



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



PEDECIBA



Caracterización de la función de la selenoproteína T y de una nueva vía de respuesta al selenio en *Caenorhabditis elegans*

Laura Romanelli Cedrez

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Universidad de la República - PEDECIBA Biología

Director de tesis: Dr. Gustavo Salinas

Montevideo-Uruguay

Febrero 2019

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Presidente: Dra. Gabriela Bedó

Vocal: Dr. Ernesto Cuevasanta

Vocal: Dr. Bruno Manta

Resumen

El selenio (Se) es un elemento esencial en cantidades traza para muchos organismos, incluyendo el ser humano: es requerido en cantidades mínimas para el funcionamiento del organismo, en tanto un leve exceso lo convierte en tóxico.

En los mamíferos este oligoelemento juega un papel clave en una serie de procesos fisiológicos como las funciones tiroidea, inmune, cardiovascular, neuromuscular y la fertilidad masculina, y su deficiencia desencadena ciertas patologías. Sus efectos fisiológicos son mediados mayoritariamente por las selenoproteínas, muchas de las cuales son enzimas antioxidantes esenciales, en donde el Se es parte del sitio redox activo. Sin embargo, se desconoce la función de algunas selenoproteínas y el papel de varios metabolitos del Se. Por otro lado, un exceso del Se es tóxico pudiendo desencadenar diferentes condiciones fisiopatológicas como hepatotoxicidad, demielinización periférica y enfermedades motoneuronales, cuyos mecanismos moleculares se desconocen.

Este trabajo consta de dos secciones diferenciadas. La primera aborda la función de la selenoproteína T (SELENOT), una presunta óxidorreductasa de función desconocida presente en animales. La segunda estudia aspectos nuevos del metabolismo del Se. En ambos estudios se usó *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo.

C. elegans posee dos genes para la selenoproteína T (SELT-1.1 y SELT-1.2). Determinamos que SELT-1.1 tiene localización de retículo endoplasmático en células musculares, epiteliales y neuronas, mientras que SELT-1.2 se localiza en una única neurona sensorial de la cabeza. En organismos mutantes de delección (KO) en los genes que codifican para SELT-1.1, SELT-1.2 y en el doble KO se analizaron fenotipos asociados a las neuronas sensoriales de la cabeza que expresan SELT. Demostramos que los mutantes en *selt-1.1* no desarrollan la característica respuesta de repulsión a compuestos volátiles aversivos y que es esencial en el comportamiento de evasión a bacterias patógenas como *Serratia marcescens*.

La segunda parte de la tesis se centró en conocer aspectos no dilucidados del metabolismo del Se. Generamos, por mutagénesis aleatoria y posterior selección, estirpes de gusanos mutantes resistentes a concentraciones de Se letales para la estirpe silvestre. El mapeo de las mutaciones presentes en dos de las estirpes generadas, resultó en la identificación de dos nuevos alelos del gen *egl-9*. Este gen codifica para una prolil hidroxilasa reguladora del factor de transcripción HIF-1 (factor inducible por hipoxia). EGL-9, también presente en vertebrados, no había sido antes relacionado a la detoxificación del Se. Con este resultado, avanzamos significativamente en estudiar a nivel orgánsmico una nueva vía de respuesta al Se. Determinamos que HIF-1 es central en la respuesta al Se y que CYSL-1 es un

regulador de EGL-9, que opera como sensor de Se. Finalmente, procuramos avanzar en los efectores regulados por HIF-1.

Así, el trabajo de tesis contribuyó a: i) comprender la función de SELENOT y reveló nuevos procesos redox dependientes, como lo es la nocicepción, de esta selenoproteína, ii) identificar varios elementos de una vía de señalización y respuesta a Se previamente no relacionada con este elemento traza.

