

**Mejoramiento de la biodisponibilidad de selenio y sus derivados
mediante aplicación *in silico* de métodos biotecnológicos**

Autor: Moisés David Moreno Díaz

**Pregrado de Biología, Departamento de Ciencias Biológicas
Escuela de Ciencias**

Asesor: Diego Fernando Villanueva Mejía, Ph.D.

Investigador Senior, Profesor Titular

Departamento Ciencias Biológicas, Escuela de Ciencias

Universidad EAFIT

Medellín, 2020

*“Only the good die young”; a tu sonrisa que perdura en mi mente, y tu espíritu, que siempre vivirá en mí, con gran cariño dedico esto, Cristian Alejandro Borda Tobón,
hermano mío ...*

“En un camino polvoriento aprendí a ver, quise saber a quién amar, a quién creer, puedo decir que me negué a participar para no arrepentirme de nada preferí no probar. Aún tengo dudas de si mi intuición falló o sólo fue el miedo el que me frenó. Nunca lo sabré, pero lo que sí sé, porque lo comprobé es que un hombre con fe no tiene límite [...]

Amigos que se fueron me visitan a diario, estéis donde estéis; me acuerdo de vosotros antes de salir en el backstage. Para todos los que estáis, ya sabéis que lo que dáis será lo que recibiréis, que se prepare el mundo porque voy a intervenir tengo un mensaje para los que se quieran venir: no son problemas, son oportunidades de mejorar y superar adversidades. Tú tienes gran poder, sólo quiérete, puedes lograr cualquier cosa esforzándote.

Todo es mental, todo es como lo percibes, tú puedes cambiar la percepción de lo que vives, la belleza está en los ojos del que mira, todo es del color de la luz que recibe. Cuántas pruebas de amor a diario y qué triste ver que pocas superamos. Te traigo un lema que te puede servir como a mí. Repítelo a diario, dice así:

Cuanto más amor das, mejor estás

Cuanto más amor das, mejor estás – Kase.O, Outro–

Agradezco la culminación de este ciclo a mi madre, por siempre haber creído más en mis virtudes que fijado en mis defectos y por confiar sin condición en el potencial de mis aciertos en lugar de condenarme por la gran magnitud de mis fracasos.

A mi padre, por no dejarse llevar ni definir por los tormentos y los desaciertos del pasado y por enseñarme, como pudo, a respetar al prójimo y a ser el hombre que ahora soy, a mi mentor Diego por su amor de maestro y por, pese a entender mis profundas carencias, impulsarme en mi vida como persona y como científico, a Paola Andrea Cano Saldarriaga por ser mi efigie de humanidad y ayudarme con paciencia a evitar mi autodestrucción, y a la universidad EAFIT por permitirme estar hoy donde estoy y bendecirme con una miríada de recuerdos, momentos y personas que siempre estarán en mí.

Tabla de contenido

Portada

Dedicatoria y agradecimientos

1. Resumen	3
2. Introducción y justificación.....	4
3. Objetivos.....	5
4. Planteamiento del problema.....	6
5. Alcance del proyecto	7
6. Marco teórico	8
6.1. Síntesis de selenoproteínas	8
6.2. <i>Escherichia coli</i> como modelo biotecnológico.....	9
7. Hipótesis	11
8. Metodología	11
8.1. Identificación de secuencias de interés.....	11
8.2. SelC	12
8.3. SelB.....	12
8.4. Construcción del plásmido	13
9. Resultados	15
9.1. Ubicación tentativa de las nuevas copias de SelC.....	15
9.2. Ubicación tentativa de la nueva copia de SelB.....	16
9.3. Construcción del plásmido	16
10. Discusión.....	17
10.1. Mecanismo del vector.....	17
10.2. ¿Por qué solo SelC y SelB?	17
10.3. Diferencias con productos similares	18
10.4. Otras consideraciones	19
11. Referencias.....	20

1. Resumen:

El selenio (Se) es un elemento esencial para el desarrollo de los mamíferos y de alto valor para el diseño de proteínas, compone más de dos decenas de selenoproteínas con funciones relativas a la defensa ante estrés oxidativo, el funcionamiento del sistema muscular, el desarrollo embrionario y el metabolismo de la hormona tiroides, entre otras. Por tal, su deficiencia conlleva una serie de malestares que pueden llegar a ser desde leves grietas en las uñas hasta la muerte, en consecuencia, el presente texto propone un modelo desarrollado mediante instrumentos biotecnológicos *in silico* y tomando en consideración la fisiología, la metabolómica y la genómica del elemento (con especial énfasis en su *toxicosis*), que permite mejorar la producción de selenio *biodisponible* con miras a la industria de alimentos suplementarios, con la finalidad de generar un producto computacional con viabilidad de aplicación *in vitro* e *in vivo*.

2. Introducción y justificación:

El selenio es un elemento traza, pese a su concepción tradicional e histórica como “veneno” dada su toxicidad, resulta esencial para la salud y el rendimiento de los mamíferos en cuanto a que conforma más de dos docenas de selenoproteínas vitales para funciones anti-oxidativas, anti-inflamatorias, reproductivas, hormonales (tiroides), entre otras (Sunde, 2012; (Duntas & Benvenga, 2015), estas proteínas se encuentran en todos los dominios de la vida, más no en todos los organismos (Cheng & Arnér, 2018) .

Su abundancia relativa en la corteza terrestre es muy baja (0,05-0,10 mg/kg), lo que sumado a la baja biodisponibilidad de la mayoría de especies químicas del elemento lo convierten en un insumo costoso para producir industrialmente mediante métodos químicos convencionales (Lopes, Ávila & Guimarães, 2017; Oraby, Allababidy & Ramadan, 2015 ; Pedrosa., *et al*, 2012).

Adicionalmente, la fisiología que implica al selenio está delimitada por umbrales toxicológicos ya establecidos y reportados en la literatura, esto implica que la excreción del elemento se ve retroalimentada positivamente por su consumo, a modo de protección frente a la toxicidad

del elemento, *i.e.* del 19-46% del selenio consumido cada 24 h es transportado y excretado (Fairweather-Trait, Collings & Hurst, 2010; Suzuki, 2005; Bügel, *et al*, 2008), lo que supone la necesidad de producir constantemente suplementos alimenticios ricos en selenio para suplir la demanda nutricional animal y humana, *e.g.* la levadura selenada (selenium yeast).

