PC en humanos es un desorden autosómico recesivo con baja incidencia (1:250,000). Esta enfermedad es caracterizada por la acumulación de ácido láctico, citrulina, amonio y lisina en sangre (45). La deficiencia de PC es heterogénea y dependiendo de la severidad de las manifestaciones clínicas y de la población en la cual se presente, la deficiencia de PC ha sido dividida en tres grupos: El grupo A, caracterizado por acidemia láctica y retraso psicomotor, ha sido observado en la población india canadiense, india americana, estadounidenses de origen caucásico y japonesa. El grupo B presenta un cuadro clínico complejo que incluye acidemia láctica neonatal severa, hiperamonemia, citrulinemia e hiperlisinemia. En este grupo, las manifestaciones clínicas se presentan en el periodo neonatal y puede ser mortal antes de los 3 meses de edad. Hasta el momento, los casos reportados han sido localizados en Canadá, Francia, Arabia Saudita, Suecia y Alemania Occidental. El tercer grupo lo

conforma un caso reportado de origen caucásico que presentaba episodios intermitentes de acidosis metabólica en la etapa infantil, a pesar de la similitud de los parámetros clínicos con respecto a los reportados en el grupo A, esta paciente tuvo un desarrollo normal y nunca presentó retraso psicomotor (47).

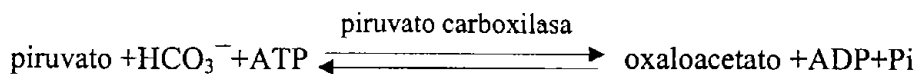


Fig. 7 Reacción catalizada por la enzima piruvato carboxilasa.

c. Propionil-CoA carboxilasa.

La enzima PCC esta formada por dos subunidades diferentes denominadas PCC- α y PCC- β , siendo la primera la que contiene el sitio de biotinilación. Se ha sugerido que la estructura de PCC es un octámero ó un dodecámero formado por 4 o 6 subunidades α y un número idéntico de subunidades β . La subunidad α tiene un peso molecular de 72kDa, mientras que el peso de la subunidad β es de 56 kDa. Cada subunidad es codificada por genes independientes denominados *PCCA* y *PCCB*.

La PCC se localiza en la mitocondria y participa en el catabolismo de los amino ácidos esenciales metionina, isoleucina, treonina y valina, por medio de la reacción de carboxilación de propionil-CoA a D-metilmalonil-CoA (Fig. 8), este ultimo utilizado como precursor de uno de los compuestos intermediarios del ciclo de Krebs, succinil-CoA (48). En humanos, la deficiencia de PCC es la causa de la enfermedad hereditaria acidemia propiónica. Los individuos afectados presentan cetoacidosis metabólica severa, hiperamonemia, hiperglicinemia, hipocarnitinemia y un patrón característico de ácidos orgánicos en orina (49). La deficiencia de PCC se divide en dos grupos complementarios designados como *pccA* (causado por mutaciones en el gene *PCCA*) y *pccB* (causado por mutaciones en el gene *PCCB*). Se han localizado alrededor de 60 mutaciones en los genes de *PCCA* y de *PCCB*. Una de las características más notables de la deficiencia de PCC es el grado de afectación a los pacientes, ya que mientras algunos individuos con

deficiencia de PCC no presentan manifestaciones clínicas, en otros la enfermedad puede ser potencialmente mortal (1, 50).

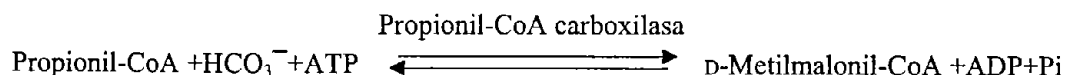


Fig. 8. Reacción catalizada por la enzima propionil-CoA carboxilasa.

d. β -metilcrotonil-CoA carboxilasa.

La enzima MCC cataliza la formación de β -metilglutaconil-CoA a partir de β -metilcrotonil-CoA durante el catabolismo del amino ácido leucina (Fig. 9) (1). Al igual que la enzima PCC, está compuesta por dos subunidades, α y β codificadas por los genes *MCCA* y *MCCB* respectivamente. La forma funcional de la MCC está compuesta por 6 heterodímeros de cadenas α y β en una estructura $(\alpha\beta)_6$. La subunidad α es de 80.5 kDa y contiene el sitio de unión a biotina, mientras que la subunidad β es de 61.3 kDa (2, 51). La deficiencia de MCC causa un desorden autosómico recesivo en humanos llamado metilcrotonilglicinuria. Los pacientes con esta enfermedad presentan un fenotipo variable, que puede ir desde lo asintomático hasta lo severo y en algunos casos puede conducir a estado de coma o la muerte. A nivel bioquímico, estos pacientes presentan una excreción elevada de 3-metilcrotonilglicina y ácido 3-hidroxisovalérico, así como niveles elevados de 3-hidroxi-isovaleril-carnitina en sangre y orina. La mayoría de las mutaciones encontradas en los genes *MCCA* y *MCCB* son mutaciones sin sentido, algunas inserciones ó deleciones y no hay una correlación hasta ahora genotipo-fenotipo. El tamiz neonatal por espectrometría de masas ha revelado que esta enfermedad parece ser la aciduria orgánica mas frecuente en Norte América, Europa y Australia (51, 52).

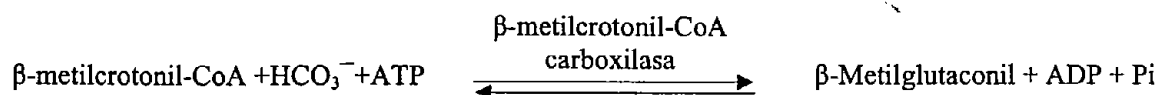


Fig. 9. Reacción catalizada por la enzima β -metilcrotonil-CoA carboxilasa.

Biotinilación de carboxilasas.

La activación de carboxilasas por biotinilación se lleva a cabo mediante la unión covalente de una molécula de biotina al grupo ϵ -amino de un amino ácido lisina localizado en la secuencia Ala/Val-Met-Lys-Met, universalmente conservada, en todas las proteínas dependientes de biotina (2). La reacción de biotinilación es catalizada en *E. coli* por la ligasa de biotina conocida como BirA. En eucariotes esta reacción es catalizada por la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS). Aunque las enzimas HCS y BirA son estructuralmente muy diferentes, ambas catalizan la biotinilación de carboxilasas de manera idéntica a través de una reacción de dos pasos (Fig. 10). En el primero, la biotina en presencia de ATP es activada formando un intermediario conocido como biotinoil-5'-AMP ó adenilato de biotina (B-AMP). En la segunda etapa de la reacción, el B-AMP es utilizado para transferir la biotina a un amino ácido de lisina de la apocarboxilasa con liberación de AMP (53).

La universalidad de la reacción de biotinilación ha sido evidenciada en experimentos que demuestran que las ligasas de biotina bacteriana pueden reconocer y biotinar carboxilasas eucariotes mientras que la HCS puede rescatar el fenotipo de cepas mutantes de *E. coli* deficientes de biotinilación (31, 32).

La proteína BirA, una ligasa de biotina con actividad transcripcional.

La proteína bacteriana BirA es responsable de la biotinilación de la subunidad BCCP de la enzima ACC, única enzima dependiente de biotina en este organismo (53). Estructuralmente la proteína BirA es una enzima monomérica de 321 amino ácidos (35.5 kDa) formada por tres dominios diferentes. La actividad enzimática de biotinilación esta contenida en una región de 130 aa en el extremo carboxilo terminal. La región amino terminal presenta una estructura terciaria del tipo hélice-vuelta-hélice (H-T-H), que le permite reconocer y unirse a una secuencia específica en el ADN del operón de biotina. Esta característica convierte a la proteína BirA en una enzima bifuncional capaz de actuar

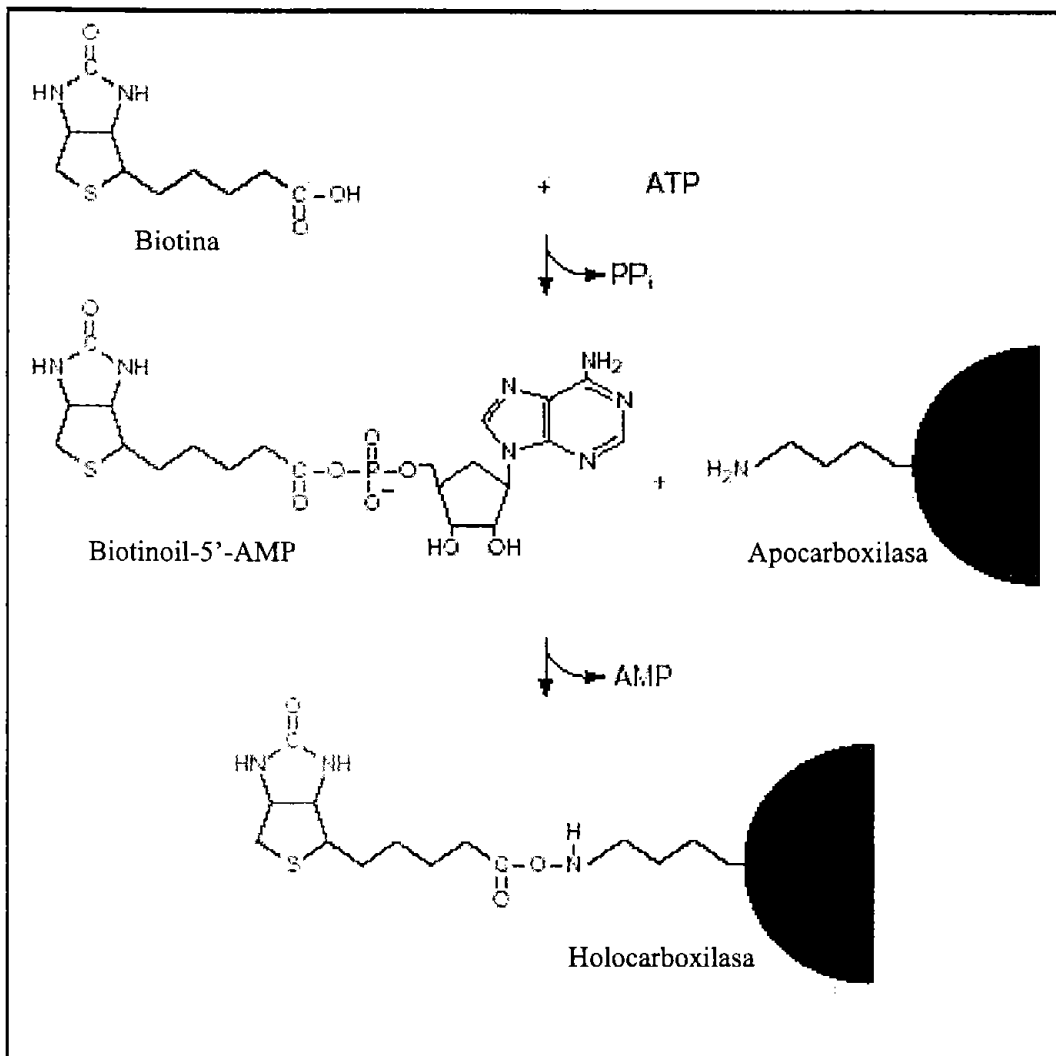


Fig. 10. La reacción de biotinylación de carboxilasas catalizada por la enzima *Holo-carboxilasa Sintetasa*. Adaptado de los autores Chapman-Smith, A. y Cronan. J.E. (54).

como un factor de transcripción responsable de la regulación de la síntesis de biotina en *E. coli*. Como se mencionó anteriormente, las bacterias poseen una vía biosintética de biotina formada por cinco proteínas diferentes. Los genes que codifican a estas enzimas bioA, bioB, bioF, bioC, bioD están localizados cabeza con cola en una región del genoma bacteriano conocida como operón de biotina (54) (Fig. 11). Cuando *E. coli* crece en un medio pobre de biotina, el intermediario de biotilación adenilato de biotina (B-AMP) es utilizado en su totalidad en la biotilación de ACC (Fig. 11A). Sin embargo, cuando la bacteria crece en un medio rico en biotina o cuando todas las moléculas de ACC disponibles han sido biotinizadas, el B-AMP se acumula en la célula favoreciendo la formación del complejo BirA-B-AMP. Este complejo es entonces capaz de unirse a una secuencia en el operador del operón de biotina actuando como un correpresor y reprimiendo la expresión de los genes del operón (54, 55) (Fig. 11B).

Holocarboxilasa sintetasa.

En los organismos eucariontes la biotilación de carboxilasas es catalizada por la enzima HCS. La actividad de esta enzima fue caracterizada bioquímicamente desde principios de los años setenta, sin embargo, poco se conocía acerca de los mecanismos de biotilación en eucariontes debido a que esta proteína no había sido purificada ni su gen clonado. En 1995 se clonó la HCS humana por medio de ensayos de complementación funcional del fenotipo de una cepa de *E. coli* deficiente de la actividad de la proteína BirA (32). Otro grupo de investigación clonó de manera independiente el cDNA de HCS a partir de secuencias peptídicas de HCS de bovino previamente clonada (56). Estos estudios revelaron que ésta proteína está formada por 726 aminoácidos (80.75 kDa) y aunque su ARNm se encuentra presente en todos los tejidos estudiados, se expresa mas abundantemente en riñón, páncreas y músculo esquelético (32, 56). El gene de la HCS humana se encuentra localizado en el cromosoma 21q22.1. El ARNm primario de la HCS es procesado alternativamente en la célula dando lugar a diversas moléculas de ARNm cuyas funciones aún están por ser determinadas, sin embargo, es posible que al menos

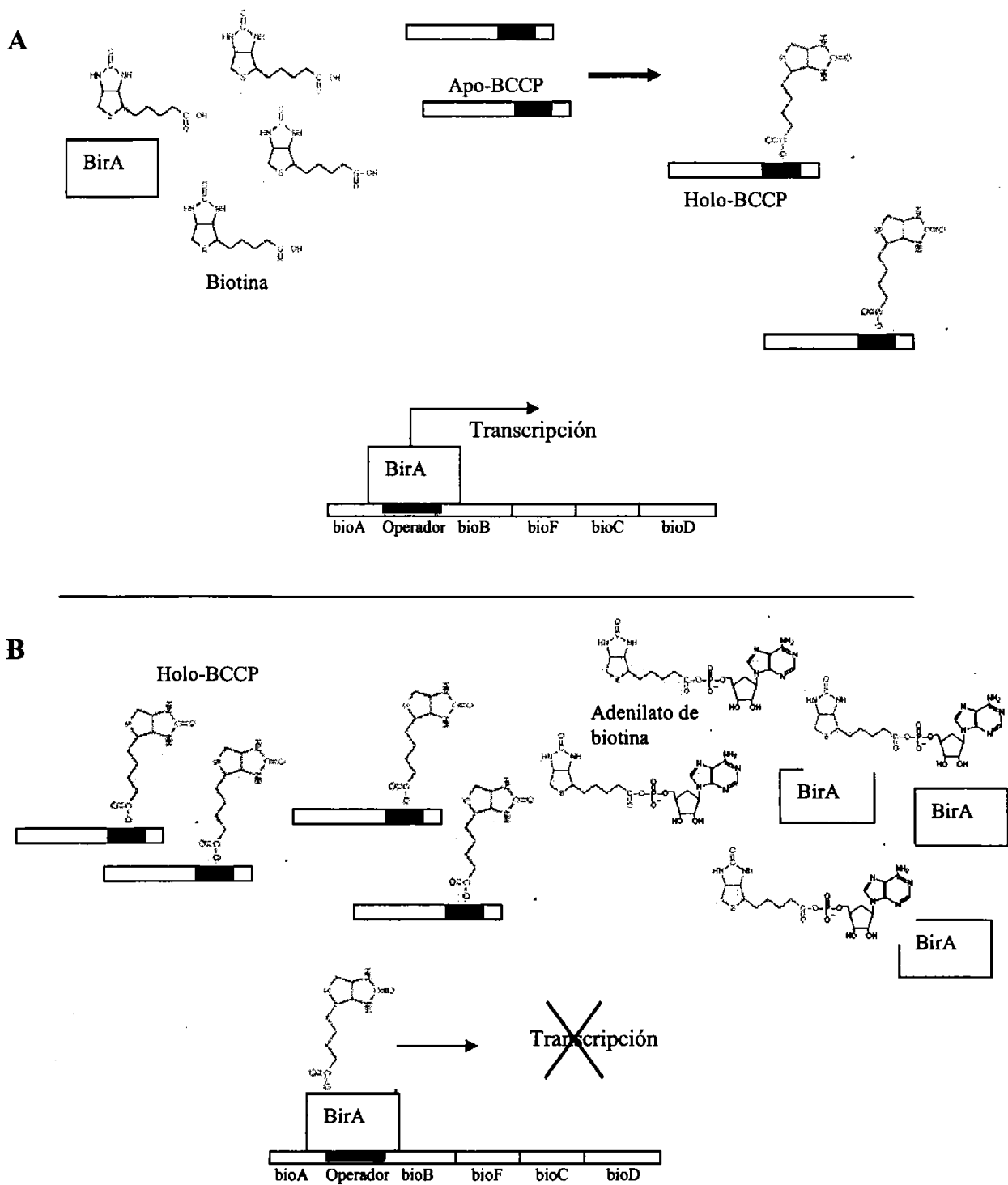


Fig. 11. La proteína BirA de *E. coli*, actúa como represor de la transcripción del operón de biotina, utilizando al compuesto adenilato de biotina (B-AMP) como correpresor.

algunas de estas formas estén relacionadas con la habilidad de dirigir a la HCS a la mitocondria o al citosol (57).

La comparación de las secuencias de la proteína Bir A y de la HCS humana revela que estas dos proteínas comparten una región de alta homología de aproximadamente 130 amino ácidos que se encuentra localizada en el extremo carboxilo terminal de ambas enzimas, sin embargo, difieren marcadamente en longitud y secuencia de la región amino terminal. Esta región corresponde al dominio de biotinilación de BirA identificado por análisis de cristalografía por rayos X (58). La región amino terminal en ambas enzimas no muestra conservación en la secuencia de aminoácidos. Ya que esta región en BirA es la que confiere actividad transcripcional, es posible que la pérdida de la capacidad de sintetizar biotina en eucariontes sea la causa de estas diferencias. Un estudio realizado por Campeau y colaboradores, sugiere que la región amino terminal de la HCS humana contribuye a la biotinilación a través de interacciones del extremo amino y carboxilo terminal y en consecuencia afectan el reconocimiento del substrato aceptor. En este estudio también se demostró, que la región mínima de la HCS que retiene actividad enzimática esta localizada en los últimos 349 aminoácidos, de los 726 de los cuales está conformada la proteína, (33). La conservación de secuencias amino terminales entre la HCS humana y la de levadura *S. cerevisiae* sugieren que esta región pueda tener una función aun no identificada (59).

El reciclamiento de la biotina es mediado por la enzima biotinidasa.

En organismos eucariontes la enzima biotinidasa tiene un papel fundamental en el ciclo de utilización de biotina al hidrolizar la unión entre la vitamina y el aminoácido lisina al que se encuentra unido en proteínas biotinizadas. La mayor parte de la biotina presente en la dieta humana se encuentra unida a proteínas y por lo tanto no está disponible para su utilización en el metabolismo. Varios investigadores han sugerido que la actividad de biotinidasa en jugo pancreático y en el plasma es probablemente la responsable de la

liberación de la biotina presente en la dieta (18, 60). Sin embargo, la biotina se encuentra en cantidades traza en la mayoría de los alimentos y no es suficiente para satisfacer los requerimientos de esta vitamina. Por esta razón, el reciclamiento de la biotina endógena durante el recambio de las carboxilasas es esencial para mantener la homeostasis metabólica. Este proceso es catalizado por biotinidasa a partir de la hidrólisis de péptidos biotinilados o del compuesto biocitina (ϵ -*N*-biotinil-L-lisina) (61, 62).

En mamíferos, la actividad de biotinidasa es particularmente alta en riñón, glándulas adrenales e hígado, este último se presume es la mayor fuente de biotinidasa. En el suero e intestino de mamíferos existe una elevada actividad de biotinidasa y se ha sugerido que esta se encuentra involucrada en la liberación de biotina a partir de proteínas consumidas en la dieta. En el cerebro la actividad de biotinidasa, aunque presente, es mucho menor que en otros órganos (63).

El gen de la biotinidasa fue clonado a partir de una librería de cDNA de hígado de humano (62) y se encuentra localizado en el cromosoma 3p25. El cDNA de la biotinidasa contiene dos posibles sitios de inicio de la transcripción y presenta un marco de lectura abierta de 1629 pb a partir del primer codon ATG. Esta secuencia codifica para una proteína monomérica de 543 amino ácidos con un peso molecular de 56.7 KDa (64).

3. Enfermedades del ciclo de utilización de biotina.

Deficiencia múltiple de carboxilasas.

El ciclo de utilización de biotina puede ser afectado como resultado de varias enfermedades genéticas con consecuencias graves para el metabolismo. A finales de la década de los sesenta y principios de los setenta aparecieron los primeros artículos científicos describiendo una nueva enfermedad (65, 66). Los pacientes afectados se

caracterizaban por excretar en la orina niveles muy altos de varios ácidos orgánicos y biotina. Estos hallazgos indicaban un bloqueo en las rutas metabólicas donde las carboxilasas catalizan reacciones clave. Este descubrimiento le dio el nombre a la enfermedad; deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC) (1). Cuando se descubrió que los síntomas podían presentarse en la etapa neonatal o varios meses después del nacimiento, la enfermedad fue dividida en forma neonatal o juvenil de la DMC. La caracterización bioquímica de la DMC reveló años más tarde que los pacientes eran afectados por dos enfermedades diferentes causadas por la deficiencia de HCS o biotinidasa (1, 67, 68).

a. Deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa.

La forma neonatal de la deficiencia múltiple de carboxilasas es un desorden autosómico recesivo causado por la deficiencia en la actividad de la HCS y que tiene por consecuencia la inactivación de todas las carboxilasas dependientes de biotina. Las manifestaciones clínicas de éste desorden se observan en un lapso que va desde las primeras horas del nacimiento hasta los 21 meses de edad. Sin embargo, la mayoría de los casos se presentan antes de los 3 meses (1). Las manifestaciones clínicas incluyen dificultad para respirar, letargia, retraso en el desarrollo psicomotor, hipotonía, convulsiones, dermatitis periorificial, alopecia y coma. Los pacientes afectados por deficiencia de HCS se caracterizan bioquímicamente por presentar principalmente cetoacidosis metabólica, aciduria orgánica e hiperamonemia (1).

Esta enfermedad puede ser potencialmente mortal si no es diagnosticada y tratada a tiempo. Con la excepción de un solo caso, todos los pacientes con deficiencia en la HCS responden al menos en algún grado a dosis farmacológicas de biotina y en la mayoría de los casos la dosis de 10 mg de biotina /día, ha sido suficiente para normalizar la excreción urinaria de ácidos orgánicos y favorecer el desarrollo normal del paciente (1, 69) Por años se especuló que la respuesta de los pacientes al tratamiento con la vitamina se debía a que las mutaciones en el gen de la HCS afectaban el sitio de unión a biotina creando una proteína mutante con una afinidad menor por la vitamina. Sin embargo, esto no fue demostrado hasta la publicación de la secuencia del gen de la HCS y la identificación de

las mutaciones presentes en pacientes con DMC (Fig. 12). Estos trabajos demostraron que la mayor parte de las mutaciones se encuentran localizadas en la región carboxilo terminal que codifica al dominio de 130 amino ácidos, catalogado como dominio de unión a biotina, el cual se encuentra conservado en la HCS y en la proteína BirA: Thr462Ile (70) R508W, G518E, V550M, D571N, G581S, delT610 delT1876, delC2279 y del (1740-1807) (59). Recientemente, otras seis mutaciones han sido localizadas fuera del dominio de unión a biotina de la HCS: R183P, L216R, L237P, V333E, V363D, T462I y 1067delG, (33, 34, 56, 71). Otras tres mutaciones han sido localizadas en la región amino terminal de la HCS (Leu 166-Arg 290), que ahora se sabe participa en la transferencia de biotina y la interacción con las apocarboxilasas (33).

Las mutaciones puntuales localizadas en la HCS, han sido también clasificadas con base a la actividad residual de HCS y se han dividido en dos grupos. Como ejemplo, en el primero se encuentran las mutaciones que generan una actividad de HCS entre el 1-14%: delT610, V333E, T462I y G581S. En el segundo grupo se encuentran las mutaciones que reducen la actividad de HCS por debajo del 0.1% de la actividad en individuos normales: delC2279, D571N y delT1876 (70). El grado de respuesta a dosis farmacológicas de biotina ha sido utilizado también para clasificar las mutaciones en el gen de la HCS. En un estudio realizado por el grupo de Gravel, se analizó la respuesta a biotina expresando HCS humana con las diferentes mutaciones reportadas en una cepa de *E. coli* deficiente de biotina. La capacidad de estas formas mutantes de HCS para reestablecer el crecimiento bacteriano permitió agrupar e identificar el efecto de cada una de las mutaciones conforme a su capacidad de respuesta a biotina. Las mutaciones se enlistan a continuación siguiendo un orden descendente con respecto a su capacidad para complementar el fenotipo bacteriano: R508W >G518E >V550M >D571N=V363D >L216R (34).

b. Deficiencia de biotinidasa.

La deficiencia de biotinidasa fue descubierta en 1983 por Wolf et al. como un defecto primario en pacientes que presentaban la forma juvenil de la DMC (68, 72). Hasta el año

2001, habían sido diagnosticados alrededor de 120 casos con esta enfermedad (1). La deficiencia de biotinidasa severa, se caracteriza por la disminución en la actividad de esta enzima al 10% con respecto al promedio de la actividad normal en plasma (73). Los pacientes que presentan este desorden autosómico recesivo no son capaces de liberar biotina a partir de los compuestos biocitina y péptidos biotinilados, por lo cual hay una incapacidad de reciclar biotina ó de usar biotina unida proveniente de la dieta, como resultado se genera una deficiencia en la actividad de todas las carboxilasas dependientes de biotina. A diferencia de la deficiencia de HCS, las principales manifestaciones de la deficiencia de biotinidasa incluyen alteraciones neurológicas, hipotonía muscular, ataques, ataxia, problemas respiratorios, alopecia, atrofia óptica, dermatitis, sordera, retraso en el desarrollo y en algunos casos la muerte. Se ha observado también conjuntivitis e infecciones causadas por hongos, probablemente como consecuencia de anomalías en el desarrollo del sistema inmunológico. Al igual que los pacientes con deficiencia de HCS, las manifestaciones clínicas y bioquímicas, con excepción de la sordera, alteraciones neurológicas y retraso en el desarrollo, son revertidas exitosamente con la administración de dosis farmacológicas de biotina (1).

El incremento de la excreción urinaria de biotina y del compuesto biocitina, además de la presencia de acidosis metabólica y aciduria orgánica son factores claves para el diagnóstico de esta enfermedad, sin embargo, las dos últimas manifestaciones clínicas, en algunos casos, se observan después de un tiempo considerable de haberse presentado el cuadro clínico (74). Se han localizado alrededor de 61 mutaciones en tres de los cuatro exones que codifican el gene de la biotinidasa (75). Las mutaciones 98-104del7ins3 y R538C, se encuentran presentes en el 52% de 31 de los 60 alelos encontrados en pacientes sintomáticos. Las mutaciones A755G, Q456H y la doble mutación 511G>A, 1330G>C se encuentra también en 52% de los alelos detectados en muestras de pacientes en E.U.A. Otras mutaciones han sido encontradas en niños con deficiencia profunda de biotinidasa en Arabia Saudita, Turquía y Japón. La deficiencia parcial de biotinidasa (10 al 30% de actividad de biotinidasa comparada con control normal en suero) es causada predominantemente por la mutación 1330G>C. A pesar de que las mutaciones que truncan el gene de la biotinidasa han sido encontradas prevalentemente en niños con

R183P L216R

R565X (Clin Biochem 36 (2003) 145-149)
D634N Clin Biochem 36 (2003) 145-149)
del(1740-1807 delC2279
N511K G528R G581S
G518E delT610 delT1876
R508W V550M D571N



Dominio amino terminal

G466

Domínio de unión a biotina
208 aa

Val674

726 aa

Región mínima con actividad catalítica

377 aa

726 aa

Fig.12 Mutaciones identificadas en el gen de la Holocarboxilasa sintetasa humana en pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas.

deficiencia profunda de biotinidasa, no hay todavía una correlación clara genotipo:fenotipo (75, 76).

c. Enfermedad de ganglio basal.

En 1998 el grupo de Dabbagh y cols, reportó los primeros 10 casos de una enfermedad hasta entonces desconocida. Los individuos afectados presentaban entre los 3 y 14 años de edad, manifestaciones clínicas como encefalopatía progresiva, confusión, disartria, disfagia parálisis facial, oftalmoplejia externa, vómito, cuadriparesis, cuadriplegia, convulsiones, pérdida del habla y demencia. En algunos pacientes esta enfermedad llegó a ser mortal, al no ser identificada y tratada a tiempo con dosis farmacológicas de biotina. Estudios de resonancia magnética nuclear revelaron que en el cerebro de los pacientes afectados existe una destrucción progresiva de las cabezas del caudato central y una pérdida parcial del putamen por lo que a este padecimiento se le denominó enfermedad de ganglio basal (EGB) (77).

La existencia de familias en las que más de un miembro está afectado por la EGB indica que este desorden tiene un componente genético. La característica más notable de esta enfermedad es que el avance de los síntomas puede detenerse suministrando a los pacientes cantidades farmacológicas de biotina (5-10mg/Kg./día) como en pacientes con DMC. Sin embargo, la caracterización bioquímica y molecular de individuos afectados ha demostrado que la EGB no es causada por deficiencia de la actividad de HCS o biotinidasa. Aun más interesante es el hecho de que la actividad de carboxilasas dependientes de biotina es normal en leucocitos e hígado lo que sugiere que los pacientes no padecen de deficiencia de biotina. Debido a estas observaciones, se ha sugerido que la etiología del padecimiento puede estar relacionado con un defecto en el transporte de biotina a través de la barrera hematoencefálica, sin embargo, se necesitan estudios más especializados para determinar la causa real de esta enfermedad (77).

d. Efectos teratogénicos causados por la deficiencia de biotina.

Recientemente Mock y colaboradores han estudiado el efecto de la deficiencia de biotina en el desarrollo embrionario en animales de laboratorio. En el pollo, la deficiencia de biotina resulta en una elevada mortalidad embrionaria, cronodistrofia, perosis, micromelia y sindactilia (78). En algunas líneas de ratón, la deficiencia de biotina durante el desarrollo embrionario causa un incremento substancial en malformaciones (79). En un estudio publicado por Watanabe et.al., se reporta que el 94% de los ratones gestados en condiciones de deficiencia de biotina, presentaron malformaciones genéticas entre las que se incluyen labio paladar hendido (94%), micrognatia (85%) y micromelia (41%). Se ha sugerido que la diferencia en susceptibilidad a desarrollar malformaciones congénitas entre especies de roedores puede estar relacionada a diferencias en el transporte de biotina de la madre al feto. El resultado más notable de estos estudios es la demostración que el número de malformaciones congénitas se eleva, aún cuando la deficiencia de biotina es marginal. En estos animales la actividad de carboxilasas está dentro de valores normales lo que descarta que el efecto teratogénico pueda deberse a la acumulación de intermediarios de las vías de las carboxilasas (78, 80-82). Como se describirá en detalle en el capítulo III, estos resultados podrían estar relacionados a la actividad transcripcional de la biotina.

Los descubrimientos de Mock son particularmente importantes ya que se ha demostrado por estudios realizados en Estados Unidos, que las mujeres desarrollan ciertos niveles de deficiencia de biotina durante el embarazo (83). En México, donde los niveles de desnutrición son alarmantes es posible que la deficiencia de biotina durante el embarazo sea mucho más común que en las poblaciones estudiadas por Mock. Algunas de las malformaciones congénitas observadas en animales de laboratorio, como labio y paladar hendido, son muy comunes en el hombre, y es importante considerar la posibilidad de que la deficiencia de biotina podría ser la causa en algunas ocasiones.

4. Más allá del papel enzimático de la biotina.

En los últimos treinta años, los resultados de diversos grupos de investigación han puesto en duda que la biotina participa en diferentes procesos celulares únicamente como cofactor de carboxilasas. Estas observaciones incluyen la expresión dependiente de biotina de varias enzimas hepáticas, el efecto de la vitamina sobre la síntesis de ADN y ARN y la presencia de biotina en el núcleo celular y biotinilación de histonas (84-90). Estos resultados no pueden ser explicados con base a la función “clásica” de la biotina en el metabolismo intermediario por lo que se ha sugerido que la vitamina participa en otros procesos celulares (Tabla 1).

a. Efecto de la biotina sobre la expresión genética.

Glucocinasa hepática. En un estudio inicial realizado en ratas alimentadas con una dieta libre de biotina se demostró que la deficiencia de biotina genera una disminución en la actividad de la enzima glucocinasa hepática (GK), este efecto era revertido en presencia de biotina en la dieta, generando un incremento de 3 a 4 veces con respecto a su control (91). Resultados similares fueron obtenidos en hígados de ratas alimentadas con una dieta libre de biotina, en estos experimentos, los niveles de ARNm del gene de la GK aumentaron 19 veces en un lapso de tiempo de una hora con respecto a su control (niveles obtenidos en condiciones de deficiencia de biotina), cuando las ratas deficientes eran estimuladas intraperitonealmente con biotina, pasado este tiempo, el efecto sobre los niveles de ARNm disminuyó y a las 4 horas el efecto fue difícilmente detectable. En este modelo, también la actividad transcripcional del gene de GK fue evaluado por medio de un ensayo de run-on, en donde se observó un incremento de 6.7 veces en la expresión del gene después de la administración de biotina (94).

Genes afectados por biotina	Efecto mediado por biotina	Vía metabólica involucrada
Glucocinasa hepática (91)	Transcripcional ↑	Glicólisis
Fosfofructocinasa (92)	Postranscripcional?? ↑	Glicólisis
Piruvato kinasa (92)	Postranscripcional?? ↑	Glicólisis
Ornitina Transcarbamilasa (93)	Transcripcional ↑	Ciclo de la urea
Guanilato ciclasa soluble y GMPc (88)	Postranscripcional ↑	Múltiples vías
Fosfoenol piruvato carboxikinasa (94)	Transcripcional ↓	Gluconeogénesis
Receptor de asiologlicoproteinas (95)	Postranscripcional ↑	Endocitosis de glicoproteínas
Holocarboxilasa sintetasa (57, 96)	Transcripcional ↑	Ciclo de utilización de biotina
Aceti-CoA carboxilasa 1 (57)	Transcripcional ↑	Ciclo de utilización de biotina
Propionil- CoA carboxilasa (57)	Transcripcional ↑	Ciclo de utilización de biotina
Metilcrotonil-CoA carboxilasa (97)	Transcripcional ↑	Ciclo de utilización de biotina
IL-1 β (97)	Transcripcional ↑	Respuesta inmune
Interferon- γ (97)	Transcripcional ↑	Respuesta inmune
IL-2 (97)	Transcripcional ↑	Respuesta inmune
IL-4 (97)	Transcripcional ↓	Respuesta inmune
N-ras (98)	Transcripcional ↑	Transducción de señales y expresión
N-myc (98)	Transcripcional ↑	Transducción de señales y expresión
raf (98)	Transcripcional ↑	Transducción de señales y expresión
<i>C-myb</i> (98)	<i>Transcripcional</i> ↑	Transducción de señales y expresión

Tabla 1. Durante los últimos 30 años, se ha demostrado la participación de la biotina en la regulación de la expresión de varios genes o en la actividad enzimática de sus productos.

Spence y Koudelka, demostraron que a una concentración de 10^{-6} M de biotina, la activación de GK era precedida por un aumento en los niveles intracelulares de GMPc en hepatocitos de rata (86, 99), 1984). Se ha demostrado también la actividad de GK en islotes pancreáticos en cultivo, en donde, los niveles de ARNm aumentaron en un 40 a 80% en presencia de 10^{-6} M de biotina. Se ha observado también un incremento en la secreción de insulina en presencia de biotina, los autores de este trabajo sugieren que la influencia de GK sobre la secreción de insulina en células beta pancreáticas parece ser incrementada por biotina a través del efecto transcripcional sobre GK (100) (Tabla 1).

Fosfofructocinasa y Piruvato kinasa. Durante el estudio del efecto de biotina sobre la glucocinasa, otras enzimas glicolíticas fueron igualmente estudiadas. Ensayos realizados en hígado de ratas normales y diabéticas, demostraron que la administración intraperitoneal de biotina a ratas diabéticas, restauraba a niveles normales (ratas control), la actividad de las enzimas fosfofructokinasa y piruvato kinasa (92). A pesar de la importancia de estos hallazgos, no hay más datos en la literatura acerca del papel biotina en la regulación de estas enzimas (Tabla 1).

Ornitina transcarbamilasa. Otra enzima hepática, pero no relacionada con el metabolismo de la glucosa es la ornitina transcarbamilasa (OTC), esta enzima juega un papel esencial en el metabolismo de arginina y en el ciclo de la urea. Maeda y colaboradores, utilizaron como modelo para su estudio, ratas Wistar alimentadas alrededor de 6 semanas con una dieta deficiente de biotina y rica en avidina, después de este tiempo, las ratas presentaron signos clásicos de la deficiencia de biotina como dermatitis y alopecia. La concentración de biotina en suero y la actividad de la carboxilasa ACC también fueron significativamente disminuidas en comparación con los valores obtenidos en ratas que recibieron una dosis intraperitoneal de biotina por día. Sin embargo, la concentración de amonio, ornitina y glutamina en plasma fueron mayor en ratas deficientes de biotina comparado con su control. No se detectó diferencia significativa en otros intermediarios del ciclo de la urea, pero sí una disminución del 30% en la actividad de la OTC. Los niveles de ARNm de la OTC en hígado de ratas deficientes de biotina disminuyeron en un 40% con respecto a los niveles obtenidos a

partir de hígados de rata control. Estos autores sugieren que la disminución de los niveles de ARNm y de la actividad de OTC están implicados en la manifestación clínica hiperamonemia presente en el cuadro clínico de individuos con deficiencia de biotina (93) (Tabla 1).

Guanilato ciclasa soluble y GMPc. En 1982, Vesely demostró que la biotina incrementaba la actividad de GMPc aproximadamente dos veces en hígado, colon, cerebelo, riñón y corazón de rata. En este mismo trabajo, Vesely demostró que el incremento en los niveles de GMPc es producto del aumento en la actividad de la guanilato ciclasa soluble (GCs), la cual incrementó de dos a tres veces en presencia de biotina en los órganos anteriormente citados. El efecto de biotina sobre la actividad de la GCs fue observado a concentraciones mínimas de biotina (0.1uM), mientras que los niveles más altos de actividad se observaron a una concentración de 1 uM (88). Estos datos fueron corroborados por el grupo de Spence y Koudelka en hepatocitos de rata, quienes observaron un aumento en la cantidad de GMPc al estimular a las células con biotina 1uM (99). Los estudios realizados para identificar el efecto de biotina en la expresión de ciertos genes como glucocinasa, hicieron suponer que biotina y GMPc actúan mediante un mismo mecanismo sobre la expresión génica. Estos resultados fueron corroborados por Bowers-Komro y De la Vega, al demostrar que el efecto de la biotina sobre glucocinasa hepática y el receptor de asialoglicoproteínas, es similar al estimular con GMPc (86, 101) (Tabla 1).

Fosfoenolpiruvato carboxikinasa. Aunque los resultados descritos anteriormente parecen indicar que la biotina funciona como activador de la transcripción de varios genes, hay evidencia que indica que esta vitamina también puede actuar como represor de la transcripción genética en células eucariontes. La enzima fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK) localizada en hígado y riñón participa en reacciones clave de la gluconeogénesis. Un estudio inicial realizado en ratas mantenidas en condiciones de deficiencia de biotina, demostró un incremento de 6.2 veces sobre los niveles de ARNm de la enzima hepática en comparación con las ratas alimentadas normalmente. En ratas Wistar diabéticas, el tratamiento con biotina parece tener un efecto inhibitorio de casi

85% en la transcripción del gen de la enzima hepática PEPCK a las 3 horas de haberse administrado biotina. Estudios paralelos han demostrado que la administración de insulina a ratas diabéticas disminuye el ARNm de PEPCK a un 10% (102). Es importante hacer notar que la biotina aparentemente tiene el mismo efecto que la insulina sobre la síntesis de ARNm de los genes de la GK y de la PEPCK aunque no hay bases para afirmar que ésta vitamina pudiera estar involucrada directamente en la regulación de gluconeogénesis (102) (Tabla 1).

Receptor de asialoglicoproteínas. En años recientes se ha demostrado que la biotina puede intervenir en la traducción del ARNm de ciertos genes. En 1988, Collins y col. demostraron que para que el receptor de asialoglicoproteínas (RAGP) se expresara de manera eficiente en células hepáticas HepG2 era necesario estimular a estas células con biotina a una concentración de $1 \times 10^{-8} \text{M}$ (95). En este estudio, los niveles de ARNm del RAGP no fueron afectados por la presencia de la vitamina pero si los niveles de proteína expresada (95, 101). También se ha reportado que la unión de insulina marcada con I^{125} a su receptor, disminuye alrededor de un 75% en la línea celular HepG2 y en la línea HuH-7 en condiciones de deficiencia de biotina, sin embargo, cuando estas células son estimuladas con biotina, la expresión del receptor de insulina es restaurada. Al igual que lo observado con el RAGP, no hubo diferencia en la abundancia del ARNm del receptor de insulina. Este resultado sugirió que biotina estaba implicada en la regulación postranscripcional del receptor de insulina (95, 103). El grupo de Stockert y cols, demostraron que además de biotina, el segundo mensajero GMPc participa en la regulación traduccional del RAGP, por medio de una cascada de transducción de señales en la que participan la proteína cinasa dependiente de GMPc y la proteína α -COP hiperfosforilada, esta última, se une a la región 5' del ARNm del RAGP estimulando su traducción en células de cultivo (101) (Tabla 1).

Interleucinas y oncogenes. El grupo de Zemleni y colaboradores han estudiado la participación de biotina en la expresión de citocinas en el sistema inmune por medio de microarreglos y ensayos de rt-PCR. Los genes de IL-1 β e interferon- γ incrementan en respuesta a la suplementación de biotina 5.6 y 4.3 veces respectivamente en células

mononucleares de sangre periférica obtenidas de individuos sanos después de la suplementación con biotina por 21 días. Sin embargo, la expresión de IL-4 bajo estas mismas condiciones, fue 6.8 veces mayor previo a la suplementación con biotina (97). En el caso de IL-2, la secreción extracelular de esta citosina fue cuantificada en células Jurkat (células T humanas) cultivadas en condiciones de deficiencia, fisiológicas y farmacológicas de biotina y se observó que la secreción aparente de IL-2 incrementa en respuesta a la deficiencia de biotina, a pesar de que los niveles de ARNm de esta interleucina respondieron en proporción a la cantidad de biotina en el medio. Estos resultados sugirieron a los autores, que el incremento aparente en la secreción de IL-2 en condiciones de deficiencia de biotina, no fue causado por un incremento en la transcripción del gene de IL-2, si no que, el efecto de biotina en la secreción aparente de IL-2 pudo haber sido resultado de la regulación del proceso de endocitosis mediado por su receptor. Este dato fue confirmado por el mismo grupo al determinar los niveles de ARNm y proteína del receptor y de IL-2, en ambos casos, se observó una disminución en los niveles en condiciones de deficiencia de biotina y una recuperación cuando los niveles de biotina se encontraban elevados, sugiriendo así, una regulación dependiente de biotina a nivel transcripcional del receptor de IL-2 (104) (Tabla 1).

Existe también evidencia de oncogenes regulados por biotina en células cancerosas de pulmón tal como c-myb, N-ras, raf y N-Myc, siendo este último el que presenta mayor dependencia a biotina, sin embargo, la implicación directa de este efecto aún se desconoce (98) (Tabla 1).

Carboxilasas dependientes de biotina y holocarboxilasa sintetasa. Recientemente se demostró que la biotina también participa en la regulación de enzimas implicadas en el ciclo de biotina. Rodríguez-Meléndez y colaboradores, demostraron en un modelo de ratas Wistar alimentadas con una dieta deficiente de biotina por 8 semanas, que la actividad y masa proteica de las enzimas PCC y PC disminuían considerablemente en hígado, riñón y músculo, siendo cerebro, el órgano menos afectado por las condiciones de deficiencia de biotina (105). A pesar de la disminución en la actividad de estas enzimas, los niveles de ARNm de PCC y PC no se vieron afectados. Estos resultados sugirieron a

los autores una posible regulación a nivel postranscripcional. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos en las carboxilasas dependientes de biotina, los mismos autores reportaron que la deficiencia de biotina ocasionaba una reducción en el ARNm de la enzima HCS en los cuatro órganos anteriormente citados, siendo esta reducción más marcada en hígado y riñón. En ratas a las que se les administró biotina intraperitonealmente, los niveles de ARNm fueron similares a los obtenidos en ratas control 24 horas después de la administración de biotina, sugiriendo una regulación del ARNm de HCS a nivel transcripcional (105). El efecto de biotina sobre la expresión de la carboxilasa MCC, también ha sido estudiado, Wiedmann y col. utilizaron como modelo células mononucleares de sangre periférica aisladas de adultos sanos antes y después de la suplementación con 8.8µmol de biotina por 21 días. Por medio de la técnica de microarreglos y confirmado por rt-PCR, los niveles de ARNm de MCC fueron 8.9 veces mayor en células post-suplementadas con respecto a células presuplementadas (97) (Tabla 1).

b. Efecto de la biotina sobre la síntesis de ADN, ARN y proliferación celular.

Además del efecto de biotina en la expresión genética de ciertas enzimas, el grupo de Dakshinamurti y cols, demostraron que células HeLa ^{en} condiciones de deficiencia de biotina, presentan una reducción en la síntesis de proteínas, síntesis de DNA y proliferación. La adición de biotina a estas células resultó en la restauración de los niveles normales de proteínas, DNA y crecimiento celular. Estos datos sugirieron a los autores que en condiciones de deficiencia de biotina, puede haber un arresto en la fase G-1 del ciclo celular y que este bloqueo es removido después de la adición de biotina al medio (106). Este mismo grupo, reportó en 1988, en células HeLa y fibroblastos humanos, una reducción en la actividad de ARN polimerasa II, la actividad de esta enzima se vio restaurada en un 60-70%, 6 horas después de adicionar 1×10^{-8} M de biotina al medio de cultivo (85). Otro grupo de trabajo ha demostrado que en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en proliferación, hay un incremento de tres

veces en la acumulación de biotina en la fase G1, S, G2 y M del ciclo celular, con respecto a células quiescentes, estos datos sugirieron que estados de proliferación incrementa la demanda de biotina en la célula (107).

c. Modificación de histonas como un proceso dependiente de biotina.

La enzima biotinidasa implicada en la biotinilación de histonas.

En 1976 Petrelli y colaboradores demostraron por medio de ensayos electroforéticos a partir de fraccionamiento de histonas obtenidas de hígado de ratas alimentadas con una dieta deficiente de biotina comparadas con ratas control, que las histonas muestran una menor afinidad por la molécula de ADN en condiciones de deficiencia de biotina. Las histonas son proteínas que median el plegamiento del ADN en cromatina y son importantes en la regulación de la transcripción y replicación del ADN. Se han identificado 5 clases de histonas: H1, H2a, H2b, H3 y H4. Estas proteínas son modificadas postranscripcionalmente por acetilación, metilación, fosforilación y ADP-ribosilación. Estas modificaciones afectan los procesos de transcripción, replicación, y reparación del ADN. El grupo de Petrelli y colaboradores también demostraron que la deficiencia de biotina genera una disminución en la fosforilación de todas las histonas, principalmente en la Histona H1. La metilación de las histonas también fue afectada en condiciones de deficiencia de biotina, mientras que un aumento en la acetilación de histonas fue observado principalmente en histonas H3, H2A y H4 (84).

Recientemente, Hymes, Wolf y colaboradores, demostraron que la biotinidasa puede transferir biotina a las histonas in vitro utilizando como sustrato biocitina y en condiciones de pH fisiológico. Para demostrar este hecho, Hymes y colaboradores, incubaron a la histona H2A extraída del timo de ternera en presencia o ausencia de biocitina obtenida de suero normal y de un paciente con deficiencia severa de biotinidasa. Utilizando ensayos de western blot, se detectó la biotinilación de la histona H2A sólo cuando fue incubada en presencia de suero normal (73, 108). Un dato

interesante es que el 25% de la actividad de biotinidasa se encuentra localizada en la fracción nuclear (109). El proceso de biotinilación de histonas abre la posibilidad de que la biotina pueda tener algún papel en la transcripción y replicación del ADN por analogía con otras modificaciones postranscripcionales. La biotinilación de histonas también ha sido detectada en ensayos *in vitro*, Zempleni y colaboradores demostraron por medio de ensayos de western-blot en presencia de estreptavidina-peroxidasa, que un análogo de biotina (sulfosuccinimidobiotina), biotinila las cinco clases de histonas, siendo el grado de biotinilación 200 veces mayor en las histonas H1, H2a y H2b que en las histonas H3 y H4 (110).

En otro estudio realizado, Stanley y colaboradores demostraron en un ensayo de biotinilación *in vitro*, a partir de histonas aisladas de células PBMC humanas, que la proliferación de PBMC responde a un incremento en la biotinilación de histonas y que este incremento es generalizado para todas las histonas. Con respecto al ciclo celular, el proceso de biotinilación de histonas fue incrementado en la fase temprana de G1 y continuó durante las fases S, G2 y M, en comparación con células quiescentes. Estos resultados generaron controversia a los autores, quienes suponían que la biotinilación de histonas estaba involucrado en procesos específicos que ocurren en diferentes fases del ciclo celular, por ejemplo, la activación de ADN durante la fase G1 y reparación de ADN durante la fase G2. En este ensayo también se demostró que todas las histonas son biotiniladas en el mismo grado durante las diferentes fases del ciclo celular (111).

