



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

LA VITAMINA BIOTINA MODIFICA LOS PATRONES DE EXPRESIÓN GENÉTICA EN CELULAS HUMANAS: EVIDENCIA DE UN SISTEMA DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL MULTISISTEMICA QUE PROTEGE EL METABOLISMO CEREBRAL DURANTE EL AYUNO

Dr. Alfonso León del Río.

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

alfon@servidor.unam.mx

RESUMEN

La enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS) cataliza la activación, mediante biotilación, de cinco carboxilasas en células humanas. La deficiencia de HCS produce el síndrome deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC). Esta enfermedad es potencialmente mortal y se caracteriza por la deficiencia de la actividad de todas las carboxilasas. La deficiencia de biotina no solo disminuye la actividad de estas enzimas sino que parece modificar la expresión genética. El objetivo de este trabajo es el describir el mecanismo que utiliza biotina para modificar la transcripción de varios genes en células humanas. Los niveles de ARNm de genes que codifican HCS y carboxilasas fueron cuantificados mediante densitometría de productos de rtPCR (polimerización en cadena por transcripción reversa) en células humanas estimuladas con biotina. Se describe la participación obligatoria de la HCS en la estimulación transcripcional dependiente de la vitamina en hepatocitos y fibroblastos humanos. Este resultado es apoyado

por el hecho que células de pacientes con deficiencia de HCS son incapaces de estimular la transcripción al ser expuestas a biotina. Se presenta evidencia que sugiere que el compuesto biotinil-5'-AMP, la forma activa de la biotina, funciona como un segundo mensajero que activa una cascada de transducción de señales en la que participan la forma soluble de la enzima guanilato ciclasa y la proteína cinasa dependiente de GMPc (GMP cíclico). Este sistema de activación transcripcional pudiera estar involucrado en el desarrollo de enfermedades neurológicas y en malformaciones congénita.

En este trabajo se presenta evidencia de que la cascada de transducción de señales formada por las enzimas HCS-GCs-PKG regula la expresión de una red de genes en células humanas. Este sistema de regulación de la expresión genética esta afectado en pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas o en organismos sujetos a una dieta pobre en biotina. Nuestras investigaciones sugieren que la regulación transcripcional mediada por biotina es diferente en hígado y músculo con respecto al cerebro. Es posible que estas diferencias tejido específicas se deriven de un sistema diseñado para proteger al metabolismo cerebral mediante la reducción en el transporte y utilización de esta vitamina en hígado y músculo durante el ayuno. La clonación de promotores de genes activados por biotina permitió identificar dos posibles sitios involucrados en mediar el efecto de biotina sobre la transcripción. Estos sitios son reconocidos por los factores CREB y C/EBP por lo que se especula que la activación transcripcional por biotina sea el resultado de una remodelación de la cromatina en la región promotora mediante el reclutamiento de acetilasas de histonas.

Los resultados de este proyecto presentan evidencia que sugiere que errores en el sistema de regulación transcripcional dependiente de biotina puede estar relacionado con varias enfermedades humanas, desde el cáncer hasta destrucción de ciertas áreas del cerebro. El descubrimiento de que la biotina actúa como un inductor transcripcional en seres humanos abre un nuevo campo de estudio que permitirá entender el porque ciertas enfermedades neurológicas pueden ser tratadas con dosis farmacológicas de la vitamina o porque la deficiencia de biotina resulta en una incremento en malformaciones congénitas.

INTRODUCCIÓN

La vitamina hidrosoluble biotina es esencial para el mantenimiento de la homeostasis metabólica de todos los organismos. La función de esta vitamina es la de ser cofactor de enzimas conocidas como carboxilasas dependientes de biotina (1). En células humanas existen cinco carboxilasas; piruvato carboxilasa (PC), propionil-CoA carboxilasa (PCC), metilcrotonil-CoA carboxilasa y dos formas de acetil-CoA carboxilasa (ACC-1 y ACC-2). Estas enzimas catalizan reacciones clave en gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y catabolismo de amino ácidos.

La biotinilación de carboxilasas es catalizada por la proteína BirA (2,3 en procariontes y por la holocarboxilasa sintetasa (HCS) (1) en eucariontes. Esta modificación postraduccional se lleva a cabo en dos etapas; en la primera, la biotina es activada mediante la hidrólisis de ATP prediciéndose el compuesto biotinil-5'-AMP (B-AMP) (4,5). En la segunda etapa de la reacción, el B-AMP es utilizado para transferir a la biotina, con liberación de AMP, a un residuo de lisina específico, en una región altamente conservada en las carboxilasas (6-9).

La mayor parte de nuestro conocimiento sobre el papel de HCS y biotina en el metabolismo humano proviene del estudio de la enfermedad deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC). La causa de esta enfermedad es la deficiencia en la actividad de la HCS que resulta en la incapacidad para sintetizar el intermediario de biotilación B-AMP y en la disminución en la actividad de todas las carboxilasas (10). Los pacientes presentan en las primeras horas de vida dermatitis periorificial severa, letargia, hipotonia, alopecia cetoacidosis hiperamonemia y acidemia orgánica (11). El desequilibrio bioquímico que caracteriza a esta enfermedad conduce a un estado de coma o incluso la muerte si la enfermedad no es diagnosticada a tiempo.

En todos los casos estudiados la enzima HCS de los pacientes con DMC muestra una afinidad por biotina 3 a 70 veces menor que los valores de células humanas normales (12,13). Esta es la razón por la cual todos los síntomas clínicos y la potencialmente mortal interrupción de gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y el catabolismo de amino ácidos pueden ser revertidos suministrando a los pacientes dosis farmacológicas de biotina.

La clonación del cDNA (DNA complementario) que codifica a la HCS humano (7) permitió determinar las bases moleculares de la DMC. Casi todas las mutaciones identificadas en pacientes afectados están localizadas en una región de 120 aminoácidos (12,14) y que muestra una alta homología con el extremo carboxilo terminal de la proteína BirA (7). El análisis de las estructuras calculadas para estos dominios reveló que los cambios observados en la HCS alteran la conformación del sitio activo de la HCS lo que resulta en la afinidad disminuida por la biotina y en la capacidad de los pacientes de recuperarse cuando son tratados con dosis farmacológicas de esta vitamina.

Estos resultados parecían haber culminado casi 70 años de investigación que comenzaron con la caracterización de la biotina como un factor de crecimiento para levaduras en 1933 (15). Sin embargo, las observaciones publicadas en varios trabajos han puesto a en duda la profundidad de nuestro conocimiento sobre las funciones de la biotina en células humanas.

A diferencia de la DMC en donde el papel de la biotina ha sido bien caracterizado, en los últimos años se han publicado una serie de trabajos sobre enfermedades que responden al tratamiento con biotina y cuya etiología es desconocida. El origen de estos padecimientos no esta relacionado a una deficiencia en la actividad de las carboxilasas dependientes de esta vitamina. La enfermedad de ganglio basal (EGB) se caracteriza por una destrucción de las cabezas del caudato central y una pérdida parcial del putamen, lo que resulta en encefalopatía progresiva, vómito, cuadriparesis, cuadriplegia, convulsiones, pérdida del habla y muerte (39). Los síntomas de EGB, a diferencia de lo que ocurre en la deficiencia de holocarboxilasa sintetasa, se presentan entre los 3 y los 14 años de edad y pueden ser revertidos si la enfermedad se diagnostica a tiempo y los pacientes reciben cantidades farmacológicas de la vitamina por el resto de su vida. En ningún caso estos pacientes han desarrollado una deficiencia total o parcial de HCS o carboxilasas. La capacidad de la biotina para revertir los síntomas de pacientes afectados con EGB sin que haya una deficiencia de carboxilasas, sugiere que esta vitamina pueda estar involucrada en otros procesos celulares al menos en el cerebro.

Esta hipótesis podría ser fortalecida por el hecho de que animales de laboratorio en gestación, a los que se les induce una deficiencia marginal de biotina que no resulta en una disminución en la actividad de carboxilasas, muestran una alta incidencia de malformaciones congénitas como labio y paladar hendido, anencefalia, sindactilia y espina bífida. (16,17). Al igual

que en el caso de la EGB, no existe hasta el momento un mecanismo molecular que pueda explicar el origen de la amplia gama de padecimientos que la deficiencia adquirida o genética de biotina tiene en humanos y animales de laboratorio.

Otras observaciones igualmente interesantes y que podrían conducir a las otras funciones que tiene la biotina en la célula han sido publicadas recientemente. En estos trabajos se demuestra que la expresión o actividad de varias enzimas hepáticas requieren de suministros adecuados de biotina. La biotina parece aumentar la actividad enzimática de glucocinasa y la transcripción de su gene en ratas *in vivo*, células beta de páncreas y hepatocitos de rata en cultivo (18-20). De manera similar, los niveles de ARNm de la enzima 6-fosfofructocinasa se incrementan en ratas deficientes de biotina después de la administración peritoneal de la vitamina (21,22).

Para explicar todas estas observaciones comenzamos una línea de investigación en la que proponemos que la biotina actúa como un inductor transcripcional en células humanas. Durante los últimos tres años hemos hecho descubrimientos significativos que indican que la biotina esta involucrada en la regulación de la expresión genética a través de una cascada de transducción de señales en la que participan la forma soluble de la enzima guanilato ciclasa (GCs) y la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG). Una de las contribuciones mas importantes de este trabajo fué el identificar a la holocarboxilasa sintetasa (HCS) como una enzima bifuncional que además de catalizar la biotilación de carboxilasas participa en la activación transcripcional dependiente de biotina mediante la síntesis de 5'biotinil-AMP (B-AMP). En este proyecto se demostró que el B-AMP funciona como un segundo mensajero, que no había sido identificado como tal en células humanas, cuya función es la de activar a la enzima GCs. Estos resultados sugieren que el fenotipo que caracteriza a los pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas pueda deberse, al menos en parte, a la modificación de los patrones de expresión genética en las células hepáticas de estos individuos.

