



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**BIOLOGIA MOLECULAR DE LA DEFICIENCIA DE
BIOTINIDASA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA:**

Biol. Anylu del Carmen Pérez Monjaras

México, D. F.

2008.



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.



PDCB/grad/052/Jur/2008

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

Me permito informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 230ª del 22 de octubre de 2008, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de **ANYLU DEL CARMEN PÉREZ MONJARAS**, con número de cuenta **505013310**, con la tesis titulada **"BIOLOGIA MOLECULAR DE LA DEFICIENCIA DE BIOTINIDASA"**, dirigida por el Dr. Alfonso León del Río.

Presidente: Dr. Antonio Velázquez Arellano
Vocal: Dra. María Alicia González Manjarrez
Vocal: Dra. María Imelda López Villaseñor
Vocal: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
Secretario: Dr. Alfonso León del Río

Atentamente

"Por mi raza hablará el espíritu"

Cd. Universitaria, a 24 de noviembre de 2008

DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
RESPONSABLE
INST. DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
COORDINADOR DEL PROGRAMA

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

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 (CONACyT 48862) y Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT IN220206-3).

AGRADECIMIENTOS

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

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

Al Dr. Alfonso León Del Río, por entrevistarme, darme una oportunidad y mostrarme lo que es el mundo de la investigación.

A Biol. Rafael Cervantes Roldán, por la asesoría técnica y la colaboración en los experimentos descritos en el capítulo III de esta tesis. Por los consejos, las opiniones, las ideas, las discusiones, el apoyo y por ser parte fundamental de mi formación. Te estoy muy agradecida.

Al Dr. Sergio Solórzano-Vargas, por su ayuda y apoyo en los momentos que más lo necesité y los buenos consejos.

A la Dra. Diana Pacheco-Álvarez, por su ayuda, los consejos y los conocimientos transmitidos.

A los integrantes de mi laboratorio: Iván, Tonatiuh, Alberto, Sandra, Cynthia, por su apoyo incondicional, comentarios, opiniones, consejos, asesorías y la ayuda en la realización de los experimentos descritos en el capítulo II de la tesis; y sobre todo por la transmisión de los conocimientos acumulados por los años de experiencia.

A la Biol. Sandra Raquel Reyes Carmona y la Q.F.B. Cynthia Montiel Hernández, por los buenos momentos, la confianza y el apoyo que me brindaron; que sería de la vida sin amigas tan importantes y fundamentales como Ustedes.

Al MC. Carlos Cabello Gutiérrez y al MC. Jorge Armando Cime Castillo, por sus opiniones, consejos y ayuda. Sobre todo por su apoyo, amistad y cariño.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Alfonso González Noriega y el Dr. Diego González Halphen, por las opiniones y sugerencias hechas a mi trabajo y sobre mi desempeño.

A los miembros del jurado de obtención de grado: Dr. Antonio Velázquez Arellano, Dra. María Alicia González Manjarrez, Dra. María Imelda López Villaseñor, Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez.

Al Dr. Antonio Velázquez Arrellano, por sus comentarios a mi trabajo, las opiniones y su guía.

Al Dr. Alfonso González Noriega y Collete Michalack, por los comentarios y sugerencias hechas a mi trabajo y al asesoramiento en el cuarto de cultivo.

A todos los que me brindaron su ayuda y consejo para la realización de este trabajo, Muchísimas
Gracias!!.

DEDICATORIAS

A mi mejor amiga... Ana del Carmen Monjaras Martínez; Mi mamá! Por la confianza para poder hablar desde recetas de cocina hasta sueños, esperanzas y miedos.

A mi otra mitad... Luís Ernesto Pérez Monjaras; Mi hermano! Por la confianza mutua, por los consejos y opiniones cuando las necesito. Cuando necesite tomar una decisión, siempre te consultare; nadie me conoce como tu!

A mi soporte interminable... Luís Pérez Rodríguez; Mi Papá! Por estar presente cuando tengo que tomar decisiones difíciles y estar a mi lado apoyándome sin importar la decisión que tome. Cuando necesite algo sin importa que sea...se que solo tendré que pedirlo.

A toda La Familia Pérez y La Familia Monjaras; por que si necesito algo, estoy enferma, tengo un examen o tengo algún problema; siempre puedo contar con todos y el apoyo que me brindan sin importar la forma, mensajitos, mails, llamadas o su presencia.

INDICE

CAPITULO I. Biotina.

	Pagina
1. Características. _____	2
2. Carboxilasas dependientes de biotina. _____	6
a. Acetil CoA Carboxilasa (ACC). _____	6
b. Piruvato carboxilasa (PC). _____	7
c. Propionil CoA Carboxilasa (PCC). _____	8
d. Metilcrotonil CoA Carboxilasa (MCC). _____	9
3. Holocarboxilasa sintetasa (HCS). _____	10
4. Biotinidasa (BTD). _____	12
5. Transporte de biotina. _____	14
6. Enfermedades relacionadas con la biotina. _____	15
a. Deficiencia ACC. _____	16
b. Deficiencia de PC. _____	16
c. Deficiencia de PCC. _____	17
d. Deficiencia de MCC. _____	18
e. Deficiencia de HCS. _____	19
f. Deficiencia de Biotinidasa. _____	22
7. La biotina como regulador de la expresión de la regulación genética. _____	26
a. Expresión dependiente de biotina. _____	26
b. Carboxilasas y Holocarboxilasa sintetasa. _____	28
c. La biotina y las modificaciones a la cromatina. _____	30
Hipótesis. _____	31
Objetivos. _____	32

CAPITULO II. Metodologías

1. Materiales. _____	34
2. Líneas celulares. _____	34
3. Células en cultivo. _____	34
4. Western blot. _____	35
5. Reverse-Transcription-PCR. _____	36
6. Ensayo para medir la actividad de HCS. _____	37
7. Secuenciación de ADNc y ADN genómico. _____	39

CAPITULO III.

Deficiencia de Biotinidasa reduce la expresión de Holocarboxilasa Sintetasa en la enfermedad Deficiencia Múltiple de Carboxilasas Juvenil.

Resumen. _____	41
Introducción. _____	42
Materiales y Métodos. _____	47
Resultados. _____	51
▪ Caracterización molecular y funcional de la línea celular deficiente de biotinidasa MCD-BD. _____	51
▪ La deficiencia de biotinidasa obstaculiza la recuperación de la biotinilación de las carboxilasas en células deficientes de biotina en respuesta a la estimulación con biocitina o biotina. _____	52
▪ Efecto de la deficiencia y suplementación de biotina sobre los niveles de proteínas de carboxilasas en células normales y deficientes de biotinidasa. _____	55
▪ La recuperación dependiente de biotina de los niveles de proteína de MCC requiere una vía GCs funcional. _____	56
▪ Efecto de la deficiencia de biotina sobre los niveles de ARNm de HCS y biotinidasa en fibroblastos normales y deficientes de biotinidasa. _____	58
▪ Nivel de proteína de HCS y actividad de biotinilación en células deficientes de biotinidasa. _____	59
Discusión. _____	61
Agradecimientos. _____	64
Abreviaturas. _____	65
Bibliografía. _____	66

CAPITULO IV.

Discusión General

Discusión. _____	72
Bibliografía general. _____	76
Abreviaturas. _____	84

APÉNDICE

1. Publicaciones. _____	86
2. Protocolos. _____	87
Extracción de ARN por el Método de Trizol. _____	88
ARN. _____	89
RT (Reverse Transcription). _____	90

PCR (Polymerase Chain Reaction).	91
Curva de ciclos.	92
Biotinilación de Carboxilasas.	93
Detección de HCS.	95
Clonación.	97
Preparación de un vector.	101
Cuarto de cultivo.	105
3. Preparación de Reactivos.	107
Buffers.	108
Medios de cultivo.	110
Soluciones.	111
Material.	112

CAPITULO I:



BIOTINA

1. CARACTERÍSTICAS.

La biotina es una vitamina hidrosoluble con un peso molecular de 244.3 g/mol, que se puede disolver en agua y etanol (1). Los mamíferos son incapaces de sintetizar la biotina en comparación con las plantas y los microorganismos, por lo que se obtiene principalmente de la dieta (2, 5). Los principales alimentos con altas concentraciones de biotina son el hígado, la clara de huevo y algunos vegetales (5).

Se han hecho diversos esfuerzos por estimar el consumo y la cantidad necesaria de biotina diaria; sin embargo debido a la diversidad en los métodos de cuantificación y la producción de biotina por nuestra flora intestinal, solo se puede estimar que se encuentra entre 30 y 100µg al día (2, 5). Se ha calculado la concentración de biotina en el plasma humano entre 0.8 y 3nM (3).

La biotina tiene un agonista natural; la avidina, una glicoproteína que se une a ella con una gran afinidad (10^{15} M). Esta proteína se encuentra presente en la yema de huevo crudo, si se consume en grandes cantidades la unión biotina-avidina impide que en el estomago e intestino se lleve a cabo la absorción correcta de la vitamina, presentándose así los síntomas que han sido catalogados como deficiencia de biotina (3, 4).

Los síntomas de la deficiencia de biotina que se observan en infantes y niños incluyen dermatitis periorifical, conjuntivitis, hipotonía, acidosis cetolactica, aciduria orgánica, infecciones en la piel y retraso en el desarrollo (6). En adolescentes y adultos los síntomas incluyen cabello delgado y pérdida de color, erupciones en la piel alrededor de ojos, nariz y boca, depresión, letárgica, alucinaciones y parestesias en las extremidades (6). También hay una disminución en la excreción de biotina en la orina pero un aumento en la excreción de ácidos orgánicos (5).

La biotina es un compuesto bicíclico, un anillo es un grupo ureido (-N-CO-N) que esta fusionado a otro anillo que contiene un azufre al que se le denomina anillo de tetrahidrotiofeno; este tiene unida una cadena lateral de 5 carbonos denominada ácido valérico, que termina en un grupo carboxilo (3, 4, 5) (Fig. 1).

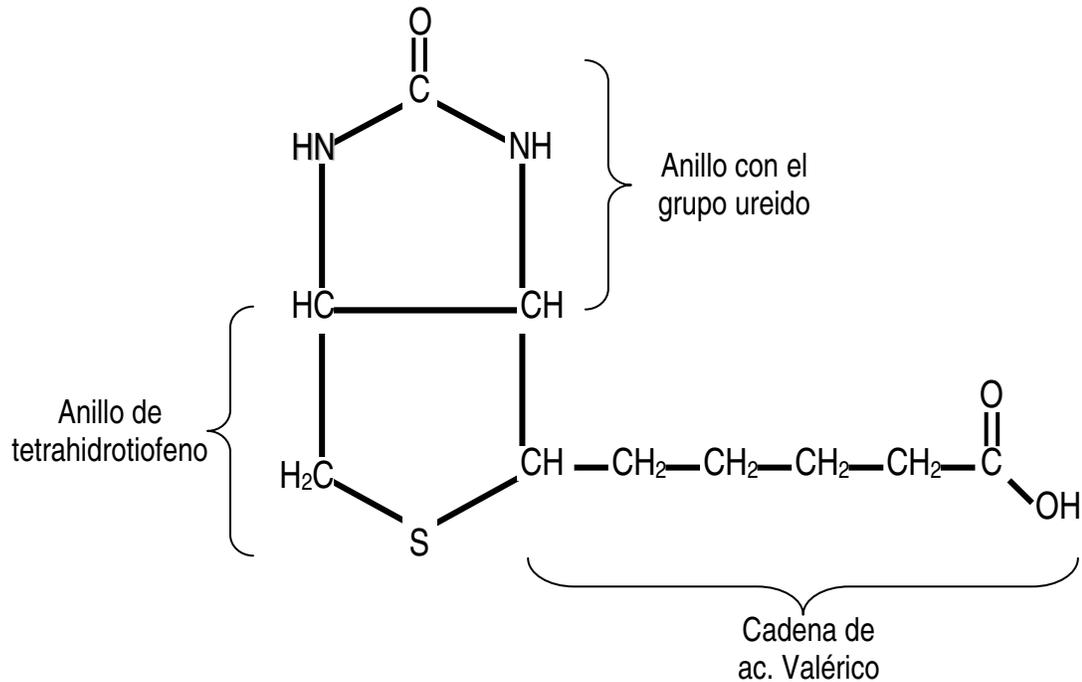


Fig. 1. Estructura de la molécula de biotina.

La biotina que obtenemos de la dieta esta presente en 2 formas; unida a proteínas o en forma libre. La biotina esta unida a proteínas mediante enlaces covalentes a polipéptidos en un residuo de lisina presente en un dominio específico. Una vez dentro del organismo esta unión es degradada por proteasas formando biocitina; la absorción de este compuesto es muy pobre, por lo que sufre una segunda degradación por la enzima biotinidasa dejando así libre a la biotina para su absorción por el intestino (2) (Fig. 2).

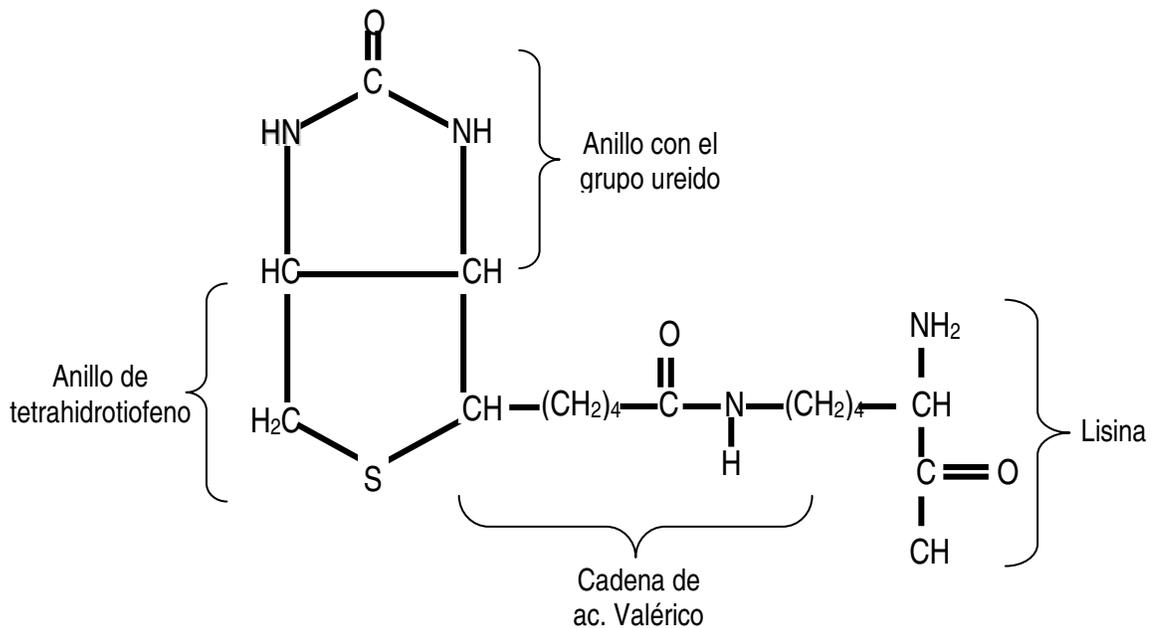


Fig. 2. Estructura de la molécula de biocitina.

En la naturaleza la biotina se encuentra en cantidades traza y en su mayor parte unida a proteínas (carboxilasas). Por esta razón, durante la evolución los organismos superiores desarrollaron un mecanismo para optimizar la utilización de esta vitamina y al que se conoce como ciclo de biotina.

Este sistema depende del funcionamiento de 3 tipos diferentes de proteínas: la primera el Transportador Multivitamínico dependiente de Sodio (SMVT) cuya función es transportar la biotina a través de la membrana plasmática; la segunda enzima es la Holocarboxilasa Sintetasa (HCS) que cataliza la biotinilación de las carboxilasas en una reacción de dos pasos en donde la biotina se activa mediante la hidrólisis de ATP para formar 5'-Biotinil-AMP (B-AMP), y como segundo paso el B-AMP es utilizado para transferir la biotina al residuo de lisina específico en una región altamente conservada de las apocarboxilasas con liberación de AMP; la tercer enzima del ciclo de utilización de biotina, es la Biotinidasa, que participa en la liberación de la biotina a partir de péptidos biotinilados producidos por la digestión o durante el recambio de carboxilasas endógenas (Fig. 3) (7, 51).

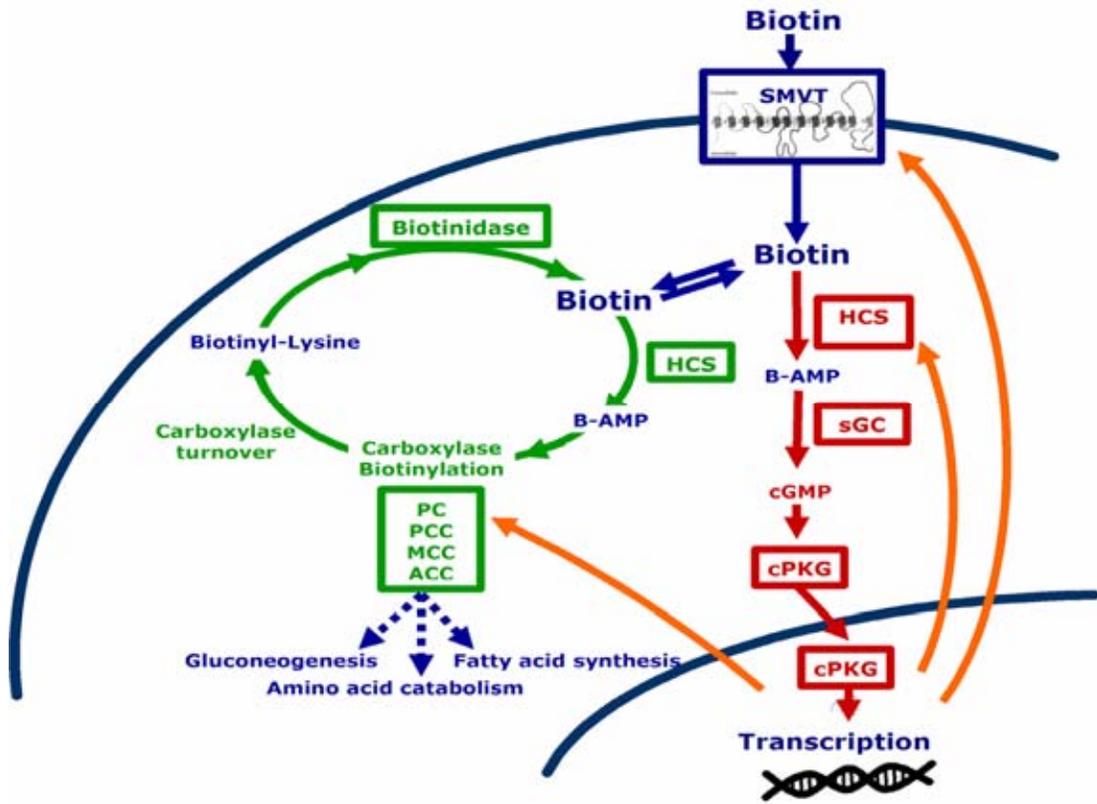


Fig. 3. Ciclo de biotina y cascada de transducción de señales dependiente de HCS.

2. CARBOXILASAS DEPENDIENTES DE BIOTINA.

En las células de los mamíferos, existen 5 enzimas que dependen de esta vitamina y que catalizan reacciones de fijación de CO₂ dependientes de ATP; tienen un papel clave en la síntesis de ácidos grasos, catabolismo de aminoácidos y gluconeogénesis (4). La función de la biotina en todas las carboxilasas es actuar como un acarreador de un grupo carboxilo activado, que proviene del bicarbonato (1, 2, 3). Las carboxilasas son sintetizadas de manera inactiva y son activadas mediante la unión de una molécula de biotina. La reacción de biotinilación de carboxilasas en organismos eucariontes es catalizada por la enzima Holocarboxilasa Sintetasa (HCS) (2, 3) (Fig. 4).

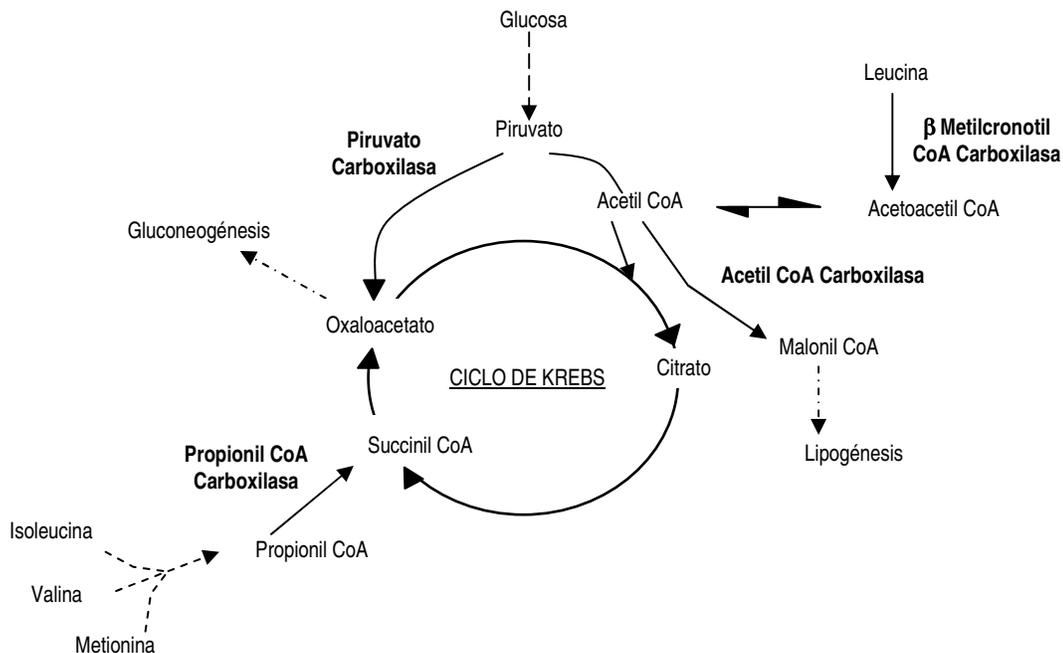


Fig. 4. Vías Metabólicas que involucran a las carboxilasas dependientes de biotina.

a. Acetil CoA carboxilasa (ACC).

La Acetil CoA es una carboxilasa involucrada en la conversión de acetil CoA en malonil CoA, una molécula reguladora de la lipogénesis que permite la síntesis y

elongación de los ácidos grasos (1, 2, 3). Esta enzima tiene 2 isoformas diferentes; ACC1 o ACC α , codificada por un gen localizado en el cromosoma 17, generando una proteína de 265 kDa aproximadamente (8, 11); el gen de la ACC2 o ACC β se encuentra en el cromosoma 12, y la proteína un peso de 280 kDa aproximadamente (11).

Las isoformas tienen funciones diferentes en la célula; la ACC1 controla la síntesis de ácidos grasos en el citosol mediante el malonil CoA (1, 6). Mientras que la ACC2 controla la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria mediante el malonil CoA, un inhibidor del transporte de ácidos grasos a la mitocondria.

Las isoformas de la ACC tienen una distribución diferente; la ACC1 esta presente en tejidos lipogénicos (hígado, riñón), glándula mamaria lactante y su funcionamiento es regulado por glucosa e insulina (7, 11); y la ACC2 se encuentra en músculo esquelético y el corazón, y se regula transcripcionalmente por factores específicos como MyoD (7, 8, 11) (Fig. 5).

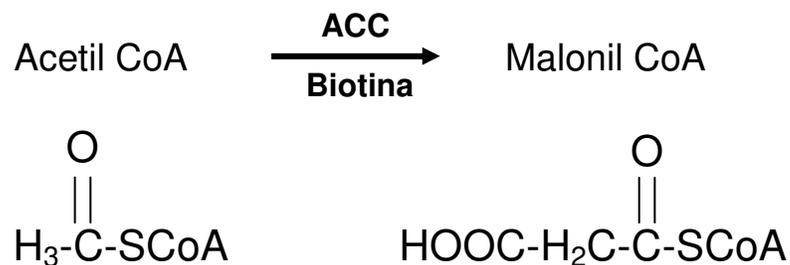


Fig. 5. Reacción de ACC.

b. Piruvato Carboxilasa (PC).

El gen que codifica a la enzima piruvato carboxilasa se localiza en el cromosoma 11q13.4-13.5 (10). Esta enzima es un polímero de 4 subunidades idénticas, tiene una conformación $\alpha_4\beta_4$; y un peso de 125-130 kDa aproximadamente, se encuentra en diversos tejidos como hígado, riñón, adipositos, glándula mamaria y adrenal (1, 7, 8).

La piruvato carboxilasa es un enzima reguladora de la gluconeogenesis; cataliza la formación de oxaloacetato a partir de piruvato, bicarbonato y ATP; y se localiza en la mitocondria (1, 7). Provee de esqueletos de carbonos a los aminoácidos aspartato y glutamato (3). Al mantener los niveles de los intermediarios del ciclo de krebs vía anaplerosis (2), esta enzima esta involucrada en la biosíntesis de sustancias neurotransmisoras, provee de α -cetoglutarato y glutamina que sirven como precursores para el restablecimiento de la reserva de neurotransmisores en las terminales presinápticas (8) (Fig. 6).

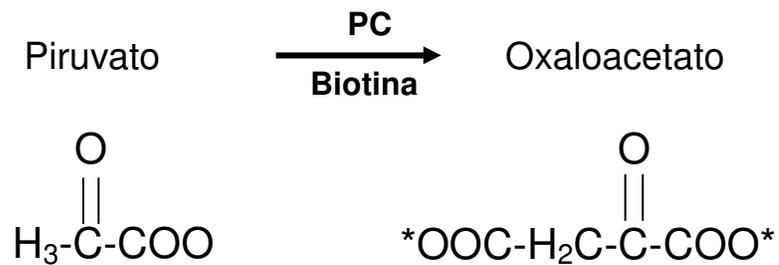


Fig. 6. Reacción de PC.

c. Propionil CoA carboxilasa (PCC).

La propionil CoA carboxilasa se encuentra en la mitocondria; esta conformada por 2 polipéptidos diferentes; PCCA o subunidad α de un peso de 70-72 kDa aproximadamente, codificado por un gen localizado en el cromosoma 13q32 (1, 7, 9). El gen de PCCB o subunidad β se encuentra en el cromosoma 3q13.3-q22, contiene 15 exones y genera una proteína de un peso de 54-56 kDa. Esta carboxilasa presenta una conformación $\alpha_4\beta_4$ o $\alpha_6\beta_6$, y en la subunidad α es donde se localiza el dominio de unión a la biotina. (1, 7, 9).

PCC cataliza la conversión de propionil CoA a metilcrotonil CoA que entra al ciclo de krebs vía succinil CoA (1); el propionil CoA proviene del catabolismo de los aminoácidos esenciales isoleucina, treonina, metionina, valina; de ácidos grasos de cadena impar y de la cadena lateral del colesterol (1, 3, 9) (Fig. 7).

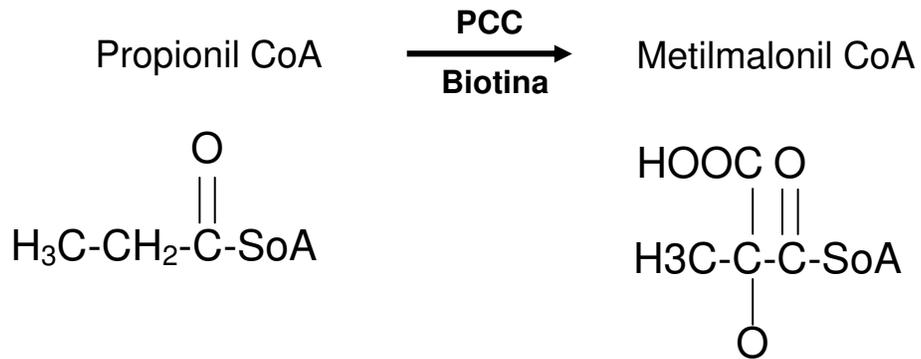


Fig. 7. Reacción de PCC.

d. Metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC).

La metilcrotonil CoA carboxilasa es una enzima formada por 2 polipéptidos diferentes, con un peso de 76 kDa aproximadamente. La biotina se une al polipéptido más grande; y tiene 4 moléculas de biotina por molécula (1). Esta enzima, localizada en la mitocondria, cataliza la conversión de metilcrotonil CoA a metilglutacotil CoA una reacción clave en la degradación de leucina (Fig. 8).

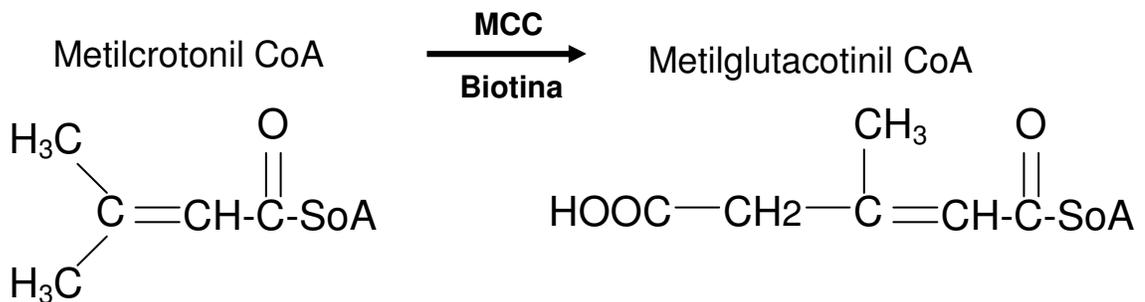


Fig. 8. Reacción de MCC.

3. HOLOCARBOXILASA SINTETASA (HCS).

El gen que codifica la HCS humana se encuentra localizado en el cromosoma 21q22.1, abarca aproximadamente 240 kb, comprende 14 exones y 13 intrones, de los intrones, el 9 es el más largo. Este gen genera una proteína de 726 aminoácidos, con un peso molecular de 80 kDa aproximadamente. Tiene 3 sitios de inicio en su N-terminal; en las metioninas 1, 7 y 58; en su región C-terminal se encuentra el sitio de unión para biotina y ATP (13, 19, 20). Experimentos hechos en placenta humana, detectaron 3 isoformas de esta enzima de pesos de 86, 82 y 76 kDa respectivamente (19). Su actividad óptima es en un pH de 8-8.5. (22).