La enzima holocarboxilasa sintetasa en el núcleo.

Recientemente Gravel y colaboradores demostraron por medio de estudios de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos dirigidos contra secuencias peptídicas amino y carboxilo terminal de HCS humana, que la mayor parte de la enzima HCS se encuentra en el núcleo celular. La enzima HCS se encuentra asociada a estructuras macromoleculares que se agregan cerca de la cromatina y muy probablemente a la proteína lamina B. La participación de la HCS en estas estructuras nucleares cambia de

acuerdo al estadio del ciclo celular lo que llevo a los autores a sugerir la participación de HCS en la dinámica de ensamble y desensamble de la cromatina. Se ha encontrado también en ensayos *in vitro*, que HCS nuclear participa directamente en la biotinilación de las cinco clases de histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4), estos datos fueron confirmados por estudios realizados en fibroblastos de pacientes con deficiencia en la actividad de HCS, en los cuales se observó una reducción dramática en la biotinilación de histonas (112).

Por análisis de secuencia de histonas, se ha reportado que las histonas no presentan la secuencia consenso de unión a biotina presente en las carboxilasas dependientes de biotina (AMKM), sin embargo, contienen residuos de Lys en forma abundante, que es el aminoácido específico al cual se une la biotina, por lo que se especula que puede haber secuencias de unión a biotina diferentes a la secuencia consenso reportada para biotinilación de carboxilasas (112). Otro hallazgo importante, es la aparente unión covalente de biotina a HCS. Por medio de ensayos electroforéticos, se observó que biotina unida o no unida a HCS genera un impacto conformacional con un cambio aparente en la masa molecular de 68 contra 66 kDa respectivamente. Una posible explicación de la "auto-biotinilación" de HCS es que la unión covalente de biotina pueda servir como un intermediario de la transferencia de biotina, un mecanismo distinto al observado en carboxilasas. Narang y colaboradores, sugieren que el papel clásico de HCS hasta ahora conocido como catalizador en la activación de carboxilasas, debe ser re-evaluado ahora con una posible función adicional en la expresión génica y regulación de la transcripción (112).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los datos acumulados durante los últimos 30 años indican que la vitamina biotina participa en varios procesos celulares además de su papel como cofactor de carboxilasas. Sin embargo, estos procesos y los mecanismos moleculares involucrados se desconocen.

La identificación de estos mecanismos de acción de la biotina, es una prioridad en el campo de la nutrición humana, que permitirá comprender la importancia de esta vitamina en el metabolismo y el desarrollo humano, así como explicar la etiología de las enfermedades en las cuales la biotina o su utilización se encuentran involucradas.

OBJETIVOS.

En este trabajo se propone identificar el mecanismo por el cual la biotina actúa como un activador transcripcional de enzimas implicadas en el ciclo de utilización de biotina y determinar el papel fisiológico de este tipo de regulación transcripcional.

CAPÍTULO II

La regulación transcripcional
dependiente de biotina y la
holocarboxilasa sintetasa.

PREFACIO AL CAPÍTULO II

Como se describió en el capítulo anterior, diversas investigaciones han puesto de manifiesto que la biotina está involucrada en procesos celulares diferentes a su papel clásico como cofactor de carboxilasas. El efecto de la biotina sobre la expresión genética fue demostrado en varias especies y modelos experimentales que incluyen células en cultivo y animales de laboratorio. Sin embargo, el mecanismo por el cual esta vitamina hidrosoluble modifica la expresión de proteínas hepáticas era desconocido.

Uno de los objetivos de la línea de investigación del laboratorio del Dr. León Del Río era identificar el mecanismo por el cual la biotina actúa como un activador transcripcional y caracterizar el papel fisiológico de este tipo de regulación de la expresión genética.

En el siguiente capítulo se describe la participación de biotina en la activación de una cascada de transducción de señales en la que participan la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS), el compuesto intermediario de biotinilación adenilato de biotina (B-AMP), la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs), el segundo mensajero GMPc y la proteína cinasa dependiente de GMPc (GMPc). La activación de esta vía tiene por resultado la regulación de los niveles de ARNm enzimas que participan en el ciclo de utilización de biotina como HCS, ACC-1 y PCC.

Los datos presentados en este capítulo forman parte de la investigación del Dr. Sergio Solórzano Vargas, estudiante del Dr. León Del Río y en la que yo participé activamente al comenzar mi entrenamiento doctoral en el laboratorio. El Dr. Solórzano amablemente me ha permitido presentar estos resultados ya que son la base de mi trabajo doctoral como será descrito en el capítulo III.

Los resultados de este capítulo fueron publicados como un artículo de investigación original del cual soy coautor en la revista *Proceedings of the National Academy of Sciences* bajo el título: **Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in**

biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. Solórzano-Vargas S., Pacheco-Alvarez, D., León Del Río A. (2002), *Proc. Natl Acad Sci, USA*, 99(8):5325-5330.

INTRODUCCIÓN.

La biotina es una vitamina hidrosoluble presente en todos los organismos y cuya función es la de actuar como cofactor de enzimas conocidas como carboxilasas dependientes de biotina (1). La unión covalente de biotina a estas proteínas es catalizada por ligasas de biotina. En procariontes esta ligasa es conocida como proteína BirA (2, 3) y en eucariontes como holocarboxilasa sintetasa (HCS) (1). Las enzimas BirA y HCS, llevan a cabo la biotinilación de carboxilasas en una reacción de dos pasos, dependientes de ATP. El primer paso, involucra la síntesis del intermediario biotinoil-5'-AMP (B-AMP) (4, 5). En la segunda fase de la reacción, el B-AMP, es utilizado para transferir a la biotina a un amino ácido lisina específico localizado en una región altamente conservada en las apocarboxilasas (6-10).

La mayor parte de lo que sabemos acerca de la biotina y del papel de HCS en el metabolismo humano, proviene de estudios realizados en pacientes con deficiencia en la actividad de HCS. Esta enfermedad se conoce como la forma neonatal de la deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC) y se caracteriza por cetoacidosis y acidemia orgánica (11). Estos pacientes presentan una reducción en la actividad de todas las carboxilasas dependientes de biotina: propionil-CoA carboxilasa (PCC), piruvato carboxilasa (PC), meticrotonil-CoA carboxilasa (MCC) y acetil-CoA carboxilasa (ACC) (12-14). En estos pacientes, la interrupción de gluconeogénesis, metabolismo de ácidos grasos y catabolismo de aminoácidos es potencialmente letal pero sus manifestaciones pueden ser revertidas con dosis farmacológicas de biotina. La actividad de la enzima HCS de la mayoría de los individuos afectados presenta una baja afinidad por biotina, siendo la K_m de la enzima mutante 3-70 veces mayor que el valor de la enzima normal (15, 16). Las mutaciones encontradas en la mayoría de los pacientes se localizan en el dominio de unión a biotina de la HCS (16, 17). El resultado es una fuerte reducción en la habilidad de las células para producir B-AMP (18).

Una diferencia remarcable entre las ligasas de biotina bacteriana y de eucariontes es la habilidad de la proteína BirA para utilizar a la biotina como un correpresor

transcripcional de los cinco genes que constituyen al operón de biotina (19). Cuando un cultivo bacteriano crece en un medio rico de biotina, el B-AMP se acumula en la célula y permanece unido a BirA. El complejo Bir-A-AMP, reconoce una secuencia de ADN específica en el promotor del operón de biotina a través del dominio H-L-H localizado a la mitad del extremo N-terminal de la proteína y reprime la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de biotina (20).

En años recientes, se ha sugerido que la biotina también participa en otros procesos celulares en organismos eucariontes como la regulación transcripcional y traduccional de la expresión genética o de la actividad de algunas enzimas hepáticas. En estos estudios, la biotina parece aumentar la actividad enzimática de glucocinasa y la transcripción de su gen en ensayos *in vitro* utilizando células β de páncreas y hepatocitos de rata (21-23). De manera similar, los niveles de ARNm de la enzima 6-fosfofructocinasa son incrementados después de la administración de la vitamina a ratas deficientes de biotina (24, 25). En cultivos de hepatocitos humanos, la biotina parece ser requerida para promover la traducción del ARNm del receptor de asialoglicoproteínas (RASG) (26). Recientemente se demostró que la deficiencia de biotina en ratas reduce la cantidad y actividad enzimática de las carboxilasas PCC y PC, al igual que los niveles de ARNm de la HCS, la enzima responsable de la biotinilación de estas proteínas (27).

Con base en la homología funcional y estructural de las proteínas HCS y BirA (7, 10, 28), en este estudio hemos investigado la posibilidad de que HCS pueda tener un papel determinante sobre los niveles de ARNm de diferentes genes en células eucariotas en respuesta a biotina. En este trabajo demostramos que células humanas requieren de la actividad de HCS para incrementar los niveles de ARNm de HCS, ACC-1 y la subunidad α de PCC (PCCA) en respuesta a la presencia de biotina. Los resultados sugieren que el mecanismo responsable del efecto de biotina sobre los niveles de ARNm requiere la activación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) y de la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG).

MATERIAL Y MÉTODOS.

Materiales. Biotina, 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate (8-Br-cGMP), 1-H (1,2,4) oxadiazolo-[4,3-a]quinaxolin-1-one (ODQ) y actinomicina-D fueron adquiridos a la Compañía Sigma. Rp-8(4-clorofenylthio)-guanosine-3',5'-cyclic monophosphorothiate (Rp-8-pCPT-cGMPS fueron de Biolog, San Diego, CA.

La línea celular de hepatoblastoma humano, HepG2 fue obtenida de American Type Cell Collection. Los fibroblastos humanos normales y fibroblastos de pacientes con DMC (MCD-MK y MCD-VE) fueron donados por el Dr. Roy Gravel (University of Calgary, Alberta, Canadá (16).

PCR-transcriptasa reversa. El ARN total fue aislado a partir de cultivos celulares utilizando el reactivo Trizol (Gibco/BRL, life technology, Heidelberg, Alemania). El ARN fue tratado por 1 hr a 37°C con 6 unidades de ribonucleasa libre de DNAsa en una solución de 100 mM de Tris-HCl, pH 7.5 y 50 mM de MgCl₂ y en presencia de 2U/μl del inhibidor de RNAsa. La concentración de ARN fue determinada por absorbancia a 260nm y la integridad de las muestras se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. A partir de 5 μg de ARN total se sintetizó cDNA utilizando la enzima superscript II transcriptasa reversa (GIBCO/BRL) y 0.8 μM de oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes estudiados. Un control de reacción sin transcriptasa reversa fue utilizada para cada una de las muestras de ARN, con el fin de verificar que los productos de PCR no fueran el resultado de contaminación por ADN genómico. El tamaño de los fragmentos de cDNA obtenidos fue entre 200 y 500 pb. La amplificación de cDNA por PCR se realizó en 30 μl de buffer (50mM KCl/150 mM MgCl₂/10 mM Tris-HCl, pH 9.0) que contenía 100 pmol de oligonucleótidos sentido y antisentido y 0.3 ul del enzima *Taq* polimerasa (Perkin-Elmer). Los oligonucleótidos utilizados fueron: **HCS:** 5'-CCC GAG CTC CGT CTC CTG GAT CGG-3' y 5'-CCC AAG CCT TTT ACC GCC GTT TGG GGA-3' [temperatura de alineamiento (T_m) = 58°C]; **ACC-1:** 5'-GAT GTA CAT CGG CTG AGT GA- 3' y 5'-ATC CAT TCA TTA CAT TGA CC- 3' (T_m = 58°C); **ACC-2:** 5'-CCT AAA GGT GAC CCG GAG T-3' y 5'- AAA AAG CCA CTC ATG ACG TT-3' (T_m : 60°C); **PCCA:** 5'-CCC CGA TGC CCG GAG GTG GT-3' y 5'-TAT

TTC CAG CTC CAG AGC AG-3' (T_m T_m :60°C); **B-actina**: 5'- GGG TCA GAA TTC CTA TG- 3' y 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' (T_m =58°C).

Densitometría por fluorescencia. Los productos de PCR fueron separados por electrocromatografía en geles de agarosa 1% y teñidos con bromuro de etidio al 1%. La cantidad de producto de PCR fue determinado por análisis densitométrico utilizando el equipo analizador de imágenes Fluor-S-imager (Bio-Rad). El procedimiento fue validado en estudios previos por medio de la amplificación por PCR de fragmentos de cDNA de HCS, PCCA y B-actina a diferentes concentraciones (dato no mostrado). El número de ciclos utilizados en la amplificación por PCR fue específico para cada gene y se realizó un análisis densitométrico en todos los casos para asegurar la amplificación de productos de PCR en fase exponencial. Por cada experimento, el ARNm del gen constitutivo de β -actina fue utilizado como transcrito de referencia. (Figs. 1 y 2).

Efecto de la deficiencia de biotina sobre los niveles de ARNm. Las células humanas HepG2 fueron cultivadas a 37C con 5% de CO₂ en 5 ml de medio α -MEM el cual contiene altos niveles de glucosa (Gibco/BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado, L-glutamina 2mM, penicilina 100 unidades/ml, y estreptomycinina 100 μ g/ml. Para los experimentos realizados en condiciones de deficiencia de biotina las células fueron cultivadas en medio MEM libre de biotina suplementado con 10% SFB dializado (GIBCO/BRL). Las células HepG2 fueron cultivadas en este medio hasta por 20 días. El ARN total fue extraído a diferentes tiempos y los niveles de ARNm de HCS, ACC-1, ACC-2, PCCA y β -actina fueron determinados por densitometría de fluorescencia como se describió anteriormente. Los cultivos celulares mantenidos en condiciones de deficiencia de biotina por 15 días, alcanzaban una confluencia del 70-80% y presentaban morfología normal.

Efecto de biotina y GMPc sobre los niveles de ARNm en células deficientes de biotina. Las células HepG2 cultivadas en medio libre de biotina por 15 días fueron estimuladas con biotina 1 μ M o con el compuesto 8-Br-cGMP (1mM), un análogo no hidrolizable de GMPc. Las células fueron cosechadas después de 2, 4, 6, 12 ó 24 hr de

tratamiento y los niveles de ARNm de los diferentes genes fueron analizados como se describió anteriormente. Para determinar el efecto de la GCs sobre los niveles de ARNm, las células HepG2 deficientes de biotina fueron tratadas por 3 hr con 50 μ M de ODQ, un inhibidor específico de la GCs (29). Después de este periodo, se añadió 1 μ M de biotina al medio y las células siguieron incubándose por un periodo de 24h. El efecto de ODQ sobre los niveles de ARNm fue comparado con los niveles obtenidos de células deficientes de biotina estimuladas con biotina sin ODQ y células mantenidas en medio normal (células control).

Estimulación de biotina sobre los niveles de ARNm después de la inhibición de la RNA polimerasa II. Las células HepG2 deficientes de biotina fueron tratadas con 10 μ M de actinomicina-D por 1 h (30). Pasado este tiempo, se añadió biotina al medio a una concentración final de 1 μ M, 24 h después, el ARN total fue extraído. Los niveles de ARNm fueron comparados con los datos obtenidos a partir de células deficientes de biotina estimuladas solamente con actinomicina-D y células no estimuladas con el inhibidor de RNA polimerasa II.

Efecto de la inhibición de la proteína cinasa dependiente de GMPc. Las células HepG2 fueron cultivadas en medio libre de biotina por 15 días y tratadas por 1h con 10 μ M de Rp-8-pCPT-cGMPs, un inhibidor específico de la proteína cinasa dependiente de GMPc (29). Después de este periodo, se añadió biotina a una concentración final de 1 μ M y la incubación de las células se continuó por 24 horas más. El ARN total fue aislado y los niveles de ARNm fueron determinados como se especificó anteriormente.

Efecto de biotina y GMPc sobre los niveles de ARNm de HCS en cultivos de fibroblastos. Los fibroblastos normales y de pacientes con DMC fueron incubados en medio libre de biotina por 15 días. Las células fueron tratadas con 0, 0.01, 0.1, 1.0 μ M de biotina por 24 h. El ARN total fue aislado y los niveles de ARNm de HCS fueron determinados por densitometría de fluorescencia de los productos de PCR obtenidos por transcripción reversa. Experimentos similares fueron realizados en estas líneas celulares en presencia de 0.01, 0.1 ó 1 mM de 8-Br-cGMP.

Análisis estadístico. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y por lo menos en tres distintas ocasiones con diferentes muestras de ARN para el ensayo de rt-PCR. Los datos obtenidos a partir de la deficiencia de biotina sobre los niveles de ARNm, fueron normalizados con los niveles de ARNm de β -actina y expresados como porcentaje de los niveles de ARNm observados en células mantenidas en medio suplementado con biotina. Los datos son presentados como el promedio de tres experimentos diferentes \pm E.S.

RESULTADOS.

Efecto de la deficiencia de biotina sobre los niveles de ARNm en células HepG2. Para establecer un modelo de investigación del efecto de biotina sobre los niveles de ARNm, se trabajó en la línea celular de hepatoblastoma HepG2, la cual previamente había sido utilizada en estudios de regulación traduccional del RASG por biotina. En nuestros estudios, primero se determinó el efecto de tiempo de deficiencia biotina sobre los niveles de ARNm de HCS, PCCA, ACC-1 y ACC-2 en células HepG2. El ARN total fue aislado a diferentes tiempos y la cantidad de ARNm fue determinado como se describe en *material y métodos* (Ver Fig. 1A para un experimento representativo). La deficiencia de biotina generó una disminución gradual en los niveles de ARNm de HCS, PCCA y ACC-1 a 17-28% con respecto a los niveles iniciales (Fig. 1B). Los niveles de ARNm de ACC-1 y PCCA fueron afectados rápidamente, disminuyendo a 40% con respecto a los niveles iniciales a los 7 días de deficiencia, mientras que para HCS se requirieron de 11 días de tratamiento para observar estos mismos valores (Fig. 1B). Los niveles de ARNm de ACC-2 ó β -actina no fueron afectados durante el transcurso del experimento. Las células deficientes de biotina mostraron morfología y crecimiento normal a lo largo del experimento. Sin embargo, la incubación de células en medio libre de biotina por lapsos de tiempo más largos, produjo un incremento en muerte celular y los efectos sobre el ARNm fueron irreversibles después de 20 días. Como consecuencia de estos resultados, los experimentos realizados para determinar el efecto de biotina y

segundos mensajeros fueron realizados en células cultivadas en condiciones de deficiencia de biotina por 14 ó 15 días.

Efecto de la suplementación de biotina sobre los niveles de ARNm de HCS y carboxilasas. Para determinar si la reducción observada sobre los niveles de ARNm es específica de la deficiencia de biotina, se estimularon células HepG2 deficientes de biotina, con biotina 1.0 un a 2, 6, 12 ó 24 h. A pesar de que las incubaciones breves con biotina generaron incrementos significativos sobre los niveles de ARNm de HCS (dato no mostrado), fue hasta las 24 horas cuando se observaron niveles comparables a los reportados en células normales (Fig. 2A y 2B). La suplementación de biotina tuvo un efecto pronunciado sobre los niveles de ARNm de ACC-1 y PCCA comparado con niveles iniciales. En el caso de ACC-1 la suplementación de biotina no sólo restauró los niveles de ARNm, si no que tuvo un incremento del 40% sobre los niveles obtenidos en condiciones normales de biotina. De manera similar, el ARNm de PCCA incrementó un 30% sobre los niveles obtenidos en condiciones normales de biotina. El ARNm de HCS sólo alcanzó los niveles normales. En contraste, no hubo un cambio significativo en los niveles de ARNm de ACC-2 y β -Actina después de la estimulación con biotina (Fig. 2A y B).

Efecto de GMPc sobre los niveles de ARNm en células deficientes de biotina. Para explorar si la recuperación dependiente de biotina de los niveles de ARNm involucraba una vía de transducción de señales, se comparó el efecto de biotina y GMPc sobre la recuperación de los niveles de ARNm de HCS, ACC-1 y PCCA. Las células HepG2 deficientes de biotina fueron estimuladas con 1.0 mM de 8-Br-cGMP. Este tratamiento produjo la elevación de los niveles de ARNm de HCS a valores normales de manera similar a la recuperación obtenida al estimular las células con biotina (Fig. 2A y 2B). Es importante hacer notar que la estimulación con GMPc aumentó los niveles de ARNm de ACC-1 y PCCA un 35-38% sobre los valores control (Fig. 2A y 2B). Finalmente, el tratamiento con 8-Br-cGMP no tuvo efecto sobre los niveles de ARNm de ACC-2 y

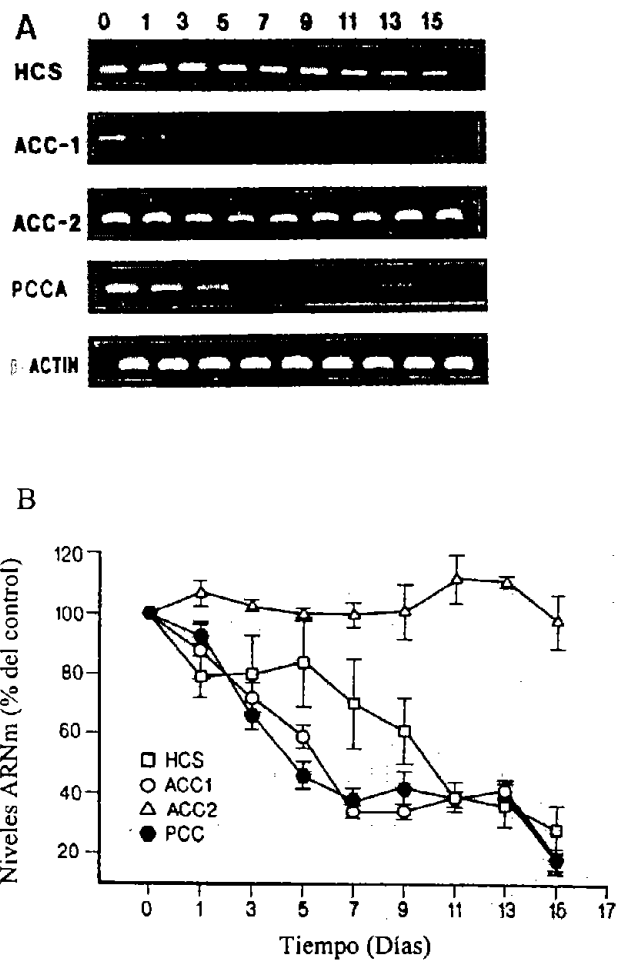


Fig. 1. Efecto dependiente de tiempo de la deficiencia de biotina sobre los niveles de ARNm. Células HepG2 fueron cultivadas en medio libre de biotina y el ARN total fue aislado a diferentes tiempos. Los ARNm de HCS, ACC-1, ACC-2 y PCCA fueron amplificados por PCR-transcriptasa reversa y cuantificados por análisis densitométrico como se describe en *materiales y métodos*. (A) Experimento representativo del efecto de la deficiencia de biotina a diferentes intervalos de tiempo sobre los niveles de ARNm de HCS, ACC-1, ACC-2 y PCCA. (B) Gráfica representativa de tres diferentes experimentos presentados como promedio \pm E.S.

actina (Fig. 2A y 2B). La estimulación simultánea con biotina y 8-Br-cGMP no produjo un efecto aditivo o cinérgico sobre los niveles de ARNm.

La enzima GCs media el efecto de biotina sobre los niveles de ARNm. Dada la aparente participación de GMPc como un mediador del efecto de biotina sobre los niveles de ARNm de HCS, ACC-1 y PCCA, decidimos estudiar si la inhibición de la GCs afectaría la recuperación dependiente de biotina de estos genes. Las células HepG2 deficientes de biotina fueron estimuladas por 24 h con biotina en presencia de ODQ como se describe en la sección de *materiales y métodos* (31), los valores obtenidos de ARNm de HCS, ACC-1 y PCCA fueron comparados con los datos obtenidos en células deficientes de biotina y células deficientes de biotina estimuladas con biotina por 24 h. Como se muestra en la **tabla 1**, la deficiencia de biotina (Bio Def) redujo los niveles de ARNm de HCS, ACC-1 y PCCA al 34-38% comparado con células control. La adición de biotina al medio (Bio Def+Bio) generó la recuperación de los niveles de ARNm a los niveles normales para HCS y por arriba de los valores normales para ACC1 y PCCA (Tabla 1). En contraste, la incubación de HepG2 con biotina y ODQ (ODQ+Bio) impidió la recuperación dependiente de biotina de los niveles de ARNm de HCS, ACC-1 y PCCA. Los resultados obtenidos en presencia de la inhibición de GCs fueron 11% para HCS, 36% para ACC-1 y 33% para PCCA (Tabla 1). Estos resultados puntualizan la participación de la GCs en la recuperación vía biotina ó GMPc de los niveles de ARNm. Estos datos también confirman que los niveles de ARNm de ACC-2 parecen no estar afectados de una manera significativa por la deficiencia o suplementación de biotina.

La proteína cinasa dependiente de GMPc puede estar involucrada en la recuperación dependiente de biotina de los niveles de ARNm, como blanco de la actividad de la GCs. Para determinar si el efecto de la biotina ocurre a través de la proteína cinasa dependiente de GMPc (29) se incubaron células HepG2 deficientes de biotina en presencia del inhibidor de la PKG, Rp-cGMPs (iPKG). Debido a que biotina y GMPc sólo afectan los niveles de ARNm de la HCS, ACC-1 y PCCA, en este ensayo no se incluyó a la enzima ACC-2. Los resultados obtenidos mostraron que a pesar de que

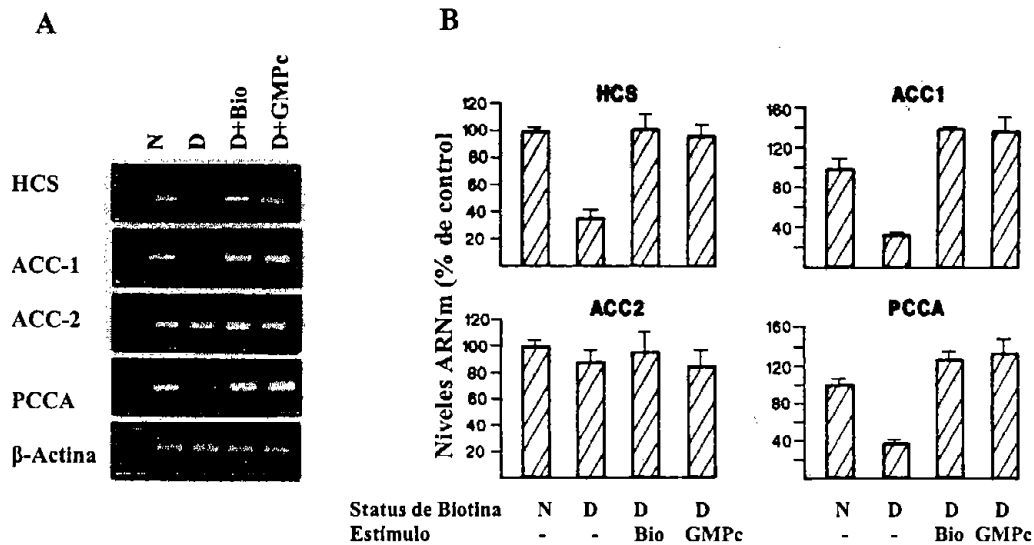


Fig. 2 Efecto de biotina y GMPC sobre los niveles de ARNm. Las células HepG2 cultivadas por 14 días en medio libre de biotina, fueron estimuladas con 1 μ M de biotina ó 1 mM de 8-Br-cGMP. Los niveles de ARNm de HCS, ACC-1, ACC-2, PCCA y β -actina fueron determinados como se describe en *materiales y métodos*. (A) Experimento representativo que muestra los niveles de ARNm en células cultivadas en condiciones normales de biotina (N), condiciones de deficiencia de biotina (D), deficiencia de biotina estimuladas con biotina (D+Bio), y células deficientes de biotina estimuladas con 8-Br-cGMP (D+GMPC). (B) Representación gráfica los datos obtenidos a partir de tres diferentes experimentos. Los resultados son representados como promedio \pm E.S.

la estimulación de células HepG2 con 1 μ M de biotina es suficiente para restaurar los niveles de ARNm a niveles normales o por encima de estos, la incubación en presencia del inhibidor de la PKG (iPKG + Bio) limitó de manera significativa la recuperación de los niveles de ARNm (Tabla 1).

La actinomicina-D impide la recuperación dependiente de biotina de los niveles de ARNm. La recuperación de los niveles de ARNm de HCS, ACC-1 y PCCA en respuesta a biotina fue estudiada en presencia de actinomicina-D. Las células HepG2 deficientes de biotina fueron preincubadas por 1h con actinomicina-D antes de estimularlas con biotina a una concentración de 1 μ M (Tabla 1). Los resultados obtenidos mostraron que los niveles de ARNm de HCS, ACC-1, ACC-2 y PCCA cayeron por debajo de los niveles obtenidos en medio libre de biotina, en las muestras que fueron incubadas con actinomicina-D. La adición de biotina no produjo efecto alguno sobre los niveles de ARNm y los resultados fueron muy similares a los obtenidos con células incubadas sólo con actinomicina-D (Tabla 1).

La actividad de la holocarboxilasa sintetasa es requerida para la recuperación dependiente de biotina de los niveles de ARNm de HCS. Debido a que biotina es el sustrato de la HCS, estudiamos si esta enzima está involucrada en la recuperación dependiente de biotina de los niveles de ARNm. El efecto de la concentración de biotina sobre los niveles de ARNm de HCS, ACC-1 y PCCA fue determinada en fibroblastos de individuos normales y los resultados obtenidos fueron comparados con los niveles de ARNm de fibroblastos de pacientes con mutaciones en la HCS que afectan la afinidad de la enzima por biotina. Los resultados obtenidos para los tres ARNm fueron similares, por lo que decidimos concentrarnos únicamente al estudio de HCS. En este experimento, se utilizaron dos líneas celulares mutantes, MCD-MK (MK) homocigota para la mutación R508W y MCD-VE (VE) que presenta las mutaciones L216R y V363D (16). Experimentos preliminares del efecto de biotina sobre los niveles de ARNm de HCS en células MK y VE mostraron patrones básicamente idénticos de respuesta a biotina (dato no mostrado). Por esta razón y por el hecho de que las células MCD-MK presentan un trasfondo genético homogéneo se decidió utilizar esta línea celular para examinar el papel

Tabla 1. Efecto de la inhibición de guanilato ciclasa soluble (GCs), proteína cinasa dependiente de GMPc y ARN polimerasa II sobre los niveles de ARNm.

ARNm	Def Bio%	Def Bio+Bio%	ODQ+Bio%	iPKG+Bio%	ActD+Bio%
HCS	36±5.0	103±9.87	11±0.68	52±2.51	25±6.0
ACC-1	34±1.15	140±2.21	36±5.0	26±9.53	14±7.24
PCCA	38±3.54	130±6.61	33±3.60	21±11.1	34±5.03
ACC-2	88±8.96	95±2.31	ND	ND	19±20

Las células deficientes de biotina HepG2, fueron estimuladas con biotina en presencia de ODQ (ODQ+Bio), Rp-cGMPs (iPKG +Bio) ó actinomicina-D. Los resultados son mostrados como porcentaje de los valores obtenidos en células cultivadas en medio normal y comparados con células deficientes de biotina (Def Bio) y células deficientes de biotina estimuladas con biotina sin inhibidores (Def Bio+Bio). ND, no determinado. Los resultados son de tres diferentes experimentos mostrados como promedio ± E. S.

de la HCS sobre los niveles de ARNm en respuesta a biotina. En la Fig. 3 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de biotina sobre la recuperación de los niveles de ARNm de HCS en células normales y MCD-MK. La deficiencia de biotina disminuyó los niveles de ARNm de HCS a 35% con respecto a los valores control en ambas líneas celulares. La adición de biotina 0.01 μ M incrementó los niveles de ARNm al 78% con respecto a los valores control, mientras que las células MCD-MK no mostraron un incremento significativo (38%). Al aumentar 10 veces la concentración de biotina (0.1 μ M) se observó un aumento en los niveles de ARNm de HCS a 87% de los valores control en fibroblastos normales y a 53% en células MCD-MK. Los niveles de ARNm de HCS en fibroblastos normales y MCD-MK fueron similares cuando fueron estimuladas con 1 μ M de biotina (118% y 93% respectivamente).

Efecto de GMPc sobre la recuperación de los niveles de ARNm en células MCD-MK. Para analizar si la recuperación dependiente de GMPc de los niveles de ARNm de HCS es afectada por la presencia de la enzima HCS mutante, se utilizaron diferentes concentraciones de 8-Br-cGMP (0.01mM, 0.1mM y 1.0 mM) para estimular fibroblastos normales y mutantes (MCD-MK). Ambas líneas celulares no mostraron cambios en los niveles de ARNm cuando fueron incubadas con 0.01mM y 0.1mM de 8-Br-cGMP (dato no mostrado). La mayor concentración de 8-Br-cGMP utilizada (1.0 mM), produjo una recuperación de los niveles de ARNm de HCS del 117% y 92% en células normales y MCD-MK, respectivamente (Tabla 2).

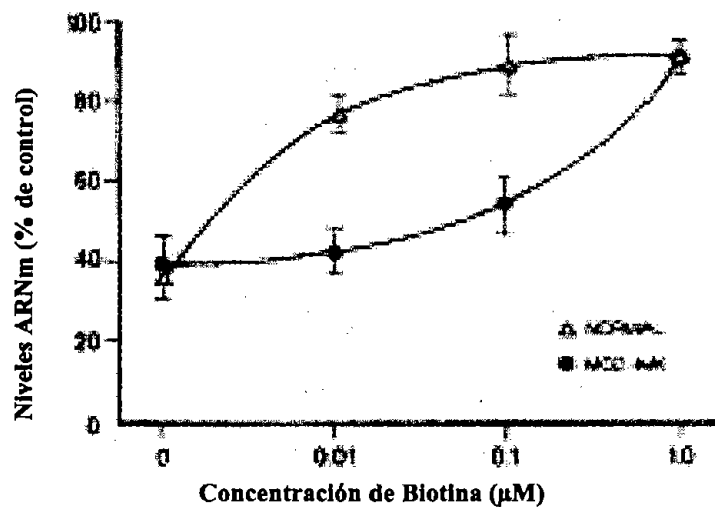


Fig. 3 Efecto de la concentración de biotina sobre los niveles de ARNm de HCS en fibroblastos normales y fibroblastos DMC. Las células normales y MCD-MK, fueron cultivadas en medio libre de biotina por 14 días. Después de este periodo, las células fueron estimuladas con 0.01 µM, 0.1µM y 1 µM de biotina por 24 h. Los niveles de ARNm de HCS fueron determinados como se describe en *materiales y métodos*. Los resultados son representados como el porcentaje de los niveles de ARNm observados en células mantenidas en medio con biotina y normalizados con los niveles de ARNm de β-actina. Los datos son de tres diferentes experimentos y se muestran como promedio ± E.S.

Tabla 2. Efecto de GMPc sobre los niveles de ARNm en células normales y MCD-MK.

Fibroblastos	Def Bio %	Def Bio +GMPc%
Normal	34±7.6	117±1.5
MCD-MK	38±12.6	92±9.24

Las células MCD deficientes de biotina y fibroblastos normales fueron estimulados con 1.0 mM de 8-Br-cGMP. Los datos son de tres diferentes experimentos y son mostrados como promedio ± E.S.

DISCUSIÓN

En el pasado, varios estudios han demostrado que la biotina, además de su papel como cofactor de carboxilasas, también influye en la expresión génica a nivel transcripcional y traduccional. Estos trabajos incluyen un papel en la regulación transcripcional y traduccional del RASG y del receptor de insulina. Recientemente se ha demostrado que la biotina regula los niveles de ARNm de HCS y los niveles de proteína de dos carboxilasas en hígado de rata. En este estudio, se ha examinado el papel de la HCS en la regulación genética mediada por biotina y se ha mostrado que la acción de esta enzima, la cual está involucrada en la formación de B-AMP a partir de biotina y en la transferencia de biotina a apocarboxilasas, es un intermediario indispensable en el efecto de biotina sobre los niveles de ARNm de HCS y carboxilasas en cultivos de fibroblastos humanos. También demostramos, que en fibroblastos humanos y células HepG2, la estimulación de biotina sobre los niveles de ARNm requiere la participación de GCs y GMPc y que el efecto de este segundo mensajero puede ser mediado a través de la PKG.

El efecto de la deficiencia de biotina en las células HepG2 fue una reducción gradual de los niveles de ARNm de HCS, ACC-1 y PCCA a una tercera parte con respecto a los niveles obtenidos en condiciones normales, mientras que los niveles de ARNm de ACC-2 no se vieron afectados. Esta disminución tomó alrededor de dos semanas, lo que refleja una lenta reducción y catabolismo de biotina. La adición de biotina a estos cultivos produjo una recuperación significativa de los niveles de ARNm en 24 horas. En este estudio, no se distinguió formalmente entre un efecto de biotina sobre la transcripción, procesamiento de ARN o estabilidad del mismo. Sin embargo, la incubación de células HepG2 deficientes de biotina en presencia de actinomicina-D por 24 horas redujo los niveles de ARNm por debajo de los niveles iniciales e impidió la recuperación de los niveles de ARNm por biotina. Si el papel de biotina fuera el de estabilizar o evitar la degradación del ARNm, entonces la estimulación con biotina en presencia de actinomicina-D debería haber resultado en la recuperación de los niveles de ARNm. El ARNm de ACC-2, que permaneció esencialmente sin cambio durante la deficiencia de biotina, también disminuyó después de la adición de actinomicina-D, de acuerdo a lo

esperado si la transcripción fuera bloqueada exitosamente. Con base en esto sugerimos que los niveles de ARNm remanentes después de las 24 h de exposición a la actinomicina-D refleja las velocidades de degradación de los ARNm, incluyendo a la ACC-2, y estas no fueron afectadas por la adición de biotina. Estos resultados sugieren que el efecto de biotina es el de estimular la transcripción.

El mecanismo de regulación de biotina sobre los niveles de ARNm permanece desconocido, sin embargo, nuestros experimentos sugieren la participación de la vía GMPc-PKG. Como evidencia podemos citar lo siguiente: Primero, la estimulación con GMPc tiene un efecto similar al de biotina sobre los niveles de ARNm. Segundo, la utilización del ODQ, un inhibidor de la GCs, bloquea el efecto de biotina. Tercero, el uso de Rp-cGMPS, un inhibidor de la PKG, permite sólo la recuperación mínima de los niveles de ARNm de HCS y carboxilasas. Estos hallazgos son similares a los obtenidos por Stockert y colaboradores (29), en donde analizaban la participación de biotina sobre la regulación de la expresión del RASG. Los experimentos anteriores se diseñaron con base a los de Stockert, en los que investigaron la regulación de la expresión del RASG.

Una herramienta clave en nuestros estudios, fue el uso de las células MCD con el fin de distinguir entre un efecto directo de biotina y otro en el cual la biotina tuviera que ser metabolizada para producir un efecto sobre la transcripción. Las células MCD-MK son homocigotas para la mutación R508W, la cual esta asociada con una baja afinidad por la vitamina (16), además de ser una de las mutaciones detectadas con mayor frecuencia en pacientes con DMC (16, 32, 33). Las células normales y mutantes cultivadas en condiciones de deficiencia de biotina, respondieron de manera diferente al estímulo con biotina. Las células mutantes requirieron de 10 a 100 veces mayor concentración de biotina para simular los niveles de ARNm de HCS alcanzados por fibroblastos normales. Al comparar la capacidad de biotina versus 8-Br-cGMP para estimular los niveles de ARNm de HCS en estas líneas celulares, se demostró la contribución esencial de la HCS y el papel río abajo del segundo mensajero GMPc y el cual no fue afectado por la presencia de HCS mutante. El producto inmediato de la interacción de HCS con biotina es la generación de B-AMP. Este, a su vez, es el substrato para la transferencia de biotina

a apocarboxilasas, en la segunda parte de la reacción de biotilación catalizada por HCS. En este trabajo se sugiere que B-AMP y no la biotina *per se*, es el compuesto responsable del efecto sobre los niveles de ARNm.

Los resultados de este trabajo también sugieren que la HCS puede participar directamente en la regulación transcripcional. En este sentido existe un precedente a esta hipótesis en la función de la proteína bacteriana BirA, que además de su papel como ligasa de biotina, actúa como represor del operón de biotina en *Escherichia coli*. El complejo BirA-B-AMP, actúa como un represor transcripcional de los genes del operón de biotina (34). El dominio de unión a DNA de BirA se encuentra localizado a la mitad del extremo amino terminal de la proteína. Es interesante el considerar que en eucariontes la formación de un complejo entre B-AMP y HCS pudiera tener una función homóloga en la regulación transcripcional. Como ejemplo, se ha demostrado que la función de ligasa de biotina de HCS se encuentra localizada en la región carboxilo terminal de la proteína (35). A pesar de que la región N-terminal de HCS, no contiene un dominio de unión al ADN como se encuentra en BirA, este puede contener secuencias que estén involucradas posiblemente en la formación de un complejo HCS-B-AMP y que esté a su vez se vea implicado en la activación de la vía GCs-GMPc-PKG. Estudios adicionales son requeridos para explorar esta función en la regulación de la expresión génica.

Un punto importante en la reducción de los niveles de ARNm de HCS y carboxilasas es el efecto de la disminución en la actividad de carboxilasas durante la deficiencia de biotina. Es posible que la acumulación de metabolitos como causa de la reducción en la actividad de las carboxilasas sea responsable de la disminución de los niveles de ARNm, y que la desaparición de estos metabolitos al reestablecerse el suministro de biotina permita que los niveles de ARNm regresen a sus niveles iniciales. Sin embargo, si esta hipótesis fuera correcta, la deficiencia de carboxilasas individuales, como la deficiencia en la actividad de PCC en la acidemia propiónica (36), resultaría en una alteración en la síntesis de otras carboxilasas ó en particular de la HCS. También, se esperaría que los pacientes mostraran una acumulación no solo del sustrato de la enzima defectuosa, sino

también de otros sustratos de carboxilasas. Hasta el momento, ninguno de estos supuestos han sido descritos (11, 36).

En un estudio previo a este trabajo se reportó que la deficiencia de biotina en ratas produce una reducción de los niveles de ARNm de HCS, sin alterar los niveles de ARNm de PC y PCC (27). En este estudio, nosotros demostramos que la deficiencia de biotina en células humanas HepG2 reduce los niveles de ARNm de HCS, PCC y ACC-1. La diferencia en la respuesta a biotina sobre los niveles de ARNm de PCC en rata y en hepatocitos humanos puede ser explicada por las diferencias en el modelo experimental utilizado o por la existencia de un efecto de biotina específico para cada especie sobre la expresión de carboxilasas. Sin embargo, nuestros resultados parecen ser confirmados por observaciones realizadas previamente en pacientes con cáncer colorrectal. En células de adenocarcinoma primario se detectó una menor concentración de biotina en comparación con células de mucosa normal, al igual que una reducción en el nivel transcripcional de los genes PCCA y PCCB (37).

En resumen, nosotros hemos propuesto que la biotina actúa sobre los niveles de ARNm a través de una cascada de señalización que requiere la acción de HCS, GCs y de la proteína cinasa dependiente de GMPc. El papel de la HCS en el control de la expresión génica de carboxilasas tiene implicaciones en el tratamiento de la enfermedad DMC. Es posible que las alteraciones clínicas y bioquímicas en pacientes con DMC reflejen el efecto combinado de la baja afinidad por biotina de la HCS mutante y la reducción de los niveles de ARNm de HCS y carboxilasas, en consecuencia una exacerbación en el curso de la enfermedad. También, nuestros resultados demuestran que la respuesta a dosis farmacológicas de biotina en pacientes con DMC, puede representar el efecto combinado de superar la afinidad reducida de la enzima mutante por biotina, así como la elevación de los niveles de carboxilasas a través del incremento en los niveles de ARNm.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Roy A. Gravel y a la Dra. Monica Narang (Universidad de Calgary) por su invaluable discusión y comentarios realizados en este manuscrito y la Rafael Cervantes Roldán por su asistencia técnica. Estos estudios fueron financiados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México. R.S.S.V. y D.P.A. son becarios del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wood, H. G. & Barden, R. E. (1977) *Annu Rev Biochem* **46**, 385-413.
2. Cronan, J. E., Jr. (1989) *Cell* **58**, 427-9.
3. Eisenberg, M. A., Prakash, O. & Hsiung, S. C. (1982) *J Biol Chem* **257**, 15167-73.
4. Sundaram, T. K., Cazzulo, J. J. & Kornberg, H. L. (1971) *Biochem J* **122**, 663-9.
5. Cazzulo, J. J., Sundaram, T. K., Dilks, S. N. & Kornberg, H. L. (1971) *Biochem J* **122**, 653-61.
6. Chapman-Smith, A. & Cronan, J. E., Jr. (1999) *Trends Biochem Sci* **24**, 359-63.
7. Leon-Del-Rio, A., Leclerc, D., Akerman, B., Wakamatsu, N. & Gravel, R. A. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 4626-30.
8. Leon-Del-Rio, A. & Gravel, R. A. (1994) *J Biol Chem* **269**, 22964-8.
9. Cronan, J. E., Jr. (1990) *J Biol Chem* **265**, 10327-33.
10. Suzuki, Y., Aoki, Y., Ishida, Y., Chiba, Y., Iwamatsu, A., Kishino, T., Niikawa, N., Matsubara, Y. & Narisawa, K. (1994) *Nat Genet* **8**, 122-8.
11. Wolf, B. (2001) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, ed. Scriver C., B. A., William S., Valle D. (McGraw-Hill Professional, Vol. 3, pp. 3935-3962.
12. Bartlett, K., Ghneim, H. K., Stirk, J. H., Wastell, H. J., Sherratt, H. S. & Leonard, J. V. (1985) *Ann NY Acad Sci* **447**, 235-51.
13. Sherwood, W. G., Saunders, M., Robinson, B. H., Brewster, T. & Gravel, R. A. (1982) *J Pediatr* **101**, 546-50.
14. Sweetman, L., Nyhan, W. L., Sakati, N. A., Ohlsson, A., Mange, M. S., Boychuk, R. B. & Kaye, R. (1982) *J Inherit Metab Dis* **5**, 49-53.
15. Burri, B. J., Sweetman, L. & Nyhan, W. L. (1985) *Am J Hum Genet* **37**, 326-37.
16. Dupuis, L., Campeau, E., Leclerc, D. & Gravel, R. A. (1999) *Mol Genet Metab* **66**, 80-90.
17. Sakamoto, O., Suzuki, Y., Li, X., Aoki, Y., Hiratsuka, M., Suormala, T., Baumgartner, E. R., Gibson, K. M. & Narisawa, K. (1999) *Pediatr Res* **46**, 671-6.
18. Morita, J., Thuy, L. P. & Sweetman, L. (1998) *Mol Genet Metab* **64**, 250-5.
19. Barker, D. F. & Campbell, A. M. (1981) *J Mol Biol* **146**, 451-67.
20. Buoncristiani, M. R., Howard, P. K. & Otsuka, A. J. (1986) *Gene* **44**, 255-61.
21. Borboni, P., Magnaterra, R., Rabini, R. A., Staffolani, R., Porzio, O., Sesti, G., Fusco, A., Mazzanti, L., Lauro, R. & Marlier, L. N. (1996) *Acta Diabetol* **33**, 154-8.
22. Chauhan, J. & Dakshinamurti, K. (1991) *J Biol Chem* **266**, 10035-8.
23. Spence, J. T. & Koudelka, A. P. (1984) *J Biol Chem* **259**, 6393-6.
24. Deodhar, A. D. & Mistry, S. P. (1970) *Life Sci II* **9**, 581-8.
25. Dakshinamurti, K., Tarrago-Litvak, L. & Hong, H. C. (1970) *Can J Biochem* **48**, 493-500.
26. Collins, J., Paietta, E. & Green, R. (1988) *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 11280-11283.

27. Rodriguez-Melendez, R., Cano, S., Mendez, S. T. & Velazquez, A. (2001) *J Nutr* **131**, 1909-13.
28. Bartlett, K. & Gompertz, D. (1976) *Lancet* **2**, 804.
29. De La Vega, L. A. & Stockert, R. J. (2000) *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C2037-42.
30. Pisarev, M. A. & de Pisarev, D. L. (1977) *Acta Endocrinol (Copenh)* **84**, 297-302.
31. Lee, Y. C., Martin, E. & Murad, F. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10763-8.
32. Dupuis, L., Leon-Del-Rio, A., Leclerc, D., Campeau, E., Sweetman, L., Saudubray, J. M., Herman, G., Gibson, K. M. & Gravel, R. A. (1996) *Hum Mol Genet* **5**, 1011-6.
33. Yang, X., Aoki, Y., Li, X., Sakamoto, O., Hiratsuka, M., Gibson, K. M., Kure, S., Narisawa, K., Matsubara, Y. & Suzuki, Y. (2000) *J Hum Genet* **45**, 358-62.
34. Chapman-Smith, A., Cronan, J.E. Jr. (1999) *Trends Biochem Sci.* **24**, 359-63.
35. Campeau, E. & Gravel, R. A. (2001) *J Biol Chem* **276**, 12310-6.
36. Wolf, B., Hsia, Y. E., Sweetman, L., Gravel, R., Harris, D. J. & Nyhan, W. L. (1981) *J Pediatr* **99**, 835-46.
37. Cherbonnel-Lasserre, C. L., Linares-Cruz, G., Rigaut, J. P., Sabatier, L. & Dutrillaux, B. (1997) *Int J Cancer* **72**, 768-75.

CAPÍTULO III

Altruismo tisular: mecanismo de
regulación de la utilización de biotina
en hígado y cerebro.

PREFACIO AL CAPÍTULO 3

En el capítulo anterior se demostró que el efecto transcripcional de la biotina es mediado a través de una cascada de transducción de señales, en la que participan la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS), la guanilato ciclasa soluble (GCs) y la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG). Este es el primer trabajo que demuestra que la HCS es una enzima bifuncional involucrada en la regulación transcripcional al igual que su homóloga bacteriana la proteína BirA. Estos resultados presentan un caso único desde el punto de vista evolutivo ya que dos enzimas que catalizan la biotinilación de carboxilasas han sido seleccionadas para regular la transcripción genética pero a través de mecanismos completamente diferentes.