Índice

1	Introducción	12
1.1	Selenio y selenocisteína	12
1.1.1	Aspectos químicos y biológicos de las especies de selenio biológicamente relevantes	12
1.1.2	Selenocisteína: síntesis e incorporación en la cadena polipeptídica	14
1.1.3	¿Por qué Selenocisteína en lugar de Cisteína en la catálisis enzimática?	17
1.2	Selenoproteínas	22
1.2.1	Selenoproteína T	22
1.3	Metabolismo del selenio: lo que se conoce y desconoce	33
1.3.1	Selenuro de hidrógeno: un metabolito intermediario clave	33
1.3.2	Ingreso a las células y metabolización intracelular de formas orgánicas del selenio: selenometionina y selenocisteína.	34
1.3.3	Ingreso a las células de formas inorgánicas del selenio: selenito y selenato y metabolización intracelular.	35
1.3.4	Rutas del selenio a nivel sistémico.	37
1.3.5	Detoxificación y excreción de selenio de las células.	38
1.3.6	Utilización del selenio por las plantas	41
1.4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	42
1.4.1	Generalidades	42
1.4.2	Ciclo de vida	43
1.4.3	Anatomía	44
1.4.4	<i>C. elegans</i> como organismo modelo	49
1.5	Selenio y <i>Caenorhabditis elegans</i>	53
1.6	Respuestas a condiciones de estrés bajo la regulación del factor de transcripción HIF-1	56
1.6.1	Factor inducible por hipoxia (HIF) y protil hidroxilasa de HIF (PHD)	56
1.6.2	Otros estímulos implicados en la respuesta de HIF	58
1.6.3	Otros blancos de PHD	59
1.6.4	Sistema HIF/EGLN en <i>C. elegans</i>	59
1.6.5	Respuesta al H ₂ S mediada por HIF	61
1.7	Objetivos	64
2	Materiales y Métodos	66
2.1	Técnicas de <i>Caenorhabditis elegans</i>	66
2.1.1	Estirpes de gusanos y de bacterias.	66
2.1.2	Medios utilizados para cultivo de <i>C. elegans</i>	66
2.1.3	Cultivo de <i>C. elegans</i> .	66
2.1.4	Visualización de <i>C. elegans</i> .	67
2.1.5	Congelado de estirpes de <i>C. elegans</i> .	67
2.1.6	Limpieza de stocks contaminados, preparación de huevos y sincronización.	68
2.1.7	Montaje de los gusanos para observación al microscopio.	68
2.1.8	Microscopía confocal, Normasky y fluorescencia.	69
2.1.9	Tinción con Dil	69
2.1.10	Cultivo de <i>Escherichia coli</i> para ARNi.	69
2.1.11	Ensayos de ARNi.	70

2.1.12	Ensayos de desarrollo extraembrionario	70
2.1.13	Generación de organismos transgénicos.	70
2.1.14	Integración de los arreglos extracromosomales al genoma.	71
2.1.15	Generación de machos.	71
2.1.16	Retrocruzamientos con la estirpe silvestre.	71
2.1.17	Generación de organismo doble mutante.	74
2.1.18	Screening genético (<i>F2 Mutant Screen</i>) y selección de mutantes resistentes a concentraciones tóxicas de selenio.	74
2.1.19	<i>SNP mapping</i> con la estirpe hawaiana (HW)	77
2.1.20	Ensayos de toxicidad con selenito de sodio en placa.	78
2.1.21	Ensayo de toxicidad en medio líquido utilizando <i>WMicrotracker</i> .	78
2.1.22	Análisis de datos	80
2.2	Protocolos de biología molecular	80
2.2.1	Preparación de ADN genómico.	80
2.2.2	<i>Worm PCR</i>	81
2.2.3	Clonados	82
2.2.4	Secuenciación de genoma de estirpes de <i>C. elegans</i> generadas.	85
3	Estudio de la función de la selenoproteína T	92
3.1	SELENOT es requerida para el fenotipo de evasión de bacterias patógenas en <i>Caenorhabditis elegans</i>	93
3.1.1	Artículo	94
4	Determinación de respuesta al selenio dependiente del factor de transcripción HIF-1	96
4.1	Aislamiento de mutantes resistentes a concentraciones tóxicas de selenio	96
4.1.1	Mutagénesis química de gusanos y selección de gusanos resistentes a concentraciones tóxicas de selenito de sodio.	96
4.1.2	Caracterización fenotípica de mutantes aislados.	96
4.1.3	Caracterización genética inicial de los mutantes aislados	99
4.1.4	Mapeo de mutaciones afectadas en organismos resistentes a concentraciones tóxicas de selenito de sodio	102
4.2	Análisis de vía de señalización de HIF-1 en presencia de selenio	106
4.2.1	Cuantificación de fenotipo de resistencia al selenio utilizando el equipo <i>WMicrotracker</i> .	106
4.2.2	Determinación de participación de HIF-1, VHL-1 y SWAN-1 en respuesta al selenio.	110
4.2.3	Determinación de CYSL-1 como regulador de EGL-9 dependiente de selenio.	115
4.2.4	Análisis de posibles efectores involucrados en la respuesta al selenio	122
4.3	Análisis de las proteínas tioredoxina reductasa, glutatión reductasa y selenofosfato sintetasa de <i>C. elegans</i> en presencia de selenio.	133
4.4	Anexo 4.1	135
4.5	Anexo 4.2	139
5	Análisis del rol de transportadores potencialmente involucrados en el metabolismo del selenio	144