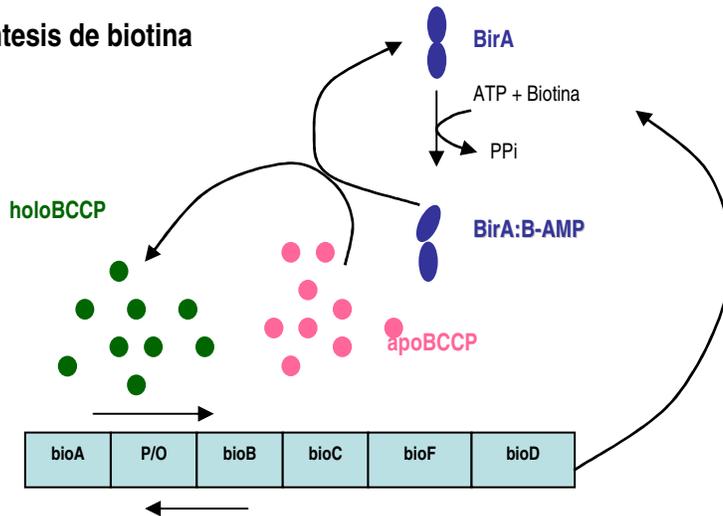
La reacción de biotilación se lleva a cabo mediante una reacción de dos pasos dependiente de ATP. En la primera fase de la reacción, la biotina es transformada a través de la hidrólisis de ATP en 5'-Biotinil-AMP (B-AMP). En la segunda mitad de la reacción el B-AMP es utilizado por la HCS para transferir la biotina a un aminoácido de lisina localizado en el dominio Ala-Met-Lys-Met conservado en todas las carboxilasas dependientes de biotina y al que se conoce como sitio de unión de biotina. En la mayoría de las carboxilasas con excepción de la ACC, el sitio de unión de biotina se encuentra hacia el extremo carboxilo terminal del péptido biotilado. (1, 3, 7).

En bacterias, la HCS tiene su homólogo; BirA, una enzima de 321 pb, y un peso de 34 kDa. Esta enzima es un dímero; esta formado por 3 dominios: El N-terminal, donde se unen las proteínas con dominios de unión al ADN; un dominio central, con una similitud al dominio SH2; y un dominio C-terminal con similitud al dominio SH3 (1, 18).

BirA tiene 2 funciones: adicionar la biotina para activar a la ACC (BCCP), la única carboxilasa presente en bacterias y unirse a una secuencia específica de ADN para reprimir la síntesis de biotina (18). El operón de biotina (BIO) esta conformado por 5 genes encargados de la síntesis de la vitamina: *bioA*, *bioB*, *bioF*, *bioC* y *bioD*; y

ocupan una región que abarca 5.8 kb. Cuando la bacteria esta creciendo en un medio pobre en biotina, el B-AMP es utilizado para la biotinilación de ACC (Fig. 9a); pero cuando la bacteria se encuentra en un medio donde la biotina es abundante o las moléculas de ACC han sido biotiniladas en su totalidad, la acumulación de B-AMP favorece la formación del complejo BirA-B-AMP. Este complejo es capaz de unirse a la secuencia del operador del operón de biotina (40pb) y actuar como un correpresor, inhibiendo la expresión de los genes necesarios para la síntesis de biotina (18, 53, 54) (Fig. 9b).

a.- Síntesis de biotina



b.- Represión de la transcripción

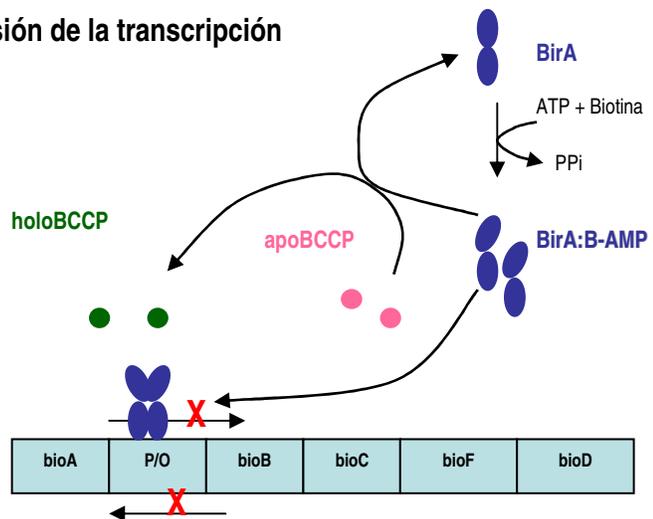


Fig. 9. Modelos de la función regulativa de BirA. *a.* Síntesis de biotina. *b.* Represión de la transcripción del operon de biotina. Adaptado de Beckett D. 2007 (18).

Se han hecho comparaciones entre las secuencias de la HCS humana y la BirA bacteriana que han probado la existencia de una homología en 130 aminoácidos en los extremos carboxilo de las enzimas; pero también difieren en cuanto a longitud y secuencia del extremo amino terminal. Se ha demostrado que la HCS humana es capaz de biotinar la ACC bacteriana y viceversa (55); sin embargo en la HCS humana no se conserva la función de unión al ADN.

4. BIOTINIDASA (BTD).

El gen que codifica para la biotinidasa se encuentra en el cromosoma 3p25, tiene 4 exones; exón A de 79 pb, exón B de 265 pb, exón C 150 pb y exón D de 1502 pb; un marco de lectura de 1629 pb, su ADNc tiene 2 secuencias de inicio (metionina 1 y 60). Es una glicoproteína de 543 aminoácidos, con un peso de 57-68 kDa, presenta 6 sitios de glicosilación; por lo que la enzima tendría un peso de 70-80kDa (1, 2, 16). Análisis hidrofóbicos han determinado que tiene un 20% de carbohidratos. Tiene un punto isoeléctrico de 4.6 (1, 16); y 9 isoformas entre los pH 4.15 y 4.35. Es relativamente estable al calor, y se desnaturaliza por completo al incubarla a 70°C por 15min (16).

Se han identificado 3 variantes del ARNm de biotinidasa: 1a, 1b y 1c. La variante 1c se expresa solamente en testículos. Se ha reportado que estas variantes se generan por el splicing del extremo 5' del ARNm de biotinidasa y dependiendo del sitio de traducción de las variantes, se tiene una señal específica que resulta en una localización tejido-específica de biotinidasa (17). La variante 1a contiene una señal para un péptido de 41 aminoácidos, con una localización en el núcleo, mitocondria y retículo endoplasmático. La variante 1b produce un péptido de 21 a 30 aminoácidos (17).

La biotinidasa es una enzima biotina-amida amidohidrolasa; hidroliza específicamente d-biotinilamidas y ésteres, por lo que no libera la biotina que está unida a carboxilasas intactas; primero las carboxilasas tienen que ser degradadas

por proteasas y peptidasas en biocitina o péptidos pequeños, para que la hidrólisis se lleve a cabo y la biotina pueda ser reciclada (1, 15, 16), esta función también la realiza sobre la biotina unida a proteínas provenientes de los alimentos (2).

La mayor actividad de biotinidasa en animales se da en suero, pero la enzima también esta presente en hígado, riñón, glándula adrenal, células secretoras como fibroblastos y leucocitos, jugo pancreático, gránulos zimógenos (3, 15), sin embargo su actividad es baja en cerebro y líquido cerebrospinal (4, 15). Se ha reportado que la biotinidasa se localiza en el retículo endoplasmático rugoso y en el aparato de Golgi, de acuerdo lo observado en fraccionamientos subcelulares (15).

La actividad máxima de esta hidrolasa se da en un pH de 5.5 que esta muy bajo al fisiológico (pH 7.4); pero este pH es adecuado para su actividad en el intestino, donde actúa sobre la biotina unida a proteína proveniente de los alimentos (2). La tasa de hidrólisis de biotina sobre sus sustratos disminuye con el aumento del tamaño del péptido (16)

Debido al pH ácido y la concentración no fisiológica que se requiere para la hidrólisis de biotina; se ha sugerido que esta no sea su principal función a menos que el valor de Km disminuya por acción de un modificador (16). La cantidad de biotinidasa en suero es mucho mayor que la de biotina, sugiriendo que esta enzima podría actuar como una proteína de unión y transporte de biotina, ya que es la única proteína en suero capaz de unir biotina, además de que cuenta con 2 sitios de unión a biotina (3nM, 59nM) y que la mayoría de la biotina no se encuentra unida a proteína (16). Sin embargo esto se objeta debido a la baja afinidad por biotina y que la concentración de la vitamina es baja (2).

En 1995, se propuso que la biotinidasa sufría modificaciones al incubarse en presencia de biocitina, siendo capaz de transferir la biotina a otras moléculas como nucleófilos no específicos o aceptores específicos como las histonas. A esta

actividad se le denominó biotinil transferasa; y se lleva a cabo en un pH óptimo de 7.5 y a una concentración de biocitina cercana a la estimada en suero (2, 16).

6. TRANSPORTE DE BIOTINA

Dada la poca disponibilidad de biotina y la importancia de la vitamina en el metabolismo, su absorción y transporte debe de ser muy eficiente. La absorción de biotina libre ocurre en el lumen del intestino de una manera activa a través de un transportador dependiente de sodio presente en la membrana de los enterocitos. Este transportador es saturable; pero cuando la vitamina se encuentra en grandes cantidades, se transporta por difusión pasiva (4, 6, 7).

Prasad y colaboradores en 1998, aislaron el ADNc de un transportador capaz de transportar biotina, ácido pantoténico y ácido lipoico en células HeLa, al que denominaron Transportador Multivitamínico dependiente de Sodio 1 (SMVT1) (2). La dependencia de sodio de este transportador, se probó retirando el sodio del medio o cambiando los cationes monovalentes (2). La especificidad la confiere la cadena de ácido valérico que comparten los 3 compuestos que transporta. Mediante diversos experimentos se ha determinado que la mayor absorción de biotina ocurre en el yeyuno (2).

El gen de este transportador se encuentra en el cromosoma 2p23, tiene 17 exones. La proteína es de 634 aminoácidos, con masa molecular de 69 kDa aproximadamente, presenta 12 dominios transmembranales (2, 12), y tiene una carga positiva de 5.4 a un pH fisiológico (12) lo que le permite interactuar con la biotina que es una molécula con carga negativa (Fig. 10).

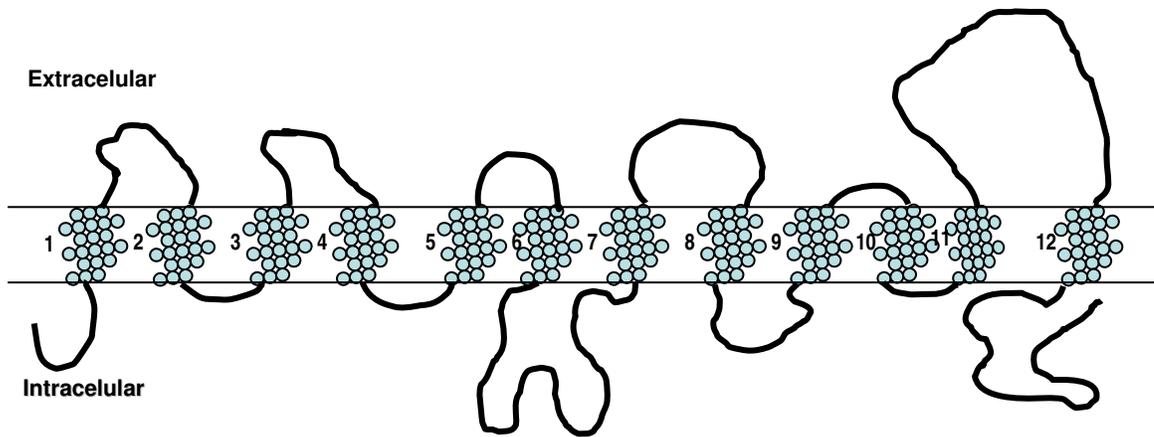


Fig. 10. Estructura del transportador de biotina SMVT. Adaptado de Prasad et al, 1999 (52).

Algunos trabajos han sugerido que el 80% de la biotina se encuentra libre, menos del 10% esta unida reversiblemente y 12% esta unida covalentemente a proteínas presentes en el plasma (6) y esto facilitaría la absorción de la vitamina por acción del transportador.

Hay cierto debate sobre la actividad de este transportador debido a la alta K_m por la biotina, que es entre 8 y 15 μM mientras que la concentración de biotina circulante es de 0.5-2nM aproximadamente; y la afinidad por el ácido pantoténico es de 2 μM (2, 3, 12). Se ha hablado de otro transportador con una mayor afinidad que cae en el rango nanomolar (2.6nM) y que se describió en las células mononucleares de la sangre periférica y keratocitos; pero se ha comprobado que este transportador parece no funcionar en otro tipo de células como CaCo2 y HepG2 (12).

6. ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA BIOTINA

En humanos, se han reportado deficiencias individuales en la actividad de las 4 carboxilasas. Estas deficiencias son originadas por la síntesis anormal de las carboxilasas afectando sus estructuras; por lo que los pacientes no responden a un tratamiento con dosis farmacológicas de biotina (1, 3). Cuando se presentan

deficiencia en la actividad de más de una carboxilasa, a este padecimiento se le conoce como Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC), y pueden ser ocasionado por desordenes autosomales recesivos en el metabolismo de la biotina, teniendo como resultado la disminución marcada en la actividad de las carboxilasas. Se presentan 2 formas de la enfermedad que se basa en la edad en la que se presentan los síntomas y la naturaleza de los mismos; DMC neonatal (deficiencia de HCS) y DMC juvenil (deficiencia de biotinidasa) (1, 4, 7).

a. Deficiencia de ACC.

En 1981, Blom reportó a un paciente que presentaba deficiencia de ACC; la actividad reducida de esta enzima ocasiona una síntesis anormal de ácidos grasos de cadena larga, incluyendo ácidos grasos poliinsaturados, resultando en un metabolismo anormal de prostaglandinas y sustancias relacionadas. Dentro de las anomalías bioquímicas se incluyen la acumulación de 1-etil-3-cetohexanoil-CoA, ácido 2-etil-hidroxihexanoico y ácido 2-etil-hexadecanoico (1, 6).

b. Deficiencia de PC.

Esta enfermedad es un desorden autosomal recesivo que tiene una frecuencia de 1:250,000 (7). Los pacientes que presentan deficiencia de PC pueden presentar 2 formas de la enfermedad: en la forma más severa no se produce una piruvato carboxilasa, se presenta en el periodo neonatal con una acidosis metabólica, hepatomegalia y muerte antes de los 3 meses; la otra forma, menos severa produce una piruvato carboxilasa enzimáticamente defectuosa y se observa un desarrollo psicomotor retardado y acidemia láctica crónica; pero una sobrevivencia más larga (3, 10)

El diagnóstico de esta enfermedad se hace midiendo las concentraciones de aminoácidos y ácidos orgánicos en la orina (10); también se observa un aumento en los niveles de ácido láctico, ácido pirúvico y alanina en la sangre (1, 3). El diagnóstico

es confirmado por la medición de la actividad de PC en fibroblastos o en algún otro tejido, aunque su actividad en plasma también es baja (7, 10).

Los síntomas que se presentan son hipotonía, convulsiones, ataxia, retraso en el desarrollo, acidemia láctica, hipoanemia, citrulinemia, retraso mental, lesiones en el cerebro similares a una isquemia, hemorragias periventriculares, efusiones subdurales. (6, 7, 10). El rango lactato a piruvato es más alto en comparación con los normales, los niveles de glutamina y aspartato son insuficientes resultando en elevación de citrulina y lisina (10).

Los síntomas neurológicos que se observan en la deficiencia de biotina y de biotinidasa se presentan por la acumulación de ácido láctico en el cerebro (6). El bloqueo del ciclo de la urea, provoca la hiperamonemia (10).

c. Deficiencia de PCC.

Los pacientes que presentan una deficiencia en la actividad de PCC, se caracterizan por presentar una acidemia propionica; que puede ser controlada con una dieta baja en proteínas (1, 7). Se han reportado diferentes mutaciones que generan la deficiencia de PCC; 24 mutaciones en el gen de PCCA y 30 mutaciones para el gen de PCCB (7).

Al bloquearse el metabolismo del ácido propiónico, las vías alternas del propionil CoA, generan características bioquímicas como un aumento en la excreción de metabolitos secundarios como ácido 3-hidroxi propionico un producto de oxidación; 2-metilcitrato que se forma por la condensación de propionil CoA y propionilglicina en orina; cantidades elevadas de ácido propiónico y ácidos orgánicos en la sangre (1, 3, 6). Los síntomas clínicos presentados son episodios de vomito, letárgica, hipotonía, acidosis láctica, cetoacidosis, cetosis severa, y acidosis metabólica progresiva hasta llegar a coma y fallas en el crecimiento y retraso mental (3, 7).

En pacientes severamente afectados, se excretan otro tipo de metabolitos como propionilglicina, tigilglicina, ácido 3-hidroxi-n-valérico en la orina y presentan altas concentraciones de amonio en la sangre (3). Se ha determinado que la excreción de ácido 3-hidroxi-3-oxopropionico no es un buen indicador de la deficiencia marginal de biotina (6).

d. Deficiencia de MCC.

Los pacientes que presentan una deficiencia aislada de MCC se dividen en 2 categorías; los que responden a biotina y los que son resistentes a ella (1). Se han reportado 3 pacientes a la fecha; 2 hermanos que permanecieron asintomáticos estando en una dieta baja en proteína. Un aumento en la proteína de la dieta de estos pacientes provoco diferentes síntomas clínicos y bioquímicos; en uno de ellos; episodios de vomito, hiperglicemia, acidosis, algo de pérdida de cabello; mientras que en el otro hipoglicemia severa, acidosis metabólica media, hipotonía y coma (3).

La deficiencia aislada de MCC causa un bloqueo en el catabolismo de leucina, las vías alternativas para el metabolismo de 3-metilcrotonil CoA, llevan a la formación de ácido 3-hidroxi-3-oxovalerico formado por hidratación; 3-metilcrotonilglicina que se forma en la reacción catalizada por la glicina-N-acilasa; y cantidades variables de ácido 3-metilcrotonico (1, 3, 6).

Ninguno de los 3 pacientes respondió a la terapia con dosis farmacológicas de biotina (3). Estudios realizados en humanos, han sugerido que la excreción de ácido 3-hidroxi-3-oxovalerico puede funcionar como un indicador sensible y temprano de la deficiencia de biotina; ya que la deficiencia de MCC es una enfermedad frecuente en USA con una incidencia de 1:50,00 nacimientos (6, 7).

e. Deficiencia de HCS.

La deficiencia en la actividad de HCS afecta la activación de las carboxilasas ocasionando una descompensación metabólica severa (7, 22). Este desorden es una enfermedad autosomal recesiva por lo que se presenta en hombres y mujeres. La edad en la que se presentan los síntomas varia, desde las pocas horas del nacimiento hasta los 21 meses de edad, aunque generalmente los síntomas se presentan antes de los 3 meses (3, 4, 7).

Los síntomas observados son diversos, los síntomas más comunes son dificultades respiratorias; también se observa hipotonía, regresión o retraso en el desarrollo, acidosis metabólica, aciduria orgánica, convulsiones, lesiones en la piel, alopecia, acidemia láctica, problemas cardiovasculares o alimenticios, encefalopatías, en algunos casos coma, excreción de metabolitos como ácido 3-hidroxivalerico, 3-metilcrotonilglicina, ácido 3-hidroxipropionico, ácido 2-metilcátrico, lactato, triglicina en la orina (3, 4, 7, 22).

En 1971, basándose en las observaciones de los síntomas de un paciente diagnosticado con deficiencia de MCC; la medición de las actividades de las carboxilasas MCC, PCC y ACC, los síntomas presentados, y a que el paciente respondiera a un tratamiento con dosis farmacológicas de biotina; se llego a la conclusión de que el defecto en estos pacientes podría ser la HCS (3, 4). Para probar esto; se utilizó como sustrato una carboxilasa semipura de hígado de rata; se midió la actividad de HCS en este paciente y se observo que la HCS tenía una afinidad disminuida por biotina; una Km por biotina 60 veces más alta de la de un paciente normal y una Vmax 30-40% más alta (3, 7).

Los síntomas que se presentan en estos pacientes son revertidos con dosis farmacológicas que van desde 10mg hasta 100mg al día; y la mayoría de los pacientes responde a este tratamiento (3, 7). Con la terapia de biotina, ninguno de los pacientes requiere una restricción en la dieta proteica (3).

Las mutaciones en el gen de HCS que causan esta enfermedad, pueden deberse a deleciones, que terminan prematuramente a la enzima o que disminuyen la actividad de sintetasa o mutaciones puntuales que afectan el sitio de unión con biotina (4). Las mutaciones que caen en la región C-terminal, la región catalítica de la enzima causan un aumento de K_m por biotina. Las mutaciones que caen en la región N-terminal reducen la V_{max} no la K_m y por lo tanto los pacientes responden menos a la terapia con biotina (7, 22). Por lo tanto; esta deficiencia causa un incremento en la K_m por biotina y/o una disminución en la V_{max} (21).

Hay diversos ensayos para medir la HCS, los que se basan en la incorporación de biotina radioactiva; utilizando como sustrato apocarboxilasas purificadas de ratas que estuvieron en una dieta deficiente de biotina o generadas a partir de células que crecieron en un medio deficiente de biotina o la apo-proteína carboxi de *E. coli* (apo-carboxyl carrier protein) (21). Los que miden la síntesis de su producto; el B-AMP, donde hidroxilamina reacciona con el B-AMP formando biotinihidroxilamato un compuesto más estable a un pH de 7-8 y la biotina excedente se separa por cromatografía de intercambio iónico (21). Los que miden la actividad de las carboxilasas proveniente de linfocitos aislados de sangre, o prenatalmente midiendo la actividad en amniocitos obtenidos por amniocintesis (3) (Fig. 11).

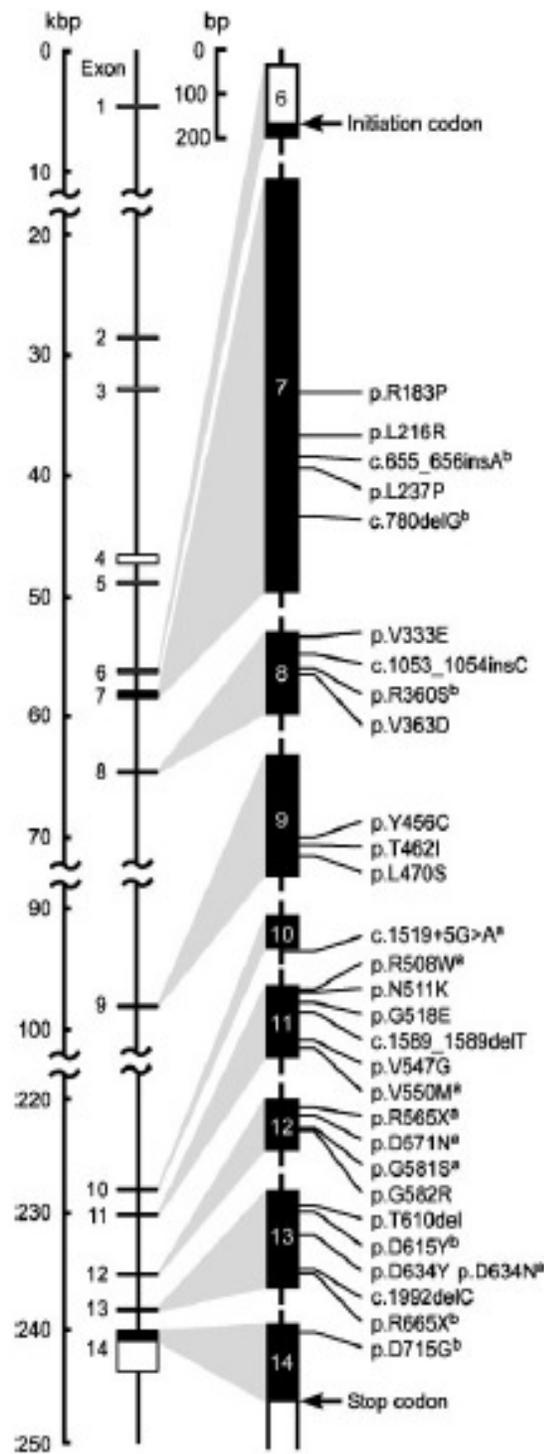


Fig. 11 Mutaciones reportadas para del gen de HCS. Adaptado de Suzuki et al, 2005 (58).

f. Deficiencia de Biotinidasa.

La deficiencia de biotinidasa (OMIM 253260) es un desorden autosomal recesivo (6), provocado por mutaciones en la enzima, que resulta en un defecto en la liberación de biotina unida en los alimentos o proveniente del reciclamiento de las carboxilasas (2, 7). En estos pacientes se ve afectado el reciclamiento de la vitamina, la activación de las carboxilasas por la actividad de HCS muestra una cinética normal en estos pacientes (3).

En 1983, Barry Wolf y sus colaboradores, determinaron que los pacientes que presentaban la deficiencia múltiple de carboxilasas juvenil, tenían una deficiencia en la actividad de biotinidasa en suero (2). Pero antes de llegar a esa conclusión, se había sugerido que estos pacientes tenían un defecto en la absorción de la vitamina en el intestino (3).

Debido a los síntomas clínicos y bioquímicos que se observan en los pacientes deficientes de biotinidasa, se ha propuesto que están relacionados con la actividad deficiente de las carboxilasas como consecuencia de una deficiencia secundaria de biotina (3).

Los pacientes presentan los síntomas después de los 3 meses de edad pero en algunos casos se presentan en la niñez o durante la adolescencia, los síntomas son similares a los presentados en la deficiencia de HCS; hipotonía, lesiones en la piel, alopecia parcial o completa, episodios de acidosis metabólica de por vida, hiperamonemia, problemas respiratorios como hiperventilación, estridor, apnea, candidiasis, conjuntivitis, acidemia láctica, aciduria orgánica con excreciones de sus metabolitos 3-metilcrotonilglicina, ácido 3-hidroxisvalérico, ácido hidroxipropiónico, ácido 2 metilcítrico (3, 4, 7, 17); y síntomas neurológicos muy particulares como retraso mental o regresión, convulsiones, ataxia, atrofia óptica, neuropatías ópticas progresivas, escotomas y pérdida del oído. En algunos pacientes estos síntomas neurológicos se han llegado a desarrollar hasta los 10 años (3, 4, 17). Se ha

reportado que la pérdida del oído ocurre en el 76% de los pacientes que presentan esta enfermedad (24).

La deficiencia de biotinidasa se clasifica en 2 formas: la deficiencia parcial donde los pacientes presentan 10-30% de la actividad de biotinidasa en suero con una incidencia de 1 en 129,282 (1:112,700– 1:177,000); y la deficiencia profunda donde presentan menos del 10% de la actividad de biotinidasa en suero, la incidencia es de 1 en 112,271 (1:85,000–1:145,000). Cuando hay una deficiencia combinada la incidencia es de 1 en 60,089 (1:49,500– 1:177,000); 1 de cada 23 individuos es heterocigoto para la deficiencia de biotinidasa (17, 23).

Debido a la incidencia de esta enfermedad, la deficiencia de biotinidasa ha sido aceptada en los programas de tamizaje para recién nacidos desde 1984, ya que sus síntomas no son reconocidos fácilmente a menos que se presenten y por que involucra un tratamiento de por vida (life-threatening). La detección es relativamente sencilla mediante una muestra de sangre en papel filtro, método utilizado comúnmente para detectar otros desordenes metabólicos (3, 23).

Los pacientes usualmente responden a dosis de 5-20mg de biotina al día, revirtiendo los síntomas clínicos y bioquímicos presentados; a excepción de los síntomas neurológicos como atrofia óptica y pérdida del oído, que no pueden ser revertidos una vez que se presentan (3, 17) (Tabla 1).