En este trabajo presentamos también evidencia que indica que la cascada de transducción de señales no solo es importante en el caso de la enfermedad DMC sino que también es vital para el correcto funcionamiento del metabolismo cerebral. Al estudiar el efecto de la deficiencia de biotina en células humanas encontramos una paradoja metabólica. Al carecer de esta vitamina las células responden "apagando" los genes que codifican enzimas involucradas en su transporte y utilización en lo que parecería un suicidio celular. Para comprender este fenómeno desarrollamos un modelo animal de deficiencia de biotina. Este modelo nos permitió descubrir que la inhibición transcripcional de genes involucrados en gluconeogénesis y síntesis de ácidos grasos ocurre en hígado, músculo, piel y riñón. Sin embargo, en el cerebro de estos animales la transcripción y la actividad de estas enzimas son normales. Este descubrimiento nos llevó a proponer que en la deficiencia de biotina los llamados órganos periféricos como el hígado y músculo muestran un altruismo metabólico que consiste en la regulación negativa de los genes involucrados en el uso de esta vitamina. Este mecanismo evita que el sistema muscular o el hígado, con una masa mucho mayor, se conviertan en competidores del cerebro por la poca biotina presente en el plasma. La razón de este complicado sistema de regulación transcripcional parece estar relacionado con el hecho de que la enzima piruvato carboxilasa (PC), una enzima dependiente de biotina, suministra a través de la anaplerosis del ciclo de Krebs un 30% de la energía utilizada por el cerebro.

En la parte final de este proyecto caracterizamos funcionalmente los promotores de dos genes activados por biotina. En ensayos de transfección se demuestra que el promotor de los genes de acetil-CoA carboxilasa (ACC-1) y del receptor multivitamínico dependiente de sodio (SMVT) es activado por cambios en la concentración de biotina. El análisis de estas regiones demuestra la presencia de sitios de unión para los factores de transcripción CREB, C/EBP y AP-1. Estos factores son responsables del reclutamiento de CBP y p300 proteínas con actividad de acetilasa de histonas asociadas a zonas transcripcionalmente activas en el DNA. Estos resultados sugieren que la biotina activa una cascada de transducción de señales que al señalizar al núcleo promueve la remodelación temporal de la cromatina favoreciendo la entrada de la maquinaria basal de transcripción.

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BIOTINA EN LOS NIVELES DE RNAm EN CÉLULAS HEPG2

Para establecer un modelo experimental que nos permitiera estudiar el efecto de biotina sobre la transcripción genética, utilizamos la línea de hepatoblastoma humano HepG2. En nuestro estudio, primero determinamos el efecto de desarrollar deficiencia de biotina en los niveles de RNAm de HCS, PCC, ACC-1 y ACC-2 en células HepG2 cultivadas en un medio libre de biotina hasta por 15 días. El RNA total fue aislado en tiempos diferentes y la cantidad de RNAm fue medido como se describe en la sección de Metodología (Fig. 1a) muestra un experimento representativo). La deficiencia de biotina resultó en una disminución gradual en los niveles de RNAm de HCS, PCC y ACC-1 que alcanzó 17-28% de los niveles iniciales (Fig.1b) a los 15 días del tratamiento. Los RNAm de ACC-1 y PCC fueron afectados más rápidamente, mostrando una disminución del 60% a los 7 días mientras que el RNAm de HCS requirió de 11 días en un medio libre de biotina para mostrar una reducción similar (Fig.1b). No se observaron cambios en los niveles de RNAm de ACC-2 o β -actina durante la realización de este experimento lo que sugiere que el efecto de la deficiencia de biotina es específico. Las células HepG2 mostraron morfología y crecimiento normal durante los 15 días de tratamiento en medio sin biotina.

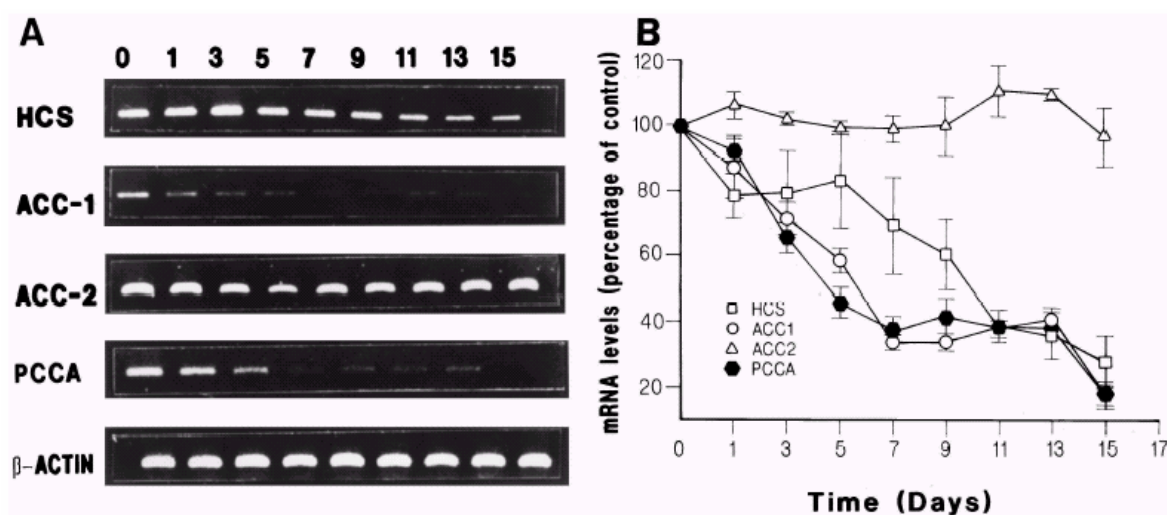


Figura 1. Efecto de la duración de la deficiencia de biotina sobre los niveles de ARNm de HCS, ACC-1, PCC y ACC-2. Panel A muestra un experimento de rtPCR representativo y panel B muestra el resumen de los experimentos realizados. Los resultados son presentados como la media con error estándar.

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE BIOTINA EN LOS NIVELES DE RNAm DE HCS Y CARBOXILASAS

Para comprobar que la reducción en los niveles de RNAm es un efecto específico de la deficiencia de biotina, incubamos células HepG2 en un medio libre de biotina por 14 días. Estos cultivos fueron transferidos a un medio conteniendo biotina 1.0 μ M por 2, 6, 12 o 24 h. Aunque incubaciones cortas con biotina produjeron incrementos importantes en los niveles de RNAm de HCS (datos no mostrados), fue solo hasta las 24 horas que se observaron niveles de RNAm comparables a los de células cultivadas en medio de crecimiento normal (Fig.2a y 2b). La suplementación de biotina a los medios de crecimiento tuvo un efecto mayor en los RNAm de ACC-1 y PCC comparado a los niveles iniciales. En el caso de ACC-1, la biotina no solo restauró los niveles de su RNAm sino que produjo un aumento del 40% por encima de los resultados obtenidos en células cultivadas permanentemente en presencia de biotina. De manera semejante, el RNAm de PCC mostró un incremento de 30% sobre las células control. Sin embargo, la biotina aumentó los niveles de RNAm solo hasta alcanzar los niveles iniciales. En contraste con los resultados anteriores, no hubo un cambio significativo en los niveles de RNAm de ACC-2 o β -actina después de la estimulación con biotina (Fig.2a y 2b).

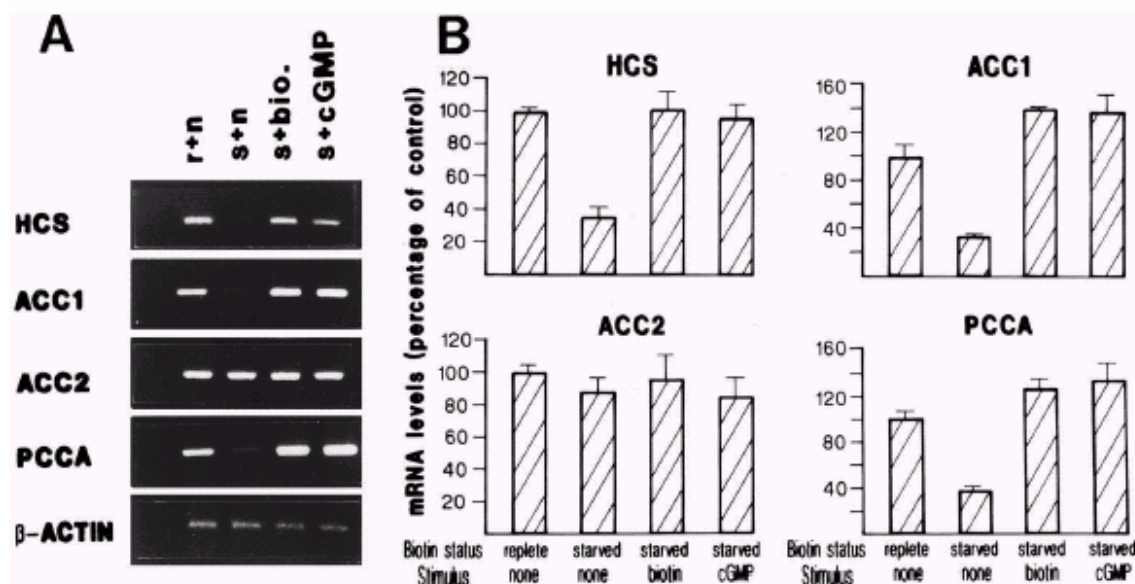


Figura 2. Efecto de la biotina, GMPc y del inhibidor de la guanilato ciclasa soluble sobre los niveles de ARNm.