5.1	Homólogos de proteínas de transporte de especies de azufre y selenio de bacterias _____	146
5.2	Homólogos de proteínas de transporte de especies de azufre y selenio de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> _____	149
5.3	Homólogos de proteínas de transporte de especies del azufre y selenio de mamíferos _____	150
6	<i>Discusión general, conclusiones y perspectivas</i> _____	154
6.1	Estudio de la Selenoproteína T _____	154
6.2	Búsqueda de genes involucrados en el metabolismo del selenio mediante genética directa. _____	157
7	<i>Agradecimientos</i> _____	164
8	<i>Referencias</i> _____	166

Abreviaturas

AC	Adenilato ciclasa
ARNdh	ARN doble hebra
ARNi	ARN de interferencia
CAS	Cianoalanina sintasa
CDS	Secuencia de ADN codificante (<i>coding DNA sequence</i>)
CGC	<i>Caenorhabditis Genetic Center</i>
Cys o C	Cisteína
CYSL	Cisteína sintasa <i>like</i>
DA	Neuronas dopaminérgicas
EF-Sec	Factor de elongación específico para Sec
EGLN	Prolil hidroxilasa (<i>egg-laying defective nine</i>)
eIF4a3	Factor de iniciación eucariota 4a3
ETHE-1	Persulfuro dioxigeneasa
FDH	Formiato deshidrogenasa
FIH1	Factor de inhibición de HIF α
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación, γ -glutamil cisteinil glicina
GSHPX	Glutación peroxidasa
HIF	Factor inducible por hipoxia
HMT-1	<i>Heavy metal tolerance factor 1</i>
HRE	Elemento de respuesta a hipoxia
HW	Estirpe de <i>Caenorhabditis elegans</i> silvestre hawaiana
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido

KO	<i>Knock out</i>
L1	Estadio larvario 1
L2	Estadio larvario 2
L3	Estadio larvario 3
L4	Estadio larvario 4
LC50	Dosis letal 50%
MPST-7	Mercaptopiruvato azufre transferasa 7
MRP	<i>Multidrug resistant protein</i>
MSRB1	Metionina sulfóxido reductasa
MYND	<i>Myeloid, Nery, and DEAF-1</i>
N2	Estirpe de <i>Caenorhabditis elegans</i> silvestre de Bristol
NBRP	<i>National Bioresource Project of Japan</i>
NGM	<i>Nematode Growth Medium</i>
OASS	O-acetilserina sulfhidrilasa
OAS-TL	O-acetilserina(tiol)liasa
ODD	<i>Oxygen dependent degradation</i>
OL-IR	<i>Outer left-inner right</i>
OL-OR	<i>Outer left-outer right</i>
PACAP	Neuropéptido pituitario activador de la adenilatociclasa
PDO	Persulfuro dioxigenasa
PHD	<i>Prolyl hydroxylase</i>
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PSer-ARNt ^{Sec}	Fosfoseril-ARNt ^{Sec}
PSTK	Fosfoseril-ARNt ^{Sec} quinasa
Rdx	Redoxinas
RE	Retículo endoplasmático
RMS	<i>Rostral migratory stream</i>

ROS	Especies reactivas del oxígeno
SBP2	Proteína de unión a SECIS
Sec o U	Selenocisteína
Sec-ARNt ^{Sec}	Selenocisteinil-ARNt ^{Sec}
SECIS	<i>SelenoCysteine Insertion Sequence</i>
SecS	Selenocisteína sintetasa
SELENOT	Selenoproteína T
SeMet	Selenometionina
Ser-ARNt ^{Sec}	Seril-ARNt de Sec
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SPS	Selenofosfato sintetasa
SQR	Sulfuro quinona reductasa
SQRD-1	Sulfuro quinona reductasa deshidrogenasa-1
SUOX	Sulfito oxidasa
TCA	<i>Tricarboxylic acid cycle</i>
Trx	Tiorredoxina
TRXR	Tiorredoxina reductasa
TST	Tiosulfato azufre transferasa
UTR	<i>Untranslated region</i>
VHL	<i>Von Hippel Lindau tumor supresor</i>