No.	MUTACIÓN	LOCALIZACIÓN	NUCLEÓTIDO	EFEECTO	REFERENCIA
1	99C>T	Exón 2	99	Sin cambio	35
2	98-104del7 ins3	Exón 2	98-104	Terminación prematura de la proteína, Frameshift	24-29, 35-37
3	100G>A	Exón 2	100	Cambio de aminoácido, 3' Splice site	25, 28, 32, 36, 37
4	133G>A	Exón 2	133	Cambio de aminoácido, G45R	30, 36
5	133G>A;865G>A	Exón 2; Exón 4	133;865	Cambio de aminoácido, G45R;A289P	28, 37
6	133G>C;1271G>C	Exón2; Exón 4	133;1271	Cambio de aminoácidos, G45R;C424S	35
7	136G>T	Exón2	136	Cambio de aminoácido, E46X	26
8	159C>A;160G>T	Exón 2	159;160	Cambio de aminoácido; Terminación, H53Q;E54ter	35
9	171T>G	Exón 2	171	Terminación prematura, Y57Ter	24, 28, 32
10	184G>T	Exón 2	184	Cambio de aminoácido, V62L	28, 37
11	184G>A	Exón 2	184	Cambio de aminoácido, V62M	26-29, 36
12	190G>A	Exón 2	190	Cambio de aminoácido, E64K	30
13	194ins4	Exón 2	194	Inserción de 4 nucleótidos, Frameshift	24
14	212T>C	Exón 2	212	Cambio de aminoácido, L71P	35
15	212T>C;236G>A	Exón 2; Exón 2	212;236	Cambio de aminoácidos, L71P;R79H	26
16	234C>T	Exón 2	234	Cambio de aminoácido, S78S	28
17	235C>T	Exón 2	235	Cambio de aminoácido, R79C	24, 28, 32, 36
18	235C>T;1361A>C	Exón2; Exón 4	235;1361	Cambios de aminoácidos, C79R;Y434C	35
19	236G>A	Exón 2	236	Cambio de aminoácido, R79H	36
20	236G>A;212T>C	Exón 2	236;212	Cambio de aminoácidos, R79H;L71P	34
21	245C>A	Exón 2	245	Cambio de aminoácido, A82D	26, 34
22	246-254del9	Exón 2	246	Delección de 9 nucleótidos, L83-L85del	27, 28, 37
23	261C>T	Exón 2	261	Codón de paro prematuro, Q88Stop	25
24	262C>T	Exón 2	262	Cambio de aminoácido, Q88X	27, 28, 37
25	278A>G	Exón 2	278	Cambio de aminoácido, Y93C	30
26	283C>T;1330G>C	Exón 2; Exón 4	283;1330	Terminación prematura; cambio de aminoácido, Q95term;D444H	35
27	298G>A	Exón 2	298	Cambio de aminoácido, A100T	30
28	310G>T	Exón 3	310	Cambio de aminoácido, Splice site	26, 28, 34, 37
29	326T>G	Exón 3	326	Cambio de aminoácido, V109G	28, 29
30	334G>A	Exón 3	334	Cambio de aminoácido, E112K	26, 34
31	334G>C	Exón 3	334	Cambio de aminoácido, cambio de carga, E112Q	25-28, 37
32	341G>T	Exón 3	341	Cambio de aminoácido, G114V	35
33	364A>G	Exón 3	364	Cambio de aminoácido, R122G	28, 37
34	382T>G	Exón 3	382	Cambio de aminoácido, F128V	28
35	393delC	Exón 3	393	Delección de 1 nucleótido, Frameshift	30
36	445T>C	Exón 3	445	Cambio de aminoácido, F149L	28, 37
37	454A>C		454	Cambio de aminoácido, T152P	26
38	459G>A	Exón 4	459	Cambio de aminoácido, 5' splice site	25, 27, 28, 37
39	466C>T	Exón 4	466	Terminación prematura, Q156Ter, Q156X	28, 31
40	469C>T	Exón 4	469	Cambio de aminoácido, R157C	26
41	470G>A	Exón 4	470	Cambio de aminoácido, R157H	25, 28, 29, 32, 35, 37
42	470G>A;1330G>C	Exón 4; Exón 4	470;1330	Cambio de aminoácidos, R157H;D444H	28, 37
43	485C>T	Exón 4	485	Cambio de aminoácido, A162V	28, 37
44	490-491del2	Exón 4	490-491	Delección de 2 nucleótidos, Frameshift	28, 31
45	511G>A;1330G>C	Exón 4; Exón 4	511	Cambio de aminoácidos, A171T;D444H	28, 29, 33, 35-37
46	515A>G	Exón 4	515	Cambio de aminoácido, N172S	28, 29
47	528G>T	Exón 4	528	Cambio de aminoácido, K176N	28, 37
48	532C>G	Exón 4	532	Cambio de aminoácido, L278V	34
49	544delA	Exón 4	544	Delección de 1 nucleótido, Frameshift	28, 31
50	549delC	Exón 4	549	Delección de 1 nucleótido, Frameshift	33
51	557G>A	Exón 4	557	Cambio de aminoácido, C186Y	28, 32
52	583A>G	Exón 4	583	Cambio de carga, N195D	25, 27, 28, 37
53	584A>G	Exón 4	584	Cambio de aminoácido, N195S	26
54	587C>G	Exón 4	587	Cambio de aminoácido, T196R	24, 28, 32
55	594delC	Exón 4	594	Delección de 1 nucleótido, Frameshift	33
56	594-596del3	Exón 4	594-596	Delección de 3 aminoácidos (Valina), V199del	25, 26, 28, 37
57	595G>A	Exón 4	595	Cambio de aminoácido, V199M	26, 30, 36
58	595G>A	Exón 4	595	Cambio de aminoácido, V198M	30
59	629A>G	Exón 4	629	Cambio de aminoácido, Y210C	25, 27, 28, 37
60	631C>T	Exón 4	631	Cambio de aminoácido, R211C	26, 28, 37

61	641G>A;1330G>C	Exón 4; Exón 4	641;1330	Cambio de aminoácidos, N214S;D444H	35
62	643C>T	Exón 4	643	Cambio de aminoácido, L215F	24-28, 37
63	645C>T	Exón 4	645	Cambio de aminoácido, P391S	25, 28
64	652G>C	Exón 4	652	Cambio de aminoácido, E218Q	26, 34
65	654G>C	Exón 4	654	Cambio de aminoácido, E218D	35
66	682G>T	Exón 4	682	Cambio de aminoácido, D228Y	28
67	734G>A	Exón 4	3734	Cambio de aminoácido, C245Y	35
68	755A>G	Exón 4	755	Cambio de aminoácido, D262G	28
69	755A>G	Exón 4	755	Cambio de aminoácido, D252G	36, 37
70	757C>T	Exón 4	757	Cambio de aminoácido, P253S	35
71	793A>T	Exón 4	793	Cambio de aminoácido, H265L	30
72	832C>G	Exón 4	832	Cambio de aminoácido, L278V	26, 34
73	833T>C	Exón 4	833	Cambio de aminoácido, L278P	25, 27, 28, 34
74	836T>G	Exón 4	836	Cambio de aminoácido, L279W	28, 29
75	887T>G	Exón 4	887	Cambio de aminoácido, V296G	30
76	929G>A	Exón 4	929	Cambio de aminoácido, G310E	28, 32
77	932G>A	Exón 4	932	Cambio de aminoácido, S311N	28, 37
78	933delT	Exón 4	933	Delección de 1 nucleótido, Frameshift	25-28, 30, 34, 37
79	934G>A	Exón 4	934	Cambio de aminoácido, G313S	30
80	935G>A	Exón 4	935	Cambio de aminoácido, cambio de carga, G312D	25, 27, 28, 37
81	968A>G	Exón 4	968	Cambio de aminoácido, H323R	28
82	1049delC	Exón 4	1049	Delección de 1 nucleótido, Frameshift	30
83	1052delC	Exón 4	1052	Delección de 1 nucleótido, Frameshift	30, 35
84	1106C>T	Exón 4	1106	Cambio de aminoácido, P368L	30
85	1158G>A	Exón 4	1158	Cambio de aminoácido, W386X	28, 37
86	1171C>T;1334G>T	Exón 4	1171;1334	Cambio de aminoácidos, P391S;G445V	35
87	1191-1192del	Exón 4	1191-1192	Delección de 1 nucleótido, Frameshift	30
88	1207T>G;1330G>C	Exón 4; Exón 4	1207;1330	Cambio de aminoácidos, F403V;D444H	28, 37
89	1211C>T	Exón 4	1211	Cambio de aminoácido, T404I	33
90	1227-1241del15ins11	Exón 4	1227-1241	Formación de estructura palindrómica, Frameshift	25, 28, 37
91	1239delC	Exón 4	1239	Delección de 1 nucleótido, Frameshift	30
92	1239-1250del12	Exón 4	1239-1250	Delección de 12 nucleótidos, Frameshift	25, 27, 30
93	1240-1251del12	Exón 4	1240-1251	Delección de 12 nucleótidos, 414-V417del	28, 37
94	1253G>C	Exón 4	1253	Cambio de aminoácido, C418S	26, 34
95	1267T>C	Exón 4	1267	Cambio de aminoácido, afecta plegamiento de la enzima, C423R	25, 28, 37
96	1268G>C	Exón 4	1268	Cambio de aminoácido, C423W	28, 29
97	1271G>A	Exón 4	1271	Cambio de aminoácido, C424Y	35
98	1313A>G	Exón 4	1313	Cambio de aminoácido, Y138C	30
99	1314T>A	Exón 4	1314	Terminación prematura, Y438stop	36
100	1330G>C;594del	Exón 4; Exón 4	1330;594	Cambio de aminoácido; Frameshift	33
101	1330G>C;1211C>T	Exón 4	1330;1211	Cambio de aminoácidos, D444H;T404I	33
102	1330G>C;1330G>C;511G>A	Exón 4	1330;511	Cambio de aminoácidos, D444H;A171T	26, 32, 33
103	1330G>C;1595C>T	Exón 4	1330;595	Cambio de aminoácidos, D444H;T532M	33
104	1330G>C	Exón 4	1330	Cambio de aminoácidos, D444H	26, 28-30, 33, 34-36
105	1334G>T	Exón 4	1334	Cambio de aminoácidos, G445V	25, 27, 28, 37
106	1352G>A	Exón 4	1352	Cambio de aminoácido, G451D	28
107	1368A>C	Exón 4	1368	Cambio de aminoácido, Q456H	26, 28-30, 32, 34, 37
108	1369G>A	Exón 4	1369	Cambio de aminoácido, enzima no funcional, V457M	25, 27, 28, 32, 37
109	1388G>A	Exón 4	1388	Cambio de aminoácido, C463Y	30
110	1413C>T	Exón 4	1413	Polimorfismo, C458C	25, 28
111	1459T>C	Exón 4	1459	Cambio de aminoácido, W487R	28, 31
112	1463G>A	Exón 4	1463	Cambio de aminoácido, afecta estabilidad de la proteína, G488D	25, 27, 28, 37
113	1466A>C	Exón 4	1466	Cambio de aminoácido, N489T	28
114	1489C>T	Exón 4	1489	Cambio de aminoácido, P497S	28, 37
115	1489C>T;1284C>T	Exón 4	1489;1284	Sin cambio, P497S	35
116	1493 insT	Exón 4	1493	Inserción 1 nucleótido, Frameshift	24
117	1511T>A	Exón 4	1511	Cambio de aminoácido, M500K	34
118	1531G>C	Exón 4	1531	Cambio de aminoácido, Q511E	35
119	1593C>T	Exón 4	1593	Cambio de aminoácido, T532M	32, 33
120	1595C>T	Exón 4	1595	Cambio de aminoácido, T532M	28-30, 32, 34, 35, 37
121	1603C>G	Exón 4	1603	Cambio de aminoácido, L535V	25
122	1610C>A	Exón 4	1610	Cambio de aminoácido, G537V	30

123	1612C>T	Exón 4	1612	Cambio de aminoácido, R538C	24-28, 30, 32, 34, 37
124	1616-1617insT	Exón 4	1616-1617	Inserción de un nucleótido, Frameshift	28, 37
125	1619A>G	Exón 4	1619	Cambio de aminoácido, Y540C	28, 37
126	1627G>C	Exón 4	1627	Cambio de aminoácido, D543H	28, 29
127	12236G>A	Intrón	12236	Cambio de aminoácido, región intrónica	28, 29

Tabla 1. Mutaciones reportadas para el gen de biotinidasa.

LA BIOTINA COMO REGULADOR DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

En los últimos años 40 los hallazgos descritos por varios investigadores sugirieron que la biotina parecía tener otras funciones además de la de cofactor de carboxilasas. Entre estas funciones se destacan la síntesis de ADN, ARN y proteínas, y la regulación de la actividad de diversas enzimas (38).

a. Expresión dependiente de biotina.

En particular la función no ortodoxa de biotina que ha sido ampliamente caracterizada es la regulación de la expresión de diversas enzimas hepáticas. Dakshinamurti en 1968 demostró que la deficiencia de biotina en ratas de laboratorio aumenta la expresión de la glucocinasa hepática y disminuía la expresión de fosfoenolpiruvato carboxicinasa. En los últimos años el número de proteínas cuya expresión se ve afectada por los niveles de biotina dentro de la célula, ha aumentado añadiéndose la piruvato cinasa, fosfofructocinasa, amilasa, enzima málica, ornitidina transcarboxilasa, la expresión del receptor de asialoglicoproteína, la secreción de insulina en células pancreáticas, la expresión de los genes de citosinas interleucina 2 (IL-2), IL-1b, IL-4, el receptor γ IL-2, interferón γ , y diversos oncogenes como N-myc, cmyb, N-ras, raf (39, 42, 47, 48, 56) (Tabla 2).

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

Tabla 2. Genes afectados por biotina

La síntesis de ARN, proteínas y el crecimiento son procesos que se ven afectados por la presencia de biotina; pero también son afectados por el segundo mensajero GMPc; por lo que se determinó si el mecanismo de acción de la biotina era a través de GMPc (43).

Experimentos realizados demostraron que la biotina era capaz de aumentar los niveles de GMPc en hígado, riñón, cerebelo y corazón de rata; ya que esta vitamina tiene un efecto sobre la enzima responsable de la síntesis de GMPc, la guanilato ciclasa soluble (43). Experimentos sobre la actividad de guanilato ciclasa soluble también demostraron que los análogos de biotina, azabiotina, bisnarazabiotina, carbobiotina, iso-azabiotina también son capaces de aumentar o estimular su actividad (48).

b. Carboxilasas y Holocarboxilasa sintetasa.

Utilizando un modelo animal de deficiencia de biotina, en el 2001 Rodríguez-Meléndez et al, mostraron que la biotina era capaz de regular la expresión de las carboxilasas PC y PCC y la HCS en diversos tejidos como hígado, riñón, músculo y cerebro. Los efectos observados en la deficiencia de biotina, afectaban los niveles de ARNm de HCS, así como la actividad y masa de las carboxilasas PC y PCC; aunque estos efectos variaban en diferentes órganos; con mayor efecto en el hígado y riñón que sobre el músculo y cerebro (45).

Este trabajo; nos daba la primera evidencia reproducible, sólida y significativa, de que la biotina era capaz de regular la expresión y actividad de las enzimas involucradas en su propio metabolismo y que esta regulación era diferente en diversos órganos; sin embargo, hasta ese momento se desconocía el mecanismo de acción de la vitamina y si la regulación diferencial en los órganos tenía alguna función fisiológica.

Para elucidar este mecanismo, utilizando las bases del modelo de deficiencia de biotina; se hicieron experimentos utilizando células HepG2 en condiciones de deficiencia de biotina que se estimularon con biotina. Se cuantificaron los niveles de ARNm en lo diferentes tratamientos y con esto se pudo determinar que la biotina y sus niveles dentro de la célula son capaces de regular la expresión de HCS, como se había descrito (45) y las carboxilasas ACC1 y PCC; ya que la ausencia de la vitamina disminuía los niveles de ARNm y la adicción de la vitamina aumentaba la expresión.

Esta regulación actúa a través de una cascada de transducción de señales, y la participación se confirmó estimulando a las células deficientes de biotina con GMPc, donde se observó una recuperación en los niveles de ARNm. Esta cascada de señalización involucra a la guanilato ciclasa soluble que es la responsable del aumento de los niveles de GMPc, que a su vez estimula a la proteína cinasa dependiente de GMPc, que al fosforilarse se transloca al núcleo activando proteínas

que aumentan la expresión de estos genes. En el mismo trabajo se demostró que la activación no se daba por la biotina, si no el producto de la HCS; el B-AMP es el responsable por esta activación, y se comprobó utilizando células de pacientes con deficiencia de HCS (49).

Trabajos posteriores demostraron que el mecanismo de regulación que involucra al B-AMP, también regula la expresión del transportador de biotina (SMVT), y la PC. Utilizando un modelo animal de deficiencia de biotina (45), se determinó el efecto fisiológico para este mecanismo, proponiéndose así el modelo altruista de utilización de biotina; este modelo propone que cuando hay una disminución en los niveles intracelulares de biotina, la célula responde disminuyendo la expresión de las enzimas que requieren biotina, el SMVT, HCS y las carboxilasas. Esta respuesta se observa en hígado, riñón y músculo; pero en el cerebro la expresión y actividad de estas enzimas no se ve afectada. Cuando el organismo se enfrenta a una deficiencia de biotina, este responde disminuyendo la expresión de las enzimas del ciclo de biotina en órganos periféricos permitiendo que la poca biotina disponible sea utilizada preferencialmente por el cerebro manteniendo intacto su funcionamiento (51).

Posteriormente también se determinó que la deficiencia de biotina afectaba la tasa de síntesis y degradación de una de las carboxilasas en hepatocitos de rata; la deficiencia de biotina disminuye la síntesis de PC pero aumenta la tasa de degradación de la misma (59). Este conjunto de resultados nos muestran que la deficiencia de la vitamina afecta la expresión, actividad y cantidad de casi todas las enzimas que participan en el ciclo de la biotina.

La única enzima del ciclo de biotina que no está bajo el control transcripcional es la biotinidasa, cuya actividad permanece a pesar de los cambios en los niveles intracelulares de biotina (51). El reciclamiento de la vitamina por acción de la biotinidasa, podría funcionar como la única fuente de biotina disponible cuando la célula se enfrenta a una deficiencia de biotina.

Para poder tener una mejor comprensión del efecto de la biotina sobre la regulación de su ciclo; es necesario entender el papel que tiene la actividad constitutiva de biotinidasa en la regulación del ciclo; ya que al presentarse una deficiencia en la actividad de biotinidasa, se manifiestan síntomas bioquímicos similares a la deficiencia de HCS que no pueden ser explicadas solamente basándose en su actividad como recicladora de biotina.

c. La biotina y las modificaciones a la cromatina

Recientemente algunos trabajos han demostrado que las histonas, las proteínas base que forman la estructura de la cromatina, pueden ser modificadas al agregar biotina covalentemente (48).

Se ha propuesto tanto a la biotinidasa como la HCS como las responsables de agregar biotina a las histonas; ya que a ambas enzimas se les ha localizado en el núcleo celular al igual que la vitamina (48, 50).

Se han reportado histonas biotiniladas en células de linfoma, células de cáncer de pulmón y enterocitos de pollo. Se han reportado sitios de biotinilación en diversas histonas; en la histona H2A son K9, K13; en la histona H3, K4, K9, K18; en la histona H4, K8, K12 (48). Las diversas modificaciones que ocurren en las histonas pueden ser afectadas por la deficiencia de biotina y modificar los patrones de fosforilación, acetilación, metilación (42).

Los patrones de acetilación y fosforilación de lisinas y serinas afectan la biotinilación de las lisinas adyacentes. Pero la dimetilación de argininas parece aumentar la biotinilación de los residuos de lisina cercanos (48). Aunque se ha mencionado la existencia de histonas biotiniladas; la función biológica de estas modificaciones todavía necesita ser investigada.

HIPÓTESIS

El reciclamiento deficiente de biotina endógena en células de pacientes con deficiencia de biotinidasa, no solo interfiere con la activación de carboxilasas, sino que podría afectar la expresión de enzimas participantes en el ciclo de utilización de biotina al interferir con la activación de la cascada de transducción de señales HCS-GCs-PKG.

OBJETIVOS

- Determinar el efecto de la deficiencia de biotinidasa en los niveles de biotinilación de las carboxilasas dependientes de biotina.
- Determinar el efecto de la deficiencia de biotinidasa sobre la recuperación de la biotinilación de las carboxilasas al estimular con biotina y biocitina.
- Determinar el efecto de la deficiencia de biotinidasa sobre la expresión (ARNm), la cantidad de proteína y la capacidad de biotinilar de HCS.

CAPITULO II:

METODOLOGÍAS

1. Materiales.

Biotina, Biocitina, inhibidor de Guanilato ciclase soluble; 1-H (1,2,4) oxadiazolo-[4,3-a]quinaxolin-1-one (ODQ), el análogo no hidrolizable de GMPc; 8-Bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-Br-cGMP) se adquirieron en Sigma-Aldrich. La biotina radiactiva, d-[8,9-³H] biotin (34.0 Ci/mmol) se adquirió de Amersham. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: streptavidina-AP conjugada de Roche Applied Science; anticuerpos anti-cabra de PC y MCC de Santa Cruz Biotechnology; el anticuerpo anti-ratón de HCS se obtuvo del Dr. Roy A. Gravel de la Universidad de Calgary, Alberta, Canadá. Las células *E. coli* C-124 se obtuvieron de Michel Goudry de Université Pierre et Marie Curie, Francia.

2. Líneas celulares.

La línea celular de deficiencia de biotinidasa (MCD-BD) se obtuvo del Depósito de Líneas Celulares Mutantes Humanas del Hospital de Niños de Montreal, Canadá. La línea celular deficiente de HCS (MCD-MK) se obtuvo del Dr. Roy A. Gravel de la Universidad de Calgary, Alberta, Canadá. La línea celular de fibroblastos normales se obtuvo de la Dra. Gloria Soldevila de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.

3. Células en cultivo.

Todas las líneas celulares se crecieron en un medio normal, alfa-MEM con glucosa alta (Invitrogen; biotina 0.40mM) suplementado con FBS 10% inactivado, 100 unidades/ml penicilina, y 100 µg/ml estreptomycin, en una atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo se cambió en intervalos de 3 días.

Para los experimentos de deficiencia de biotina; las células se cambiaron de medio de cultivo; MEM (Invitrogen), suplementado con FBS dializado al 10% con las mismas concentraciones de antibióticos, y se mantuvieron en estas condiciones por 13 días.

Para los experimentos de recuperación de la biotinylación; las células se crecieron en un medio deficiente de biotina por 13 días; posteriormente se cambiaron a un medio deficiente adicionado con diferentes concentraciones de biotina o biocitina (1, 10, 100nM) y se incubaron en este medio por 24h.

Para determinar la participación de GCs en la recuperación de la biotinylación y los niveles de proteína de las carboxilasas; fibroblastos normales deficientes de biotina se incubaron con 50µM de ODQ, un inhibidor específico de GCs por 3h. Posteriormente se añadió al medio 1mM de biotina y se incubó en este medio por 48 y 72h. Se crecieron conjuntamente células en un medio normal (control). Alternamente; fibroblastos deficientes de biotinidasa (MCD-BD) se crecieron en un medio deficiente de biotina por 13 días; se agregó al medio deficiente 1mM de biotina o 1mM de 8-Br-cGMP, un análogo no hidrolizable de GMPc; se mantuvieron en este medio por 48 y 72h.

4. Western blot.

Las células fueron despejadas de los frascos de cultivo incubando con tripsina por 5min y recuperadas en PBS. Se centrifugaron las células por 10min a 3000rpm a 4°C; se repitió 2 veces. Al terminar se retiró el sobrenadante y se obtuvo un pellet de células. Se hicieron los extractos totales de proteína resuspendiendo el pellet de células en 200µl de buffer de RIPA (Tris Base 50mM, NaCl 150mM, SDS 1%, NP40 1%, Dioxicolato de Sodio 0.5%, Inhibidor de proteasas 1 tableta) y 20µl de inhibidores de proteasas y de PMSF. Se mezcló en vortex y se incubó en hielo por 20min, posteriormente se centrifugó 15 min a 12000rpm a 4°C. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se cuantificó la concentración de proteína utilizando el espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc.).

Se separaron las proteínas (30-100 µg de proteína total) por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 8%; se confirmaron cantidades iguales de proteína total en cada carril tiñendo los geles con azul de coomassie antes de transferir a la membrana de PVDF 0.45µM (Millipore).

Las membranas se bloquearon toda la noche en una solución de BSA 3% en TBS/tween 0.1%. Posteriormente se hicieron lavados de 10min con TBS y se incubaron las membranas con los anticuerpos correspondientes.

Para la detección de los niveles de biotina en las carboxilasas se utilizó streptavidina-AP conjugada 1:2000 por 1h y lavados de 10min con TBS. Para la detección de la expresión de HCS se incubó 2h con el anticuerpo anti-ratón de HCS 1:3000 y lavados de 20min con TBS. Para la detección de las carboxilasas PC y MCC se incubó 2h con anticuerpos anti-cabra 1:500, lavados de 10min con TBS/tween 0.05%; posteriormente la incubación con un anticuerpo secundario conejo anti-cabra conjugado a HRP 1:20,000 y lavados de 10min con TBS/tween 0.05%.

La visualización de las bandas de HCS, PC y MCC se realizó usando el kit de quimioluminiscencia (Roche Applied Science). La visualización de las bandas indicando el contenido de biotina en las carboxilasas se realizó con el kit de BCPI/NTB (Zymed Laboratorios Inc.). El contenido de biotina de las bandas se cuantificó usando el analizador de imágenes FX (Bio-Rad).

5. Reverse transcription-PCR.

La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la concentración del ARN utilizando el espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc.). Se utilizaron 3µg para determinar la integridad del ARN en un gel de formaldehído. Posteriormente se hizo la transcripción reversa (rt) utilizando 3µg de ARN total y siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando la enzima Superscript II (Invitrogen). Para la síntesis de ADNc, se utilizaron 5 µg de ARN total y 0.3 µM de primers específicos sentido y antisentido para generar productos de PCR de 200-300pb utilizando la enzima **Amplificasa** Taq Polymerase (Biotecnologías Universitarias).

Los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el ARNm humano fueron: HCS: 5'-CCC GAG CTC CGT CTC CTG GAT CGG-3' y 5'-CCC AAG CCT TTT ACC GCC

GTT TGG GGA-3' ($T_m= 58^\circ\text{C}$]; Biotinidasa, 5'-ATC TAT GAA CAG CAA GTG ATG ACT-3' ($T_m 66^\circ\text{C}$) y 5'-AGG GAC CAG GGT GAA ATT GTC ATA-3' ($T_m= 70^\circ\text{C}$); β -actina: 5'-GGG TCA GAA TTC CTA TG-3' y 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' ($T_m= 58^\circ\text{C}$).

Una vez realizado el PCR; los productos se separaron en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. La cantidad del producto de PCR se determinó por densitometría usando el Fluor-S imagen (Bio-Rad). Para los experimentos, se realizaron curvas de ciclos para asegurar que los experimentos estaba siendo realizados en la fase exponencial; ya que el número de ciclos variaba para cada gen. Se utilizó el ARNm de β -actina como una referencia de la transcripción celular.

6. Ensayo para medir la actividad de HCS.

Se utilizó el vector p-FLAG (Sigma) que contenía un fragmento de ADNc que codifica para los últimos 67 aminoácidos de la subunidad alfa de PCC humana (630-703) y que se llamo p-67. Este vector se utilizó para transformar la sepa silvestre de *E. coli* XL-1 y una sepa mutante *E. coli* C-124, que no es capaz de sintetizar detiobiotina, un intermediario esencial para producción de biotina.

Se hicieron cultivos de XL-1 y C-124 conteniendo a p-67 en un medio LB; cuando los cultivos llegaron a la fase Log; se centrifugaron por 10min a 1500rpm y se lavo el pellet de bacterias con PBS estéril 2 veces. Después se transfirieron las bacterias a un medio libre de biotina (7.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 33 mM KH_2PO_4 , 60 mM K_2HPO_4 , 1.7 mM de citrato de sodio, 1 mM MgSO_4 , 0.2% dextrosa, 0.1% casaminoácidos) y se dejo por 10min para que las bacterias se recuperaran. Después se agrego 2 mM IPTG, para inducir la producción de proteína y se incubaron a 37°C por 4 h.

Al terminar la inducción, se centrifugaron las bacterias por 10min a 1500rpm, y se lavaron con PBS estéril 2 veces. El pellet de bacterias se sonico 3 veces con pulsos de 10s en un buffer de lisis y se centrifugó 20min a 15000rpm. La concentración de

proteína del sobrenadante se determinó utilizando el espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc.)

Las proteínas del sobrenadante se separaron en geles de poliacrilamida al 12%; se cargaron 100 µg totales de proteína en cada carril; y se transfirió a una membrana de PDVF 0.2µM (Millipore) que se bloqueo toda la noche con BSA 3%. En la membrana aparece 2 bandas biotiniladas en las bacterias expresando p-67: p-67 a una altura de 14 kDa y BCCP a 18 kDa, la subunidad de ACC en *E. coli*.

Para detectar a presencia de las proteínas, se cortó un carril de la membrana que contenían las proteínas expresadas en XL-1 transformadas con p-67 y se incubó con streptavidina-AP para la detección de las proteínas biotiniladas. La banda de abajo, corresponde a p-67, y se utilizó como referencia para cortar la sección de adyacente de la membrana que contenía a p-67 no biotinilado de *E. coli* C-124. Las piezas de membranas que contenían p-67 no biotinilado se utilizaron en fase sólida, para los ensayos de HCS.

Las piezas de la membrana se incubaron por 1h a 25°C en 150µl en un buffer de reacción que contiene Tris-HCl pH 8.0, 50 mM glutation reducido, 22.5 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 1-3 µCi ³H-biotina y 100 µg de proteína total de extractos de fibroblastos normales o MDC-BD, como fuente de la enzima HCS.

Las células se crecieron en un medio normal donde se preincubo por 6h con 1mM de biotina no radiactiva y 63mM de cicloheximida para bloquear los sitios de biotinilación libres y la síntesis de novo de carboxilasas. Los extractos se pasaron dos veces por una columna (Millipore) para eliminar la biotina no radioactiva. La incorporación de la biotina radioactiva a p-67 unido a la membrana fue estimada utilizando un contador de centelleo Beckman LS 6500. Bajo estas condiciones, p-67 se encuentra en exceso y el ensayo es lineal a una hora de incubación.

7. Secuenciación de ADNc y ADN genómico de biotinidasa.

El gen de biotinidasa genera un péptido de 1629 pb; para su clonación se dividió el ADNc en 2 fragmentos y se amplificó por rt-PCR utilizando primers específicos; EcoR1 5'-1 GGG AAT TCA TGG CGC ATG CGC ATA TTC AGG GCG GAA ($T_m=88.1\text{ °C}$); Xho1 3'-1 GGC TCG AGG ACA TTA GCT GCC AGA ACG TTG ATG ($T_m=80.5\text{ °C}$); generando un fragmento de 912 pb; EcoR1 5'-2 GGG AAT TCG AAC CAG CTC CCA CTC TTG GCA GCA ATT ($T_m=83.4\text{ °C}$); Xho1 3'-2 GGC TCG AGC TAG TCC CTC TCA TAC AAG CGC CC ($T_m=80.6\text{ °C}$) generan un fragmento de 803 pb; y ambos fragmentos fueron clonados en el vector pGEM (Promega). Los exones de biotinidasa se amplificaron a partir de ADN genómico y clonados en el vector pGEM. Las clonas que contenían el ADNc y los exones fueron mandados a secuenciar en Laragen (Los Ángeles).

CAPITULO III:

**DEFICIENCIA DE BIOTINIDASA REDUCE LA
EXPRESIÓN DE HOLOCARBOXILASA
SINTETASA EN LA ENFERMEDAD DEFICIENCIA
MÚLTIPLE DE CARBOXILASAS JUVENIL.**

RESUMEN

La biotinidasa cataliza la hidrólisis de la vitamina biotina a partir de la degradación de carboxilasas dependientes de biotina. Esta reacción clave hace que la biotina este disponible para su reutilización en la biotinilación de las apocarboxilasas recién sintetizadas. Esta reacción es catalizada por la Holocarboxilasa Sintetasa (HCS) mediante la síntesis de 5'-Biotinil-AMP (B-AMP) a partir de biotina y ATP, seguida por la transferencia de biotina a un residuo específico de lisina en el sustrato apocarboxilasa. Además de la activación de las carboxilasas, B-AMP también es una molécula reguladora clave en la transcripción de los genes que codifican a las apocarboxilasas y la misma HCS. En humanos, deficiencias genéticas de HCS o Biotinidasa, resultan en la enfermedad Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (MCD), que se caracteriza por la reducción en la actividad de todas las carboxilasas dependientes de biotina. Aunque las manifestaciones clínicas de ambas enfermedades son similares, se diferencian en las características neurológicas únicas, cuyo origen no está completamente comprendido. En este estudio, nosotros mostramos que la deficiencia de biotinidasa no solo reduce la biotinilación neta de las carboxilasas si no que también afecta la expresión de las carboxilasas y de la HCS interfiriendo con el mecanismo de control transcripcional dependiente de B-AMP. Nosotros proponemos que los pacientes deficientes de biotinidasa pueden desarrollar una deficiencia secundaria de HCS que altera el mecanismo altruista tejido-específico que protege el metabolismo del cerebro durante la deficiencia de biotina.

INTRODUCCIÓN

En humanos, la vitamina biotina es un micronutriente esencial que tiene dos funciones diferentes en la célula (1). La primera, es el cofactor de cinco carboxilasas dependientes de biotina: Piruvato carboxilasa (PC), Propionil CoA carboxilasa (PCC), Metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC), y 2 isoformas de Acetil CoA carboxilasa (ACC-1 y ACC-2) (2). Estas enzimas catalizan reacciones claves en gluconeogénesis, catabolismo de aminoácidos y síntesis de ácidos grasos que ponen en manifiesto la importancia de biotina en la homeostasis del metabolismo (2). La segunda, la biotina es un regulador de la expresión de varias proteínas hepáticas que incluyen a la glucocinasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasas y la mayoría de las proteínas involucradas en el metabolismo de la biotina (1, 3-13).

Debido a la importancia de la biotina en el metabolismo de la célula, los organismos superiores enfrentan una amenaza constante a su supervivencia porque son incapaces de sintetizar la vitamina, situación que se complica más por la limitada disponibilidad de la biotina en la naturaleza, ya que la mayoría está unida a proteínas y no está directamente accesible (2, 14).

Durante la evolución, los mamíferos desarrollaron lo que es conocido como el ciclo de biotina, que les permite hacer frente a la baja disponibilidad de este nutriente crítico (Fig.1). Este sistema depende de dos enzimas; la Holocarboxilasa Sintetasa (HCS) y la Biotinidasa (1, 2). La HCS es la responsable de la activación, mediante la biotinilación de todas las carboxilasas dependientes de biotina en las células humanas. Este proceso se lleva a cabo en una reacción de pasos, una reacción dependiente de ATP en donde la biotina se activa a 5'-Biotinil-AMP (B-AMP) y luego transferida a un residuo específico y conservado de lisina que se encuentra en todas las carboxilasas dependientes de biotina (2, 15, 16). La Biotinidasa cataliza la liberación de la biotina de péptidos biotinilados o biocitina (biotin-lisina), productos que se generan en la digestión intestinal de los nutrientes o durante la degradación de carboxilasas (reciclamiento endógeno de biotina) (2, 17).