Más aún, la especie bioactiva del selenio: la selenocisteína (Sec), cuenta con características de altísimo interés para la industria y el desarrollo de la ingeniería genética, *i.e.* Sec es el aminoácido proteínogénico menos abundante en eucariotas y bacterias no-metanogénicas, aun así, su presencia brinda a las moléculas que conforma propiedades catalíticas únicas: hay evidencia de que la sustitución de Cys por Sec mejora la velocidad cinética de varias enzimas en hasta dos órdenes de magnitud (Fu, Söll & Sevostyanova, 2018), las posibilidades que abre la comprensión transversal de este 21avo aminoácido y el mecanismo de las selenoproteínas es invaluable para la ampliación del conocimiento concerniente a la transcriptómica, la cinética enzimática y, posiblemente, muchas otras áreas del conocimiento biológico.

Por esto, el selenio es un elemento de interés para la industria pecuaria (Mehdi & Dufrasne, 2016; Givens., *et al*, 2004) y se justifica cualquier acercamiento teórico-experimental que tenga como propósito ampliar, en general, el estado del arte del elemento y las nociones de los mecanismos metabolómicos, transcriptómicos y genómicos asociados al mismo, ya que aún tenemos mucho por aprender acerca de este elemento y su rol en la vida (Castellano, 2019).

3. Objetivos:

General: Proponer un modelo biotecnológico molecular que permita, teóricamente, mejorar la producción de selenio orgánico biodisponible en la bacteria *Escherichia coli* como organismo modelo.

Específicos:

- Mediante exploración de fuentes bibliográficas, referenciales y multimedia, determinar los componentes principales y que median el sistema de producción de selenocisteína (selenoproteínas).

- Determinar el gen y/o las secuencias protagónicas en la síntesis de selenoproteínas (principales mediadores del metabolismo del selenio).
- Con la información obtenida, diseñar una construcción genética que contenga las secuencias implicadas en el proceso de síntesis de selenoproteínas, así como las secuencias reguladoras idóneas.

4. Planteamiento del problema

Podría considerarse en primera instancia que los valores de biodisponibilidad del selenio y sus derivados son bajos en cada posible caso no obstante, con excepción del selenato y la selenita (que pese a ser bien absorbidos no son bien retenidos), esto solamente aplicaría a sus presentaciones inorgánicas, dado que los valores de absorción y retención de los compuestos selenados orgánicos como la selenometionina y la selenocisteína (Sec) rondan el 65% -o más- según varias publicaciones (Givens., *et al*, 2004; Sunde, 2012; MacFarquhar., *et al*, 2010).

También se conoce que el rango entre la deficiencia y la toxicosis del selenio es uno de los más “estrechos” en comparación con otros nutrientes; *i.e.* $\pm <40\mu\text{g}/\text{día}$ y $>400\mu\text{g}/\text{día}$ para humanos y $\pm <100\mu\text{g}/(\text{kgMS}).\text{día}$ y $>300\mu\text{g}/(\text{kgMS}).\text{día}$ (siendo MS materia seca) para ganado, dependiendo de características antropométricas (edad, peso, altura, *etc*) y si se trata de ganado de faena o ganado lechero, respectivamente (dos Reis, *et al*, 2017; Sunde, 2012; Mehdi & Dufrasne, 2016).

Las repercusiones de estas patologías van desde: alopecia, ruptura de uñas (o pezuñas), pérdida de peso, distrofia muscular nutricional, retención de la placenta y producción sub-óptima de leche, hasta la muerte, entre otras (Mehdi & Dufrasne, 2016; Jovanović, *et al*, 2013; Sunde, 2012; Givens, *et al*, 2004; Fairweather-Trait, Collings & Hurst, 2011) y como añadido, limitan la producción de selenoproteínas en relación a la variable cantidad.

Por esto, es posible concretar que la mayor parte del selenio que se “desperdicia”, gracias a las condiciones fisiológicas que lo regulan, está comprendido entre sus versiones inorgánicas relacionadas a las deposiciones fecales y los selenosacáridos producto de las excreciones urinarias. Así, se concibe que la manera más concreta de abordar el problema en concreto, es a partir de la generación de un método o herramienta biotecnológica que permita reincorporar las presentaciones menos biodisponibles del selenio a sus formas más aprovechables (por lo

menos en la industria pecuaria y alimenticia) (*i.e.* mejorar la *eficacia de inserción de selenocisteína*, reciclar el selenio), sin afectar la homeostasis y/o la supervivencia del biorreactor a emplear o eligiendo uno que tenga cierto grado de resistencia ante la toxicosis del selenio.

5. Alcance del proyecto

Se presenta un modelo biotecnológico *in silico* viable (plásmido) que permite mejorar la eficacia de inserción de selenocisteína, *i.e.* mejora la velocidad de producción de selenio biodisponible, para ser aplicado en un futuro cercano y que siguiendo el lineamiento de los objetivos del desarrollo sostenible, y en el caso de que sea aplicado con éxito; a nivel académico se expandiría el marco de estudio de las nutrigenómicas, la biodisponibilidad y la biotecnología del selenio, de manera tal que el producto aquí presentado y la proyección futura de este proyecto tenga una incidencia y brinde un aporte al cumplimiento de las metas trazadas, específicamente: la producción y el consumo responsable, la formación de comunidades sostenibles, crecimiento económico, innovación para la construcción de una industria sustentable y la gestión responsable de los ecosistemas y la vida terrestre.

En cuanto a un apartado tecnológico y ambiental, la propuesta planteada ofrece la promesa de eventualmente desarrollar nuevas herramientas para un ejercicio más responsable, controlado y optimizado de la ganadería, esto desemboca específicamente en una disminución en el uso de enriquecedores de selenio y en la posibilidad de aprovechar el máximo virtual posible del selenio que otrora se perdía o desperdiciaba.

Por otro lado, si el sistema llega a ser aplicado *in vivo* de forma exitosa, el proyecto podría ser una de las vanguardias en cuanto a la lucha contra la estigmatización científica y los falsos estereotipos referentes a los organismos modificados genéticamente, ayudando de esta manera al proceso de permeabilización de la ciencia hacia la sociedad, y al desarrollo de una nación más dispuesta, entendida y afín a las prácticas relativas al método científico en ámbitos más allá del académico.

Adicionalmente, se proyecta que este texto quede legado en la biblioteca

de la universidad EAFIT en el cual se expongan los avances que se logren durante la realización del proyecto, de forma tal que pueda ser empleado como referencia en el momento de desarrollar aún más fases del proyecto mismo o para establecer un marco referencial que permita desarrollar nuevas propuestas relativas al tópico de investigación (inspirar a otros estudiantes o clarificar la metodología y el desarrollo procedimental de un proyecto de tesis).

En este mismo sentido, esta tesis podrá conformar las bases para futuras aplicaciones de la teoría referente a los mecanismos genéticos, fisiológicos y metabólicos del selenio, así como su aplicación y, por último, se concluirá el proceso profesional de un estudiante de biología de la universidad EAFIT, con la capacidad de inspirar, crear y transformar.