EFFECTO DEL GMPc EN LOS NIVELES DE RNAm EN CÉLULAS DEFICIENTES DE BIOTINA

Para explorar la idea de que la recuperación en los niveles de RNAm involucra una vía de transducción de señales y la participación de segundos mensajeros, comparamos el efecto de biotina y GMPc en la recuperación de los niveles de RNAm de HCS, ACC-1 y PCC. Al estimular

células HepG2 deficientes de biotina con 8-Br-cGMP (1.0 mM) este tratamiento resultó en el incremento de los niveles de RNAm de HCS a los niveles observados en células control. Este incremento fue comparable al obtenido añadiendo biotina a los cultivos (Fig. 2a y 2b). Los niveles e RNAm de PCC y ACC-1 aumentaron después de la estimulación con GMPc 30-35% por encima de los valores observados en células control (Fig. 2a y 2b). Estos resultados también fueron idénticos a los observados estimulando a las células HepG2 con biotina. Finalmente, el tratamiento con 8-Br-cGMP no tuvo efecto alguno sobre el RNAm de ACC-2 o actina (Fig. 2a y 2b). La estimulación simultánea de células HepG2 con biotina y 8-Br-cGMP no produjo un efecto aditivo o sinérgico en los niveles de RNAm. El resultado de usar ambos compuestos fueron idénticos a los obtenidos utilizando cualquiera de ellos por separado (datos no mostrados).

LA FORMA SOLUBLE DE LA ENZIMA GUANILATO CICLASA MEDIA EL EFECTO DE BIOTINA SOBRE LOS NIVELES DE RNAm

Nuestros resultados sugieren que el segundo mensajero GMPc actúa como mediador del efecto de biotina en los niveles de RNAm de HCS, PCC y ACC-1. Existen dos enzimas que podrían estar involucradas en el aumento en la concentración de GMPc en hepatocitos estimulados con biotina; guanilato ciclasa soluble (GCs) y guanilato ciclasa membranal. Para distinguir entre estas posibilidades determinamos si la inhibición de la GCs afecta la recuperación dependiente de biotina de los niveles de RNAm. Células HepG2 deficientes de la vitamina fueron estimuladas con biotina por 24 h en presencia de ODQ un inhibidor específico de la GCs como se describe en la sección de Metodología (37), y los niveles de RNAm de HCS, ACC-1 y PCC fueron comparados con los obtenidos en células deficientes de biotina y células deficientes de biotina estimuladas por 24 h con la vitamina. Como se muestra en el Cuadro 1, la deficiencia de biotina (Bio Def) redujo los niveles de RNAm de HCS, ACC-1 y PCC a un 34-38% con respecto a valores de células control. Al añadir biotina al medio (Bio Def + Bio) de nuevo resultó en la recuperación de los niveles de RNAm a niveles normales para HCS y por encima de valores control en el caso de ACC-1 y PCC-1 (Cuadro 1). La incubación de células HepG2 con biotina y ODQ (ODQ + Bio) evitó la recuperación dependiente de biotina de los niveles de RNAm de HCS, ACC-1 y PCC. Los resultados obtenidos cuando la GCs fue inhibida fueron HCS 11%, ACC-1 36% y PCC 33% (Cuadro 1). Este experimento indica que la GCs está involucrada estimular la recuperación de RNAm por biotina o GMPc. Estos datos también confirman que el RNAm de ACC-2 parece no ser afectados de una manera significativa por la deficiencia de biotina o la suplementación con la vitamina.

LA PROTEÍNA CINASA DEPENDIENTE DE GMPc ES ESTIMULADA POR LA ACTIVIDAD DE LA GCs PARTICIPANDO EN EL AUMENTO DE LOS NIVELES DE RNAm DEPENDIENTE DE BIOTINA

Para determinar si el efecto de biotina ocurre a través de una cinasa dependiente de GMPc (PKG) (29), se incubaron células HepG2 deficientes de biotina en presencia del inhibidor de la PKG, Rp-cGMPS (PKG_i). Estos experimentos muestran que aunque la estimulación de células HepG2 con biotina 1 μ M fue suficiente para restaurar los niveles de RNAm a niveles normales, la incubación de las células en presencia del inhibidor PKG_i limitó de manera importante la recuperación de los niveles de RNAm (Cuadro, 1).

LA ACTINOMICINA-D IMPIDE LA RECUPERACIÓN DE LOS NIVELES DE RNAm EN CÉLULAS ESTIMULADAS CON BIOTINA.

Para continuar caracterizando el efecto de biotina en los niveles de ARNm investigamos si este proceso involucra una estimulación directa de la transcripción de los genes estudiados. Células HepG2 deficientes de biotina fueron incubadas durante una hora en presencia de actinomicina D, inhibidor de la RNA polimerasa II. Después de este tiempo se añadió biotina (1 μ M) a la mitad de los cultivos, mientras que los restantes sirvieron como controles de actinomicina-D. La incubación de las células continuó por 24 h (Cuadro, 1). Este experimento muestra que los niveles de RNAm de HCS, ACC-1, ACC-2 y PCC disminuyeron por debajo de los niveles obtenidos en medio libre de biotina en las células que fueron expuestas a actinomicina-D. La estimulación con biotina no aumentó los niveles de RNAm en presencia del inhibidor, siendo estos valores esencialmente idénticos a los controles que solo fueron tratados con actinomicina-D (Cuadro, 1).

Cuadro.1. Efecto de la inhibición de la guanilato ciclasa soluble, proteína cinasa dependiente de GMPc y RNA polimerasa II en los niveles de ARNm.

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

EL EFECTO DE BIOTINA SOBRE LOS NIVELES DE RNAm REQUIERE DE LA ACTIVIDAD DE LA HOLOCARBOXILASAS SINTETASA

Debido a que la biotina es el sustrato de la HCS, investigamos si esta enzima participa en la recuperación de los niveles de RNAm en células HepG2 estimuladas con biotina. En este experimento comparamos el efecto de diferentes concentraciones de biotina en los niveles de RNAm de HCS, ACC-1 y PCC en fibroblastos normales y fibroblastos de pacientes con mutaciones en HCS que disminuyen su afinidad por biotina e impiden la formación del intermediario B-AMP. Debido a que los resultados obtenidos por los tres RNAm estudiados fueron similares, decidimos enfocarnos en el estudio del RNAm de la HCS. Dos líneas celulares mutantes fueron utilizadas, MCD-MK, homocigota para la mutación R508W, y MCD-VE con las mutaciones L216R y V363D (16). Experimentos preliminares demostraron que ambas líneas celulares respondían de manera idéntica a biotina (datos no mostrados). Por esta razón y el hecho de que las células MCD-MK nos proveían de un trasfondo genético homogéneo, decidimos utilizar ésta línea celular para estudiar el papel de la HCS en el efecto de biotina sobre los niveles de RNAm. La Fig. 3 muestra el efecto de diferentes concentraciones de la vitamina en la recuperación de los niveles de RNAm de HCS en células MCD-MK deficientes de biotina. La incubación de células normales y MCD-MK en un medio libre de biotina por 14 días redujo los niveles de RNAm de HCS a un 35% de los valores control en ambos casos. La suplementación de los cultivos con biotina 0.01 μ M incrementó los niveles de RNAm a 78% con respecto a los resultados obtenidos en fibroblastos control. Esta concentración de biotina no indujo un cambio

aparente en el RNAm de HCS en células MCD-MK (38%). Al incrementar 10 veces la concentración de biotina (0.1 mM) los niveles de RNAm de HCS aumentaron a 87% en fibroblastos normales y 53% en células MCD-MK. Los niveles de RNAm de HCS en fibroblastos normales y células MCD-MK mostraron niveles similares solo hasta que la concentración de biotina fue incrementada a 1.0 μ M (118% y 93%, respectivamente) (Fig.3).

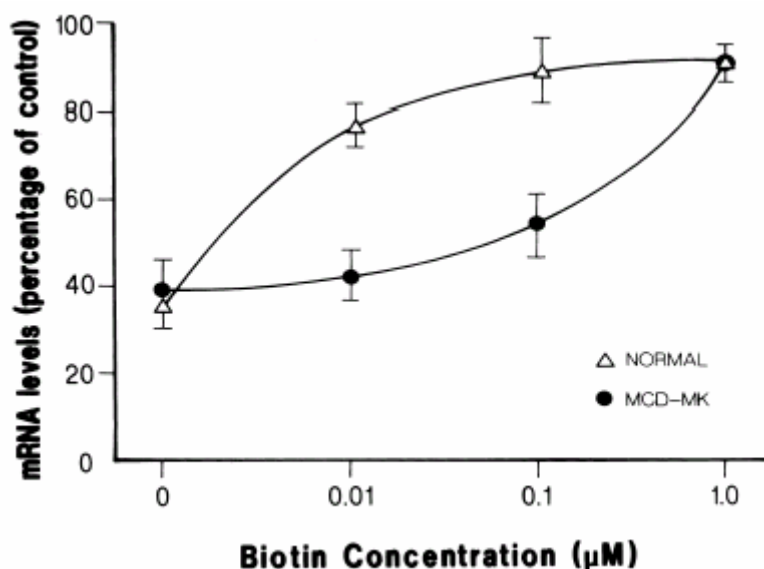


Figura 3. Efecto de diferentes concentraciones de biotina sobre los niveles de ARNm de HCS en células normales y de pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas (MCD-MK).

EFFECTO DEL GMP_c EN LOS NIVELES DEL RNAm DE HCS EN CÉLULAS NORMALES Y CÉLULAS MCD

En esta sección del estudio investigamos si en la DMC las mutaciones en HCS afectan también el aumento en los niveles del RNAm en respuesta a GMP_c. fibroblastos normales y células MCD-MK fueron estimuladas con diferentes concentraciones de 8-Br-cGMP (0.01 mM, 0.1 mM y 1.0 mM). Ambas líneas celulares no mostraron ningún cambio en la concentración de RNAm de HCS al ser incubadas con 8-Br-cGMP 0.01mM y 0.1 mM (datos no mostrados). Sin embargo al estimular las células con 8-Br-cGMP 1.0 mM los niveles de RNAm de HCS se elevaron a 117% en células normales y 92% en células MCD-MK con respecto a células control.