Demostramos recientemente, que la HCS es un participante obligado en la regulación transcripcional mediada por biotina (Fig. 1). El mecanismo requiere de B-AMP, el producto de la reacción de HCS, el cual activa la cascada de transducción de señales que involucra a la Guanilato ciclasa soluble (GCs) y a la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) (4, 7). En la presencia de biotina, la cascada HCS-GCs-PKG induce la expresión de los componentes del ciclo de biotina que se requieren para su transporte y utilización: el Transportador Multivitamínico dependiente de Sodio (SMVT), PC, PCC, MCC, ACC y HCS (3, 5, 13).

Paradójicamente la deficiencia de biotina resulta en una reducción de la expresión de estos genes en tejidos como el hígado, riñón, músculo pero no en el cerebro. Aunque esto pudiera ser contrario a la necesidad de utilizar la biotina cuando hay una disponibilidad limitada, nosotros mostramos que este patrón de represión genética es un mecanismo de contingencia altruista tejido-específico que, al disminuir la utilización de biotina en tejidos específicos, permite un aporte de la vitamina al cerebro (3). En este órgano, la PC tiene dos papeles importantes; como un regulador de la anaplerosis del ciclo de krebs mediante la carboxilación del piruvato, y la restauración de la pérdida de alfa cetoglutarato durante la liberación de glutamato y ácido aminobutírico de las neuronas y la exportación de glutamina de la glia (18, 19).

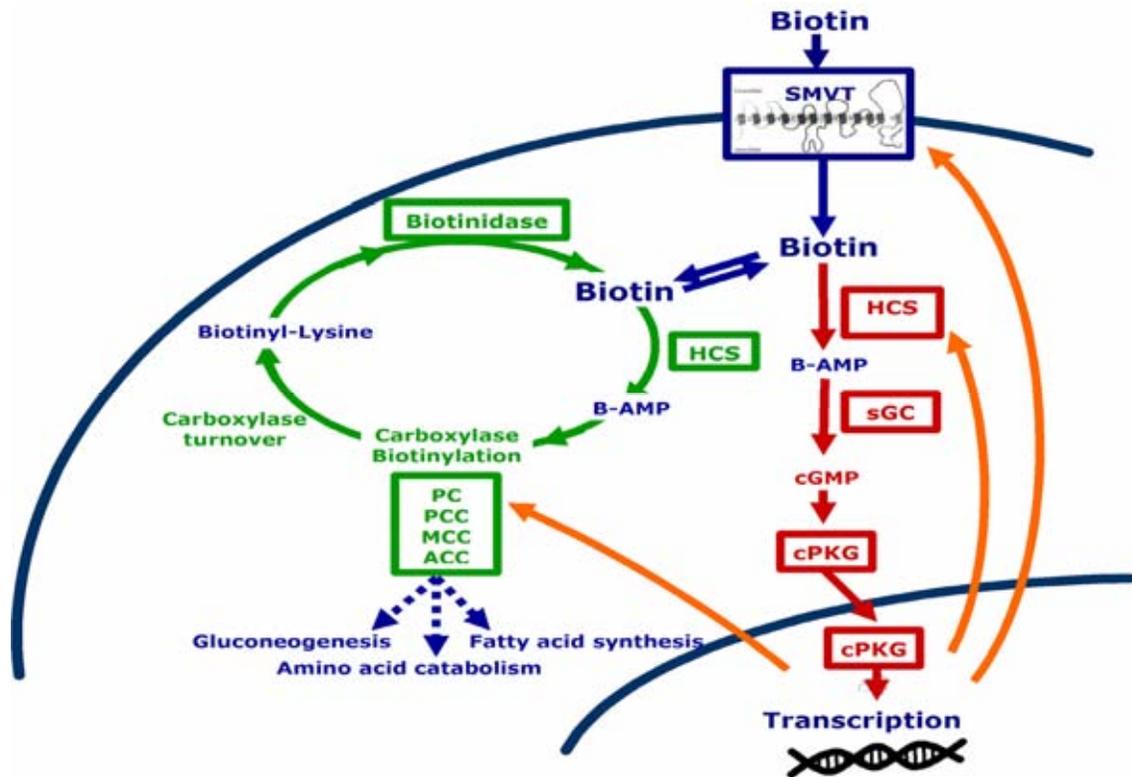


Fig. 1. El ciclo de biotina y la regulación transcripcional dependiente de HCS en células humanas. Representación esquemática del ciclo de biotina (flechas verdes) y de la cascada de transducción de señales dependiente de HCS (flechas rojas) responsable de la regulación transcripcional de Piruvato carboxilasa (PC), Propionil CoA carboxilasas (PCC), Metilcrotonil CoA carboxilasa (ACC), Acetil CoA carboxilasa (ACC), Transportador Multivitamínico dependiente de Sodio (SMVT) y Holocarboxilasa Sintetasa (HCS). Enzimas que participan en la vía de HCS: Guanilato ciclasa soluble (GCs), proteína dependiente de GMPc (PKG).

En humanos, el ciclo de biotina puede ser interrumpido por deficiencias genéticas de Holocarboxilasa Sintetasa (Deficiencia de HCS [MIM253270] o de Biotinidasa (Deficiencia de biotinidasa [MIM 253269]), que resultan en las formas neonatal o juvenil respectivamente de la enfermedad Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (MCD) (2, 20, 21). Aunque ambas enfermedades difieren en la edad en la que se presentan los síntomas, comparten un número de manifestaciones clínicas y bioquímicas, incluyendo la disminución en la actividad de todas las carboxilasas, acidemia orgánica, hiperamonemia, dermatitis, alopecia, convulsiones y coma. En los pacientes deficientes de biotinidasa se presenta daño neurológico que incluye retraso mental, pérdida del oído, atrofia óptica (2). Aunque son potencialmente letales, la

mayoría de las manifestaciones clínicas y bioquímicas de la MCD neonatal y juvenil pueden ser tratadas satisfactoriamente con dosis farmacológicas de biotina.

La respuesta a biotina de los pacientes con MCD neonatal esta asociada principalmente a que tiene al menos un alelo que expresa una HCS mutante con una Km elevada por biotina, y su actividad necesita de grandes concentraciones de biotina (1-5). Sin embargo, basados en la participación de HCS en la regulación transcripcional dependiente de biotina, nosotros sugerimos que las manifestaciones clínicas y bioquímicas en los pacientes deficientes de HCS son un reflejo de los efectos combinados de la baja afinidad de la enzima mutante por biotina y la reducción en los niveles de ARNm de HCS y de las carboxilasas (3, 4). En los pacientes deficientes de biotinidasa, el ciclo de biotina permanece intacto porque la biotina libre puede ser utilizada para la biotinilación de las carboxilasas. Aquí el defecto esta en el inadecuado suplemento de biotina debido a la inhabilidad para reciclar la biotina unida a proteína de las fuentes endógenas o de los nutrientes (2).

Por lo tanto, la suplementación con dosis farmacológicas de biotina debe de compensar la pérdida del acceso a la biotina adicional que normalmente esta disponible en los nutrientes (2). Aunque la última consecuencia de la deficiencia de biotinidasa es la interrupción de las vías metabólicas donde están involucradas las carboxilasas dependientes de biotina, las manifestaciones clínicas que distinguen este desorden de la deficiencia de HCS, especialmente las relacionadas con los síntomas neurológicos, no se ha comprendido del todo (22).

En este trabajo, utilizamos fibroblastos de un paciente con deficiencia de biotinidasa como un modelo experimental para estudiar el papel de esta enzima en la biotinilación de las carboxilasas y sobre la cascada HCS-GCs-PKG de la que depende la expresión de las carboxilasas y la HCS en condiciones de deficiencia y suplementación. Nuestros resultados muestran que en las células deficientes de biotinidasa, la deficiencia de biotina resulta en una reducción más rápida de la biotinilación de las carboxilasas y en la expresión de PC y MCC que en los

fibroblastos normales. También demostramos que en las células deficientes de biotinidasa la expresión y la actividad de la HCS es más baja que en las células control. Nosotros proponemos que, en la ausencia de una suplementación de biotina, los pacientes deficientes de biotinidasa pueden desarrollar una deficiencia secundaria de HCS que, combinada con la deficiencia primaria de biotinidasa, puede interrumpir la regulación altruista de la utilización de biotina que protege el metabolismo del cerebro contra la deficiencia de la vitamina.

MATERIALES Y METODOS

Materiales.- Biotina, Biocitina, 1-H (1,2,4) oxadiazolo-[4,3-a]quinaxolin-1-one (ODQ) y 8-Bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-Br-cGMP) fueron comprados en Sigma-Aldrich. d-[8,9-3H] biotin (34.0 Ci/mmol) de Amersham. La línea celular de deficiencia de biotinidasa, DMC-BD fue del depósito de Líneas Celulares Mutantes Humanas del Hospital de Niños de Montreal, la línea celular deficiente de HCS, MCD-MK (23) y el anticuerpo contra HCS (24) fueron reportados previamente. Los fibroblastos humanos normales se obtuvieron de G. Soldevila, UNAM. Las células *E. coli* C-124 fueron previamente descritas (16, 25). Los cultivos celulares se mantuvieron en medio normal alfa-MEM con glucosa alta (Invitrogen; biotina 0.40mM) suplementado con FBS 10% inactivado, 100 unidades/ml penicilina, y 100 µg/ml estreptomycin (medio normal). El medio deficiente de biotina fue preparado utilizando medio libre de biotina MEM, FBS dializado (Invitrogen) con las mismas concentraciones de antibióticos.

Experimentos de células en cultivo.- La metodología para la deficiencia de biotina en cultivo se describió previamente (3, 4). Brevemente, las células se mantuvieron en un medio normal o deficiente de biotina a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5% por 13 días. El medio se cambio en intervalos de 3 días. Para los experimentos de recuperación de la biotilación, las células se crecieron en un medio deficiente de biotina y luego se estimulo con biotina o biocitina en concentraciones de 1-100nM por 24h.

Western blot para la expresión de HCS y el contenido de biotina en la carboxilasas. Extractos de células humanas en cultivo (30-100 µg de proteína total) se separaron por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida y transferidas a una membrana de PVDF (Millipore). Las membranas se incubaron en una solución 1:3000 del anticuerpo anti-ratón de HCS o con una solución 1:2000 de streptavidina-AP conjugada (Roche Applied Science) o con una solución 1:500 de anticuerpos anti-cabra de PC y MCC (Santa Cruz Biotechnology). La visualización de las bandas de

HCS se realizó usando el kit de quimioluminiscencia (Roche Applied Science). El contenido de biotina de las bandas se cuantificó usando el analizador de imágenes FX (Bio-Rad) como se describió previamente. La concentración de proteína se determinó utilizando el espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc.) y la confirmación de cantidades iguales de proteína total en cada carril se hizo tiñendo los geles con azul de coomassie antes de transferir a la membrana de PVDF.

Efecto de biotina y GMPc sobre la expresión de las carboxilasas en células deficientes de biotina.- Para determinar la participación de GCs en la recuperación de la biotilación y los niveles de proteína de las carboxilasas; fibroblastos normales deficientes de biotina se trataron con 50 μ M de ODQ, un inhibidor específico de GCs por 3h (4). Después de este periodo, se añadió 1mM de biotina al medio por 48 y 72h, y el efecto sobre los niveles de proteína de MCC se comparó con células deficientes de biotina estimuladas con biotina sin ODQ y células que crecieron continuamente en un medio normal (control). Alternamente, células MCD-BD se crecieron en un medio libre de biotina por 13 días se estimularon con 1mM de biotina o 1mM de 8-Br-cGMP, un análogo no hidrolizable de GMPc. Las células se recuperaron después de 48 y 72h y el nivel de la proteína de MCC se determinó como se describió arriba.

Reverse transcription-PCR.- Los procedimientos para el aislamiento de ARN, síntesis de ADNc y PCR se describieron previamente (3, 4). 5 μ g de ARN total y 0.5 μ M de primers específicos se usaron para la síntesis de ADNc y 0.3 μ M de primers específicos sentido y antisentido se usaron para generar productos de PCR de 200-300pb. Los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el ARNm humano fueron: HCS: 5'-CCC GAG CTC CGT CTC CTG GAT CGG-3' y 5'-CCC AAG CCT TTT ACC GCC GTT TGG GGA-3' (T_m = 58 $^{\circ}$ C]; Biotinidasa, 5'-ATC TAT GAA CAG CAA GTG ATG ACT-3' (T_m 66 $^{\circ}$ C) y 5'-AGG GAC CAG GGT GAA ATT GTC ATA-3' (T_m = 70 $^{\circ}$ C); β -actin: 5'-GGG TCA GAA TTC CTA TG-3' y 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' (T_m = 58 $^{\circ}$ C). Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. La cantidad del producto de PCR se

determino por densitometría usando el Fluor-S imagen (Bio-Rad) como se describió previamente (3, 4). El procedimiento se validó con estudios previos por amplificación por PCR con diferentes concentraciones de los fragmentos de ADNc HCS, Biotinidasa y β -actina (datos no mostrados). El número de ciclos también varían y se cuantificaron por densitometría para asegurar que los experimentos sean realizados en la fase exponencial. Para cada experimento, el ARNm constitutivo de β -actina fue usado como referencia de la transcripción celular. Estuvo presente en cantidades equivalente en todas las nuestras de ARN.

Ensayo para medir la actividad de HCS usando el sustrato de biotilación

p-67.- Para determinar la actividad de HCS en fibroblastos normales y MCD-BD se uso una modificación de un protocolo que fue reportado previamente (16, 25). Brevemente, el vector p-FLAG (Sigma) contenía un fragmento de ADNc que codifica para los últimos 67 aminoácidos de la subunidad alfa de PCC humana (630-703) que se utilizo para transformar la sepa silvestre, *E. coli* XL-1 y *E. coli* C-124, una mutante que no es capaz de sintetizar detiobiotina, un intermediario esencial para producción de biotina. En la fase Log de cultivos de XL-1 y C-124 en medio LB, se transfirieron a cultivo libre de biotina (7.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 33 mM KH_2PO_4 , 60 mM K_2HPO_4 , 1.7 mM de citrato de sodio, 1 mM MgSO_4 , 0.2% dextrosa, 0.1% casaminoácidos) y 2 mM IPTG, se incubaron a 37 °C por 4 h. Las células se sonicaron 3 veces con pulsos de 10s y centrifugadas a 15000rpm por 20min. Las proteínas del sobrenadante se separaron en geles de poliacrilamida al 12% (100 μg totales de proteína por carril) y se transfirió a una membrana de PDVF. Hay 2 bandas biotiladas en las células expresando p-67: p-67 a 14 kDa y BCCP a 18 kDa, la subunidad de ACC en *E. coli*.

Para detectar la presencia de las proteínas en el gel, un carril que contiene las proteínas expresadas en XL-1 transformadas con p-67, se corto de la membrana y se incubo con streptavidina-AP para detectar las proteínas biotiladas (Fig. 6A). La banda de abajo, corresponde a p-67, se utilizó como referencia para cortar la sección de adyacente de la membrana que contenía la apo-p-67 no biotilada de *E. coli* C-124. Las piezas de la membrana que contienen apo-p-67 se utilizaron, en fase sólida,

para los ensayos de HCS. La actividad de HCS se monitoreo al incubar las piezas de la membrana por 1h a 25°C en 150µl de buffer de reacción que contiene Tris-HCl pH 8.0, 50 mM glutation reducido, 22.5 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 1-3 µCi ³H-biotina y 100 µg de proteína total de extractos de fibroblastos normales o MDC-BD. Para estos experimentos las células se crecieron en un medio normal donde se preincubo por 6h con 1mM de biotina no radiactiva y 63mM de cicloheximida para bloquear los sitios de biotinilación libres y la síntesis de novo de carboxilasas (5). Los extractos se prepararon de acuerdo con lo previamente reportado y se paso dos veces por una columna (Millipore) para eliminar la biotina no radioactiva. La incorporación de la biotina radioactiva a p-67 unido a la membrana fue estimada utilizando un contador de centelleo Beckman LS 6500. Bajo estas condiciones, p-67 se encuentra en exceso y el ensayo es linear a una hora de incubación.

Secuenciación de ADNc y ADN genómico.- Para determinar las mutaciones responsables por el fenotipo de las células MCD-BD, el ADNc de biotinidasa fue clonado en el vector pGEM (Promega). Los exones de biotinidasa se amplificaron a partir de ADN genómico como se reporto previamente (26, 27) y clonados en el pGEM. El ADNc y los exones fueron secuenciados en Laragen (Los Ángeles).

Análisis estadístico.- Todos los experimentos se hicieron por triplicado al menos tres veces en diferentes tiempos. Los resultados de la deficiencia de biotina en los niveles de ARNm, se normalizaron con los datos obtenidos del ARNm de β-actina que crecieron en un medio normal. Los datos presentados son la media de tres experimentos diferentes +/- S.E. a menos que se indique lo contrario. La significancia estadística de los resultados de la biotinilación de p-67 que se obtuvieron de las células normales y MCD-BD fueron analizadas a 0.05 y 0.01 de nivel de significancia utilizando la T de Student.

RESULTADOS

Caracterización molecular y funcional de la línea celular deficiente de

biotinidasa MCD-BD. Para caracterizar la línea celular MCD-BD utilizadas como modelo experimental en este estudio, primero se identificaron las mutaciones responsables por la deficiencia de biotinidasa secuenciando el ADNc que codifica para esta enzima. Este procedimiento resulto en la identificación de una transversión 1330G-C, que causa la sustitución de His por Asp444 (D444H), y una transición simple 511G-A, que resulta en la sustitución de Thr por Ala171 (A171T) (Fig. 2A). Estas mutaciones han sido previamente reportadas (26) y son consideradas como la causa mas común de la deficiencia profunda de biotinidasa en un tamizaje de recién nacidos en Estados Unidos (28). Debido a que estas mutaciones son reportadas originalmente como una mutación doble en el alelo (28) mandamos a secuenciar completamente los cuatro exones de biotinidasa a partir de ADN genómico para buscar alguna otra mutación. Este procedimiento nos confirmó las mutaciones encontradas y no revelaron la presencia de alguna otra mutación.

Para verificar el impacto de estas mutaciones, probamos los niveles de biotinilación de las carboxilasas PC, PCC y MCC en células MCD-DB y comparamos los resultados con fibroblastos normales (control positivo) y con MCD-MK (control negativo). Estas últimas tienen carboxilasas no biotiniladas en un medio normal con biotina debido a una mutación en HCS homocigoto R508W ocasionando una alta Km por biotina, pero que se recupera a niveles normales en un medio que contenga 100 veces más biotina (23). Las células se crecieron en un medio normal hasta un 80% de confluencia y extractos totales de proteína fueron separados por medio de una electroforesis en un gel de poliacrilamida. El contenido de biotina es visualizado por western blot usando streptavidina-AP. Se identificaron tres bandas en células normales que corresponden a PC (128 kDa), la subunidad alfa de MCC (74 kDa), y la subunidad alfa de PCC (72 kDa). Como se reporto previamente, ACC (256 kDa) no se puede visualizar mediante este ensayo colorimétrico (3). PCC y MCC aparecen como un doblete o una banda ancha, que se distingue claramente de PC (Fig. 2B).

En contraste, las células MCD-BD muestran una reducción en la biotilación de PCC y MCC en un medio normal, de dos tercios de lo observado en los fibroblastos normales. Como era de esperar, las células MCD-MK, muestran casi una completa ausencia de la incorporación de biotina a PC, MCC y PCC (Fig. 2B). Estos resultados sugieren que la deficiencia profunda de biotinidasa resulta en una disminución en los niveles de biotilación en los fibroblastos humanos en cultivo, aún cuando se crecen en presencia de un exceso de biotina.

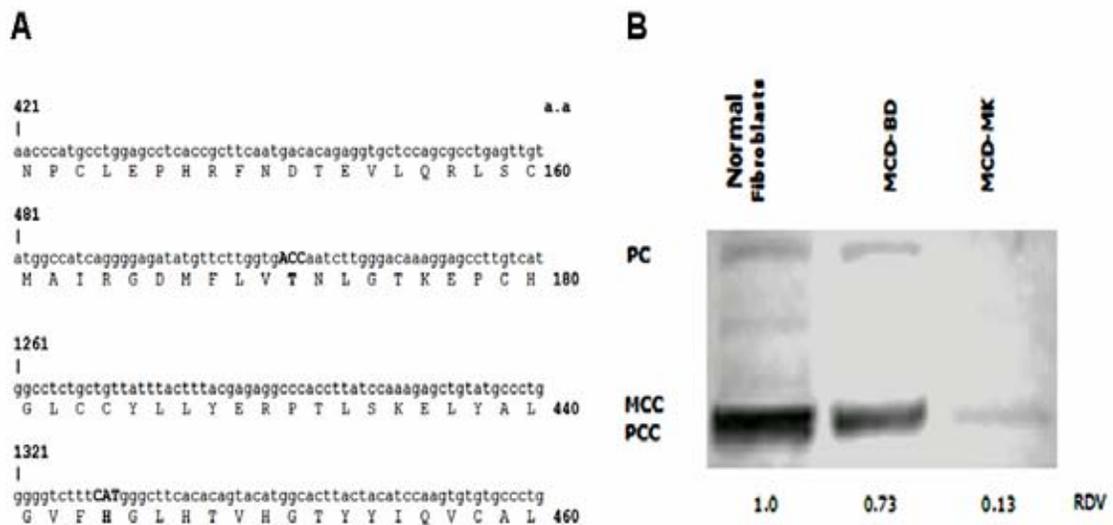


Fig. 2. Caracterización molecular y funcional de la línea celular MCD-BD. (A) Secuencia parcial de aminoácidos de Biotinidasa (residuos 140-180 y 420-460) donde se localiza la sustitución A171T y D444H que se encuentra en la línea celular MCD-BD. Los nucleótidos correspondientes se encuentran en la parte de arriba de la secuencia de aminoácidos con las mutaciones resaltadas en negritas. (B) Western blot representativo del experimento donde se muestra el efecto de la deficiencia de biotinidasa (MCD-BD) en la biotilación de PC, PCC y MCC al crecer en un medio normal (0.40µm de biotina). Las células MCD-MK son de pacientes con deficiencia de HCS (3). Cambios en la reactividad de streptavidina-AP en las bandas de PCC/MCC se analizaron por densitometría. Los valores debajo de los carriles corresponden al valor densitométrico relativo (RDV) normalizado con el valor observado en los fibroblastos normales. Cada carril contiene 50µg de lisado de células.

La deficiencia de biotinidasa obstaculiza la recuperación de la biotilación de las carboxilasas en células deficientes de biotina en respuesta a la estimulación con biocitina o biotina. El experimento anterior demostró que hay un defecto en la biotilación en las células MCD-BD que va mas allá del defecto en la liberación de la biotina unida a proteína. Para determinar si esto es resultado de un defecto en el reciclamiento de la biotina, nosotros examinamos la habilidad de las

células deficientes de biotina en recuperar la biotinilación de las carboxilasas después de estimular con biotina o biocitina. Estudios previos hechos establecieron que la deficiencia de biotina resulta en una reducción en la biotinilación de PC, MCC y PCC (3, 29, 30).

En este estudio, nos enfocamos en la biotinilación de PCC-MCC para monitorear el nivel de biotina en nuestros experimentos. Las células se crecieron en un medio deficiente de biotina por 13 días y después se estimuló con biotina o biocitina por 24hr en concentraciones que van desde la fisiológica hasta la farmacológica (1, 10, 100nM). Extractos totales de proteína provenientes de células en cultivo fueron separadas por electroforesis y la recuperación de la biotinilación de PCC-MCC fueron determinadas con streptavidina-AP. En estos experimentos, los resultados fueron normalizados con respecto a los valores obtenidos en fibroblastos normales incubados en un medio normal.

Los fibroblastos normales incubados en un medio deficiente de biotina mostraron una biotinilación de PCC-MCC de menos del 25% del nivel observado en las células control. Cuando las células deficientes de biotina se estimularon con 1, 10, 100nM de biotina, el contenido de biotina en PCC-MCC incremento a 26 +/- 2%, 87 +/- 14% y 103 +/- 11% de los valores control respectivamente (Fig. 3A). Resultados similares se obtuvieron cuando se uso biocitina, alcanzando 24 +/- 3%, 79 +/- 15% y 80 +/- 13% respectivamente (Fig. 3B). Estos resultados confirman que las células normales pueden promover eficientemente la biotinilación de las carboxilasas utilizando biotina libre o biocitina como fuente de biotina.

Como siguiente paso, determinamos la recuperación de la biotinilación de las carboxilasas en células MCD-BD en las mismas condiciones experimentales. La deficiencia de biotina reduce el contenido de biotina en las carboxilasas a 37 +/- 5% del observado en un medio normal. Las células deficientes de biotinidasa mostraron una respuesta muy pobre a la estimulación con biotina. Cuando los cultivos deficientes fueron estimulados con 1, 10, 100nM de biotina, los valores de

biotinilación de PCC-MCC fueron $33 \pm 6\%$, $45 \pm 10\%$ y $48 \pm 2\%$, respectivamente (Fig. 3C). Cuando se agrego 1, 10, 100nM de biocitina al medio la biotinilación de las carboxilasas no se vio afectada significativamente ($27 \pm 7\%$, $37 \pm 9\%$ y $38 \pm 16\%$) (Fig. 3D). Estos resultados son consistentes con el bloqueo de la biotinidasa resultando en la incapacidad de liberar la biotina de la biocitina para usarla en la biotinilación de las carboxilasas. Sin embargo, la reducción en los niveles de biotinilación en un medio normal y la falla en la respuesta a biotina libre después de una deficiencia de biotina implica un proceso más complejo.

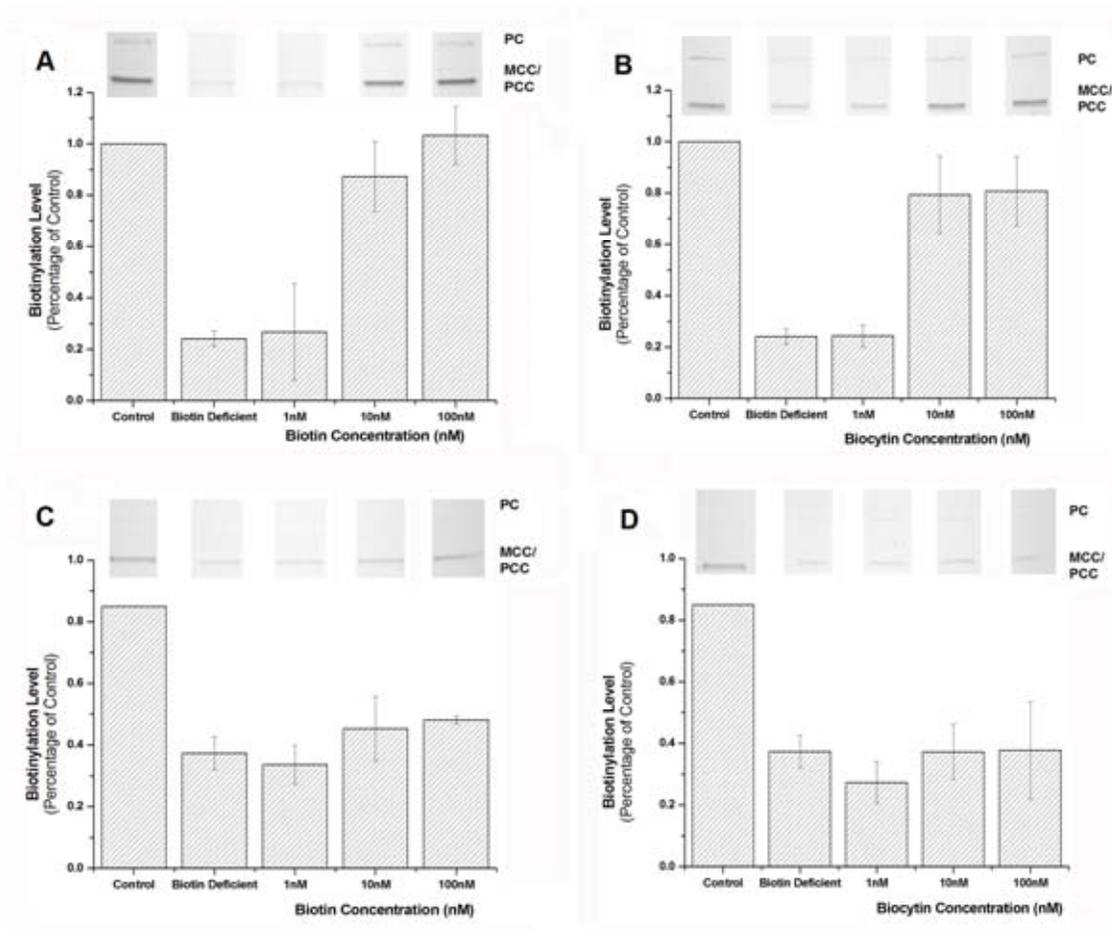


Fig. 3. Efecto de la concentración de biocitina (biotina-lisina) y biotina en la biotinilación de las carboxilasas en fibroblastos normales y MCD-BD cultivados en medio deficiente. Fibroblastos normales (panel A y B) y MCD-BD (panel C y D) fueron incubados en un medio deficiente de biotina por 13 días (células deficientes de biotina) para reducir la cantidad de biotina presente en las carboxilasas. Las células fueron transferidas a un medio que contenía 1, 10, 100nM de biotina (A y C) o biocitina (B y D) por 24hr. La recuperación de la biotinilación se determino por análisis densitométricos del western blot de la reactividad de streptavidina-AP con las bandas PCC/MCC como se describió en Materiales y Métodos. Western blots representativos se muestran en la parte de arriba de cada barra correspondiente del histograma. Los datos se normalizaron con respecto al contenido de biotina en MCC/PCC de cada línea celular que se creció en medio normal (control) como se muestra en la media \pm S.E. de tres experimentos independientes.

Efecto de la deficiencia y suplementación de biotina sobre los niveles de proteínas de carboxilasas en células normales y deficientes de biotinidasa.

Exploramos la relación entre la falta de respuesta a la estimulación con biotina que se observo en la células MDC-BD y la cantidad de apocarboxilasas disponibles para biotinilación. En este experimento estudiamos el efecto de la biotina en la recuperación de la biotinilación de las carboxilasas y los niveles de proteína de PC y MCC en células normales y deficientes de biotinidasa que crecieron en un medio deficiente de biotina.

Como se describió antes, mediante western blot utilizando streptavidina-AP se determino que la deficiencia de biotina reduce los niveles de biotinilación de PC, MCC y PCC en células normales. La adición de 1 μ M de biotina (una concentración 10 veces más alta que la utilizada anteriormente) recupero la biotinilación de las carboxilasas en células normales a niveles control en 48hr. La extensión del tiempo de incubación a 72hr no incremento mas la biotinilación de las carboxilasas (Fig. 4A).