La cascada HCS-GCs-PKG puede en principio explicar el efecto reportado de la deficiencia de biotina sobre la expresión de varias enzimas hepáticas y en el incremento de malformaciones congénitas en animales de laboratorio. Sin embargo, la función fisiológica de este mecanismo de regulación transcripcional en el metabolismo normal y en el desarrollo de la deficiencia múltiple de carboxilasas era desconocida.

Con el fin de explorar la importancia fisiológica de este mecanismo, estudié el efecto de la deficiencia de biotina en la regulación de la expresión de los genes que codifican enzimas del ciclo de utilización de biotina en células humanas y en un modelo de deficiencia de biotina (rata).

Los resultados obtenidos durante esta fase de mi investigación me permitieron proponer un modelo para explicar la utilización diferencial de biotina en hígado y cerebro al que llamamos "altruismo tisular". Este sistema postula que durante la deficiencia de biotina los tejidos periféricos como hígado y riñón auto-limitan sus requerimientos de biotina para favorecer que el cerebro reciba un aporte continuo de esta vitamina.

En esta investigación conté con la colaboración del Dr. Sergio Solórzano Vargas, el Dr. Roy A. Gravel (Universidad de Calgary) quien suministró el anticuerpo contra HCS y participó en la discusión de mis resultados, el Dr. A. Velázquez quien donó tejidos de ratas deficientes de biotina y en los cuales determiné la concentración de ARNm y del Biólogo Rafael Cervantes Roldán quien colaboró en la realización del análisis de expresión de HCS mediante Western blot.

Los resultados presentados en este capítulo fueron publicados como un artículo de investigación original en la revista *Journal of Biological Chemistry* bajo el título: **Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency.** Pacheco-Alvarez, D., Solórzano-Vargas, R., Gravel, R.A., Cervantes-Roldán, R., Velázquez, A. & León-Del-Río, A., *J. Biol. Chem.*, 10.1074/jbc.M407056200. Accepted on September 28, 2004.

INTRODUCCIÓN.

La biotina funciona como cofactor en reacciones de carboxilación actuando específicamente como acarreador de un grupo carboxilo. En células humanas existen cinco carboxilasas dependientes de biotina: piruvato carboxilasa (PC), propionil-CoA carboxilasa (PCC), metilcrotonil-CoA carboxilasa y dos formas de acetyl-CoA carboxilasa (ACC-1 y ACC-2). Estas enzimas catalizan reacciones clave en gluconeogénesis, catabolismo de amino ácidos y síntesis de ácidos grasos, lo cual explica el amplio impacto de la biotina sobre el metabolismo humano (1).

Durante la evolución, los mamíferos perdieron la habilidad de sintetizar biotina por lo que sus requerimientos de la vitamina son obtenidos a través de un delicado balance entre la biotina presente en la dieta y el reciclamiento de la vitamina endógena unida a proteínas (1,2). Para garantizar un suministro constante de la vitamina, los organismos eucariontes desarrollaron un ciclo de utilización de biotina que depende de la participación de tres proteínas diferentes. La primera es un acarreador para el transporte de biotina a través de la membrana plasmática. Aunque se ha sugerido la existencia de varios transportadores de biotina en diferentes especies, solo uno ha sido clonado y caracterizado funcionalmente (3,4). El transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT) recibe su nombre ya que puede transportar biotina, ácido lipoico y pantotenato y es caracterizado por una Km elevada por biotina (5,6). La segunda proteína del ciclo es la holocarboxilasa sintetasa (HCS) que cataliza la biotinilación de carboxilasas en una reacción dependiente de ATP en dos pasos. En esta reacción, la biotina es transformada a biotinil-5'-AMP (B-AMP) y después es transferida a una secuencia específica en las apocarboxilasas (7-9). La tercera enzima es la biotinidasa que participa en la liberación de biotina a partir de biocitina (biotinil-lisina) y péptidos biotinilados productos de la digestión o durante el recambio de carboxilasas endógenas (10).

El balance en la utilización exógena y reciclamiento de biotina en células humanas puede ser alterado por anomalías genéticas con terribles consecuencias para la homeostasis

metabólica. La deficiencia de la actividad de HCS o biotinidasa produce la forma neonatal o juvenil, respectivamente, de la enfermedad deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC) (1,11,12). Las dos formas de DMC son potencialmente mortales. Sin embargo, todas sus manifestaciones clínicas y bioquímicas, exceptuando el daño neurológico, pueden revertirse con dosis farmacológicas de biotina (1).

Recientemente, se ha implicado a la biotina en otros procesos celulares que incluyen síntesis de ADN y ARN, actividad semejante a la del óxido nítrico sobre la síntesis de GMPc, crecimiento y proliferación celular y biotinilación de histonas (13-19). El efecto no clásico de la biotina que ha sido mejor caracterizado es su papel en la expresión genética. Varios trabajos realizados en animales de laboratorio y células en cultivo han mostrado que la biotina es esencial para la expresión y actividad de las enzimas glucocinasa, fosfofructocinasa, ornitina transcarbamilasa, receptor de asialoglicoproteínas, PCC, ACC-1 y HCS (20-28).

En el laboratorio, hemos investigado el efecto de la deficiencia de biotina en fibroblastos humanos y células HepG₂ y se ha observado una reducción de los niveles de ARNm de HCS, la subunidad alpha de PCC y ACC-1, los cuales regresaron a niveles normales después de suministrar biotina a las células (29). El efecto de biotina en la expresión de estas enzimas es mediado a través de una cascada de transducción de señales en la cual participan la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) y la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG). Es importante hacer notar que nuestro grupo demostró que las células de pacientes con la forma neonatal de la DMC requieren 100 veces más biotina que células normales para restaurar los niveles de ARNm de HCS a valores normales (29). Estos resultados sugirieron que el producto de la reacción catalizada por HCS, B-AMP y no biotina *per se* podría ser el responsable del efecto de biotina en la expresión génica.

A pesar de que la cascada HCS-GCs-PKG podría explicar el efecto de la biotina sobre la expresión genética, el significado fisiológico de este tipo de regulación y su relevancia en el fenotipo de la DMC se desconocen. La represión de la síntesis de ARNm de HCS y carboxilasas provocada por la deficiencia de biotina es una respuesta paradójica y

aparentemente autodestructiva considerando la función esencial de la biotina. El ciclo de utilización de biotina, presenta mecanismos independientes para la utilización de biotina exógena (vía captación de SMVT) contra biotina celular (reciclamiento vía biotinidasa). En este trabajo hemos examinado la regulación de la expresión de ARNm de SMVT y biotinidasa para determinar si este tipo de regulación tiene por objeto el control del ciclo de utilización de biotina en células humanas. El estudio del efecto de biotina sobre los niveles de ARNm también incluye a la PC debido a la importancia de esta enzima en gluconeogénesis, glicólisis y el ciclo de Krebs. Los resultados demuestran que la expresión de los ARNm de SMVT y PC, al igual que HCS responde a la disponibilidad de biotina mientras que los niveles de ARNm de biotinidasa no son afectados por la deficiencia de esta vitamina.

En este trabajo también se demuestra, en un modelo animal con ratas alimentadas con una dieta normal y ratas alimentadas con una dieta deficiente de biotina que la vía de señalización HCS-GCs-PKG reprime la transcripción de las enzimas del ciclo de utilización de biotina en hígado y riñón mientras que en el cerebro la expresión de estas enzimas no es afectada. Aun más interesante es el hecho de que en condiciones de deficiencia de biotina, la expresión de enzimas implicadas en el ciclo de utilización de biotina es constitutiva.

Para explicar estas observaciones proponemos que el efecto diferencial de biotina en hígado y cerebro puede ser parte de un mecanismo altruista que reprime la utilización de biotina en hígado con el fin de preservar el metabolismo cerebral cuando la biotina en la dieta es limitante o deficiente.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Materiales. Biotina y 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate (8-Br-cGMP) utilizados son de la compañía Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. La línea celular de hepatoblastoma, HepG₂ fueron suministradas por American Type Cell Collection. La

línea de glioma C6 de rata fue amablemente donada por la Dra. H. Pasantes, Universidad Nacional Autónoma de México. Los fibroblastos normales, los fibroblastos de pacientes con DMC neonatal (MCD-MK) y el anticuerpo contra un péptido N-terminal de HCS humana (a.a 58-78) han sido descritos anteriormente por otros grupos (19). Los cultivos celulares fueron mantenidos en medio alpha-MEM con alta glucosa (GIBCO/BRL; biotina 0.40 μ M) suplementado con 10% de FBS inactivado por calor, penicilina 100 unidades/ml, y estreptomina 100 μ g/ml (medio control). El medio deficiente de biotina fue preparado utilizando medio MEM libre de biotina, FBS dializado (GIBCO/BRL) y la misma concentración de antibióticos. Las ratas Wistar macho utilizadas fueron proporcionadas por el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Las dietas normales y deficientes de biotina para los animales de laboratorio fueron elaboradas por ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland OH.

Experimentos de cultivo celular. El método utilizado de cultivos celulares en condiciones de deficiencia de biotina ha sido previamente descrito (29). Las células fueron cultivadas en medio normal o en medio deficiente de biotina a 37°C con 5% CO₂ hasta por 15 días. El medio fue cambiado cada tercer día. En los experimentos de recuperación por biotina, a los 14 días de deficiencia de biotina, se añadió biotina en concentraciones finales de 0.001 a 1 μ M ó 1 mM de 8-Br-cGMP, un análogo no hidrolizable de GMPc por 24 horas.

PCR de transcripción reversa y Western blot. La metodología utilizada para aislar ARN, síntesis de ADN y PCR (rtPCR) fueron descritas previamente y las condiciones específicas utilizadas en este trabajo son las siguientes: 4 μ g de RNA y 0.5 μ M de los oligonucleótidos específicos fueron utilizados para la síntesis de cDNA. 0.3 μ M de oligonucleótidos sentido y antisentido fueron utilizados para obtener productos de PCR de entre 330-900 pb de longitud (29). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para amplificar ARNm humano fue la siguiente: HCS, 5'- TGA GGT CCA TTC CCG AGT AT-3' (T.M. 60 C) y 5'- AAC CTG GAG GAA GCC AGA AT-3' (T.M. 60 C); SMVT, 5'-TGT GCT CTC CTG TTA TGC AG-3' (T.M. 60 C) y 5'- ACA TGG

AAA GAA CAT TCC AA-3'(T.M. 54 C); actina 5'- ATG TGC AAG GCC GGC TTC GC-3 (T.M. 66 C) y 5'- GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG- 3'(T.M. 60 C); biotinidasa 5'- ATC TAT GAA CAG CAA GTG ATG ACT - 3'(T.M. 66 C) y 5'- AGG GAC CAG GGT GAA ATT GTC ATA- 3'(T.M. 70 C); PC, 5'- CGA CTC TGT GAA ACT CGC TAA ACA -3'(T.M. 70 C) y 5'- TGG TCT TTG CCG TGG GCA A-3'(T.M. 60 C). Los oligonucleótidos utilizados para amplificar ARNm de rata: actina, 5'- ATC GTG AGG AAC ACT CAG AA- 3' (T.M. 58 C) y 5'- CGC CAA GCC GAA TGG CAA AA- 3'(T.M. 62 C); biotinidasa, 5'-TGT GCA AGA TTA TAG TGT TCC CA-3' (T.M.62 C) y 5'- AAC ACG CCA AAC TTG CCA GC-3'(T.M. 62 C); SMVT, 5'- AAT TCA CTG GCC ACT GTC AC-3'(T.M. 60 C) y 5'- AGT GAG CAG ACT GAC AAT CAG-3'(T.M. 62 C); PC, 5'- TTG ACG TGG CCA TGC GCT TCT T-3'(T.M. 68 C) y 5'- TAG TAC TCC AGT GAG TAT TTA G-3'(T.M. 60 C). Los productos de PCR fueron visualizados después por electroforesis en geles de agarosa y cuantificados por densitometría utilizando un analizador de imágenes FX (BIORAD, Hércules CA.), los valores obtenidos fueron normalizados con respecto a los valores del ARNm de β -actina (29). El ARNm de β -actina estuvo presente en cantidades equivalentes en todas las muestras de ARN (Fig. 1, 3 y 4).

Para el análisis por Western blot se prepararon extractos de líneas celulares o tejidos de rata en buffer RIPA (Tris HCL 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%) conteniendo 5 μ l de una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche) y 0.5 μ l de PMSF 200 mM (Invitrogen). Muestras de 20-30 μ g de proteína total fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y transferidos a una membrana PVDF (Millipore). Las membranas fueron incubadas con una solución 1:2000 del anticuerpo de conejo contra HCS. Las proteínas fueron visualizadas utilizando el equipo BM chemiluminescence's western blotting kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Modelo animal de deficiencia de biotina. En este trabajo utilizamos ratas Wistar macho de 21-28 días que fueron mantenidas en cajas con aire filtrado y alimentadas *ad*

libitum con una dieta libre de biotina. Los animales fueron sacrificados después de 8-10 semanas cuando las actividades de las carboxilasas dependientes de biotina eran menores al 30 % con respecto a animales control (28,30). Los órganos seleccionados fueron removidos rápidamente, lavados en PBS y congelados en nitrógeno líquido. El ARN total fue aislado de cerebro, hígado y riñón de animales deficientes y control y la concentración de ARNm fue determinada como se describió anteriormente.

Valores de biotina en carboxilasas de ratas normales y deficientes de biotina. El hígado y cerebro de ratas alimentadas con una dieta normal o deficiente de biotina, fueron removidos y lavados en buffer PBS frío. Una muestra de tejido (1gr.) fue homogeneizado en un buffer compuesto por EDTA 10 mM, Tris-HCl 600 mM y KCl 1M pH. 7.5. Los homogenados fueron centrifugados a 7,500 G por 20 minutos. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 150,000 G por 30 minutos y la concentración de proteína fue determinada utilizando el sistema Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). Las proteínas de los homogenados (70 ug) fueron separadas mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS (8%) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La determinación del contenido de biotina en las proteínas fraccionadas fue realizado utilizando una dilución 1:2000 del conjugado estreptavidina-AP (Roche). Las bandas biotiniladas fueron cuantificadas utilizando el analizador de imágenes FX (BioRad, Hercules CA).

Análisis estadístico. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y en al menos en tres diferentes ocasiones utilizando preparaciones de ARN diferentes. Los resultados del efecto de la deficiencia de biotina sobre los niveles de ARNm fueron normalizados con los valores de β -actina y expresados como porcentaje de los niveles de ARNm observados en células o ratas mantenidas en condiciones normales. Los datos son presentados como la media de tres experimentos +/- E.S.

RESULTADOS.

La disponibilidad de biotina regula los niveles de ARNm de las enzimas participantes en el ciclo de utilización de biotina en células HepG₂. Para determinar si la expresión de los componentes clave del ciclo de utilización de biotina es regulada por la concentración exógena de la vitamina, analizamos los niveles de ARNm de SMVT y biotinidasa, dos proteínas que controlan la entrada de biotina al ciclo. El efecto de biotina sobre los niveles de ARNm de PC también se analizó, debido al papel central de PC en el metabolismo. Los resultados de las tres enzimas fueron comparados con los niveles de ARNm de HCS que previamente había mostrado ser regulado por la disponibilidad de biotina (29). Las células humanas HepG₂ fueron sembradas por triplicado en tres grupos experimentales: células incubadas en medio normal como control, células incubadas por 15 días en medio deficiente de biotina y células deficientes de biotina estimuladas por 24 h con biotina (1 μ M) (medio de recuperación). A partir de células tratadas, se aisló el ARN total y los niveles de ARNm fueron determinados por rtPCR (Fig. 1A). La deficiencia de biotina produjo una reducción notable en los niveles de ARNm de SMVT (-71% \pm 2), HCS (-64% \pm 5) y PC (-68% \pm 3) comparado con los valores obtenidos en las células control. Sin embargo, no se registró un cambio significativo en los niveles de ARNm de biotinidasa (-16% \pm 2) o actina (Fig. 1B). La especificidad del efecto de biotina fue confirmado al estimular con esta vitamina los cultivos deficientes. Este tratamiento resultó en el restablecimiento de los niveles de ARNm de SMVT, HCS y PC (Fig. 1B). Los niveles de ARNm de biotinidasa permanecieron sin cambio con respecto a los cultivos control, cuando las células fueron incubadas en medio deficiente de biotina o en medio de recuperación.

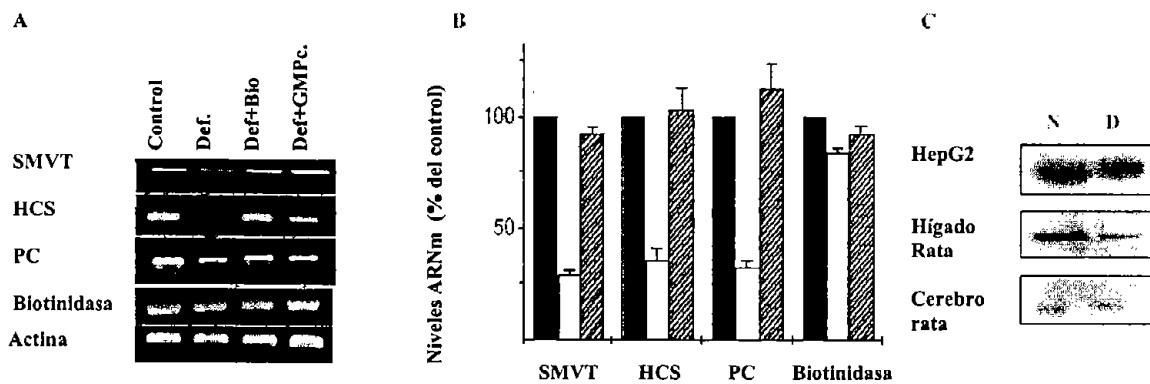


Fig. 1. Efecto de biotina sobre los niveles de ARNm y proteína. Las células HepG2 cultivadas por 14 días en medio libre de biotina fueron estimuladas con 1 μ M de biotina, los niveles de ARNm de SMVT, HCS, PC, biotinidasa y actina fueron determinados como se describe en *materiales y métodos*. A) Experimento representativo de los niveles de ARNm obtenidos a partir de células normales (control), células deficientes de biotina (Def), células deficientes de biotina estimuladas con biotina (Def+Bio) y células deficientes de biotina estimuladas con 8-Br-cGMP (Def+GMPC). B) Gráfica representativa de los resultados obtenidos a partir de tres experimentos diferentes, columna negra representa células normales, columna blanca representa células deficientes de biotina, diagonal representa células deficientes de biotina estimuladas con biotina. Los resultados son expresados como porcentaje de los niveles de ARNm de células normales y son mostrados como promedio \pm E. S. C) Efecto de biotina sobre los niveles de proteína de HCS, en células HepG2, hígado y cerebro de rata, normal (N) y deficiente de biotina (D).

En este trabajo se confirmó que la reducción de los niveles de ARNm se refleja en los niveles de proteína, utilizando a la HCS como modelo (Fig. 1C). El análisis por Western blot de los niveles de HCS en células HepG2, confirmó que la deficiencia de biotina reduce a una tercera parte la cantidad de proteína HCS con respecto a los resultados obtenidos en células control. Como se observó con los niveles de ARNm, la adición de biotina a los cultivos deficientes generó la normalización de la proteína a los niveles obtenidos en células control (dato no mostrado).

Al comienzo de este estudio demostramos que el efecto de biotina sobre los niveles de ARNm de HCS y la subunidad α de PCC son mediados por la activación de la enzima GCs y el incremento en los niveles de GMPc (29). Para determinar si la expresión de SMVT, PC y biotinidasa esta bajo el mismo tipo de regulación, estudiamos el efecto de un análogo no hidrolizable de GMPc (8-Br-cGMP) en células deficientes de biotina. La adición de 1 mM de 8-Br-cGMP por 24 horas, incrementó los niveles de ARNm de SMVT, PC y HCS hasta alcanzar valores normales, de manera similar a la respuesta a la estimulación con biotina (Fig. 1A y Tabla 1). En contraste, los niveles de ARNm de biotinidasa, que no fueron significativamente afectados por la deficiencia de biotina ($84\% \pm 2$ del valor control), mostraron un cambio mínimo como resultado de la estimulación con biotina ($91\% \pm 4$) o el análogo de GMPc ($112\% \pm 10$) con respecto a los valores obtenidos en células control. Estos resultados demuestran que la biotina y el GMPc tienen efectos similares sobre los niveles de ARNm en células previamente incubadas en un medio deficiente de biotina.

Determinación de los niveles de ARNm de las enzimas del ciclo de biotina en células de pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas. En el capítulo anterior, demostramos que los fibroblastos de pacientes con la forma neonatal de la DMC requieren cantidades mayores de biotina para modificar sus niveles de ARNm después de haber sido mantenidas en condiciones de deficiencia de biotina (29). En este experimento determinamos si existe también un efecto sobre la transcripción de los genes de SMVT y

Tabla 1. Efecto de biotina y 8-Br-cGMP sobre los niveles de ARNm en células HepG2.

ARNm	Deficiente de biotina%	Estimulado con biotina%	Estimulado con GMPC%
SMVT	29±2	92±3	101±7
HCS	36±5	103±10	98±8
PC	32±3	112±11	106±4
Biotinidasa	84±2	91±4	112±10
Actina	107±3	94±10	109±4

biotinidasa y consecuentemente, si la HCS esta implicada en su regulación. La línea celular MCD-MK utilizada en este estudio es homocigota para la mutación R508W y es caracterizada por una Km elevada para biotina (11,29,31). Las células MCD-MK y fibroblastos normales fueron incubados en medio deficiente de biotina con el fin de analizar la capacidad de SMVT, HCS y biotinidasa de incrementar sus niveles de ARNm al ser estimuladas con diferentes concentraciones de biotina. Cuando los fibroblastos normales y MCD-MK fueron incubados en medio libre de biotina, los niveles de ARNm de SMVT disminuyeron como se esperaba ($12\% \pm 2$) y una reducción similar fue observada en los niveles de ARNm de HCS ($29\% \pm 4$) (Fig. 2A, B). En contraste, las dos líneas celulares respondieron de manera muy diferente a la estimulación con biotina. En fibroblastos normales, la estimulación con biotina por 24h incrementó los niveles de ARNm de ambas enzimas. En el caso de SMVT la recuperación máxima de los niveles de ARNm se alcanzó con la menor concentración de biotina utilizada ($0.001 \mu\text{M}$), mientras que concentraciones mayores de la vitamina no resultaron en un aumento adicional significativo. A pesar de que la deficiencia de biotina no generó una disminución significativa sobre los niveles ARNm de biotinidasa, la estimulación con concentraciones crecientes de biotina produjo una disminución en los niveles de ARNm de esta enzima de 100% a una concentración $0.001 \mu\text{M}$ a $78\% \pm 2$ cuando se incrementó la concentración de biotina a $0.1 \mu\text{M}$ (Fig. 2A). Como ya habíamos demostrado anteriormente (29), el ARNm de HCS también mostró una recuperación similar a la obtenida en condiciones normales, sin embargo, el incremento no fue tan eficiente alcanzándose niveles control a una concentración de biotina $1 \mu\text{M}$.

La respuesta a biotina de las células MCD-MK fue muy diferente (Fig. 2B). En una concentración $0.001 \mu\text{M}$ de biotina, el ARNm de SMVT aumentó de $12\% \pm 9$ (valor observado en medio deficiente de biotina) a $50\% \pm 5$. Al aumentar la concentración de biotina a $1 \mu\text{M}$, el ARNm de SMVT solo se incrementó a $63\% \pm 7$. Al igual que en células normales, los niveles de ARNm de biotinidasa no fueron afectados por la deficiencia de biotina, sin embargo, se observó una tendencia a disminuir en presencia de concentraciones crecientes de biotina. Como se observó anteriormente (29), los niveles

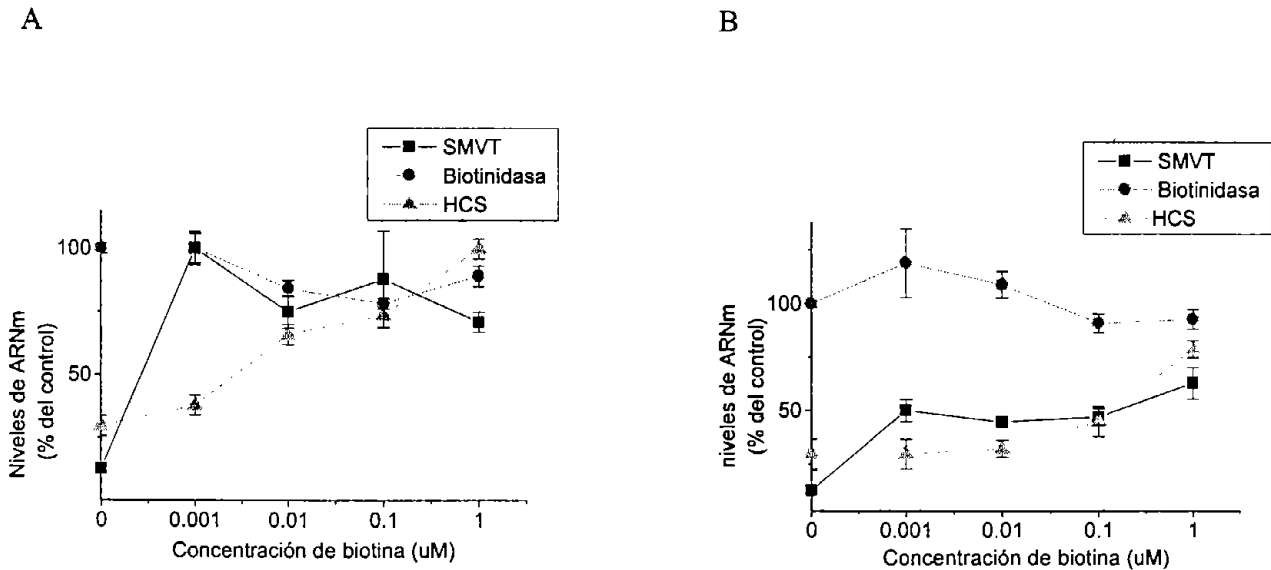


Fig. 2 Efecto de la concentración de biotina sobre los niveles de ARNm en SMVT, HCS y biotinidasa en fibroblastos normales y fibroblastos MCD. Los fibroblastos normales (A) y los fibroblastos MCD (B) fueron cultivados en medio libre de biotina por 14 días. Después de este periodo, las células fueron estimuladas por 24 horas con 0.001 μ M, 0.01 μ M, 0.1 μ M y 1.0 μ M de biotina por 24 horas. Los niveles de ARNm de SMVT, HCS y biotinidasa fueron determinados como se describe en *materiales y métodos*. Los resultados son presentados como porcentaje de los valores de ARNm obtenidos en células mantenidas en medio con biotina y normalizados con los valores de ARNm de β -actina. Los datos presentados son de tres experimentos diferentes y se muestran como promedio \pm E. S.

de ARNm de HCS en células MCD-MK, aumentaron solo cuando las células fueron estimuladas con concentraciones altas de biotina. El mayor aumento observado ($79\% \pm 4$ de los valores control) ocurrió al añadir biotina en una concentración $1.0 \mu\text{M}$. Estos resultados demuestran que, como en el caso de HCS, la normalización de los niveles de ARNm de SMVT en células MCD-MK requiere de por lo menos de 100 veces más biotina que las células normales para lograr un incremento similar. Estos resultados demuestran que la expresión del ARNm de biotinidasa no es afectado por la presencia de HCS mutante.

La integridad de los elementos río abajo de la vía de transducción de señales HCS-GCs-PKG en células MCD-MK sobre los niveles de ARNm, fue analizada al incubar células normales y de pacientes MCD-MK en presencia de 8-Br-GMPc. Las células MCD-MK cultivadas en condiciones de deficiencia de biotina fueron estimuladas con 8-Br-GMPc 1mM y el resultado fue un incremento en el ARNm de HCS y SMVT comparable a los niveles obtenidos en células normales (dato no mostrado) (29). Estos resultados confirmaron que el ARNm de SMVT, al igual que el ARNm de HCS, responden normalmente a GMPc en células MCD.

Determinación de los niveles de ARNm de enzimas implicadas en el ciclo de biotina en tejidos de rata. Los resultados anteriores sugieren que una dieta baja en biotina o mutaciones en el gen de la HCS disminuyen la capacidad de las células humanas para mantener los niveles de ARNm de las proteínas involucradas en la utilización de biotina exógena mientras que la habilidad para reciclar a la vitamina mediante la actividad de biotinidasa no es afectada. Este mecanismo de regulación transcripcional en apariencia actuaría en contra del mantenimiento de la homeostasis metabólica, debido a que una reducción en la expresión de SMVT y HCS provocaría una reducción en la utilización de la poca biotina disponible. Para determinar el papel fisiológico de este proceso, aparentemente autodestructivo, hemos utilizado un modelo animal (rata) de deficiencia de biotina y hemos examinado el impacto de la disminución de biotina en diferentes tejidos. En este experimento, se alimentó a ratas Wistar macho con una dieta libre de

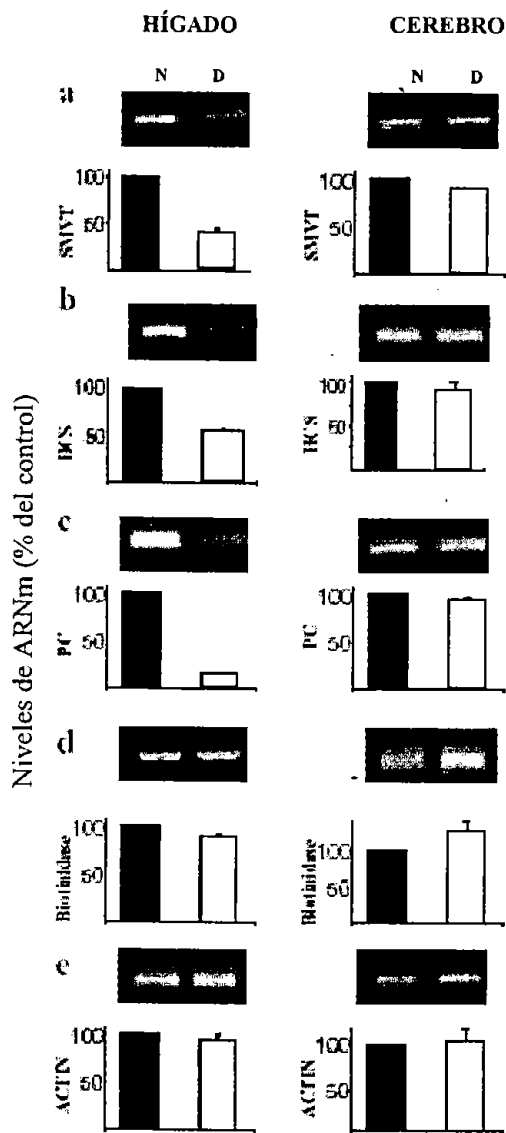


Figura 3. Efecto de la deficiencia de biotina en tejidos de rata. Ratas Wistar machos adultos fueron alimentados con una dieta normal (N) y deficiente de biotina (D) por ocho semanas. Los niveles de ARNm de SMVT, HCS, PC, biotinidasa y actina de hígado y cerebro fueron determinados como se describe en *materiales y métodos* y expresados como porcentaje de los valores observados en tejidos normales. Los resultados fueron normalizados con los valores obtenidos en B-actina. Se muestran productos de rt-PCR representativos de cada experimento. Los datos son de tres experimentos diferentes y se muestran como promedio \pm E. S.

biotina durante ocho semanas. Después de este tiempo, los animales presentaban el fenotipo clásico de deficiencia de biotina y una dramática disminución en la actividad de las carboxilasas dependientes de biotina PC y PCC (30). Los niveles de ARNm de SMVT, HCS, PC y biotinidasa fueron determinados en diferentes órganos por análisis densitométrico de productos de rtPCR. Para simplificar la presentación de los resultados, solo se presentan los datos obtenidos en cerebro e hígado (Fig. 3), debido a que experimentos preliminares realizados en riñón produjeron resultados similares a los patrones de expresión en hígado.

La deficiencia de biotina redujo los niveles de ARNm en el hígado de ratas deficientes (SMVT, 42% \pm 3; HCS, 55% \pm 3; PC, 17% \pm 2 con respecto a niveles normales de biotina), mientras que en el cerebro los niveles de ARNm mostraron solo un ligero cambio (SMVT, 90% \pm 1; HCS, 94% \pm 7; PC, 96% \pm 3) en ratas deficientes de biotina (Fig. 3a-c). El ARNm de biotinidasa no fue afectado en el hígado (91% \pm 2 con respecto a niveles normales de biotina), de manera similar a los resultados obtenidos en cultivos de hepatocitos humanos. Sin embargo, en el cerebro de ratas deficientes, encontramos un modesto incremento en el ARNm de biotinidasa (129% \pm 10) con respecto a los niveles encontrados en animales normales (Fig. 3d). La deficiencia de biotina no tuvo efecto alguno en el ARNm del gen de actina (Fig. 4e) en hígado o cerebro. El análisis de HCS por Western blot mostró que la deficiencia de biotina reduce los niveles de proteína en un 50% en hígado mientras que en el cerebro el tratamiento no afectó la cantidad de HCS (Fig. 1c).

Estos resultados sugieren que la biotina regula los niveles de ARNm en hígado y riñón (dato no mostrado), pero no en el cerebro. Para determinar si estos resultados son producto de una propiedad específica de tejido o tipo celular, estudiamos si la resistencia del cerebro a la deficiencia de biotina podía ser reproducida en cultivos de células C6 de glioma de rata. Después de incubar estas células en medio deficiente de biotina observamos una reducción importante en los niveles de ARNm de SMVT a 20% \pm 10 y PC a 33% \pm 6 de los valores normales (Fig. 4a,b). De manera semejante a lo observado en los experimentos anteriores, la deficiencia de biotina no afectó los niveles de ARNm de biotinidasa (96% \pm 4 ; Fig. 4c). Al estimular las células C6 deficientes con biotina, observamos un incremento en los niveles de ARNm de SMVT y PC a 63% \pm 2 y 82% \pm 4, respectivamente (Fig. 4a,b). Este tratamiento no tuvo ningún efecto en el

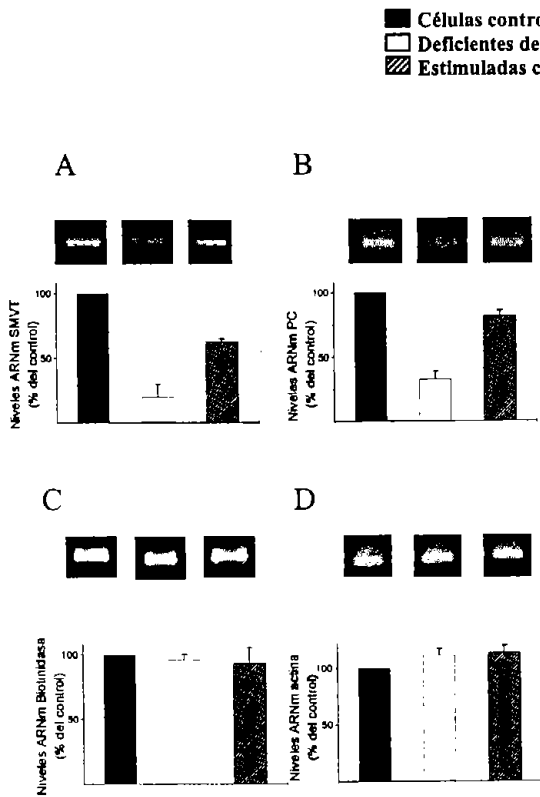


Fig. 4. Efecto de la deficiencia de biotina sobre los niveles de ARNm en células gliales de rata. Células gliales C6 fueron incubadas por 14 días en medio libre de biotina y estimuladas con biotina 1 μ M. Los niveles de ARNm fueron determinados como se describe en *materiales y métodos* y expresados como porcentaje de los valores normales. Columnas negras; células mantenidas en medio normal, columnas blancas; células mantenidas en medio deficiente, diagonal; células deficientes de biotina estimuladas con biotina. Los datos son de tres experimentos diferentes y se muestran como promedio \pm E. S.

ARNm de biotinidasa (Fig. 4c). Los resultados indican que las células C6 de glioma de rata responden de manera similar a las células HepG2 y difieren de la respuesta encontrada en cerebro de ratas deficientes de biotina.

El contenido de biotina en carboxilasas cerebrales es preservado selectivamente en ratas deficientes de biotina. Los resultados anteriores sugieren que la represión en la expresión del ciclo de biotina en hígado y la expresión constitutiva de este ciclo en cerebro durante periodos de deficiencia de biotina tienen por objeto el maximizar la incorporación de biotina a carboxilasas en cerebro. En otros tejidos, a través de la reducción en la síntesis de carboxilasas y la disminución en la transferencia de biotina (deficiencia de HCS), debería haber muy poca biotina unida a proteínas. Para determinar la cantidad de biotina unida a proteína en extractos de hígado y cerebro de ratas normales y deficientes de biotina, utilizamos estreptavidina en ensayos de Western Blot. Estos resultados mostraron que en el hígado de ratas deficientes de biotina, las formas biotiniladas de PC (128kDa), PCC (74kDa) y MCC (72 kDa) se redujeron en un 90% comparado con los valores obtenidos en animales control (Fig. 5). En contraste, en cerebro, no hubo diferencia en el nivel de carboxilasas biotiniladas de PC y MCC entre ratas normales y ratas deficientes de biotina. Datos anteriormente publicados (32), mostraron que PCC es mucho menos abundante que MCC en hígado y cerebro y bajo las condiciones utilizadas en este trabajo no fue posible detectarla en el cerebro de ratas normales o deficientes de biotina.

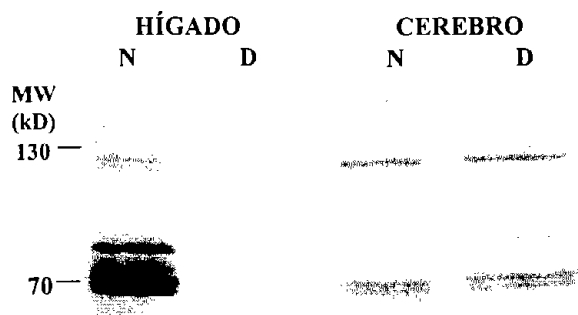


Fig. 5 Contenido de biotina en hígado y cerebro de carboxilasas. Extractos proteicos de hígado y cerebro de ratas normales y deficientes de biotina, fueron fraccionadas por electroforesis SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa. La biotinilación de carboxilasas fue visualizada por medio de la incubación de las membranas con estreptavidina-AP. Las bandas observadas fueron identificadas a partir de pesos moleculares para las carboxilasas previamente reportados, PC (128kDa) y MCC (72 kDa). El contenido de carboxilasas biotiniladas fue analizado por densitometría como se describe en *materiales y métodos*.

DISCUSIÓN.

En este trabajo hemos investigado la regulación transcripcional del ciclo de utilización de biotina en cultivos de células humanas y en diferentes órganos de rata bajo condiciones de deficiencia de biotina. Nuestros experimentos demuestran que SMVT y HCS, proteínas esenciales para la utilización de biotina exógena o presente en la dieta, responden a la deficiencia de biotina reduciendo los niveles de sus ARNm. En contraste, la reutilización de biotina endógena vía biotinidasa no es afectada por el estatus de la vitamina. Particularmente importante para nuestra investigación es que el ciclo de biotina parece ser expresado en cerebro de manera constitutiva. Igualmente importante es que el modesto aumento en el ARNm de biotinidasa sugiere que este órgano podría ver aumentada su capacidad para reciclar biotina bajo condiciones limitantes de biotina. En este trabajo proponemos, que cuando el acceso a biotina es reducido o limitado, la expresión de ARNm asociados con la utilización de biotina en órganos periféricos, en especial hígado y riñón, es reprimida, mientras permanecen expresados constitutivamente en el cerebro. Basado en estos resultados sugerimos que el propósito de este mecanismo de regulación transcripcional es preservar la función esencial de biotina en el cerebro a expensas del hígado durante la deprivación de biotina.

En este modelo sugerimos que la reducción en la utilización de biotina en tejidos periféricos durante períodos de ayuno favorece el acceso del cerebro a la biotina libre circulante en plasma proveniente de la dieta y del reciclamiento endógeno. En este escenario, la biotina libre es conducida al cerebro como consecuencia de la reducción de los ARNm de SMVT, HCS y carboxilasas en hígado, reduciendo así la utilización de biotina. Los hallazgos que hemos obtenido acerca de la expresión constitutiva del ARNm de biotinidasa en células humanas y tejidos periféricos de rata, complementan los resultados publicados por Baumgartner y cols. quienes demostraron que la deficiencia de biotina no afecta la actividad enzimática de biotinidasa en cultivos celulares (33). Con base en estos resultados, sugerimos que la liberación de biotina unida a proteína continúa funcionando en hígado y otros órganos periféricos en condiciones de deficiencia de

biotina, sin embargo, una parte de esta vitamina liberada, es conducida al torrente circulatorio debido a la reducción en la utilización de la misma en estos tejidos.

Es interesante hacer notar que en el cerebro se ha documentado la presencia de un transportador de biotina de alta afinidad (34). En este escenario el flujo de biotina proveniente de la dieta y la biotina liberada a partir de hígado, son dirigidos hacia el torrente circulatorio y finalmente al cerebro, en donde la captación constitutiva y utilización de biotina; vía HCS, así como el incremento en el reciclamiento de biotina; vía biotinidasa, aseguran el funcionamiento óptimo de carboxilasas dependientes de biotina en periodos de deficiencia de esta vitamina.

La utilización preferencial de biotina por el cerebro fue confirmada por medio de análisis de carboxilasas biotiniladas en hígado y cerebro de ratas normales y deficientes de biotina. A pesar de las condiciones de deficiencia de biotina, los niveles de carboxilasas biotiniladas en el cerebro fueron similares a los observados en animales control, mientras que en hígado el contenido de carboxilasas biotiniladas fue severamente disminuido. Estudios previos han demostrado que el contenido de biotina en el cerebro así como la actividad de carboxilasas dependientes de biotina son relativamente preservados en condiciones de deficiencia de biotina (35-39). La reducción en la cantidad de carboxilasas biotiniladas en hígado puede deberse a la disminución en la síntesis de carboxilasas y a la reducción en la transferencia de biotina como consecuencia de la disminución en la síntesis de HCS. Estos datos concuerdan con estudios publicados anteriormente acerca de la acumulación de carboxilasas no biotiniladas (apocarboxilasas) en hígado de ratas deficientes de biotina (40,41).

La regulación del ciclo de biotina parece ocurrir mediante la activación de la vía de transducción de señales HCS-GCs-PKG (Fig. 6). Previamente demostramos que la represión de la síntesis de ARNm de HCS, ACC-1 y la subunidad alpha de PCC por deficiencia de biotina puede ser revertida estimulando las células con GMPC (8-Br-

cGMP) y la transcripción de estos genes puede ser interrumpida con inhibidores de las enzimas GCs y PKG (29). En este trabajo hemos demostrado que la transcripción de SMVT y PC es regulada por el mismo mecanismo dependiente de GMPc y que la enzima biotinidasa no es regulada por esta vía. La expresión constitutiva de biotinidasa puede explicar el extenso periodo requerido (en células o animales de laboratorio) para producir deficiencia de biotina. Muy probablemente, estos resultados son un reflejo del tiempo requerido para agotar la biotina endógena que continúa siendo liberada a través de la biotinidasa durante el período de deficiencia de biotina. En principio, la actividad constitutiva de biotinidasa, puede contribuir a la sobrevivencia celular al convertirse en la fuente principal de biotina libre en órganos como hígado para alimentar el metabolismo a través de la activación de carboxilasas. Los niveles remanentes de ARNm de HCS, SMVT y carboxilasas (30%) en células deficientes de biotina podrían sugerir que el sistema de represión transcripcional no tiene la finalidad de reprimir por completo la utilización de biotina sino limitarla a un nivel de subsistencia.

Los resultados obtenidos para HCS son similares a los encontrados por el grupo de Rodríguez-Meléndez, quienes mostraron que los niveles de ARNm son afectados substancialmente en hígado de ratas deficientes de biotina, mientras que cerebro presenta cambios mínimos. Sin embargo, diferente a lo que nosotros reportamos, ellos no observaron una disminución en los niveles de ARNm de PC. La variación en los resultados obtenidos, puede deberse al método utilizado, ya que este mismo grupo reportó que la actividad de PC y PCC al igual que la masa proteica si responden con una reducción en condiciones de deficiencia de biotina (30).

Nuestras investigaciones sugieren que la inmunidad del cerebro a la deficiencia de biotina es una propiedad específica de este tejido mas que un reflejo de una característica celular, ya que al incubar células C6 de rata en un medio deficiente de biotina, los niveles de ARNm de SMVT, HCS y PC fueron reducidos de manera muy similar a lo observado en células HepG2 y fibroblastos humanos. Este modelo es apoyado por resultados publicados anteriormente que muestran una fuerte reducción de las actividades de

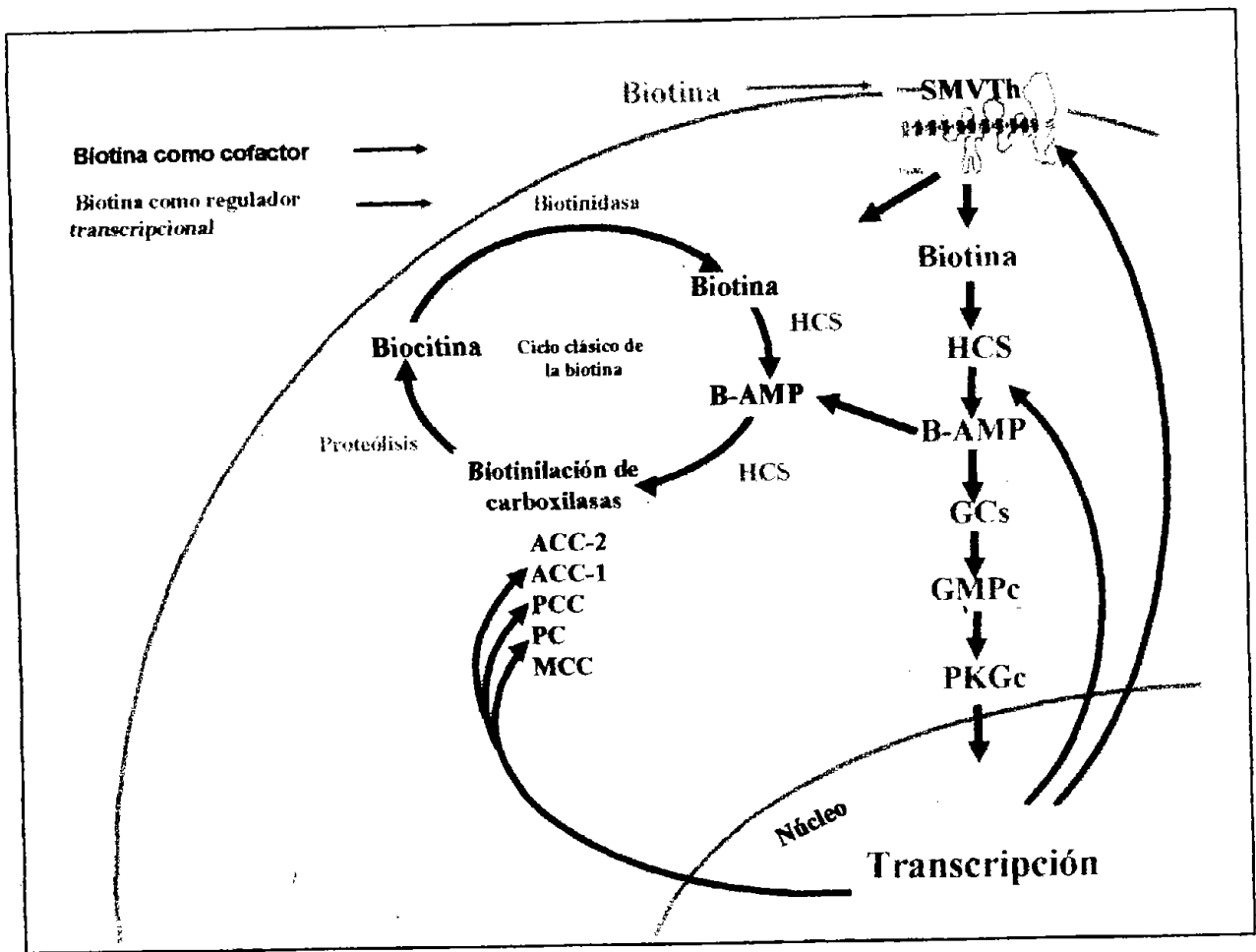


Fig. 6. Representación esquemática del ciclo de utilización de biotina en células humanas. La función de biotina como cofactor de carboxilasas es indicada en azul y la función transcripcional es representada en rojo.

carboxilasas en neuronas, oligodendroglia y queratinocitos cultivados en medio libre de biotina (33).

La hipótesis de preservar los niveles de biotina en el cerebro a expensas del hígado indica la importancia de carboxilasas funcionales en el metabolismo cerebral (35) (Fig.7). En el cerebro, la actividad de la enzima PC es importante para la generación del alfa-cetoglutarato el cual se pierde debido a la liberación de glutamato y GABA de neuronas y a la exportación de glutamina por la glia (36,37). Recientemente se ha demostrado que la carboxilación del piruvato en neuronas y glia puede aportar hasta un 30% y 40-60% respectivamente de los intermediarios del ciclo de Krebs (37). Esto podría explicar el porque un organismo sacrificaría temporalmente los requerimientos de biotina en otros órganos para mantener el desarrollo y funcionamiento del cerebro.