6. Marco teórico

6.1 Síntesis de selenoproteínas

La regulación transcripcional de la expresión génica relacionada al selenio ha sido profundamente estudiada desde 1930 (Sunde, 2012). La información provista por las referencias consultadas indica que el contenido de selenio en el cuerpo controla los niveles de expresión de numerosos genes relacionados (o no) a las selenoproteínas, (Lammi & Qu, 2018; Sunde, 2012).

Concretamente, lo que hace posible la síntesis de selenoproteínas es la actividad en conjunto de lo que se conoce como elemento SECIS (secuencias de inserción de selenocisteína), ubicadas en las UTR 3' de los mRNA en eucariotas y contiguos a codones de parada UGA asociados a selenoproteínas en procariotas, son estos elementos quienes modifican la codificación del mencionado codón (el cual pasa a codificar para inserción de selenocisteína a la proteína en proceso de síntesis) (Lammi & Qu, 2018; Sunde, 2012).

Y un tRNA^{[Ser]Sec}, expresado en *E.coli* por el gen SelC, quien media la ruta metabólica en la cual se convierte un residuo de serina (Ser) en cisteína (Cys), para después modificarla en selenocisteína (Sec) a través del intercambio del grupo hidroxilo por un Se⁰, mediado por una molécula de selenofosfato,

originaria de la reducción de seleniuro en eucariotas y selenato/selenita en procariotas. Por último, el residuo es insertado cotraduccionalmente a la proteína en construcción mediante el factor de elongación específico de selenocisteína SelB quien reconoce y moviliza el tRNA^{[Ser]Sec} hacia su destino, adicionalmente, existen enzimas que actúan de una manera menos directa (es decir, afectan (Lammi & Qu, 2018; Sunde, 2012; Gursinsky, *et al*, 2008) [ver figuras 1, 2 y 3].

Adicionalmente, hay evidencia de que la sobre-expresión y la coexpresión de dos genes de interés para este proyecto (SelC y SelB) mejoran la síntesis de variadas selenoproteínas en distintos microorganismos (la producción de estas está limitada por la compatibilidad inter-especie, es decir, *E. coli* no puede producir selenoproteínas mamíferas de modo natural, aunque esta barrera ya ha sido superada con ingeniería genética [Haruna, *et al*, 2014]) (Fu, Söll & Sevostyanova, 2018; Gursinsky, *et al*, 2008).

En el caso de bacterias, específicamente *E.coli*, se tiene que solo hay reducción de selenita (SeO_3^{2-}) y selenato (SeO_4^{2-}) hasta selenio elemental Se^0 , el cual es funcionalmente homólogo al seleniuro (Se^{2-}) en eucariotas (Turner, Weiner & Taylor, 1998).

6.2 *Escherichia coli* como modelo biotecnológico

Escherichia coli es un activo de gran valor como herramienta biotecnológica: si bien, anteriormente se aclararon los umbrales toxicológicos del selenio en humanos y ganado, el modelo seleccionado presenta características de gran interés en cuanto a este apartado, ya que las colonias de esta especie pueden crecer en presencia de hasta $>32000\mu\text{g/ml}$ selenato y $<1600\mu\text{g/ml}$ selenita, también poseen naturalmente el genoma y metaboloma necesario para la inserción de selenio a proteínas (Turner, Weiner & Taylor, 1998; Gursinsky, *et al*, 2008), lo cual nulifica la necesidad de empleo de *transgenes* (si bien esto no es relevante a nivel científico, lo es a nivel sociocultural).

En este orden de ideas, *E. coli* también es uno de los modelos más empleados como biorreactor, dada su idiosincrática sencillez y maleabilidad a nivel genoma y su accesibilidad, sobre todo para la realización de transformaciones y clonaciones, siendo una de las aplicaciones más importantes la producción de proteínas heterólogas en distintas cepas de la especie, *e.g.* la producción de insulina humana (Baeshen, *et al*, 2014), además, hoy día existen cepas de *E.coli*

especializadas en mejorar la eficiencia de transformación y clonación (como la cepa DH5 α) (Kostylev, *et al*, 2015).

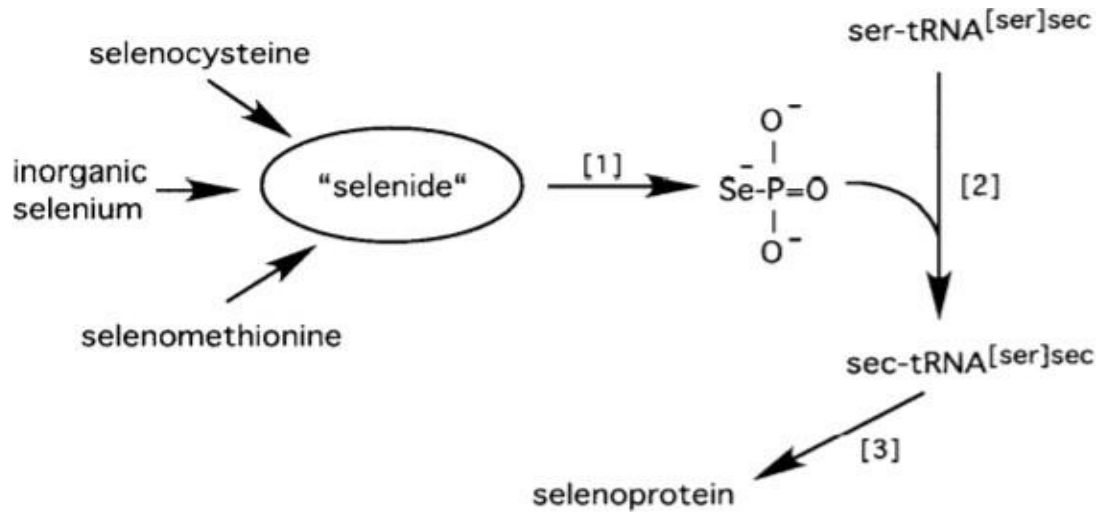


Figura 1. diagrama general de la ruta metabólica de biosíntesis de selenoproteínas (Burk, Hill & Motley, 2003), nótese que se obvian las enzimas específicas del catabolismo del selenio, ya que estas son un conjunto extenso de moléculas que se dedican a transformar las distintas especies del elemento a seleniuro en eucariotas, o selenio elemental a partir de selenato y selenita en procariotas, las cuales son las únicas especies activas directamente en el proceso de síntesis de selenofosfato