Para entender el efecto sobre la proteína de las carboxilasas, análisis de western blot utilizando anticuerpos contra PC y MCC, mostró que la deficiencia de biotina en fibroblastos normales no afecta el nivel de estas proteínas significativamente (Fig. 4C). En las células MCD-BD, la deficiencia de biotina también reduce el contenido aparente de biotina en PC, MCC y PCC. Sin embargo, la reducción en el nivel de biotinilación de las carboxilasas es semejante con los niveles de proteína (Fig. 4B contra 4D). La incubación de las células MCD-BD deficientes de biotina con 1 μ M de biotina, incremento los niveles de biotinilación de PC a las 72hr mientras que la biotinilación de MCC mostró un incremento a las 48hr (Fig. 4B).

Otra vez, los cambios en los niveles de biotinilación fueron similares a los cambios en los niveles de proteínas. Mientras que la deficiencia de biotina reduce los niveles de proteína de PC y MCC, la adición de 1 μ M de biotina incrementa la cantidad de MCC y PC a las 48 y 72hr respectivamente (Fig. 4D). Estos resultados sugieren que la recuperación en la biotinilación de las carboxilasas en fibroblastos normales

deficientes de biotina se logra a través de la biotinilación de apocarboxilasas preexistentes, mientras que la recuperación de la biotinilación en células MCD-BD requiere la síntesis de proteínas de novo.

La recuperación dependiente de biotina de los niveles de proteína de MCC requiere una vía GCs funcional. Previamente demostramos que en las células humanas la deficiencia de biotina reduce la expresión de la mayoría de los genes que se involucran en el ciclo de biotina al interrumpir la cascada de transducción de señales HCS-GCs-PKG. Por lo tanto, examinamos la integridad de esta vía en las células normales y deficientes de biotinidasa deficientes de biotina.

Primero determinamos el efecto de la inhibición de la GCs en la expresión de MCC al incubar células deficientes de biotina en un medio que contenía $1\mu\text{M}$ de biotina y ODQ como se describió en Materiales y Métodos. En estos experimentos, nos enfocamos a los niveles de proteína de MCC debido a la poca expresión de PCC que se observo en las células MCS-BD. Nuestros resultados muestran que mientras que la deficiencia de biotina tuvo poco efecto en los niveles de proteína de MCC, la inhibición de la GCs por 48 y 72hr resulto en una reducción progresiva de la cantidad de esta proteína (Fig. 4E). Este resultado sugiere que en la células normales la vía HCS-GCs-PKG es requerida para mantener el nivel de apocarboxilasas.

Lo siguiente fue determinar al efecto de GCs en la recuperación en las células MCD-BD. A diferencia de las células normales, las células MCD-BD muestran una reducción de MCC al crecer en un medio deficiente de biotina, la inhibición de GCs no seria informativa sobre la participación de la vía de GCs en mantener los niveles de proteínas de las carboxilasas. Por lo que se crecieron células MCD-BD en un medio deficiente de biotina por 13 días y después se estimulo con 1mM de biotina o con 8-Br-GMPc (GMPc) por 48hr. Los niveles de proteína de MCC, medidos a través de un western blot, muestran que los niveles de MCC en las células MCD-BD deficientes de biotina pueden ser recuperados efectivamente de la misma manera por $1\mu\text{M}$ de biotina o GMPc. El papel de GMPc como intermediario entre la

estimulación con biotina y la síntesis de MCC fue confirmado al incubar las células MCD-BD deficientes de biotina en un medio que contenía $1\mu\text{M}$ de biotina y ODQ. Bajo estas condiciones, el nivel de proteína de MCC no se incremento (Fig. 4F). Este resultado indica que la vía HCS-GCs-PKG se requiere para la recuperación de los niveles de proteínas de las carboxilasas en los fibroblastos normales y deficientes de biotinidasa deficientes de biotina. Sin embargo, la pobre respuesta de las células MCD-BD a la biotina sugiere que la expresión de HCS, el componente regulador de esta cascada, puede estar afectado en las células deficientes de biotinidasa.

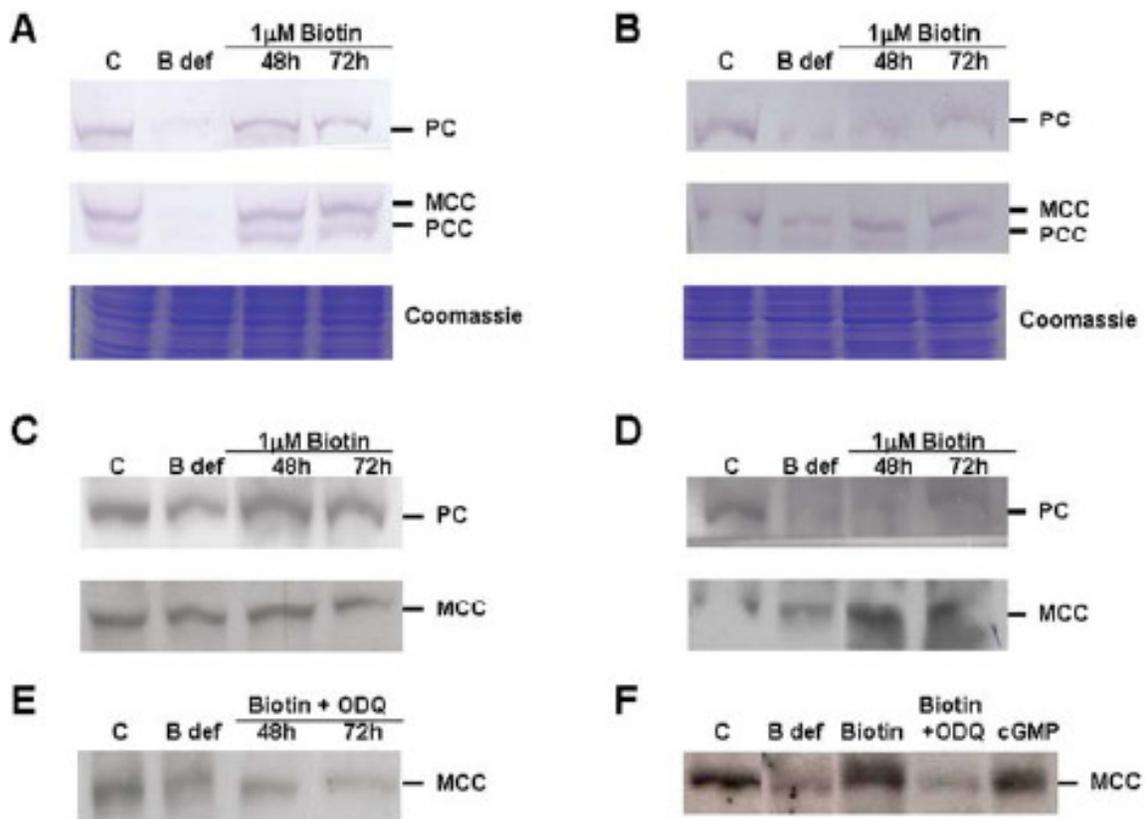


Fig. 4. Efecto de biotina, ODQ, GMPC sobre la biotinilación de las carboxilasas y los niveles de proteína de PC y MCC en fibroblastos normales y MCD-BD. Fibroblastos normales (panel A, C y E) y MCD-BD (panel B, D y F) que crecieron en un medio normal (N) o en un medio deficiente (B def) por 13 días. Después de este periodo las células se estimularon con 1mM de biotina por 48 y 72hr. En A y B los extractos se prepararon de células en cultivo y se determinó la cantidad de biotina presente en las carboxilasas por western blot utilizando streptavidina-AP como se describió en Materiales y Métodos. En C y D, el efecto de la deficiencia de biotina y recuperación de los niveles de proteína de PC y MCC se determinaron por western blot utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra las carboxilasas. En E, para explorar el papel de la vía HCS-GCs-PKG en la restauración dependiente de biotina de los niveles de proteína de MCC estudiamos el efecto de la inhibición de la GCs en fibroblastos normales deficientes de biotina estimulados con $1\mu\text{M}$ de biotina. Alternativamente, fibroblastos MCD-BD deficientes de biotina fueron estimulados con $1\mu\text{M}$ de biotina o con GMPC y los niveles de proteína de MCC determinados por análisis de western blot como se describió previamente. Para verificar las diferencias en los niveles de biotinilación y de proteína no se relacionaron con la cantidad de proteína presente en las muestras todos los geles fueron teñidos con azul de coomassie antes de transferir las proteínas a las membranas. Como un ejemplo de los controles de carga se muestra en el panel A debajo de las bandas de streptavidina-AP.

Efecto de la deficiencia de biotina sobre los niveles de ARNm de HCS y biotinidasa en fibroblastos normales y deficientes de biotinidasa.

Para probar esta hipótesis, examinamos el impacto de la deficiencia de biotina en los niveles de ARNm de HCS para determinar si la regulación transcripcional dependiente de biotina de los componentes del ciclo de biotina se afectaba en estas células. Usamos el ARNm de HCS como indicador, por que es la enzima reguladora de la transcripción dependiente de biotina y la primera enzima del ciclo de biotina sujeta al control transcripcional por la vía HCS-GCs-PKG.

Primero, examinamos el efecto de la deficiencia de biotina en relación al tiempo de incubación sobre el ARNm de HCS, Biotinidasa y β -actina en células normales. Esto se realizó creciendo las células en un medio deficiente por 13 días y midiendo los niveles de ARNm por intervalos durante todo el experimento, como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se normalizaron con los niveles iniciales de cada cultivo para facilitar la comparación de los resultados obtenidos con los diferentes cultivos. En células normales, la deficiencia de biotina reduce los niveles del ARNm de HCS de una manera gradual, con 95% del nivel inicial a los 3 días del experimento, terminando en 55-60% a los 11 y 15 días (Fig. 5A). No se observó un cambio significativo en los niveles de ARNm de Biotinidasa y β -actina durante el curso del experimento.

En células MCD-BD, los niveles de ARNm de HCS en un medio normal los niveles eran más bajo hasta 52% \pm 3 % (datos no mostrados). Normalizando a los niveles iniciales, el ARNm de HCS disminuye de manera más rápida cuando se cambian las células a un medio deficiente de biotina, mostrando una reducción detectable en el primer día del experimento y llegando hasta 60% del nivel inicial a los 3 días y 20% a los 15 días (Fig. 5B). Estos resultados sugieren que los niveles de ARNm de HCS se reducen más fácilmente en una deficiencia de biotina en las células deficientes de biotinidasa que en los fibroblastos normales y revelaron un resultado inesperado en donde el ARNm de HCS está disminuido aun en un medio normal. Los niveles de ARNm de biotinidasa y β -actina se mostraron igual que en las células normales, no

se afectaron con la deficiencia de biotina, y es consistente con los resultados previos donde la expresión de biotinidasa no se ve regulada por la disponibilidad de biotina y la vía HCS-GCs-PKG (3).

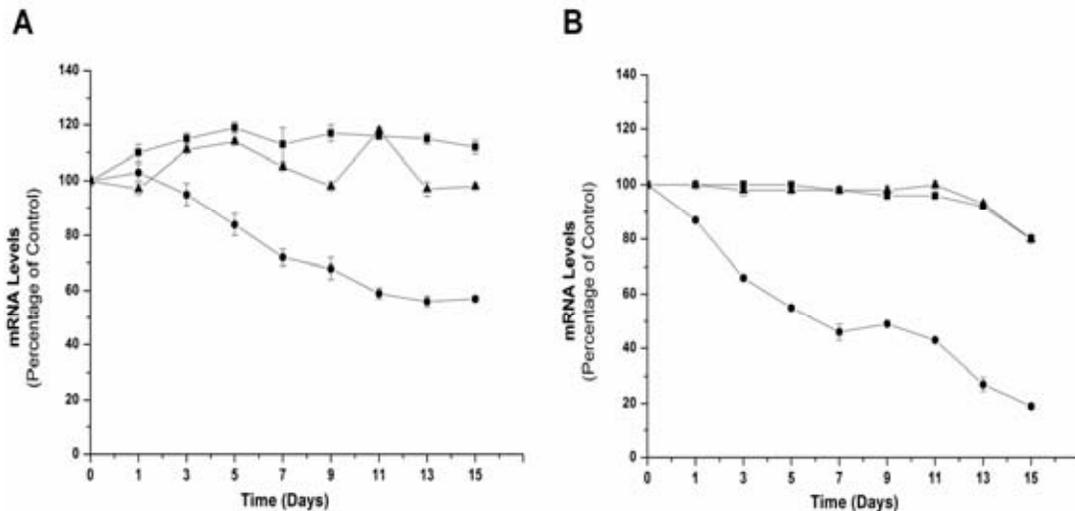


Fig. 5. Efecto de deficiencia de biotina sobre el ARNm de Holocarboxilasa Sintetasa, Biotinidasa y β -actina en fibroblastos normales y MCD-BD. Células normales (A) y MCD-BD (B) que crecieron en medio deficiente de biotina por 13 días y los niveles de ARNm de HCS (●), Biotinidasa (▲) y β -actina (■) fueron determinados por rt-PCR a diferentes tiempos, como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados son presentados como porcentaje de los valores de ARNm de las células que crecieron en un medio normal y normalizados con el valor inicial (tiempo 0) del ARNm de β -actina. Los datos son de tres experimentos diferentes y mostrados como la media \pm S.E.

Nivel de proteína de HCS y actividad de biotilación en células deficientes de biotinidasa.

La rápida reducción en los niveles de ARNm de HCS en las células MCD-BD durante la deficiencia de biotina proporciona una explicación a la reducción en los niveles de biotilación de las carboxilasas de estas células en comparación con las células normales, ya que el B-AMP que produce la HCS es requerido para mantener la vía HCS-GCs-PKG de la que depende la expresión de las carboxilasas (3, 4). Por lo tanto determinamos si la reducción del ARNm de HCS correspondía a una reducción en la función de la enzima. Para determinar la actividad de HCS, utilizamos p-67, 67 aminoácidos del carboxilo terminal del la subunidad alfa de PCC, como sustrato de biotilación (16, 25). (Fig. 6A). Se prepararon extractos totales de células normales o MCD-BD que se incubaron en la presencia de p-67 unida a una membrana de PVDF y 1 μ Ci 3 H-biotina y ATP, como se describe en Materiales y Métodos. La cantidad de radiactividad unida a la membrana, correspondiente a la

cantidad de ^3H -biotina unida a p-67, se tomo como la medida de la actividad de HCS presente en los diferentes extractos. En este experimento, los extractos de células de un medio normal se utilizaron para minimizar la presencia de apocarboxilasas en las muestras que podrían competir con el sustrato (5, 29). Los extractos de las células normales catalizaron la incorporación de 5000 +/- 500 cpm de ^3H -biotina a p-67, mientras que las células MCD-BD mostraron una reducción del 50% en la actividad de biotilación, incorporando 2320 +/- 300 cpm en el sustrato p-67 (Fig. 6B). Por análisis de western blot usando un anticuerpo contra HCS, se confirmo que la reducción en la actividad de biotilación esta asociado a una reducción en la cantidad de proteína de HCS. Las células deficientes de biotinidasa mostraron un tercio de la inmunoreactividad a HCS que se expresa en las células normales (Fig. 6C).

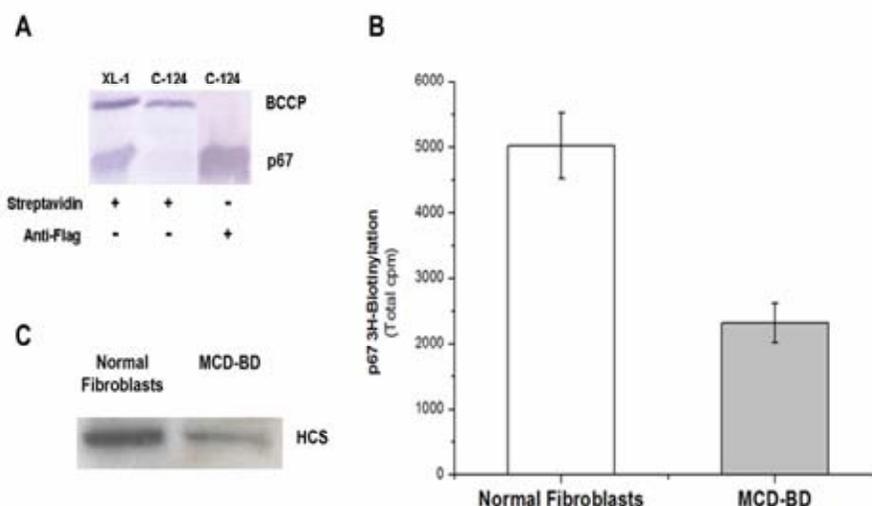


Fig. 6. Actividad y proteína de Holocarboxilasa Sintetasa en células MCD-BD. La actividad de HCS se determino en un ensayo en fase sólida en donde p-67 unida a la membrana de PVDF fue utilizado como sustrato para biotilación. (A) Preparación del sustrato p-67. Una membrana de PVDF en donde se transfirió después de una electroforesis en un gel de poliacrilamida los extractos de *E. coli* XL-1 (will type) o células C-124 (auxotrofa de biotina) que expresan p-67. Las 2 bandas de proteínas corresponden a BCCP (banda de arriba, 18 kDa) y a p-67 (banda de abajo, 14 kDa). La membrana se reveló con streptavidina-AP (se dejaron dos carriles) para la detección de las proteínas biotiladas o utilizando el anticuerpo anti-flag (carril derecho) para detectar p-67 no biotilado. En XL-1 las dos bandas están biotiladas debido a la síntesis endógena de biotina. En C-124, en donde la expresión de p-67 se hizo en un medio libre de biotina, solo la banda de arriba esta biotilada. El último carril de la derecha confirma la presencia de p-67 no biotilado en las células C-124 utilizando el anticuerpo anti-flag. (B) La actividad de HCS en cultivos de fibroblastos. p-67 unido a membrana fue incubado en presencia de ^3H -biotina, ATP y extractos tota de proteína de células humanas. La cantidad de ^3H -biotina incorporada a p-67 por fibroblastos normales (barras blancas) o MCD-BD (barras negras) se determino usando un contador de líquido de centelleo. (C) detección de la proteína HCS en cultivo de fibroblastos. El nivel de la proteína de HCS en fibroblastos normales y MCD-BD fueron visualizadas por western blot utilizando un anticuerpo contra la región amino terminal de HCS.

DISCUSIÓN

En este trabajo, investigamos el impacto de la deficiencia de biotina sobre el mantenimiento de la biotinilación y la expresión de las carboxilasas y la regulación del ciclo de biotina en células humanas bajo las condiciones de deficiencia y suplementación de biotina.

Nuestros resultados muestran que la deficiencia de biotina, como se esperaba, reduce la biotinilación de las carboxilasas en las células normales y deficientes de biotinidasa. Sin embargo, en los fibroblastos normales este efecto se revierte efectivamente después de la incubación con cantidades fisiológicas de biotina o biocitina, y en las células deficientes de biotinidasa no. Estas células son incapaces de recuperar los niveles de biotinilación de las carboxilasas con biocitina y mostraron solo una recuperación parcial después de una incubación prolongada con dosis farmacológicas de biotina libre. La falta de respuesta con biocitina es comprensible debido a que se requiere la biotinidasa para liberar a la biotina de este compuesto, pero la respuesta reducida a la biotina libre demuestra que hay un impacto más complejo de la deficiencia de biotinidasa del que se anticipó debido al defecto en la funcionalidad de la enzima. Aquí mostramos que el comportamiento de las células MCD-BD está asociado a una disminución en la expresión de las carboxilasas y HCS, la enzima responsable de la actividad de biotinilación y el componente principal de la cascada de transducción de señales HCS-GCs-PKG.

Se esperaba que las células MCD-BD tuvieran una expresión normal de HCS, ya que la enzima no está afectada directamente por las mutaciones en biotinidasa (31). En lugar de eso, observamos la reducción del nivel de ARNm de HCS, la proteína y la actividad de la enzima en células MCD-BD, aún en un medio normal. Aún más las células MCD-BD muestran una pobre recuperación en el medio rico en biotina, a pesar de la aparente habilidad intacta para utilizar la biotina libre. Proponemos que la deficiencia de biotinidasa produce una cascada de eventos que inician con el bloqueo de la utilización de la biotina unida a proteína. La reducción en el acceso a

esta fuente de biotina mimifica una deficiencia parcial de biotina que como consecuencia reduce la disponibilidad de B-AMP requerido para mantener la cascada HCS-GCs-PKG para mantener la expresión óptima de HCS y las carboxilasas, resultando en una desregulación de esta vía. Un resultado similar se observa en las células control, ilustrado en la reducción en la proteína de MCC que se obtiene por la inhibición de la GCs por ODQ, y la completa restauración de los niveles de la proteína MCC en las células MCD-BD al incubar las células con GMPc. Se llegó a la conclusión de que una vez que la síntesis de novo de las carboxilasas se detiene, la reducción aparente de la proteína de las carboxilasas es similar al resultado obtenido por la degradación intracelular de la proteína.

Debido a que en células normales, los niveles de proteína de MCC no se ven afectados por la deficiencia de biotina sugerimos que la expresión de MCC se mantiene a través del reciclamiento endógeno de biotina a través de la actividad de la biotinidasa. Por otro lado, las células MCD-BD, son incapaces de reciclar la biotina unida a proteínas, son propensas a mostrar una disminución en los niveles de proteína de las carboxilasas y de HCS por su incapacidad de mantener la vía HCS-GCs-PKG durante la deficiencia de biotina.

La necesidad de concentraciones farmacológicas de las células MCD-BD puede estar relacionada con la baja expresión de HCS que a su vez es incapaz de sintetizar suficiente B-AMP para activar la transcripción de los genes involucrados en el ciclo de biotina. Sin embargo, la habilidad de las células MCD-BD de incrementar los niveles de proteína de MCC al ser estimuladas con GMPc reveló que una vez que el bloqueo del procesamiento de biotina se supera, la integridad del resto de la vía HCS-GCs-PKG esta intacto. Esto se confirma con la observación de que con 1mM de biotina es incapaz de estimular el incremento de los niveles de MCC en células MCD-BD deficientes de biotina en presencia de ODQ.

El resultado del efecto de la deficiencia de biotinidasa sobre la regulación de la vía HCS-GCs-PKG es reducir la expresión de HCS, PC, PCC, ACC y el Transportador

Multivitamínico dependiente de Sodio (SMVT) (3, 5) produciendo una deficiencia neta de la biotinilación de las carboxilasas más abajo del umbral requerido para la contribución efectiva al metabolismo intermediario. Esta interrupción en la regulación del ciclo de biotina proporciona una explicación para el estado inicial de los pacientes con deficiencia de biotinidasa. Mientras que la mayoría de la biotina se encuentra unida a proteína (2, 14), una suplementación simple con cantidades equivalentes de biotina libre deberían de ser suficiente para tratar a la enfermedad. Pero como en la deficiencia de HCS, se requiere de un tratamiento persistente con dosis farmacológicas de biotina para mantener a los pacientes libres de los síntomas metabólicos (2). Nuestro estudio sugiere que la suplementación de biotina no solo tiene el papel para proveer el producto de la biotinidasa defectuosa, si no que también es para superar la represión en la expresión de HCS y las apocarboxilasas que acompaña a la deficiencia de biotina o la deficiencia genética de HCS.

Esto nos lleva a proponer, por lo tanto, que la expresión constitutiva de biotinidasa puede contribuir a la supervivencia de la célula al convertirse, durante periodos de insuficiencia de biotina libre, la fuente primaria de biotina que mantenga la biotinilación de las carboxilasas. La biotinidasa es la única enzima del ciclo de biotina que no se encuentra bajo el control transcripcional de la vía HCS-GCs-PKG y por lo tanto el reciclamiento endógeno de biotina se espera que sea independientemente continuo a la disponibilidad de biotina en la célula. Sin embargo, en la deficiencia de biotinidasa, el cerebro es igualmente susceptible como otros órganos a la deficiencia de biotina, resultando en todas las anomalías neurológicas, incluyendo la pérdida del oído, atrofia óptica, pérdida de la visión, calcificaciones del ganglio basal, edema cerebral, atrofia cerebral y encefalopatía necrótica subaguda (Síndrome Leigh) (32, 33), que no se observan normalmente en la deficiencia de biotina y de HCS. Aunque el ARNm de biotinidasa y la proteína se expresan en todo el cerebro, es más abundante en los centros de audición y visión, incluyendo núcleos cocleares ventrales y dorsales, complejos olivares superiores y núcleos vestibulares (34).

Debido a que estas áreas aparentemente contienen más biotina que otras regiones del cerebro, es posible que la regulación del ciclo de biotina sea de particular relevancia en estas células (26, 35). Sugerimos que la deficiencia de biotinidasa en combinación con cantidades limitantes de biotina puede llevar al desarrollo de una deficiencia secundaria de HCS que puede comprometer la supervivencia de células con una demanda metabólica más alta como las neuronas. La pérdida de la posición privilegiada del cerebro en la deficiencia de biotinidasa se apoya en datos de necropsias donde se muestra una actividad inexistente de PCC en el cerebro, mientras que el hígado y riñón, la actividad de esta enzima estaba moderadamente reducida (29% y 42%, respectivamente), con respecto a los niveles observados en individuos control (33).

Recientemente, se han descrito otros desordenes que responden a biotina, incluyendo la enfermedad de ganglio basal que responde a biotina y debilidad de miembros con respuesta a biotina (36, 37, 38, 39). Estas enfermedades son caracterizadas por encefalopatías subagudas, retraso mental, rigidez de miembros severa, distonía y cuadraparesis. Debido a que estos síntomas pueden ser prevenidos o revertidos con dosis farmacológicas de biotina y que en algunos casos la deficiencia de biotinidasa ha sido asociada con encefalopatías progresivas (40, 41), se ha sugerido que la vía de la biotina este involucrada en estos desordenes. Aun así, la relación con las anomalías en la biotinidasa, HCS o el transporte de biotina han sido evasivas (36, 37, 42). Es posible que estos desordenes representen diferentes grados de la misma enfermedad en donde el delicado balance entre la utilización de la biotina endógena y el reciclamiento endógeno de la vitamina se ve interrumpido, afectando la expresión de la HCS y del ciclo de biotina.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dr. Diana Pacheco-Álvarez del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Shannon Healy, Universidad de Calgary y María Del Río Salazar por los comentarios a este trabajo. Agradecemos la asistencia técnica de Colette

Michalack, Luz María Chiu Velázquez y Jorge Armando Valdés Contreras. Este trabajo se realizó con los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 48862) y Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN220206-3), Universidad Nacional Autónoma de México.

ABREVIATURAS

Las abreviaciones utilizadas son: HCS, Holocarboxilasa Sintetasa; MCD, Deficiencia Múltiple de Carboxilasas; B-AMP, 5'-Biotinil-AMP; PC, Piruvato carboxilasa; PCC, Propionil CoA carboxilasa; ACC, Acetil CoA carboxilasa; MCC, Metilcromtonil CoA carboxilasa; SMVT, Transportador Multivitamínico dependiente de Sodio.

REFERENCIAS

1. Pacheco-Álvarez, D., Solórzano-Vargas, R.S., León-Del-Río, A. (2002) Biotin in metabolism and its relationship to human disease. **Arch. Med. Res.** 33, 439-447.
2. Wolf, B. (2001) Disorders of biotin metabolism. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver, C., Beaudet A.L. William S, Valle D., eds. (New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division), pp 3935-3962.
3. Pacheco-Álvarez D., Solórzano-Vargas, R.S., Gravel, R.A., Cervantes-Roldán, R., Velázquez, A., León-Del-Río A. (2004) Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency. *J. Biol. Chem.* 279, 52312-52318.
4. Solórzano-Vargas, R.S., Pacheco-Álvarez D., León-Del-Río, A. (2002) Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 99, 5325-5330.
5. Pacheco-Álvarez D., Solórzano-Vargas, R.S., González-Noriega, A, Michalak, C., Zempleni, J., León-Del-Río, A. (2005) Biotin availability regulates expression of the sodium-dependent multivitamin transporter and the rate of biotin uptake in HepG2 cells. **Mol. Genet. Metab.** 85, 301-307.
6. Chauhan, J., Dakshinamurti, K. (1991) Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J. Biol. Chem.* 266, 10035-10038.
7. Collins, J., Paietta, E., Green, R., Morell, A., Stockert, R. (1988) Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2. *J. Biol. Chem.* 263, 11280-11283.
8. Deodhar, A.D., Mistry, S.P. (1970) Regulation of glycolysis in biotin-deficient rat liver. *Life Sci. II.* 9, 581-588.

9. Dakshinamurti, K., Tarrago-Litvak, L., Hong, H. C. (1970) Biotin and glucose metabolism. *Can. J. Biochem.* *48*, 493-500.
10. Borboni, P., Magnaterra, R., Rabini, R.A., Staffolani, R., Porzio, O., Sesti, G., Fusco, A., Mazzanti, L., Lauro, R., Marlier, L.N. (1996) Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured beta-cells. *Acta Diabetol.* *33*, 154-158.
11. De la Vega, L.A., Stockert, R.J. (2000) Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *279*, 2037-2042.
12. Maeda, Y., Kawata, S., Inui, Y., Fukuda, K., Igura, T., Matsuzawa, Y. (1996) Biotin deficiency decreases ornithine transcarbamylase activity and mRNA in rat liver. *J. Nutr.* *126*, 61-66.
13. Rodríguez-Meléndez, R., Cano, S., Mendez, S.T., Velazquez, A. (2001) Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J. Nutr.* *131*, 1909-1913.
14. Pispa, J. (1965) Animal biotinidase. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* *43*, 1-39.
15. Chapman-Smith A., Cronan, J. E. Jr., (1999) The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 359-363.
16. León-Del-Río, A., Gravel, R.A. (1994) Sequence requirements for the biotinylation of carboxyl-terminal fragments of human propionyl-CoA carboxylase alpha subunit expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *269*, 22964-22968.
17. Cole, H., Reynolds, T.R., Lockyer, J.M., Buck, G.A., Denson, T., Spence, J. E., Hymes, J., Wolf, B. (1994) Human serum biotinidase. cDNA cloning, sequence, and characterization. *J. Biol. Chem.* *269*, 6566-6570.