EL TRANSPORTADOR DE BIOTINA SMVT, ES REGULADO A NIVEL TRANSCRIPCIONAL POR LA PRESENCIA DE LA VITAMINA

Los resultados anteriores claramente indican que la biotina actúa sobre la expresión genética en células humanas. Sin embargo, para que la biotina pueda participar como cofactor de carboxilasas o como inductor transcripcional necesita ser primero internalizada a la célula. Por esta razón, y por el hecho de que el transportador de biotina SMVT presenta un punto lógico

de regulación del metabolismo de la vitamina, determinamos el efecto de su deficiencia sobre los niveles de ARNm de este gen. Células HepG2 incubadas en un medio deficiente de biotina mostraron una reducción del 70% en los niveles de ARNm de SMVT con respecto a células control (Fig.4.), la especificidad del efecto de la deficiencia de biotina quedó de manifiesto al estimular a las células con biotina 1.0 μ M. Este tratamiento fué suficiente para restablecer los niveles del ARNm de SMVT a valores normales. La expresión de SMVT parece estar bajo el mismo control transcripcional que los genes de HCS, ACC-1 y PCC ya que el GMPc puede sustituir a la biotina y el compuesto ODQ, inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, previno la recuperación de los niveles de ARNm cuando las células fueron estimuladas con biotina en presencia de este veneno metabólico (Fig.4.).

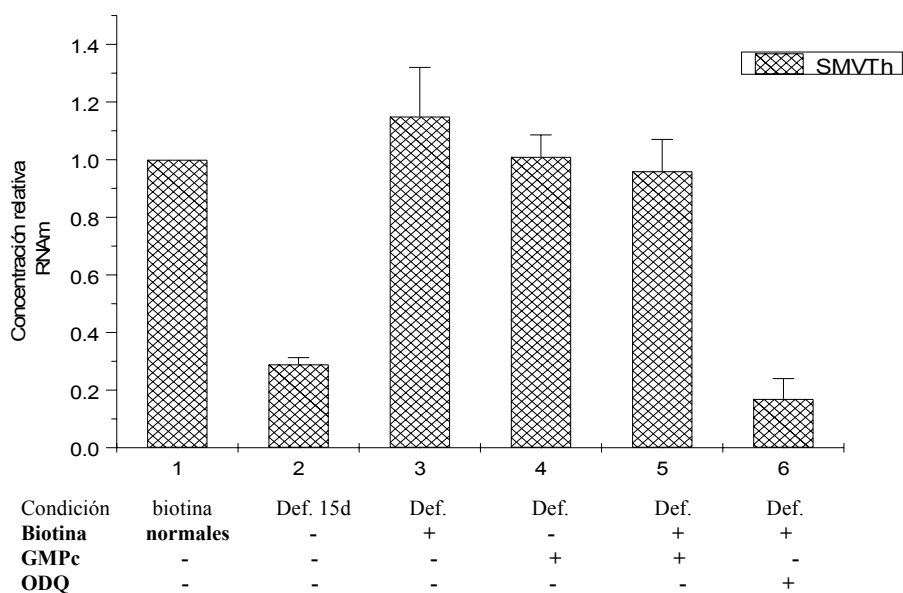


Figura 4. Efecto de biotina, GMPc y GCs, sobre los niveles de ARNm del SMVT en células humanas.

EN PACIENTES CON DEFICIENCIA MÚLTIPLE DE CARBOXILASAS HAY UNA DISMINUCIÓN EN LOS NIVELES DE ARNm DE SMVT

Para determinar si los niveles de ARNm de SMVT están bajo el control de la actividad de la HCS estudiamos el efecto de la deficiencia de biotina en células normales y células de pacientes con DMC. Al incubar estas líneas celulares en un medio deficiente de biotina registramos una reducción del 70% en los niveles de ARNm de SMVT en ambos casos. Sin embargo, al estimular las células con diferentes concentraciones de biotina la respuesta fué muy diferente. Mientras que biotina 1nM fué suficiente para que células normales incrementaran los niveles de ARNm a 78% con respecto al control, las células DMC mostraron un incremento mucho menor (20%). A pesar que la concentración de la biotina incrementó mil veces, los niveles de ARNm de SMVT, en células DMC no alcanzó los niveles normales (Fig. 5).

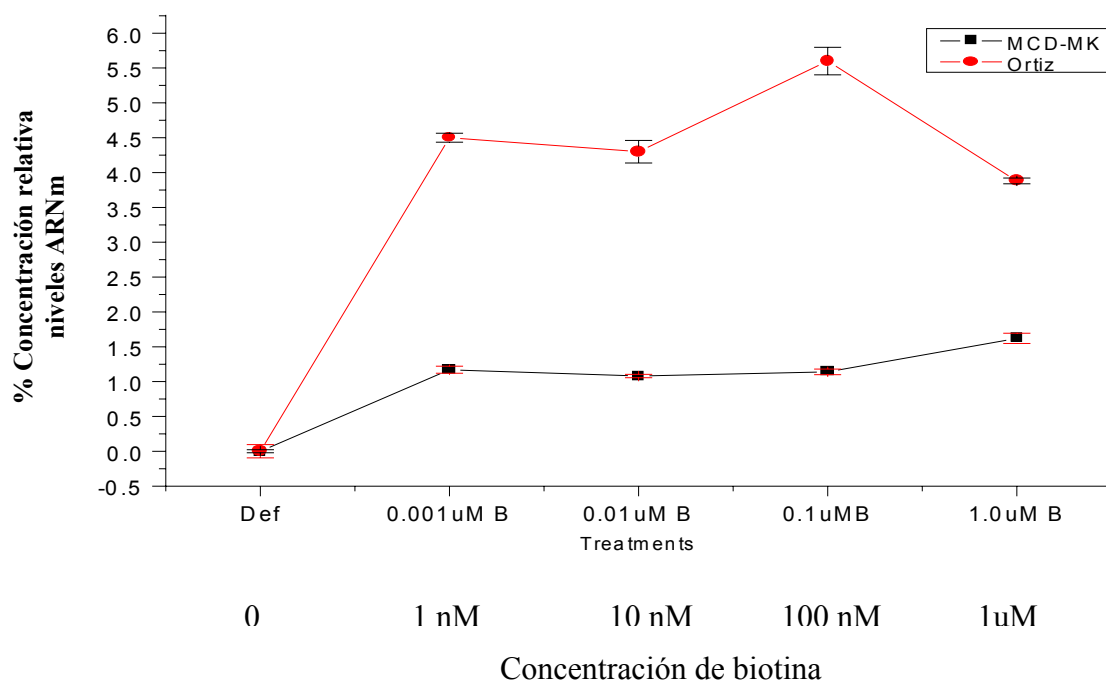


Figura 5. Efecto de la biotina en los niveles de ARNm de SMVT en células normales y de pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas.

LA DEFICIENCIA DE BIOTINA NO AFECTA LOS NIVELES DE ARNm DE BIOTINIDASA ENZIMA RESPONSABLE DEL RECICLAMIENTO DE BIOTINA

Los resultados anteriores son difíciles de explicar ya que se esperaría que la célula respondiera a la deficiencia de biotina sintetizando más transportador SMVT para maximizar las oportunidades de satisfacer sus requerimientos en cuanto a esta vitamina. Para tratar de entender este comportamiento decidimos determinar el efecto de la deficiencia de biotina sobre los niveles de ARNm de enzimas involucradas en el transporte (SMVT), utilización (HCS y propionil-CoA carboxilasa, PC) y reciclamiento (biotinidasa) de biotina. Nuevamente, como había ocurrido en experimentos anteriores, la deficiencia de biotina resultó en una disminución de los niveles de ARNm de HCS, PC y SMVT en fibroblastos normales y en fibroblastos de pacientes con DMC. Sin embargo, los niveles del ARNm de biotinidasa no fueron afectados (Cuadro 2). Estos resultados sugieren que la deficiencia de biotina reduce la capacidad de las células para utilizar la biotina exógena mientras que la capacidad de reciclamiento intracelular permanece intacta. El hecho de que la biotinidasa no sea afectada transcripcionalmente también indica que el efecto de biotina es específico y no el resultado del deterioro metabólico de la célula que pudiera afectar la transcripción genética en general.