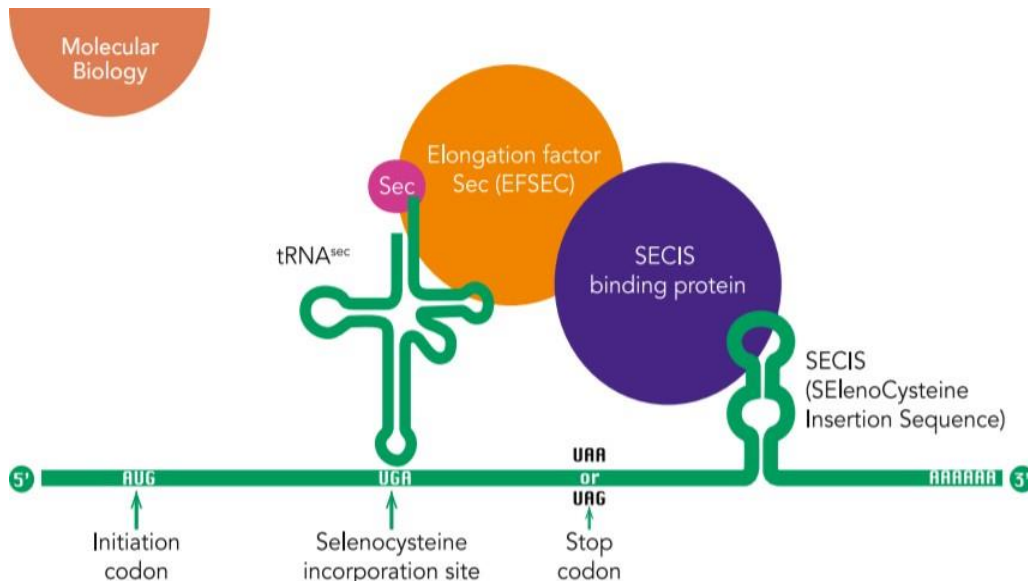


Figura 2. Esquema general del mecanismo genómico de la síntesis de selenoproteínas en eucariotas, es de especial interés el comportamiento del codón de parada UGA, que gracias a la influencia del elemento SECIS, codifica para la inserción de selenio a quien usualmente sería un residuo de cisteína o de metionina, (tomado de Schweizer, 2017).

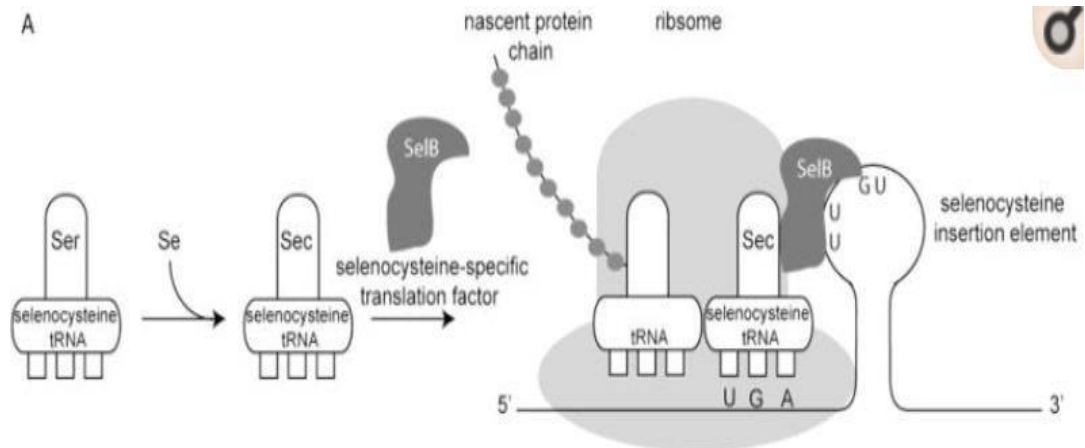


Figura 3. Esquema general del mecanismo transcripcional de la síntesis de selenoproteínas en procariontas, nótese que en este caso los elementos SECIS se encuentran contiguos o cerca del codón de inserción de selenocisteína UGA, según Cheng y Arnér del 2018, la distancia crítica entre el codón UGA y el elemento SECIS es de 11 nt (tomado de Schaefer-Ramadan, Thorpe & Rozovsky, 2014)

7. Hipótesis

Se definió entonces, que el elemento de más interés para el desarrollo de los objetivos trazados es el RNA de transferencia de serina-selenocisteína ($tRNA^{(Ser)[Sec]}$), se plantea que un aumento en el número de copias del gen que lo expresa (SelC) optimizará la capacidad en cuanto a retención y velocidad de síntesis de selenio biodisponible (selenoproteínas, Sec), sin afectar la supervivencia de los organismos dadas las cualidades tóxicas del selenio previamente descritas. Asimismo, para asegurar el correcto desempeño de estas modificaciones y obtener el resultado esperado en alguna medida, se añadirá también una copia del factor de elongación específico de selenocisteína (SelB), concorde a la evidencia presentada por el respaldo bibliográfico que sugiere los resultados deseados cuando se aumenta la co-expresión de ambos genes tratados. No obstante, se plantea que sobre-expresar el número de copias de SelC es suficiente para obtener una mejora en la producción de selenoproteínas.

8. Metodología

8.1. Identificación de secuencias de interés

En un primer lugar, se partió explorando *reviews* relativos a la regulación transcripcional del selenio, de este modo fue posible encontrar el gen llamado “TRSP” (TRU-TCA1-1) (Lammi & Qu, 2018; Downey, *et al*, 2009; Carlson, *et al*, 2004), se halló que este gen regula la síntesis del tRNA-Sec en mamíferos, elemento que se encarga de albergar y mantener la mayoría de la maquinaria genómica relativa a la transcripción de selenoproteínas en altos eucariotas, dado esto, se tomó dicho gen como referencia para buscar por homología en distintas bases de datos como: *HomoloGene*, *Genecards*, *GenBank*, *etc*, logrando definir de esta manera con acierto al gen SelC como elemento sintetizador de tRNA^{(Ser)[Sec]} en procariotas. Ya identificado SelC, fue posible realizar un ejercicio similar, pero con un enfoque más delimitado, para definir la función y la pertinencia de aplicación, en este proyecto de otras secuencias involucradas en la genómica y la metabolómica del selenio, como son SelA, SelB (ver resultados y discusión).