18. Chiang, G., Mistry, S. (1974) Activities of pyruvate carboxylase and propionyl CoA carboxylase in rat tissues during biotin deficiency and restoration of the activities after biotin administration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **146**, 21-24.
19. Hassel, B. (2000) Carboxylation and anaplerosis in neurons and glia. *Mol. Neurobiol.* **22**, 21-40.
20. Wolf, B., Grier, R., Secor, McVoy Jr., Heard, G. (1985) Biotinidase deficiency: a novel vitamin recycling defect. *J. Inherit. Metab. Dis.* **8**, 53-58.
21. Dupuis, L., Campeau, E., Leclerc, D., Gravel, R.A. (1999) Mechanism of biotin responsiveness in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **66**, 80-90.
22. Sander, J.E., Packman, S., Townsend, J.J. (1982) Brain pyruvate carboxylase and the pathophysiology of biotin-dependent diseases. *Neurology.* **32**, 878-80.
23. Dupuis, L., León-Del-Río, A., Leclerc, D., Campeau, E., Sweetman, L., Saudubray, J.M., Herman, G., Gibson, K.M., Gravel, R.A. (1996) Clustering of mutations in the biotin-binding region of holocarboxylase synthetase in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1011-1016.
24. Narang, M.A., Dumas, R., Ayer, L.M., Gravel, R.A. (2004) Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 15-23.
25. León-Del-Río, A., Leclerc, D., Akerman, B., Wakamatsu, N., Gravel, R.A. (1995) Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** **92**, 4626-4630.
26. Wolf, B., Jensen, K.P., Barshop, B., Blitzler, M., Carlson, M., Goudie, D.R., Gokcay, G.H., Demirkol, M., Baykal, T., Demir, F., *et al* (2005) Biotinidase deficiency: novel mutations and their biochemical and clinical correlates. *Hum. Mutat.* **25**, 413.

27. Knight, H., Reynolds, T.R., Meyers, G.A., Pomponio, R.J., Buck, G.A., Wolf, B. (1998) Structure of the human biotinidase gene. *Mamm. Genome.* 9, 327-330.
28. Norrgard, K.J., Pomponio, R.J., Swango, K.L., Hymes, J., Reynolds, T., Buck, G.A., Wolf, B. (1998) Double mutation (A171T and D444H) is a common cause of profound biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in the United States. *Hum. Mutat.* 11, 410.
29. Weiner, D., Wolf, B. (1991) Biotin uptake, utilization, and efflux in normal and biotin-deficient rat hepatocytes. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 46, 344-363.
30. Rodríguez-Meléndez R., Pérez-Andrade, M.E., Díaz, A., Deolarte, A., Camacho-Arroyo, I., Cicerón, I., Ibarra, I., Velázquez, A. (1999) 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.
31. Burri, B., Sweetman, L., Nyhan, W. (1985) Heterogeneity of holocarboxylase synthetase in patients with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 37, 326-337.
32. Schulz, P.E., Weiner, S.P., Belmont, J.W., Fishman, M.A. (1988) Basal ganglia calcifications in a case of biotinidase deficiency. *Neurology.* 38, 1326-1328.
33. Baumgartner, E.R., Suormala, T.M., Wick, H., Probst, A., Blauenstein, U., Bachmann, C., Vest, M. (1989) Biotinidase deficiency: a cause of subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh syndrome). Report of a case with lethal outcome. *Pediatr. Res.* 26, 260-266.
34. Heller, A.J., Stanley, C., Shaia, W.T., Sismanis, A., Spencer, R.F., Wolf, B. (2002) Localization of biotinidase in the brain: implications for its role in hearing loss in biotinidase deficiency. *Hear. Res.* 173, 62-68.
35. Bhagavan, H.N., Coursin, D.B. (1970) Depletion of biotin from brain and liver in biotin deficiency. *J. Neurochem.* 17, 289-290.

36. 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) Biotin-responsive basal ganglia disease: a novel entity. *Brain*. 121, 1267-1279.
37. Subramanian, V.S., Marchant, J.S., Said, H.M. (2006) Biotin-responsive basal ganglia disease-linked mutations inhibit thiamine transport via hTHTR2: biotin is not a substrate for hTHTR2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 291, 851-859.
38. Adhisivam, B., Mahto, D., Mahadevan, S. (2007) Biotin responsive limb weakness. *Indian Pediatr*. 44, 228-230.
39. Straussberg, R., Shorer, Z., Weitz, R., Basel, L., Kornreich, L., Corie, C.I., Harel, L., Djaldetti, R., Amir, J. (2002) Familial infantile bilateral striatal necrosis: clinical features and response to biotin treatment. *Neurology*. 59, 983-989.
40. Suchy, S.F., McVoy, J.S., Wolf, B. (1985) Neurologic symptoms of biotinidase deficiency: possible explanation. *Neurology*. 35, 1510-1511.
41. Héron, B., Gautier, A., Dulac, O., Ponsot, G. (1993) Biotinidase deficiency. Progressive encephalopathy curable with biotin. *Arch. Fr. Pediatr*. 50, 875-878.
42. Lo, W., Kadlecsek, T., Packman, S. (1991) Biotin transport in the rat central nervous system. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 37, 567-572.

CAPITULO IV:

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento, la importancia de la vitamina biotina en el metabolismo se reducía a su función como cofactor. Sin embargo, recientemente un sinnúmero de investigadores han mostrado que la función de biotina dentro de la célula es más compleja de lo que se esperaba.

La importancia de la función de la biotina como cofactor, se ve reflejado cuando se presentan enfermedades de tipo genético, como la Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC) en sus formas neonatal y juvenil. Los pacientes presentan una serie de manifestaciones clínicas y bioquímicas muy similares, aunque el origen de la enfermedad es diferente; una deficiencia en la actividad de HCS y por la tanto en la activación de las carboxilasas o en la de Biotinidasa, el reciclamiento de la vitamina.

Trabajos previos han demostrado que la biotina regula la expresión y cantidad de las enzimas involucradas en su metabolismo; iniciando con los trabajos de Rodríguez-Meléndez (45, 59), y posteriormente con los trabajos realizados en nuestro laboratorio; donde se determinó que la biotina actúa a través de una cascada de transducción de señales involucrando a la HCS-GCs-PKG, regulando así la expresión genética de las carboxilasas dependientes de biotina, el transportador membranal SMVT y la HCS; mientras que la expresión de biotinidasa se mantiene independiente al nivel de biotina dentro de la célula (49, 51).

En este trabajo mostramos que las células de pacientes deficiencia de biotinidasa, además de presentar una menor biotinilación de carboxilasas también presentan una expresión reducida de las proteínas que se involucran en el transporte y utilización de biotina. Estas observaciones nos permiten proponer un modelo para explicar el fenotipo de la deficiencia de Biotinidasa y las similitudes con la deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa.

Durante el desarrollo de este trabajo mostramos que la imposibilidad para reciclar biotina endógena provoca en las células deficientes de biotinidasa una deficiencia intracelular de biotina provocando un malfuncionamiento de la cascada de señalización HCS-GCs-PKG de la que depende la expresión de los genes que codifican a las carboxilasas dependientes de biotina, al transportador membranaral SMVT y a la misma HCS. Como resultado, esta disminución en la expresión de estas proteínas hace más vulnerable a estas células a cambios que afectan en la disponibilidad de biotina. El efecto de la deficiencia de biotinidasa sobre la regulación de la cascada HCS-sGC-PKG y la expresión de carboxilasas se comprobó al mostrar que la incubación de células de pacientes deficientes de biotina recuperaban los niveles de ARNm de carboxilasas y HCS al ser incubadas con biotina o con un análogo no hidrolizable de GMPc.

Una de las principales contribuciones de mi trabajo fue mostrar que los pacientes deficientes de biotinidasa pueden desarrollar una deficiencia secundaria de HCS. Esta observación podría ser la explicación de las semejanzas clínicas y bioquímicas entre ambas enfermedades; ya que anteriormente se suponía que se debía a una deficiencia de biotina, debido a la incapacidad de liberar la biotina de su unión con proteína en el intestino evitando así su correcta absorción. De igual importancia, en este trabajo mostramos que altas concentraciones de biotina son requeridas para reestablecer la expresión de HCS, carboxilasas y SMVT; explicando el porqué estos pacientes a pesar de expresar una HCS normal requieren de dosis farmacológicas para mantener la homeostasis metabólica.

Durante los últimos años se han reportado una serie de enfermedades de origen desconocido cuyos síntomas pueden prevenirse o revertirse suministrando altas dosis de biotina a los pacientes. Entre estos desordenes se puede mencionar a la enfermedad de ganglio basal, el síndrome de Leigh y la enfermedad de debilitamiento de extremidades. Mediante este trabajo proponemos que al interrumpirse la regulación del ciclo de biotina; esto puede resultar en la muerte de células con una demanda elevada de energía y/o biotina como por ejemplo las

neuronas. En el cerebro, la vitamina biotina cumple 2 funciones importantes: la primera es administrar la energía necesaria al cerebro mediante anaplerosis del ciclo de krebs a través de la actividad de las carboxilasas dependientes de biotina; la segunda mediante la actividad de PC se ve involucrada en la biosíntesis de sustancias neurotransmisoras, donde provee de α -cetoglutarato y glutamina; precursores del restablecimiento de la reserva de neurotransmisores en los terminales presinápticos (8).

Esto es de gran importancia, ya que se ha mostrado que los núcleos cerebrales involucrados en la visión y audición sean particularmente ricos en biotina y expresan mayores cantidades de biotinidasa (57). Si la hipótesis que proponemos es correcta, implicaría que durante la deficiencia de biotinidasa estas células serían particularmente afectadas por concentraciones bajas de biotina. Permittiéndonos explicar mediante este modelo porque pacientes deficientes de biotinidasa presentan manifestaciones neurológicas como pérdida auditiva y atrofia óptica a diferencia de los pacientes deficientes de HCS, los cuales no presentan este tipo de manifestaciones.

Los resultados que aquí presentamos, sugieren que al presentarse la deficiencia de biotinidasa, el mecanismo tisular (HCS-GCs-PKG) que garantiza un suministro constante de biotina al cerebro, confiriéndole protección contra una deficiencia de biotina para asegurar su funcionamiento; se ve afectado dejándolo vulnerable cuando se presenta la deficiencia de biotinidasa en combinación con la deficiencia secundaria de HCS. Este modelo que proponemos, explicaría por qué los pacientes con deficiencia de biotinidasa tienen manifestaciones neurológicas severas que no se presentan en los pacientes con deficiencia de HCS.

Cuando se presenta una deficiencia de biotinidasa, no se permite la liberación de la biotina proveniente de los alimentos en el intestino lo que produciría a nivel de organismo una deficiencia de biotina. Intracelularmente no se permite la liberación de

biotina (reutilización) por lo que se agudiza más el fenotipo al introducirse la deficiencia secundaria de HCS.

Finalmente, una de las contribuciones más importantes de mi trabajo es el describir que la actividad de la enzima biotinidasa no solo es importante para liberar a la biotina unida a proteínas en los alimentos y durante el recambio de proteínas. Los resultados aquí mostrados indican que la enzima biotinidasa funciona como un amortiguador que protege a las células, a través de la reutilización de la vitamina endógena, de cambios en la concentración de biotina. Esto permite un suministro constante lo que resulta no solo en la activación de carboxilasas sino en la expresión de las enzimas del ciclo de biotina. Este mecanismo de salvaguarda del metabolismo intermediario dependiente de biotina presumiblemente juega un papel fundamental en periodos de ayuno en la supervivencia de nuestros antepasados durante la evolución humana.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

1. Dakshinamurti K, Chauhan J. *Annu Rev Nutr.* (1988). **8**:211-33. Regulation of biotin enzymes.
2. McMahon RJ. *Annu Rev Nutr.* (2002). **22**:221-39. Epub 2002 Jan 4. Biotin in metabolism and molecular biology.
3. Sweetman L, Nyhan WL. *Annu Rev Nutr.* (1986). **6**:317-43. Inheritable biotin-treatable disorders and associated phenomena.
4. Wolf, B. (2001) Disorders of biotin metabolism. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver, C., Beaudet A.L. William S, Valle D., eds. (New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division), pp 3935-3962.
5. Ziegler EE, Filer JL Jr. *Present Knowledge in Nutrition. Seventh Edition.* 1996. International Life Sciences Institute-Nutrition Foundation.
6. Zemleni J, Mock DM. *J Nutr Biochem.* (1999). Mar; **10**(3):128-38. Biotin biochemistry and human requirements.
7. Pacheco-Álvarez D, Solórzano-Vargas RS, Del Río AL. *Arch Med Res.* (2002). Sep-Oct; **33**(5):439-47. Biotin in metabolism and its relationship to human disease.
8. Jitrapakdee S, Wallace JC. *Curr Protein Pept Sci.* (2003). Jun; **4**(3):217-29. The biotin enzyme family: conserved structural motifs and domain rearrangements.
9. Campeau E, Desviat LR, Leclerc D, Wu X, Pérez B, Ugarte M, Gravel RA. *Mol Genet Metab.* (2001). Sep-Oct; **74**(1-2):238-47. Structure of the PCCA gene and distribution of mutations causing propionic acidemia.

- 10.** De Meirleir L. *J Child Neurol.* (2002). Dec; **17** Suppl 3:3S26-33; discussion 3S33-4. Defects of pyruvate metabolism and the Krebs cycle.
- 11.** Munday MR. *Biochem Soc Trans.* (2002). Nov; **30** (Pt 6):1059-64. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase.
- 12.** Balamurugan K, Ortiz A, Said HM. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2003). Jul; **285**(1):G73-7. Epub 2003 Mar 19. Biotin uptake by human intestinal and liver epithelial cells: role of the SMVT system.
- 13.** Suzuki Y, Aoki Y, Ishida Y, Chiba Y, Iwamatsu A, Kishino T, Niikawa N, Matsubara Y, Narisawa K. *Nat Genet.* (1994). Oct; **8**(2):122-8. Isolation and characterization of mutations in the human holocarboxylase synthetase cDNA.
- 14.** Chauhan J, Dakshinamurti K. *J Biol Chem.* (1986). Mar **25**;261(9):4268-75. Purification and characterization of human serum biotinidase.
- 15.** Wolf B, Hymes J, Heard GS. *Methods Enzymol.* (1990). **184**:103-11. Biotinidase.
- 16.** Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B. *Methods Enzymol.* (1997). **279**:422-34. Biotinidase in serum and tissues.
- 17.** Wolf B. *J Nutr Biochem.* (2005). Jul; **16**(7):441-5. Biotinidase: its role in biotinidase deficiency and biotin metabolism.
- 18.** Beckett D. *Annu Rev Genet.* (2007). **41**:443-64. Biotin sensing: universal influence of biotin status on transcription.

- 19.** Hiratsuka M, Sakamoto O, Li X, Suzuki Y, Aoki Y, Narisawa K. *Biochim Biophys Acta*. (1998). Jun 11; **1385**(1):165-71. Identification of holocarboxylase synthetase (HCS) proteins in human placenta.
- 20.** Yang X, Aoki Y, Li X, Sakamoto O, Hiratsuka M, Kure S, Taheri S, Christensen E, Inui K, Kubota M, Ohira M, Ohki M, Kudoh J, Kawasaki K, Shibuya K, Shintani A, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Narisawa K, Matsubara Y, Suzuki Y. *Hum Genet*. (2001). Nov; **109**(5):526-34. Epub 2001 Oct 5. Structure of human holocarboxylase synthetase gene and mutation spectrum of holocarboxylase synthetase deficiency.
- 21.** Morita J, Thuy LP, Sweetman L. *Mol Genet Metab*. (1998). Aug; **64**(4):250-5. Deficiency of biotinyl-AMP synthetase activity in fibroblasts of patients with holocarboxylase synthetase deficiency.
- 22.** Bailey LM, Ivanov RA, Jitrapakdee S, Wilson CJ, Wallace JC, Polyak SW. *Hum Mutat*. (2008). Jun; **29**(6):E47-57. Reduced half-life of holocarboxylase synthetase from patients with severe multiple carboxylase deficiency.
- 23.** Wolf B. *J Inherit Metab Dis*. (1991). **14**(6):923-7. Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency.
- 24.** Sivri HS, Genç GA, Tokatli A, Dursun A, Coşkun T, Aydın HI, Sennaroğlu L, Belgin E, Jensen K, Wolf B. *J Pediatr*. (2007). Apr; **150**(4):439-42. Hearing loss in biotinidase deficiency: genotype-phenotype correlation.
- 25.** Pomponio RJ, Hymes J, Reynolds TR, Meyers GA, Fleischhauer K, Buck GA, Wolf B. *Pediatr Res*. (1997). Dec; **42**(6):840-8. Mutations in the human biotinidase gene that cause profound biotinidase deficiency in symptomatic children: molecular, biochemical, and clinical analysis.

- 26.** Milánkovics I, Kámory E, Csókay B, Fodor F, Somogyi C, Schuler A. *Mol Genet Metab.* (2007). Mar; **90**(3):345-8. Epub 2006 Dec 20. Mutations causing biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in Western Hungary.
- 27.** Wolf B, Spencer R, Gleason T. *J Pediatr.* (2002). Feb; **140**(2):242-6. Hearing loss is a common feature of symptomatic children with profound biotinidase deficiency.
- 28.** Hymes J, Stanley CM, Wolf B. *Hum Mutat.* (2001). Nov; **18**(5):375-81. Mutations in BTB causing biotinidase deficiency.
- 29.** Mühl A, Möslinger D, Item CB, Stöckler-Ipsiroglu S. *Eur J Hum Genet.* (2001). Apr; **9**(4):237-43. Molecular characterisation of 34 patients with biotinidase deficiency ascertained by newborn screening and family investigation.
- 30.** Wolf B, Jensen K, Hüner G, Demirkol M, Baykal T, Divry P, Rolland MO, Perez-Cerdá C, Ugarte M, Straussberg R, Basel-Vanagaite L, Baumgartner ER, Suormala T, Scholl S, Das AM, Schweitzer S, Pronicka E, Sykut-Cegielska J. *Mol Genet Metab.* (2002). Sep-Oct; **77**(1-2):108-11. Seventeen novel mutations that cause profound biotinidase deficiency.
- 31.** Pomponio RJ, Ozand PT, Al Essa M, Wolf B. *J Inherit Metab Dis.* (2000). Mar; **23**(2):185-7. Novel mutations in children with profound biotinidase deficiency from Saudi Arabia.
- 32.** Pomponio RJ, Coskun T, Demirkol M, Tokatli A, Ozalp I, Hüner G, Baykal T, Wolf B. *J Inherit Metab Dis.* (2000). Mar; **23**(2):120-8. Novel mutations cause biotinidase deficiency in Turkish children.

- 33.** Funghini S, Donati MA, Pasquini E, Gasperini S, Ciani F, Morrone A, Zammarchi E. *J Inherit Metab Dis.* (2002). Aug; **25**(4):328-30. Two new mutations in children affected by partial biotinidase deficiency ascertained by newborn screening.
- 34.** László A, Schuler EA, Sallay E, Endreffy E, Somogyi C, Várkonyi A, Havass Z, Jansen KP, Wolf B. *J Inherit Metab Dis.* (2003). **26**(7):693-8. Neonatal screening for biotinidase deficiency in Hungary: clinical, biochemical and molecular studies.
- 35.** Wolf B, Jensen KP, Barshop B, Blitzler M, Carlson M, Goudie DR, Gokcay GH, Demirkol M, Baykal T, Demir F, Quarry S, Shih LY, Pedro HF, Chen TH, Slonim AE. *Hum Mutat.* (2005). Apr; **25**(4):413. Biotinidase deficiency: novel mutations and their biochemical and clinical correlates.
- 36.** Neto EC, Schulte J, Rubim R, Lewis E, DeMari J, Castilhos C, Brites A, Giugliani R, Jensen KP, Wolf B. *Braz J Med Biol Res.* (2004). Mar; **37**(3):295-9. Epub 2004 Mar 3. Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: biochemical and molecular characterizations.
- 37.** Norrgard KJ, Pomponio RJ, Hymes J, Wolf B. *Pediatr Res.* (1999). Jul; **46**(1):20-7. Mutations causing profound biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in the United States occur at different frequencies than in symptomatic children.
- 38.** Bhullar RP, Dakshinamurti K. *J Cell Physiol.* (1985). Jun; **123**(3):425-30. The effect of biotin on cellular functions in HeLa cells.
- 39.** Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM, Velázquez A, Wang J, Fernandez-Mejia C. *Endocrinology.* (1999). Oct; **140**(10):4595-600. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats.

- 40.** Paulose CS, Thliveris JA, Viswanathan M, Dakshinamurti K. *Horm Metab Res.* (1989). Dec; **21**(12):661-5. Testicular function in biotin-deficient adult rats.
- 41.** Watanabe T, Dakshinamurti K, Persaud TV. *J Nutr.* (1995) Aug; **125**(8):2114-21. Biotin influences palatal development of mouse embryos in organ culture.
- 42.** Petrelli, F., Marsili, G. and Moretti, P. *Biochem. Exp. Biol.* (1976). **12**, 461–465. RNA, DNA, histones and interactions between histone proteins and DNA in the liver of biotin-deficient rats.
- 43.** Vesely DL. *Science.* (1982) Jun **18**; 216(4552):1329-30. Biotin enhances guanylate cyclase activity.
- 44.** Vesely DL, Wormser HC, Abramson HN. *Mol Cell Biochem.* (1984); **60**(2):109-14. Biotin analogs activate guanylate cyclase.
- 45.** Rodríguez-Meléndez R, Cano S, Méndez ST, Velázquez A. *J Nutr.* (2001) Jul;**131**(7):1909-13. Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats.
- 46.** Singh IN, Dakshinamurti K. *Mol Cell Biochem.* (1988) Jan; **79**(1):47-55. Stimulation of guanylate cyclase and RNA polymerase II activities in HeLa cells and fibroblasts by biotin.
- 47.** Wiedmann S, Eudy JD, Zemleni J. *J Nutr.* (2003). Mar; **133**(3):716-9. Biotin supplementation increases expression of genes encoding interferon-gamma, interleukin-1beta, and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, and decreases expression of the gene encoding interleukin-4 in human peripheral blood mononuclear cells.

- 48.** Zemleni J. *Annu Rev Nutr.* (2005); **25**: 175-96. Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin.
- 49.** Solórzano-Vargas RS, Pacheco-Álvarez D, León-Del-Río A. *Proc Natl Acad. Sci U S A.* (2002). Apr 16; **99**(8):5325-30. Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells.
- 50.** Narang MA, Dumas R, Ayer LM, Gravel RA. *Hum Mol Genet.* (2004). Jan 1; **13**(1):15-23. Epub 2003 Nov 12. Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase.
- 51.** Pacheco-Álvarez D, Solórzano-Vargas RS, Gravel RA, Cervantes-Roldán R, Velázquez A, León-Del-Río A. *J Biol Chem.* (2004). Dec 10; **279**(50):52312-8. Epub 2004 Sep 28. Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency.
- 52.** Prasad PD, Wang H, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Devoe LD, Ganapathy V. *Arch Biochem Biophys.* (1999). Jun 1; **366**(1):95-106. Molecular and functional characterization of the intestinal Na⁺-dependent multivitamin transporter.
- 53.** Polyak SW, Chapman-Smith A, Brautigam PJ, Wallace JC. *J Biol Chem.* (1999). Nov 12; **274**(46):32847-54. Biotin protein ligase from *Saccharomyces cerevisiae*. The N-terminal domain is required for complete activity.
- 54.** Chapman-Smith A, Cronan JE Jr. *Trends Biochem Sci.* (1999). Sep; **24**(9):359-63. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity.

- 55.** León-Del-Río, A., Leclerc, D., Akerman, B., Wakamatsu, N., Gravel, R.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (1995). **92**, 4626-4630. Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of *Escherichia coli*.
- 56.** Dakshinamurti K, Cheah-Tan C. *Arch Biochem Biophys.* (1968). Sep 20; **127**(1):17-21. Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat.
- 57.** Heller, A.J., Stanley, C., Shaia, W.T., Sismanis, A., Spencer, R.F., Wolf, B. *Hear. Res.* (2002). **173**, 62-68. Localization of biotinidase in the brain: implications for its role in hearing loss in biotinidase deficiency.
- 58.** Suzuki Y, Yang X, Aoki Y, Kure S, Matsubara Y. *Hum Mutat.* (2005). Oct; **26** (4):285-90. Mutations in the holocarboxylase synthetase gene HLCS.
- 59.** Rodríguez-Fuentes N, López-Rosas I, Román-Cisneros G, Velázquez-Arellano A. *Mol Genet Metab.* (2007). Nov; **92**(3):222-8. Epub 2007 Aug 27. Biotin deficiency affects both synthesis and degradation of pyruvate carboxylase in rat primary hepatocyte cultures.

ABREVIATURAS:

ACC	_____	Acetil CoA carboxilasa
PC	_____	Piruvato carboxilasa
PCC	_____	Propionil CoA carboxilasa
MCC	_____	Metilcrontonil CoA carboxilasa
B-AMP	_____	5'-Biotinil-AMP
HCS	_____	Holocarboxilasa Sintetasa
SMVT	_____	Transportador Multivitamínico Dependiente de Sodio
DMC	_____	Deficiencia Múltiple de Carboxilasas
GCs	_____	Guanilato Ciclasa soluble
PKG	_____	Proteína cinasa dependiente de GMPc
ODQ	_____	1-H (1,2,4) oxadiazolo-[4,3-a]quinaxolin-1-one
8-Br-GMPc	_____	8-Bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate

APENDICE

1. PUBLICACIONES.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

¹ Recipients of doctoral scholarships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

² To whom correspondence should be addressed: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México. Tel.: 5255-5622-8940; E-mail: leon@biomedicas.unam.mx.

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

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

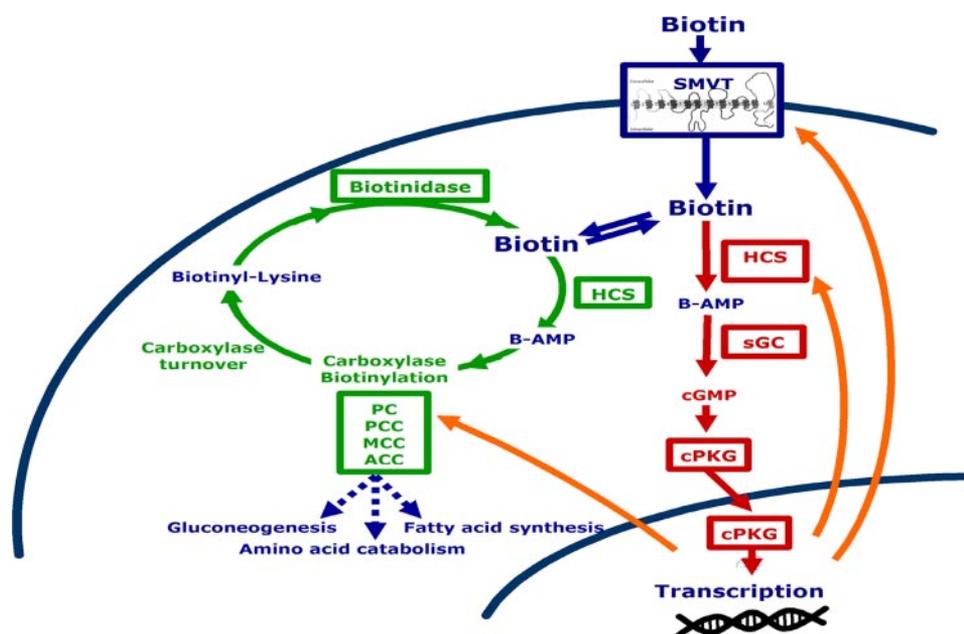


FIGURE 1. **The biotin cycle and the HCS-dependent transcriptional regulation in human cells.** Shown is a schematic representation of the biotin cycle (green arrows) and the HCS-dependent signal transduction pathway (red arrows) responsible for the transcriptional regulation of PC, PCC, MCC, ACC, sodium-dependent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

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

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

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

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

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

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

EXPERIMENTAL PROCEDURES

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

Deficiency of Biotinidase Activity Disrupts HCS Expression

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

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

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

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

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

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

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

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

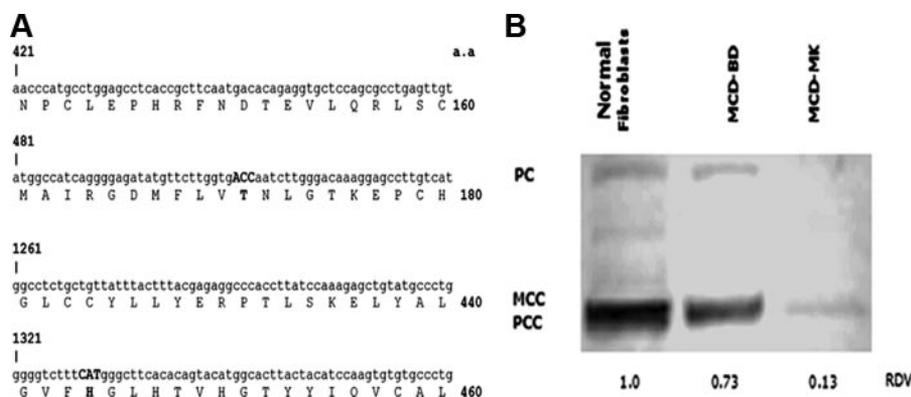


FIGURE 2. Molecular and functional characterization of cell line MCD-BD. *A*, partial biotinidase amino acid sequence (residues 140–180 and 420–460) localizing substitutions A171T and D444H found in the cell line MCD-BD. The corresponding nucleotide sequence is shown above the amino acid sequences with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

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

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

RESULTS

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

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

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

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

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

Deficiency of Biotinidase Activity Disrupts HCS Expression

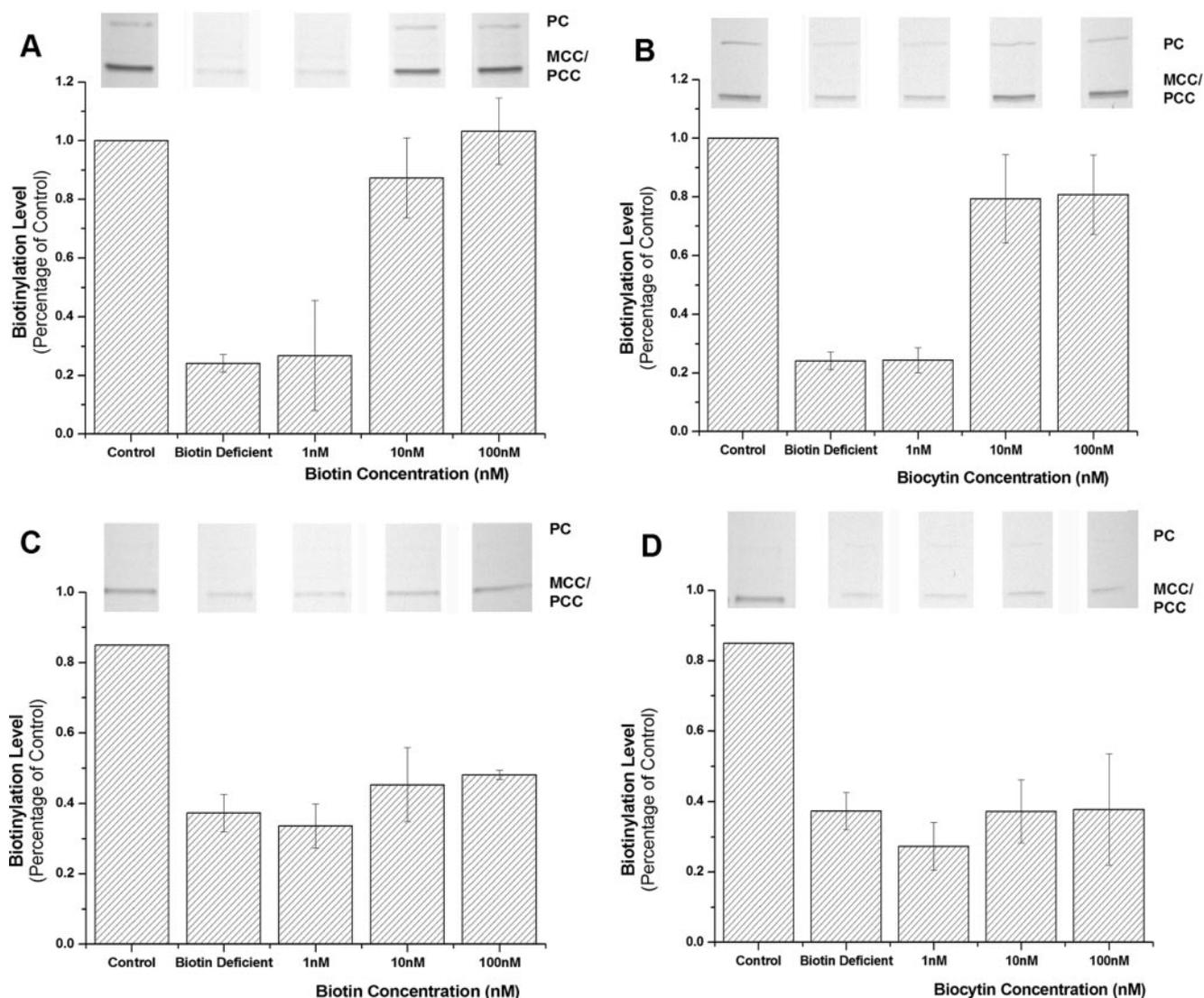


FIGURE 3. Effect of biocytin (biotinyl-lysine) and biotin concentration in carboxylase biotinylation of normal and MCD-BD fibroblasts cultivated in biotin-deficient medium. Normal (A and B) and MCD-BD fibroblasts (C and D) were incubated in biotin-deficient medium for 13 days (biotin deficient cell)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