Fórmulas químicas abreviadas

CH_3SeCH_3	Dimetilselenuro
CH_3SeH	Metil-selenol
$\text{CH}_3\text{SeSeCH}_3$	Dimetildiselenuro
GS-SeH	Glutación-selenopersulfuro
GSSH	Glutación persulfuro
H_2S	Sulfuro de hidrógeno
H_2Se	Selenuro de hidrógeno
$\text{H}_2\text{SePO}_3^-$	Selenofosfato dihidrógeno
HCN	Ácido cianhídrico
HSe^-	Anión hidroselenuro
NO	Óxido nítrico
RS^-	Tiolato
RSe^-	Selenolato
RSeO_2H	Ácido selenínico
RSeO_3H	Ácido selenónico
RSeOH	Ácido selenénico
RSO_2H	Ácido sulfínico
RSO_3H	Ácido sulfónico
RSOH	Ácido sulfénico
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	Tiosulfato
SeO_3^{2-}	Selenito
SeO_4^{2-}	Selenato
SePO_3^{3-}	Selenofosfato
SO_3^{2-}	Sulfito

1 Introducción

En esta tesis se abordó la función de una selenoproteína y ciertos aspectos del metabolismo del selenio, utilizando el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Por ello esta introducción contiene diferentes bloques que introducen al selenio, la selenocisteína, las selenoproteínas, el metabolismo del selenio y el organismo en el cual se realizaron los estudios.

1.1 Selenio y selenocisteína

1.1.1 Aspectos químicos y biológicos de las especies de selenio biológicamente relevantes

El selenio (Se) es un elemento traza esencial para muchos organismos, incluyendo los humanos[1,2]. En la mayoría de las especies, el rango que existe entre dosis deficientes y tóxicas es particularmente estrecho. En el ser humano la ingesta diaria recomendada en adultos es 55 µg/día y el límite superior es 400 µg/día[3].

El elemento Se fue descrito por primera vez en 1817 por Jacob Berzelius. Los efectos tóxicos del Se se establecieron de forma inequívoca a mediados del siglo XX, cuando se logró determinar que la causa de intoxicación de animales de granjas (caballos, ovejas y cabras) de algunas regiones de Estados Unidos era la alimentación con plantas seleníferas. Esta intoxicación se reprodujo en animales de laboratorio[4].

A mediados de 1950 el Se comienza a ser reconocido como un elemento con un rol beneficioso para diversos organismos. Por un lado se reportó que cantidades traza de selenito eran requeridas por *Escherichia coli* para desarrollar una actividad ácido fórmico deshidrogenasa óptima. Por otro lado, en la levadura de cerveza se había descrito un componente, el llamado “factor III”, que evitaba una enfermedad de hígado letal en ratas con alimentación restringida. Luego se determinó que el “factor III” era el Se[4,5]. En 1970 distintos estudios identificaron al Se como un componente esencial de la enzima glutatión peroxidasa (GSHPX)[4,5]. A partir de este momento se reconoce la esencialidad del Se en muchos organismos.

A finales de los 70 se supo que la forma de Se relevante de la GSHPX de mamíferos, de la glicina reductasa de *Clostridium sticklandii* y de la formiato deshidrogenasa (FDH) de *Escherichia coli* era el aminoácido selenocisteína (Sec)[4].

Actualmente es claro que el rol del Se como un elemento esencial en muchos seres vivos es debido a las proteínas que lo incorporan en la forma del aminoácido Sec, el cual es codificado genéticamente (detallado en apartado 1.1.2). Muchas de las selenoproteínas de función conocida son óxidorreductasas en las que el aminoácido Sec es parte del sitio activo[6]. Los ratones *knock out* (KO) en el

ARNt^{Sec} y en la selenoproteína tiorredoxina reductasa (TRXR¹, TRXR1 y TRXR2[7]) mueren durante el desarrollo embrionario[8–10]. Además, la deficiencia de Se, asociada a dietas pobres, provoca alteraciones bioquímicas que pueden afectar numerosos procesos fisiológicos que incluyen las funciones tiroidea, cardiovascular, neuromuscular, reproductiva e inmune[11]. Asimismo, la deficiencia de Se en combinación con algún estrés adicional exacerba ciertas enfermedades como el cretinismo por deficiencia de yodo y predispone a otras como la cardiomiopatía de Keshan, desencadenada por ciertas infecciones virales[1,2].