8.2. SelC

Se delimitó la secuencia del gen SelC para *E.coli* mediante consulta de literatura, respaldada por aplicación del servicio BLASTn (megablast) a la secuencia origen, se identificó (Baron, Heiden & Böck, 1990; Manzine, *et al*, 2013; Zhang, *et al*, 2000): 5’GGAAGATCGTCGTCCTCCGGTGAGGCGGCTGGACTTCAAATC CAGTTGGGGCCGCCAGCGGTCCCGGGCAGGTTCGACTCCTGT GATCTTCCGCCA-3’, la cual coincide con lo registrado en la base de datos de genes del NCBI, por lo menos para la cepa *K-12 substr. MG1655* (Gene ID: 948167). La búsqueda en BLAST presentó como resultados un conjunto de secuencias de alta similitud pertenecientes a diversas cepas de la especie en cuestión, no obstante, la ubicación de estas secuencias presentó considerable variabilidad, por lo cual se decide que la región tentativa de inserción de la secuencia plasmídica, pese a que no es muy relevante dada la corta longitud de SelC (95 nt), será contigua, *downstream* al gen SelC de la cepa a seleccionar, empleando las enzimas de restricción FD0224 y FD0044.

8.3. SelB

La secuencia del gen SelB se demarcó únicamente mediante herramientas del NCBI (Gene ID: 948103), ya que la secuencia mide 1845 nt esta no será escrita. También se respaldó la decisión de dónde ubicar esta nueva copia del gen mediante BLASTn, encontrándose que SelB presenta mucha menor variabilidad en su posición respecto a distintas cepas (si es que no es nula), por lo que su posición debe tener más relevancia en contraste con SelC, como añadidura, la copia de SelB naturalmente presente en la cepa *K-12 substr. MG1655* se superpone, por su extremo 5-' y en cuatro bases, hacia el extremo 3-' de otro gen involucrado en la genómica del selenio, SelA, por todo esto se decide que la región tentativa de inserción de la secuencia plasmídica será contigua, *downstream* al gen SelB naturalmente presente en la cepa a seleccionar y se recomienda que, idealmente, se debería generar esta modificación mediada por un sistema Crispr/Cas adaptado para darle especificidad a la edición (*i.e.* entre SelB y yiaY), con el fin de evitar posibles alteraciones en la expresión de SelA, debido a las circunstancias actuales esto resulta imposible, por tal, se usarán únicamente las enzimas de restricción FD0374 y FD0753.

Todas las enzimas de restricción fueron seleccionadas mediante la herramienta FDEST de ThermoFisher Scientific (ver anexo).

8.4. Construcción del plásmido

El plásmido fue construido mediante el software de libre acceso GenSmart Design de *GenScript Biotech*, para esto, se tomó el sistema pET como molde/*backbone* y se modificó a conveniencia. Se consideraron como cimiento y punto de inicio los elementos que deben considerarse prioritarios en un vector de expresión: regiones de origen de replicación que brinden heredabilidad a las modificaciones efectuadas y sean compatibles con la maquinaria de transcripción del organismo modelo, marcadores de selección que permitan medir la eficacia de las transformaciones y sean compatibles con el ensamble plasmídico, enzimas de restricción de acuerdo a los lugares tentativos de inserción de material genético; una antes y una después de cada gen u operón de interés, regiones reguladoras (sistema promotor-terminador) que permitan la correcta expresión de las secuencias de interés, incluyendo

las de los marcadores de selección y, obviamente, las secuencias o genes a insertar.

Usualmente también se usan potenciadores para mejorar aún más la síntesis de las secuencias de interés en el caso de vectores de expresión, y reducidas secuencias denominadas “*tags*” o “*signals*” que facilitan la identificación de la expresión en proteínas añadidas o recombinantes de interés. Estos últimos no serán considerados en este diseño, ya que, como se verá en el último apartado, hay un cierto interés por mantener la expresión de la nueva copia del SelB al mínimo, a forma de añadidura, nuestro interés no radica en la purificación de proteínas, además de que el diseño de la construcción cuenta con regiones reguladoras T7 (promotor y terminador flanqueando las copias de SelB) en conjunto también con los promotores, terminadores y represores endógenos de las secuencias de interés (incluyendo las de los marcadores de selección), que, en consideración de que la evidencia experimental alude a contraproducción en cuanto a producción de selenoproteínas cuando aumenta demasiado la expresión de SelC (Cheng & Arnér, 2017; Cheng & Arnér, 2018; Gursinsky, et al, 2008), teóricamente unas cuantas copias del gen no deberían producir el efecto adverso al deseado (ya que para provocar esto, sobre-expresión de SelC debe ser, en términos de los autores, exagerada).

En este diseño se usó la secuencia ori: 5'-
TTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACA
AAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAA
GAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGA
GCGCAGATAACCAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTA
GGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTC
GCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGAT
AAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCG
GATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCAC
ACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGAT
ACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG
GGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGA
ACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG
GTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAG
CGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGG
AAA-3', ya que es predominante en *Enterobacteriaceae*, usada en todo

tipo de vectores comerciales a escala industrial (ColE1, pMB1, pBR322, pUC, entre otros) y presenta resultados consistentes y eficientes (Wu & Liu, 2010; secuencia extraída de la base de datos de GenSmart Design). Los marcadores de selección son resistencia a ampicilina y a kanamicina para SelB y SelC respectivamente, dadas las indicaciones presentes en el manual del sistema pET de *Novagen*, donde se recomienda el uso de ambos marcadores. Se plantea el uso de promotores y terminadores T7, ya que hacen parte de uno de los sistemas de regulación transcripcional más eficientes en procariontes a día de hoy, desarrollado naturalmente para transcribir todo un genoma con solo una subunidad proteica y sin la ayuda de moléculas adicionales, por esto es uno de los sistemas de regulación más empleado a escala mundial (Borkotoky & Murali, 2018).

Todas las consideraciones anteriores fueron tomadas en cuenta siguiendo los lineamientos descritos por Nora, *et al*, 2019

9. Resultados

9.1. Ubicación tentativa de las nuevas copias de SelC

Se designaron las enzimas de restricción mediante la herramienta FDEST de *ThermoFisher Scientific* **FD0224 (DraI)** y **FD0044 (Alw44I)** para cortar en los puntos 5' y 3' del intrón flanqueado por el gen SelC y el gen yicT respectivamente, como se grafica en la imagen a continuación, es de anotar que dadas las características del gen SelC (como el tipo de molécula que expresa y su longitud) la posición de las nuevas copias no debería presentar ninguna alteración en el metabolismo del modelo a transformar.



9.2. Ubicación tentativa de la nueva copia de SelB

También se designaron las enzimas de restricción mediante la herramienta FDEST de *ThermoFisher Scientific* para este caso, los cortes se realizarán por las enzimas de digestión FD1564 (XmaJI) y FD0753 (MfeI) para los puntos 5' y 3' del intrón flanqueado por el gen SelB y el gen yiaY respectivamente, cabe enfatizar en que la posición de esta modificación *puede* llegar a acarrear fenomenologías indeseadas, no obstante no se encontraron referencias al respecto, por lo cual se imposibilita el expresar un veredicto factual al respecto (no se muestra toda la secuencia dada su longitud, que es de 1845 bp o 614 aa).