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

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

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

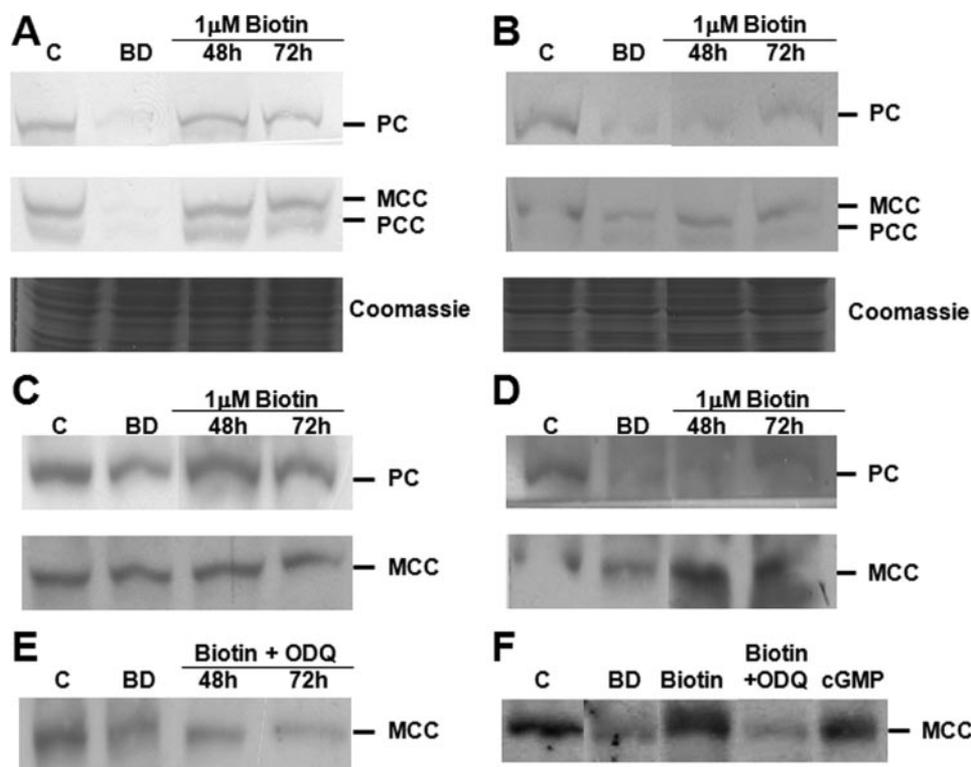


FIGURE 4. Effect of biotin, ODQ and 8-Br-cGMP on carboxylase biotinylation and PC and MCC protein levels in normal and MCD-BD fibroblasts. Normal (A, C, and E) and MCD-BD fibroblasts (B, D, and F) were grown in normal biotin containing medium (N) or biotin-free medium (B def) for 13 days. After this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

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

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

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

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

Deficiency of Biotinidase Activity Disrupts HCS Expression

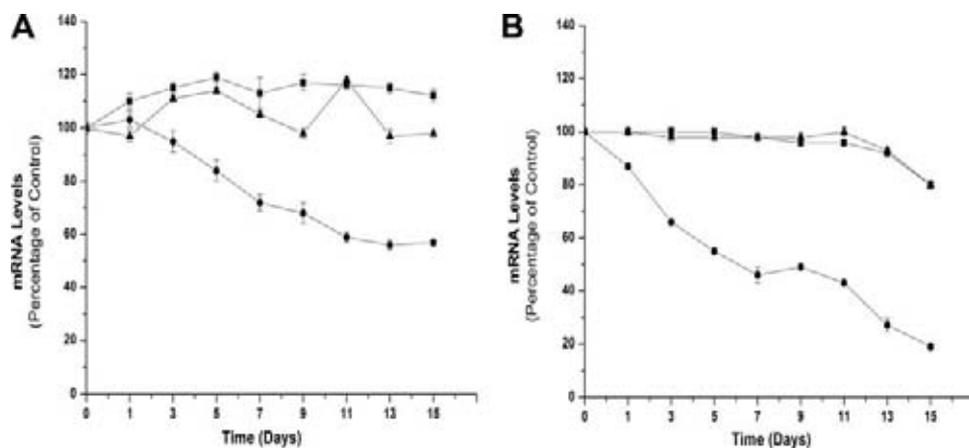


FIGURE 5. Time course of the effect of biotin deficiency on holocarboxylase synthetase, biotinidase, and β -actin mRNA levels in normal and MCD-BD fibroblasts. Normal (A) and MCD-BD cells (B) were grown in biotin-deficient medium for up to 13 days, and the mRNA levels for HCS (●), biotinidase (▲), and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

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

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

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

DISCUSSION

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

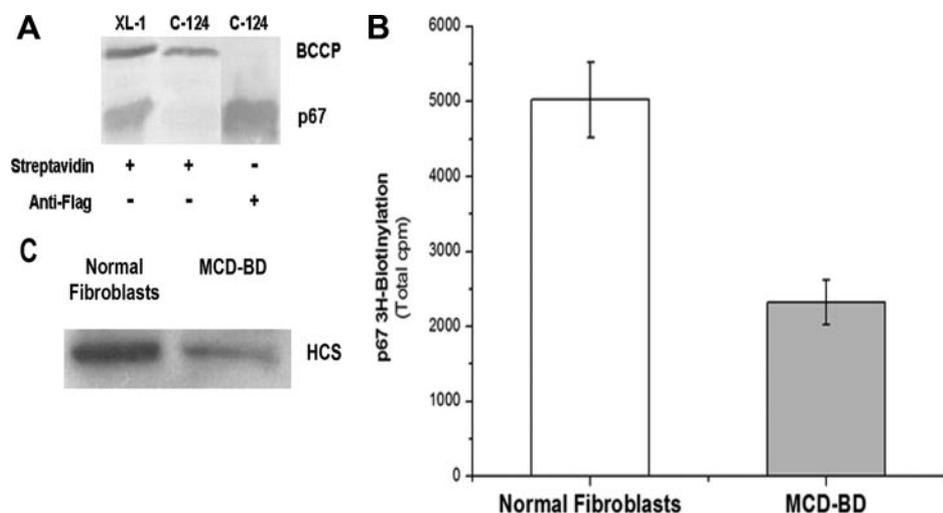


FIGURE 6. Holocarboxylase synthetase activity and protein in MCD-BD cells. HCS activity was determined in a solid phase assay in which p67 bound to PVDF membrane was used as substrate for biotinylation. *A*, preparation of p67 substrate. A PVDF membrane was prepared by transfer from a polyacrylamide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

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

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

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

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

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

Deficiency of Biotinidase Activity Disrupts HCS Expression

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

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

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

REFERENCES

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

2. PROCOLOS.

EXTRACCIÓN DE ARN POR EL MÉTODO DE TRIZOL.

Material

- Cloroformo.
- Isopropil alcohol.
- Etanol 75% en agua DEPC.
- Agua DEPC.
- Tubos eppendorf de 500µl y 1.5 ml DEPC.

1. Limpiar con alcohol el área de trabajo, las pipetas, la gradilla.
2. Traer hielo.
3. Utilizar guantes y cubrebocas.
4. Poner en la gradilla los tubos eppendorf de 1.5ml que se van a utilizar y se rotulan adecuadamente.

Homogenización.

1. Sacar las cajas del cuarto de cultivo.
2. Se retira el medio de cultivo.
3. Añadir TRizol a las cajas (3ml a T-25, 7ml a T-75) con una pipeta de 10 ml desechable, y limpiar la caja varias veces. (Los desechos que se generen deben ponerse en una bolsa aparte.)
4. Se pasa el contenido de las cajas a tubos eppendorf (1ml en cada tubo).

Fase de separación.

5. Se incuban los tubos eppendorf por 5 min. a 30°C.
6. Se añaden 200 µl de cloroformo.
7. Se agitan vigorosamente por 15 seg.
8. Incubar a 30°C por 3 min.
9. Centrifugar a 12000 rpm, por 15 min. a 4°C. Preparar nuevos tubos eppendorf de 1.5 ml y rotularlos.

Precipitación de ARN.

10. Al sacar los tubos, la muestra se separo en 3 fases, se transfiere la parte acuosa transparente con mucho cuidado al nuevo tubo eppendorf.
11. Agregar 500 µl de isopropil alcohol (frío), mezclar.
12. Incubar 10 min. a 30°C.
13. Centrifugar a 12000 rpm, por 10 min. a 4°C.

Lavado del ARN.

14. Retirar con mucho cuidado el sobrenadante.
15. Agregar 1 ml de etanol 75% en agua DEPC, mezclar.
16. Centrifugar a 7400 rpm por 5 min., a 4°C.
17. Tomar una punta de 1ml, cortar la punta con unas tijeras y pasar los pellets de ARN a un solo tubo (un tubo por cada tratamiento).
18. Centrifugar a 7400 rpm por 5 min., a 4°C.

Resuspensión del ARN.

19. Retirar el sobrenadante y dejar que el pellet de ARN se seque un poco (se forma un "gelecito" blanco en el fondo, al secarse se vuelve transparente).
20. Agregar agua Gibco para resuspender el pellet de ARN (dependiendo de la cantidad de ARN, se calcula la cantidad de agua).
21. Incubar por 5 min. 60°C, dar un spin.
22. Mezclar en el vortex, muy levemente.
23. Hacer alícuotas, rotular adecuadamente y guardarlas a -70°C.

.....

ARN.

1. Concentración ARN.

1. Se prende el espectrofotómetro a 260 nm
2. Se descongela una de las alícuotas de RNA
3. Se hace una dilución del RNA 1:1000 (1µl RNA + 1000 µl de H₂O destilada)
4. Se pone la muestra en la celda, se lee, y se anota la densidad óptica
5. Se multiplica la lectura por un factor determinado (ARN = 40) y el resultado es la concentración de ARN en µg/µl

2. Integridad del RNA.

Se prepara un gel de formaldehído.

1. 0.3gr de Agarosa + 24ml de H₂O DEPC.
2. Se calienta por 30seg., se agita, se calienta por 30seg más.
3. Se deja enfriar un poco.
4. Se agrega 8ml de 5x Running Buffer, despacio y agitando.
5. Añadir 17.8ml de formaldehído, despacio y agitando.
6. Vertir en el cassette y dejar que gelifique por 30min.

3. Preparación de la muestra.

1. En tubos DEPC de 500 µl.

		Muestra
ARN	3 µg	5 µl
H ₂ O DEPC	2 µl	-----
5x running buffer	2 µl	2 µl
Formaldehído	3.5 µl	3.5 µl
Formamida	10 µl	10 µl
	20.5 µl	20.5 µl

El agua solo si es necesario,
para completar el volumen final

1. Se incuba 15 min. a 55°C.
2. Se pasa rápidamente a hielo.
3. Se centrifuga 5 seg.
4. Se agregan 2 µl de colorante, se mezcla, se baja.
5. Se carga toda la muestra en el gel, y se corre a 60 volts por 2 hrs.
6. Una vez terminado; se saca el gel y con cuidado se pone en un recipiente (50 ml de buffer de corrida y 50 µl de Radiant Red RNA Stain), en agitación lenta toda la noche.
7. Leer el gel en el FX al día siguiente.

.....

RT. Reverse Transcription

1. Se hace una mezcla en un tubo eppendorf de 500 μ l DEPC.
2. Se utilizan puntas con filtro.
3. El oligo dT y los dNTP's, se mezclan en el vortex antes de usarlos.
4. Se utilizan 5 μ g ARN

H ₂ O	? μ l
Oligo dT	1 μ l
ARN	5 μ g = X μ l
dNTP's 10 nM	1 μ l
	13 μl

La cantidad de H₂O puede variar dependiendo la cantidad de ARN que se va a poner

5. Se incuba a 65°C por 5 min.
6. Se pasa a hielo, se baja con un spin.
7. Se resuspende el buffer 5x first-strand y el 0.1M DTT.
8. Se agregan 4 μ l de buffer.
9. Se agregan 2 μ l de 0.1M DTT.
10. Se da un spin, se mezcla golpeando un poco el tubo, se da un spin.
11. Se incuba a 42°C por 2 min., se da un spin.
12. Se agrega 1 μ l de la enzima SuperScript II.
13. Se incuba 50 min. a 42°C.
14. Al terminar, se incuba 15 min. a 70°C, para terminar la reacción.
15. Se pasa a hielo y se pueden aguardar las muestras a 4°C o a -20°C.

.....

PCR. Polymerase Chain Reaction

1. Se hace la mezcla en un tubo eppendorf de 1.5 ml, sin incluir el ADNc.
2. Se calcula en número de reacciones necesarias, y se agrega 0.3
3. Se separan y rotulan los tubos para PCR.
4. Se prende el termociclador y se ponen las condiciones de las reacciones dependiendo del gen en cuestión.

	1 reacción
H ₂ O	21.6 µl
10 x PCR buffer	3 µl
MgCl ₂ 30mM	1.5 µl
dNTP's mix	0.6 µl
P. sense	1 µl
P. antisense	1 µl
Taq amplificasa	0.3 µl
ADNc	1 µl
	30µl

Condiciones
95°C – 5 min.
94°C – 1 min.
58°C – 1 min.
72°C – 1 min.
72°C – 10 min.

5. Se agregan 29 µl a cada tubito.
6. A los tubos de las muestras se les agrega el ADNc.
7. Una vez terminado el PCR, se prepara un gel de agarosa el 1%.
8. Calentar 1 min, mover, calentar otros 30seg, dejar enfriar un poco.
9. Llevar el casete al cuarto frío, vertir en el casete y esperar a que gelifique.
10. Agregar 250 ml de buffer TBE a la cámara de electroforesis (aproximadamente).
11. Colocar el gel en la cámara.

1%, 50ml buffer TBE + 0.4 gr. Agarosa, 8 pozos
1%, 110ml buffer TBE + 1.1 gr. Agarosa, 15 pozos
2%, 50ml buffer TBE + 1 gr. agarosa, 8 pozos
2%, 110ml buffer TBE + 2.1 gr. agarosa, 15 pozos

12. Agregar 5 µl de 6x loading buffer a las muestras.
13. Mezclar y bajar.
14. Cargar 12 µl de las muestras en el gel.
15. Cargar 3 µl de marcador (1Kd DNA extensión Ladder) (solo la primera vez y cuando sea una curva de ciclos).
16. Correr a 80 volts aproximadamente 1:20min (96 volts, 40 min, 100 volts, 1 hr.).
17. Leer en el FX.

CURVA DE CICLOS

1. Se limpia el área de trabajo con alcohol, se utilizan puntas con filtro y tubos nuevos (DEPC si se puede).
2. Se calcula en número de reacciones necesarias, y se agrega 0.3.
3. Se separan y rotulan los tubos para PCR.
4. Se prende el termociclador y se ponen las condiciones de las reacciones dependiendo del gen en cuestión.
5. Se hace la mezcla en un tubo eppendorf de 1.5 ml, sin incluir el ADNc.

	1 reacción	11.3 reacciones
H ₂ O	21.6 µl	244.08 µl
10 x PCR buffer	3 µl	33.9 µl
MgCl ₂ 30mM	1.5 µl	16.95 µl
dNTP's mix	0.6 µl	6.78 µl
P. sense	1 µl	11.3 µl
P. antisense	1 µl	11.3 µl
Taq amplificasa	0.3 µl	3.39 µl
ADNc	1 µl	
	30 µl	

Condiciones
 95°C – 5 min.
 94°C – 1 min.
 58°C – 1 min.
 72°C – 1 min.
 72°C – 10 min.

6. Se agregan 29 µl al tubito control.
7. Se agregar el ADNc, restando la reacción que ya se saco, y se mezcla (10.3 reacciones: 10.3 µl de ADNc).
8. Se comienza a contar los ciclos (16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, etc.) y cuando este a 3 seg. de terminar el ciclo indicado, se pone pausa en el ciclo y se saca el tubito correspondiente y se guarda a 4°C, así hasta que se termine el programa.
9. Una vez terminado todos los ciclos del PCR, se prepara un gel de agarosa el 1%.
10. Calentar 1:15 min., dejar enfriar un poco.
11. Llevar el casete al cuarto frío, vertir en el casete y esperar a que gelifique.
12. Agregar 250 ml de buffer TBE a la cámara de electroforesis (aproximadamente).
13. Colocar el gel en la cámara.
14. Agregar 6 µl de 6x loading buffer a las muestras.
15. Mezclar y bajar.
16. Cargar 15 µl de las muestras en el gel, no se usa marcador por que se sabe que es lo que se amplifica.
17. Correr a 80 volts (aproximadamente 1:20min).
18. Leer en el FX.

BIOTINILACIÓN DE CARBOXILASAS

1. Extracción de proteínas a partir de células humanas

Campana de flujo laminar en el cuarto de cultivo:

1. Retirar el medio de cultivo de los frascos T-75 (T-25).
2. Añadir 5 ml de PBS y lavar las células 1 vez.
3. Añadir 2 ml de Tripsina, e incubar los frascos a 37°C por 5 min.
4. Añadir 8 ml de PBS y pasar las células a un tubo falcon de 15 ml.
5. Centrifugar las células a 3000 rpm por 10 min. a 4°C, al terminar retirar y desechar el sobrenadante.
6. Lavar nuevamente con 10 ml de PBS, resuspendiendo el pellet, y centrifugar a 3000 rpm, por 10 min. a 4°C.
7. Al terminar, se tira el sobrenadante.

2. Lisis de Células

Laboratorio:

8. Resuspender el pellet de células en 200 µl de buffer de RIPA + 20 µl de inhibidores de proteasas + 20 µl de PMSF, y pasarlo a tubos eppendorf nuevos.
9. Mezclar en el vortex.
10. Incubar en hielo por 20 min.
11. Centrifugar a 14000 rpm por 15 min a 4°C.
12. Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.

3. Determinación de proteínas

Curva de BSA					Incubar 10 min.	Leer en el espectrofotómetro a 595 nm
Tubo	H ₂ O	BSA		Reactivo de Bradford		
0	800 µl	0	0 µg	200 µl		
1	800 µl	1µl	1 µg	200 µl		
2	800 µl	2µl	2 µg	200 µl		
4	800 µl	4µl	4 µg	200 µl		
6	800 µl	6µl	6 µg	200 µl		
8	800 µl	8µl	8 µg	200 µl		
10	800 µl	10µl	10 µg	200 µl		
12	800 µl	12µl	12 µg	200 µl		
problema 1 (concentrado)	800 µl	1µl	?	200 µl		
problema 2 (concentrado)	800 µl	2µl	?	200 µl		

Anotar las densidades opticas (DO) y hacer una grafica en Excel. Al tener la ecuación de la gráfica, despejar Y, sustituir el valor de Y por el valor de la DO de las muestras problema y eso da la concentración de proteína de la muestra. Hacer los cálculos para la cantidad de proteína que se va a cargar

4. Preparación del gel de acrilamida

2 geles, 1.0mm, 8%, peines 10 pozos			
Resolving gel		Stacking gel	
Agua	4.8 ml	Agua	3 ml
Acrilamida	2.7 ml	Acrilamida	1 ml
buffer pH 8.8	2.5 ml	buffer pH 6.8	1.25 ml
TEMED	5 µl	TEMED	10 µl
APS 10%	50 µl	APS 10%	100 µl

2 geles, 1.5mm, 8%, peines 10 pozos			
Resolving gel		Stacking gel	
Agua	9.6 ml	Agua	3 ml
Acrilamida	5.4 ml	Acrilamida	1 ml
buffer pH 8.8	5 ml	buffer pH 6.8	1.25 ml
TEMED	10 µl	TEMED	10 µl
APS 10%	100 µl	APS 10%	100 µl

1. Una vez determinados los µg/µl necesarios, se preparan las muestras en tubos eppendorf de 500µl.

-
2. Añadir un volumen de buffer de carga desnaturizante 2x, equivalente.
 3. Hervir la muestra a 90°C por 5 min., pasar las muestras a hielo.
 4. Centrifugar a 7000 rpm por 1 min a 4°C.
 5. Cargar las muestras en el gel, y poner 6 µl del marcador de peso molecular, y correr a 130 volts por 1:10min.

5. Transferencia

1. Una vez terminada la electroforesis, se pasan los geles al buffer de transferencia por 10 min. (80 ml Buffer de Transferencia sin metanol + 20 ml de Metanol).
2. Se humedecen los papeles filtro grueso y delgado en buffer de transferencia con metanol.
3. Se activa la membrana de PVDF con metanol absoluto por 1 min.
4. Armar la cámara de transferencia; papel grueso, papel delgado, membrana, gel, papel delgado, papel grueso.
5. Poner a 300 mAmp por 25 min. (**No debe de exceder de 24 volts**), y 25 min. (más el faltante) a 23 volts.

6. Inmunodetección con streptavidina-AP

1. Incubar las membranas con blotto (20 ml) + leche descremada al 5% (1gr) por 1 hr. a temperatura ambiente. (si se dejó la membrana secando, se rehidrata con 50 ml de metanol 20% (10 ml metanol + 40 ml de H₂O).
2. Lavar 3 veces por 10 min. con 10ml de Buffer de lavado (NaCl, Tris, Tween).
3. Incubar con streptavidina-AP (5µl) en buffer de Tritón (10ml) 1:2000 por 1 h. 37°C en movimiento.
4. Lavar 3 veces por 10 min. con buffer de lavado.
5. Revelar con NBT y BCIP (1 ml NBT + 1 ml BCIP + 8 ml de H₂O), poner la mezcla en un tubo falcon usado, forrado con papel aluminio.
6. Detener la reacción añadiendo grandes cantidades de agua.

DETECCIÓN DE HCS

1 Extracción de proteínas a partir de células humanas

Campana de flujo laminar en el cuarto de cultivo:

1. Retirar el medio de cultivo de los frascos T-75 (T-25).
2. Añadir 5 ml de PBS y lavar las células 1 vez.
3. Añadir 2 ml de Tripsina, e incubar los frascos a 37°C por 5 min.
4. Añadir 8 ml de PBS y pasar las células a un tubo falcon de 15 ml.
5. Centrifugar las células a 3000 rpm por 10 min. a 4°C, al terminar retirar y desechar el sobrenadante.
6. Lavar nuevamente con 10 ml de PBS, resuspendiendo el pellet, y centrifugar a 3000 rpm, por 10 min. a 4°C.
7. Al terminar, se tira el sobrenadante.

2 Lisis de Células

Laboratorio:

1. Resuspender el pellet de células en 200 µl de buffer de RIPA + 20 µl de inhibidores de proteasas + 20 µl de PMSF, y pasarlo a tubos eppendorf nuevos.
2. Mezclar en el vortex.
3. Incubar en hielo por 20 min.
4. Centrifugar a 14000 rpm por 15 min a 4°C.
5. Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.

3 Determinación de proteínas

Curva de BSA					Incubar 10 min.	Leer en el espectrofotómetro a 595 nm
Tubo	H ₂ O	BSA		Reactivo de Bradford		
0	800 µl	0	0 µg	200 µl		
1	800 µl	1µl	1 µg	200 µl		
2	800 µl	2µl	2 µg	200 µl		
4	800 µl	4µl	4 µg	200 µl		
6	800 µl	6µl	6 µg	200 µl		
8	800 µl	8µl	8 µg	200 µl		
10	800 µl	10µl	10 µg	200 µl		
12	800 µl	12µl	12 µg	200 µl		
problema 1 (concentrado)	800 µl	1µl	?	200 µl		
problema 2 (concentrado)	800 µl	2µl	?	200 µl		

Anotar las densidades opticas (DO) y hacer la grafica en Excel. Al tener la ecuación de la gráfica, despejar Y, sustituir el valor de Y por el valor de la DO de las muestras problema y eso da la concentración de proteína de la muestra. Hacer los cálculos para la cantidad de proteína que se va a cargar

4 Preparación del gel de acrilamida

2 geles, 1.0mm, 8%, peines 10 pozos			
Resolving gel		Stacking gel	
Agua	4.8 ml	Agua	3 ml
Acrilamida	2.7 ml	Acrilamida	1 ml
buffer pH 8.8	2.5 ml	buffer pH 6.8	1.25 ml
TEMED	5 µl	TEMED	10 µl
APS 10%	50 µl	APS 10%	100 µl

2 geles, 1.5mm, 8%, peines 10 pozos			
Resolving gel		Stacking gel	
Agua	9.6 ml	Agua	3 ml
Acrilamida	5.4 ml	Acrilamida	1 ml
buffer pH 8.8	5 ml	buffer pH 6.8	1.25 ml
TEMED	10 µl	TEMED	10 µl
APS 10%	100 µl	APS 10%	100 µl

1. Una vez determinados los µg/µl necesarios, se preparan las muestras en tubos eppendorf de 500 µl.

-
2. Añadir un volumen de buffer de carga desnaturizante 2x, equivalente.
 3. Hervir la muestra a 90°C por 5 min., pasar las muestras a hielo.
 4. Centrifugar a 14000 rpm por 1 min a 4°C.
 5. Cargar las muestras en el gel, y poner 10 µl del marcador de peso molecular, y correr a 130 volts por 1:10min.

5 Transferencia

1. Una vez terminada la electroforesis, se pasan los geles al buffer de transferencia por 10 min. (80 ml Buffer de Transferencia sin metanol + 20 ml de Metanol).
2. Se humedecen los papeles filtro grueso y delgado en buffer de transferencia con metanol.
3. Se activa la membrana de PVDF con metanol absoluto por 1 min.
4. Armar la cámara de transferencia; papel grueso, papel delgado, membrana, gel, papel delgado, papel grueso.
5. Poner a 300 mAmp por 25 min. (**No debe de exceder de 24 volts**), y 25 min. (más el faltante) a 23 volts.

6 Inmunodetección con HCS

1. Incubar las membranas con el anticuerpo de HCS (1:3000) diluido en solución de bloqueo 0.5%, por 2 hr en movimiento a temperatura ambiente.
2. Lavar 2 veces por 20 min. con PBS/Tween 0.1%.
3. Lavar 2 veces por 20 min. con solución de bloqueo 0.5%.
4. Diluir 0.3-0.4ul de anticuerpo secundario (Roche) en solución de bloqueo e incubar la membrana 1hr en movimiento a temperatura ambiente.
5. Lavar 4 veces por 20 min. con PBS/Tween 0.1%.
6. Preparar la solución de revelado: Sol. A + Sol B (100:1) (1ml).
7. Preparar el cassette, las placas, la solución Reveladora, la solución Fijadora, sanitas, timer, pipeta, tijeras, y llevarlos al cuarto oscuro para revelar.

6 Inmunodetección con HCS-AP

1. Lavar 2 veces por 10 min. con PBS/Tween 0.1%.
2. Diluir el anticuerpo de HCS (1:3000) diluido en leche al 3%, por 1 hr en movimiento a temperatura ambiente.
3. Lavar 2 veces por 10 min. con PBS/Tween 0.1%.
4. Diluir el anticuerpo secundario (prot. A) en solución leche al 3%, incubar la membrana 1hr en movimiento a temperatura ambiente.
5. Lavar 2 veces por 10 min. con PBS/Tween 0.1%.
6. Preparar la solución reveladora: 1 ml PBS/Tween 0.1 + 5µl agua oxigenada + una pizcacha de 3,3 diaminobenzidina, poner la mezcla en un tubo falcon usado, forrado con papel aluminio.
7. Detener la reacción con agua destilada.

CLONACIÓN.

1. PCR.

Se hace un PCR de lo que se quiere clonar.

	1 reacción	1 reacción
H ₂ O	23µl	52µl
PCR Mix	20µl	40µl
P. sense	2.5µl	3µl
P. antisense	2.5µl	3µl
ADNc	2µl	2µl
	50µl	100µl

	1 reacción
H ₂ O	36µl
10x PCR buffer	5µl
MgCl ₂	1.5µl
dntp's	2µl
P. sense	1.5µl
P. antisense	1.5µl
Ampli Taq	0.5µl
ADNc	2µl
	50µl

2. Precipitación de ADN.

1. Del volumen en que se tenga el ADN, se debe ajustar a 100µl con H₂O destilada.

45µl PCR	95µl PCR
<u>55µl H₂O</u>	<u>5µl H₂O</u>
100µl	100µl

2. Pasar a un tubo eppendorf de 1.5ml.
3. Agregar 50µl de amonio 10M (NH₄AC).
4. Agregar 2 µl de glicógeno.
5. Mezclar en vortex.
6. Agregar 150µl de isopropanol.
7. Mezclar con el dedo.
8. Centrifugar 12 min. a 4°C, máx. vel.
9. Quitar el isopropanol por decantación.
10. Agregar 600µl de etanol 80%.
11. Mezclar en vortex.
12. Centrifugar 1 min. a 4°, máx. vel.
13. Retirar el exceso con la pipeta.
14. Resuspender el ADN en H₂Og.

3. Digestión.

1. Se digiere parte del ADN, y el resto se guarda a -20°C.

BSA 10x	2µl
Buffer 2 10x	2µl
Enzima 1	0.2µl
Enzima 2	0.2µl
ADN	5µl
H ₂ O	10.6µl

2. Se mezcla todo en un eppendorf 500µl.
3. Se baja la mezcla.
4. Se incuba a 37°C, toda la noche.
5. Se prepara un gel de agarosa low melting point al 1%.
6. Se agregan 6µl de lower buffer, se cargan 26µl de la muestra en el gel y 4µl de marcador de peso molecular.
7. Se correa a 90 volts, 1 hr.
8. Se va al cuarto oscuro y se corta la banda que se quiere y ponerlo en un tubo eppendorf de 1.5ml.