La función tiroidea tiene extremada dependencia de este oligoelemento, ya que las deiodinasas (DI), claves en la síntesis y homeostasis de la hormona T₃, son selenoproteínas. DI1 y DI2 activan la pro-hormona T₄ y la DI3 inactiva la hormona T₃ (forma activa)[12]. Las deficiencias en las GSHPX1, GSHPX3 y GSHPX4 se han vinculado con alteraciones cardiovasculares[13]. Se ha demostrado también que la función del sistema inmune y algunos procesos específicos del desarrollo neuronal dependen de selenoproteínas[11,14]. También se han correlacionado bajos niveles de este elemento con patologías neuromusculares debido a su rol protector frente al estrés oxidativo implicado en la neurodegeneración[14]. En testículos, existe una alta expresión de varias selenoproteínas GSHPX4, TRXR3, SELENOV y SELENOP y la deficiencia en Se tiene una incidencia importante en la fertilidad masculina[15].

Así como una deficiencia de este elemento afecta el correcto funcionamiento del organismo, un exceso de Se es tóxico y puede desencadenar diversas condiciones fisiopatológicas. En mamíferos están reportadas la hepatotoxicidad, demielinización periférica y enfermedades motoneuronales, pudiendo causar incluso la muerte[16].

Aunque está claro que la deficiencia así como el exceso de este elemento es perjudicial para la salud, la complejidad de la función de este oligoelemento puede ser mayor. Aún en concentraciones normalmente óptimas, el rol de este elemento puede cambiar según la condición fisiopatológica. El rol del Se en la prevención, inhibición o progresión del cáncer ha sido tema de debate durante muchos años hasta hoy[17].

Los seres vivos también utilizan Se de otras dos maneras: i) como 2-selenouridina en la posición de “balanceo” del anticodón (1^a base) de algunos ARNt de ciertos procariotas y ii) como cofactor, junto con molibdeno, en algunas molibdoпротеínas de bacterias, estando ambos elementos involucrados en la catálisis[18].

¹ En mamíferos hay tres genes que codifican para TRXR, TRXR1 y 2 son esenciales.

1.1.2 Selenocisteína: síntesis e incorporación en la cadena polipeptídica

La selenocisteína (Sec, código de tres letras; U código de una letra) es un aminoácido análogo a la cisteína (Cys o C), que posee Se en lugar de azufre (S) (**Fig. 1.1**). Está codificado por un codón UGA [19], uno de los codones usuales de terminación de la traducción, el cual es reprogramado por una secuencia de inserción de Sec (denominada elemento SECIS, del inglés: *SElenoCysteine Insertion Sequence*)[20], presente en el ARNm de selenoproteínas. El mecanismo de inserción de Sec ha sido caracterizado en detalle en bacteria, arqueas y eucariotas, siendo una serie de estudios en *E. coli*, por Boch y colaboradores, los pioneros.

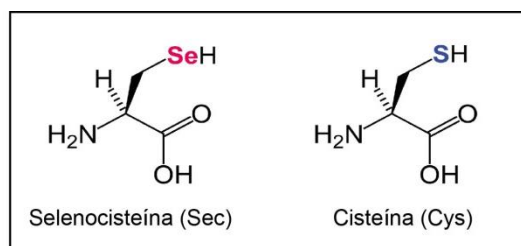


Fig. 1.1: Fórmulas químicas de Selenocisteína y Cisteína, aminoácidos análogos que se diferencian en el heteroátomo de su cadena lateral, átomo de selenio (Se) y azufre (S).

En bacterias la biosíntesis de Sec es iniciada por la seril-ARNt sintetasa canónica que cataliza la unión covalente de la serina al ARNt de Sec (Ser-ARNt^{Sec}), además de catalizar la síntesis de Ser-ARNt^{Ser}[21]. Este intermediario es convertido en Sec-ARNt^{Sec} por la Sec sintetasa (SecS o Sela en *E. coli*), la cual utiliza selenofosfato (SePO₃³⁻) como precursor[22]. El selenofosfato es sintetizado por la selenofosfato sintetasa (SPS o SelD en *E. coli*) la cual requiere de selenuro de hidrógeno (H₂Se) y ATP como sustratos para generar selenofosfato, AMP y fosfato inorgánico[1,23] (**Fig. 1.2 A**).