La distribución diferencial de nutrientes en hígado versus cerebro no es un mecanismo exclusivo para la biotina. Durante muchos años se ha sabido que el patrón de tráfico de glucosa de un órgano a otro es distinto en los estados de alimentación normal y ayuno. Durante el ayuno, la mayoría de los tejidos, pero no el cerebro, limitan su consumo de glucosa al internalizar los transportadores GLUT4 en respuesta a una reducción del cociente insulina/glucagon. El flujo de glucosa hacia las neuronas no es dependiente de insulina, lo que garantiza la presencia de este metabolito en el cerebro de manera independiente del estado nutricional del organismo. Detrás de este tipo de regulación tejido específica en la utilización de glucosa esta el hecho de que el cerebro depende casi exclusivamente de este carbohidrato como fuente de energía. El suministro continuo de glucosa al cerebro se logra reduciendo su utilización por tejido muscular y manteniendo el transporte de glucosa independiente de insulina en las neuronas (20,42,43). La importancia de las carboxilasas dependientes de biotina para el metabolismo cerebral sugiere similitudes entre los sistemas de economía cerebral de biotina y glucosa durante el ayuno.

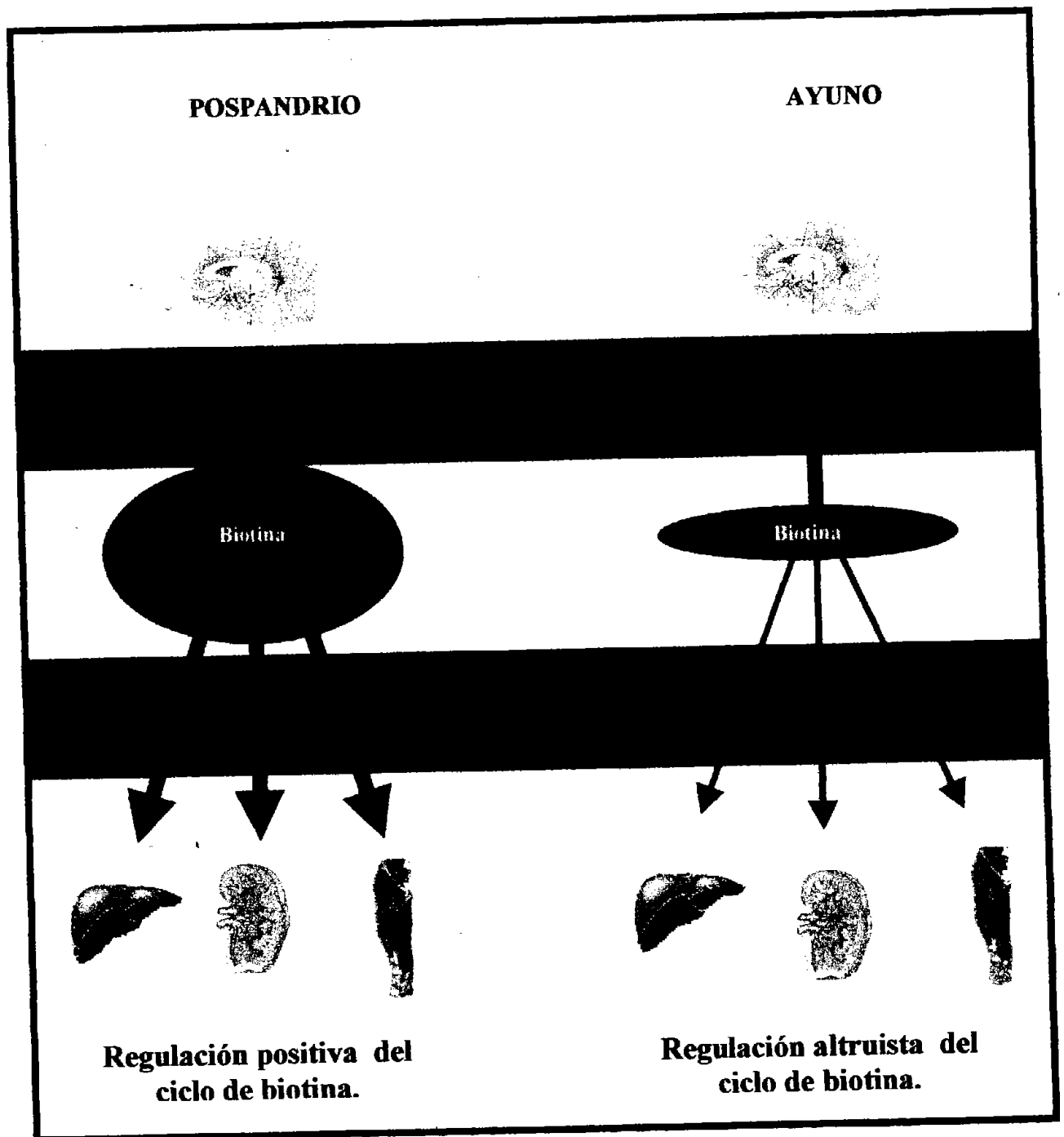


Fig. 7. Modelo de altruismo tisular para la regulación de la utilización de biotina en cerebro, hígado y músculo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wolf, B. (2001) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver C., B. A., William S., Valle D., ed) Vol. 3, pp. 3935-3962, 4 vols., McGraw-Hill Professional
2. Pacheco-Alvarez, D., Solórzano-Vargas, R. S., and León Del Río, A. (2002) *Arch Med Res* **33**, 439-447
3. Prasad, P. D., Wang, H., Kekuda, R., Fujita, T., Fei, Y., Devoe, L. D., Leibach, F. H., and Ganapathy, V. (1998) *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 7501-7506
4. Wang, H., Huang, W., Fei, Y. J., Xia, H., Yang-Feng, T. L., Leibach, F. H., Devoe, L. D., Ganapathy, V., and Prasad, P. D. (1999) *J Biol Chem* **274**, 14875-14883.
5. Prasad, P. D., Wang, H., Huang, W., Fei, Y. J., Leibach, F. H., Devoe, L. D., and Ganapathy, V. (1999) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **366**, 95-106
6. Balamurugan, K., Ortiz, A., and Said, H. M. (2003) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G73-77
7. Leon-Del-Rio, A., Leclerc, D., Akerman, B., Wakamatsu, N., and Gravel, R. A. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4626-4630.
8. Chapman-Smith, A., Cronan, J.E. Jr. (1999) *Trends Biochem Sci* **24**, 359-363
9. Leon-Del-Rio, A., and Gravel, R. A. (1994) *J Biol Chem* **269**, 22964-22968
10. Hymes, J., and Wolf, B. (1996) *Clin Chim Acta* **255**, 1-11
11. Dupuis, L., Campeau, E., Leclerc, D., and Gravel, R. A. (1999) *Mol Genet Metab* **66**, 80-90.
12. Wolf, B., Grier, R. E., Secor McVoy, J. R., and Heard, G. S. (1985) *J Inherit Metab Dis* **8**, 53-58.
13. Stanley, J. S., Griffin, J. B., and Zempleni, J. (2001) *Eur J Biochem* **268**, 5424-5429.
14. Petrelli, F., Coderoni, S., Moretti, P., and Paparelli, M. (1978) *Mol Biol Rep* **4**, 87-92.
15. Vesely, D. L. (1982) *Science*. 1982 Jun 18;216(4552):1329-30. **216**, 1329-1330
16. Singh, I. N., Dakshinamurti, K. (1988) *Mol Cell Biochem* **79**, 47-55
17. Zempleni, J., Mock, D.M. (1999) *Arch Biochem Biophys*. **371**, 83-88
18. Hymes, J., Fleischhauer, K., and Wolf, B. (1995) *Biochem Mol Med* **56**, 76-83.
19. Narang, M. A., Dumas, R., Ayer, L. M., and Gravel, R. A. (2003) *Hum Mol Genet*
20. Spence, J. T., and Koudelka, A. P. (1984) *J Biol Chem* **259**, 6393-6396.
21. Bowers-Komro, D. M., and McCormick, D. B. (1984) *Nutrition reviews* **42**, 360-361
22. Chauhan, J., and Dakshinamurti, K. (1991) *J Biol Chem* **266**, 10035-10038.
23. Collins, J., Paietta, E., and Green, R. (1988) *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 11280-11283
24. Deodhar, A. D., and Mistry, S. P. (1970) *Life Sci II* **9**, 581-588.
25. Dakshinamurti, K., Tarrago-Litvak, L., and Hong, H. C. (1970) *Can J Biochem* **48**, 493-500.

26. Borboni, P., Magnaterra, R., Rabini, R. A., Staffolani, R., Porzio, O., Sesti, G., Fusco, A., Mazzanti, L., Lauro, R., and Marlier, L. N. (1996) *Acta Diabetol* **33**, 154-158.
27. De La Vega, L. A., Stockert, R.J. (2000) *Am J Physiol Cell Physiol*. **279**, C2037-2042.
28. Maeda, Y., Kawata, S., Inui, Y., Fukuda, K., Igura, T., and Matsuzawa, Y. (1996) *J Nutr* **126**, 61-66
29. Solorzano-Vargas, R. S., Pacheco-Alvarez, D., and Leon-Del-Rio, A. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5325-5330
30. Rodriguez-Melendez, R., Cano, S., Mendez, S. T., and Velazquez, A. (2001) *J Nutr* **131**, 1909-1913.
31. Morita, J., Thuy, L. P., and Sweetman, L. (1998) *Mol Genet Metab* **64**, 250-255.
32. Salto, R., Giron, M. D., del Mar Sola, M., and Vargas, A. M. (1999) *Mol Cell Biochem* **200**, 111-117.
33. Suormala, T., Wiesmann, U.N., Cruz, F., Wolf, A., Daschner, M., Limat, A., Fowler, B., Baumgartner, E.R. (2002) *Int J Vitam Nutr Res*. **72**, 278-286
34. Rodriguez-Pombo, P., Ugarte, M. (1992) *J Neurochem*. **58**, 1460-1463
35. Sander, J. E., Packman, S., and Townsend, J. J. (1982) *Neurology* **32**, 878-880.
36. Chiang, G. S., Mistry, S.P. (1974) *Proc Soc Exp Biol Med*. **146**, 21-24
37. Schrijver, J., Dias, T., and Hommes, F. A. (1979) *Nutr Metab* **23**, 179-191
38. Bhagavan, H. N., and Coursin, D. B. (1970) *Journal of neurochemistry* **17**, 289-290
39. Lo W, Kadlecsek, T., and Packman, S. (1991) *J. Nutr. Sci. Vitaminol* **37**, 567-572
40. Rodriguez-Melendez, R., Perez-Andrade, M. E., Diaz, A., Deolarte, A., Camacho-Arroyo, I., Ciceron, I., Ibarra, I., and Velazquez, A. (1999) *Mol Genet Metab* **66**, 16-23
41. Weiner, D., and Wolf, B. (1991) *Biochem Med Metab Biol* **46**, 344-363
42. Watson, R. T., and Pessin, J. E. (2001) *Recent Prog Horm Res* **56**, 175-193
43. Das, U. G., Schroeder, R. E., Hay, W. W. J., and Devaskar, S. U. (1999) *Am. J. Physiol*. **276**, R809-817

CAPÍTULO IV

Discusión General

Durante los últimos 35 años, diferentes grupos de investigación han sugerido que la biotina, además de su papel como cofactor de carboxilasas, es necesaria para la regulación de la expresión de las enzimas glucocinasa hepática (GK), ornitina transcarbamilasa (OTC), fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK), receptor de asialoglicoproteínas (RASG), fosfofructokinasa (PFK), piruvato kinasa y holocarboxilasa sintetasa (HCS) (86-88, 91, 95, 99, 101, 105). Sin embargo, a pesar del número de investigadores interesados en este fenómeno, el mecanismo responsable del efecto de biotina sobre la expresión genética era desconocido hasta el inicio de este proyecto en el laboratorio del Dr. León Del Río.

Durante la primera fase de mi entrenamiento como estudiante de doctorado, trabajé en colaboración con el Dr. Sergio Solórzano Vargas con el objetivo de determinar el mecanismo por el cual la biotina afecta la expresión de diversas enzimas hepáticas. Como resultado de este trabajo describimos que la biotina modifica los niveles de ARNm de HCS, PCC y ACC-1 en células humanas, mediante la activación de una cascada de transducción de señales en la que participan la enzima GCs, el segundo mensajero GMPc y la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) (57). Este mecanismo de respuesta a biotina había sido descrito anteriormente por el grupo de Stockert y cols. para explicar el efecto post-transcripcional de esta vitamina en la expresión del receptor de asialogliproteínas (RASG) (89, 101, 103, 113).

La contribución más importante de este trabajo fue el identificar a la enzima HCS, como una enzima bifuncional, que además de catalizar la biotinilación de carboxilasas, es la responsable de la activación de la cascada GCs-PKG (Fig. 6, Capítulo III). El utilizar fibroblastos de pacientes con deficiencia de HCS permitió conocer que el efecto sobre la transcripción de HCS, PCC y ACC-1, es mediado por el compuesto B-AMP y no por la biotina *per se*. Estos resultados sugieren que el fenotipo de la enfermedad DMC por deficiencia de HCS pudiera deberse al menos en parte a una síntesis deficiente de ciertas carboxilasas dependientes de biotina (57). La bioquímica de este mecanismo es de gran interés ya que el efecto del B-AMP sobre la actividad de la GCs no tiene precedente. En

especial si consideramos que la activación de la GCs es mediada por NO o CO₂. Estos datos y los resultados del capítulo II sugieren la posible existencia de otra enzima, hasta ahora desconocida, que una la síntesis de B-AMP por la HCS con el incremento en la actividad de GCs.

La actividad transcripcional de la HCS es evolutivamente un modelo único debido a su semejanza con la proteína bacteriana BirA. Durante la evolución, BirA en bacterias y HCS en eucariontes fueron seleccionadas para catalizar la biotinilación de carboxilasas y regular la expresión genética. Sin embargo, a diferencia de la biotinilación de carboxilasas, donde ambas proteínas utilizan el mismo mecanismo, el efecto transcripcional de estas dos enzimas es mediado por mecanismos completamente diferentes (53). La proteína BirA es un factor transcripcional, mientras que la HCS, como se describió anteriormente, recluta una cascada de transducción de señales (57).

Los resultados descritos en el capítulo I, tienen implicaciones directas en la comprensión de las bases moleculares de la enfermedad DMC. Anterior a este estudio, se consideraba que las grandes dosis de biotina requeridas para normalizar el metabolismo de los pacientes afectados, eran resultado de la baja afinidad de HCS por biotina. Sin embargo, nuestros resultados sugieren la posibilidad de que la represión de la síntesis de HCS y carboxilasas, como consecuencia de los bajos niveles de B-AMP, puedan estar involucrados en la necesidad de concentraciones farmacológicas de biotina para corregir el defecto en DMC.

La existencia de una cascada de transducción de señales activada por HCS y B-AMP, puede en principio explicar el efecto de la biotina en la expresión de diversas enzimas y el aumento de malformaciones congénitas en animales de laboratorio deficientes de biotina. Sin embargo, es necesario identificar todos los genes que son regulados por biotina, para sustentar esta hipótesis, en especial aquellos que juegan un papel importante en el desarrollo embrionario.

Aunque los resultados descritos anteriormente ponen de manifiesto las implicaciones metabólicas y genéticas de la deficiencia de biotina, una pregunta que quedaba aun sin contestar era determinar el papel fisiológico de la regulación transcripcional por biotina.

Como se describió anteriormente, la biotina es una vitamina hidrosoluble que no puede almacenarse en forma libre en el organismo y que se encuentra en cantidades traza en la naturaleza. Por estas razones es difícil explicar las ventajas evolutivas que pudiera presentar al organismo el que la transcripción de al menos nueve genes esenciales para mantener la homeostasis metabólica dependa de esta vitamina. Durante la evolución humana, es probable que nuestros ancestros sufrieron de deficiencia de biotina debido a una dieta pobre en esta vitamina o a la inanición. Por esta razón resulta una paradoja que nuestras células cuenten con un sistema que disminuye la expresión de enzimas necesarias para la utilización de la biotina cuando esta se encuentra en concentraciones bajas. Para explicar la naturaleza autodestructiva de este mecanismo, propuse que la función de la regulación transcripcional por biotina era la de limitar la utilización de biotina a través de la regulación del ciclo de utilización de esta vitamina.

Para explorar esta posibilidad estudié el efecto de la deficiencia de biotina sobre la expresión de los niveles de ARNm de SMVT, HCS, PC y biotinidasa en células HepG2 y en un modelo animal (rata). Los resultados obtenidos indican que la expresión de estas enzimas, exceptuando a la biotinidasa, están bajo el control de la cascada de transducción de señales activada por HCS.

Para tratar de entender el papel fisiológico de este sistema, recurrimos primero a la literatura, en donde encontramos observaciones que tampoco pueden ser explicadas con base a las funciones de biotina en el organismo y que pudieran estar relacionadas con nuestros resultados. La deficiencia de biotina en ratas de laboratorio resulta en una disminución severa en la actividad de las carboxilasas en hígado y riñón, sin embargo, en

el cerebro la actividad de estas enzimas es solo moderadamente afectada (114, 115) (116). Igualmente importantes son los reportes que demuestran que la concentración de biotina en líquido cefalorraquídeo es 2.5 veces mayor que la concentración en plasma durante condiciones de homeostasis metabólica (114) y que la masa de las carboxilasas disminuye en el hígado de ratas deficientes de biotina mientras que en el cerebro permanecen sin cambio (105). Estos datos sugieren que el cerebro es un órgano privilegiado que es protegido durante la deficiencia de biotina. El mecanismo involucrado podría tener como base la regulación transcripcional del ciclo de biotina mediante la actividad de HCS y la cascada GCs-PKG. Sin embargo, esto implicaría que la regulación transcripcional dependiente de biotina tuviera especificidad de tejido.

Para probar esta hipótesis, estudié el efecto de la deficiencia de biotina en la expresión de enzimas del ciclo de biotina en diversos órganos de rata, un modelo animal de deficiencia de biotina desarrollado en el laboratorio del Dr. Antonio Velázquez. Este mismo modelo había sido ya utilizado por otros investigadores (12, 13, 93, 117) (105, 117, 118). Mis resultados demostraron que en órganos periféricos, como hígado y riñón, la deficiencia de biotina genera la disminución de los niveles de ARNm de SMVT, HCS y PC, mientras que en el cerebro los niveles permanecieron sin cambio. Estos resultados confirman la naturaleza privilegiada del cerebro y sugieren que durante la deficiencia de biotina, la habilidad para utilizar esta vitamina en tejidos como hígado y riñón sería reducida de manera considerable. Es particularmente interesante el hecho de que los niveles de ARNm de biotinidasa en cerebro, aumentaron aproximadamente 30% durante la deficiencia de biotina, sugiriendo que la protección al cerebro durante condiciones limitantes de biotina en el organismo, podría incluir un aumento en el reciclamiento de la misma en tejido cerebral.

Este mecanismo garantizaría que durante la deficiencia de biotina o el ayuno, los órganos periféricos limitarían el uso de esta vitamina permitiendo un flujo continuo de la misma al cerebro. En este escenario la actividad de biotinidasa permitiría a estos órganos sobrevivir durante tiempos cortos mediante la activación de carboxilasas utilizando

biotina reciclada. A este mecanismo de regulación diferencial de la utilización de biotina le hemos denominado “altruismo tisular” (Fig. 7. Capítulo III).

La existencia de este mecanismo puede estar relacionada con la importancia del papel fundamental que desempeñan algunas carboxilasas dependientes de biotina en el cerebro. La carboxilación de piruvato a oxaloacetato es catalizada por la enzima piruvato carboxilasa y es indispensable para el funcionamiento del ciclo de Krebs. Estudios recientes han reportado que la carboxilación de piruvato en neuronas y glía contribuye en un 30% y 40-60% al suministro de energía requerida por el cerebro (119). En este órgano la actividad de PC es particularmente importante debido a que compensa la pérdida de α -cetoglutarato causada por la liberación de sus derivados, los neurotransmisores glutamato y GABA durante la actividad neuronal. La carboxilación de piruvato en cerebro, también es importante en la detoxificación de amonía a través de la formación de glutamina (120).

El mecanismo de utilización preferencial de nutrientes por algún órgano específico bajo condiciones limitantes, no es único para biotina, la utilización preferencial de glucosa en cerebro bajo condiciones de ayuno prolongado ha sido extensamente estudiado. La mayoría de los tejidos en el organismo utilizan glucosa y ácidos grasos como fuente de energía, sin embargo, el cerebro utiliza sólo glucosa (121). Se ha documentado que en estados de ayuno prolongado, hay un aumento en la regulación de glicólisis cerebral, a través de un incremento paralelo en el rango del transporte de glucosa de la sangre al cerebro. Bajo estas condiciones, hay un aumento en la regulación transcripcional y postranscripcional de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3, isoformas localizadas en la barrera hematoencefálica y en tejido neuronal respectivamente (121). En condiciones de ayuno prolongado, los órganos periféricos, limitan su consumo de glucosa al reducir el número de transportadores GLUT4 en la membrana plasmática en respuesta a una reducción del cociente insulina/glucagon (122). La importancia de las carboxilasas dependientes de biotina para el metabolismo cerebral sugiere similitudes entre los sistemas de economía cerebral de biotina y glucosa durante el ayuno.

Estudios anteriores a este proyecto demostraron que la biotina también afecta la expresión de enzimas hepáticas, como glucocinasa y fosfoenolpiruvato carboxikinasa, que no están involucradas en su utilización. Aunque estas enzimas no fueron estudiadas por este trabajo, es interesante especular que su regulación es también parte de un complejo mecanismo dependiente de biotina para mantener la homeostasis metabólica en el cerebro. La suplementación de biotina aumenta el ARNm de glucocinasa y reprime la expresión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxikinasa (94, 102). Este mecanismo puede contribuir al mantenimiento de los niveles de glucosa en plasma durante el ayuno. El grupo de Stockert, quien describió la regulación traduccional dependiente de biotina del receptor de asialoglicoproteínas y el receptor de insulina, ha determinado que este proceso también es dependiente del segundo mensajero GMPc (123, 124). Estos datos sugieren que la vía de transducción de señales HCS-GCs-PKG puede tener un impacto más amplio que la mera regulación de la biotinilación de carboxilasas y ayudar a transmitir señales nutricionales más generales para la regulación de la homeostasis metabólica en hígado y cerebro.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

1. Wolf, B. (2001) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, ed. Scriver C., B. A., William S., Valle D. (McGraw-Hill Professional, Vol. 3, pp. 3935-3962.
2. Jitrapakdee, S. & Wallace, J. C. (2003) *Curr Protein Pept Sci* **4**, 217-29.
3. Kogl (1935) *Chem. Ber.* **68**, A16.
4. Moss, J. & Lane, M. D. (1971) *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **35**, 321-442.
5. Gyorgy, P., Kuhn, R., Lederer, E. (1939) *J. Biol. Chem.* **131**, 733-744.
6. Lardy, H. A. & Peanasky, R. (1953) *Physiol Rev* **33**, 560-5.
7. Wakil, S. J., Titchener, E. B. & Gibson, D. M. (1958) *Biochim Biophys Acta* **29**, 225-6.
8. Lane, M. D., Young, D. L. & Lynen, F. (1964) *J Biol Chem* **239**, 2858-64.
9. Wood, H. G. & Barden, R. E. (1977) *Annu Rev Biochem* **46**, 385-413.
10. Baumgartner, E. R. & Suormala, T. (1997) *Int J Vitam Nutr Res* **67**, 377-84.
11. Leon-Del-Rio, A., Hol-Soto-Borja, D. & Velazquez, A. (1993) *Arch Med Res* **24**, 143-6.
12. Weiner, D. & Wolf, B. (1991) *Biochem Med Metab Biol* **46**, 344-63.
13. Said, H. M., Mock, D. M. & Collins, J. C. (1989) *Am J Physiol* **256**, G306-11.
14. Dyer, D. L. & Said, H. M. (1997) *Methods Enzymol* **279**, 393-405.
15. Said, H. M., Ortiz, A., McCloud, E., Dyer, D., Moyer, M. P. & Rubin, S. (1998) *Am J Physiol* **275**, C1365-71.
16. Spector, R. & Mock, D. (1987) *Journal of Neurochemistry* **48**, 400-404.
17. Rodriguez-Pombo, P., Ugarte, M. (1992) *J Neurochem.* **58**, 1460-3.
18. Leon-Del-Rio, A., Velazquez, A., Vizcaino, G., Robles-Diaz, G. & Gonzalez-Noriega, A. (1990) *Ann Nutr Metab* **34**, 266-72.
19. Grafe, F., Wohlrab, W., Neubert, R.H, Brandsch, M. (2003) *J Invest Dermatol.* **120**, 428-33.
20. Wang, H., Huang, W., Fei, Y. J., Xia, H., Yang-Feng, T. L., Leibach, F. H., Devoe, L. D., Ganapathy, V. & Prasad, P. D. (1999) *J Biol Chem* **274**, 14875-83.
21. Prasad, P. D., Wang, H., Huang, W., Fei, Y. J., Leibach, F. H., Devoe, L. D. & Ganapathy, V. (1999) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **366**, 95-106.
22. Prasad, P. D., Wang, H., Kekuda, R., Fujita, T., Fei, Y. J., Devoe, L. D., Leibach, F. H. & Ganapathy, V. (1998) *J Biol Chem* **273**, 7501-6.
23. Prasad, P. D. & Ganapathy, V. (2000) *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **3**, 263-6.
24. Balamurugan, K., Ortiz, A., Said, H.M. (2003) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **285**, G73-7.
25. Smanik, P. A., Liu, Q., Furminger, T. L., Ryu, K., Xing, S., Mazzaferri, E. L. & Jhiang, S. M. (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **226**, 339-45.
26. Dey, S., Subramanian, V. S., Chatterjee, N. S., Rubin, S. A. & Said, H. M. (2002) *Biochim Biophys Acta* **1574**, 187-92.
27. Chatterjee, N. S., Rubin, S. A. & Said, H. M. (2001) *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C548-55.

28. Nabokina, S. M., Subramanian, V. S. & Said, H. M. (2003) *Am J Physiol Renal Physiol* **284**, F737-42.
29. Crisp, S. E., Griffin, J. B., White, B. R., Toombs, C. F., Camporeale, G., Said, H. M. & Zempleni, J. (2004) *Eur J Nutr* **43**, 23-31.
30. Manthey KC, G. J., Zempleni J. (2002) *J Nutr.* **132**, 887-92.
31. Leon-Del-Rio, A. & Gravel, R. A. (1994) *J Biol Chem* **269**, 22964-8.
32. Leon-Del-Rio, A., Leclerc, D., Akerman, B., Wakamatsu, N. & Gravel, R. A. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4626-30.
33. Campeau, E. & Gravel, R. A. (2001) *J Biol Chem* **276**, 12310-6.
34. Dupuis, L., Campeau, E., Leclerc, D. & Gravel, R. A. (1999) *Mol Genet Metab* **66**, 80-90.
35. Lee, J. J., Moon, Y. A., Ha, J. H., Yoon, D. J., Ahn, Y. H. & Kim, K. S. (2001) *J Biol Chem* **276**, 2576-85.
36. Abu-Elheiga, L., Almarza-Ortega, D. B., Baldini, A. & Wakil, S. J. (1997) *J Biol Chem* **272**, 10669-77.
37. Abu-Elheiga, L., Jayakumar, A., Baldini, A., Chirala, S. S. & Wakil, S. J. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4011-5.
38. Kim, K. H. (1997) *Annu Rev Nutr* **17**, 77-99.
39. Abu-Elheiga, L., Brinkley, W. R., Zhong, L., Chirala, S. S., Woldegiorgis, G. & Wakil, S. J. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1444-9.
40. Kim, K. H. (1997) *Annu Rev Nutr.* **17**, 77-99.
41. Boone, A. N., Rodrigues, B. & Brownsey, R. W. (1999) *Biochem J* **341** (Pt 2), 347-54.
42. Blom, W. & Scholte, H. R. (1981) *The new England Journal of medicine* **305**, 465-466.
43. Jitrapakdee, S. & Wallace, J. C. (1999) *Biochem J* **340** (Pt 1), 1-16.
44. Carbone, M. A., MacKay, N., Ling, M., Cole, D. E., Douglas, C., Rigat, B., Feigenbaum, A., Clarke, J. T., Haworth, J. C., Greenberg, C. R., Seargeant, L. & Robinson, B. H. (1998) *Am J Hum Genet* **62**, 1312-9.
45. Wallace, J. C., Jitrapakdee, S. & Chapman-Smith, A. (1998) *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 1-5.
46. Shank, R. P., Bennett, G. S., Freytag, S. O. & Campbell, G. L. (1985) *Brain Res* **329**, 364-7.
47. Robinson, B. (2001) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, ed. Scriver, C., Beaudet, AL., Sly, WS., Valle, D. (Mc. Graww Hill, U.S.A.), Vol. **2**, pp. 2275-2295.
48. Nelson, D. L., Cox, M.M. (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry* (Worth Publisher, New York, U.S.A.).
49. Perez-Cerda, C., Merinero, B., Marti, M., Cabrera, J.C., Pena, L., Garcia, M.J., Gangoiti, J., Sanz, P., Rodriguez-Pombo, P., Hoenicka, J., Richard, E., Muro, S., Ugarte, M. (1988) *Eur J Pediatr.* **157**, 50-2.
50. Campeau, E., Dupuis, L., Leon-Del-Rio, A., Gravel, R. (1999) *Mol Genet Metab.* **67**, 11-22.
51. Desviat, L. R., Perez-Cerda, C., Perez, B., Esparza-Gordillo, J., Rodriguez-Pombo, P., Penalva, M. A., Rodriguez De Cordoba, S. & Ugarte, M. (2003) *Mol Genet Metab* **80**, 315-20.

52. Baumgartner, M. R., Dantas, M. F., Suormala, T., Almashanu, S., Giunta, C., Friebel, D., Gebhardt, B., Fowler, B., Hoffmann, G. F., Baumgartner, E. R. & Valle, D. (2004) *Am J Hum Genet* **75**, 790-800.
53. Chapman-Smith, A. & Cronan, J. E., Jr. (1999) *Trends Biochem Sci* **24**, 359-63.
54. Chapman-Smith, A., Cronan, J.E. Jr. (1999) *J Nutr.* **129**, 477S-484S.
55. Chapman-Smith, A., Cronan, J.E. Jr. (1999) *Trends Biochem Sci.* **24**, 359-63.
56. Suzuki, Y., Aoki, Y., Ishida, Y., Chiba, Y., Iwamatsu, A., Kishino, T., Niikawa, N., Matsubara, Y. & Narisawa, K. (1994) *Nat Genet* **8**, 122-8.
57. Solorzano-Vargas, R. S., Pacheco-Alvarez, D. & Leon-Del-Rio, A. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5325-30.
58. Wilson, K. P., Shewchuk, L. M., Brennan, R. G., Otsuka, A. J. & Matthews, B. W. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9257-61.
59. Dupuis, L., Leon-Del-Rio, A., Leclerc, D., Campeau, E., Sweetman, L., Saudubray, J. M., Herman, G., Gibson, K. M. & Gravel, R. A. (1996) *Hum Mol Genet* **5**, 1011-6.
60. Hymes, J. & Wolf, B. (1996) *Clin Chim Acta* **255**, 1-11.
61. Hymes, J. & Wolf, B. (1999) *J Nutr* **129**, 485S-489S.
62. Cole, H., Reynolds, T. R., Lockyer, J. M., Buck, G. A., Denson, T., Spence, J. E., Hymes, J. & Wolf, B. (1994) *J Biol Chem* **269**, 6566-70.
63. Hymes, J., Fleischhauer, K., Wolf, B (1997) in *Methods in enzymology*, ed. McCormick, D. B., Suttie, J.W., Wagner, C. (Academic Press, New York, U.S.A.), Vol. **279**, Part 1, pp. 422-434.
64. Knight, H. C., Reynolds, T. R., Meyers, G. A., Pomponio, R. J., Buck, G. A. & Wolf, B. (1998) *Mamm Genome* **9**, 327-30.
65. Sweetman, L., Bates, S. P., Hull, D. & Nyhan, W. L. (1977) *Pediatr Res* **11**, 1144-7.
66. Gompertz, D., Draffan, G. H., Watts, J. L. & Hull, D. (1971) *Lancet* **2**, 22-4.
67. Burri, B. J., Sweetman, L. & Nyhan, W. L. (1981) *J Clin Invest* **68**, 1491-5.
68. Wolf, B., Grier, R. E., Allen, R. J., Goodman, S. I. & Kien, C. L. (1983) *Clin Chim Acta* **131**, 273-81.
69. Santer, R., Muhle, H., Suormala, T., Baumgartner, E. R., Duran, M., Yang, X., Aoki, Y., Suzuki, Y. & Stephani, U. (2003) *Mol Genet Metab* **79**, 160-6.
70. Aoki, Y., Li, X., Sakamoto, O., Hiratsuka, M., Akaishi, H., Xu, L., Briones, P., Suormala, T., Baumgartner, E. R., Suzuki, Y. & Narisawa, K. (1999) *Hum Genet* **104**, 143-8.
71. Aoki, Y., Li, X., Sakamoto, O., Hiratsuka, M., Akaishi, H., Xu, L., Briones, P., Suormala, T., Baumgartner, E. R., Suzuki, Y. & Narisawa, K. (1999) *Hum Genet* **104**, 143-8.
72. Wolf, B., Grier, R. E., Secor McVoy, J. R. & Heard, G. S. (1985) *J Inherit Metab Dis* **8**, 53-8.
73. Hymes, J., Fleischhauer, K. & Wolf, B. (1995) *Biochem Mol Med* **56**, 76-83.
74. Baumgartner, E. R., Suormala, T.M., Wick, H., Probst, A., Blauenstein, U., Bachmann, C., Vest, M. (1989) *Pediatr Res.* **26**, 260-6.
75. Hymes, J., Stanley, C. M. & Wolf, B. (2001) *Hum Mutat* **18**, 375-81.
76. Swango, K. L. & Wolf, B. (2001) *Mol Genet Metab* **74**, 492-9.

77. Ozand, P. T., Gascon, G.G., Al Essa, M., Joshi, S., Al Jishi, E., Bakheet, S., Al Watban, J., Al-Kawi, M.Z., Dabbagh, O. (1998) *Brain* **121**, 1267-79.
78. Zempleni J, M. D. (2000) *Proc Soc Exp Biol Med*. **223**, 14-21.
79. Watanabe, T. & Endo, A. (1991) *J Nutr* **121**, 101-4.
80. Watanabe, T. (1993) *J Nutr* **123**, 2101-8.
81. Watanabe, T., Dakshinamurti, K. & Persaud, T. V. (1995) *J Nutr* **125**, 2114-21.
82. Mock, D. M., Mock, N. I., Stewart, C. W., LaBorde, J. B. & Hansen, D. K. (2003) *J Nutr* **133**, 2519-25.
83. Zempleni J, M. D. (2000) *Proc Soc Exp Biol Med* **223**(1), 14-21.
84. Petrelli, F., Coderoni, S., Moretti, P. & Paparelli, M. (1978) *Mol Biol Rep* **4**, 87-92.
85. Singh, I. N., Dakshinamurti, K. (1988) *Mol Cell Biochem* **79**, 47-55.
86. Bowers-Komro, D. M. & McCormick, D. B. (1984) *Nutrition reviews* **42**, 360-361.
87. Dakshinamurti, K. & Chauhan, J. (1991) *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 10035-10038.
88. Vesely, D. L. (1982) *Science*. 1982 Jun 18;216(4552):1329-30. **216**, 1329-30.
89. Collins, J. C., Paietta, E., Green, R., Morell, A. G. & Stockert, R. J. (1988) *J Biol Chem* **263**, 11280-3.
90. Narang, M. A., Dumas, R., Ayer, L. M. & Gravel, R. A. (2003) *Hum Mol Genet*.
91. Dakshinamurti, K. & Cheah-Tan, C. (1968) *Can J Biochem* **46**, 75-80.
92. Dakshinamurti, K., Tarrago-Litvak, L. & Hong, H. C. (1970) *Can J Biochem* **48**, 493-500.
93. Maeda, Y., Kawata, S., Inui, Y., Fukuda, K., Igura, T. & Matsuzawa, Y. (1996) *J Nutr* **126**, 61-6.
94. Chauhan, J. & Dakshinamurti, K. (1991) *J Biol Chem* **266**, 10035-8.
95. Collins, J., Paietta, E. & Green, R. (1988) *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 11280-11283.
96. Rodriguez-Melendez R, C. S., Mendez ST, Velazquez A. (2001) *J Nutr*. **131**, 1909-13.
97. Wiedmann S, E. J., Zempleni J. (2003) *J Nutr*. **133**, 716-9.
98. Scheerger, S. B. & Zempleni, J. (2003) *Int J Vitam Nutr Res* **73**, 461-7.
99. Spence, J. T. & Koudelka, A. P. (1984) *J Biol Chem* **259**, 6393-6.
100. Romero-Navarro G, C.-V. G., German MS, Matschinsky FM, Velazquez A, Wang J, Fernandez-Mejia C. (1999) *Endocrinology* **140**, 4595-600.
101. De La Vega, L. A. & Stockert, R. J. (2000) *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C2037-42.
102. Dakshinamurti, K. & Li, W. (1994) *Mol Cell Biochem* **132**, 127-32.
103. Stockert, R. J. & Morell, A. G. (1990) *J Biol Chem* **265**, 1841-6.
104. Rodriguez-Melendez R, C. G., Griffin JB, Zempleni J (2003) *Am J Physiol Cell Physiol*. **284**, C415-21.
105. Rodriguez-Melendez, R., Cano, S., Mendez, S. T. & Velazquez, A. (2001) *J Nutr* **131**, 1909-13.
106. Bhullar, R. P. & Dakshinamurti, K. (1985) *J Cell Physiol* **123**, 425-30.
107. Stanley, J. S., Mock, D. M., Griffin, J. B. & Zempleni, J. (2002) *J Nutr* **132**, 1854-9.

108. Hymes, J., Fleischhauer, K. & Wolf, B. (1995) *Clin Chim Acta* **233**, 39-45.
109. Pispá, J. (1965) *Ann Med Exp Biol Fenn* **43**, Suppl 5:1-39.
110. Zempleni, J., Mock, D.M. (1999) *Arch Biochem Biophys*. **371**, 83-8.
111. Stanley JS, G. J., Zempleni J. (2001) *Eur J Biochem*. **268**, 5424-9.
112. Narang, M. A., Dumas, R., Ayer, L. M. & Gravel, R. A. (2004) *Hum Mol Genet* **13**, 15-23.
113. Stockert, R. J. & Ren, Q. (1997) *J Biol Chem* **272**, 9161-5.
114. Lo W, Kadlecsek, T. & Packman, S. (1991) *J. Nutr. Sci. Vitaminol* **37**, 567-572.
115. Schrijver, J., Dias, T. & Hommes, F. A. (1979) *Nutr Metab* **23**, 179-91.
116. Sander, J. E., Packman, S. & Townsend, J. J. (1982) *Neurology* **32**, 878-80.
117. Bhagavan, H. N. & Coursin, D. B. (1970) *Journal of neurochemistry* **17**, 289-290.
118. Lo, W., Kadlecsek, T. & Packman, S. (1991) *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **37**, 567-72.
119. Hassel, B. (2000) *Mol Neurobiol* **22**, 21-40.
120. Hassel, B. (2001) *J Neurosci Res* **66**, 755-62.
121. Olson, A. L. & Pessin, J. E. (1996) *Annu Rev Nutr* **16**, 235-56.
122. Watson, R. T. & Pessin, J. E. (2001) *Recent Prog Horm Res* **56**, 175-93.
123. De La Vega, L. A., Stockert, R.J. (2000) *Am J Physiol Cell Physiol*. **279**, C2037-42.
124. Stockert, R. J. & Ren, Q. (1997) *J Biol Chem* **272**, 9161-5.

ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
B-AMP	Adenilato de biotina
DMC	Deficiencia múltiple de carboxilasas
EGB	Enfermedad de ganglio basal
GCs	Guanilato ciclasa soluble
GK	Glucokinasa
HCS	Holocarboxilasa sintetasa
MCC	B-metilcrotonil-CoA carboxilasa
OTC	Ornitina transcarbamilasa
PCC	Propionil-CoA carboxilasa
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PC	Piruvato carboxilasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa
PFK	Fosfofructokinasa
PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc
RASG	Receptor de asioglicoproteínas
SMVT	Transportador multivitamínico dependiente de sodio

APÉNDICE

Publicaciones

LA BIOTINA, UNA VITAMINA MULTIFUNCIONAL

Diana Pacheco-Alvarez y Alfonso León-Del-Río

Depto. de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Apdo. Postal 70-228, C.P. 04510, Ciudad Universitaria, México, D.F. E-mail: alfon@servidor.unam.mx

RESUMEN

La biotina es una vitamina soluble en agua que es utilizada como un cofactor de enzimas involucradas en reacciones de carboxilación. En humanos existen cinco carboxilasas dependientes de biotina: propionil-CoA carboxilasa, metilmalonil-CoA carboxilasa, piruvato-CoA carboxilasa y dos formas de acetil-CoA carboxilasa. Estas enzimas catalizan reacciones claves en gluconeogénesis, metabolismo de ácidos grasos y catabolismo de aminoácidos, además, la biotina juega un papel esencial en mantener la homeostasis metabólica de la célula. En años recientes, la biotina ha sido asociada a varias enfermedades en humanos. Algunas de éstas, están relacionadas a la deficiencia de enzimas involucradas en el metabolismo de biotina. Sin embargo, no todos los desórdenes que pueden ser tratados con biotina pueden ser explicados sobre las bases del papel clásico de esta vitamina en el metabolismo celular. Varios grupos han sugerido que la biotina puede estar involucrada en la regulación de la transcripción o expresión de diferentes proteínas. La biotinilación de histonas y la activación de cascadas de transducción de señales, han sido sugeridos como los mecanismos que se encuentran por detrás de las manifestaciones de la deficiencia de biotina no clásica en humanos.

Palabras Clave: Biotina, biotinidasa, carboxilasas, deficiencia múltiple de carboxilasas, holocarboxilasa sintetasa.

ABSTRACT

Biotin a water soluble vitamin is used as a cofactor of enzymes involved in carboxylation reactions. In humans there are five biotin dependent carboxylases: propionyl-CoA carboxylase, methylcrotonyl-CoA carboxylase, pyruvate carboxylase and two forms of acetyl-CoA carboxylase. These enzymes catalyze key reactions in gluconeogenesis, fatty acid metabolism and aminoacid catabolism and thus biotin plays an essential role in keeping the metabolic homeostasis. In recent years biotin has been associated to several diseases in humans. Some of them are related to deficiencies of enzymes involved in biotin metabolism. However, not all biotin responsive disorders can be explained on the basis of the classical role of the vitamin in cell metabolism. Several groups have suggested the biotin may be involved in regulating the transcription or protein expression of different proteins. Biotinylation of histones and triggering of transduction signaling cascades have been suggested as the underlying mechanisms behind these non-classical biotin deficiency manifestation in humans.

Key Words: Biotin, biotinidase, carboxylases, multiple carboxylase deficiency, holocarboxylase synthetase.

INTRODUCCIÓN

La biotina es una vitamina hidrosoluble perteneciente al complejo B y es esencial para el crecimiento y mantenimiento homeostático de todos los seres vivos¹. Esta vitamina fue descubierta en 1935 por Kogl cuando se le caracterizó como un factor indispensable para el crecimiento de levadura². La importancia de esta vitamina para organismos superiores fue reconocida cuando se demostró que protegía a las ratas contra los efectos tóxicos

de una dieta rica en clara de huevo^{3,4}. Este efecto tóxico se demostró más tarde, y se debe a la presencia de avidina, una proteína con extraordinaria afinidad por la biotina^{3,5}. Los organismos superiores, desde las levaduras hasta el hombre, dependen por completo de la dieta para satisfacer sus requerimientos de esta vitamina⁶. Sin embargo, microorganismos como *Escherichia coli* son capaces de sintetizar biotina y se presume puedan jugar un papel relevante en suministrar al menos parte de la vitamina requerida para el metabolismo humano¹.

La importancia de la biotina presente en la dieta fue reconocida por muchos años, sin embargo, su papel en el metabolismo era desconocido. En 1953 Lardy y Peanasky reportaron que la deficiencia de biotina en ratas reducía la habilidad de extractos de hígado para catalizar la carboxilación dependiente de ATP de propionato a succinato⁷. En 1958 se demostró que la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC), purificada a partir de extractos hepáticos de aves, estaba enriquecida con biotina y ésta podía ser inactivada en presencia de avidina⁸. Finalmente, Lane y Lynen⁹ demostraron que la biotina está covalentemente unida a la enzima propionil-CoA carboxilasa (PCC). Como resultado de esta observación se descubrió que la biotina es utilizada por todos los organismos como grupo prostético de enzimas involucradas en reacciones de descarboxilación, carboxilación y transcarboxilación en donde actúa como vector para la transferencia de grupos carboxilo¹⁰⁻¹³.

En años recientes, diversos grupos de investigación han sugerido que, además de su función clásica en el metabolismo, la vitamina biotina participa en la regulación de la expresión de varios genes en distintos organismos. En este artículo, describimos los trabajos realizados por investigadores y médicos para identificar los diversos procesos celulares en los que la biotina participa.

EVOLUCIÓN DE LAS ENZIMAS DE CARBOXILACIÓN

El número de las carboxilasas dependientes de biotina presentes en la célula no ha sido constante durante el proceso de evolución, variando de un organismo a otro. En mamíferos existen cinco carboxilasas dependientes de biotina; las dos formas de ACC codificadas por genes diferentes¹⁴⁻¹⁵ y expresadas en el citoplasma; y 3 carboxilasas mitocondriales que son la PCC, la metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) y la piruvato carboxilasa (PC). En levaduras sólo se presentan dos carboxilasas, la PC y la ACC y en el caso más extremo se encuentra la bacteria *E. coli* en la cual sólo existe una enzima dependiente de biotina la ACC¹⁶.

La estructura de las carboxilasas también ha sido modificada durante la evolución, mostrando diferencia de un organismo a otro. El caso de la enzima ACC es el más representativo de todas las enzimas dependientes de biotina. En bacterias la enzima ACC está compuesta por tres subunidades, cada una de ellas posee una actividad enzimática diferente. En células humanas, las isoformas ACC-1 y ACC-2 están constituidas por una sola cadena polipeptídica multifuncional. Con base en la arquitectura molecular de las carboxilasas, los miembros de esta familia pueden ser divididos en tres grupos diferentes¹⁷. El primer grupo está representado por la ACC de *E. coli* y la transcarboxilasa (TC) de *Propionibacterium shermanii*. Estas enzimas, están compuestas por 3 subunidades: la proteína acarreadora de biotina (BCCP); la carboxilasa de biotina (BC), que cataliza la formación del compuesto carboxibiotina; y, por último, la subunidad transferasa de carboxilo (CT),

que transfiere el grupo carboxilo a la molécula aceptora de carboxilación¹⁸⁻²². El segundo grupo está representado por enzimas compuestas por dos subunidades polipeptídicas denominadas α y β , que son la PCC y la MCC de organismos eucariontes. La subunidad α de estas proteínas, contiene el cofactor de biotina y posee la actividad de carboxilasa de biotina, mientras que la subunidad β cataliza la transferencia del grupo carboxilo. El tercer grupo de enzimas dependientes de biotina está representado por las enzimas ACC y PC humanas, en donde las tres funciones anteriormente citadas han sido incorporadas en una sola cadena polipeptídica multifuncional.

Las enzimas dependientes de biotina catalizan y comparten una gran homología en la secuencia del sitio de unión a biotina, por lo que se ha sugerido que los genes que codifican para polipéptidos acarreadores de esta vitamina son derivados de un ancestro común. Es posible que mediante un proceso de una o más duplicaciones durante la evolución, el gen original haya dado lugar a dos o más genes que codificarán diversas enzimas, conservando entre ellas funciones comunes. Bajo este escenario, la diferencia estructural de las carboxilasas en organismos procariontes y eucariontes puede representar varias etapas en la evolución del sistema de biotinilación¹⁷.

FUNCIÓN DE LAS CARBOXILASAS DEPENDIENTES DE BIOTINA EN EL METABOLISMO HUMANO

Las enzimas dependientes de biotina que catalizan reacciones de carboxilación son: ACC-1, ACC-2, PCC, MCC y PC. Estas proteínas catalizan reacciones clave en los procesos de gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y catabolismo de aminoácidos¹.

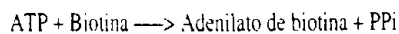
En humanos existen dos isoformas de ACC codificadas por genes diferentes que catalizan la transformación de acetil-CoA a malonil-CoA, sustrato principal de la síntesis y elongación de ácidos grasos, recientemente se ha sugerido que ACC-1 está involucrada en la síntesis de ácidos grasos^{8,23,24} mientras que ACC-2 es responsable de la oxidación de los mismos, predominantemente en músculo esquelético y corazón^{25,26}. La enzima PC cataliza la síntesis del ácido oxaloacético a partir de piruvato suministrando un intermediario primario para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Esta enzima también provee una fuente de esqueletos de carbono para la síntesis de aspartato y glutamato. La enzima PCC cataliza la carboxilación de propionil-CoA para formar metilmalonil-CoA, el cual después de varios pasos entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La enzima MCC forma β -metilglutaconil-CoA a partir de β -metilcrotonil-CoA un paso esencial en el catabolismo del aminoácido leucina¹. Estas carboxilasas tienen funciones importantes en las vías metabólicas, tal como el catabolismo de aminoácidos (PCC, MCC), gluconeogénesis (PC) y síntesis de ácidos grasos (ACC-1 y ACC-2).