Cuadro 2. Efecto de la biotina sobre niveles de ARNm de enzimas involucradas en el transporte, utilización y reciclamiento de esta vitamina en diferentes líneas celulares humanas.

| | HepG2 | | Fibroblastos normales | | MCD-MK (HCS deficiente) | |
|--------------------|--------------|------------|------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|
| | Deficientes | +Biotina | Deficientes | +Biotina | Deficientes | +Biotina |
| SMVT | 29% | 115% | 18% | 88% | 18% | 47.2% |
| HCS | 36% | 100% | 34% | 117% | 38% | 92% |
| PC | 57% | 100% | 26% | 100% | 51% | 100% |
| Biotinidasa | 84% | 91% | 108% | 100% | 118% | 113% |

LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR LA CASCADA HCS-GCS-PKG MUESTRA ESPECIFICIDAD TISULAR

Para tratar de comprender el papel fisiológico de la regulación transcripcional por biotina desarrollamos un modelo animal de deficiencia de esta vitamina. En esta parte del proyecto utilizamos ratas tipo Whistar macho adultos alimentados con una dieta deficiente de biotina durante 8 semanas. Este tiempo es el requerido para que las carboxilasas en el plasma de los animales disminuyan su actividad a 1%-5% del valor normal. Estos valores enzimáticos son los que presentan los pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas. El RNA total se extrajo a partir de cerebro, músculo, riñón e hígado de estos animales para amplificar mediante rtPCR los ARNm de HCS, SMVT, PC y bitinidasa. Estos experimentos fueron diseñados para explorar la posibilidad de que la inhibición en la transcripción de estos genes por deficiencia de biotina sea un fenómeno general y no producto del uso de células hepáticas como modelo experimental, en el caso del modelo animal, la deficiencia de biotina resultó en una marcada disminución en el ARNm de SMVT, HCS y la carboxilasa piruvato carboxilasa (PC) en hígado y riñón (Cuadro 3). De manera análoga a los resultados obtenidos en hepatocitos y fibroblastos humanos los niveles de ARNm de biotinidasa no fueron afectados por la deficiencia de biotina. De manera notable el cerebro mostró ser un órgano protegido ya que la deficiencia de biotina no afecto los niveles de ARNm de ninguno de los genes estudiados (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de biotina sobre niveles de ARNm de enzimas involucradas en la utilización de biotina en órganos de rata deficiente de biotina.

| | Hígado | Cerebro | Riñón |
|--------------------|---------------|----------------|--------------|
| SMVTr | 42% | 90% | 43% |
| HCSr | 55% | 94% | n.d. |
| PCr | 16.7% | 95.6% | 41% |
| Biotinidasa | 91% | 104% | 93% |

LOS PROMOTORES DE ACC-1 Y SMVT CONTIENEN SECUENCIAS QUE SON ACTIVADAS DURANTE LA ESTIMULACIÓN CELULAR CON BIOTINA

En los experimentos anteriores se demostró que la biotina al ser transformada por la HCS en B-AMP actúa como un inductor transcripcional a través de la estimulación de una cascada de transducción de señales localizada en el citoplasma. Sin embargo, desconocemos como se transmite esa señal al núcleo celular para activar la transcripción de genes blanco. Para caracterizar la parte nuclear de la estimulación transcripcional por biotina clonamos fragmentos de DNA genómico en los que presumiblemente se encuentran los promotores de los genes ACC-1 y SMVT. Estos fragmentos fueron subclonados en el vector pGI3 basic (promega) que contine el gen reportero de luciferasa. Un aumento en la actividad de luciferasa es el indicador de que los fragmentos genómicos contienen un promotor funcional. En el caso de la región promotora de SMVT esta se dividió en tres fragmentos menores a los que se denominó P1, P2 y P3. Estos experimentos mostraron que únicamente el fragmento P2 presenta la capacidad para dirigir la expresión de luciferasa (Fig.6.). Cuando las células transfectadas con estos fragmentos fueron estimuladas con biotina la actividad de luciferasa se incrementó en un 100%. El promotor de ACC-1 mostró un comportamiento similar pero en este caso la biotina estimulo casi 200% la actividad de luciferazas con respecto al control (datos no mostrados). Esto resultados sugieren que el efecto transcripcional de biotina observado en células en cultivo se reproduce a nivel de promotores. Con el objeto de identificar las regiones en el promotor que pudieran estar involucradas en el efecto de biotina se analizaron las secuencias genómicas con el programa MacVector para identificar todos los posibles sitios de unión de factores de transcripción presentes en los promotores de ACC-1 y SMVT. Aunque estas regiones son completamente diferentes en cuanto a su secuencia, en ambas encontramos secuencias consenso para la unión de los factores de transcripción C/EBP y CREB. La funcionalidad de estos sitios y su papel en la regulación transcripcional por biotina será determinada mediante ensayos de inmuno-precipitación de cromatina, mismos que serán descritos al final de esta sección.

DISCUSIÓN

Varios estudios han demostrado que la biotina, además de actuar como cofactor de carboxilasas, también modifica la expresión genética a nivel transcripcional y traduccional. La mayor parte de estos trabajos han sido realizados utilizando proteínas hepáticas de rata. Estudios recientes han mostrado también que la biotina regula de manera positiva los niveles del RNAm de HCS y mantiene el nivel de la menos dos carboxilasas en hígado de rata. En este estudio, hemos examinado el papel de la HCS en la regulación genética mediada por biotina. Los resultados demuestran el papel de HCS, cuya función es la activación de biotina a B-AMP y su transferencia a las carboxilasas, como intermediario en la estimulación mediada por biotina de los niveles de RNAm de HCS y carboxilasas en fibroblastos humanos. Este trabajo demuestra que en fibroblastos y hepatocitos humanos que la estimulación por biotina de los niveles de RNAm requiere GMPc y la participación de la enzima guanilato ciclasa soluble, y la proteína cinasa dependiente de GMPc.

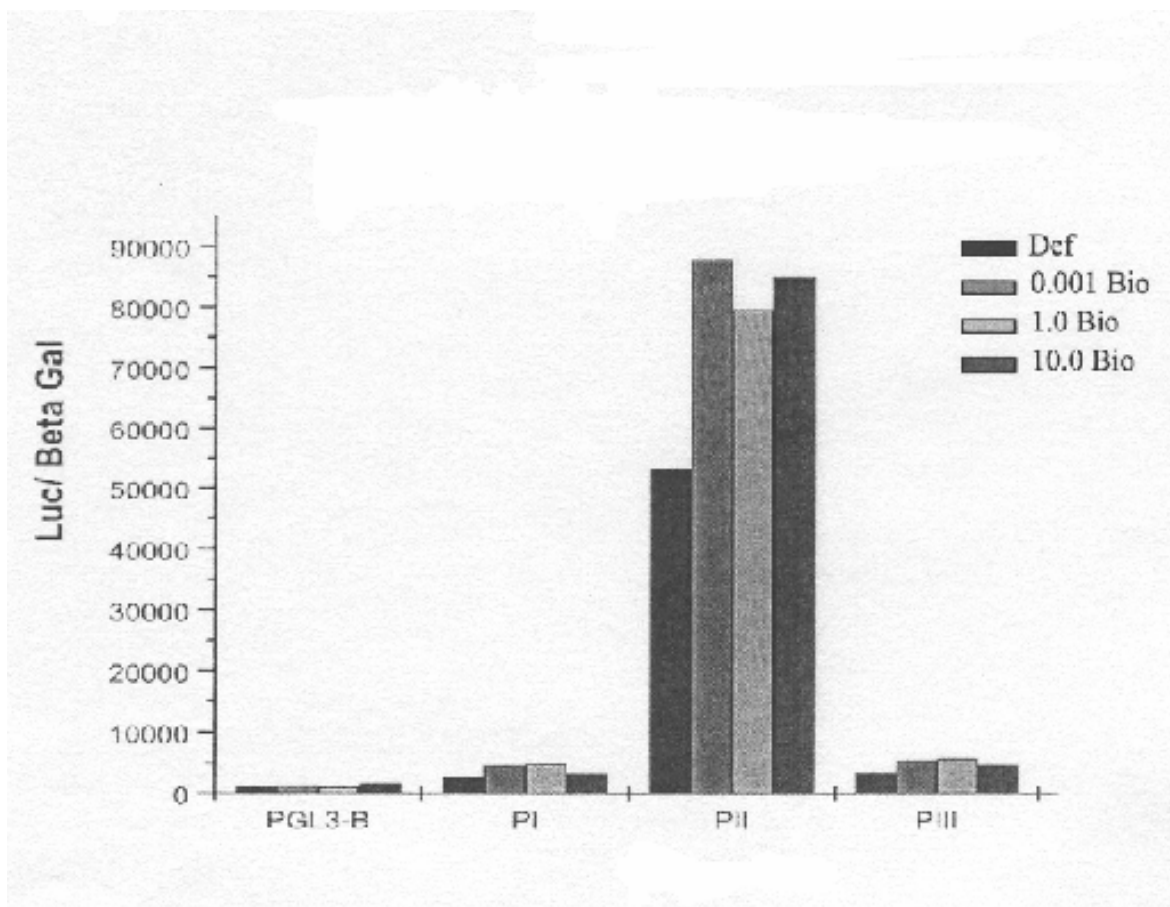


Figura 6. Efecto de biotina sobre la actividad del promotor del gen SMVT humano.

El impacto de la deficiencia de biotina en células HepG2 fue una reducción gradual de los niveles de RNAm de HCS, ACC-1 y PCC hasta alcanzar un 30% de los niveles iniciales mientras que el ARNm de la ACC-2 no fue afectado. Las células tuvieron que ser incubadas dos semanas en un medio libre de biotina para observar los cambios antes mencionados en los niveles de RNAm. Esto probablemente refleja una lenta excreción y metabolismo de biotina. La suplementación o adición de biotina resultó en una recuperación dramática de los niveles de RNAm en 24 horas lo que demuestra que el efecto de biotina es específico.

La incubación de células HepG2 in presencia del inhibidor de la RNA polimerasa II, actinomycin-D por 24 horas redujo los niveles de RNAm por debajo de los niveles observados en células deficientes de biotina y la vitamina no pudo contrarrestar los efectos de la droga. Estos resultados sugieren que el efecto de biotina es estimular la transcripción genética, sin embargo, confirmación de esta afirmación requiere del examen directo de la velocidad de transcripción para descartar la posibilidad de que la biotina influya en el procesamiento o estabilidad del RNAm.

Los experimentos realizados en este trabajo presentan evidencias que indican que la biotina regula los niveles de RNAm a través de una cascada de transducción de señales que

involucra cGMP y PKG (Fig 7). En primer lugar, el GMPc puede reproducir el efecto de biotina en los niveles de RNAm. En segundo lugar, el uso de ODCQ, un inhibidor de la GCs, impide el efecto de biotina. Tercero, el inhibidor e la PKG (rp-cGMPS), permitió solo una recuperación mínima de los niveles de RNAm de HCS y carboxilasas.