9.3. Construcción del plásmido

Se logró diseñar un plásmido conjuntando lo anteriormente explorado y tomando en consideración las deliberaciones manifestadas por otros autores en publicaciones que aluden a la transformación de alta eficiencia y/o a las genómicas relacionadas al selenio en *E. coli* (Shilling, *et al*, 2020; Cheng & Arnér, 2017; Kostylev, *et al*, 2015) y la evidencia a nivel experimental que se discute en el apartado pertinente (ver Figura 4 y discusión), con respaldo también de diversas fuentes multimedia: como la base de datos de partes de *GenScript Biotech*, los foros de *ResearchGate* y los manuales de usuario del catálogo de plásmidos de *Novagen* (con especial énfasis en el sistema pET).

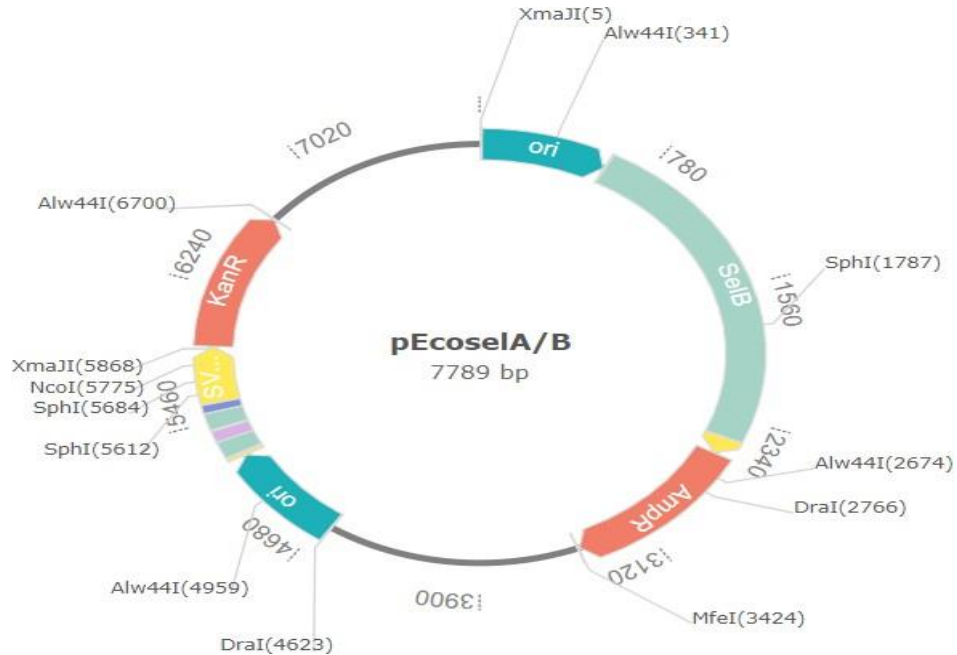


Figura 4. El orden de los elementos del vector, iniciando después del punto ubicado a las 12 en sentido horario es: enzima de digestión FD1564 (XmaJI), origen de replicación 1 (ColE1), secuencia de interés (SelB), promotor AmpR, gen de resistencia a ampicilina (AmpR), enzima de digestión FD0753 (MfeI), intrón, enzima de restricción FD0224 (DraI), origen de replicación 2 (ColE1), promotor T7, secuencia de interés (SelC), intrón t pequeño, secuencia de interés (SelC), terminador T7, promotor SV40, gen de resistencia a kanamicina (KanR) y la enzima de restricción FD0044 (Alw44I) seguida de un último intrón *las enzimas que muestra el gráfico y no son mencionadas aquí son *multiple cloning sites* (MCS) generados por el algoritmo del GenSmart Design, adicionalmente, antes de cada secuencia de interés se encuentra una secuencia optimizada Shine-Dalgarno cortesía de Xu, *et al*, 2013*.

10. Discusión

10.1. Mecanismo del vector

El funcionamiento del plásmido construido se conceptualiza como el aumento en la capacidad de retención de selenio, a modo de $tRNA^{(Ser)[Sec]}$ cargado con selenocisteína, y la velocidad de síntesis de selenoproteínas, en cuanto a la capacidad de acción de inserción de selenocisteína en simultáneo, de esta manera la mayor parte del selenio absorbido por las colonias será metabolizado hasta una de sus versiones más biodisponibles antes de ser excretado o almacenado.

10.2. ¿Por qué solo SelC y SelB?

Según los datos reportados por Xu, *et al*, 2013, Cheng & Arnér, 2017 y Cheng & Arnér, 2018: sobre-expresar individualmente SelA, SelB y SelC acarrea una disminución en la eficiencia de inserción de selenocisteína de hasta 61.1% y del 11.6% para los dos primeros casos respectivamente, por otro lado, el tercer caso presenta un aumento en dicha eficiencia del 43.4% al 52.6%, adicionalmente, los mencionados autores indican que la co-expresión de SelA, SelB y SelC, con SelA o SelB siendo regulados por promotores inducibles o solo por sus promotores endógenos, aumenta la eficiencia de incorporación de selenocisteína en un 69.7%, por esto se decide no involucrar a SelA en el arreglo genético, ya que se considera innecesario para obtener los resultados deseados y se sospecha que el resultado puede llegar a ser mejor aún de esta manera (de hecho, la evidencia así pareciese indicarlo [ver Fig.5 de Xu, *et al*, 2013]), además, en *E coli* tanto SelA como SelB se encuentran en un mismo operón, por lo cual pEcoselA/B, aparte de ser un vector de transformación perfectamente funcional, también puede hacer las veces de insumo de investigación, en cuanto a que el estudio de la expresión de su copia individual e independiente de SelB puede dar luz sobre los límites *naturales* del mejoramiento en la eficiencia de inserción de Sec con este método (edición génica), al contrastarse con los resultados de las referencias citadas y otras publicaciones, adicionalmente, el gen SelA tiene una longitud considerable, por lo que añadir una copia de SelA al plásmido diseñado implica un considerable aumento en el número de nucleótidos (+1392 nt) y por ende, también en el precio del plásmido.

10.3. Diferencias con productos similares

Los únicos plásmidos con similar función encontrado son los referidos en la literatura como psUABC y derivados del mismo: pBAD-selA, pBAD-selB, pBAD-selAB, pBAD-selAB(SD), pBAD-selC, pEXT-selC y pSUABC, quienes fueron diseñados para, precisamente, estudiar la sobre-expresión y la co-expresión de los genes SelA, SelB y SelC. Al parecer ninguno de estos vectores es comercial, ni de libre acceso (en todas las publicaciones revisadas, es el Profesor Elias Arnér de la universidad de Karolinska quien aporta el psUABC), por lo que no hay una forma de comparar directamente los plásmidos mencionados con pEcoselA/B.