ACTIVACIÓN DE CARBOXILASAS

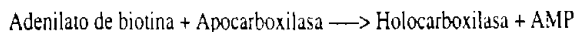
Las carboxilasas dependientes de biotina son sintetizadas en el citoplasma como precursores inactivos (apocarboxilasas). La activación de estas enzimas se lleva a cabo mediante la unión de una molécula de biotina a un aminoácido de lisina localizado en una secuencia Ala/Val-Met-Lys-Met que es universalmente conservada en todas las enzimas dependientes de biotina²⁷. Este tetrapéptido se encuentra localizado en carboxilasas mitocondriales (PC, PCC, MCC) hacia el extremo carboxilo terminal, mientras que en las carboxilasas citosólicas ACC-1 y ACC-2 se encuentra localizado hacia el extremo amino terminal. En 1994 León-Del-Río y Gravel demostraron que el extremo carboxilo terminal de la subunidad alpha de la enzima PCC humana puede funcionar como un dominio independiente de 67 aminoácidos (p-67) y que puede ser biotinilado *in vivo* e *in vitro* por las enzimas BirA bacteriana y HCS humana²⁸. El tamaño del dominio de biotinilación parece variar entre una enzima a otra ya que en el caso de la subunidad BCCP de la ACC bacteriana el sitio de biotinilación mínimo es de 87 aminoácidos²⁹.

La reacción de biotinilación de apocarboxilasas es catalizada en organismos eucariontes por la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS)¹³ y en organismos procariontes por enzimas conocidas como ligasas de biotina o proteína BirA²¹. Como se describirá más adelante, estas enzimas son muy diferentes; sin embargo, ambas catalizan la reacción de biotinilación mediante el mismo mecanismo. Este proceso se lleva a cabo en dos reacciones parciales. En la primera, la biotina es activada utilizando ATP formando un intermediario conocido como adenilato de biotina (B-AMP). En la segunda reacción, el B-AMP es utilizado para unir a la biotina a un aminoácido de lisina de la apocarboxilasa con liberación de AMP³⁰.

Reacción 1



Reacción 2



LA LIGASA DE BIOTINA BACTERIANA (BIRA) ES UNA ENZIMA BIFUNCIONAL CON ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL

La reacción de biotinilación en bacterias es catalizada por la enzima BirA. Esta proteína es una enzima monomérica de 321 aminoácidos (35.5 kDa). En la región carboxilo terminal formada por 130 aminoácidos, reside la actividad enzimática de biotinilación. El extremo amino terminal se caracteriza por poseer una estructura terciaria del tipo hélice-vuelta-hélice (H-T-H), que le permite reconocer y unirse de manera específica a una secuencia específica en el ADN bacteriano. Esta característica convierte a la proteína BirA en una enzima bifuncional ya que cataliza la biotinilación de la subunidad BCCP de la ACC

bacteriana y regula la transcripción de los cinco genes involucrados en la síntesis de biotina en *E. coli*, funcionando como un represor de la transcripción de los mismos³¹⁻³³. Estudios recientes han revelado que la proteína BirA funciona como un sensor de la cantidad de biotina y de concentración de apocarboxilasas en bacterias. Cuando *E. coli* crece en un medio pobre de biotina, el intermediario de biotinilación adenilato de biotina (B-AMP) es utilizado en su totalidad en la biotinilación de ACC, única carboxilasa presente en este organismo. Sin embargo, cuando la bacteria crece en un medio rico en biotina o cuando todas las moléculas de ACC disponibles han sido biotiniladas, este compuesto se acumula, permaneciendo unido a BirA. En este escenario el B-AMP actúa como corepresor del operón de biotina ya que permite a la proteína BirA unirse al operador reprimiendo la expresión de los genes del operón de biotina²⁷ (Figura 1).

HOLOCARBOXILASA SINTETASA HUMANA

En los organismos eucariontes la biotinilación de carboxilasas se lleva a cabo por la HCS. La actividad de esta enzima fue

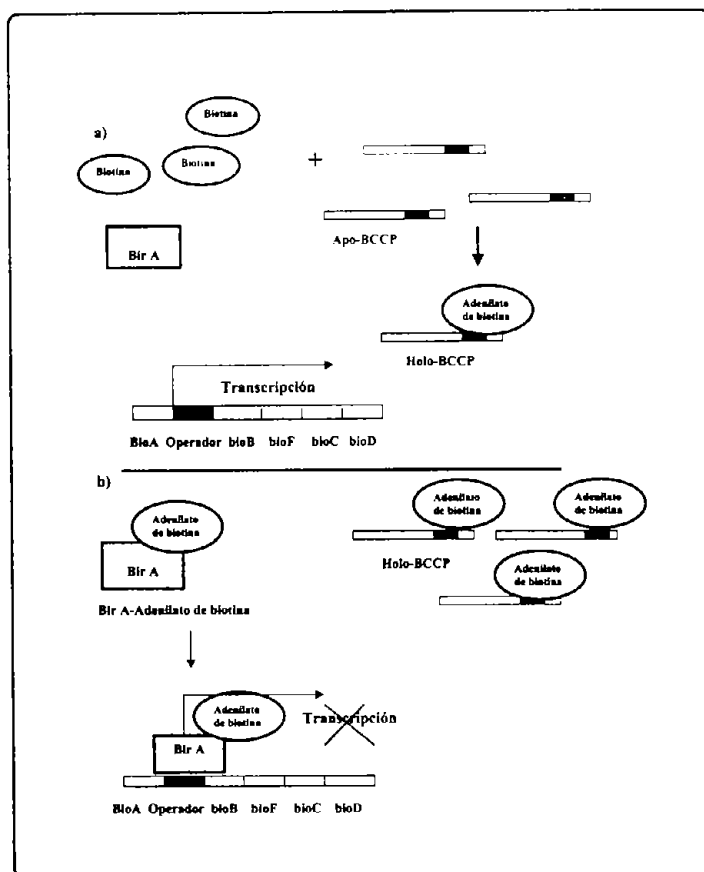


Figura 1. La ligasa de biotina de *E. coli* actúa como represor del operón de biotina. a) Cuando la biotina está presente en bajas concentraciones, todos los productos adenilato de biotina (B-AMP) producidos por BirA son utilizados para biotinilar la subunidad de BCCP de *E. coli*. b) Cuando la biotina se encuentra en exceso con respecto a BCCP, el producto B-AMP se acumula y el complejo BirA-B-AMP es capaz de unirse al operón de biotina.

caracterizada bioquímicamente desde principios de los años setenta; sin embargo, poco se conocía acerca de los mecanismos de biotilación en eucariontes debido a que esta proteína no había sido purificada ni su gen clonado¹³. En 1995 Suzuki y cols. y León-Del-Río y cols., clonaron el ADNc de la HCS humana^{34,35}. Estos estudios revelaron que esta proteína está formada por 726 aminoácidos (80.75 kDa) y aunque su ARNm se encuentra presente en todos los tejidos estudiados, se expresa preferencialmente en riñón, páncreas y músculo esquelético. El ARNm primario de la HCS es procesado alternativamente en la célula dando lugar a diversas moléculas de ARNm cuyas funciones aún están por ser determinadas, sin embargo, es posible que al menos algunas de estas formas estén relacionadas con la habilidad de dirigir a la HCS a la mitocondria o al citosol³⁵.

La comparación de las secuencias de la proteína Bir A y de la HCS humana revela que estas dos proteínas comparten una región de alta homología de aproximadamente 130 aminoácidos que se encuentra localizada en el extremo carboxilo terminal de ambas enzimas. Esta región corresponde al dominio de biotilación de BirA identificado por análisis de cristalografía por rayos X³¹. La región amino terminal en ambas enzimas no muestra conservación en la secuencia de aminoácidos, ya que

esta región en BirA es la que confiere actividad transcripcional y es posible que la pérdida de la capacidad de sintetizar biotina en eucariontes sea la causa de estas diferencias. La ausencia de una presión selectiva para conservar este dominio, condujo a la modificación de los extremos amino terminales; sin embargo, la conservación de secuencias amino terminales entre la HCS humana y de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sugieren que esta región pueda tener una función aún no identificada³⁰.

SISTEMAS DE UTILIZACIÓN DE BIOTINA EN ORGANISMOS EUKARIONTES

La vitamina biotina está presente en cantidades mínimas en los alimentos y en su mayor parte se encuentra unida a proteínas, lo que limita su disponibilidad para ser utilizada en el metabolismo de mamíferos. Por esta razón durante la evolución de los organismos superiores aparecieron una serie de sistemas para asegurar la óptima utilización y reciclamiento de esta vitamina¹ (Figura 2).

En el intestino delgado de diversas especies se han encontrado dos receptores específicos para la biotina. El primero es un cotransportador de sodio que reconoce a la biotina libre que es liberada en el lumen intestinal por la actividad de la biotinidasa pancreática. El segundo es capaz de transportar al compuesto

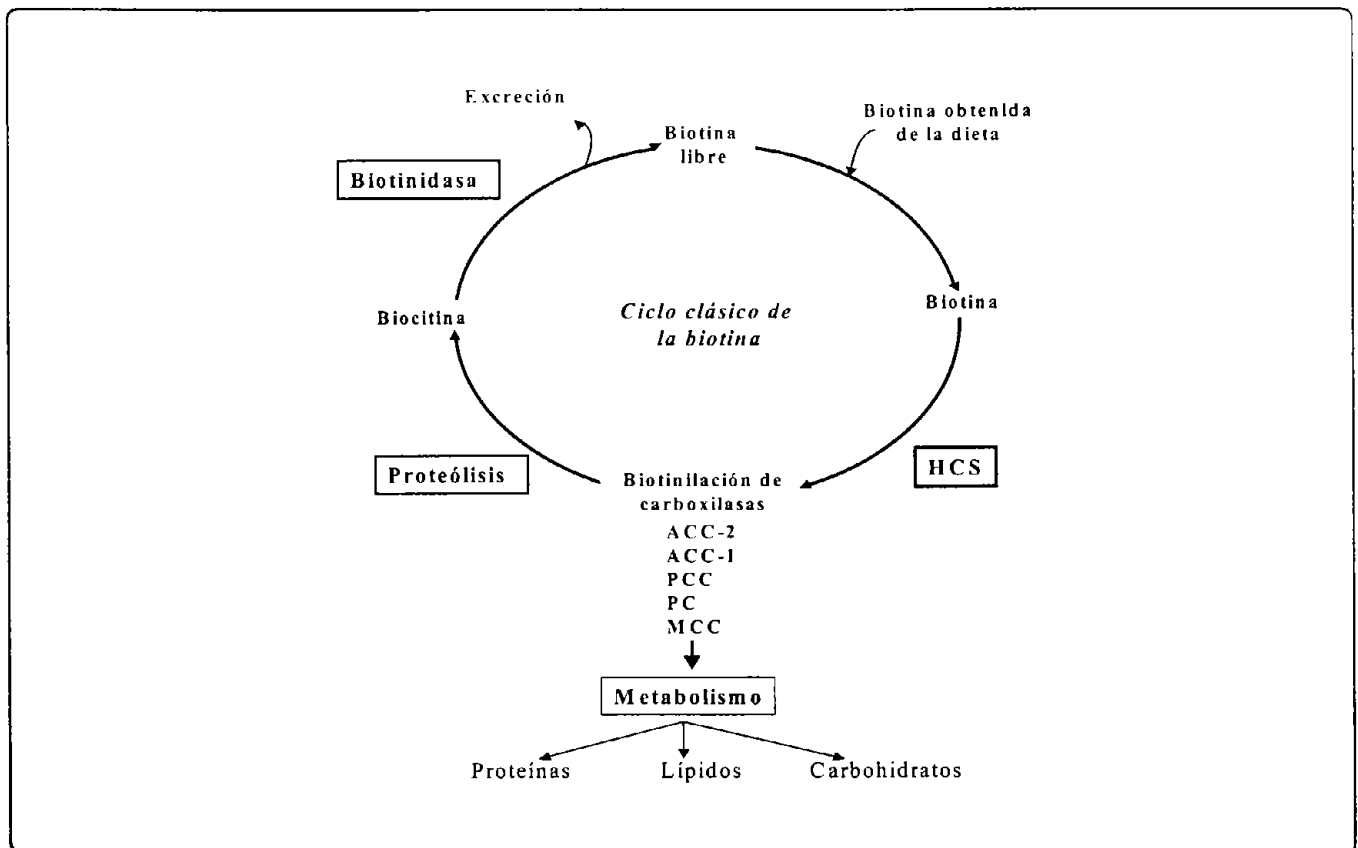


Figura 2. Ciclo de Biotina. La biotina obtenida de los alimentos es liberada por la enzima biotinidasa y utilizada para activar a las holocarboxilasas en presencia de la enzima HCS. Las apocarboxilasas utilizadas son degradadas y nuevamente la biotina es liberada por la acción de la enzima biotinidasa.

biocitina (biotinil-lisina) obtenido de la degradación de carboxilasas biotiniladas, en contra de un gradiente de concentración, presumiblemente para que la vitamina sea liberada en el plasma o en el interior de las células por la enzima biotinidasa³⁶.

Durante el proceso de recambio enzimático en el interior celular, las carboxilasas son degradadas por proteasas liberando el compuesto biocitina. La biotina es liberada a partir del compuesto biocitina por medio de la actividad de la enzima biotinidasa (biotina-amidohidrolasa), la cual hidroliza específicamente la unión entre la biotina y el grupo ϵ -amino del aminoácido lisina. La biotina liberada es utilizada entonces por la enzima HCS para la activación de carboxilasas¹.

ERRORES EN LA UTILIZACIÓN DE LA BIOTINA

Debido al papel fundamental de las carboxilasas en el metabolismo, una disminución en su actividad puede traer consecuencias metabólicas catastróficas para el organismo. La deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC) es una enfermedad que se caracteriza por una disminución en la actividad de todas las enzimas dependientes de biotina y cuyo origen puede ser adquirido o genético. La deficiencia adquirida de esta afección puede ser el resultado de una alimentación pobre en biotina o de una alimentación parenteral prolongada^{36,37}. La DMC de origen genético puede deberse a mutaciones en los genes que codifican para la enzima HCS o para la biotinidasa, estos padecimientos tienen un patrón de herencia autosómico recesivo.

Deficiencia de HCS. En humanos la deficiencia en la actividad de HCS produce la forma neonatal de la DMC. Las manifestaciones clínicas de este desorden se observan dentro de las primeras horas del nacimiento e incluyen dificultad para respirar, letargia, retraso en el desarrollo psicomotor, hipotonía, convulsiones, dermatitis periorificial, alopecia y coma. Los pacientes afectados por deficiencia de HCS se caracterizan bioquímicamente por presentar cetoacidosis metabólica, aciduria orgánica e hiperamonemia³⁸.

Esta enfermedad puede producir retraso mental severo y potencialmente mortal si no es diagnosticada y tratada a tiempo. Todos los síntomas clínicos y bioquímicos de la DMC debido a una baja en la actividad de HCS pueden ser eliminados exitosamente suministrando a los pacientes dosis farmacológicas de biotina¹. Por años se especuló que la respuesta de los pacientes al tratamiento con la vitamina se debía a que las mutaciones en el gen de la HCS afectaban el sitio de unión a biotina creando una proteína mutante con una afinidad menor por la vitamina. Sin embargo, esto no fue demostrado hasta la publicación de la secuencia del gen de la HCS y la identificación de las mutaciones presentes en pacientes con DMC. Estos trabajos demostraron que la mayor parte de las mutaciones se encuentran localizadas en la región que codifica al dominio de 130 aminoácidos que está conservado en la HCS y la proteína

BirA: R508W, G518E, V550M, y D571N³⁹. Sin embargo, cuatro mutaciones más, han sido localizadas hacia el extremo amino terminal lejos del sitio de unión de la biotina de la HCS: L216R, V363D³⁹, L237P, 107delG³⁴. Aunque se desconoce la función de la región amino terminal de la HCS es posible que en organismos eucariontes el sitio de unión de la biotina de la HCS sea más complejo que el de la proteína BirA y que requiera de interacciones intramoleculares entre las regiones carboxilo y amino terminales. Sin embargo, la observación de que hay formas de HCS, en las que han sido eliminados los primeros 400 aminoácidos, y que muestran una actividad catalítica indistinguible de la HCS normal, plantean un serio problema para la aceptación del modelo anterior³⁰.

Deficiencia de biotinidasa. La deficiencia de la actividad de la enzima biotinidasa causa la forma juvenil de la DMC. A diferencia de la deficiencia de HCS esta enfermedad se manifiesta más tarde en el desarrollo de los pacientes entre las primeras semanas de vida y hasta los 10 años de edad. Los síntomas de la forma juvenil de la DMC son hipotonía, ataxia, problemas para respirar, pérdida de cabello, atrofia óptica, dermatitis, sordera y retraso mental. Se ha observado también conjuntivitis e infecciones causadas por hongos, probablemente como consecuencia de anomalías en el desarrollo del sistema inmunológico. En los pacientes con deficiencia de HCS, las manifestaciones clínicas y bioquímicas que presentan, con excepción de la sordera y el retraso mental, son revertidas exitosamente con la administración de dosis farmacológicas de biotina¹.

BIOTINA Y EXPRESIÓN GÉNICA

Como se ha descrito en esta revisión bibliográfica, la biotina tiene dos funciones conocidas en el metabolismo; la primera es su actividad como grupo prostético de enzimas que catalizan la transferencia de grupos carboxilo en organismos procariontes y eucariontes. La segunda, es su papel como correpressor de la transcripción del operón de la biotina en bacterias. Debido a la extraordinaria conservación evolutiva de las enzimas dependientes de biotina, de las ligasas de la biotina y de la HCS, durante mucho tiempo nos preguntamos si la función de regulación transcripcional de la biotina habría sido conservada también en organismos eucariontes. La respuesta a esta pregunta en un principio parece ser no, ya que los organismos superiores perdimos la capacidad de sintetizar biotina y la enzima HCS no posee dominios que le permitan actuar como un factor de transcripción, tal y como lo hace su homólogo bacteriano la proteína BirA. Sin embargo, diversas observaciones parecen indicar que la biotina en organismos eucariontes pudiera estar involucrada en la regulación de la transcripción genética y de la estructura cromosómica.

La primera evidencia consiste en la localización de esta vitamina no sólo en la mitocondria y el citoplasma, donde se encuentran las enzimas dependientes de la biotina, sino también en el

núcleo celular. Aunque hasta el momento se desconoce el papel de la biotina en el núcleo, es importante mencionar que experimentos anteriores han mostrado en cultivos celulares deficientes de esta vitamina, una detención del ciclo celular en la fase G1 y por lo tanto, una disminución en la síntesis de ADN^{40,41}.

En 1976 Petrelli y cols. demostraron que las histonas muestran una menor afinidad por la molécula de ADN en ratas deficientes de biotina⁴². Ellos también demostraron que la deficiencia de biotina da como resultado una disminución en la fosforilación y metilación de las histonas y en un aumento en la acetilación de las mismas⁴³. En años recientes se ha demostrado el papel fundamental que juega la metilación y los procesos de acetilación/desacetilación de histonas en la remodelación de la cromatina y en el ensamblaje de complejos de iniciación de la transcripción en promotores de genes regulados por receptores hormonales⁴⁴. Los efectos de la deficiencia de biotina sugieren que esta vitamina pudiera intervenir en el remodelamiento de la cromatina y en la regulación de la transcripción genética. En el año de 1995 Hymes y colaboradores sugirieron que las histonas H2A, H2B, H1, H2 y H3 pueden ser biotiniladas por la biotinidasa, enzima responsable del reciclamiento de biotina durante el recambio de carboxilasas⁴⁵. Recientemente Stanley y cols.⁴⁶ demostraron que la biotinilación de histonas ocurre *in vivo* y que aumenta durante la diferenciación celular. Sin embargo, no existen evidencias que apoyen la biotinilación de histonas como un mecanismo de activación transcripcional.

Con el objeto de determinar el papel de la biotina en el núcleo celular, en años recientes se han realizado estudios sobre el papel de esta vitamina en la transcripción de varios genes. En cultivos con deficiencia de biotina se demostró una disminución en la transcripción del gen de la glucocinasa hepática (GK). Estos resultados pueden revertirse suministrando biotina al medio de cultivo en una concentración de 10^{-4} M^{47,48}. Resultados similares se obtuvieron en hígados de ratas alimentadas con una dieta libre de biotina. En estos experimentos la transcripción del gen de la GK aumentó hasta 19 veces con respecto a las ratas control después de la aplicación de una inyección intraperitoneal de biotina⁴⁹. Recientemente se demostró que la biotina también promueve la traducción del RNAm de la GK hepática⁵⁰. Una observación importante es el hecho de que la transcripción de los genes que responden a biotina es también inducida incubando a los cultivos celulares con análogos no hidrolizables de GMPc tal como la enzima cinasa dependiente de GMPc (cGK). Sin embargo, no se observa un efecto sinérgico al añadir simultáneamente biotina y GMPc. Este resultado sugiere a los autores que la biotina y el GMPc actúan mediante el mismo mecanismo o que la biotina actúa a través de la estimulación de la enzima GK⁴⁶⁻⁵⁰. Este modelo parece ser corroborado por los resultados publicados por Vesely⁵¹ quien demostró que la biotina es capaz de estimular *in vitro* la actividad de la enzima guanilato ciclasa soluble en hígado, colon, cerebelo, riñón y corazón de rata.

Recientemente se demostró que la biotina también participa en la regulación transcripcional de varios genes en diferentes organismos. En el año 2001, Velázquez y cols., realizaron un estudio en órganos de ratas con deficiencia de biotina, en el que demostraron que la actividad de las enzimas PCC, PC y MCC disminuye en hígado, riñón, músculo y cerebro, mientras que los niveles de ARNm permanecen sin cambio. Estos resultados sugieren una regulación a nivel postranscripcional. A diferencia de las carboxilasas, los mismos autores reportan que la deficiencia de biotina ocasiona una reducción en el ARN mensajero de la enzima HCS, sugiriendo que la regulación de esta enzima es a nivel transcripcional^{52,53}.

En contraste con los resultados reportados por el grupo de Velázquez, realizamos un experimento en el laboratorio, utilizando como modelo una línea celular hepática, en el cual observamos que la expresión a nivel transcripcional de la carboxilasa PCC se ve incrementada al inducir a estas células con biotina. Resultados similares se observaron en la expresión a nivel transcripcional de las enzimas ACC-1, ACC-2 y HCS. Al igual que los resultados reportados para la enzima GK, los genes de la PCC, ACC-1, ACC-2 y HCS también son estimulados por GMPc⁵⁴.

Aunque los resultados descritos anteriormente parecen indicar que la biotina funciona como activador de la transcripción de varios genes, hay evidencia que indica que esta vitamina también puede actuar como represor de la transcripción genética en células eucariontes. En ratas Wistar diabéticas, el tratamiento con biotina parece tener un efecto inhibitorio de casi 85% en la transcripción del gen de la enzima hepática fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK) enzima involucrada en la regulación del proceso de gluconeogénesis. Es importante hacer notar que la biotina aparentemente tiene el mismo efecto que la insulina sobre la síntesis de ARNm de los genes de la GK y de la PEPCK aunque no hay bases para afirmar que esta vitamina pudiera estar involucrada directamente en la regulación de gluconeogénesis⁵⁵.

En años recientes se ha demostrado que la biotina puede intervenir en la traducción del ARNm de ciertos genes. En 1988, Collins y cols. demostraron que para que el receptor de asialoglicoproteínas (RAGP) se exprese de manera eficiente en células hepáticas HepG2 es necesario estimular a estas células con biotina⁵⁶. La cantidad de ARNm del RAGP no es afectada por la presencia de la vitamina pero sí la cantidad de proteína expresada por las células tratadas^{57,58}. Como en el caso de la GK, HCS, PCC y ACC, la expresión del RAGP fue estimulado por el tratamiento de las células con análogos no hidrolizables de GMPc. Estos resultados sugieren un mecanismo común para la regulación transcripcional y traduccional por biotina. El mismo grupo demostró que el aumento en la concentración de GMPc estimulaba a la enzima cinasa dependiente de GMPc (cGK) y que ésta a su vez promovía la fosforilación de la proteína COPI.

Esta proteína se une a la región 5' del ARNm del RAGP estimulando su traducción en células de cultivo⁵⁹.

CONCLUSIONES

Aunque la regulación transcripcional y traduccional mediada por la biotina parece efectuarse a través del aumento en la concentración de GMPc, quedan por ser identificados los mecanismos por los cuales la biotina activa a la enzima GC. Es posible que el verdadero inductor de la actividad de la GC no sea la biotina, sino el intermediario de la reacción de biotinilación de carboxilasas adenilato de biotina (B-AMP). Este compuesto funciona como correpresor del operón de la biotina en bacterias y resulta interesante considerar que en eucariontes este compuesto haya sido seleccionado para actuar como un segundo mensajero. En este escenario varios modelos pueden imaginarse para explicar el papel del B-AMP y de la HCS. En el primero, el compuesto B-AMP podría actuar directamente sobre la GC incrementando su actividad y con ello la concentración intracelular de GMPc. En un segundo modelo el B-AMP unido a la HCS podría ser capaz de interactuar con la enzima GC de una manera similar a la unión de la proteína BirA y de su correpresor B-AMP.

Cualquiera que sea el mecanismo utilizado por la vitamina biotina para regular la transcripción genética, es evidente que se trata de un mecanismo general que es utilizado por la célula para regular la actividad de promotores de diversos genes en respuesta a cambios en la concentración de esta vitamina o alguno de sus derivados. Es necesario identificar a estos mecanismos para entonces entender plenamente la importancia de esta vitamina en el metabolismo humano.

REFERENCIAS

- Wolf, B. Disorders of Biotin Metabolism. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 2 (eds. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D.) 3151-3177 (McGraw-Hill, New York, 1995).
- Kogl, F. Biotin enzymes. *Chem. Ber.* **68**, A16 (1935)
- Gyorgy, P., Kuhn, R. & Lederer, E. The curative factor (vitamin H) for egg white injury, with particular reference to its presence in different foodstuffs and yeast. *J. Biol. Chem.* **131**, 733-744 (1939).
- Gyorgy, P. Rachitis und andere avitaminosen. *Z. Aertzt. Forbild.* **28**, 377 (1931).
- Moss, J. & Lane, M.D. The biotin-dependent enzymes. *Adv. Enzymol.* **35**, 321-398 (1971).
- Heard, G.S., Wolf, B. & Reddy, J.K. Pancreatic biotinidase activity: the potential for intestinal processing of dietary protein-bound biotin. *Pediatr. Res.* **18**, 198A (1984).
- Lardy, H.A. & Peanasky, R. Metabolic functions of biotin. *Physiol. Rev.* **33**, 560-565 (1953).
- Wakil, S.J., Titchener, E.B. & Gibson, D.M. Evidence for the participation of biotin in the enzymic synthesis of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 225 (1958).
- Lane, D.M., Young, D.L. & Lynen, F. The enzymatic synthesis of holotranscarboxylase from apotranscarboxylase and (+)-biotin: I. Purification of apoenzyme and synthetase: Characteristics of the reaction. *J. Biol. Chem.* **239**, 2858-2864 (1964).
- Dakshinamurti, K. & Bhagavan, N.H. Biotin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **447**, 1-441 (1985).
- Moss, J. & Lane, M.D. The biotin-dependent enzymes. *Adv. Enzymol.* **35**, 321-398 (1971).
- Alberts, A.W. & Vangelos, P.R. In: *The Enzymes* (ed. Boyer, P.D.) Vol. 6, 37-82 (Academic Press, Orlando, 1972).
- Wood, H.G. & Barden, R.E. Biotin Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 385-413 (1977).
- Thampy, K.G. Formation of malonyl coenzyme A in rat heart. Identification and purification of an isozyme of A carboxylase from rat heart. *J. Biol. Chem.* **264**, 17631-17634 (1989).
- Bianchi, A. *et al.* Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* **265**, 1502-1509 (1990).
- Li, S.J. & Cronan, J.E. Growth rate regulation of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase, which catalyzes the first committed step of lipid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **175**, 332-340 (1993).
- Lynen, F. New experiments of biotin enzymes. *Crit. Rev. Biochem.* **7**, 103-119 (1979).
- Lindqvist, Y. & Schneider, G. Protein-biotin interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 798-803 (1996).
- Alberts, A.W., Nervi, A.M. & Vangelos, P.R. Acetyl CoA carboxylase. II. Demonstration of biotin-protein and biotin carboxylase subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **63**(4), 1319-1326 (1969).
- Guchhait, R.B. *et al.* Acetyl coenzyme A carboxylase system of *Escherichia coli*. Purification and properties of the biotin carboxylase, carboxyltransferase and carboxyl carrier protein components. *J. Biol. Chem.* **249**(20), 6633-6642 (1974).
- Li, S.J. & Cronan, J.E. The genes encoding the two carboxyltransferase subunits of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* **267**, 16841-16847 (1992).
- Li, S.J. & Cronan, J.E. The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* **267**, 855-863 (1992).
- Nugteren, D.H. The enzymic chain elongation of fatty acids by rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **106**, 280-290 (1965).
- Hopwood, D.A. & Sherman, D.H. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 37-66 (1990).
- McGarry, J.D., Mannaerts, G.P. & Foster, D.W. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic acid oxidation and ketogenesis. *J. Clin. Invest.* **60**, 265-270 (1977).
- McGarry, J.D. & Brown, N.F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* **244**(1), 1-14 (1997).
- Chapman-Smith, A. & Cronan, J.E. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 359-363 (1999).
- León-Del-Río, A. & Gravel, R.A. Sequence requirements for the biotinylation of carboxyl-terminal fragments of human propionyl-CoA carboxylase a subunit expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 22964-22968 (1994).
- Chapman-Smith, A., Turner, D.L., Cronan, J.E., Morris, T.W. & Wallace, J.C. Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein

- of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. J.* **302**, 881-887 (1994).
30. Campeau, E. & Gravel, R. Expression in *Escherichia coli* of N- and C-terminally deleted human holocarboxylase synthetase: Influence of the N-terminus on biotinylation and identification of a minimum functional protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 12310-12316 (2001).
31. Wilson, K.P., Shewchuk, L.M., Brennan, R.G., Otsuka, A. & Matthews, B.W. *Escherichia coli* biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 9257-9261 (1992).
32. Cronan, J.E. Jr. The *E. coli* bio operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. *Cell* **58**, 427-429 (1989).
33. Cronan, J.E., Jr. Expression of the biotin biosynthetic operon of *Escherichia coli* is regulated by the rate of protein biotinylation. *J. Biol. Chem.* **263**, 10332-10336 (1988).
34. Suzuki, Y. *et al.* Isolation and characterization of mutations in the human holocarboxylase synthetase cDNA. *Nature Genet.* **8**, 122-128 (1994).
35. León-Del-Río, A., Leclerc, D., Akerman, B., Wakamatsu, N. & Gravel, R.A. Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 4626-4630 (1995).
36. León-Del-Río, A., Velázquez, A., Vizcaíno, G., Robles-Díaz, G., González-Nonaga, A. Association of pancreatic biotinidase activity and intestinal uptake of biotin and biocytin in hamster and rat. *A. Annu. Nut. Metab.* **34**, 266-272 (1990).
37. Dixon, M. & Webb, E. *Enzymes*. Third edition (Academic Press, 1979) 507 pp.
38. Wolf, B. Disorders of Biotin Metabolism. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 2 (eds. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D.) 3151-3177 (McGraw-Hill, New York, 1995).
39. Dupuis, L. *et al.* Clustering of mutations in the biotin-binding region of holocarboxylase synthetase in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1011-1016 (1996).
40. Dakshinamurti, K. & Chalifour, L. The biotin requirement of HeLa cells. *J. Cell. Physiol.* **107**(3), 427-438 (1981).
41. Bhullar, R.P. & Dakshinamurti, K. The effect of biotin on cellular functions in HeLa cells. *J. Cell. Physiol.* **123**(3), 425-430 (1985).
42. Petrelli, F., Marsili, G. & Moretti, P. RNA, DNA, histones and interactions between histone proteins and DNA in the liver of biotin-deficient rats. *Biochem. Exp. Biol.* **12**, 461-465 (1976).
43. Petrelli, F., Coderoni, S., Moretti, P. & Paparelli, M. Effect of biotin on phosphorylation, acetylation, methylation of rat liver histones. *Mol. Biol. Rep.* **4**, 87-92 (1978).
44. Lavinsky, R.M. *et al.* Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 2920-2925 (1998).
45. Hymes, J., Fleischhauer, K. & Wolf, B. Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem. Mol. Med.* **56**, 76-83 (1995).
46. Stanley, J.S., Griffin, J.B. & Zemleni, J. Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5424-5429 (2001).
47. Spence, J.T. & Koudelka, A.P. Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **259**, 6393-6396 (1984).
48. Singh, I. & Dakshinamurti, K. Stimulation of guanylate cyclase and RNA polymerase II activities in HeLa cells and fibroblasts by biotin. *Mol. Cell. Biochem.* **79**, 47-55 (1988).
49. Chauhan, J. & Dakshinamurti, K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J. Biol. Chem.* **266**, 10035-10038 (1991).
50. McCarty, M.F. High-dose biotin, an inducer of glucokinase expression, may synergize with chromium picolinate to enable a definitive nutritional therapy for type II diabetes. *Med. Hypotheses* **52**, 401-406 (1999).
51. Vesely, D.L. Biotin Enhances Guanylate Cyclase Activity. *Science* **216**, 1329-1330 (1982).
52. Rodríguez, M. R. *et al.* Differential Effects of Biotin Deficiency and Replenishment on Rat Liver Pyruvate and Propionyl-CoA Carboxylases and on Their mRNAs. *Mol. Genet. Metab.* **66**, 16-23 (1999).
53. Rodríguez-Meléndez, R., Cano-Colín, S. & Velázquez-Arellano, A. Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases. *J. Nutr.* **131**, 1909-1913 (2001).
54. Solórzano-Vargas, R., Pacheco-Alvarez, D. & León-Del-Río, A. Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**(8), 5325-5330 (2002).
55. Dakshinamurti, K. & Li, W. Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* **132**, 127-132 (1994).
56. Collins, J.C., Paietta, E., Green, R. & Morell, A.G. Biotin-dependent Expression of the Asialoglycoprotein Receptor in HepG2. *J. Biol. Chem.* **263**, 11280-11283 (1988).
57. Stockert, R.J. & Morell, A.G. Second messenger modulation of the asialoglycoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 1841-1846 (1990).
58. Stockert, R.J., Paietta, E., Racevskis, J. & Morell, A.G. Posttranscriptional Regulation of the Asialoglycoprotein Receptor by cGMP. *J. Biol. Chem.* **267**, 56-59 (1992).
59. De-la-Vega, L. & Stockert, R.J. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am. J. Cell. Physiol.* **279**, C2037-C2042 (2000).



REVIEW ARTICLE

Biotin in Metabolism and Its Relationship to Human Disease

Diana Pacheco-Alvarez, R. Sergio Solórzano-Vargas and Alfonso León Del Río

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBM), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

Received for publication January 2, 2002; accepted April 17, 2002 (02/001).

Biotin, a water-soluble vitamin, is used as cofactor of enzymes involved in carboxylation reactions. In humans, there are five biotin-dependent carboxylases: propionyl-CoA carboxylase; methylcrotonyl-CoA carboxylase; pyruvate carboxylase, and two forms of acetyl-CoA carboxylase. These enzymes catalyze key reactions in gluconeogenesis, fatty acid metabolism, and amino acid catabolism; thus, biotin plays an essential role in maintaining metabolic homeostasis. In recent years, biotin has been associated with several diseases in humans. Some are related to enzyme deficiencies involved in biotin metabolism. However, not all biotin-responsive disorders can be explained based on the classical role of the vitamin in cell metabolism. Several groups have suggested that biotin may be involved in regulating transcription or protein expression of different proteins. Biotinylation of histones and triggering of transduction signaling cascades have been suggested as underlying mechanisms behind these non-classical biotin-deficiency manifestation in humans. © 2002 IMSS. Published by Elsevier Science Inc.

Key Words: Biotin, Holocarboxylase synthetase, Biotin deficiency, Multiple carboxylase deficiency.

Introduction

Biotin is a water-soluble vitamin found in all organisms that functions as cofactor of enzymes known as biotin-dependent carboxylases (1). The role of biotin in carboxylases is to act as vector for carboxyl-group transfer between donor and acceptor molecules during carboxylation reaction. Covalent addition of biotin to these proteins is catalyzed by biotin ligases, which in prokaryotes are known as BirA protein (2,3) and in eukaryotes as holocarboxylase synthetase (HCS) (1). For both BirA and HCS, biotin addition occurs as an ATP-dependent, two-step reaction that, in the first step, involves synthesis of the intermediate, biotinyl-5'-AMP (B-AMP) (4,5). In the second step, B-AMP is substrate for transfer biotin, with release of AMP to a specific lysine residue in a highly conserved region in apocarboxylases (6–10).

Until very recently, the sole known function of biotin in human cells was to act as cofactor of five biotin-dependent

carboxylases, including propionyl-CoA carboxylase (PCC), pyruvate carboxylase (PC), methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC), acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC-1), and acetyl-CoA carboxylase 2 (ACC-2) (11–13). These enzymes, discussed later, catalyze key reactions in gluconeogenesis, fatty acid synthesis, and amino acid catabolism. Because these enzymes play such an important role in intermediary metabolism, biotin starvation or deficiencies of one enzyme involved in biotin utilization is potentially lethal. It has been suggested in recent years that biotin may play a role in other cellular events in eukaryotic organisms such as transcriptional or translational regulation or activity enhancement of different hepatic enzymes (14–23). Furthermore, biotin deficiency has been proven teratogenic in different animal species and the cause of several neurologic diseases (24–26). Mechanisms involved in these other functions of biotin are largely unknown; however, it is possible that biotin may have been selected during evolution to play different roles in metabolism and gene expression of higher organisms.

In this report, we review the different roles of biotin in cell metabolism and human disease and present our laboratory data showing that biotin acts through a signaling cascade that includes the soluble form of guanylate cyclase (sGC) and a cGMP-dependent protein kinase (PKG). These

Address reprint requests to: Dr. Alfonso León Del Río, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, IIBM, UNAM, CU, 04510 México, D.F., México. Tel.: (+52) (55) 5622-3891; FAX: (+52) (55) 5622-3855; E-mail: alfon@servidor.unam.mx

results may in principle explain some non-classic manifestations of biotin deficiency in humans.

Biotin Metabolism in Human Cells

Unlike bacteria, higher organisms are unable to synthesize biotin and thus depend entirely on the vitamin present in foods to satisfy their vitamin requirements. Biotin is present in very low concentrations in nature, thus putting the metabolic homeostasis of the cell at risk. To deal with their biotin requirements, higher organisms have evolved to a very efficient and complex biotin cycle to ensure adequate supply and utilization of the vitamin (Figure 1). Most biotin present in foods is not readily available because it is protein-bound (27) and must be released from the carboxylases to which it is attached before it can be used in carboxylation reactions. This reaction is carried out by pancreatic biotinidase, which specifically cleaves the quasi-peptide bond between biotin and ϵ -amino group of lysine residue to which it is attached (28). Biotin released in intestinal lumen is actively absorbed in a sodium-dependent fashion across the brush-border membrane of enterocytes (29-31). Once inside the cell, biotin is covalently attached to carboxylases by the enzyme holocarboxylase synthetase (HCS) (9,6,32). During turnover of carboxylases, biotinylated peptides are then cleaved by cytoplasmic or plasma biotinidase (93), thus allowing biotin to be recycled and used in biotinylation

of new carboxylases. The importance of this cycle in maintaining biotin levels within the cell is evidenced by the fact that mutations in either biotinidase or holocarboxylase synthetase results in a potentially lethal metabolism disorder, as will be revealed later in this review (33-35).

Biotin-Dependent Carboxylases in Human Cells

In human cells there are five biotin-dependent carboxylases involved in synthesis of fatty acids, gluconeogenesis, and amino acid catabolism (36) (Figure 2). These enzymes use biotin as a vector to transfer a carboxyl group between carboxylation donor and acceptor molecules (1,37,38). The universality of biotin enzymes among living organisms most likely reflects the ancient origin of these families of proteins and their importance for intermediary metabolism. Biotin-dependent enzymes in human cells are located in two cell compartments: mitochondria and cytoplasm (39).

The enzyme pyruvate carboxylase (PC) consists of four identical subunits of 130 KDa arranged in a tetrahedron-like structure. PC is located in mitochondria and catalyzes transformation of pyruvate to oxaloacetate, an intermediary product in phosphoenolpyruvate synthesis, hence essential for glucose synthesis (40). In humans, genetic PC deficiency has been described as an autosomal recessive disorder with a frequency of 1:250,000 (36). Clinical and biochemical manifestations of PC deficiency include low PC

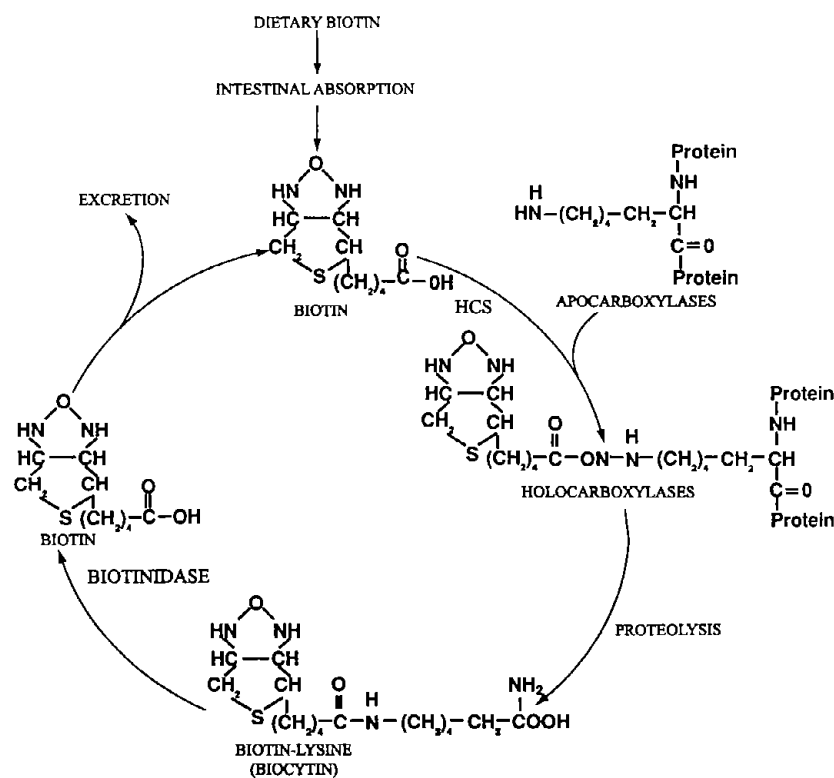


Figure 1. Biotin cycle in mammals.

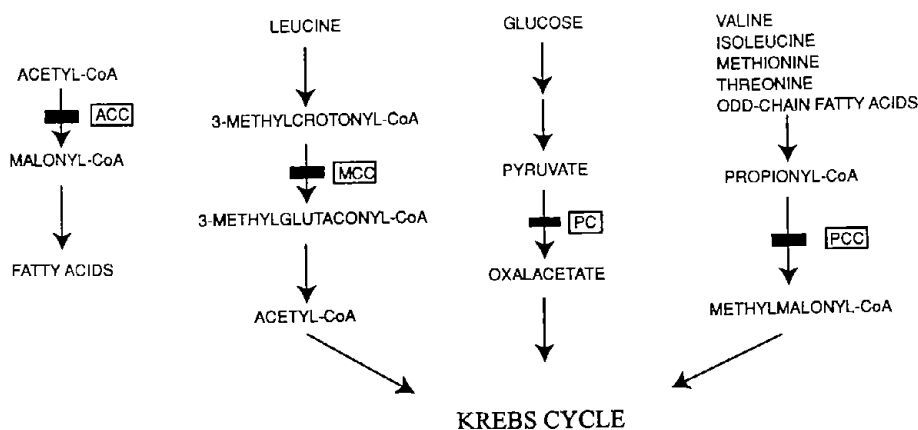


Figure 2. Role of biotin-dependent carboxylases in human metabolism.

activity in plasma, lactic acidemia, hyperammonemia, citrulinemia, mental retardation, and developmental delay (41).

The enzyme propionyl-CoA carboxylase (PCC) is involved in catabolism of branched chain amino acids and fatty acids of odd-numbered chain length by catalyzing transformation of propionyl-CoA to methylmalonyl-CoA. PCC is a mitochondrial enzyme formed by two different polypeptides, alpha and beta, presenting a structure $\alpha_4\beta_4$ or $\alpha_6\beta_6$, the alpha subunit carrying the biotin molecule (42,43). PCC deficiency results in the metabolic disorder known as propionic acidemia. Clinical presentation of this disease includes vomiting, lethargy, hypotonia, lactic acidosis, and ketoacidosis; the disease is characterized by heterogeneity of clinical and biochemical manifestations and is potentially lethal. However, when propionic acidemia is mild, a protein-restricted diet can lead to lactic acidemia control. Genetic origin of propionic acidemia has been described by several groups who have reported 24 mutations on the gene encoding the alpha subunit of PCC and 29 mutations on the gene encoding the beta subunit of PCC (44).

Enzyme β -methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC) is involved in catabolism of amino acid leucine catalyzing carboxylation of 3-methylcrotonyl-CoA to 3-methylglutaconyl-CoA. As with PCC, MCC is located in mitochondria and is composed of two different subunits named alpha and beta of 85 and 60 kDa, respectively (45). Clinical and biochemical manifestations of MCC deficiency include seizures, hypotonia, organic acidemia, and the urine of these patients contains large amounts of 3-hydroxyvaleric acid and 3-methylcrotonylglycine (46). MCC deficiency appears to be the most frequent organic aciduria in North America, with an estimated frequency of 1:50,000 live births (46).

The enzyme ACC catalyzes carboxylation of acetyl-CoA to malonyl-CoA, an essential step in biosynthesis of fatty acids. In human cells there are two forms of ACC (ACC-1 and ACC-2). These enzymes are encoded by different genes and in their mature form are composed of a single polypeptide (47–51). ACC-1 is the only known biotin-dependent

carboxylase located in human cell cytoplasm, because ACC-2 is also located in mitochondria (94). ACC-1 is mainly expressed in lipogenic tissues such as liver and kidney, while ACC-2 is expressed preferentially in skeletal muscle and heart. Differential expression of ACC-1 and ACC-2 has led to the hypothesis that ACC-1 is involved in fatty acid synthesis and ACC-2 is involved in fatty acid catabolism in muscle (48). Differences between these two enzymes extend to their transcriptional regulation: ACC-1 is regulated by nutrients such as glucose and insulin, while ACC-2 is regulated at transcriptional level by muscle-specific cell factors such as MyoD (52).

Biotinylation of Carboxylases in Human Cells

As described in the previous section of this review, biotin-dependent carboxylases exhibit variation in their architecture. Given that biotin-dependent enzymes catalyze similar reactions, it is reasonable to consider that genes encoding biotin-carrier polypeptides are derived from a common ancestor. It is possible that through a process of one or more duplications, the primordial gene gave rise to two or more biotin protein genes that then evolved independently to code for biotin enzymes with different but still related functions (39). The common ancestry of biotin-dependent carboxylases is revealed when we compare the amino acid sequence of these proteins. All biotin enzymes share a high sequence homology around the acceptor site of biotinylation (53). Biotinylation of these proteins occurs at a specific lysine residue located within the sequence Met-Lys-Met. This tripeptide is located in most enzymes 35 amino acids from the carboxyl terminus except in ACC, where the Met-Lys-Met is located toward the amino terminus of the protein. All carboxylases contain a Pro-Xn-Pro motif 30–35 amino acids from amino terminal side of biotin binding site. Finally, all biotin-containing proteins have several glycine and valine

residues conserved at specific positions in relation to the biotinylation site (Figure 3). Modification of any of these conserved sequences by site-directed mutagenesis impairs biotinylation of carboxylases (7). These results suggested that conserved sequences may function as a signal during biotinylation reaction or to maintain the three-dimensional structure of the domain (7,8,54,55).

Biotinylation of carboxylases is catalyzed by BirA protein in bacteria and by HCS in humans (6,42,32,56-58). Although these enzymes have different substrates, both proteins catalyze biotinylation of carboxylases through an identical double-step reaction. In the first step, biotin is activated by ATP producing the intermediary product biotinyl-5'-AMP (B-AMP). In the second step, B-AMP is used to transfer biotin to carboxylases, which are synthesized as inactive precursors that require biotinylation to catalyze transfer of a carboxyl group (Figure 4).

A remarkable difference between bacterial and eukaryotic biotin ligases is the ability of BirA protein to use biotin as transcriptional co-repressor of the five genes forming the biotin operon (56). When bacteria are grown in a biotin-rich medium, B-AMP accumulates in the cell and remains bound to BirA. The complex, BirA-B-AMP, recognizes a specific DNA sequence in the promoter of biotin operon through an H-L-H domain located in amino terminal half of the protein and represses transcription of genes involved in biotin synthesis (3,59,60). Eukaryotes lose the ability to synthesize biotin during evolution, reflected in the fact that amino terminal regions of BirA and HCS show no sequence conservation (9,61).

Biotin-Responsive Inborn Errors of Biotin Metabolism

There are autosomal recessive disorders of biotin metabolism in humans that result from biotinidase or HCS activity disruption. More recently, evidence has been presented showing that impairment of biotin transport in hematoencephalic border leads to very unusual clinical manifestations. The main outcome of such deficiencies is marked reduction in all biotin-dependent carboxylase activity (12,13,33,35,62). Affected patients demonstrate a combination of

all carboxylase deficiencies, both clinically and biochemically. However, unlike in isolated carboxylase defects, these patients respond successfully to pharmacologic doses of biotin. Based on age-of-onset symptoms, HCS and biotinidase deficiencies are known as neonatal and juvenile forms of multiple carboxylase deficiency (MCD), respectively (36).

Biotinidase Deficiency

A defect of biotinidase activity blocks biotin release from food or food recycling after carboxylase proteolysis. This results in a secondary biotin deficiency, disrupting all carboxylase activity. In these patients, intestinal absorption mechanisms of biotin and biotinylation of carboxylases remain unaltered, explaining why affected children respond rapidly to dietary biotin supplementation. Main clinical and biochemical features of biotinidase deficiency include alopecia, developmental delay, organic aciduria, seizures, skin rash, mild hyperammonemia, and breathing problems. Disease onset varies from 2 weeks to 2 years of age. Biotinidase activity in serum of affected children is 0-30% of mean normal activity; biochemical and the majority of clinical manifestations of the disease can be reversed successfully with pharmacologic doses of biotin (5-20 mg daily) (36,63-69).