La incorporación de Sec a la síntesis proteica es mediada por una maquinaria específica, articulada sobre el aparato de traducción canónico. El elemento SECIS, que en bacterias está ubicado inmediatamente a continuación del codón UGA^{Sec}, une un factor de elongación específico para Sec, denominado EF-Sec o SelB en *E. coli*. EF-Sec media la incorporación de Sec-ARNt^{Sec} al ribosoma y la elongación de la cadena polipeptídica, impidiendo la terminación de la síntesis proteica[24] (**Fig. 1.2 B**).

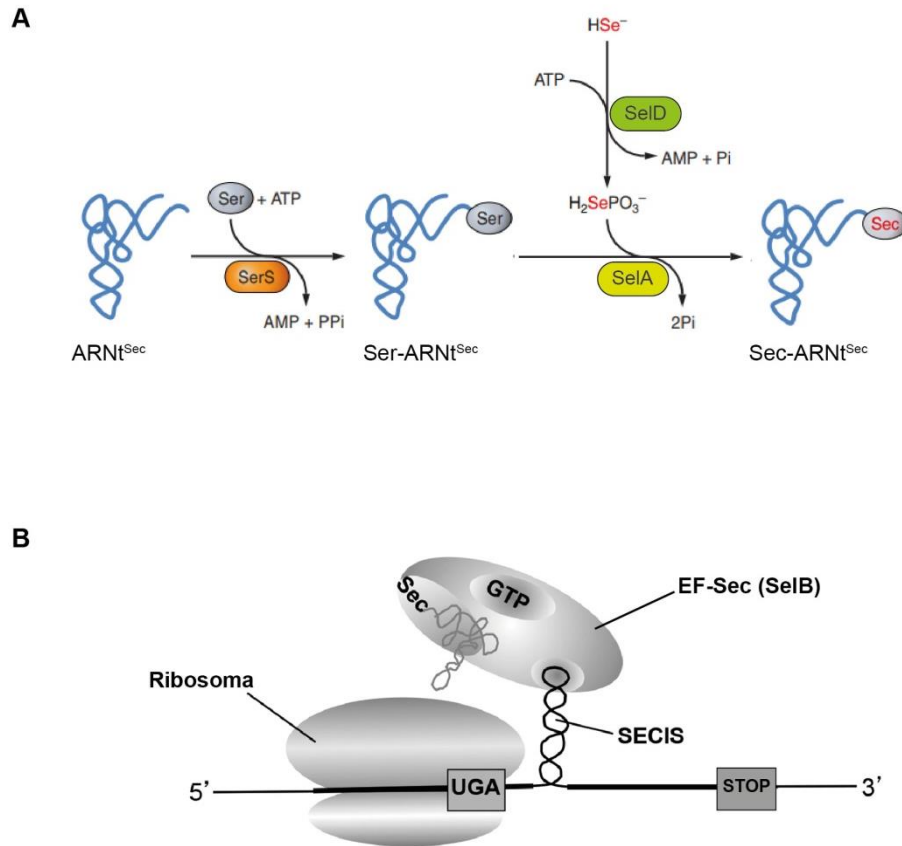


Fig. 1.2: Síntesis e incorporación de selenocisteína (Sec) en la cadena polipeptídica en Bacterias. **A:** Esquema representando la biosíntesis de Sec. La seril-ARNt sintetasa (SerS) cataliza la unión de serina al ARNt de Sec (Ser-ARNt^{Sec}). La Sec sintetasa (SelA en *E. coli*) cataliza la síntesis de selenocisteinil-ARNt^{Sec} (Sec-ARNt^{Sec}) utilizando al selenofosfato (SePO₃³⁻) como dador de Se, cuya formación es catalizada por la selenofosfato sintetasa (SelD) a partir de selenuro y ATP. **B:** Esquema representando incorporación de Sec en la cadena polipeptídica en crecimiento. El factor de elongación específico para Sec (SelB en *E. coli*) se une al Sec-tRNA^{Sec} y media su interacción con el ribosoma. Modificado de referencias [1,18].

En el dominio Eukarya y Archaea tanto la biosíntesis de Sec como su incorporación en la cadena polipeptídica en crecimiento son más complejas que en Bacteria. Al igual que en bacterias, la biosíntesis de Sec es iniciada por la seril-ARNt sintetasa canónica catalizando la formación de Ser-ARNt^{Sec}[21]. Luego la fosfoseril-ARNt^{Sec} quinasa (PSTK) cataliza la transformación de Ser-ARNt^{Sec} en fosfoseril-ARNt^{Sec} (PSer-ARNt^{Sec})[25], y la Sec sintetasa (SecS, diferente de la de bacterias) cataliza la conversión de PSer-ARNt^{Sec} en Sec-ARNt^{Sec} utilizando como dador de Se el selenofosfato (sintetizado por la SPS)[22] (**Fig. 1.3 A**).