No obstante, gracias a las gráficas aportadas por los autores en sus respectivas publicaciones (Cheng & Arnér, 2018; Cheng & Arnér, 2017; Xu, *et al*, 2013) es posible determinar que todos estos plásmidos poseen

solo una copia de cada gen de interés (en cada caso particular), por lo cual la tasa de expresión de SelC y posiblemente la eficacia de inserción de selenocisteína sea mejor en pEcoselA/B que en cualquiera de estos vectores (soportado por la evidencia experimental proporcionada por los mismos autores), adicionalmente, a excepción del psUABC, todos los demás plásmidos cuentan con promotores tac o pBAD, que si bien tienen sus ventajas, en la mayoría de los casos presentan resultados más humildes que el sistema T7 en cuestión de tasa de expresión de proteínas y/o RNA's (Balzer, *et al*, 2013).

Por último, ninguno de los plásmidos cuenta con el diseño para insertar tanto SelB como SelC en un mismo tratamiento, debido a que para estudiar la co-expresión de estos dos genes, en el artículo respectivo se optó por emplear dos vectores distintos para obtener una cepa con ambos genes sobre-expresados, con el añadido de que algunos de estos plásmidos poseen operones *lac*, lo cual debería hacerlos más caros en comparación con el diseño presentado. Por todo esto, es posible concretar que el constructo pEcoselA/B es la herramienta con mejor proyección para solucionar la realidad problemática descrita.

10.4. Otras consideraciones

En el estado en que se encuentra, pEcoselA/B no tiene la capacidad de introducir sus modificaciones en sitios específicos, si bien las enzimas seleccionadas mejoran las probabilidades de obtener las modificaciones en los lugares deseados, esto básicamente sigue dependiendo del azar, e idealmente la aplicación de este vector debería ir acompañada por un arreglo Crispr/Cas adecuado y adaptado a la cepa a tratar, con el fin de evitar posibles mismatches y/o alteraciones en el marco abierto de lectura.

Adicionalmente, para ofrecer una solución concisa a la realidad problemática plasmada, se debe hacer un escalado de este modelo a nivel industrial, por tal, este trabajo se encuentra inherentemente incompleto y debe ser considerado como una fase inicial de futuros esfuerzos.

Por último; pese a que las genómicas del selenio y el propio elemento cada vez cobran más relevancia en el escenario investigativo, y que desde el descubrimiento de los elementos SECIS se ha ampliado notablemente el marco teórico holístico de los mecanismos y funciones del selenio, aún falta un largo recorrido antes de que podamos sacar todo el potencial

biológico/biotecnológico del elemento, dado que la posibilidad de diseñar nuevas y súper-mejoradas proteínas, dirigir la citotoxicidad para combatir el cáncer (Wallenberg, Misra & Björnstedt, 2014), expandir nuestros conocimientos respecto al código genético, e incluso ahondar en la evolución de todos estos mecanismos (Hatfield & Gladyshev, 2002), es solo una realidad que empieza a tomar forma y sin duda, con algo más de tiempo y esfuerzos en el tópico por parte de la comunidad científico/académica, se producirá una revolución sin precedentes en las disciplinas afines a la vida y, muy probablemente, en la sociedad.

11. Referencias

- Carlson, B. A., Novoselov, S. V., Kumaraswamy, E., Lee, B. J., Anver, M. R., Gladyshev, V. N., & Hatfield, D. L. (2004). Specific Excision of the Selenocysteine tRNA^{[Ser]^{Sec} (T-rsp) Gene in Mouse Liver Demonstrates an Essential Role of Selenoproteins in Liver Function. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 8011–8017. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310470200>}
- Duntas, L. H., & Benvenega, S. (2015). Selenium: an element for life. *Endocrine*, 48(3), 756–775. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0477-6>
- Castellano, S. (2019). Selenium strikes back at fungi. *Nature Microbiology*, 4(5), 726–727. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0434-5>
- Lammi, M. J., & Qu, C. (2018). Selenium-Related Transcriptional Regulation of Gene Expression. <https://doi.org/10.3390/ijms19092665>
- Fu, X., Söll, D., & Sevostyanova, A. (2018). Challenges of site-specific selenocysteine incorporation into proteins by *Escherichia coli*. *RNA Biology*, 15(4–5), 461–470. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1440876>
- Gursinsky, T., Gröbe, D., Schierhorn, A., Jäger, J., Andreesen, J. R., & Söhling, B. (2008). Factors and selenocysteine insertion sequence requirements for the synthesis of selenoproteins from a gram-positive anaerobe in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), 1385–1393. <https://doi.org/10.1128/AEM.02238-07>

- Haruna, K. I., Alkazemi, M. H., Liu, Y., Söll, D., & Englert, M. (2014). Engineering the elongation factor Tu for efficient selenoprotein synthesis. *Nucleic Acids Research*, 42(15), 9976–9983. <https://doi.org/10.1093/nar/gku691>
- Fairweather-tait, S. J., Bao, Y., Broadley, M. R., Collings, R., Ford, D., Hesketh, J. E., & Hurst, R. (2011). Selenium in Human Health and Disease, 14(7).
- Mehdi, Y., & Dufrasne, I. (2016). Selenium in cattle: A review. *Molecules*, 21(4). <https://doi.org/10.3390/molecules21040545>
- Pedrosa, L. F. C., Motley, A. K., Stevenson, T. D., Hill, K. E., & Burk, R. F. (2012). Fecal Selenium Excretion Is Regulated by Dietary Selenium Intake, 377–381. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9430-9>
- Balzer, S., Kucharova, V., Megerle, J., Lale, R., Brautaset, T., & Valla, S. (2013). A comparative analysis of the properties of regulated promoter systems commonly used for recombinant gene expression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-26>
- Cheng, Q., & Arnér, E. (2018). Chapter 17: Overexpression of recombinant selenoproteins in *E. coli*. *Selenoproteins: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1661, 98–103. <https://doi.org/10.2307/j.ctt1xhr7d5.20>
- Givens, D. I., Allison, R., Cottrill, B., & Blake, J. S. (2004). Enhancing the selenium content of bovine milk through alteration of the form and concentration of selenium in the diet of the dairy cow, 817(April), 811–817. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1737>
- Fairweather-tait, S. J., Collings, R., & Hurst, R. (2010). Selenium bioavailability : current knowledge and future research, 91(2). <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674J>.The
- Sunde RA. Selenium. In: Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 11th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2012:225-37
- Macfarquhar, J. K., Broussard, D. L., Melstrom, P., Hutchinson, R., Wolkin, A., Martin, C., ... Green, A. L. (2015). Acute Selenium Toxicity Associated With a Dietary Supplement, 170(3), 256–261.
- Hesketh, J. (2008). Nutrigenomics and Selenium : Gene Expression Patterns , Physiological Targets , and Genetics. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155446>
- Nuttall, K. L. (2006). Evaluating selenium poisoning. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 36(4), 409–420.
- Kostylev, M., Otwell, A. E., Richardson, R. E., & Suzuki, Y. (2015). Cloning should be simple: *Escherichia coli* DH5á-mediated assembly of multiple DNA fragments with