Holocarboxylase Deficiency

Multiple carboxylase deficiency caused by mutations in HCS gene is a much more severe metabolic disorder. In this case, cell ability to biotinylate carboxylases is directly affected, while biotin release by biotinidase and intestinal absorption is normal (12,33,70). Biochemical and clinical manifestations of the disorder include ketolactic acidosis, organic aciduria, hyperammonemia, skin rash, feeding problems, hypotonia, seizures, developmental delay, alopecia, and coma (36). Disease onset occurs within a few hours after birth until 15 months of age. The urine of these patients shows relatively high concentrations of beta-hydroxyvalerate, beta hydroxypropionate, methylcitrate, lactate, and triglycine (36). Excretion of all these metabolites is clear

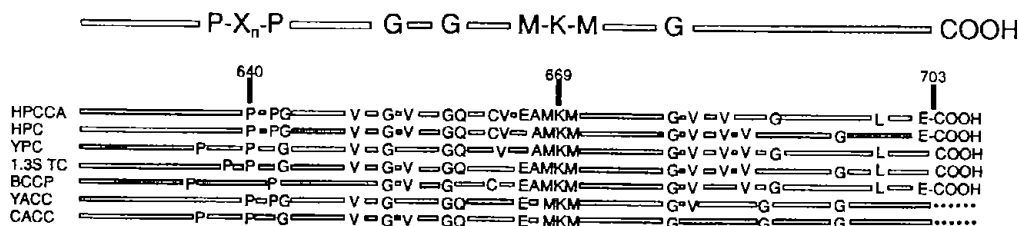


Figure 3. Amino acid sequence conservation among biotin-dependent enzymes. The sequence of different biotin enzymes is aligned with respect to the biotin binding site to show amino acid conservation around this region. Proline region and the conserve Gly residues are shown in the schematic representation of biotin domain above protein sequences. The numbers represent the amino acid position in the α subunit of PCC. Protein sequences are as follows: HPCCA, human propionyl-CoA carboxylase; HPC, human pyruvate carboxylase; YPC, yeast pyruvate carboxylase; 1.3S TC, 1.3S subunit of transcarboxylase of *P. shermanii*; YACC, yeast acetyl-CoA carboxylase, and CACC, chicken acetyl-CoA carboxylase.

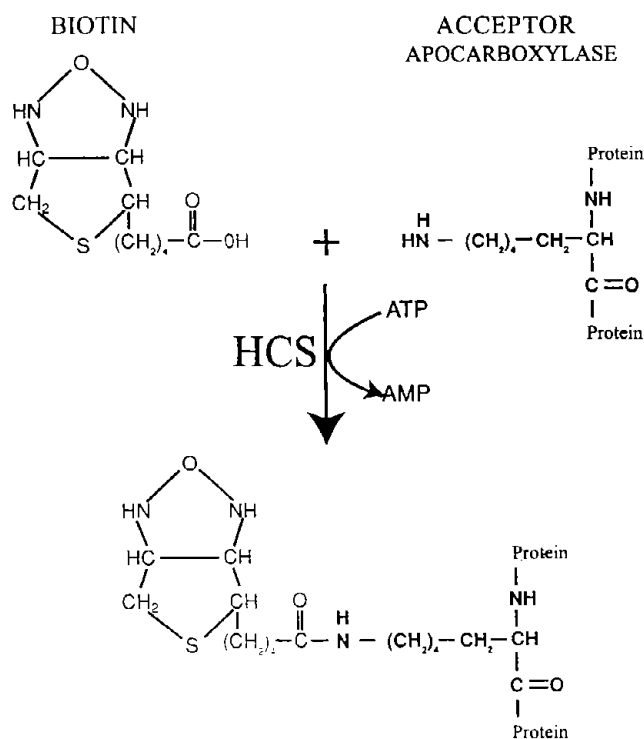


Figure 4. Biotinylation of apocarboxylases. Activation of carboxylases occurs by addition of a biotin molecule to a specific Lys residue in the polypeptide chain. This reaction is catalyzed by holocarboxylase synthetase (HCS).

evidence of generalized carboxylase failure. The disease is lethal; however, all its clinical and biochemical manifestations can be reversed if treated promptly with pharmacologic doses of biotin (10–100 mg per day).

Biotin responsiveness observed in MCD patients led to the hypothesis that mutations present in MCD cause a decrease in HCS affinity for biotin (71). Using semi-pure carboxylases from rat as substrate showed that HCS affinity for biotin from patients with MCD was decreased up to 70-fold compared to normal individuals. Cloning of HCS cDNA (9,10) showed that HCS is a member of a protein family of biotin ligases. Human HCS has a 130-carboxyl terminal amino acid domain that shows high sequence conservation with biotin ligases such as BirA protein from *Escherichia coli* (9,10,61). This 130-amino acid region is responsible for biotin activation prior to carboxylase biotinylation (60). Sequence conservation between human HCS and bacterial BirA protein allows biotinylation of bacterial carboxylase by HCS and vice versa (7,9). Sequencing of HCS gene in MCD patients showed that the majority of mutations responsible for MCD are located in conserved 130 amino acid domain (33). When expressed in bacteria, these mutations were shown to reduce affinity of the enzyme for biotin. Although HCS is a 726 amino acid protein, biotinylation of carboxylases appears to require solely from carboxyl terminal 130 amino acid domain. HCS in which 500 amino termi-

nal amino acids were eliminated by site-directed mutagenesis shows identical biotinylation activity as the full-length enzyme (61).

Biotin-Responsive Basal Ganglia Disease

In recent years, Ozand and collaborators (24) described several patients in Saudi Arabia with clinical and neuroradiologic evidence of basal ganglia disease (BGD). This form of BGD is associated with destruction of caudate heads centrally and partial or complete loss of the putamen. The most intriguing characteristic of the disorder is that it appears to be a familiar disease with possible autosomal recessive inheritance and one that responds within days to large doses of biotin. Symptoms observed in these patients include confusion, lethargy progressing to coma, vomiting, seizures, dystonia, dysarthria, dysphagia, paralysis of the seventh nerve, quadriparesis, ataxia, hypertension, and chorea. All patients studied showed normal carboxylases and biotinidase activities, suggesting that the disease might be caused by a defect in the biotin transporter system across cerebral capillaries at the blood brain barrier. This would suggest that biotin-dependent BGD is caused by inactivation of biotin-dependent enzymes in the cell. However, we cannot explain why some patients remain asymptomatic to the age of 14 years. Recently, Gusella and collaborators localized biotin-dependent BGD gene to chromosome 2 and identified a putative gene named SLC19A3. The encoded protein by this gene belongs to a family of reduced folate transporter genes. Two missense mutations were identified in exons 2 and 5 in patients but not in control individuals. Evidence, although interesting, is circumstantial because there are no biochemical data demonstrating involvement of this membrane protein in biotin transport in brain. We can speculate that accumulation of carboxylase intermediary may lead to destruction of basal ganglia. However, it is difficult to explain why patients with mutations in genes encoding biotinidase or holocarboxylase synthetase do not present the same clinical manifestations (72).

New Functions For An Old Vitamin

In recent years it has been suggested that biotin may play a role in other cellular events in eukaryotic organisms such as transcriptional or translational regulation or enhancement of activity of different hepatic enzymes. In these studies, biotin appears to augment glucokinase enzymatic activity and transcription of its gene in laboratory rats, pancreatic β -cells, and rat hepatocytes in culture (14,18,19). Similarly, mRNA levels for 6-phosphofructokinase are increased after administration of the vitamin to biotin-starved rats (22,23). In human hepatocyte culture, biotin appears to be required to promote translation of the asialoglycoprotein receptor (ASGR) mRNA (20). Significantly, a recent report showed that biotin

deficiency in rat reduces protein concentration and activity of carboxylases PCC and PC and mRNA level of HCS, the enzyme responsible for their biotinylation (21).

Although none of these reports presents a mechanism that would explain the role of biotin on transcription and translation, it is interesting to consider recent evidence suggesting that biotinidase can biotinylate histones. In theory, histone biotinylation may account for modifications on gene expression in the same way acetylation or methylation do. Zemleni and collaborators developed a method that allows the study of histone biotinylation *in vivo* and demonstrated that cell proliferation increases histone biotinylation (73-75). However, no conclusive evidence of biotinidase activity in nucleolus has been reported, and it is not clear in which way histone biotinylation represents a cause or an effect of cell proliferation. Moreover, there is no evidence that biotinylation of histones would have an effect on gene expression. These studies, however, may be supported by old observations made by Petrelli and collaborators (76) in which they stated that biotin deficiency reduced DNA and RNA synthesis in liver of rats. In the same study, they reported that DNA affinity for histones decreased as a result of biotin deficiency. It is interesting to consider that histone biotinylation may be one of many modifications that the cell uses to control gene expression. However, recent data appear to suggest that biotin may influence target gene expression by triggering a signaling cascade on cytoplasm (77).

We have used biotin-dependent carboxylases in our laboratory to study the effect of biotin on transcription regulation in human cells. Our investigation showed that biotin deficiency reduces HCS, ACC-1, and PCC mRNA levels. The effect of biotin is specific in that addition of vitamins to cell cultures is sufficient to restore mRNA levels to normal values. Biotin-deficient HepG2 cells stimulated with cGMP show an identical increase in mRNA levels, suggesting that biotin acts through guanylate cyclase activation. To test this hypothesis, we incubated human cells in presence of high doses of biotin and specific inhibitor or the soluble guanylate cyclase (sGC). Under these experimental conditions, cells were unable to increase mRNA levels of genes studied (77). The role of cGMP as a second messenger involved in transcriptional regulation is well known. One of the most common partners of sGC in signaling cascades is cGMP-dependent protein kinase (PKG), a protein that when activated by cGMP migrates to the nucleus where it is involved in transcription of genes such as *c-fos* (17,78-80). To investigate whether PKG is involved in transducing the biotin signal to nucleus, we incubated HepG2 cells in presence of biotin and 8-(4-chlorophenylthio) guanosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate, a specific PKG inhibitor, showing that this procedure blocks the ability of biotin to increase HCS mRNA levels.

Given the high structural and functional similarities between HCS and BirA protein (9,10,81), we investigated the possibility that HCS may have a role in determining mRNA

levels of different genes in eukaryotic cells in response to biotin. To address this question, we used fibroblasts from patients with multiple carboxylase deficiency due to an HCS gene mutation that renders a protein with low affinity toward biotin (R508W). These cells were unable to increase HCS mRNA in response to low biotin concentrations. To increase mRNA levels to normal values, vitamin concentration was raised 100-fold, in keeping with mutations that cause reduced affinity for biotin by the mutant enzyme. Outcome is deficient synthesis of biotinyl-5'-AMP, the active form of the vitamin in the biotinylation reaction (34). HCS and carboxylase mRNA levels in normal and MCD fibroblasts and HepG2 cells can be restored by addition of the cGMP analog 8-Br-cGMP and abolished by addition of soluble guanylate cyclase inhibitors. We propose a regulatory role for biotin in HCS and carboxylase mRNA level control through a signaling cascade that requires HCS, guanylate cyclase, and cGMP-dependent protein kinase.

Last-Minute Speculations

In this review we proposed that biotin has different roles in the cell from those of its function as carboxylase cofactor. One such role is the effect of biotin on mRNA levels through a signaling cascade, which requires the holocarboxylase synthetase enzymes, the soluble form of guanylate cyclase, and cGMP-dependent protein kinase. In this context, it is interesting to consider the possibility that HCS is a bifunctional enzyme that in addition to its role in biotinylation of carboxylases is able to regulate expression of its own gene and of carboxylase genes. Although we cannot explain how HCS exerts this regulatory effect, we can imagine two different models: the first would imply that during eukaryote evolution, B-AMP was selected as a second messenger capable of stimulating sGC activity. Alternatively, in the second model the complex HCS-B-AMP may be the real effector molecule, as in the case of *Escherichia coli* BirA protein, in which this complex acts as transcriptional repressor of the biotin operon (3).

If HCS is indeed a bifunctional protein, this will not be the first case among biotin enzymes. In prokaryotes, BirA protein is the well-documented case of a protein that possesses enzymatic activity and also acts as transcription factor (3). More recently, the precursor of PCCB, the remaining subunit of PCC, was shown as able to bind to enzyme glucokinase functioning as regulator of its enzymatic activity in pancreatic β cells (18,19,82).

The role of HCS as part of a signaling cascade that triggers carboxylase gene transcription has implications in understanding the disease's multiple carboxylase deficiency. It is possible that the phenotype observed in MCD patients and their response to pharmacologic doses of biotin reflect a combined effect of low HCS affinity for biotin and decreased transcription of carboxylases and HCS genes. The role of

biotin and HCS in transcriptional regulation could prove to have broader implications for human health, as suggested by a series of reports on the teratogenic effects of biotin deficiency in different species (26). In pregnant mice, marginal biotin deficiency produced by an avidin-rich diet resulted in no obvious carboxylase deficiency findings. However, products showed higher frequency of malformations including cleft palate, micrognathia, and micromelia (83–91). Based on results presented in this study, it is interesting to consider the possibility that the biotin-HCS signal transduction pathway may be compromised by marginal biotin deficiency that affects the expression of genes involved in development. This possibility is of particular importance because recent studies have shown that a high number of pregnant women develop some degree of biotin deficiency (26,92).

Involvement of biotin in transcriptional regulation and description of a biotin-dependent basal ganglia disease (BGD) suggest that biotin may also be important for preservation of brain structures. The mechanisms underlying BGD are unknown; however, it is unlikely that accumulation of carboxylase substrates plays a role in development of this disease, because patients affected with multiple carboxylase deficiency do not exhibit similar symptoms. It would be interesting to study BGD patients to determine whether biotin-mediated transcriptional regulation of brain genes is responsible for the disease.

Although biotin and its role in classical cell metabolism have been known for decades, it is only now that we have begun to understand the multiple functions that this vitamin has and the versatility of the enzymes involved in its metabolism. It is necessary to determine the effect of biotin during development and disease to understand the different roles of this vitamin in the organism and to assess the real risk of a low-biotin diet during pregnancy.

Acknowledgments

This work was supported by grants J28005M and DGAPA: IN 203399 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico) and the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). Universidad Nacional Autónoma de México, respectively.

References

1. Wood HG, Barden RE. Biotin enzymes. *Annu Rev Biochem* 1977;46:385–413.
2. Eisenberg MA, Prakash O, Hsiung SC. Purification and properties of the biotin repressor. A bifunctional protein. *J Biol Chem* 1982;257:15167–15173.
3. Cronan JE Jr. The *E. coli* bio operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. *Cell* 1989;58:427–429.
4. Sundaram TK, Cazzulo JJ, Kornberg HL. Synthesis of pyruvate carboxylase from its apoenzyme and (+) (+)-biotin in *Bacillus stearothermophilus*. Mechanism and control of the reaction. *Biochem J* 1971;122:663–669.
5. Cazzulo JJ, Sundaram TK, Dilks SN, Kornberg HL. Synthesis of pyruvate carboxylase from its apoenzyme and (+)-biotin in *Bacillus stearothermophilus*. Purification and properties of the apoenzyme and the holoenzyme synthetase. *Biochem J* 1971;122:653–661.
6. Chapman-Smith A, Cronan JE Jr. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem Sci* 1999;24:359–363.
7. León-Del-Río A, Gravel RA. Sequence requirements for the biotinylation of carboxyl-terminal fragments of human propionyl-CoA carboxylase alpha subunit expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1994;269:22964–22968.
8. Cronan JE Jr. Biotinylation of proteins *in vivo*. A post-translational modification to label, purify, and study proteins. *J Biol Chem* 1990;265:10327–10333.
9. León-Del-Río A, Leclerc D, Akerman B, Wakamatsu N, Gravel RA. Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4626–4630.
10. Suzuki Y, Aoki Y, Ishida Y, Chiba Y, Iwamatsu A, Kishino T, Niiikawa N, Matsubara Y, Narisawa K. Isolation and characterization of mutations in the human holocarboxylase synthetase cDNA. *Nat Genet* 1994;8:122–128.
11. Bartlett K, Ghneim HK, Stirk JH, Wastell HJ, Sherratt HS, Leonard JV. Enzyme studies in combined carboxylase deficiency. *Ann N Y Acad Sci* 1985;447:235–251.
12. Sherwood WG, Saunders M, Robinson BH, Brewster T, Gravel RA. Lactic acidosis in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency caused by holocarboxylase synthetase deficiency of early and late onset. *J Pediatr* 1982;101:546–550.
13. Sweetman L, Nyhan WL, Sakati NA, Ohlsson A, Mange MS, Boychuk RB, Kaye R. Organic aciduria in neonatal multiple carboxylase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1982;5:49–53.
14. Chauhan J, Dakshinamurti K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* 1991;266:10035–10038.
15. Huber BE, Glowinski IB, Thorgerirsson SS. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the asialoglycoprotein receptor in normal and neoplastic rat liver. *J Biol Chem* 1986;261:12400–12407.
16. Stockert RJ, Ren Q. Cytoplasmic protein mRNA interaction mediates cGMP-modulated translational control of the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 1997;272:9161–9165.
17. 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.
18. Borboni P, Magnaterra R, Rubini RA, Staffolani R, Porzio O, Sesti G, Fusco A, Mazzanti L, Lauro R, Marlier LN. Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured beta-cells. *Acta Diabetol* 1996;33:154–158.
19. 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.
20. Collins JC, Paietta E, Green R, Morell AG, Stockert RJ. Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2. *J Biol Chem* 1988;263:11280–11283.
21. Rodríguez-Meléndez R, Cano S, Méndez ST, Velázquez A. Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J Nutr* 2001;131:1909–1913.
22. Dakshinamurti K, Tarrago-Litvak L, Hong HC. Biotin and glucose metabolism. *Can J Biochem* 1970;48:493–500.
23. Deodhar AD, Mistry SP. Regulation of glycolysis in biotin-deficient rat liver. *Life Sci* 1970;9:581–588.
24. Ozand PT, Gascon GG, Al Essa M, Joshi S, Al Jishi E, Bakheet S, Al Watban J, Al-Kawi MZ, Dabbagh O. Biotin-responsive basal ganglia disease: a novel entity. *Brain* 1998;121:1267–1279.
25. Zemleni J, Mock DM. Bioavailability of biotin given orally to humans in pharmacologic doses. *Am J Clin Nutr* 1999;69:504–508.
26. Zemleni J. Marginal biotin deficiency is teratogenic. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;223(1):14–21.

27. Wilhelm F. Vitamins. Berlin, Germany: De Gruyter; 1988. p. 1058.
28. Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta* 1996;255:1-11.
29. León-Del-Río A, Hol-Soto-Borja D, Velázquez A. Studies on the mechanism of biotin uptake by brush-border membrane vesicles of hamster enterocytes. *Arch Med Res* 1993;24:143-146.
30. León-Del-Río A, Velázquez A, Vizcaino G, Robles-Dfáz G, González-Noriega A. Association of pancreatic biotinidase activity and intestinal uptake of biotin and biocytin in hamster and rat. *Ann Nutr Metab* 1990;34:266-272.
31. Chatterjee NS, Kumar CK, Ortiz A, Rubin SA, Said HM. Molecular mechanism of the intestinal biotin transport process. *Am J Physiol* 1999;277:C605-C613.
32. Chapman-Smith A, Cronan JE Jr. *In vivo* enzymatic protein biotinylation. *Biomol Eng* 1999;16:119-125.
33. Dupuis L, León-Del-Río A, Leclerc D, Campeau E, Sweetman L, Saudubray JM, Herman G, Gibson KM, Gravel RA. Clustering of mutations in the biotin-binding region of holocarboxylase synthetase in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Hum Mol Genet* 1996; 5:1011-1016.
34. Morita J, Thuy LP, Sweetman L. Deficiency of biotinyl-AMP synthetase activity in fibroblasts of patients with holocarboxylase synthetase deficiency. *Mol Genet Metab* 1998;64:250-255.
35. Dupuis L, Campeau E, Leclerc D, Gravel RA. Mechanism of biotin responsiveness in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 1999;66:80-90.
36. Wolf B. Disorders of biotin metabolism. In: Scriver C, Beaudet AL, William S, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Vol. III. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2001. pp. 3935-3962.
37. Dakshinamurti K, Chalifour L, Bhullar RP. Requirement for biotin and the function of biotin in cells in culture. *Ann N Y Acad Sci* 1985;447: 38-55.
38. Moss J, Lane MD. The biotin-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1971;35:321-442.
39. Lynen F. New experiments of biotin enzymes. *CRC Crit Rev Biochem* 1979;7:103-119.
40. Wallace JC, Jitrapakdee S, Chapman-Smith A. Pyruvate carboxylase. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1-5.
41. Carbone MA, MacKay N, Ling M, Cole DE, Douglas C, Rigat B, Feigenbaum A, Clarke JT, Haworth JC, Greenberg CR, Seargeant L, Robinson BH. Amerindian pyruvate carboxylase deficiency is associated with two distinct missense mutations. *Am J Hum Genet* 1998;62: 1312-1319.
42. Browner MF, Taroni F, Sztul E, Rosenberg LE. Sequence analysis, biogenesis, and mitochondrial import of the alpha-subunit of rat liver propionyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 1989;264:12680-12685.
43. Ohura T, Kraus JP, Rosenberg LE. Unequal synthesis and differential degradation of propionyl CoA carboxylase subunits in cells from normal and propionic acidemia patients. *Am J Hum Genet* 1989;45: 33-40.
44. Ugarte M, Pérez-Cerda C, Rodríguez-Pombo P, Desviat LR, Pérez B, Richard E, Muro S, Campeau E, Ohura T, Gravel RA. Overview of mutations in the PCCA and PCCB genes causing propionic acidemia. *Hum Mutat* 1999;14:275-282.
45. McKean AL, Ke J, Song J, Che P, Achenbach S, Nikolau BJ, Wurtele ES. Molecular characterization of the non-biotin-containing subunit of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 2000;275:5582-5590.
46. Baumgartner MR, Almashanu S, Suormala T, Obie C, Cole RN, Packman S, Baumgartner ER, Valle D. The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Clin Invest* 2001; 107:495-504.
47. Abu-Elheiga L, Jayakumar A, Baldini A, Chirala SS, Wakil SJ. Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4011-4015.
48. Abu-Elheiga L, Almarza-Ortega DB, Baldini A, Wakil SJ. Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms. *J Biol Chem* 1997;272:10669-10677.
49. Ullrich CK, Widmer J, Park JP, Mohandas TK, Witters LA. Assignment of acetyl-CoA carboxylase-beta (ACACB) to human chromosome band 12q24.1 by *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1997;77:176-177.
50. Ha J, Lee JK, Kim KS, Witters LA, Kim KH. Cloning of human acetyl-CoA carboxylase-beta and its unique features. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11466-11470.
51. Widmer J, Fasshi KS, Schlichter SC, Wheeler KS, Crute BE, King N, Nutile-McMenemy N, Noll WW, Daniel S, Ha J, Kim KH, Witters LA. Identification of a second human acetyl-CoA carboxylase gene. *Biochem J* 1996;316:915-922.
52. Lee JJ, Moon YA, Ha JH, Yoon DJ, Ahn YH, Kim KS. Cloning of human acetyl-CoA carboxylase beta promoter and its regulation by muscle regulatory factors. *J Biol Chem* 2001;276:2576-2585.
53. Lamhonwah AM, Quan F, Gravel RA. Sequence homology around the biotin-binding site of human propionyl-CoA carboxylase and pyruvate carboxylase. *Arch Biochem Biophys* 1987;254:631-636.
54. Polyak SW, Chapman-Smith A, Mulhern TD, Cronan JE Jr, Wallace JC. Mutational analysis of protein substrate presentation in the post-translational attachment of biotin to biotin domains. *J Biol Chem* 2001;276:3037-3045.
55. Cronan JE Jr. The biotinyl domain of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. Evidence that the "thumb" structure is essential and that the domain functions as a dimer. *J Biol Chem* 2001;276:37355-37364.
56. Barker DF, Campbell AM. The *birA* gene of *Escherichia coli* encodes a biotin holoenzyme synthetase. *J Mol Biol* 1981;146:451-467.
57. Chapman-Smith A, Morris TW, Wallace JC, Cronan JE Jr. Molecular recognition in a post-translational modification of exceptional specificity. Mutants of the biotinylated domain of acetyl-CoA carboxylase defective in recognition by biotin protein ligase. *J Biol Chem* 1999; 274:1449-1457.
58. Blanchard CZ, Chapman-Smith A, Wallace JC, Waldrop GL. The biotin domain peptide from the biotin carboxyl carrier protein of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase causes a marked increase in the catalytic efficiency of biotin carboxylase and carboxyltransferase relative to free biotin. *J Biol Chem* 1999;274:31767-31769.
59. Buoncristiani MR, Howard PK, Otsuka AJ. DNA-binding and enzymatic domains of the bifunctional biotin operon repressor (*BirA*) of *Escherichia coli*. *Gene* 1986;44:255-261.
60. Wilson KP, Shewchuk LM, Brennan RG, Otsuka AJ, Matthews BW. *Escherichia coli* biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:9257-9261.
61. Campeau E, Gravel RA. Expression in *Escherichia coli* of N- and C-terminally deleted human holocarboxylase synthetase. Influence of the N-terminus on biotinylation and identification of a minimum functional protein. *J Biol Chem* 2001;276:12310-12316.
62. Burri BJ, Sweetman L, Nyhan WL. Heterogeneity of holocarboxylase synthetase in patients with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985;37:326-337.
63. Wolf B, Heard GS. Biotinidase deficiency. *Adv Pediatr* 1991;38:1-21.
64. Wolf B, Grier RE, Secor McVoy JR, Heard GS. Biotinidase deficiency: a novel vitamin recycling defect. *J Inheret Metab Dis* 1985;8: 53-58.
65. Wolf B, Heard GS, Jefferson LG, Proud VK, Nance WE, Weissbecker KA. Clinical findings in four children with biotinidase deficiency detected through a statewide neonatal screening program. *N Engl J Med* 1985;313:16-19.
66. Weissbecker KA, Wolf B, Eaves LJ, Marazita ML, Nance WE. Combined pedigree and twin family study to determine the sources of variation in serum biotinidase activity: the usefulness of multiple study designs. *Am J Med Genet* 1993;47:231-240.

67. Cole H, Reynolds TR, Lockyer JM, Buck GA, Denson T, Spence JE, Hymes J, Wolf B. Human serum biotinidase. cDNA cloning, sequence, and characterization. *J Biol Chem* 1994;269:6566-6570.
68. Norrgard KJ, Pomponio RJ, Hymes J, Wolf B. Mutations causing profound biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in the United States occur at different frequencies than in symptomatic children. *Pediatr Res* 1999;46:20-27.
69. Pomponio RJ, Ozand PT, Al Essa M, Wolf B. Novel mutations in children with profound biotinidase deficiency from Saudi Arabia. *J Inher Metab Dis* 2000;23:185-187.
70. Sakamoto O, Suzuki Y, Li X, Aoki Y, Hiratsuka M, Suormala T, Baumgartner ER, Gibson KM, Narisawa K. Relationship between kinetic properties of mutant enzyme and biochemical and clinical responsiveness to biotin in holocarboxylase synthetase deficiency. *Pediatr Res* 1999;46:671-676.
71. Burri BJ, Sweetman L, Nyhan WL. Mutant holocarboxylase synthetase: evidence for the enzyme defect in early infantile biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *J Clin Invest* 1981;68:1491-1495.
72. Zeng W, Al-Yamani, Acierno JS, Ozand P, Gusella JF. Mutations in SLC19A3 encoding a novel transporter cause biotin-responsive basal ganglia disease. Paper presented at the 51st Annual Meeting, The American Society of Human Genetics, 2001.
73. Stanley JS, Griffin JB, Zemleni J. Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation. *Eur J Biochem* 2001;268:5424-5429.
74. Hymes J, Wolf B. Human biotinidase isn't just for recycling biotin. *J Nutr* 1999;129:485S-489S.
75. Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B. Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem Mol Med* 1995;56:76-83.
76. Petrelli F, Coderoni S, Moretti P, Paparelli M. Effect of biotin on phosphorylation, acetylation, methylation of rat liver histones. *Mol Biol Rep* 1978;4:87-92.
77. Solórzano-Vargas S, Pacheco-Alvarez D, León Del Río A. Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(8):5325-5330.
78. Collins SP, Uhler MD. Cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent protein kinases differ in their regulation of cyclic AMP response element-dependent gene transcription. *J Biol Chem* 1999;274:8391-8404.
79. Gudi T, Huvar I, Meinecke M, Lohmann SM, Boss GR, Pilz RB. Regulation of gene expression by cGMP-dependent protein kinase. Trans-activation of the c-fos promoter. *J Biol Chem* 1996;271:4597-4600.
80. Ikuta T, Ausenda S, Cappellini MD. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1847-1852.
81. Bartlett K, Gompertz D. Combined carboxylase defect: biotin-responsiveness in cultured fibroblasts. *Lancet* 1976;2:804.
82. Shiraishi A, Yamada Y, Tsuura Y, Fijimoto S, Tsukiyama K, Mukai E, Toyoda Y, Miwa I, Seino Y. A novel glucokinase regulator in pancreatic beta cells: precursor of propionyl-CoA carboxylase beta subunit interacts with glucokinase and augments its activity. *J Biol Chem* 2001;276:2325-2328.
83. Watanabe T. Dietary biotin deficiency affects reproductive function and prenatal development in hamsters. *J Nutr* 1993;123:2101-2108.
84. Watanabe T, Dakshinamurti K, Persaud TV. Biotin influences palatal development of mouse embryos in organ culture. *J Nutr* 1995;125:2114-2121.
85. Watanabe T, Endo A. Biotin deficiency per se is teratogenic in mice. *J Nutr* 1991;121:101-104.
86. Watanabe T, Endo A. Teratogenic effects of maternal biotin deficiency on mouse embryos examined at midgestation. *Teratology* 1990;42:295-300.
87. Heard GS, Blevins TL. Is biotin deficiency teratogenic in mice? *J Nutr* 1989;119:1348-1350.
88. Watanabe T, Endo A. Species and strain differences in teratogenic effects of biotin deficiency in rodents. *J Nutr* 1989;119:255-261.
89. Goto T, Watanabe T, Endo A. Sex difference in susceptibility to teratogenic effect of maternal biotin deficiency in mouse embryos. *Teratology* 1985;31:425-427.
90. Watanabe T, Endo A. Teratogenic effects of avidin-induced biotin deficiency in mice. *Teratology* 1984;30:91-94.
91. Watanabe T. Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *J Nutr* 1983;113:574-581.
92. Mock DM, Stadler DD. Conflicting indicators of biotin status from a cross-sectional study of normal pregnancy. *J Am Coll Nutr* 1997;16:252-257.
93. Pispaj A. Animal biotinidase. *Ann Med Exp Biol Fenn* 1965;43:1-39.
94. Abu-Elheiga L, Brinkley W, Zhong L, Chirala S, Woldegiorgis G, Wakil S. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1444-1449.

Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells

R. Sergio Solórzano-Vargas, Diana Pacheco-Alvarez, and Alfonso León-Del-Río*

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

Communicated by Allan Campbell, Stanford University, Stanford, CA, February 19, 2002 (received for review October 29, 2001)

Holocarboxylase synthetase (HCS) catalyzes the covalent attachment of biotin to five biotin-dependent carboxylases in human cells. Multiple carboxylase deficiency (MCD) is a life-threatening disease characterized by the lack of carboxylase activities because of deficiency of HCS activity. Here, we report the obligatory participation of HCS in the biotin-dependent stimulation of the level of HCS mRNA and those of acetyl-CoA carboxylase and the α subunit of propionyl-CoA carboxylase in human cells. Fibroblasts from patients with MCD are unable to increase HCS mRNA in response to biotin unless the vitamin concentration is raised 100-fold, in keeping with mutations that cause a reduced affinity for biotin by the mutant enzyme. The outcome is deficient synthesis of biotinyl-5'-AMP, the active form of the vitamin in the biotinylation reaction. HCS and carboxylase mRNA levels in normal and MCD fibroblasts and HepG2 cells can be restored by the addition of the cGMP analogue, 8-Br-cGMP, and can be abolished by the addition of inhibitors of the soluble form of guanylate cyclase. We propose a regulatory role for biotin in the control of HCS and carboxylase mRNA levels through a signaling cascade that requires HCS, guanylate cyclase, and cGMP-dependent protein kinase.

Biotin is a water-soluble vitamin found in all organisms that functions as a cofactor of enzymes known as biotin-dependent carboxylases (1). The covalent addition of biotin to these proteins is catalyzed by biotin ligases, which in prokaryotes are known as the BirA protein (2, 3) and in eukaryotes as holocarboxylase synthetase (HCS) (1). For both BirA and HCS, biotin addition occurs as an ATP-dependent, two-step reaction that, in the first step, involves synthesis of the intermediate, biotinyl-5'-AMP (B-AMP) (4, 5). In the second step, B-AMP is used to transfer biotin, with release of AMP, to a specific lysine residue in a highly conserved region in apocarboxylases (6–10).

Most of what we know about biotin and the role of HCS in human metabolism comes from the study of patients with deficiency of HCS activity. These patients, also described as having the neonatal form of multiple carboxylase deficiency (MCD), have life threatening ketoacidosis and organic acidemia (11). They have reduced activity of all biotin-dependent carboxylases: propionyl-CoA carboxylase (PCC), pyruvate carboxylase (PC), methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC), and acetyl-CoA carboxylase (ACC) (12–14). In these patients, the potentially lethal disruption of gluconeogenesis, fatty acid metabolism, and amino acid catabolism can be reversed with pharmacological doses of biotin. The HCS of most affected individuals studied have a reduced affinity for biotin with the K_m of the mutant enzyme elevated 3–70 times over the value for the normal enzyme (15, 16). Most patients have mutations in the biotin-binding domain of HCS (16, 17). The outcome is a strong reduction in the ability of the cells to produce B-AMP (18).

A remarkable difference between bacterial and eukaryotic biotin ligases is the ability of the BirA protein to use biotin as a transcriptional corepressor of the five genes that form the biotin operon (19). When bacteria are grown in a biotin-rich medium, B-AMP accumulates in the cell and remains bound to BirA. The complex, BirA-B-AMP, recognizes a specific DNA sequence in the promoter of the biotin operon through a H-L-H domain located in the N-terminal half of the protein and represses transcription of the genes involved in biotin synthesis (20).

In recent years, it has been suggested that biotin may play a role in other cellular events in eukaryotic organisms such as transcriptional or translational regulation or enhancement of the activity of different hepatic enzymes. In these studies, biotin seems to augment the enzymatic activity of glucokinase and the transcription of its gene in rats *in vivo*, pancreatic β -cells and rat hepatocytes in culture (21–23). Similarly, mRNA levels for 6-phosphofructokinase are increased after administration of the vitamin to biotin-starved rats (24, 25). In human hepatocyte culture, biotin seems to be required to promote translation of the asialoglycoprotein receptor (ASGR) mRNA (26). Significantly, a recent report showed that biotin deficiency in rat reduces the protein concentration and activity of the carboxylases, PCC and PC, and the mRNA level of HCS, the enzyme responsible for their biotinylation (27).

Given the high structural and functional similarities between HCS and the BirA protein (9, 10, 28), we investigated the possibility that HCS may have a role in determining mRNA levels of different genes in eukaryotic cells in response to biotin. In this report we show that in human cells, HCS is required to mediate the biotin-dependent increase in mRNA levels of HCS, ACC-1, and the α subunit of PCC (PCCA). We suggest that the mechanism responsible for the biotin effect on mRNA requires activation of the soluble form of guanylate cyclase (sGC) and of the cGMP-dependent protein kinase (PKG).

Materials and Methods

Materials. Biotin, 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate (8-Br-cGMP), 1-H (1,2,4)oxadiazolo-[4,3-a]quinaxolin-1-one (ODQ), and actinomycin-D were purchased from Sigma. Rp-8(4-chlorophenylthio)-guanosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate (Rp-8-pCPT-cGMPS) was from Biolog, San Diego, CA.

Abbreviations: HCS, holocarboxylase synthetase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; PCCA, α subunit of propionyl-CoA carboxylase; MCD, multiple carboxylase deficiency; B-AMP, biotinyl-5'-AMP; sGC, soluble guanylate cyclase; PKG, cGMP-dependent protein kinase; ODQ, 1-H(1,2,4)oxadiazolo-[4,3-a]quinaxolin-1-one; 8-Br-cGMP, 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate; Rp-cGMPS, Rp-8(4-chlorophenylthio)-guanosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate; ASGR, asialoglycoprotein receptor.

*To whom reprint requests should be addressed. E-mail: alfonso@servidor.unam.mx.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. 51734 solely to indicate this fact.

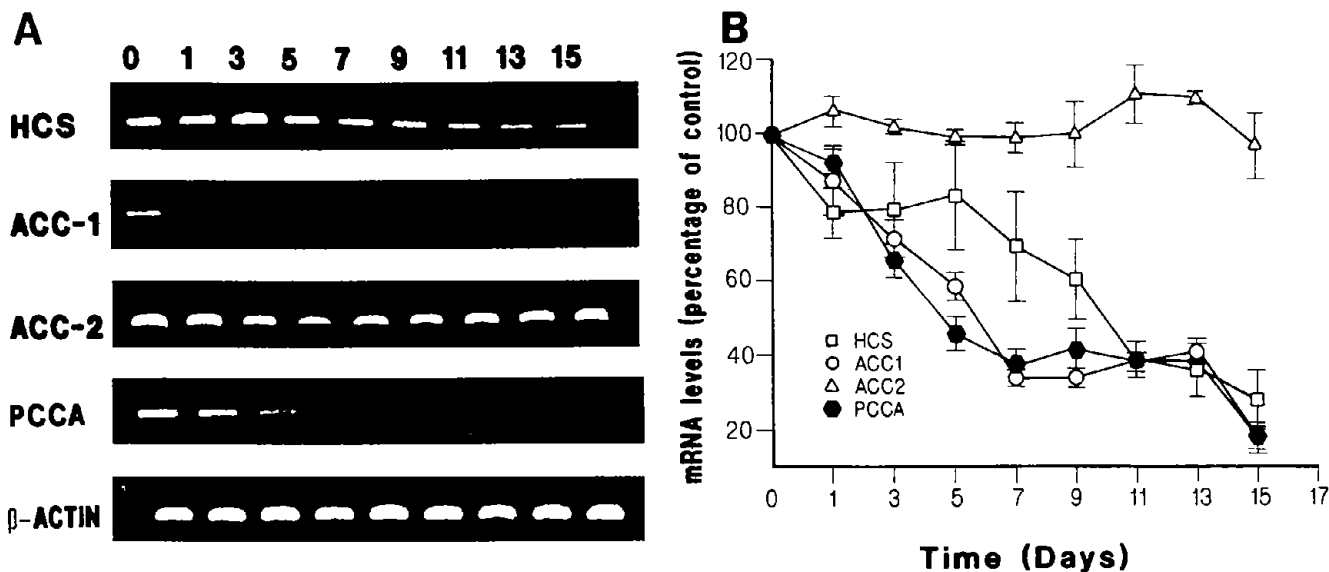


Fig. 1. Time course effect of biotin deficiency on mRNA levels. HepG2 cells were grown in a biotin-free medium. Total RNA was isolated at different times and HCS, ACC-1, ACC-2, and PCCA mRNAs were amplified by reverse transcription PCR and quantitated by densitometry as described in *Materials and Methods*. (A) Representative experiment showing the effect of time of biotin restriction on the mRNA levels for HCS, ACC-1, ACC-2, and PCCA. (B) Summary of the results obtained in three different experiments presented as mean \pm SE. Lane numbers correspond to days in biotin-deficient medium.

The human hepatoblastoma cell line, HepG2, was obtained from the American Type Cell Collection. Normal human fibroblasts and fibroblasts from patients with MCD (MCD-MK and MCD-VE) were kindly provided by R. Gravel (University of Calgary, Alberta, Canada; ref. 16).

Reverse Transcription-PCR. Total RNA was isolated from cultured cells by using the Trizol reagent method (GIBCO/BRL, Life Technology, Heidelberg, Germany). RNA was treated for 1 h at 37°C with 6 units of ribonuclease-free DNase in 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 and 50 mM MgCl₂ in the presence of 2 U/ μ l placental RNase inhibitor. The RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm, and the integrity of the RNA samples was confirmed by electrophoresis through 1% agarose. Next, 5 μ g of total RNA were converted to cDNA by using Superscript II reverse transcriptase (GIBCO/BRL) and 0.8 μ M of specific oligonucleotides for each of the genes tested. A control reaction without reverse transcriptase was performed for each RNA sample to verify that the subsequent PCR did not proceed from contaminating genomic DNA. For PCR amplification of the cDNAs, sense and antisense primers were designed to amplify 200- to 500-bp RNA fragments. This amplification was accomplished by incubating 1 μ l of the resulting cDNA in a 30 μ l reaction volume (50 mM KCl/150 mM MgCl₂/10 mM Tris-HCl, pH 9.0) containing 100 pmol of specific sense and antisense primers and 0.3 μ l of *Taq* polymerase (Perkin-Elmer). The oligonucleotides used were: HCS: 5'-CCC GAG CTC CGT CTC CTG GAT CGG-3' and 5'-CCC AAG CCT TTT ACC GCC GTT TGG GGA-3' [melting temperature (T_m) = 58°C]; ACC-1: 5'-GAT GTA CAT CGG CTG AGT GA-3' and 5'-ATC CAT TCA TTA CAT TGA CC-3' (T_m = 58°C); ACC-2: 5'-CCT AAA GGT GAC CCG GAG T-3' and 5'-AAA AAG CCA CTC ATG ACG TT-3' (T_m = 60°C); PCCA: 5'-CCC CGA TGC CCG GAG GTG GT-3' and 5'-TAT TTC CAG CTC CAG AGC AG-3' (T_m = 60°C); β -actin: 5'-GGG TCA GAA TTC CTA TG-3' and 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' (T_m = 58°C).

Fluorescence Densitometry. PCR products were separated on 1% agarose gels and stained with ethidium bromide. The amount of

PCR product was determined by densitometry by using a Fluor-S-imager (Bio-Rad). The procedure was validated in prior studies by PCR amplification of different concentrations of cDNA fragments of HCS, PCCA, and β -actin (data not shown). The number of PCR cycles was also varied and plotted against fluorescence intensity to ensure that experiments were done within the exponential phase. For every experiment, the constitutive β -actin mRNA was used as the reference cellular transcript. It was present at equivalent levels in all RNA samples (Figs. 1 and 2).

Effect of Biotin Deficiency on mRNA Levels. Human HepG2 cells were grown at 37°C with 5% CO₂ in 5 ml of α -MEM medium containing high glucose levels (GIBCO/BRL) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. For biotin starvation experiments, the cells were grown in biotin-free MEM medium supplemented with 10% dialyzed FBS (GIBCO/BRL) to maximally reduce the biotin levels. HepG2 cells were cultivated in this medium for up to 20 days. Total RNA was isolated at various times, and the mRNA levels for HCS, ACC-1, ACC-2, PCCA, and β -actin were determined by fluorescence densitometry as described above. After 15 days in biotin-free medium, the cells cultures were 70–80% confluent and microscopic analysis showed normal morphology.

Effect of Biotin and cGMP on mRNA Levels in Biotin-Starved Cells. HepG2 cells grown in biotin free medium for 15 days were stimulated with 1 μ M biotin or 1 mM 8-Br-cGMP, a non hydrolyzable analogue of cGMP. Cells were harvested after 2, 6, 12, or 24 h, and the mRNA levels for the different genes were determined as described above. To determine the involvement of sGC on mRNA levels, biotin-starved HepG2 cells were treated with 50 μ M ODQ, a specific inhibitor of sGC, for 3 h (29). After this period, 1 μ M biotin was added to the medium for 24 h, and the effect on mRNA levels was compared with biotin-deficient cells stimulated by biotin without ODQ and cells grown continuously in normal medium (control cells).

Biotin Stimulation of mRNA Levels After Inhibition of RNA Polymerase II. Biotin-starved HepG2 cells were treated with 10 μ M actinomycin-D for 1 h (30). After this time, biotin was added to the

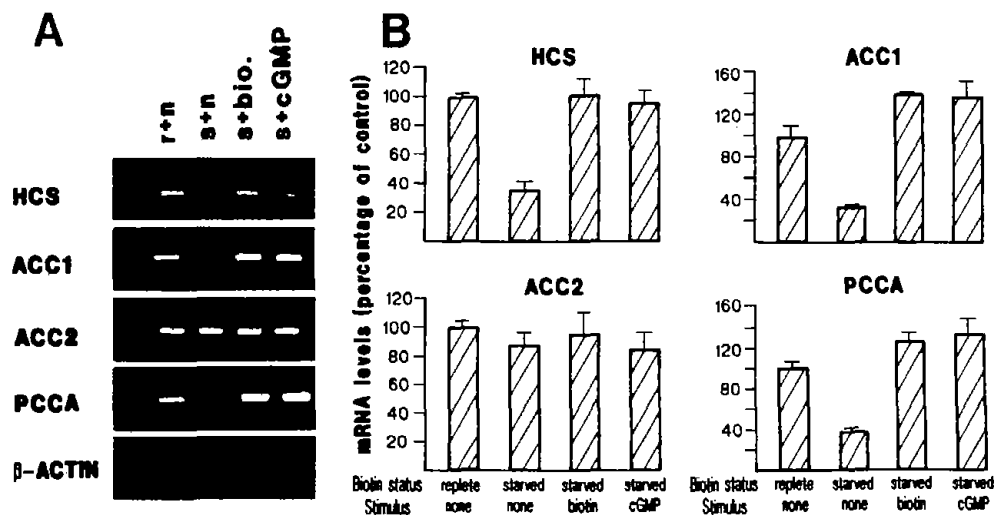


Fig. 2. Effect of biotin and cGMP on mRNA levels. HepG2 cells cultivated 14 days in a biotin-free medium were stimulated with 1 μ M biotin or 1 mM 8-Br-cGMP. HCS, ACC-1, ACC-2, PCCA, and β -actin mRNA were determined as described in *Materials and Methods*. (A) Representative experiment showing mRNA levels in biotin-replete cells (r), biotin-starved cells (s), biotin-starved cells stimulated with biotin (s + bio), and biotin-starved cells stimulated with 8-Br-cGMP (s + cGMP). (B) Summary of the results obtained from three different experiments. Results are presented as mean \pm SE.

medium to a final concentration of 1 μ M and total RNA was isolated 24 h later. mRNA levels were compared with data obtained from cells treated with actinomycin-D without biotin and cells not treated with the RNA polymerase II inhibitor.

Effect of cGMP-Dependent Protein Kinase Inhibition. HepG2 cells grown in biotin-free medium for 15 days were treated with 10 μ M Rp-8-pCPT-cGMPs, a specific inhibitor of cGMP-dependent protein kinase (29) for 1 h. After this period, 1 μ M biotin (final) was added to the medium, and growth was continued for 24 h. Total RNA was isolated and the mRNA levels were determined as above.

Effect of Biotin and cGMP on HCS mRNA Levels in Fibroblast Cultures. Normal fibroblasts and fibroblasts from patients with MCD were incubated in biotin-free medium for 15 days. Cells were treated with 0, 0.01, 0.1, or 1.0 μ M biotin for 24 h. Total RNA was isolated, and the level of HCS mRNA was determined by fluorescence densitometry of reverse transcription PCR products. Similar experiments were performed on these cell lines using 0.01, 0.1, or 1.0 mM 8-Br-cGMP.

Statistical Analysis. All experiments were done in triplicate and at least three different times with different RNA samples as the source of RNA for the reverse transcription PCR. Results of biotin starvation on mRNA were normalized to β -actin mRNA and expressed as a percentage of mRNA levels observed in cells grown in biotin-replete medium. Data are presented as mean of three different experiments \pm SE.

Results

Effect of Biotin Starvation on mRNA Levels in HepG2 Cells. To establish a model for investigation of the effect of biotin on mRNA levels, we made use of the hepatoblastoma line, HepG2, which has been used in studies of the regulation of ASGR translation by biotin. In our studies, we first determined the time course of developing biotin deficiency on HCS, PCCA, ACC-1, and ACC-2 mRNA levels in HepG2 cells grown in a biotin-free medium for up to 15 days. Total RNA was isolated at various times, and the amount of mRNA was determined as described in *Materials and Methods* (see Fig. 1A for a representative experiment). Biotin starvation resulted in a gradual decrease in the

levels of HCS, PCCA, and ACC-1 mRNA to 17–28% of starting levels (Fig. 1B). ACC-1 and PCCA mRNAs were more rapidly affected, showing less than 40% of starting levels by 7 days, whereas 11 days of treatment were required to observe a similar reduction of HCS mRNA level (Fig. 1B). No change was observed in ACC-2 or β -actin mRNA levels during the course of the experiment. Biotin-starved cells showed normal morphology and growth rate throughout the experiment. However, longer incubation of cells in biotin-free medium resulted in an increase in cell death, and the effects on mRNA levels became irreversible (see below) after 20 days. For these reasons, experiments to determine the effect of biotin and second messengers on HCS and carboxylase mRNA levels were performed in cells grown for 14 or 15 days in biotin-free medium.

Effect of Biotin Supplementation on HCS and Carboxylase mRNA Levels. To determine whether the reduction observed in mRNA levels was specific to biotin starvation, we incubated HepG2 cells, previously made biotin-deficient for 14 days, in medium containing 1.0 μ M biotin for 2, 6, 12, or 24 h. Although short incubations with biotin produced significant increments of HCS mRNA levels (data not shown), it took up to 24 h to observe restoration of mRNA to levels comparable to those found in normal cells (Fig. 2A and B). Biotin supplementation had a more pronounced effect on ACC-1 and PCCA mRNAs compared with initial levels. In the case of ACC-1, biotin supplementation not only restored the mRNA level but showed a 40% increase above the results obtained with biotin-replete conditions. Similarly, PCCA mRNA rose to 30% over biotin-replete conditions. HCS was restored to initial levels only. In contrast, there was no significant change in ACC-2 or β -actin mRNA levels after biotin stimulation (Fig. 2A and B).