El elemento SECIS en eucariotas y arqueas está presente en el 3'UTR del ARNm y también participa en la incorporación de Sec a la síntesis proteica[20,26]. De manera análoga a las bacterias, en arqueas EF-Sec media la unión del elemento SECIS y la incorporación a la síntesis proteica[26]. En eucariotas, la proteína de

unión a SECIS (SBP2) se une al elemento SECIS y este complejo une el factor de elongación específico para Sec[27]. Al igual que en bacterias, EF-Sec une Sec-ARNt^{Sec} y media la incorporación de Sec-ARNt^{Sec} al ribosoma y la elongación de la cadena polipeptídica. Otras proteínas adicionales, participan en la incorporación de este aminoácido en eucariotas, la proteína ribosomal L30, el factor de iniciación 4a3 (eIF4a3) y la nucleolina. La proteína ribosomal se predice que forma parte de la maquinaria basal de inserción de Sec, mientras que nucleolina y eIF4a3 tendrían funciones regulatorias[1] (**Fig. 1.3 B**).

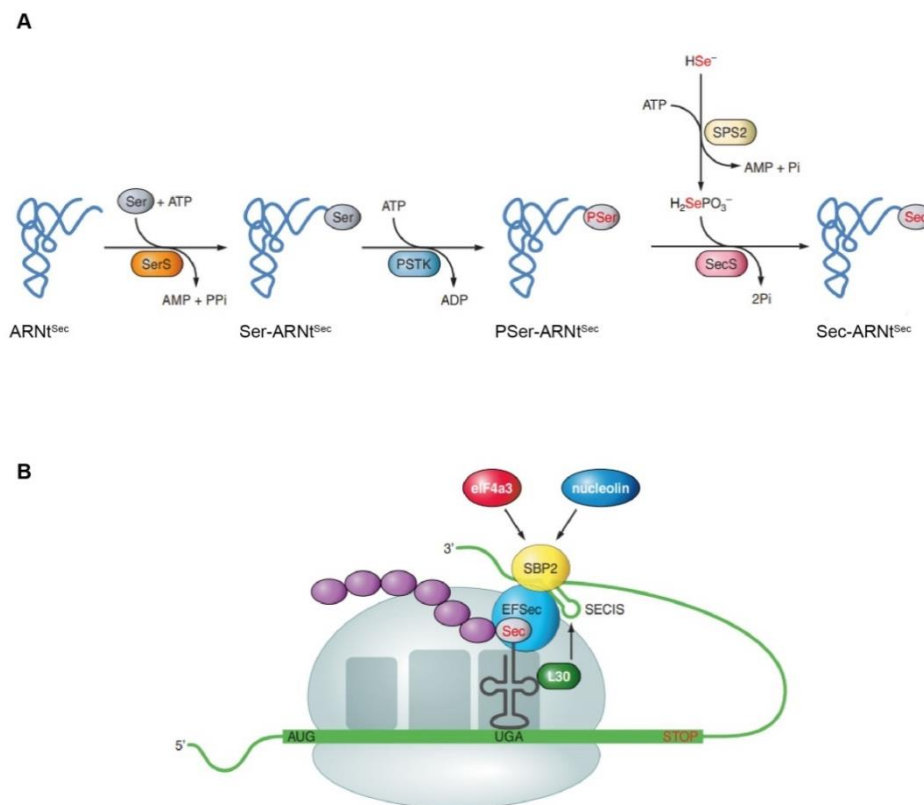


Fig.1.3: Síntesis e incorporación de selenocisteína (Sec) en la cadena polipeptídica en eucariotas. **A:** esquema representando la biosíntesis de Sec. La seril-ARNt sintetasa (SerS) cataliza la unión de serina al ARNt de Sec (Ser-ARNt^{Sec}). La fosfoferil-ARNt quinasa (PSTK) cataliza la formación del intermediario fosfoferilARNt^{Sec} (P-Ser-tRNA^{Sec}) el cual es convertido en selenocisteinil-ARNt Sec (SecARNt^{Sec}) por la Sec sintasa (SecS). La SecS utiliza al selenofosfato como dador de selenio, cuya formación es catalizada por la selenofosfato sintetasa (SPS2) a partir de selenuro y ATP. **B:** Esquema representando incorporación de Sec en la cadena polipeptídica en crecimiento en mamíferos. En dicho proceso se encuentra involucrada la proteína SBP2, proteína de unión a secuencia de inserción de Sec (SECIS), la cual se une al elemento SECIS en el 3'UTR del ARNm. EFSec: Factor de elongación específico para Sec el cual se une al Sec-tRNA^{Sec}. L30: proteína ribosómica L30, eIF4a3: Factor de iniciación eucariota, Nucleolin (nucleolina) proteína con rol regulatorio. Figura modificada de referencia[1]