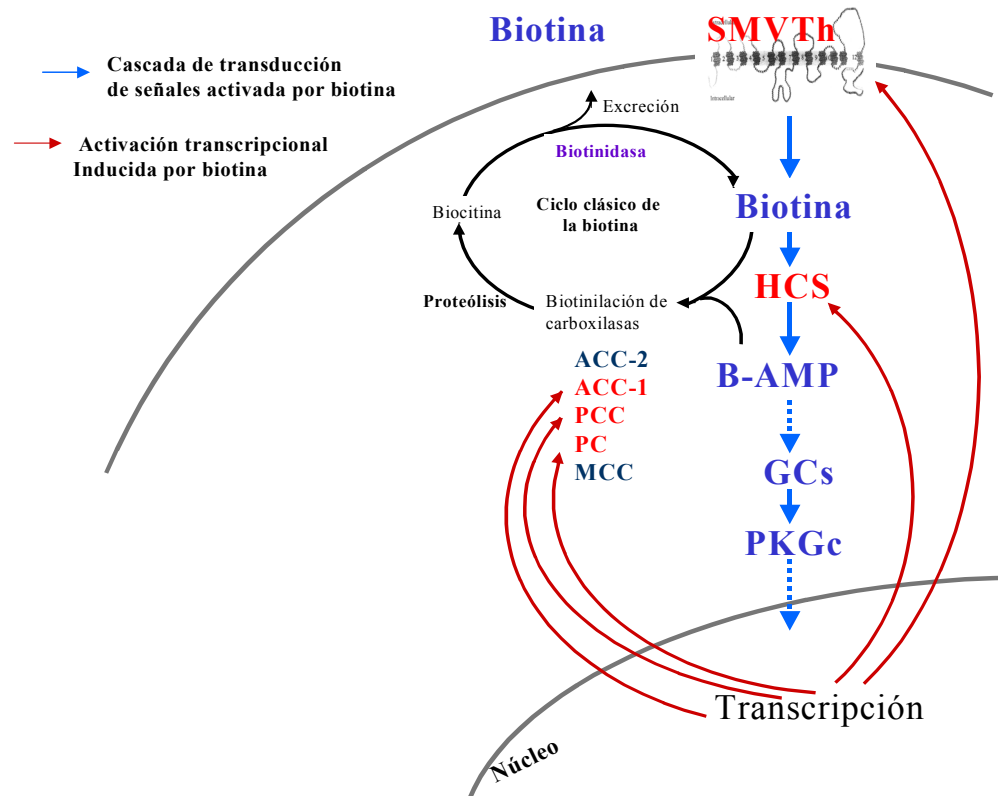


Figura 7. Modelo en el que se representa la función “clásica” de biotina como cofactor de carboxilasas y su papel como activador transcripcional.

En nuestra investigación el uso de células de pacientes con DMC fue esencial para distinguir entre un efecto directo de biotina y uno en el cual la biotina tiene que ser metabolizada para producir un efecto transcripcional. Las células MCD-MK son homocigotas para la mutación R508W, una de las más frecuentemente encontradas en pacientes con DMC (16, 31, 32). Células humanas que llevan esta mutación presentan una baja actividad de todas las carboxilasas pero han demostrado responder estupendamente a dosis farmacológicas de biotina (16). Al incubar células normales y DMC deficientes de biotina con concentraciones diferentes de la vitamina se demostró que las células mutantes requieren 100 veces más biotina para elevar la cantidad de ARNm de HCS a niveles mostrados por células normales. Al comparar la capacidad de biotina vs GMPc para estimular los niveles de RNAm de HCS en estas líneas celulares, demostramos la contribución esencial de HCS en este proceso y el hecho de que el GMPc se encuentra debajo de la HCS en la cascada de transducción de señales. El producto

inmediato de la interacción de HCS con biotina es la síntesis de B-AMP. Este compuesto es el sustrato real para la transferencia de biotina a las carboxilasas. En este trabajo sugerimos que el B-AMP es un buen candidato para ser un segundo mensajero involucrado en los procesos celulares regulados por biotina.

Un estudio previo a esta investigación demostró que la deficiencia de biotina en ratas resulta en la reducción en los niveles de ARNm de HCS mientras que los ARNm de PC y PCC no fueron afectados (27). En este estudio mostramos que la deficiencia de biotina en células humanas HepG2 reduce los niveles de ARNm de HCS, PCC y ACC-1. El comportamiento diferente del ARNm de PCC en células humanas y ratas deficientes de biotina puede explicarse por diferencias en las técnicas ó los modelos utilizados en ambos estudios. Es también posible que el efecto de biotina sobre las carboxilasas sea específico de células humanas. Sin embargo, nuestros resultados parecen ser confirmados por la observación hecha en pacientes con cáncer de colon. Las células de adenocarcinoma mostraron tener concentraciones mas bajas de biotina en comparación con células normales y una reducción en los niveles de ARNm de PCCA y PCCB (34). Es posible que en células de cáncer de colon el patrón de expresión genética ha sido alterado de manera adicional por la poca disponibilidad de biotina y por la disminución en la activación de la cascada de señalización HCS-GCs-PKG descrita en este estudio.

Uno de los descubrimientos más interesantes de este estudio es la represión de la transcripción del transportador de biotina SMVT en células deficientes. La singularidad de este resultado es que uno esperaría que ante la deficiencia de biotina la célula respondiera sintetizando más SMVT para optimizar las probabilidades de utilizar la poca biotina disponible en el medio. Esto en principio parece ser contrario al mantenimiento de la homeostasis metabólica por lo que decidimos utilizar un modelo animal para descartar que este resultado fuera producto del modelo utilizado más que una característica de la regulación in vivo del SMVT. El modelo animal mostró también que la deficiencia de biotina resulta en una reducción de los niveles de ARNm de las enzimas involucradas en el transporte y utilización de biotina en hígado, riñón y músculo. Sin embargo los niveles de ARNm no fueron afectados en el cerebro de estos animales. Para explicar estas observaciones proponemos el siguiente modelo; **En la deficiencia de biotina, debido a una mala alimentación o al ayuno, hay una reducción en la transcripción de los genes HCS, SMVT y de las carboxilasas en órganos periféricos.** Esto provocaría una reducción en el consumo de biotina en músculo, hígado, piel y riñón. Estos órganos, en el escenario propuesto, tendrían un papel altruista en el metabolismo ya que al sacrificar su consumo de biotina favorecen que la vitamina remanente en el plasma sea utilizada por el cerebro. Este mecanismo probablemente este asociado con la imperiosa necesidad de este órgano para mantener activas a las enzimas propionil-CoA carboxilasa y piruvato carboxilasa ya que en conjunto aportan el 30% de la energía que consume este órgano en forma de intermediarios del ciclo de Krebs. Esta hipótesis es fortalecida por el hecho de que la PC también participa en la síntesis de neurotransmisores por lo que su papel en el cerebro es aún más importante. Es interesante recordar que tanto en células humanas en cultivo como en el modelo animal los niveles de ARNm de biotinidasa no fueron afectados por la deficiencia o suplementación de biotina. Debido a que el papel de la biotinidasa es el reciclar biotina intracelular durante la degradación de carboxilasas podemos especular que esta enzima tiene un papel fundamental en el modelo de protección del metabolismo cerebral. Ya que esta enzima no es afectada por los niveles de biotina es posible que durante la deficiencia de esta vitamina, y al disminuir el consumo de la vitamina en órganos como el músculo o el hígado, la biotinidasa contribuya a la supervivencia de estos tejidos mediante el reciclamiento de la vitamina

intracelular (Fig.7), la importancia de la biotinidasa en el mantenimiento metabólico queda de manifiesto en pacientes que muestran una deficiente actividad en la actividad de esta enzima. Los síntomas de esta enfermedad son virtualmente idénticos a los de pacientes con deficiencia de HCS. Sin embargo, a diferencia de la DMC, la deficiencia de biotinidasa implica daño neurológico y pérdida de la audición por lo que es posible que la actividad de esta enzima sea particularmente importante para satisfacer los requerimientos de biotina del sistema nervioso. Es interesante considerar la posibilidad de que la cascada HCS-Gcs-PKG y la biotinidasa estén detrás de los síntomas de pacientes afectados con la enfermedad de ganglio basal en particular con la destrucción del putamen.

La clonación de los promotores de ACC-1 y SMVT permitió estudiar los mecanismos de activación transcripcional a nivel del DNA. Nuestros resultados indican que la respuesta de estos promotores es idéntica a la observada en células humanas cultivadas en presencia de biotina. La adición de biotina en concentraciones fisiológicas es suficiente para aumentar en un 2100-200% la actividad de estos promotores en células HepG2. Estos resultados validan los experimentos realizados en células en cultivo y de manera igualmente importante nos proveen de un modelo experimental con el cual esperamos diseccionar en detalle cada uno de los componentes de la maquinaria nuclear responsable de la activación transcripcional de biotina. El análisis de las secuencias de los promotores de ACC-1 y SMVT revela una sola característica en común, la presencia de varios sitios de unión para CREB y C/EBP. Aunque estos sitios aun deben ser validados experimentalmente, es interesante considerar su posible importancia en los procesos descritos en este proyecto.

La cascada de transducción de señales activada por biotina involucra a la enzima PKG. Esta es una cinasa que al ser activada por GMPc es translocada a núcleo en donde se le ha asociado a la activación transcripcional mediante la fosforilación de factores de transcripción como c-Jun. Es interesante considerar que en la activación transcripcional por biotina PKG tenga como sustratos a CREB y C/EBP ya que es sabido que estos factores son activados por fosforilación catalizada por diversas cinasas. Si este modelo es correcto, la unión de CREB y C/EBP al promotor de ACC-1 o SMVT resultaría en el reclutamiento de CBP y p300. Estos factores celulares poseen actividad de acetilasas de histonas misma que se ha asociado a regiones transcripcionalmente activas del DNA. En este trabajo proponemos que el último paso en la activación transcripcional mediada por biotina es la acetilación de histonas lo que resulta en una remodelación transitoria de la estructura de la cromatina en la región promotora permitiendo el acceso a la maquinaria basal de la transcripción.