.....

4. Extracción de ADN con fenol.

1. Preparar 3 series de tubos eppendorf 1.5ml rotulados.
2. Agregar 1ml de fenol a una serie de tubos y ponerlo a calentar a 37 °C.
3. Poner a 60°C los tubos con el gel, hasta que se disuelva.
4. Una vez disuelto, agregar agua destilada hasta 500µl.
5. Agregar 50µl de SH.
6. Agregar 25µl de NaCl 5M.
7. Mezclar en vortex.
8. Poner los tubos a 37 °C por 5min.
9. Agregar 500µl del fenol precalentado a cada tubo.
10. Mezclar en vortex por aproximadamente 30 seg. (se pone blanco).
11. Centrifugar 5min a máx.vel.

12. Pasar el sobrenadante a los tubos con los 500µl restantes del fenol.
13. Mezclar en vortex aprox. 30 seg.
14. Centrifugar 1 min. a máx.vel.
15. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
16. Agregar 500µl de cloroformo.
17. Mezclar en vortex.
18. Centrifugar 1 min. a máx. vel.

19. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
20. Agregar 2µl de glicógeno, mezclar bien en vortex.
21. Agregar 500µl de isopropanol y mezclar en vortex.
22. Centrifugar 12 min. a 4 °C, máx. vel.

23. Retirar el sobrenadante por decantación.
24. Agregar 600µl de etanol 80% frío.
25. Mezclar en vortex.
26. Centrifugar 6 min. a 4 °C, máx. vel.
27. Retirar el sobrenadante.
28. Centrifugar 1 min. a 4 °C máx. vel.
29. Quitar el exceso con una pipeta.
30. Resuspender el ADN en H₂Og.

31. Prepara un gel de agarosa al 1%.
32. Hacer una mezcla:
2µl lower buffer
9µl H₂O
1µl muestra y/o vector.
33. Cargar la mezcla en el gel.
34. Correr a 90volts por 1 hr.
35. Leer y cuantificar en el FX.

5. Ligación.

1. Dependiendo de la cuantificación del vector y del inserto, se debe de hacer una relación de 1:4, 1 de vector y 4 de inserto.

Inserto	7µl
Vector	1µl
5x ligase buffer	4µl
H ₂ Og	7µl

2. Agregar 1µl de enzima ligasa.
3. Agregar 0.3µl de ATP 200mM.
4. Incubar 30 min. a temp. ambiente.

-
5. Dejar a 17°C toda la noche.

6. Transformación por choque térmico.

1. Sacar un tubo de XL-1 del rebco.
2. Agregarle 120µl de células a cada ligación.
3. Mezclar bien con la pipeta, sin hacer burbujas.
4. Pasar a un tubo eppendorf nuevo de 1.5ml.
5. Incubar en hielo 30 min.
6. En ambiente estéril, en un tubo falcon de 15 ml preparar la mezcla:

1ml de SOA	1ml de SOA por cada ligación.
10µl de MgCl ₂	10µl de MgCl ₂ por cada ml de SOA.
10µl de glucosa	10µl de glucosa por cada ml de SOA.
7. Sacar las cajas petri con LB/amp que se van a utilizar y dejarlas a temp. ambiente.
8. Mezclar en vortex y dejar a temp. ambiente.
9. Incubar los tubos 40 sec. a 42°C.
10. Pasar a hielo 1min.
11. Agregarle 1ml de la mezcla a cada tubo.
12. Agitar suavemente.
13. Incubar 1:30 min. a 37°C 900rpm.
14. Centrifugar 1 min. a máx. vel.
15. Decantar el sobrenadante.
16. Resuspender las bacterias.
17. En ambiente estéril, plaquear las bacterias y dejar incubar a 37°C.

7. Transformación por electroporación.

1. Se lavan las celdas con agua caliente y se dejan ahí, por 10 min.
2. Sacar las cajas petri con LB/amp que se van a necesitar y se dejan a temp. ambiente.
3. Lavar las celdas con etanol.
4. Poner las celdas en luz UV por 15 min.
5. Se arma el electroporador.
6. Pasar las celdas al refrigerador por 5 min.
7. Preparar una mezcla de LB s/antibiótico con 1% de glucosa.
8. Sacar un tubo de células XL-1 Blue para electroporación.
9. Tomar 10µl de la ligación y agregársela a las células (el resto de la ligación se guarda).
10. Se mezcla con la pipeta y se pone en el hielo.
11. Se pone toda la mezcla y las células en el interior de la celda.
12. Se limpia la celda, evitando que tenga agua y se pone en el electroporador y se da el choque, después se pasa a hielo.
13. Se pone 1ml del LB/glucosa en la celda, se resuspenden las células y se regresa al tubo de las células.
14. Incubar a 37°C por 1hr, a 900rpm.
15. Centrifugar 1 min. a máx. vel.
16. Decantar el sobrenadante.
17. Resuspender las bacterias.
18. En ambiente estéril, plaquear las bacterias y dejar incubar a 37°C.

8. Minipreps.

De las colonias que crecieron se hacen precultivos.

Precultivo

1. Esterilizar tubos (25 min. + 10 min. secado) y las tapas en el transluminador por 15 min.
 2. Etiquetar los tubos adecuadamente y ponerlos en una gradilla.
 3. Con el mechero prendido, agregar 3 ml de medio LB con ampicilina 100µg/ml a cada tubo.
 4. Picar las colonias con una punta amarilla y ponerla en el tubo.
 5. Flamear la tapa y tapar el tubo.
 6. Dejar creciendo toda la noche a 37°C a 250 rpm.
-

.....

Plasmid Minipreps

1. Llenar los tubos eppendorf con aproximadamente 1.5 ml del precultivo.
2. Centrifugar 1.5 min. a 7000 rpm.
3. Retirar el sobrenadante.
4. Resuspender el pellet en 100µl de ETRL con lisozima y RNAsa
5. Se agregan 10 µl de lisozima por cada ml de ETRL y 5 µl de RNAsa por cada ml de ETRL. (la mezcla se prepara en un ambiente estéril).
6. Se agregar 250 µl de agua destilada estéril.
7. Mezclar y dejar incubando 10 min. a temperatura ambiente.
8. Agregar 300 µl de LiOH 0.2 M/ 2% SDS.
9. Agregar 100 µl de cloroformo.
10. Mezclar fuertemente (se deben de observar 2 fases, la de arriba debe de ser clara).
11. Se agregan 300 µl de 3M Kac/2M Hac.
12. Mezclar hasta que cambie a color amarillo.
13. Incubar 15 min. en hielo.
14. Centrifugar 5 min. a 16.1 rpm.
15. Retirar el sobrenadante y pasarlo a un nuevo tubo.
16. Incubar 5 min. a 37°C.
17. Agregar 500 µl de terbutanol:EtOH y agitar (puede ser isopropanol).
18. Incubar 5 min. a temperatura ambiente.
19. Centrifugar 10 min. a 4°C a 13.2 rpm (máx. velocidad).
20. Retirar el sobrenadante por decantación con mucho cuidado, y quitar el exceso con una pipeta.
21. Lavar el pellet con 1ml de etanol 70%.
22. Mezclar en vortex (se debe de desprender el pellet).
23. Centrifugar 5 min. a 4°C, máxima velocidad.
24. Retirar el sobrenadante con cuidado y dejar secando el pellet 5 min.
25. Resuspender el pellet en 20µl de H₂Og.

9. Digestión.

La digestión se realiza en un volumen total de 10µl:

BSA 10x	1µl
Buffer 2 10x	1µl
Enzima 1	0.1µl
Enzima 2	0.1µl
ADN	2µl
H ₂ O	5.8µl
	<hr/>
	10µl

1. Se hace una mezcla de para el número determinado de muestras.
 2. Se agrega la cantidad necesaria de ADN que se va a cortar.
 3. Se agregar el restante de la mezcla.
 4. Se mezcla en el vortex.
 5. Se baja la mezcla.
 6. Se incuba a 37° C, por aprox. 2 hrs.
 7. Se prepara un gel de agarosa al 1% $\left\{ \begin{array}{l} 110 \text{ ml TBE} + 1.1 \text{ gr. agarosa, } 15 \text{ pozos} \\ 120 \text{ ml TBE} + 1.2 \text{ gr. agarosa, } 30 \text{ pozos} \end{array} \right.$ Dependiendo de la banda que se quiera ver, se le pone el buffer Higher o lower.
 8. Se agregan 5 µl de lower buffer
 9. Se cargan 10µl de la muestra en el gel y 4 µl de marcador de peso molecular
 10. Se correa a 90 volts, 1 hr.
 11. Se lee en el FX.
 12. Las clonas que son del peso adecuado, se vuelven a poner un precultivo.
-

PREPARACIÓN DE UN VECTOR.

1. Precultivo.

1. Se preparan 2 matraces con 300ml de LB con ampicilina 200mM.
2. Se pone a cada matraz 100ml del glicerol con el vector.
3. Se deja creciendo toda la noche a 37°C, 250rpm.

2. Maxipreps.

1. Pasar los cultivos a frascos y centrifugar 20 min. a 4000rpm 4°C.
2. Resuspender el pellet en 6ml de ETC y pasarlos a los botes de policarbonato; coleccionar el resto con 3ml de H₂O destilada.
3. Añadir 1ml de lisozima 25mg, incubar 10min a temp ambiente.
4. Añadir 10ml de 0.2M LiOH y 3ml de cloroformo.
5. Incubar 6 min. en hielo.
6. Añadir 5ml de 3M KAc, 2M HAc y mezclar.
7. Incubar 5 min. en hielo.
8. Pedir el roto JA-20 y calibrar los botes con H₂O destilada.
9. Centrifugar 5 min. a 10000rpm, 4°C.
10. Transferir el sobrenadante al tubo y agregar 13 ml de terbutanol:etanol (98:2).
11. Mezclar e incubar 5 min. en hielo.
12. Centrifugar 30 min. a 15000rpm a 4°C.
13. Quitar el sobrenadante.
14. Pesar 2grs de cloruro de cesio en un falcon de 15ml nuevo.
15. Disolver con el ADN.
16. Agregar 200µl de bromuro de etidio.
17. Centrifugar 5 min. a 4000rpm a temp ambiente.
18. Pasar el sobrenadante a los tubos para la centrifuga.
19. Llenar el tubo con cloruro de cesio SIN BURBUJAS.
20. Sellar los tubos.
21. Pesar los tubos, hacer parejas y hacer los contrapesos necesarios.
22. Apretar los tubos (120).
23. Prender la centrifuga, poner el vacío a 20 (15min).
24. Poner el programa 9 (80000rpm, 20°C, 3:30hrs)
25. Colocar los tubos y presionar START cuando ya este el vacío.
26. Sacar los tubos con mucho cuidado.
27. Montar el tripie con las pinzas, poner el tubo, con la luz UV localizar la banda de ADN; con un agujero hacer un orificio arriba del tubo (escape) con otra agujero picar el tubo por debajo de la banda y extraerla con cuidado, y pasarlo a un eppendorf 1.5ml nuevo.
28. Agregarle 1ml de butanol, mezclarlo bien, centrifugar 5min.
29. Quitar la fase acuosa a guardar a 4°C el tubito.
30. Poner 2.4ml de agua en los tubos de policarbonato, pasar el ADN.
31. Agregar 600µl de 3M NaAc pH 5.2.
32. Agregar 18ml de etanol 100%.
33. Mezclar y equilibrar con etanol.
34. Centrifugar 15 min. a 15000rpm 4°C.
35. Quitar el sobrenadante con cuidado.
36. Secar el pellet.
37. Agregar 400µl de TE y resuspender el pellet.
38. Pasarlo a un tubo eppendorf 1.5ml.
39. Agregar 40µl de 3M NaAc pH 5.2.
40. Agregar 880µl etanol 100% metanol frío.
41. Mezclar bien.
42. Centrifugar 10min máx. vel 4°C.
43. Retirar el sobrenadante.
44. Agregar 600µl de etanol 80%.

-
45. Mezclar bien y centrifugar 10min, máx. vel 4 °C.
 46. Quitar el sobrenadante.
 47. Centrifugar 3min máx. vel 4 °C.
 48. Quitar el exceso.
 49. Secar el pellet.
 50. Resuspender en 500 µl de TE.

3. Desalar el ADN.

1. Sacar las columnas Nap 5.
2. Se ponen en un soporte y se destapan.
3. Poner 10ml de buffer para equilibrar.
4. Poner los 500µl de la muestra.
5. Agregar 1ml de buffer y recuperarlo en un tubo eppendorf.

4. Cuantificación del ADN.

1. Se hace una dilución 1:1000 de la muestra.
2. Se hace la lectura a 260nm y se multiplica por el factor 50.
3. Se hacen los cálculos para digerir 20µg del vector (si esta muy diluido se precipita el vector).

5. Precipitación del ADN.

1. Del volumen en que se tenga el ADN, se debe ajustar a 200 µl con H₂Og.
2. Pasar a un tubo eppendorf de 1.5ml.
3. Agregar 20µl de acetato de sodio 3M (NH₄Na).
4. Agregar 2 µl de glicógeno 10ml/ml.
5. Mezclar en vortex.
6. Agregar 2 volúmenes de etanol 100% frío. (el volumen de etanol, corresponde al volumen total de la mezcla).
7. Mezclar con el dedo.
8. Centrifugar 12 min. a 4 °C, máx. vel.
9. Quitar el sobrenadante por decantación.
10. Agregar 600µl de etanol frío 80%.
11. Mezclar en vortex.
12. Centrifugar 8 min. a 4 °, máx. vel.
13. Quitar el sobrenadante.
14. Centrifugar 1min 4°C máx. vel.
15. Retirar el exceso con la pipeta.
16. Resuspender el ADN en H₂Og.

6. Digestión.

BSA 10x	2µl
Buffer 2 10x	2µl
Enzima 1	1µl
Enzima 2	1µl
DNA	20µl
H ₂ O	4µl

1. Se mezcla todo en un eppendorf 500µl, se baja la mezcla.
2. Se incuba a 37° C, toda la noche.

7. CIP.

1. En el tubo de reacción se hace la mezcla:

Buffer 3	4µl
ADN digerido	30µl
H ₂ O	5µl
Enzima CIP	1µl
	<hr/>
	40µl

-
2. Se mezcla bien.
 3. Se incuba la mezcla a 37°C por 1hr.

8. Gel Agarosa.

1. Se prepara un gel de agarosa 0.5% en el cassette grande para la cámara azul y poner un peine para un solo carril (180ml + 0.8gr agarosa)

ADN digerido	30µl
H ₂ O	26.7µl
6x PCR buffer	13.3µl
	80µl

2. Cargar los 80 µl a lo largo del carril.
3. Correr toda la noche a 40 volts.
4. Se saca el gel de la cámara y se pone en el transiluminador.
5. Cortar el carril y la franja donde esta la banda del vector (ADN), tratando de que permanezca en una sola tira.
6. Preparar un gel de agarosa LMP 1% en un cassette grande (100ml TBE + 1.1gr agarosa LMP), calentarlo para disolverlo, y dejar enfriar un poco antes de vertirlo en el cassette que tiene el la tira del ADN.
7. Correr el gel por 2hrs a 70 volts.

9. Extracción de ADN con fenol.

1. Preparar 3 series de tubos eppendorf 1.5ml rotulados.
2. Agregar 1ml de fenol a una serie de tubos y ponerlo a calentar a 37°C.
3. Poner a 60°C los tubos con el gel, hasta que se disuelva.
4. Una vez disuelto, agregar agua destilada hasta 500 µl.
5. Agregar 50µl de SH.
6. Agregar 25µl de NaCl 5M.
7. Mezclar en vortex.
8. Poner los tubos a 37°C por 5min.
9. Agregar 500µl del fenol precalentado a cada tubo.
10. Mezclar en vortex por aproximadamente 30 seg. (se pone blanco).
11. Centrifugar 5min a máx. vel.

12. Pasar el sobrenadante a los tubos con los 500µl restantes del fenol.
13. Mezclar en vortex aprox. 30 seg.
14. Centrifugar 1 min. a máx. vel
15. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
16. Agregar 500µl de cloroformo.
17. Mezclar en vortex.
18. Centrifugar 1 min. a máx. vel.

19. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
20. Agregar 2µl de glicógeno, mezclar bien en vortex.
21. Agregar 500µl de isopropanol y mezclar en vortex.
22. Centrifugar 12 min. a 4°C, máx. vel.

23. Retirar el sobrenadante por decantación.
24. Agregar 600µl de etanol 80% frío.
25. Mezclar en vortex.
26. Centrifugar 6 min. a 4°C, máx. vel.
27. Retirar el sobrenadante.
28. Centrifugar 1 min. a 4°C máx. vel.
29. Quitar el exceso con una pipeta.

-
- 30.** Resuspender el ADN en H₂Og.
 - 31.** Prepara un gel de agarosa al 1%.
 - 32.** Hacer una mezcla:
 - 2μl lower buffer
 - 9μl H₂O
 - 1μl muestra y vector.
 - 33.** Cargar la mezcla en el gel.
 - 34.** Correr a 90volts por 1 hr.
 - 35.** Leer y cuantificar en el FX.

.....

CUARTO DE CULTIVO.

Cambio de medio.

Prender el baño maría y calentar los medios de cultivo (Medio deficiente de biotina, Medio normal), PBS.

1. Limpiar la campana con rocal, agua y alcohol.
2. Prender 15 min. la luz UV.
3. Dejar abierta la campana 15 min.

4. Limpiar con alcohol los frascos de los medios, PBS y meterlos en la campana.
5. Sacar de la incubadora los frascos con las células.
6. Prender el mechero y flamear las bocas de los frascos de las células, medio y PBS.
7. Retirar el medio a los frascos con la bomba de vacío.

8. Agregar 5 ml de PBS a cada frasco para lavarlas células.
9. Mover ligeramente el frasco para lavar las células.
10. Retirar el PBS con la bomba de vacío.
11. Agregar otros 5 ml de PBS a cada frasco, mover ligeramente el frasco para lavar las células, y retirar el PBS con la bomba de vacío.
12. Agregar medio de cultivo a los frascos (10 ml a los T-75, 5 ml a los T-25), cuidando de utilizar una pipeta nueva cada vez que se tome medio de cultivo.

13. Flamear la boca de los frascos antes de cerrarlos.
14. Flamear la boca de los frascos de medio de cultivo y de PBS antes de cerrarlos, ponerles parafilm y guardarlos en el refrigerador.
15. Guardar los frascos en la incubadora a 37°C, con CO₂ al 5%.
16. Cerrar los pipeteros, retirar el material usado.
17. Limpiar la campana con rocal, agua y alcohol.

División de células.

Prender el baño maría y calentar los medios de cultivo (Medio deficiente de biotina, Medio normal), PBS, Tripsina.

1. Limpiar la campana con rocal, agua y alcohol.
2. Prender 15 min. la luz UV.
3. Dejar abierta la campana 15 min.

4. Limpiar con alcohol los frascos de los medios, PBS y tripsina y meterlos en la campana.
5. Sacar de la incubadora los frascos con las células.
6. Prender el mechero y flamear las bocas de los frascos de las células, PBS, medios y tripsina.
7. Retirar el medio a los frascos con la bomba de vacío

8. Agregar 5 ml de PBS a cada frasco para lavar las células.
9. Mover ligeramente el frasco para lavar las células.
10. Retirar el PBS con la bomba de vacío.
11. Agregar otros 5 ml de PBS a cada frasco, mover ligeramente el frasco para lavar las células, y retirar el PBS con la bomba de vacío.

12. Agregar 2 ml de tripsina a cada frasco, cerrarlo e incubar por 5 min a 37°C en la incubadora.
13. Agregar el volumen necesario de medio de cultivo para detener la reacción (8 ml para T-75 o 3 ml para T-25).
14. Limpiar cada frasco con la pipeta y el medio para recuperar la mayor cantidad de células y pasarlo todo al tubo falcon.

-
15. Agregar las células a cada frasco (1:2, 5ml células + 5ml de medio en T-75, 2.5ml células + 2.5ml medio en T-25; 1:4, 2.5ml células + 7.5ml medio en T-75, 1ml células + 4ml medio en T-25) y el medio.
 16. Flamear la boca de los frascos antes de cerrarlos.
 17. Flamear la boca de los frascos de medio de cultivo y de PBS antes de cerrarlos, ponerles parafilm y guardarlos en el refrigerador.
 18. Guardar los frascos en la incubadora a 37°C, con CO₂ al 5%.
 19. Cerrar los pipeteros, retirar el material usado.
 20. Limpiar la campana con rocal, agua y alcohol.

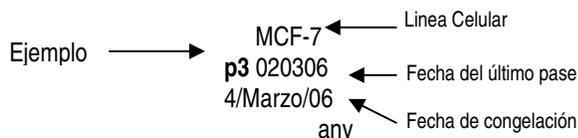
Congelado de células.

Prender el baño maría y calentar PBS/EDTA, FBS/DMSO, tripsina; el medio α-MEM/ FBS 10% se utiliza frío.

- | | |
|---------|------------|
| 45% FBS | 47.5ml FBS |
| 5% DMSO | 2.5ml DMSO |
| 50% | 50ml |
1. Limpiar la campana con rocal, agua y alcohol.
 2. Prender 15 min. la luz UV.
 3. Dejar abierta la campana 15 min.
 4. Limpiar con alcohol los frascos de medio, PBS/EDTA, tripsina y ponerlos en la campana.
 5. Sacar de la incubadora los frascos con las células.
 6. Prender el mechero y flamear las bocas de los frascos de las células, PBS, medio, tripsina, FBS/DMSO.
 7. Retirar el medio a los frascos con la bomba de vacío.
 8. Agregar 5 ml de PBS a cada frasco para lavar las células.
 9. Mover ligeramente el frasco para lavar las células.
 10. Retirar el PBS con la bomba de vacío.
 11. Agregar 2 ml de tripsina a cada frasco, cerrarlo e incubar por 5 min. a 37°C en la incubadora.
 12. Sacar un tubo falcon de 15 ml estéril.
 13. Agregar el volumen necesario de medio de cultivo para detener la reacción (8 ml para T-75 o 3 ml para T-25).
 14. Limpiar cada frasco con la pipeta y el medio para recuperar la mayor cantidad de células y pasarlo todo al tubo falcon y ponerlo en hielo.
 15. Centrifugar 10 min., a 3000rpm a 4°C.
 16. Flamear la boca de los tubos falcon, retirar el sobrenadante; con una pipeta de 1ml resuspender el pellet, pasar todas las células a un solo tubo y agregar 10ml de medio frío.
 17. Centrifugar 10 min., a 3000rpm a 4°C. Sacar los criotubos y rotularlos adecuadamente.
 18. Flamear la boca de los tubos falcon, y retirar el sobrenadante, con la pipeta quitar el exceso de medio, y deshacer el pellet.
 19. Se agregan los ml de FBS/DMSO necesarios, al tubo Falcon.

10mm----5viales
 75mm----- x
 x = 4 viales = 4ml FBS/DMSO

20. Mezclar bien.
21. Poner 1ml de la mezcla a cada criotubo rotulado.



22. Guardar a -70°C toda la noche.
23. Pasar a nitrógeno líquido, anotando el lugar donde se coloca.

3. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

BUFFERS.

Buffer de transferencia (semi-seca) (Stock, sin metanol).

- Tris 60 mM
- Glicina 48.75 mM
- SDS 1.6 mM
- Metanol 20%

Pesar en un vaso de precipitado:

Tris	7.27gr
Glicina	3.66gr
SDS	0.46gr
aforar	800ml

Para utilizarlo se ponen 80 ml de buffer stock, sin metanol + 20 ml de metanol absoluto.

Buffer de transferencia (húmeda).

Mezclar en un vaso de precipitado:

Glicina	2.9gr
Tris Base	5.8gr
SDS	0.37gr
Metanol	200ml
aforar	1 litro

Buffer de corrida (SDS-Running buffer).

Mezclar en un vaso de precipitado:

Tris Base	7.585gr	15.17gr	75gr
Glicina	36gr	72gr	360gr
SDS	2.5gr	5gr	25gr
aforar	500ml	500ml	2.5 litros
	5x	10x	10x

TBE.

Pesar en un vaso de precipitado:

Tris Base	108gr	86.4gr	54gr	54gr
Ac. Bórico	55gr	44gr	27.5gr	27.5gr
EDTA 0.5M pH 8	40ml	32gr	20ml	20ml
aforar	1 litro	800ml	500ml	1 litro
	10x	10x	10x	5x

Preparar 500ml a 10x; agregarle 9.5 litros de agua destilada y 100µl de bromuro de etidio.

.....

Buffer de RIPA.

Pesar en un vaso de precipitado:

Tris-Base	0.30285gr
NaCl	0.4383gr
Dioxicolato de Sodio	0.25gr
SDS	0.05gr
NP40	500µl
Inhibidores de proteasas	1 Tableta
aforar	50ml

Mezclar y guardar a 4°C.

Blotto o Buffer de Borato.

Pesar en un vaso de precipitado:

Ac. Bórico	12.4gr	6.2gr	3.1gr
Borato de Sodio	19gr	9.5gr	4.75gr
NaCl	8.8gr	4.4gr	2.2gr
aforar	2 litros	1 litro	500ml

Buffer de Lavado.

Pesar en un vaso de precipitado:

0.9% NaCl	13.5gr	9gr	4.5gr
10mM Tris-HCl	1.815gr	1.21gr	0.605gr
0.05% Tween 20	0.75ml	0.5ml	0.25ml
aforar	1.5 litros	1 litro	500ml

Ajustar el pH de la solución a 7.4 con NaOH.

MEDIOS DE CULTIVO.

α -MEM/FBS10%.

- Esterilizar agua milliq (30min, EL)
- Esterilizar filtros de 0.4 μ M y 0.2 μ M, 4 frascos de 500ml, 1 vaso de precipitado 1L, y probeta. (30min + 15min de secado).

En el cuarto de cultivo, colocar los frascos y filtros dentro de la campana y poner en la luz UV por 15min.

Mezclar en el vaso de precipitado estéril:

- 900ml de agua estéril.
- 1 sobre para 1lt de Minimal Essential Medium Alpha Medium (Invitrogen).
- 2.2gr. Bicarbonato de Sodio.
- 0.1gr. Piruvato de Sodio.
- 50ml de FBS.
- 1ml de mezcla de antibióticos.

En el cuarto de cultivo, filtrar por el filtro de 0.45 μ M y después por 0.2 μ M. Flamear la boca de los frascos de medio de cultivo antes de cerrarlos, ponerles parafilm, rotularlos adecuadamente y guardarlos en el refrigerador.

MEM/FBS10% dializado.

- Esterilizar agua milliq (30min, EL)
- Esterilizar filtros de 3 μ M, 0.4 μ M y 0.2 μ M, 6 frascos de 500ml, 1 vaso de precipitado 1L, y probeta. (30min + 15min de secado).

En el cuarto de cultivo, colocar los frascos y filtros dentro de la campana y poner en la luz UV por 15min.

Mezclar en el vaso de precipitado estéril:

- 900ml de agua estéril.
- 1 sobre para 1lt de Minimal Essential Medium (Invitrogen).
- 2.2gr. Bicarbonato de Sodio.
- 0.1gr. Piruvato de Sodio.
- 50ml de FBS dializado.
- 1ml de mezcla de antibióticos.

En el cuarto de cultivo, filtrar por el filtro de 3 μ M, después en 0.45 μ M y después en 0.2 μ M. Flamear la boca de los frascos de medio de cultivo antes de cerrarlos, ponerles parafilm, rotularlos adecuadamente y guardarlos en el refrigerador.

LB.

Pesar en un vaso de precipitado:

Bacto tryptone	10gr
Yeast extract	5gr
NaCl	10gr
aforar	1 litro

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH.
Dividir en 2 frascos de 500ml.
Esterilizar (20min, EL).

.....

LB con agar.

Pesar en un vaso de precipitado:

Bacto tryptone	10gr
Yeast extract	5gr
NaCl	10gr
aforar	1 litro

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH.
Dividir en 2 frascos de 500ml.
Agregar a cada frasco 7.5gr de Bacto agar.
Esterilizar (25min, EL).

SOLUCIONES.

PBS (Cuarto de cultivo).

- Esterilizar agua milliq (30min, EL)
- Esterilizar filtros de 0.2µM, 2 frascos de 500ml, 1 vaso de precipitado 1L, y probeta. (30min + 15min de secado).

En el cuarto de cultivo, colocar los frascos y filtros dentro de la campana y poner en la luz UV por 15min.

Mezclar en el vaso de precipitado estéril:

100ml de agua estéril
1 sobre para Dulbecco's phosphate Buffered Saline para 1Lt.

En el cuarto de cultivo, filtrar por el filtro de 0.2µM.

Flamear la boca de los frascos de PBS antes de cerrarlos, ponerles parafilm, rotularlos adecuadamente y guardarlos en el refrigerador.

SOA.

Pesar en un vaso de precipitado:

Bacto tryptone	20gr	2gr
Bacto yeast	5gr	0.5gr
NaCl 5M	2ml	200µl
KCl 1M	2.5ml	250µl
aforar	1 litro	100ml

Esterilizar (15min, EL).

TBS.

Pesar en un vaso de precipitado:

KCl	1.5gr	0.75gr
NaCl	95.35gr	47.67gr
aforar	1 litro	500ml
	10x	10x

Ajustar el pH a 7.4 con HCl concentrado.
Esterilizar (20min, EL).

.....

PBS.

Pesar en un vaso de precipitado:

NaCl	80gr	40gr
KCl	2gr	1gr
Na ₂ HPO ₄	14.4gr	7.2gr
KH ₂ PO ₄	2.4gr	1.2gr
aforar	1 litro	500ml
	10x	10x

Ajustar el pH a 7.4 con NaOH.
Esterilizar (20min, EL).

Verseno.

- Esterilizar agua milliq (30min, EL)
- Esterilizar filtros de 0.2µM, 2 frascos de 250ml, 1 vaso de precipitado 600ml y probeta. (30min + 15min de secado).

Mezclar en el vaso de precipitado estéril:

EDTA	0.1gr
KCl	0.2gr
NaCl	4gr
Tris-Base	1.52gr

Aforar a 500ml, ajustar el PH 7.7 con HCl 2N.

Una vez preparado el verseno, se disuelven 3ml de tripsina en un litro.

3ml---1000ml X = 1.5ml de tripsina en 500ml de verseno.
X ---500ml

En el cuarto de cultivo, filtrar por el filtro de 0.2mM y separar en 2 frascos de 250ml.
Flamear la boca de los frascos antes de cerrarlos, ponerles parafilm, rotularlos adecuadamente y guardar un frasco en el refrigerador y el otro ponerlo a -20 °C.

MATERIAL.

Tubos DEPC.

Poner en un vaso de precipitado 2 litros de agua destilada.
Agregar 1ml de DEPC por cada litro de agua (utilizar guantes y cubrebocas).
Agregar los tubos (1.5ml o 600µl).
Dejar agitando toda la noche.
Sacar los tubos (guantes y cubrebocas) y dejar secando (4hr aproximadamente).
Meter los tubos en frascos y esterilizar (30min + 15min de secado).