Effect of cGMP on mRNA Levels in Biotin-Starved Cells. To explore whether biotin-dependent recovery of mRNA levels involves a signal transduction pathway, we compared the effect of biotin and cGMP on recovery of HCS, ACC-1, and PCCA mRNA levels. Biotin-starved HepG2 cells were stimulated with 1.0 mM 8-Br-cGMP. This treatment resulted in the normalization of HCS mRNA to the initial biotin-replete level, comparable to that obtained by adding back biotin (Fig. 2A and B). Interestingly, PCCA and ACC-1 mRNA levels were restored to 35–38%

Table 1. Effect of inhibition of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and RNA polymerase II in mRNA levels

mRNA	Bio Def, %	Bio Def + Bio, %	ODQ + Bio, %	PKGi + Bio, %	Act D + Bio, %
HCS	36 ± 5.0	103 ± 9.87	11 ± 0.68	52 ± 2.51	25 ± 6.0
ACC-1	34 ± 1.15	140 ± 2.21	36 ± 5.0	26 ± 9.53	14 ± 7.24
PCCA	38 ± 3.54	130 ± 6.61	33 ± 3.60	21 ± 11.1	34 ± 5.03
ACC-2	88 ± 8.96	95 ± 2.31	ND	ND	19 ± 2.0

Biotin-starved HepG2 cells were stimulated with biotin in the presence of ODQ (ODQ + Bio), Rp-cGMPS (PKGi + Bio), or actinomycin-D. The results are shown as percentage of values obtained in cells grown in normal medium and compared to biotin-deficient cells (Bio Def) and biotin-deficient cells stimulated with biotin without inhibitors (Bio Def + Bio). ND, not determined. Results are from three different experiments shown as mean ± SE.

over initial levels (Fig. 2 *A* and *B*). Here too, the recovery mimicked the effect of biotin addition to the biotin-starved cells. Finally, treatment with 8-Br-cGMP had no effect on ACC-2 or actin mRNA levels (Fig. 2 *A* and *B*). Simultaneous addition of biotin and 8-Br-cGMP did not produce an additive or synergistic change in mRNA levels. Instead, they produced mRNA changes essentially identical to those obtained with either substance alone (data not shown).

sGC Mediates Biotin Effect on mRNA Levels. Given the apparent involvement of cGMP as a mediator of the biotin effect on HCS, ACC-1, and PCCA mRNA levels, we determined whether inhibition of sGC would affect their biotin-dependent recovery. Vitamin-starved HepG2 cells were stimulated for 24 h with biotin in the presence of ODQ as described in *Materials and Methods* (37), and the mRNA levels for HCS, ACC-1, and PCCA were compared with those obtained with biotin-starved cells and biotin-starved cells treated for 24 h with biotin. As shown in Table 1, biotin starvation (Bio Def) reduced the mRNA levels of HCS, ACC-1, and PCCA to 34–38% compared with control cells. Addition of biotin to the medium (Bio Def + Bio) again resulted in a recovery of the mRNA levels to within normal values for HCS and above normal values for ACC-1 and PCCA (Table 1). In contrast, incubation of HepG2 cells with biotin and ODQ (ODQ + Bio) prevented the biotin-dependent recovery of HCS, ACC-1, and PCCA mRNAs levels. The results obtained when sGC was inhibited were HCS 11%, ACC-1 36% and PCCA 33% (Table 1). This experiment points to sGC involvement in stimulating the restoration of mRNA levels by biotin or cGMP. The data also confirmed that ACC-2 mRNA seems to be unaffected in a significant way by biotin starvation or biotin supplementation.

The cGMP-Dependent Protein Kinase May Be Involved in Biotin-Dependent Recovery of mRNA Levels As the Target of sGC Activity. To assess whether the biotin effect occurs through a PKG (29), we incubated biotin-starved HepG2 cells in a medium containing the PKG inhibitor, Rp-cGMPS (PKGi). Because biotin and cGMP affected only HCS, ACC-1, and PCCA mRNA levels, ACC-2 was not included in these experiments. Although stimulation of HepG2 cells with 1 μM biotin was sufficient to restore mRNA levels to normal or greater than normal values, incubation of the cells in the presence of biotin and the inhibitor (Rp-cGMPS + Bio) severely limited the recovery of mRNA levels, with a small increases for HCS or small decreases for the other mRNAs (Table 1).

Actinomycin-D Prevents Biotin-Dependent Recovery of mRNA Levels. Recovery of HCS, ACC-1, and PCCA mRNA levels in response to biotin was studied in the presence of actinomycin D. Biotin-starved HepG2 cells were incubated for 1 h in the presence of actinomycin D. Then biotin (1.0 μM) was added to half the samples, with the remaining samples serving as actinomycin D

controls, and incubation continued for 24 h (Table 1). These data showed that mRNA levels for HCS, ACC-1, ACC-2, and PCCA fell to below the levels obtained in biotin-free medium in the samples containing actinomycin-D. Their levels likely reflect incomplete decay of remaining mRNA after the addition of inhibitor. The addition of biotin produced no effect on mRNA levels, with the results essentially identical to the actinomycin-D-only controls (Table 1).

Holocarboxylase Synthetase Activity Is Required for Biotin-Dependent Recovery of HCS mRNA Levels. Because biotin is the substrate of HCS, we studied whether this enzyme is involved in the biotin-dependent recovery of mRNA levels. The effect of biotin concentration on HCS, ACC-1, and PCCA mRNA levels was determined in normal fibroblasts versus fibroblasts with mutations in HCS that affect the affinity of the enzyme for biotin. Because the results for the three mRNAs were similar, we decided to focus on HCS mRNA. Two mutant cell lines were used, MCD-MK, homozygous for R508W, and MCD-VE with the mutations L216R and V363D (16). Preliminary experiments on the biotin effect on HCS mRNA levels in MK and VE cells show basically identical patterns of response to the vitamin (data not shown). For this reason and the fact that MCD-MK cells provided us with a homogeneous genetic background, we decided to use this cell line to examine the role of HCS in mRNA levels in response to biotin. Fig. 3 shows the effect of different concentrations of biotin on the recovery of HCS mRNA levels after biotin starvation of control and mutant fibroblasts. Biotin starvation reduced the HCS mRNA level in both normal and MCD-MK cells to ≈35% of control values after 14 days of treatment. The addition of 0.01 μM biotin to the cultures increased the HCS mRNA level to 78% of the biotin-replete level in normal fibroblasts, whereas the MCD-MK cells did not show a significant change (38%). A further 10-fold increment in biotin concentration (0.1 μM) resulted in an increase in HCS mRNA levels to 87% in normal fibroblasts and 53% in MCD-MK cells. It was only when biotin was raised to 1.0 μM that similar HCS mRNA levels were observed in normal and MCD-MK cells (118% and 93%, respectively).

cGMP Effect on Recovery of HCS mRNA Levels Is Normal in MCD Cells. We further examined whether the cGMP-dependent recovery of HCS mRNA levels was also affected as a result of mutation in HCS. Different concentrations of 8-Br-cGMP (0.01 mM, 0.1 mM, and 1.0 mM) were used to stimulate normal and mutant fibroblasts (MCD-MK). Both cell lines showed no change in HCS mRNA levels when incubated with 0.01 mM and 0.1 mM 8-Br-cGMP (data not shown). The highest concentration of 8-Br-cGMP, 1.0 mM, produced a recovery of HCS mRNA to 117% of biotin-replete levels in normal cells versus 92% in MCD-MK cells (Table 2).

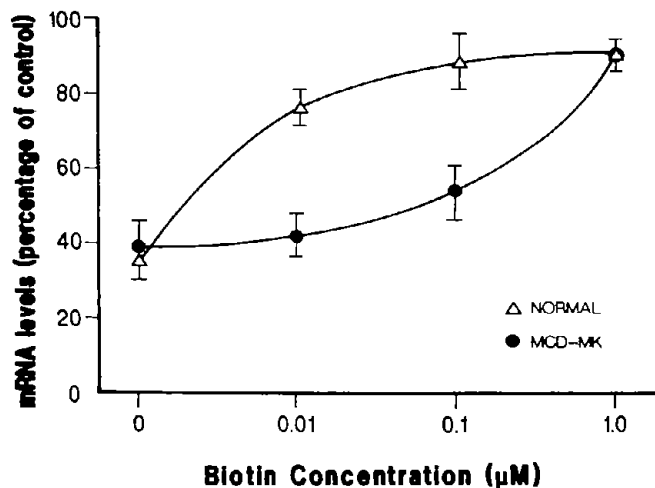


Fig. 3. Effect of biotin concentration on HCS mRNA levels in normal and MCD fibroblasts. Normal and MCD cells were grown in biotin free medium for 14 days. After this period, the cells were stimulated with 0.01 μ M, 0.1 μ M, and 1.0 μ M biotin for 24 h. HCS mRNA levels were determined as described in *Materials and Methods*. Results are presented as percentage of mRNA values observed in cells grown in biotin-containing medium and normalized to β -actin mRNA levels. Data are from three different experiments and shown as mean \pm SE.

Discussion

Numerous studies have demonstrated that biotin, in addition to its role as the cofactor of biotin-dependent carboxylases, also acts to influence gene expression at the transcriptional and translational level. Most of these findings have been made for rat liver proteins, including roles for biotin in the transcriptional regulation and translational stimulation of ASGR and insulin receptor. Recent studies also showed that biotin up-regulates HCS mRNA levels and maintains the level of at least two carboxylases in rat liver. In this study, we have examined a role for HCS in biotin-mediated gene regulation and showed that action of this enzyme, which functions in the activation of biotin to B-AMP and biotin transfer to apocarboxylases, is an intermediate in the biotin stimulation of HCS and carboxylase mRNA levels in cultured human fibroblasts. We show further, in human fibroblasts and HepG2 cells, that biotin stimulation of mRNA levels requires cGMP and the participation of sGC, and that the cGMP effect may be mediated through PKG.

The impact of biotin withdrawal from HepG2 cells was a gradual reduction of the mRNA levels of HCS, ACC-1, and PCCA to about one-third of starting levels, whereas ACC-2 mRNA was unaffected. This reduction took as long as 2 weeks, which likely reflected a slow clearing and catabolism of biotin. The re-addition of biotin produced a dramatic recovery of mRNA levels within 24 h, which for ACC-1 and PCC, exceeded starting levels. We did not distinguish formally between an effect of biotin on transcription rate or RNA processing or stability. Significantly, incubation of biotin-starved HepG2 cells in the

presence of actinomycin-D for 24 h reduced mRNA levels to below biotin-starvation levels, and biotin did not protect against this reduction. If the role of biotin, or a downstream product, were to protect mRNA from decay, then the addition of biotin to the actinomycin-D experiment should have slowed the rate of loss. ACC-2 mRNA, which remained essentially unchanged during biotin-starvation, also fell to a low level after actinomycin-D addition, which would be expected if transcription were successfully blocked. We surmise, therefore, that the mRNA levels remaining after 24 h of actinomycin-D exposure reflected their decay rates, including ACC-2, and these were unaffected by biotin addition. These results suggest that the effect of biotin is to stimulate transcription, although confirmation will require direct examination of transcription rates.

The mechanism of biotin regulation of mRNA levels remains unknown, although our experiments point to a cGMP-PKG pathway. First, cGMP could mimic precisely the biotin effect on mRNA levels. Second, use of ODQ, an inhibitor of sGC, blocked the biotin effect. Third, Rp-cGMPs, an inhibitor of PKG, permitted only minimal recovery of HCS and carboxylase mRNA levels. These findings are similar to those made by Stockert and colleagues (29) in their investigation of biotin regulation of ASGR expression. Our experiments were modeled on those of Stockert, and the involvement of sGC and PKG was also demonstrated in his study. Interestingly, however, those studies support a role for biotin in controlling the rate of translation of ASGR rather than transcription, as suggested here. It is possible that multiple mechanisms are involved, but it would be prudent to look for a unifying mechanism for the action of biotin on gene expression.

Key to our studies was the use of MCD cells to distinguish between a direct effect of biotin and one in which biotin had to be metabolized to produce an effect on transcription. MCD-MK cells are homozygous for the mutation R508W, which is a strikingly biotin-responsive mutation *in vitro* (16) and is a frequent mutation detected in patients with biotin-responsive MCD (16, 31, 32). Incubation of biotin-starved normal and mutant cells with biotin showed that 10- to 100-fold higher biotin concentration was required by the mutant cells to restore HCS mRNA to similar levels. By comparing the capacity of biotin versus 8-Br-cGMP to stimulate HCS mRNA levels in these cell lines, we demonstrated both the essential contribution of HCS and the downstream role of cGMP in these cells, which was unaffected by the presence of mutant HCS. The immediate product of HCS interaction with biotin is the generation of B-AMP. It, in turn, is the substrate for biotin transfer to apocarboxylases, completed as the second half reaction of HCS. We suggest that B-AMP is a good candidate for a biotin-based regulatory molecule.

Our studies also raise the possibility that HCS itself may participate as a regulatory molecule. There is precedent for this hypothesis in the behavior of its bacterial counterpart, BirA, which, in addition to its biotin ligase role, is also the repressor of the biotin operon in *Escherichia coli*. Mechanistically, the complex, BirA-B-AMP, acts as a direct transcriptional repressor of the genes of the biotin operon (6). Its DNA-binding domain is in the N-terminal half of the protein. It is attractive to consider an analogous complex in eukaryotes between HCS and B-AMP that might have a regulatory function. For example, it has been shown that the biotin ligase function of HCS resides in the C-terminal half of the protein (38). Although the N-terminal half does not contain a recognizable DNA-binding domain, as found for BirA, it may contain sequences that are involved, perhaps as an HCS-B-AMP complex, in the activation of the sGC-cGMP-dependent protein kinase pathway. Additional studies will be required to resolve its role in the regulation of gene expression.

A significant issue in the reduction of HCS and carboxylase mRNA levels is the role of impaired carboxylases during biotin

Table 2. Effect of different concentrations of cGMP on HCS mRNA levels in normal and MCD cells

Fibroblasts	Bio Def, %	Bio Def + cGMP, %
Normal	34 \pm 7.6	117 \pm 1.5
MCD-MK	38 \pm 12.6	92 \pm 9.24

Biotin-starved MCD cells and normal fibroblasts were stimulated with 1.0 mM 8-Br-cGMP. Data are from three different experiments and are shown as mean \pm SE.

deficiency. It is possible that metabolites accumulating because of reduced activity of the carboxylases are responsible for depressing mRNA levels, which, with their disappearance after biotin replenishment, allows the mRNAs to return to starting levels. However, if this were true, deficiency of individual carboxylases, such as deficiency of PCC activity in propionic acidemia (33), would be expected to result in impairment of synthesis of other carboxylases or, in particular, of HCS, if mRNA and consequently protein levels were depressed. Also, patients would be expected to show accumulation not only of the defective enzyme substrate, but ultimately of other carboxylase substrates. To our knowledge, none of these outcomes has ever been described (11, 33).

A previous report showed that biotin deficiency in rat results in a reduction in HCS mRNA levels, but leaves PC and PCC mRNA unaffected (27). In this study we show that biotin deficiency in human HepG2 cells reduces HCS, PCC, and ACC-1 mRNA levels. The difference in the response in PCC mRNA levels to biotin in rat and human hepatocytes could be explained by technical and experimental model differences or the presence of a species-specific effect of biotin on carboxylase expression. However, our results seem to be confirmed by previous observations made in patients with colorectal cancer. Primary adenocarcinoma cells showed lower biotin concentration in com-

parison with normal mucosa cells and a reduction of transcript levels of the PCCA and PCCB genes (34).

In summary, we have proposed that biotin acts on mRNA levels through a signaling cascade that requires the action of HCS, sGC, and the cGMP-dependent protein kinase. A role for HCS in control of carboxylase gene expression has implications for the treatment of MCD. It is possible that the clinical and biochemical deficits in MCD patients reflect the combined effect of the low affinity of mutant HCS for biotin and the concomitant reduction in carboxylase and HCS mRNAs levels, in effect an exacerbation of the disease process. Conversely, our findings suggest that the dramatic response of patients to pharmacological doses of biotin represents the combined effect of overcoming the reduced affinity of the mutant enzyme as well as elevating enzyme levels through the mRNA increase.

We thank Drs. Roy A. Gravel and Monica Narang (University of Calgary) for invaluable discussion and for comments to the manuscript and Rafael Cervantes Roldán for technical assistance. These studies were supported by grants of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica from Universidad Nacional Autónoma de México. R.S.S.-V. and D.P.-A. are recipients of a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

- Wood, H. G. & Barden, R. E. (1977) *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 385–413.
- Eisenberg, M. A., Prakash, O. & Hsiung, S. C. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 15167–15173.
- Cronan, J. E., Jr. (1989) *Cell* **58**, 427–429.
- Sundaram, T. K., Cazzulo, J. J. & Kornberg, H. L. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **143**, 609–616.
- Cazzulo, J. J., Sundaram, T. K., Dilks, S. N. & Kornberg, H. L. (1971) *Biochem. J.* **122**, 653–661.
- Chapman-Smith, A., Cronan, J. E., Jr. & John, E. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 359–363.
- León-Del-Río, A. & Gravel, R. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 22964–22968.
- Cronan, J. E., Jr. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10327–10333.
- León-Del Río, A., Leclerc, D., Akerman, B., Wakamatsu, N. & Gravel, R. A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4626–4630.
- Suzuki, Y., Aoki, Y., Chiba, Y., Iwamatsu, A., Kishino, T., Niihara, N., Matsubara, Y. & Narisawa, K. (1994) *Nat. Genet.* **8**, 122–128.
- Wolf, B. (2001) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eds Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Sly, W. S., Valle, D. & Childs, B. (McGraw-Hill Professional, New York), Vol. 3, pp. 3935–3961.
- Bartlett, K., Ghneim, H. K., Stirk, J. H., Wastell, H. J., Sherratt, H. S. & Leonard, J. V. (1985) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **447**, 235–251.
- Sherwood, W. G., Saunders, M., Robinson, B. H., Brewster, T. & Gravel, R. A. (1982) *J. Pediatr.* **101**, 546–550.
- Sweetman, L., Nyhan, W. L., Sakati, N. A., Ohlsson, A., Mange, M. S., Boychuk, R. B. & Kaye, R. (1982) *J. Inher. Metab. Dis.* **5**, 49–53.
- Burri, B. J., Sweetman, L. & Nyhan, W. L. (1985) *Am. J. Hum. Genet.* **37**, 26–337.
- Dupuis, L., Campeau, E., Leclerc, D. & Gravel, R. A. (1999) *Mol. Genet. Metab.* **66**, 80–90.
- Sakamoto, O., Suzuki, Y., Li, X., Aoki, Y., Hiratsuka, M., Sourmala, T., Baumgartner, E. R., Gibson, K. M. & Narisawa, K. (1999) *Pediatr. Res.* **46**, 671–676.
- Morita, J., Thuy, L. P. & Sweetman, L. (1998) *Mol. Genet. Metab.* **64**, 250–255.
- Barker, D. F. & Campbell, A. M. (1981) *J. Mol. Biol.* **146**, 469–492.
- Buonocristiani, M. R., Howard, P. K. & Otsuka, A. J. (1986) *Gene* **44**, 255–261.
- Borboni, P., Magnatera, R., Rabini, R. A., Staffolani, R., Porzio, O., Sesti, G., Fusco, A., Mazzanti, L., Lauro, R. & Marlier, L. N. (1996) *Acta Diabetol.* **33**, 154–158.
- Chauhan, J. & Dakshinamurti, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10035–10038.
- Spence, J. T. & Koudelka, A. P. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 6393–6386.
- Deodhar, A. D. & Mistry, S. P. (1970) *Life Sci.* **9**, 581–588.
- Dakshinamurti, K., Tarrago-Litvak, L. & Hong, H. C. (1970) *Can. J. Biochem.* **48**, 493–500.
- Collins, J. C., Paietta, E., Green, R., Morell, A. G. & Stockert, R. J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 11280–11283.
- Rodriguez-Melendez, R., Cano, S., Mendez, S. T. & Velazquez, A. (2001) *J. Nutr.* **131**, 1909–1913.
- Bartlett, K. & Gompertz, D. (1976) *Lancet* **2**, 804.
- De La Vega, L. A. & Stockert, J. R. (2000) *Am. J. Physiol.* **279**, C2037–C2042.
- Pisarev, M. A. & de Pisarev, D. L. (1977) *Acta Endocrinol.* **84**, 297–302.
- Dupuis, L., León-Del-Río, A., Leclerc, D., Campeau, E., Sweetman, L., Saudubray, J. M., Herman, G., Gibson, K. M. & Gravel, R. A. (1996) *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1011–1016.
- Yang, X., Aoki, Y., Li, X., Sakamoto, O., Hiratsuka, M., Gibson, K. M., Kure, S., Narisawa, K., Matsubara, Y. & Suzuki, Y. (2000) *J. Hum. Genet.* **45**, 358–362.
- Wolf, B., Hsia, Y. E., Sweetman, L., Gravel, R. A., Harris, D. J. & Nyhan, W. L. (1981) *J. Pediatr.* **99**, 835–846.
- Cherbonnel-Lasserre, C. L., Linares-Cruz, G., Rigaut, J. P., Sabatier, L. & Dutrillaux, B. (1997) *Int. J. Cancer* **72**, 768–775.
- Ha, J., Lee, J. K., Kim, K. S., Witters, L. A. & Kim, K. H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11466–11470.
- Abu-Elheiga, L., Almaraz-Ortega, D. B., Baldini, A. & Wakil, S. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 10669–10677.
- Lee, Y. C., Martin, E. & Murad, F. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10763–10768.
- Campeau, E. & Gravel, R. A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 12310–12316.

Paradoxical Regulation of Biotin Utilization in Brain and Liver and Implications for Inherited Multiple Carboxylase Deficiency*

Received for publication, June 23, 2004, and in revised form, August 31, 2004
 Published, JBC Papers in Press, September 28, 2004, DOI 10.1074/jbc.M407056200

Diana Pacheco-Alvarez‡§¶||, R. Sergio Solórzano-Vargas‡§¶||, Roy A. Gravel§, Rafael Cervantes-Roldán‡, Antonio Velázquez¶, and Alfonso León-Del-Río‡**

From the ‡Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México, §Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada T2N 4N1, and ¶Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04530, México

AQ: A

Holocarboxylase synthetase (HCS) catalyzes the biotinylation of five carboxylases in human cells, and mutations of HCS cause multiple carboxylase deficiency (MCD). Although HCS also participates in the regulation of its own mRNA levels, the relevance of this mechanism to normal metabolism or to the MCD phenotype is not known. In this study, we show that mRNA levels of enzymes involved in biotin utilization, including HCS, are down-regulated during biotin deficiency in liver while remaining constitutively expressed in brain. We propose that this mechanism of regulation is aimed at sparing the essential function of biotin in the brain at the expense of organs such as liver and kidney during biotin deprivation. In MCD, it is possible that some of the manifestations of the disease may be associated with down-regulation of biotin utilization in liver because of the impaired activity of HCS, and that high dose biotin therapy may in part be important to overcoming the adverse regulatory impact in such organs.

AQ: B

The vitamin biotin functions as the cofactor in carboxylation reactions where it acts as the carboxyl carrier. In human cells, there are five biotin dependent carboxylases: pyruvate carboxylase (PC),¹ propionyl-CoA-carboxylase (PCC), methylcrotonyl-CoA carboxylase, and two forms of acetyl-CoA carboxylase (ACC-1 and ACC-2). Biotin-dependent carboxylases catalyze key reactions in gluconeogenesis, branched-chain amino acid catabolism, and fatty acid synthesis, roles that underscore its broad impact in human metabolism (1).

Fn1

* This work was supported by Grant 40001-Q from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Grant IN235202 from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica from Universidad Nacional Autónoma de México. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ These authors contributed equally to this study. Recipients of scholarships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México.

** To whom correspondence should be addressed: Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 04510, México. Tel.: 525-622-3891; Fax: 525-622-3855; E-mail: leon@biomedicas.unam.mx.

¹ The abbreviations used are: PC, pyruvate carboxylase; PCC, propionyl-CoA-carboxylase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; SMVT, sodium-dependent multivitamin transporter; HCS, holocarboxylase synthetase; MCD, multiple carboxylase deficiency; sGC, soluble guanylate cyclase; PKG, cGMP-dependent protein kinase; 8-Br-cGMP, 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate; rtPCR, reverse transcription-PCR.

During evolution, mammals lost the ability to synthesize biotin and now satisfy their need for the vitamin through a delicate balance between dietary biotin and reutilization of endogenous, protein-bound biotin (1, 2). To ensure a continuous supply of the vitamin, eukaryotic organisms have developed a biotin utilization cycle that depends on the participation of three different proteins. The first is a transporter for the uptake of biotin through the plasma membrane. Although different biotin transporters have been proposed in different species, only one has been confirmed by cDNA cloning (3, 4). The sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT) transports biotin, pantothenic acid, and lipoic acid and is characterized by a seemingly high K_m for biotin (5, 6). The second is holocarboxylase synthetase (HCS). It catalyzes the biotinylation of carboxylases in a two-step, ATP-dependent reaction in which biotin is first activated to biotinyl-5'-AMP and then transferred to the apocarboxylase substrate (7-9). The third enzyme of the biotin cycle is biotinidase. It is responsible for releasing biotin from protein-bound biotin by hydrolysis of biocytin (biotinyl-lysine) or short biotinylated peptides generated during digestion or turnover of endogenous carboxylases (10).

AQ: C

In humans, the balance between the utilization of exogenous and recycled biotin can be disrupted by genetic abnormalities with devastating consequences for metabolic homeostasis. Loss of HCS or biotinidase activity produces the neonatal or juvenile forms, respectively, of the disease multiple carboxylase deficiency (MCD) (1, 11, 12). Both forms of MCD are potentially fatal. However, all clinical and biochemical manifestations can be reversed with pharmacological doses of biotin (1).

Biotin has been implicated in a number of other cellular processes including DNA and RNA synthesis, nitric oxide-like activity on cGMP synthesis, cell growth, and histone biotinylation (13-19). The non-classical effect of biotin that has been best characterized is its role in gene expression. Several groups have shown that in laboratory animals and cell cultures, biotin is required for optimal expression and activity of glucokinase, phosphofructokinase, ornithine transcarbamylase, asialoglycoprotein receptor, PCC, ACC-1, and HCS (20-28).

AQ: D

We investigated the effect of biotin deficiency in human fibroblasts and HepG2 cells and observed a reduction in mRNA levels for HCS, PCC- α subunit, and ACC-1, which are all returned to normal levels after biotin supplementation (29). Biotin achieves this outcome by triggering a signaling cascade involving soluble guanylate cyclase (sGC) and cGMP-dependent protein kinase (PKG). Significantly, cells from patients with neonatal MCD required 100 times more biotin than control cells to restore HCS mRNA to a normal level following growth in biotin-depleted medium (29). These results suggested that the product of the HCS reaction, biotinyl-5'-AMP,

AQ: E

and not biotin *per se* is responsible for the effect of biotin on gene expression.

Although HCS-sGC-PKG-mediated signaling could explain the effect of biotin on gene expression, the physiological significance of this type of regulation and its relevance to the phenotype of MCD are unknown. The down-regulation of HCS and carboxylases during biotin depletion seems self-destructive given the essential function of biotin. Because the biotin cycle presents independent mechanisms for the utilization of exogenous biotin (uptake via SMVT) *versus* cellular biotin (recycling via biotinidase), we have examined the regulation of SMVT and biotinidase mRNA expression as a function of biotin access to determine whether the regulation is aimed at control of the biotin cycle. We have also assessed the regulation of PC given its prominence at the junction of gluconeogenesis, glycolysis, and the Krebs cycle. Significantly, we show that SMVT and PC mRNA expression, along with that of HCS, responds to biotin availability, whereas biotinidase does not. We demonstrate, in biotin-replete *versus* biotin-deficient rats, that whereas the HCS-sGC-PKG pathway down-regulates biotin utilization in liver and kidney, it does not in brain. Instead, we show that the biotin cycle in the brain is constitutively expressed or even enhanced in its capacity to scavenge biotin during biotin depletion. We put forward the hypothesis that the differential effect of biotin in liver and brain may be part of an altruistic mechanism for the repression of biotin utilization in liver so as to ensure the continued supply of biotin to the brain when dietary biotin becomes limiting or deficient.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Biotin and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate (8-Br-cGMP) were from Sigma-Aldrich. The human hepatoblastoma cell line, HepG2, was from the American Type Cell Collection, and the rat C6 glioma line was kindly provided by Dr. H. Pasantes, Universidad Nacional Autónoma de México. Normal human fibroblasts, fibroblasts from a patient with MCD (MCD-MK), and rabbit antibody to HCS (raised against an N-terminal peptide of human HCS, residues 58–78) have been described previously (19). Cell cultures were maintained in α -minimum Eagle's medium containing high glucose (biotin concentration 0.40 μ M, Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin (biotin-replete medium). Biotin-deficient medium was prepared using biotin-free minimum Eagle's medium, dialyzed fetal bovine serum (Invitrogen), and the same antibiotic concentration. Male Wistar rats were provided by Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Biotin-replete and biotin-deficient diets for laboratory animals were purchased from ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland, OH.

Cell Culture Experiments—The methods for biotin starvation of cell cultures are essentially as described previously (29). Briefly, cells were grown in biotin-replete or biotin-deficient medium at 37 °C with 5% CO₂ for up to 15 days. The medium was changed at 3-day intervals. For biotin-based recovery of cells grown in biotin-deficient medium, biotin, at concentrations from 0.001 to 1 μ M, or 1 mM 8-Br-cGMP, a non-hydrolyzable form of cGMP, was added at day 14, and the cells were maintained in the biotin- or cGMP-supplemented medium for 24 h.

Reverse Transcription-PCR and Western Blot—Procedures for RNA isolation, cDNA synthesis and PCR (rtPCR) were as described previously, except that 4 μ g of RNA and 0.5 μ mol of the gene-specific oligonucleotide primers were used for cDNA synthesis and 0.3 μ mol of specific sense and antisense primers were used to give PCR products 330–900 bp in length (29). The oligonucleotides used to amplify human mRNA were as follows: HCS, 5'-TGA GGT CCA TTC CCG AGT AT-3' (T_m 60 °C) and 5'-AAC CTG GAG GAA GCC AGA AT-3' (T_m 60 °C); SMVT, 5'-TGT GCT CTC CTG TTA TGC AG-3' (T_m 60 °C) and 5'-ACA TGG AAA GAA CAT TCC AA-3' (T_m 54 °C); actin 5', -ATG TGC AAG GCC GGC TTC GC-3' (T_m 66 °C) and 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' (T_m 60 °C); biotinidase, 5'-ATC TAT GAA CAG CAA GTG ATG ACT-3' (T_m 66 °C) and 5'-AGG GAC CAG GGT GAA ATT GTC ATA-3' (T_m 70 °C); PC, 5'-CGA CTC TGT GAA ACT CGC TAA ACA-3' (T_m 70 °C) and 5'-TGG TCT TTG CCG TGG GCA A-3' (T_m 60 °C). The oligonucleotides used to amplify rat mRNA levels were as follows: actin, 5'-ATC GTG AGG AAC ACT CAG AA-3' (T_m 58 °C) and 5'-CGC CAA

GCC GAA TGG CAA AA-3' (T_m 62 °C); biotinidase, 5'-TGT GCA AGA TTA TAG T GT T CC CA-3' (T_m 62 °C) and 5'-AAC ACG CCA AAC TTG CCA GC-3' (T_m 62 °C); SMVT, 5'-AAT TCA CTG GCC ACT GTC AC-3' (T_m 60 °C) and 5'-AGT GAG CAG ACT GAC AAT CAG-3' (T_m 62 °C); PC, 5'-TTG ACG TGG CCA TGC GCT TCT T-3' (T_m 68 °C) and 5'-TAG TAC TCC AGT GAG TAT TTA G-3' (T_m 60 °C). PCR products were evaluated following electrophoresis on agarose gels and were quantified by densitometry using a molecular imager FX (Bio-Rad) and normalized to β -actin mRNA as described previously (29). The β -actin mRNA was present at equivalent levels in all RNA samples (see Figs. 1, 3, and 4).

For Western blot analysis, crude extracts from human cells or rat tissues were prepared in radioimmune precipitation assay buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing 5 μ l of protease inhibitor mixture (Roche Applied Science) and 0.5 μ l of 200 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Invitrogen). 20–30 μ g of total protein were fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). The membranes were incubated in a 1:2000 solution of rabbit HCS antibody. Visualization of HCS bands was performed using a BM chemiluminescence Western blotting kit (Roche Applied Science) following the manufacturer's protocol.

Animal Model for Biotin Deficiency—Male Wistar rats, age 21–28 days, were placed in air filtered cages and fed a biotin-free diet *ad libitum*. The animals were sacrificed after 8–10 weeks when liver carboxylase activities were less than 30% of those of control animals fed a normal diet (28, 30). The selected organs were rapidly removed, rinsed in phosphate-buffered saline, and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated from brain, liver, and kidney from normal and biotin-deficient rats, and mRNA levels were determined as described above.

Biotin Content in Carboxylases from Normal and Biotin-deficient Rats—Liver and brain from rats fed on normal and biotin-deficient diets as described above were harvested and washed on cold phosphate-buffered saline buffer. A sample of tissue (1 g) was homogenized in a buffer containing 10 mM EDTA, 600 mM Tris-HCl and 1 M KCl, pH 7.5. The homogenates were centrifuged at 7,500 $\times g$ for 20 min. The supernatant was then centrifuged again at 150,000 $\times g$ for 30 min, and the protein concentration in the supernatant was determined using the Bio-Rad protein assay. The samples (70 μ g) were fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (8%) and transferred to a nitrocellulose membrane. Visualization of biotin containing proteins was conducted by incubating the membranes in a 1:2000 solution of streptavidin-AP conjugate following the manufacturer's recommendations (Roche Applied Science). Biotin containing bands were quantitated using an imager FX (Bio-Rad) as described above.

Statistical Analysis—All experiments were done in triplicate and at least three different times using different RNA samples as the source of RNA for the rtPCR. Results of biotin starvation on mRNA were normalized to β -actin mRNA and expressed as a percentage of mRNA levels observed in cells or rats grown in biotin-replete medium. Data are presented as the mean of three different experiments \pm S.E.

RESULTS

Biotin Availability Regulates mRNA Levels of the Biotin Utilization Cycle Proteins in HepG2 Cells—To determine whether key components of the biotin cycle are under the control of the exogenous biotin concentration, we examined mRNA levels of SMVT and biotinidase, two proteins that control entry of biotin into the cycle. We also assessed PC mRNA because of its central role in metabolism and compared all three with HCS, which we showed previously to be regulated by biotin availability (29). Human HepG2 cells were plated in triplicate in three experimental groups: cells incubated in biotin-replete medium as control, cells incubated in biotin-deficient medium for 15 days, and cells incubated in a biotin-deficient medium for 15 days, which was followed by the addition of 1 μ M biotin for 24 h (biotin-recovery medium). After the treatments, total RNA was isolated, and mRNA levels were determined by rtPCR (Fig. 1A). Biotin starvation produced a significant decrease in the mRNA levels for SMVT ($-71\% \pm 2$), HCS ($-64\% \pm 5$), and PC ($-68\% \pm 3$) compared with cells in biotin-replete medium. However, there was little change in the mRNA for biotinidase ($-16\% \pm 2$) or actin, used as the control (Fig. 1B). The reduction in mRNA levels proved to be specific for biotin deficiency because the addition of the vitamin to 15-day biotin-starved cultures re-

AQ: I

AQ: J

F1

Altruistic Mechanism for Biotin Utilization in Brain

3

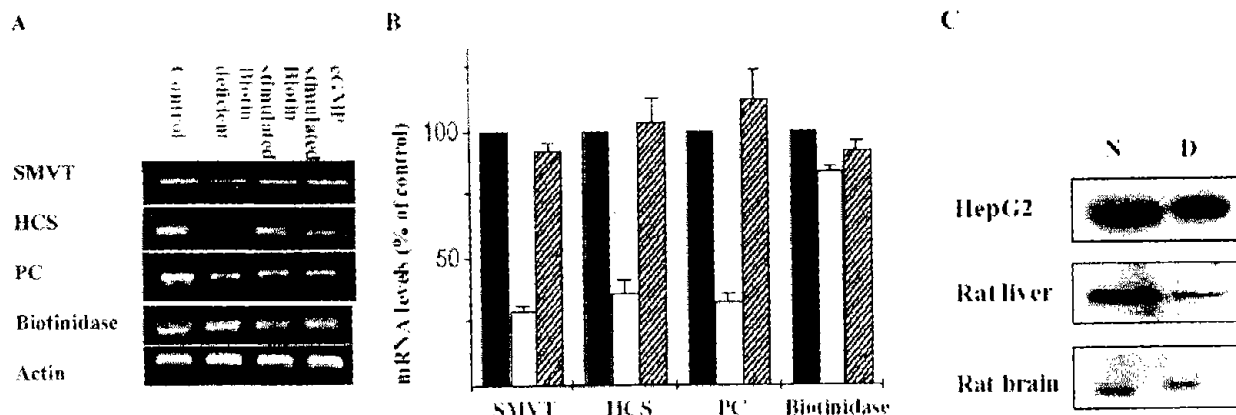


FIG. 1. Effect of biotin on mRNA and protein levels. HepG2 cells cultivated for 14 days in a biotin-free medium were stimulated with $1 \mu\text{M}$ biotin and the mRNA levels of SMVT, HCS, PC, biotinidase, and actin were determined as described under "Experimental Procedures." A, representative experiment showing mRNA levels in normal cells, biotin-deficient cells, biotin-starved cells stimulated with biotin, and biotin-starved cells stimulated with 8-Br-cGMP. B, summary of the results obtained from three different experiments. Closed bars, normal cells; open bars, biotin-deficient cells; hatched bars, biotin-starved cells stimulated with biotin. Results are expressed as percentage of mRNA levels of normal cells and shown as mean \pm S.E. C, effect of biotin on HCS protein in normal (N) and biotin-deficient (D) HepG2 cells, rat liver, and brain.

stored the mRNA for SMVT, HCS, and PC to normal levels (Fig. 1B). Biotinidase mRNA remained essentially unchanged in cells incubated in biotin-deficient or recovery medium relative to the control medium.

We confirmed that the reduction in mRNA was reflected in the level of protein, using HCS for the analysis (Fig. 1C). A Western blot of HCS from the HepG2 treatment cultures showed that the amount of HCS protein was reduced by one-third for cells grown in biotin-deficient medium compared with the level obtained for cells in biotin-replete medium. As observed for the mRNA, the addition of biotin to the deficient cultures resulted in normalization of the protein to the level obtained for control cells (data not shown).

We showed previously that the biotin effects on HCS and PCC- α subunit mRNA are mediated by sGC and cGMP (29). To determine whether the expression of SMVT, PC, and biotinidase are under similar control, we examined the effect of stimulating biotin-starved cells with 8-Br-cGMP in place of biotin. The addition of 1 mM 8-Br-cGMP for 24 h increased the mRNA of SMVT and PC (as well as HCS) to starting levels, mimicking the response to biotin (Fig. 1A and Table I). In contrast, biotinidase mRNA, which was essentially unchanged in biotin-depleted medium (to $84\% \pm 2$ of biotin-replete level), showed little change (to $91\% \pm 4$ and $112\% \pm 10$ of normal levels) on the addition of biotin or 8-Br-cGMP, respectively. These results show that biotin and the cGMP analogue have similar effects on mRNA levels in cells that had been previously depleted of biotin.

Biotin Cycle mRNA Levels in MCD Cells—We had shown that fibroblasts from a patient with neonatal MCD require much higher levels of biotin to elicit a change in its HCS mRNA following incubation in biotin-deficient medium (29). In this experiment, we determined whether there is also an effect on SMVT and biotinidase mRNA, and consequently whether HCS is also implicated in their regulation. For MCD cells, we made use of the HCS-deficient MCD-MK cell line, which is homozygous for R508W, a mutation that gives its HCS an elevated K_m for biotin (12, 29, 31). Normal and MCD-MK cells were incubated in biotin-deficient medium and compared for their ability to stimulate an increase in mRNA levels for SMVT, HCS, and biotinidase in response to the addition of different concentrations of biotin. When control and MCD-MK fibroblasts were grown in biotin-free medium, SMVT mRNA was decreased in each cell line as expected ($12\% \pm 2$ of pretreatment levels), and

TABLE I
Effect of biotin and 8-Br-cGMP on mRNA levels in HepG2 cells

mRNA	Biotin deficient		cGMP stimulated
	%	%	%
SMVT	29 ± 2	92 ± 3	101 ± 7
HCS	36 ± 5	103 ± 10	98 ± 8
PC	32 ± 3	112 ± 11	106 ± 4
Biotinidase	84 ± 2	91 ± 4	112 ± 10
Actin	107 ± 3	94 ± 10	109 ± 4

a similar reduction was obtained for HCS mRNA (to $29\% \pm 4$) (Fig. 2A and B). In contrast, the two cell lines differed markedly in their response to the re-addition of biotin. In normal cells, biotin addition for 24 h resulted in a stimulation in the level of both mRNA species. For SMVT mRNA, the maximum recovery to the level observed in biotin-replete cells was observed at the lowest biotin concentration used, $0.001 \mu\text{M}$, with higher concentrations giving marginally lower recoveries. Although biotinidase mRNA was not reduced by biotin deficiency, the addition of increasing biotin to the culture medium produced a tendency toward a reduction in biotinidase mRNA levels from 100% at $0.001 \mu\text{M}$ biotin to $78\% \pm 2$ at $0.1 \mu\text{M}$ biotin (Fig. 2A). In keeping with our previous study (29), HCS mRNA also showed recovery to starting levels, but it increased more slowly with increasing biotin concentration so that full recovery was obtained at only the highest concentration of biotin ($1 \mu\text{M}$).

The MCD-MK cells behaved very differently (Fig. 2B). At $0.001 \mu\text{M}$ biotin, SMVT mRNA increased from the biotin-starved level of $12\% \pm 9$ of the biotin-replete level to $50\% \pm 5$ and showed little additional change ($63\% \pm 7$ at $1 \mu\text{M}$ biotin). Like normal cells, biotinidase mRNA was not reduced in biotin-depleted medium, although it did show a downward trend on the readdition of biotin at the higher biotin concentrations. As observed before (29), HCS mRNA increased only at the higher biotin concentrations, beginning at $0.1 \mu\text{M}$ biotin and reaching $79\% \pm 4$ of starting level at $1 \mu\text{M}$ biotin. These results show that, like HCS, SMVT requires at least 100 times more biotin than normal cells to achieve a similar increase in its mRNA level, whereas biotinidase mRNA is unaffected by the defective HCS.

The integrity of the downstream elements of the HCS-sGC-PKG transduction pathway in MCD cells on the mRNA response was tested by incubating the normal and MCD-MK cells in the presence of 8-Br-cGMP. Treatment of biotin-starved MCD cells with 1 mM 8-Br-cGMP resulted in increases of HCS

4

Altruistic Mechanism for Biotin Utilization in Brain

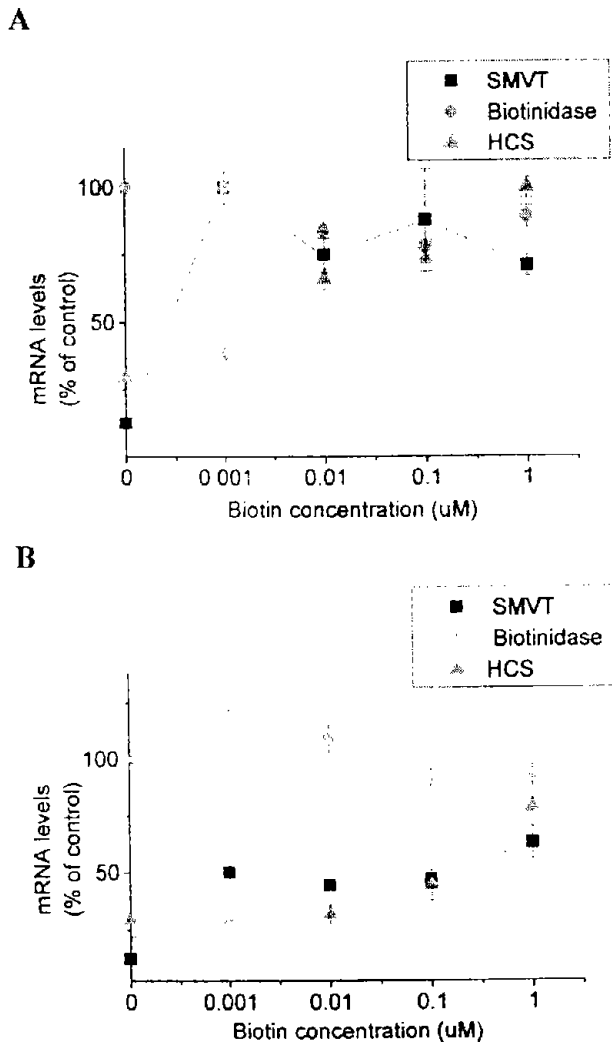


FIG. 2. Effect of biotin concentration on SMVT, HCS, and biotinidase mRNA levels in normal and MCD fibroblasts. Normal (A) and MCD cells (B) were grown in biotin-free medium for 14 days. After this period the cells were stimulated with 0.001, 0.01, 0.1, and 1.0 μ M biotin for 24 h. The mRNA levels of SMVT, HCS, and biotinidase were determined as described under "Experimental Procedures." Results are presented as percentage of mRNA values observed in cells grown in biotin-containing medium and normalized to β -actin mRNA levels. Data are from three different experiments and shown as mean \pm S.E.

and SMVT mRNA comparable with those obtained previously for normal cells (data not shown) (29). These results confirm that SMVT mRNA, like HCS mRNA, responds normally to the cGMP in MCD cells and that direct stimulation with the cGMP analogue bypasses the HCS defect.

Biotin Cycle mRNA Levels in Rat Tissues—The above results suggest that low nutrient biotin or mutations in MCD result in a diminished capacity of cells to restore mRNA levels of proteins involved in the utilization of exogenous biotin while leaving unaffected the enzyme required for recycling endogenous vitamin. This mechanism of mRNA regulation seems to work against maintaining metabolic homeostasis because a reduction in the expression of SMVT and HCS mRNA would be expected to diminish the capacity to scavenge biotin in a low biotin nutrient source. To assess the physiological role of such a seemingly self-destructive process, we made use of a rat model of biotin deficiency and examined the impact of biotin

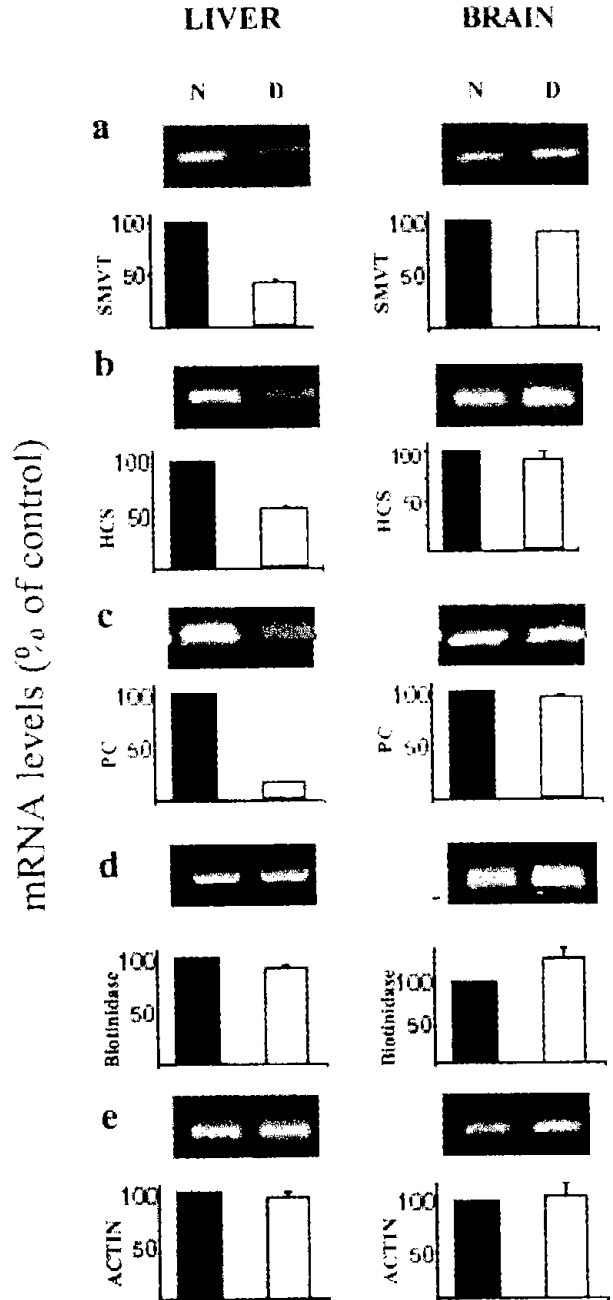


FIG. 3. Differential effects of biotin deficiency in rat tissues. Adult male Wistar rats were fed with normal (N) or biotin-deficient (D) diets for 8 weeks. SMVT, HCS, PC, biotinidase, and actin mRNA levels from liver and brain were determined as described under "Experimental Procedures" and expressed as percentage of the observed values in normal tissues and normalized to β -actin mRNA levels. Blots show representative rtPCR products from each experiment. Data are from three different experiments and shown as mean \pm S.E.

starvation in different tissues. Male Wistar rats were fed a biotin-free diet, and after 8 weeks they presented with a characteristic biotin deficiency phenotype and a dramatic decrease in biotin-dependent PC and PCC activities (30). The mRNA levels of SMVT, HCS, PC, and biotinidase were determined in different organs by densitometric analysis of rtPCR products. For clarity, only the results obtained in brain and liver are presented (Fig. 3) because preliminary data for kidney gave

AQ: W

F3

Altruistic Mechanism for Biotin Utilization in Brain

5

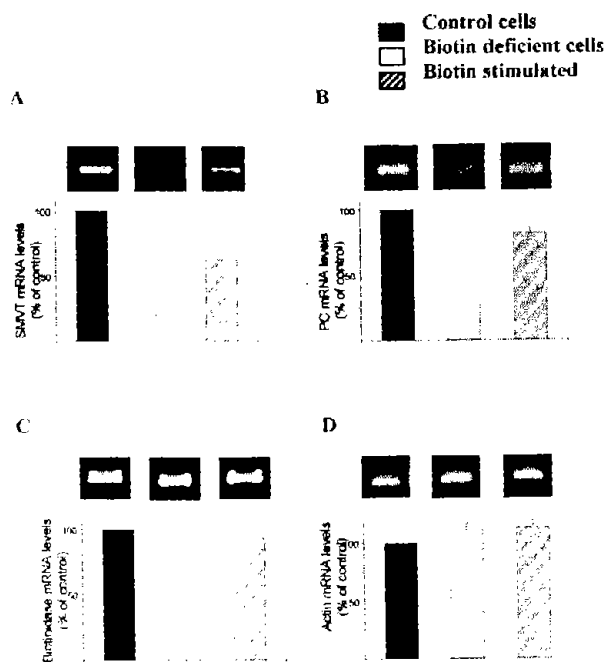


FIG. 4. Effect of biotin deficiency on mRNA levels in rat glioma cells. C6 cells incubated for 14 days in biotin-deficient medium were stimulated with $1 \mu\text{M}$ biotin. mRNA levels were determined as described under "Experimental Procedures" and expressed as percentage of normal values. *Closed bars*, cells grown in normal medium; *open bars*, biotin-deficient cells; *hatched bars*, biotin-deficient cells stimulated with biotin. Data are from three different experiments and shown as mean \pm S.E.

similar expression patterns as for liver.