El descubrimiento de que la biotina actúa como un inductor transcripcional sugiere que esta vitamina pudiera ser importante en la regulación de la expresión de otros genes no involucrados en el metabolismo de la biotina. Durante años, varios investigadores y veterinarios han mostrado que la deficiencia marginal de biotina en animales en gestación resulta en una alta incidencia de malformaciones congénitas como labio y paladar hendido, sindactilia, anencefalia y espina bífida, entre otras (41). En estos animales la actividad de carboxilasas esta dentro de los límites normales, por lo que es posible que la activación transcripcional por biotina podría ser importante en la organogénesis durante el desarrollo embrionario. El efecto teratogénico de la deficiencia de biotina podría estar relacionado con la capacidad de la enzima PKG para activar los factores de transcripción *c-Jun* y *c-Fos* (42). Es posible que cuando la cascada HCS-GCs-PKG no es disparada por privación de la vitamina esto resulte en cambios en la expresión de genes que dependen de *c-Jun* y *c-Fos* para ello.

En resumen, en este trabajo hemos propuesto que la biotina actúa regulando los niveles de ARNm de varios genes a través de una cascada de transducción de señales que esta formada por la HCS, la forma soluble de la guanilato ciclasa y la proteína cinasa dependiente de GMPc (GMP cíclico). El papel de la HCS en el control de la expresión de los genes que codifican carboxilasas tiene implicaciones en el tratamiento de la deficiencia múltiple de carboxilasas. Es posible que las manifestaciones clínicas y bioquímicas de estos pacientes reflejan el efecto combinado de una baja afinidad por biotina de la HCS mutante y la consecuente reducción en los niveles de ARNm de HCS y carboxilasas. Un efecto que resultaría en el deterioro de la salud de estos pacientes. De manera similar, nuestros experimentos sugieren que la rápida recuperación de pacientes con DMC ó de sus células en cultivo, representa el efecto simultáneo de compensar la baja afinidad de la HCS por la vitamina, así como, la elevación en la concentración de estas enzimas a través del incremento en los niveles de sus respectivos ARNm. Los resultados obtenidos en cuanto a la represión transcripcional en hígado y cerebro sugieren que la posibilidad de algunas enfermedades de etiología desconocida como la enfermedad de ganglio basal, pudiera estar relacionada a una falla en el sistema de protección del metabolismo cerebral propuesto en este trabajo.

Si este modelo es correcto, la deficiencia de biotina podría tener implicaciones importantes en el estudio de la nutrición y desarrollo humanos. En estudios recientes realizados en Estados Unidos, se ha demostrado que casi el 100% de las mujeres embarazadas desarrollan diversos grados de deficiencia de biotina. La evidencia que presentamos en este trabajo, en cuanto al papel de biotina como un inductor transcripcional y su posible relación con malformaciones congénitas, hacen prioritario el estudio del estatus nutricional de biotina en mujeres embarazadas en nuestro país. **Es necesario comprender a fondo las diferentes funciones de la biotina en el metabolismo humano para poder determinar el verdadero riesgo que representa una dieta pobre en biotina, sobre todo si se toma en cuenta los niveles tan elevados de desnutrición presentes en México.**

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales. Biotina 8-bromoguanosina monofosfato cíclico (8-Br-GMPc), 1-H [1,2,4]oxadazolo-[4,3-a]quinaxolina-1 uno (ODQ) y actinomicina-D fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Rp-8(4-clorotiofenil)-guanosina-3', 5'-monofosforotioato cíclico (Rp-8-pCPT-cGMPS) fue obtenido de Biolog, San Diego, CA. La línea celular humana de hepatoblastoma, HepG2, fue obtenida de la American Type Cell Collection. Fibroblastos humanos normales y fibroblastos de pacientes con DMC (DMC-MK) y DMC-VE) fueron donados por el Dr. R. Gravel de la Universidad de Calgary, Alberta, Canada.

Transcripción reversa-PCR. El ARN total fue aislado a partir de cultivos celulares utilizando el producto Trizol (Gibco-BRL Life Technology, Heidelberg, Alemania). El RNA obtenido fue tratado por 1h a 37°C con 6 U de deoxirribonucleasa libre de ribonucleasa en 100 mM de Tris-HCl, pH 7.5 y 50 mM de MgCl₂ en presencia de 2U/ul de inhibidor de RNAsa de placenta. La concentración de ARN fue determinada por absorbancia a 260 nm, y la integridad de las muestras de ARN fue confirmada por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Enseguida, 5 µg de ARN total fueron transformados a ADN complementario (ADNc) utilizando la enzima transcriptasa reversa Superscript II (Gibco-BRL) y 0.8 µM de oligonucleótidos, específicos para cada uno de los genes utilizados. Una reacción de control sin transcriptasa reversa fue realizada para cada muestra de ARN para verificar que el producto del PCR subsecuente no fuera resultado de contaminación por DNA genómico. Para la amplificación por PCR de ADNc, se utilizaron oligonucleótidos sentido y antisentido para amplificar fragmentos de 200-500pb a partir de RNA. Esto fue

realizado incubando 1 ul del ADNc obtenido, en un volumen de reacción de 30 ul (50 mM MgCl₂ y 10 mM Tris-HCl, pH 9.0) conteniendo 100 pmol de oligonucleótidos sentido y antisentido y 0.3ul de la enzima taq Polimerasa (Perkin Elmer). Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: HCS:5'-CCC GAG CTC CGT CTC CTG GAT CGG-3' y 5'-CCC AAG CCT TTT ACC GCC GTT TGG GGA-3' (Tm=58°C); ACC-1: 5'-GAT GTA CAT CGG CTG AGT GA-3' y 5'-ATC CAT TCA TTA CAT TGA CC-3' (Tm=58°C), ACC-2: 5'-CCT AAA GGT GAC CCG GAG T-3' Y 5'-AAA AAG CCA CTC ATG ACG TT-3' (Tm=60°C), PCCA: 5'-CCC CGA TGC CCG GAG GTG GT-3' y 5'-TAT TTC CAG CTC CAG AGC AG-3' (Tm=60°C), β-actina: 5'-GGG TCA GAA TTC CTA TG-3' y 5' -GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' (Tm=58°C).

Densitometría de fluorescencia: Los productos de PCR obtenidos fueron separados en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. La cantidad de producto de PCR fue determinado por densitometría, utilizando un analizador de imágenes (Fluor-S-imager, BIORAD, Hercules CA.) El procedimiento fue validado en estudios previos con productos amplificados por PCR utilizando diferentes concentraciones de fragmentos de ADNc de HCS, PCCA y β-actina (Dato no mostrado). El número de ciclos utilizados por PCR fue variable para cada uno de los genes. Para asegurar que los experimentos fueran realizados en la fase exponencial de amplificación, el número de ciclos utilizados fueron graficados contra la intensidad de fluorescencia de la banda obtenida. Para cada experimento, se utilizó ARNm del gen constitutivo de β-actina, como referencia de transcrito celular. Este fue presente a niveles equivalentes en todas las muestras de ARN (Figs. 1 y 2).

Efecto de la deficiencia de biotina en niveles de ARNm. La línea celular HepG2 humana fue mantenida a 37°C en presencia de 5% de CO₂ en 5 ml. de medio alpha-MEM, el cual contiene altos niveles de glucosa (GIBCO/BRL) suplementado con SFB 10% inactivado por calor, además de la presencia de 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 ug/ml de estreptomicina. Para los experimentos realizados en deficiencia de biotina, las células fueron mantenidas en medio MEM libre de biotina, suplementado con SFB 10% dializado (Gibco/BRL) con el fin de reducir al máximo los niveles de biotina. Las células HepG2 fueron cultivadas en este medio aproximadamente por 20 días. El RNA total fue extraído a diferentes tiempos y los niveles de ARNm para HCS, ACC-1, ACC-2, PCCA y β-actina fueron determinados por densitometría de fluorescencia como se describió anteriormente. Después de 15 días mantenidas en medio libre de biotina, los cultivos celulares alcanzaron un 70-80% de confluencia y un análisis por microscopía mostró morfología normal en las células.

Efecto de biotina y GMPc sobre los niveles de ARNm en células mantenidas en deficiencia de biotina. Células HepG2 mantenidas en medio libre de biotina por 15 días, fueron estimuladas con 1 μM de biotina ó 1mM de 8-Br-GMPc, un análogo no hidrolizable de GMPc. Las células fueron cosechadas después de 2, 6, 12 y 24h y los niveles de ARNm de los diferentes genes fue analizado como se mencionó anteriormente. Para determinar la participación de la forma soluble de la guanilato ciclasa (GCs) en los niveles de ARNm, las células deficientes de biotina fueron tratadas por 3 h con 50 μM de ODQ, un inhibidor específico de la GCs. Después de este tiempo, 1 μM de biotina fue añadido al medio por 24 h y el efecto sobre los niveles de ARNm fueron comparados con células deficientes de biotina estimuladas con biotina en ausencia de ODQ y células mantenidas en medio normal (células control).

Estímulo de biotina sobre los niveles de ARNm después de la inhibición de la ARN polimerasa II. Las células HepG2 deficientes de biotina fueron tratadas con 10 μM de actinomicina-D por 1 h (30). Después de este tiempo, se añadió biotina al medio a una concentración final de 1 μM y el RNA total fue aislado 24 h después. Los niveles de ARNm fueron comparados con los datos obtenidos de células tratadas con actinomicina-D en ausencia de biotina y células no tratadas con el inhibidor de la RNA polimerasa II.