- short end homologies. PLoS ONE, 10(9), 1–15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137466>
- Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., & Redwan, E. M. (2014). Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0>
- Jovanović, I. B., Veličković, M., Vuković, D., Milanović, S., Valčić, O., & Gvozdić, D. (2013). Effects of Different Amounts of Supplemental Selenium and Vitamin E on the Incidence of Retained Placenta, Selenium, Malondialdehyde, and Thyronines Status in Cows Treated with Prostaglandin F 2 α for the Induction of Parturition . *Journal of Veterinary Medicine*, 2013, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2013/867453>
- Oraby, M. M., Allababidy, T., & Ramadan, E. M. (2015). The bioavailability of selenium in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 307–315.
<https://doi.org/10.1016/j.aoad.2015.10.006>
- Burk, R. F., Hill, K. E., & Motley, A. K. (2003). Selenoprotein metabolism and function: Evidence for more than one function for selenoprotein P. *Journal of Nutrition*, 133(5 SUPPL. 2), 1517–1520. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1517s>
- Suzuki, K. T. (2005). Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies. *Journal of Health Science*, 51(2), 107–114. <https://doi.org/10.1248/jhs.51.107>
- Baron, C., Heider, J., & Böck, A. (1990). Mutagenesis of selC, the gene for the selenocysteine-inserting tRNA-species in E.coli: Effects on in vivo function. *Nucleic Acids Research*, 18(23), 6761–6766. <https://doi.org/10.1093/nar/18.23.6761>
- Manzine, L. R., Serrão, V. H. B., Lima, L. M., De Souza, M. M., Bettini, J., Portugal, R. V., Van Heel, M., & Thiemann, O. H. (2013). Assembly stoichiometry of bacterial selenocysteine synthase and SelC (tRNA^{Sec}). *FEBS Letters*, 587(7), 906–911.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.02.014>
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.
- Schweizer, U. (2017) Rare but essential – the amino acid selenocysteine, *Molecular Biology*.
- Turner, R. J., Weiner, J. H., & Taylor, D. E. (1998). Selenium metabolism in E. coli, *BioMetals* 11, 223–227.
- Geer, L. Y., Marchler-Bauer, A., Geer, R. C., Han, L., He, J., He, S., Liu, C., Shi, W., & Bryant, S. H. (2009). The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL.1), 492–496. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp858>

- dos Reis, A. R., El-Ramady, H., Santos, E. F., Gratão, P. L., & Schomburg, L. (2017). Overview of Selenium Deficiency and Toxicity Worldwide: Affected Areas, Selenium-Related Health Issues, and Case Studies. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56249-0_13
- Givens, D. I., Allison, R., Cottrill, B., & Blake, J. S. (2004). Enhancing the selenium content of bovine milk through alteration of the form and concentration of selenium in the diet of the dairy cow. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(8), 811–817. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1737>
- Bügel, S., Larsen, E. H., Sloth, J. J., Flytlie, K., Overvad, K., Steenberg, L. C., & Moesgaard, S. (2008). Absorption, excretion, and retention of selenium from a high selenium yeast in men with a high intake of selenium. *Food and Nutrition Research*, 52, 1–9. <https://doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1642>
- Cheng, Q., & Arnér, E. S. J. (2017). Selenocysteine insertion at a predefined UAG codon in a release factor 1 (RF1)-depleted *Escherichia coli* Host strain bypasses species barriers in recombinant selenoprotein translation. *Journal of Biological Chemistry*, 292(13), 5476–5487. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.776310>
- Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., & Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0939-8>
- Wallenberg, M., Misra, S., & Björnstedt, M. (2014). Selenium cytotoxicity in cancer. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 114(5), 377–386. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12207>
- Hatfield, D. L., & Gladyshev, V. N. (2002). How Selenium Has Altered Our Understanding of the Genetic Code. *Molecular and Cellular Biology*, 22(11), 3565–3576. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.11.3565-3576.2002>
- Downey, C. M., Horton, C. R., Carlson, B. A., Parsons, T. E., Hatfield, D. L., Hallgrímsson, B., & Jirik, F. R. (2009). Osteo-chondroprogenitor-specific deletion of the selenocysteine tRNA gene, *Trsp*, leads to chondronecrosis and abnormal skeletal development: A putative model for Kashin-Beck disease. *PLoS Genetics*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000616>
- Borkotoky, S., & Murali, A. (2018). The highly efficient T7 RNA polymerase: A wonder macromolecule in biological realm. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.198>
- Nora, L. C., Westmann, C. A., Martins-Santana, L., Alves, L. de F., Monteiro, L. M. O., Guazzaroni, M. E., & Silva-Rocha, R. (2019). The art of vector engineering: towards

the construction of next-generation genetic tools. *Microbial Biotechnology*, 12(1), 125–147. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13318>

Wu, Y. C., & Liu, S. T. (2010). A sequence that affects the copy number and stability of pSW200 and ColE1. *Journal of Bacteriology*, 192(14), 3654–3660. <https://doi.org/10.1128/JB.00095-10>

Schaefer-Ramadan, S., Thorpe, C., & Rozovsky, S. (2014). Site-specific insertion of selenium into the redox-active disulfide of the flavoprotein augments liver regeneration. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 548, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.02.001>

Xu, Y. wei, Jiang, Z. hua, Mu, Y., Zhang, L., Zhao, S. qi, Liu, S. jun, Wang, C., Zhao, Y., Lü, S. wu, Yan, G. lin, & Luo, G. min. (2013). Effects of combinatorial expression of selA, selB and selC genes on the efficiency of selenocysteine incorporation in *Escherichia coli*. *Chemical Research in Chinese Universities*, 29(1), 87–94. <https://doi.org/10.1007/s40242-013-2250-4>

Anexo: <https://www.thermofisher.com/co/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/fastdigest-thermo-scientific/fastdigest-enzyme-selection-tool.html>