Biotin deficiency produced a decrease in liver mRNA levels (SMVT, $42\% \pm 3$ of the biotin-replete level; HCS, $55\% \pm 3$; PC, $17\% \pm 2$) while showing little change in brain (SMVT, $90\% \pm 1$; HCS, $94\% \pm 7$; PC, $96\% \pm 3$) in biotin-deficient rats (Fig. 3, a-c). Biotinidase mRNA was unaffected in liver ($91\% \pm 2$ of biotin replete level), resembling the data obtained in human cell cultures. Yet, in the brain of deficient rats, we found a modest increase (to $129\% \pm 10$) over the value observed in normal animals (Fig. 3d). Biotin starvation had no effect on the mRNA levels of the reference gene actin (Fig. 3e) in either liver or brain. Western blot of liver and brain HCS showed that biotin starvation reduced the amount of HCS protein in the liver to half the level in control animals, but had no effect on the brain enzyme (Fig. 1C).

These results suggest that biotin regulates mRNA levels in liver and kidney (data not shown) but not brain. To determine whether this is a tissue-specific or cell-specific property, we determined whether the resistance of brain to the effect of biotin-starvation would extend to rat C6 glioma cells. Following incubation in biotin-free medium, mRNA levels were reduced significantly as observed for HepG2 cells, with SMVT at $20\% \pm 10$ of normal levels and PC at $33\% \pm 6$ (Fig. 4, A and B). Similarly, biotin starvation had no effect on biotinidase mRNA ($96\% \pm 4$; Fig. 4C). The addition of biotin to the deficient cultures raised the mRNA levels of SMVT and PC to $63\% \pm 2$ and $82\% \pm 4$, respectively (Fig. 4, A and B) while having no effect on biotinidase mRNA (Fig. 4C). These results indicate that rat C6 glioma cells behave like HepG2 cells rather than the brain of biotin-starved rats.

Biotin Content in Brain Carboxylases Is Selectively Maintained in Biotin-deficient Rats—These results suggest that the down-regulation of the biotin cycle in liver and constitutive expression in brain during periods of biotin deprivation are

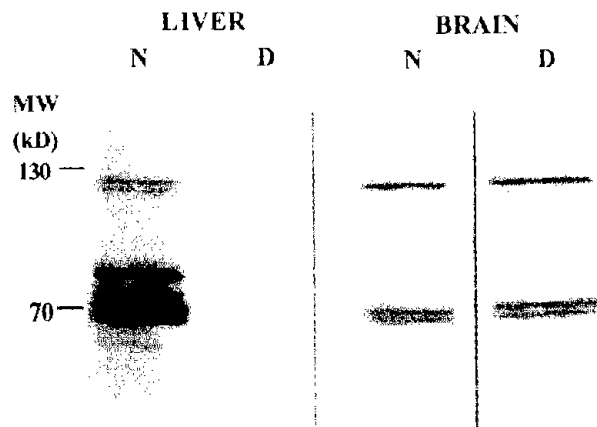


FIG. 5. Biotin content in liver and brain carboxylases. Proteins from liver and brain extracts of normal and biotin-deficient rats were fractionated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The biotinylation of carboxylases was visualized by incubating the membranes with streptavidin-AP, and individual bands were identified based on the reported molecular masses for PC (128 kDa), PCC (74 kDa), and MCC (72 kDa). Biotinylation content of carboxylases was determined by densitometry as described under "Experimental Procedures."

aimed at maximizing the assimilation of biotin into carboxylases in brain. In other tissues, through reduction in carboxylase protein and reduced biotin transfer (HCS deficiency), there should be very little protein-bound biotin. To assess the level of protein-bound biotin, we used streptavidin to probe Western blots of extracts of liver and brain of normal and biotin-deficient rats. The results show that in biotin-deficient rats, the biotinylated forms of hepatic PC (128 kDa), PCC (74 kDa), and MCC (72 kDa) were reduced by 90% compared with control animals (Fig. 5). In contrast in brain, there was no difference in the level of biotinylated carboxylases PC and MCC in normal versus biotin-deficient animals. As reported previously (32), PCC is much less abundant than MCC in liver and brain and under the present experimental conditions was not detectable in the brain from normal and biotin-deficient rats.

DISCUSSION

We have investigated the regulation of the biotin cycle in cultured cells and rat liver under conditions of biotin starvation and replenishment. We have shown that SMVT and HCS, proteins critical to the utilization of exogenous or dietary biotin, respond to biotin deprivation by reduction in the steady state level of their mRNAs. In contrast, biotin re-utilization via biotinidase is unaffected by biotin status. Importantly, the biotin cycle appears to be constitutively expressed in brain with biotinidase mRNA modestly elevated in limiting biotin. We hypothesize that under conditions of reduced or limited access to biotin, expression of mRNAs associated with biotin utilization in liver (but also kidney) become repressed while remaining constitutively expressed in brain. We propose that this mechanism of regulation is aimed at sparing the essential function of biotin in brain at the expense of liver during biotin deprivation.

In this model, we suggest that the reduction in biotin utilization in liver during periods of reduced dietary availability maximizes access of the brain to circulating free biotin both dietary and endogenously generated. The free biotin is directed to brain because the reduction in SMVT, HCS, and carboxylase mRNAs in liver reduces their capacity to utilize biotin while leaving free biotin in circulation. Our finding that biotinidase mRNA is constitutively expressed in cells and peripheral tissues complements the findings of Baumgartner and co-workers

AQ: K

F4

AQ: X
AQ: Y

F5

AQ: L

AQ: M
AQ: N

(33) who showed that biotin deficiency does not affect the enzymatic activity of biotinidase in cell cultures. We suggest therefore that the release of protein-bound biotin continues in biotin-depleted liver, but some of this biotin is also directed to the circulation because of the reduction in utilization. Significantly, the brain is an organ in which a high affinity biotin transporter has been documented (34). Therefore one can picture the flow of dietary and released endogenous biotin from liver to the circulation and transport to the brain where constitutive uptake and utilization via HCS, as well as increased endogenous re-utilization via elevated biotinidase, assure maintenance of functional carboxylase activities in periods of biotin deprivation.

The sequestering of biotin to the brain was confirmed by the examination of the level of biotinylated carboxylases in the liver and brain of normal and biotin-deficient rats. Despite severe biotin deficiency, the level of biotinylated carboxylases in brain was similar to that of control animals, whereas liver was grossly deficient in carboxylase-biotin content. Previous studies had also shown that brain biotin content as well as the activity of biotin-dependent carboxylases are relatively preserved in the face of biotin starvation and systemic biotin deficiency in rats (35–39). The reduction in protein-bound biotin in liver was likely caused by a combination of a decrease in carboxylase levels because of reduced synthesis and impairment in biotin transfer because of reduced synthesis of HCS. The latter is in keeping with the previous detection of accumulated unbiotinylated carboxylases (apocarboxylases) in the liver of biotin-deficient rats (40, 41). Thus, through the expedient of repression of mRNA synthesis, the reduction in biotinylated carboxylases in liver could be doubly assured through down-regulation in the synthesis of both apocarboxylases and HCS.

Mechanistically, the regulation of the biotin cycle appears to occur through an HCS-sGC-PKG pathway. We showed previously that the repression of HCS, ACC-1, and PCC- α subunit mRNA in limiting biotin can be reversed with cGMP (as 8-Br-cGMP) and that reactivation can be blocked with inhibitors of sGC or PKG (29). We have extended these findings to PC and SMVT mRNAs, which also respond to cGMP, and to biotinidase mRNA, which does not. Indeed, the constitutive expression of biotinidase may explain the extended period (in cell cultures or rats) required to produce biotin deficiency. It probably reflects the time required for depletion of endogenous biotin, which through biotinidase continues to be released throughout the biotin depletion period. In principle, biotinidase may contribute to cell survival by becoming the primary source of free biotin in liver to fuel metabolism through the activation of carboxylases. It is possible that the 30% baseline level of HCS, SMVT, and carboxylases mRNAs remaining in biotin-depleted cells is not meant to represent a shutdown of biotin utilization but to limit it to subsistence level of activity.

Our results for HCS are similar to those of Rodriguez-Meléndez *et al.* (30), who showed that HCS mRNA was reduced in liver of biotin deficient rats but with minimal reduction in brain. Unlike us, they did not observe a reduction of PC mRNA, but this may have reflected a difference in detection method used because PC as well as PCC activity and protein mass were reduced in their study.

Our studies suggests that the biotin sparing to the brain is organ-specific rather than cell-type defined because when brain-derived cells, represented by the rat C6 glioma cells, were cultured in a biotin-free medium, the mRNA levels of SMVT and PC were reduced in a similar fashion as those of HepG2 cells and fibroblasts. This model is supported by previous studies that have also shown a strong reduction of carboxylase activities in neurons, oligodendroglia, and keratinocytes grown in biotin-deficient medium (33).

This hypothesis for sparing the brain at the expense of liver underscores the importance of functional carboxylase to brain metabolism (35). In this organ, the activity of biotin-dependent PC is important for the regeneration of α -ketoglutarate because of the release of glutamate and γ -aminobutyric acid from neurons and glutamine export from glia (36, 37). Recently, it was shown that the rate of neuronal and glial pyruvic carboxylation could operate at as much as 30% and 40–60% of the Krebs cycle turnover rate, respectively (37). This may provide a rational for an organism to temporarily sacrifice the biotin requirement of other organs to assure the maintenance of efficient brain development and function.

Differential depletion of nutrients in liver *versus* brain is not unique to biotin. For many years it has been known that the pattern of traffic of glucose from one tissue to another is distinct in the well fed *versus* starvation states in mammals. During starvation, most tissues (but not the brain) limit glucose consumption by internalizing GLUT4 transporters in response to a reduction in the insulin/glucagon ratio. Glucose influx into neurons is not dependent on insulin, which assures the presence of this metabolite in the brain independently of the nutritional state of the organism. The rationale behind the tissue-specific regulation of glucose utilization is that the brain depends almost entirely on it as an energy source. Thus a continuous supply of glucose to the brain is achieved by reducing its utilization by muscle tissue and maintaining the insulin-independent influx of glucose in neurons (42, 43). The apparent importance of biotin-dependent carboxylases in brain metabolism suggests similarities between glucose and biotin sparing during nutritional deprivation.

Acknowledgments—We thank Viviana Valadez Graham and Alfonso González Noriega for comments on this work and Colette Michalack and Nayeli Rodríguez Fuentes for technical assistance.

REFERENCES

- Wolf, B. (2001) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver C., B. A., William S., Valle D., eds) Vol. 3, pp. 3935–3962, McGraw-Hill Professional, New York
- Pacheco-Alvarez, D., Solórzano-Vargas, R. S., and León Del Río, A. (2002) *Arch. Med. Res.* **33**, 439–447
- Prasad, P. D., Wang, H., Kekuda, R., Fujita, T., Fei, Y., Devoe, L. D., Leibach, F. H., and Ganapathy, V. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 7501–7506
- Wang, H., Huang, W., Fei, Y. J., Xia, H., Yang-Feng, T. L., Leibach, F. H., Devoe, L. D., Ganapathy, V., and Prasad, P. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 14875–14883
- Prasad, P. D., Wang, H., Huang, W., Fei, Y. J., Leibach, F. H., Devoe, L. D., and Ganapathy, V. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **366**, 95–106
- Balamurugan, K., Ortiz, A., and Said, H. M. (2003) *Am. J. Physiol.* **285**, G73–G77
- Leon-Del-Río, A., Leclerc, D., Akerman, B., Wakamatsu, N., and Gravel, R. A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 4626–4630
- Chapman-Smith, A., Cronan, J. E., Jr. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 359–363
- Leon-Del-Río, A., and Gravel, R. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 22964–22968
- Hymes, J., and Wolf, B. (1996) *Clin. Chim. Acta.* **255**, 1–11
- Wolf, B., Grier, R. E., Secor McVoy, J. R., and Heard, G. S. (1985) *J. Inher. Metab. Dis.* **8**, 53–58
- Dupuis, L., Campeau, E., Leclerc, D., and Gravel, R. A. (1999) *Mol. Genet. Metab.* **68**, 80–90
- Stanley, J. S., Griffin, J. B., and Zemleni, J. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 5424–5429
- Petrelli, F., Coderoni, S., Moretti, P., and Paparelli, M. (1978) *Mol. Biol. Rep.* **4**, 87–92
- Vesely, D. L. (1982) *Science* **216**, 1329–1330
- Singh, I. N., Dakshinamurti, K. (1988) *Mol. Cell Biochem.* **78**, 47–55
- Zemleni, J., Mock, D. M. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **371**, 83–88
- Hymes, J., Fleischhauer, K., and Wolf, B. (1995) *Biochem. Mol. Med.* **56**, 76–83
- Narang, M. A., Dumas, R., Ayer, L. M., and Gravel, R. A. (2003) *Hum. Mol. Genet.*
- Spence, J. T., and Koudelka, A. P. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 6393–6396
- Bowers-Komro, D. M., and McCormick, D. B. (1984) *Nutr. Rev.* **42**, 360–361
- Chauhan, J., and Dakshinamurti, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10035–10038
- Collins, J., Paietta, E., and Green, R. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 11280–11283
- Deodhar, A. D., and Mistry, S. P. (1970) *Life Sci.* **11**, 581–588
- Dakshinamurti, K., Tarrago-Litvak, L., and Hong, H. C. (1970) *Can. J. Biochem.* **48**, 493–500

AQ: Q

AQ: O

AQ: R

AQ: S

AQ: T

AQ: U

AQ: P

Altruistic Mechanism for Biotin Utilization in Brain

7

26. Borboni, P., Magnaterra, R., Rabini, R. A., Staffolani, R., Porzio, O., Sesti, G., Fusco, A., Mazzanti, L., Lauro, R., and Marlier, L. N. (1996) *Acta Diabetol.* **33**, 154-158
27. De La Vega, L. A., Stockert, R.J. (2000) *Am. J. Physiol.* **279**, C2037-C2042
28. Maeda, Y., Kawata, S., Inui, Y., Fukuda, K., Igura, T., and Matsuzawa, Y. (1996) *J. Nutr.* **126**, 61-66
29. Solorzano-Vargas, R. S., Pacheco-Alvarez, D., and Leon-Del-Rio, A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5325-5330
30. Rodriguez-Melendez, R., Cano, S., Mendez, S. T., and Velazquez, A. (2001) *J. Nutr.* **131**, 1909-1913
31. Morita, J., Thuy, L. P., and Sweetman, L. (1998) *Mol. Genet. Metab.* **64**, 250-255
32. Salto, R., Giron, M. D., del Mar Sola, M., and Vargas, A. M. (1999) *Mol. Cell Biochem.* **200**, 111-117
33. Suormala, T., Wiesmann, U. N., Cruz, F., Wolf, A., Daschner, M., Limat, A., Fowler, B., Baumgartner, E. R. (2002) *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **72**, 273-286
34. Rodriguez-Pombo, P., Ugarte, M. (1992) *J. Neurochem.* **58**, 1460-1463
35. Sander, J. E., Packman, S., and Townsend, J. J. (1982) *Neurology* **32**, 878-880
36. Chiang, G. S., Mistry, S. P. (1974) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **146**, 21-24
37. Schrijver, J., Dias, T., and Hommes, F. A. (1979) *Nutr. Metab.* **23**, 179-191
38. Bhagavan, H. N., and Coursin, D. B. (1970) *J. Neurochem.* **17**, 289-290
39. Lo W, Kadlecck, T., and Packman, S. (1991) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **37**, 567-572
40. Rodriguez-Melendez, R., Perez-Andrade, M. E., Diaz, A., Deolarte, A., Camacho-Arroyo, I., Ciceron, I., Ibarra, I., and Velazquez, A. (1999) *Mol. Genet. Metab.* **66**, 16-23
41. Weiner, D., and Wolf, B. (1991) *Biochem. Med. Metab. Biol.* **46**, 344-363
42. Das, U. G., Schroeder, R. E., Hay, W. W. J., and Devaskar, S. U. (1999) *Am. J. Physiol.* **276**, R809-R817
43. Watson, R. T., and Pessin, J. E. (2001) *Recent Prog. Horn. Res.* **56**, 175-193

AQ: V

Elsevier Editorial(tm) for Molecular Genetics and Metabolism
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Biotin availability regulates expression of the sodium-dependent multivitamin transporter and the rate of biotin uptake in HepG2 cells.

Article Type: Original Article

Keywords: Sodium dependent multivitamin transporter , SMVT, holocarboxylase synthetase, HCS, biotin-dependent carboxylases, biotin utilization, gene expression, soluble guanylate cyclase, cyclic GMP dependent protein kinase, PKG.

Corresponding Author: Dr Alfonso Leon Del Rio Instituto de Investigaciones Biomedicas

Other Authors: Diana Pacheco-Alvarez, Ph.D.; R. Sergio Solórzano-Vargas, Ph.D.; Alfonso González-Noriega, Ph.D.; Colette Michalak, Ph.D.; Janos Zempleni, Ph.D.
Universidad nacional Autónoma de México, Universidad Nacional Autónoma de México,
Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad Nacional Autónoma de México,
University of Nebraska

Biotin availability regulates expression of the sodium-dependent multivitamin transporter and the rate of biotin uptake in HepG2 cells.

Diana Pacheco-Alvarez¹, R. Sergio Solórzano-Vargas¹, Alfonso González-Noriega², Colette Michalak², Janos Zemleni³, and Alfonso León-Del-Río¹.

Departments of ¹ Biología Molecular y Biotecnología and ² Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510

³ Department of Biochemistry, University of Nebraska at Lincoln, NE 68583-0806

Corresponding author: Alfonso León-Del-Río
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México
México, D.F. 04510
Telephone: 5255-5622-3891
E-mail: leon@biomedicas.unam.mx

Abstract

In human cells biotin is essential to maintain metabolic homeostasis and as a regulator of expression of different hepatic enzymes. The enzyme holocarboxylase synthetase (HCS) transforms biotin into its active form 5'-biotinyl-AMP and this compound is used to biotinylate five biotin-dependent carboxylases or to activate a soluble guanylate cyclase (sGC) and a cGMP-dependent protein kinase (PKG). The HCS-sGC-PKG pathway is responsible for maintaining the mRNA levels of enzymes involved in biotin utilization including HCS, carboxylases and a biotin carrier known as sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT). In recent years the role of SMVT in biotin metabolism has been questioned due to its high K_m for the vitamin and the characterization of high affinity biotin transporters in different cell types. To understand the role of SMVT in the control of biotin utilization we have studied the regulation of biotin uptake and SMVT expression in HepG2 cells which depend on SMVT to fulfill their biotin demand. In this study we show that biotin deficiency in HepG2 cells reduced the rate of biotin uptake and the amount of SMVT mRNA levels and protein mass. We also demonstrate that the biotin-dependent transcriptional activity of SMVT promoter in human cells is regulated through the HCS-sGC-PKG pathway. This study suggests that biotin availability regulates the expression of SMVT supporting the proposed role of SMVT in the altruistic mechanism of biotin utilization in liver that has been associated with the sparing of the brain during biotin deficiency.

Keywords

Sodium dependent multivitamin transporter , SMVT, holocarboxylase synthetase, HCS, biotin-dependent carboxylases, biotin utilization, gene expression, soluble guanylate cyclase, cyclic GMP dependent protein kinase, PKG.

Introduction

In human cells the vitamin biotin plays an essential role in gluconeogenesis, fatty acid synthesis and carbohydrate metabolism because of its role as cofactor of five carboxylases; pyruvate carboxylase (PC), propionyl-CoA carboxylase (PCC), methylcrotonyl-CoA carboxylase and two forms of acetyl-CoA carboxylase (ACC-1 and ACC-2) [1, 2]. Carboxylase biotinylation is catalyzed by the enzyme holocarboxylase synthetase (HCS) through a reaction that involves the transformation of biotin into biotinyl-5'-AMP (B-AMP) and its subsequent attachment to a specific lysine residue in the carboxylases [1]. We recently showed that B-AMP is also required to activate a signal transduction cascade that includes a soluble guanylate cyclase (sGC) and cGMP-dependent protein kinase (PKG) [3]. Triggering of the HCS-sGC-PKG pathway in human hepatocytes maintains the mRNA levels of PCC, ACC-1, HCS [3], PC and the sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT) [4]. The regulatory role of biotin seems to be limited to the expression of proteins involved in the transport and utilization of exogenous vitamin while having no effect on biotinidase mRNA levels, enzyme responsible for biotin recycling during carboxylase turnover [4].

The nature of this regulatory mechanism is in principle paradoxical since a decrease in biotin concentration will prompt the cells to respond by limiting their ability to utilize the remaining vitamin jeopardizing metabolic homeostasis. However, this mechanism explains why after prolonged biotin deficiency the mass and activity of biotin-dependent carboxylases and total biotin concentration in the

brain of laboratory animals are not drastically affected as occurs in liver, kidney and other organs [4-9]. We proposed that during biotin deficiency the HCS-sGC-PKG pathway limits biotin utilization in liver and other tissues allowing a continuous supply of the vitamin to the brain. In this organ, biotin dependent PC and PCC are essential for continuance of cell metabolism and brain function via anaplerosis of Krebs cycle and restoration of alpha-ketoglutarate because of the release of glutamate γ -aminobutyric acid from neurons and glutamine export from glia [4, 10].

In recent years the study of biotin uptake has shown the presence of high and low affinity carrier-mediated systems in eukaryotic cells [8, 11-17]. The best characterized biotin carrier is SMVT, a transmembrane protein that mediates the uptake of biotin, lipoic acid and panthotenate. The SMVT mRNA is highly abundant in absorptive tissues such as intestine, kidney and placenta [18] and blocking its expression in human liver and intestinal epithelial cells results in a severe impairment in biotin uptake [11]. However, the physiological relevance of SMVT for biotin metabolism has been questioned due to its seemingly high K_m for the vitamin (8-20 μM). Moreover, recent studies have suggested that astrocytes, Jurkat and kidney cells increase their rate of biotin uptake as an adaptive mechanism to compensate for low biotin concentrations, contrary to the proposed role of regulation of biotin transport in "altruistic" biotin utilization in liver [8, 19-21].

In this work we studied biotin uptake and expression of SMVT in human HepG2 cells under conditions of biotin deficiency to determine if both processes are

related and regulated by the same mechanisms in liver. Our results showed that human HepG2 cells grown in a biotin deficient medium have a lower rate of biotin uptake than normal cells. The impairment in biotin uptake is associated to a reduction in the amount of both SMVT protein mass and mRNA levels. SMVT expression is restored by biotin supplementation while lipoic acid and pantothenic acid, the other substrates of SMVT, did not have a significant effect. Transfection of HepG2 cells with a vector containing a luciferase reporter gene under the control of the rat SMVT promoter demonstrated that its transcriptional activity is regulated by biotin availability through activation of the HCS-sGC-PKG pathway. Our results may have direct implications in the study of human nutrition and in the actual recommended minimum daily intake of biotin due to the possible effects of the vitamin on pantothenic acid and lipoic acid transport.

Materials and Methods

Materials. Biotin, cycloheximide, 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate (8-Br-cGMP) and 1-H (1,2,4)oxadiazolo-[4,3-a]quinaxolin-1-one (ODQ) were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Rp-8(4-chlorophenylthio)-guanosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate (Rp-8-pCPT-cGMPS or PKGi) was from Biolog, San Diego, CA. *d*-[8,9-³H]biotin was from Amersham Pharmacia Biotech. Galacton, Light emission accelerator were from Tropix. The human hepatoblastoma cell line, HepG2, was obtained from the American Type Cell Collection. Normal human

fibroblasts and fibroblasts from a patient with MCD (MCD-MK) were kindly provided by R. Gravel (University of Calgary, Alberta, Canada) [22].

Cell culture experiments. Cell cultures were maintained in alpha-MEM medium (GIBCO/BRL; supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (biotin-replete medium). Biotin-deficient medium was prepared using biotin free MEM medium, dialyzed FBS (GIBCO/BRL) and the same antibiotic concentration. The methods for biotin starvation of cell cultures are essentially as previously described [3]. Cells were grown in biotin-replete or biotin-deficient medium at 37°C with 5% CO₂ for up to 15 days. The medium was changed at three day intervals. Biotin-deficient cells were stimulated with biotin (1nM to 1 µM), or with 1 mM 8-Br-cGMP, a non-hydrolysable form of cGMP, at day 14 and the cells were maintained in the biotin- or cGMP-supplemented medium for 24 hours.

Reverse transcription-PCR and Western blot. Procedures for RNA isolation, cDNA synthesis and PCR were as previously described [3], except for the following modifications: 4 µg RNA and 0.5 µM of the gene-specific oligonucleotide primers were used for cDNA synthesis and 0.3µM of specific sense and antisense primers were used to give PCR products 300-520 bp in length [3]. The oligonucleotides used to amplify human mRNA were as follows: HCS, 5'- TGA GGT CCA TTC CCG AGT AT-3'(T.M. 60°C) and 5'- AAC CTG GAG GAA GCC AGA AT-3' (T.M. 60° C); SMVT, 5'-TGT GCT CTC CTG TTA TGC AG-3' (T.M. 60°

C) and 5'- ACA TGG AAA GAA CAT TCC AA-3'(T.M. 54°C); actin 5'- ATG TGC AAG GCC GGC TTC GC-'3 (T.M. 66°C) and 5'- GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG- 3'(T.M. 60°C). PCR products were evaluated following electrophoresis on agarose gels and were quantified by densitometry using a molecular imager FX (BIORAD, Hercules CA.) and normalized to β -actin mRNA levels [3]. The β -actin mRNA was present at equivalent levels in all RNA samples.

For Western blot analysis of SMVT expression in human normal and biotin deficient cells we used a polyclonal rabbit antibody against human SMVT [23]. The membranes were also probed with a polyclonal antibody against the 78 kDa β -glucuronidase receptor which was used as an internal expression control [24].

Biotin uptake assay. HepG2 cells were grown in T25 flasks for 15 days in biotin supplemented or biotin deficient medium. Cell cultures at 80% confluence were washed three times with PBS buffer and incubated in biotin deficient medium containing 63 μ M cycloheximide (protein synthesis inhibitor) and 13nM [3 H]-biotin. To study the amount of biotin transported the cells were washed three times in ice-cold Hanks balance salt solution (HBSS) and collected in 500 μ l of ice-cold PBS buffer using a rubber policeman. After centrifugation at 4000 rpm the cells were resuspended in 100 μ l of PBS buffer. Cell extracts were obtained by sonicating the samples three times for 15 seconds in an ultrasonic processor (Sonics and Materials, INC. U.S.A). Total protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad). Radioactive biotin uptake was analyzed in a liquid scintillator. Results are expressed as cpm/mg of total protein. To determine the

effect of apocarboxylases on the rate of biotin uptake normal and biotin starved HepG2 cells were preincubated with 1 μ M non-radioactive biotin and 63 μ M of cycloheximide to block free protein biotinylation sites and prevent de novo carboxylases synthesis. After washing the cells three times in PBS biotin uptake was studied as described above.

Effect of biotin on SMVT promoter activity. To study the effect of biotin on SMVT transcription we made use of the previously described rat SMVT promoter [25]. Three different elements have been identified within this promoter P1, P2 and P3. These DNA regions were amplified by PCR and subcloned into the promoter-less pGL3-basic vector (pGL3B) to direct the expression of a luciferase reporter. The SMVT constructs (3.25 μ g) and a control vector expressing β -galactosidase were transiently transfected into biotin deficient HepG2 cells, plated at 40-60% confluence, using the calcium phosphate mammalian cell transfection kit (5'-3' INC. U.S.A). Luciferase activity was determined 48 hours after transfection using the enhanced luciferase assay kit by Analytical Luminescence Laboratory. The results were corrected by β -galactosidase activity using the Galacto-Light chemiluminescent reporter assay (Tropix, Bedford MA.).

Effect of soluble guanylate cyclase and cGMP-dependent protein kinase inhibition on SMVT promoter activity. HepG2 cells grown in biotin-free medium for 15 days were treated with 50 μ M 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate (8-Br-cGMP), 1-H[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinaxolin-1-one (ODQ), a specific inhibitor

of sGC or 10 μ M Rp-8-pCPT-cGMPs, a specific inhibitor of cGMP-dependent protein kinase (PKGi) [26] for 1 hr. After this period, 1 μ M biotin (final) was added to the medium, and growth was continued for 24 h. Luciferase activity was determined transfecting the pGL3B-P2 vector as described above.

Statistical analysis. All experiments were done in triplicate and at least in three different times. For rtPCR analysis the RNA samples were obtained from three different cell cultures and the rtPCR analysis was done independently for each sample. Results of biotin starvation on mRNA were normalized to β -actin mRNA and expressed as a percentage of mRNA levels observed in cells grown in biotin-replete medium. In the experiments on biotin effect on SMVT protein we used the expression of the 78 kDa cation dependent β -glucuronidase receptor as a control. Data is presented as the mean of three different experiments \pm S.E.

Results.

Biotin availability during cell growth modifies the rate of vitamin transport in HepG2 cells.

The rate of biotin uptake was compared in HepG2 cells grown for several passages in normal or biotin deficient medium. Biotin starved HepG2 cells transported 122% more biotin than cells grown in a replete medium (22.2 ± 0.5 cpm

$\times 10^3/\text{mg}$ protein and $10 \pm 0.88 \text{ cpm} \times 10^3/\text{mg}$ protein respectively) (Figure, 1). Previous reports had shown that biotin deficiency results in the accumulation of unbiotinylated apocoboxylases, histones and other unidentified biotinylable polypeptides [5, 27-29]. To determine the impact of these proteins, on the apparent biotin uptake we first determined how much biotin can covalently attached to proteins by normal and biotin deficient cells by comparing biotin uptake and efflux [28, 30]. In these experiments, the cells were loaded with 3H -biotin and then incubated in a large volume of medium containing $1 \mu\text{M}$ of cold biotin to promote the exchange of the intracellular pool of the vitamin [28, 30]. The biotin retained after the efflux time is taken as a measure of the protein-bound biotin that could not be exchanged with the large extra cellular pool of cold biotin. Our results indicated that in deficient cells 87.7% of the transported biotin is protein bound while in normal cells only 12.89% of the vitamin is not freely exchangeable (Fig. 1). These differences most likely reflect the larger pool of unbiotinylated carboxylases present in biotin deficient cells that act as a biotin sink during the uptake experiments [28].

To determine the impact of free biotin-binding sites in the rate of biotin uptake, we pre-incubated normal and deficient cells with $1 \mu\text{M}$ cold biotin and $63 \mu\text{M}$ cycloheximide for 4 hours before the uptake experiments. This treatment was aimed at blocking free biotinylation sites and inhibiting biotin-dependent synthesis of carboxylases [3]. After treatment the cells were incubated in a medium containing 13 nM 3H -biotin and $63 \mu\text{M}$ cycloheximide for 5, 30 and 60 min. Biotin uptake shown to be linear up to 30 minutes in both normal and deficient cells.

However, after blocking biotinylation sites, biotin uptake by normal cells was 53%-68% higher than in deficient cells (Fig. 2). The uptake values in normal cells were 5.82 ± 0.92 cpm $\times 10^3$ /mg protein, 24.82 ± 2.67 cpm $\times 10^3$ /mg protein and 35.27 ± 0.79 cpm $\times 10^3$ /mg protein at 5, 30 and 60 min, respectively. Biotin uptake values in deficient cells were 1.835 ± 0.275 cpm $\times 10^3$ /mg protein, 11.7 ± 3.76 cpm $\times 10^3$ /mg protein and 12.685 ± 1.885 cpm $\times 10^3$ /mg protein. HepG2 cells incubated at 4°C showed a biotin uptake of less than 1% of that observed at 37° C (Fig. 2). This result suggested that non-specific biotin uptake is negligible and biotin transport in normal and deficient cells is the result of a specific carrier-mediated process.

Biotin deficiency reduces SMVT protein and mRNA levels expressed in HepG2 cells.

To explore the nature of the mechanism involved in the regulation of the rate of biotin uptake we determined the amount of SMVT protein expressed in normal and biotin deficient HepG2 cells by Western blot analysis. Protein extracts from deficient cells showed an expression of SMVT polypeptide of 20% of that observed in normal cells. Significantly, when deficient cells were stimulated with 1 μ M biotin for 24 hours the amount of SMVT increased to 52% compared to control cultures. These results suggested that SMVT expression is regulated by biotin availability in the incubation medium. Stimulation of HepG2 cells with lipoic acid or pantothenic acid did not change the expression of SMVT (data not shown). The specificity of the biotin effect was tested incubating the same membranes with a polyclonal

antibody directed against the 78 KDa cation dependent beta-glucuronidase receptor [24, 31]. The expression of this receptor was not affected by biotin deficiency or supplementation in HepG2 cells suggesting that biotin specifically regulates SMVT expression (Fig. 3A).

As we previously shown biotin deficiency reduced SMVT mRNA levels to 29 % with respect to control cells (Fig. 3B). Stimulation of deficient cells with 1 μ M biotin resulted in the normalization of SMVT mRNA to initial levels. Similar results were obtained when HepG2 deficient cells were stimulated with 8-Br-cGMP, a non-hydrolyzable analogue of cGMP (Fig. 3B). Treatment of cells with biotin deficient medium or 8-Br-cGMP had no effect on actin mRNA levels which is used as a reference gene (Fig. 3B).

Biotin stimulates the activity of the rat SMVT promoter in human cells.

To test the effect of biotin availability on the transcriptional regulation of SMVT we made use of a vector containing a luciferase reporter gene under the control of the promoter region of the rat SMVT gene. The promoter region of the rat SMVT gene has been extensively characterized [25] and it is composed of three modules named P1, P2 and P3. These sequences were cloned in a pGL3B vector, transfected into biotin deficient HepG2 cells and the luciferase activity was measured after the cells were stimulated with different concentrations of biotin. P1 and P3 elements did not show a significant promoter activity in HepG2 cells (Table, 1). However, when P2 directed the transcription of luciferase we recorded a 509-

fold increase in its activity compared to the results obtained transfecting the empty vector. Stimulation of HepG2 cells with 1 nM or 1 μ M biotin produced an 844-fold and 766-fold increase, respectively, in luciferase activity.

Biotin-dependent P2 transcriptional activation requires of the HCS-sGC-PKG pathway.

We previously had shown that biotin stimulation of mRNA levels of HCS and biotin enzymes required of the HCS-sGC-PKG pathway. To determine if the transcriptional activity of SMVT P2 promoter is regulated by this signal transduction mechanism we studied its biotin response in the presence of inhibitors of soluble guanylate cyclase or the cGMP-dependent protein kinase in HepG2 cells. Pretreatment of cells with ODQ or PKGi reduced the P2 driven luciferase activity to 57% and 68%, respectively, compared to cells that were treated only with biotin. Increasing biotin concentration to 1 μ M did not affect luciferase activity in the presence of the enzymatic inhibitors indicating the absolute dependence of SMVT promoter on the HCS-sGC-PKG pathway.

Discussion

The results of this work showed that biotin starved HepG2 cells have an apparent higher rate of biotin uptake than cells grown in normal medium. This compares favorably to previous reports on biotin transport in human and rat derived cell lines

[8, 20, 28, 32], that interpreted their results as an adaptive mechanism of mammalian cells to maximize the utilization of biotin when the vitamin is present in low concentrations. However, these studies did not consider the presence of unbiotinylated carboxylases accumulated in the cell during biotin starvation [6, 28]. We showed that in biotin deficient cells most of the transported vitamin is attached to proteins while in normal cells only one fifth of it is protein bound. The relevance of apocarboxylases in assessing the rate of biotin transport was evidenced by blocking free biotinylation sites and showing that normal cells have a higher rate of vitamin transport than biotin starved cultures. We propose that the larger pool of apocarboxylases present in biotin deficient cells, acting as a biotin sink during the uptake experiments, may have lead to an underestimation of the biotin transported by normal cells in previous investigations.

Although different biotin carriers have been identified in human tissues, HepG2 cells depend on SMVT to satisfy their vitamin requirements because of the apparent lack of high affinity biotin transporters [11]. This feature makes HepG2 cells a unique model to test the role of SMVT expression in the regulation of biotin transport. The results presented in this study suggested that the decrease in the rate of biotin transport in deficient HepG2 cells was likely related to modification in the expression of SMVT. This hypothesis is based on the fact that biotin starved cells showed a similar reduction in SMVT protein and mRNA levels.

Our observations on the effect of biotin in SMVT expression contrast with previous studies performed in Jurkat cells where biotin deficiency results in a higher expression of SMVT protein. These seemingly contradictory results may have their

origin in both methodological and physiological differences. In this work, biotin deficiency is achieved incubating HepG2 cells in a biotin-free medium, whereas the Jurkat cell studies used low biotin concentrations (0.025 μM) [13, 20]. This is of particular importance if we consider that Jurkat cells express both SMVT and a recently characterized high affinity biotin transporter [13]. It is possible that when Jurkat cells are incubated in the presence of trace amounts of biotin, the high affinity transporters could prevent the fall of biotin concentration within the cell beyond the point where SMVT expression is affected.

Mechanistically, regulation of the rate of biotin transport and SMVT expression in HepG2 cells depends on biotin availability and its effects on the SMVT promoter through activation of the HCS-sGC-PKG pathway. This model is supported by the findings that P2 transcriptional activity is enhanced by biotin at physiological and pharmacological concentrations and the fact that blocking sGC or PKG activities abolishes activation of SMVT promoter even at pharmacological concentrations of biotin.

An interesting feature of SMVT regulation is that prolonged biotin starvation failed to abolish the expression of both SMVT mRNA and its protein. This may suggest that low levels of the transporter are permanently expressed in the cell, independently of its nutritional status. In this model the biotin regulatory mechanism would allow the cells to increase SMVT expression when biotin concentration is raised to optimize utilization of the vitamin. Our results also evidenced the previously published paradoxical nature of the HCS-sGC-PKG pathway since low biotin concentrations would fail to activate SMVT expression

reducing even more the ability of liver cells to satisfy their vitamin requirements. We suggest that control of SMVT promoter activity by biotin availability supports the role of SMVT in the altruistic regulation of biotin utilization in liver. This mechanism is aimed at limiting biotin utilization in peripheral organs, such as liver, to ensure a continuous vitamin delivery to the brain [4]. This organ is characterized for expressing both SMVT and a high affinity biotin transporter [4, 8].

The nutritional and biochemical characterization of nutrients in human and animal metabolism, have identified synergistic interactions between different vitamins. In the case of biotin it has been shown to interact with pantothenic acid through a yet unidentified mechanism. Biotin deficiency in rats is aggravated by a simultaneous pantothenic acid deficiency. The addition of biotin to the diet not only protects the animals from biotin deficiency but also reduces the severity of the symptoms of a pantothenic acid deficiency [33]. Since biotin and pantothenic acid have different functions, in carboxylase reactions and synthesis of CoA [33], respectively, it is unlikely that one vitamin could substitute for the other. Instead, we propose that biotin supplementation could have increased SMVT expression facilitating the uptake of low pantothenic acid concentrations. If this is true, our results may challenge the actual biotin daily recommended intake, since an adequate supply of this vitamin may be essential to guarantee the efficient utilization of pantothenic acid and lipoic acid uptake.

Acknowledgments

This study was supported by grants of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (40001-Q) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica from Universidad Nacional Autónoma de México (IN235202). D.P.A and R.S.S.V. are recipients of scholarships from CONACyT and DGAPA-UNAM.

References

- [1] D. Pacheco-Alvarez, R.S. Solórzano-Vargas and A. León Del Río, *Arch Med Res.* 33 (2002) 439-47.
- [2] B. Wolf. in (Scriver C., B.A., William S., Valle D., ed.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill Professional 2001, pp. 3935-3962.
- [3] R.S. Solorzano-Vargas, D. Pacheco-Alvarez and A. Leon-Del-Rio, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 5325-30.
- [4] D. Pacheco-Alvarez, R.S. Solorzano-Vargas, R.A. Gravel, R. Cervantes-Roldan, A. Velazquez and A. Leon-Del-Rio, *J Biol Chem* 279 (2004) 52312-8.
- [5] R. Rodriguez-Melendez, M.E. Perez-Andrade, A. Diaz, A. Deolarte, I. Camacho-Arroyo, I. Ciceron, I. Ibarra and A. Velazquez, *Mol Genet Metab* 66 (1999) 16-23.
- [6] C.S. Rodriguez-Melendez R, Mendez ST, Velazquez A., *J Nutr.* 131 (2001) 1909-13.
- [7] Lo W, T. Kadlecsek and S. Packman, *J. Nutr. Sci. Vitaminol* 37 (1991) 567-572.
- [8] P. Rodriguez-Pombo, Ugarte, M., *J Neurochem.* 58 (1992) 1460-3.
- [9] H.N. Bhagavan and D.B. Coursin, *Journal of neurochemistry* 17 (1970) 289-290.
- [10] B. Hassel, *Mol Neurobiol* 22 (2000) 21-40.
- [11] K. Balamurugan, A. Ortiz and H.M. Said, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285 (2003) G73-7.
- [12] P.D. Prasad, H. Wang, R. Kekuda, T. Fujita, Y.J. Fei, L.D. Devoe, F.H. Leibach and V. Ganapathy, *J Biol Chem* 273 (1998) 7501-6.
- [13] Zempleni J and M.D. M., *The American Physiological Society* (1998) C382-C388.

- [14] Zempleni J and M.D. M., American Society for Butritional Sciences (2000).
- [15] F. Grafe, Wohlrab, W., Neubert, R.H, Brandsch, M., J Invest Dermatol. 120 (2003) 428-33.
- [16] R.L. Daberkow, B.R. White, R.A. Cederberg, J.B. Griffin and J. Zempleni, J Nutr 133 (2003) 2703-6.
- [17] N.S. Chatterjee, C.K. Kumar, A. Ortiz, S.A. Rubin and H.M. Said, Am J Physiol 277 (1999) C605-13.
- [18] H. Wang, W. Huang, Y.J. Fei, H. Xia, T.L. Yang-Feng, F.H. Leibach, L.D. Devoe, V. Ganapathy and P.D. Prasad, J Biol Chem 274 (1999) 14875-83.
- [19] K. Balamurugan, N.D. Vaziri and H.M. Said, Am J Physiol Renal Physiol (2004).
- [20] S.E. Crisp, J.B. Griffin, B.R. White, C.F. Toombs, G. Camporeale, H.M. Said and J. Zempleni, Eur J Nutr 43 (2004) 23-31.
- [21] Zempleni J, Steven Stanley J and M. DM., J Nutr Biochem. 12 (2001) 465-473.
- [22] L. Dupuis, E. Campeau, D. Leclerc and R.A. Gravel, Mol Genet Metab 66 (1999) 80-90.
- [23] J.B. Griffin, J.S. Stanley and J. Zempleni, Int J Vitam Nutr Res 72 (2002) 195-8.
- [24] A. Gonzalez-Noriega and C. Michalak, Biochim Biophys Acta 1538 (2001) 152-61.
- [25] N.S. Chatterjee, S.A. Rubin and H.M. Said, Am J Physiol Cell Physiol 280 (2001) C548-55.
- [26] L.A. De La Vega, Stockert, R.J., Am J Physiol Cell Physiol. 279 (2000) C2037-42.
- [27] M.A. Narang, R. Dumas, L.M. Ayer and R.A. Gravel, Hum Mol Genet 13 (2004) 15-23.
- [28] D. Weiner and B. Wolf, Biochem Med Metab Biol 46 (1991) 344-63.
- [29] J.S. Stanley, J.B. Griffin and J. Zempleni, Eur J Biochem 268 (2001) 5424-9.
- [30] Zempleni J and M. D., J. Nutr. Biochem 10 (1999) 105-109.
- [31] A. Gonzalez-Noriega, C. Michalak, J.R. Cruz-Perez and F. Masso, Biochim Biophys Acta 1538 (2001) 141-51.
- [32] G.J. Manthey KC, Zempleni J., J Nutr. 132 (2002) 887-92.
- [33] H.E. Sauberlich, Ann N Y Acad Sci 355 (1980) 80-97.

Figure legends

Figure 1. Effect of biotin starvation on the rate of biotin uptake by HepG2 cells. Total biotin uptake (open bars) was studied in HepG2 cells cultivated 14 days in normal (control) or biotin-free medium (deficient). The cells were incubated in a biotin free medium containing ^3H -biotin and the amount of radioactive vitamin was measured in cell extracts in a liquid scintillator. Protein-bound biotin in normal and deficient cells (closed bars) was determined by measuring the radioactivity remaining in cell extracts after vitamin efflux experiments as described in material and methods. Results are expressed as cpm per mg of total protein and shown as mean \pm S.E .

Figure 2. Time-course of biotin uptake in normal and biotin deficient HepG2 cells. Normal (■) and biotin deficient (○) HepG2 cells were preincubated in the presence of $1\ \mu\text{M}$ cold biotin and $63\ \mu\text{M}$ cycloheximide to block free biotinylation sites. ^3H -biotin uptake was determined at 37°C or 4°C (Δ) as described above. Results are expressed as cpm per mg of total protein and shown as mean \pm S.E .

Figure 3. Biotin availability affects the abundance of protein and mRNA levels of SMVT in HepG2 cells. (A). Western blot analysis of the effect of biotin concentration on the abundance of SMVT and 78 kDa β -glucuronidase receptor proteins. (B). Effect of biotin and cGMP on SMVT mRNA levels in normal (C), biotin deficient (D), biotin deficient stimulated with biotin (D+B), and deficient

stimulated with cGMP (D+cGMP) HepG2 cells. Inserts show rtPCR products of SMVT and actin from a typical experiment.

Figure 4. Effect of soluble guanylate cyclase and cGMP-dependent protein kinase inhibition on SMVT promoter activity. Biotin deficient HepG2 cells were transfected with a pGL3B vector carrying the P2 element from the rat SMVT promoter directing the expression of a luciferase reporter gene. Luciferase activity was determined as described in materials and methods after the cells were stimulated with 1 μ M biotin (P2+Bio) in the presence or absence of ODQ (P2+ODQ) or PKGi (P2+PKGi).

Table 1. Effect of biotin concentration on the rat SMVT promoter activity.

Table 1**Table 1**

Biotin concentration	0.0 μM	0.001 μM	1.0 μM
	(RLU)/ β -galactosidase activity		
pGL3B	100	110	100
pGL3B -P1	250	400	480
pGL3B -P2	52500	87000	79000
pGL3B -P3	300	500	550

Figure 1

Fig 1

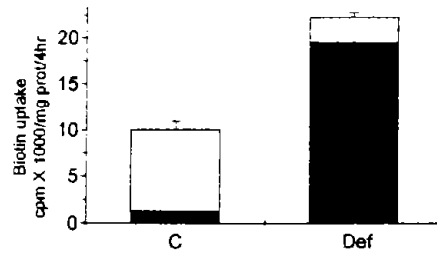


Figure 2

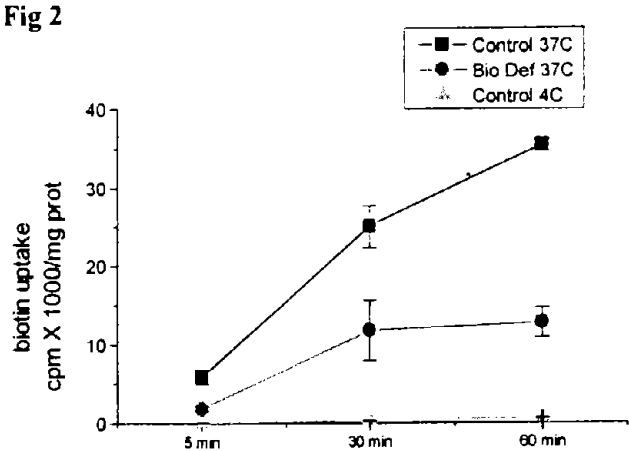


Figure 3

Fig 3A

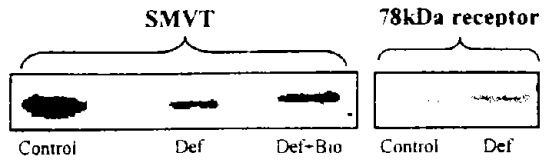


Fig 3B

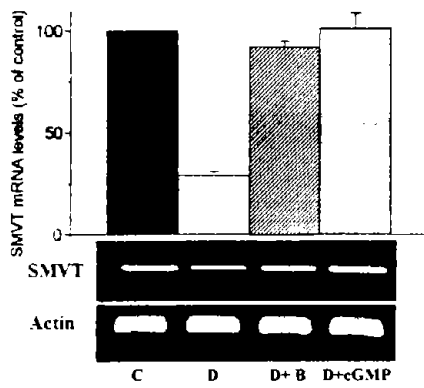


Figure 4

Fig 4