Efecto de la inhibición de la proteína cinasa dependiente de GMPc. Células HepG2 fueron mantenidas en medio libre de biotina por 15 días, estas fueron tratadas con 10 μM de Rp-8-pCPT-cGMPS, un inhibidor específico de la proteína cinasa dependiente de GMPc (29) por 1 hora. Después de este periodo, 1μM de biotina (concentración final) fue añadido al medio y su crecimiento continuó por un total de 24h. El ARN total fue aislado y los niveles de ARNm fue determinado como se describió anteriormente.

Efecto de biotina y GMPc sobre los niveles de ARNm de HCS en cultivos de fibroblastos. Fibroblastos normales y fibroblastos de pacientes con DMC fueron incubados en medio deficiente de biotina por 15 días. Las células fueron tratadas con 0, 0.01, 0.1 ó 1.0 μ M de biotina por 24 hr. El ARN total fue aislado y el nivel de ARNm de la HCS fue determinado por densitometría de fluorescencia a partir de los productos de rtPCR. Experimentos similares fueron realizados en estas líneas celulares utilizando 0.01, 0.1 ó 1.0 mM 8-Br-GMPc.

Efecto de la biotina sobre la expresión del transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT). Para que la biotina pueda actuar como cofactor de carboxilasas o como inductor transcripcional debe primero ser transportada al interior de las células. En organismos eucariontes el transportador multivitamínico dependiente de sodio es el encargado de transportar biotina, ácido lipóico y pantotenato. Para estudiar si la biotina puede regular la expresión de su propio transportador medimos la cantidad de RNAm del SMVT en células normales y deficientes de biotina mediante rtPCR como se describió anteriormente.

Modelo animal de deficiencia de biotina.

Para estudiar el efecto de la deficiencia de biotina en diferentes órganos se alimentó a ratas Whistar adultas con una dieta libre de biotina (Harlan U.S.A). Para determinar el grado de deficiencia de biotina se midió la actividad de piruvato carboxilasa en el plasma cada tercer día. Cuando la actividad de esta enzima mostró valores de entre 1% y 5% de los valores normales los animales fueron sacrificados y los órganos fueron colectados y congelados en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. El RNA de los tejidos fue aislado mediante homogenización con trizol de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante.

Clonación y caracterización funcional de los promotores de ACC-1 y SMVT.

Utilizando como referencia la secuencia publicada de ACC-1 y SMVT realizamos una búsqueda en los bancos de datos del genoma humano para localizar la región genómica que contiene el sitio de inicio de la transcripción de estos genes. Fragmentos de 1.0, 3.0 y 5.0 kb de longitud por arriba del sitio de inicio de la transcripción fueron amplificados mediante PCR utilizando DNA genómico como templado de los genes de ACC-1 y SMVT. Los fragmentos fueron clonados en el plásmido pG13 (Promega) que contiene el gen reportero luciferasa. Los vectores fueron transfectados en células HepG2 y la actividad promotora fue determinada, después de estimular con biotina a estas células, en base a la actividad de luciferasa en extractos celulares.

Análisis estadístico. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y por lo menos en tres diferentes ocasiones, utilizando diferentes muestras de ARN para los ensayos de rtPCR. Los resultados obtenidos de ARNm de células en deficiencia de biotina fueron normalizados con ARNm de β -actina y expresados como porcentaje de niveles de ARNm observados en células mantenidas en medio deficiente de biotina. Los datos son presentados como el promedio de tres experimentos diferentes \pm E. S.

REFERENCIAS

1. Wood HG, Barden RE. (1977) *Annu Rev Biochem* 46, 385-413.
2. Eisenberg MA, Prakash O, Hsiung SC. (1982) *J Biol Chem* 257, 15167-15173.
3. Cronan J Jr. (1989) *Cell* 58, 427-429.
4. Sundaram TK, Cazzulo JJ, Kornberg HL (1971) *Arch Biochem Biophys* 143, 609-616
5. Cazzulo JJ, Sundaram TK, Dilks SN, Kornberg HL. (1971) *Biochem J* 122, 653-661.
6. Chapman-Smith, A., and Cronan J. E. (1999) *TIBS* 24.
7. Leon-Del-Río A, Gravel RA. (1994) *J Biol Chem* 269, 22964-22968.
8. Cronan J Jr. (1990) *J Biol Chem* 265, 10327-10333
9. León-Del Río, A., Leclerc, D., Akerman, B., Wakamatsu, N., and Gravel, R. A. (1995) *Proc Natl Acad Sci* 92, 4626-4630.
10. Suzuki Y, Aoki Y, Chiba Y, Iwamatsu A, Kishino T, Niikawa N, Matsubara Y, Narisawa K (1994) *Nat Genet* 8, 122-128.

11. Wolf B. (2001) In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill Professional, 3935-3962.
12. Bartlett K, Ghneim HK, Stirk JH, Wastell HJ, Sherratt HS, Leonard JV (1985) *Ann N Y Acad Sci* 447, 235-251.
13. Sherwood WG, Saunders M, Robinson BH, Brewster T, Gravel RA. (1982) *J Pediatr* 101, 546-550.
14. Sweetman L, Nyhan WL, Sakati NA, Ohlsson A, Mange MS, Boychuk RB, Kaye R. (1982) *J Inherit Metab Dis* 5, 49-53
15. Burri BJ, Sweetman L, Nyhan WL. (1985) *Am J Hum Genet* 37, 326-337.
16. Dupuis, L., Campeau, E., Leclerc, D., and Gravel, R. A. (1999) *Molr Genet Metab* 66, 80-90.
17. Sakamoto O, Suzuki Y, Li X, Aoki Y, Hiratsuka M, Sourmala T, Baumgartner ER, Gibson KM, Narisawa K. (1999) *Pediatr Res* 46, 671-676.
18. Morita, J., Thuy L.P., and Sweetman L. (1998) *Mol Genet Metab* 64, 250-255.
19. Barker DF, Campbell AM (1981) *J Mol Biol* 146, 469-492
20. Buoncristiani MR, Howard PK, Otsuka AJ. (1986) *Gene* 44, 255-261.
21. Borboni P, Magnaterra R, Rabini RA, Staffolani R, Porzio O, Sesti G, Fusco A, Mazzanti L, Lauro R, Marlier LN. (1996) *Acta Diabetol* 33, 154-158
22. Chauhan, J. , Dakshinamurti, K. (1991) *J Biol Chem* 266, 10035-10038.
23. Spence, J. T. and Koudelka, A. P. (1984) *J Biol Chem* 259, 6393-9386.
24. Deodhar AD, Mistry SP. (1970) *Life Sci* 9, 581-588
25. Dakshinamurti K, Tarrago-Litvak L, Hong HC. (1970) *Can J Biochem* 48, 493-500.
26. Collins JC, P., E., Green, R., Morell, A. G., and Stockert, R. J. (1988) *J Biol Chem* 263, 11280-11283.
27. Rodriguez-Melendez R, Cano S, Mendez ST, Velazquez A. (2001) *J Nutr* 131, 1909-1913.
28. Bartlett K, Gompertz D. (1976) *Lancet* 2, 804.
29. De La Vega, L. A., and Stockert J.R. (2000) *Am J Physiol Cell Ph.* 279, C2037-2042.
30. Pisarev MA, de Pisarev DL. (1977) *Acta Endocrinol* (Copenh) 84, 297-302.
31. Dupuis L, Leon-Del-Rio A, Leclerc D, Campeau E, Sweetman L, Saudubray JM, Herman G, Gibson KM, Gravel RA. (1996) *Hum Mol Genet* 5,1011-6
32. Yang X, Aoki Y, Li X, Sakamoto O, Hiratsuka M, Gibson KM, Kure S, Narisawa K, Matsubara Y, Suzuki Y. (2000) *J Hum Genet* 45,358-62
33. Wolf B, Hsia YE, Sweetman L, Gravel R, Harris DJ, Nyhan WL.(1981) *J Pediatr* 99.835-46
34. Cherbonnel-Lasserre CL, Linares-Cruz G, Rigaut JP, Sabatier L, Dutrillaux B. (1997) *Int J Cancer* 72, 768-775.
35. Ha J, Lee JK, Kim KS, Witters LA, Kim KH. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11466-11470.
36. Abu-Elheiga L, Almarza-Ortega DB, Baldini A, Wakil SJ. (1997) *J Biol Chem* 272, 10669-10677.
37. Lee YC, Martin E, Murad F (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10763-10768
38. Campeau, E.Gravel, R A. (2001) *J Biol Chem* 276, 12310-12316
39. Ozand PT, Gascon GG, Al Essa M, Joshi S, Al Jishi E, Bakheet S, Al Watban J, Al-Kawi MZ, Dabbagh O. (1998). *Brain*. Jul;121 (Pt 7):1267-79.
40. Mock DM., Quirk, JG, Mock N.I., (2002) *Am J Clin Nutr.* 2002 Feb;75(2):295-9
41. Zempleni J.,Mock,DM.(2000) *Proc Soc Exp Biol Med.*;223(1):14-21
42. Gudi T, Huvar I, Meinecke M, Lohmann SM, Boss G, Pilz B. (1996). *J. Biol Chem* 271 (9):4597-4600.

Semblanza del Dr. Alfonso León del Río.



Es egresado de la Maestría en investigación Biomédica Básica de la Universidad Nacional Autónoma de México (1990). El Dr. León obtuvo su doctorado en Biología y Genética Humana por la Universidad de McGill en Montreal, Canadá (1995) y realizó una estancia postdoctoral en el Howard Hughes Medical Institute de la Universidad de California en San Diego.(1995-1998). Ha recibido numerosos premios:Premios y distinciones: Prix de Excellence de la Provincia de Quebec, Premio Doctoral de la American Society of Human Genetics, Donativo de la Fundación Mexicana para la Salud para jóvenes Investigadores. Donativo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para jóvenes investigadores.