1.1.3 ¿Por qué Selenocisteína en lugar de Cisteína en la catálisis enzimática?

El elaborado proceso de recodificación para la codificación de Sec así como su biosíntesis, indica que el Se tiene alguna propiedad que confiere alguna ventaja sobre el azufre, al menos en algunas proteínas.

Las selenoproteínas son en su mayoría utilizadas como catalizadores de reacciones redox, por lo que el análisis de ventajas del uso de Sec sobre Cys ha sido en base a propiedades que favorezcan este tipo de reacciones. Se piensa que Sec es una “supercisteína” que confiere alguna ventaja sobre Cys en algunas óxidorreductasas. En estas óxidorreductasas la Sec participa en intercambios tiol-selenol/selenil-sulfuro, como en la TRXR, y en intercambios selenol/selenénico/selenil-sulfuro como en GSHPX y metionina sulfóxido reductasas (MSRB1)[28].

Para las reacciones de intercambio ditiol(selenol-tiol)/disulfuro(selenil-sulfuro), reacciones que muchas selenoproteínas catalizan, existen principalmente tres maneras en las cuales el intercambio puede ser acelerado: i) aumento de nucleofilia del átomo que ataca (mejor nucleófilo²), ii) aumento de electrofilia del átomo atacado por el nucleófilo (mejor electrófilo³) y iii) mayor estabilidad del grupo saliente (mejor grupo saliente⁴). Durante el ciclo catalítico de estas óxidorreductasas, el átomo de Se puede ser nucleófilo, electrófilo y grupo saliente, dependiendo del paso del ciclo catalítico[29].

Es importante consignar que la etapa limitante del ciclo suele ser el paso inicial, en el que se produce un ataque nucleofílico de la óxidorreductasa sobre su blanco.

² Nucleófilo es una especie química que dona un par de electrones a un grupo electrófilo formando un enlace.

³ Electrófilo es una especie química que acepta un par de electrones para formar un enlace.

⁴ Grupo saliente es un fragmento de una molécula que se separa con un par de electrones en una escisión heterolítica.

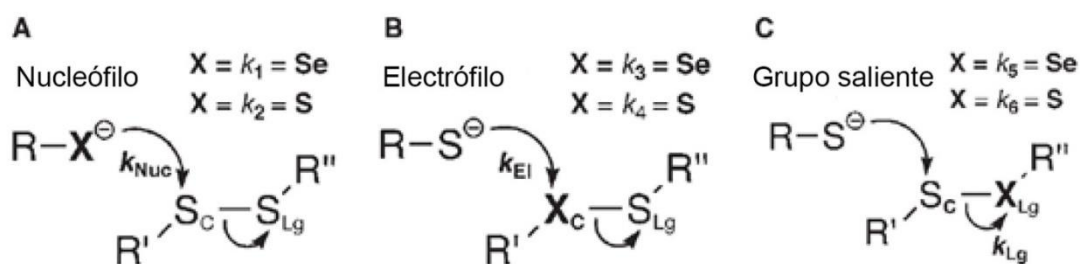


Figura 1.4: Comparación entre selenio y azufre en reacción de tipo intercambio tiol/disulfuro. Durante el ciclo catalítico Sec puede intervenir en el ataque nucleofílico de un disulfuro **(A)**, o en la etapa resolutive (formando parte del intermediario selenil-sulfuro) puede intervenir como electrófilo **(B)** o grupo saliente **(C)**. La constante de velocidad de la reacción de intercambio depende de tres constantes de velocidad individuales: la constante para el ataque nucleofílico (k_{Nuc}), la constante de velocidad a la cual el átomo central (X_c) acepta electrones ($k_{\text{Electrofilia}}$ o k_{EI}) y la constante de velocidad a la cual el enlace S_c-X_{Lg} se rompe ($k_{\text{Leaving group}}$ o k_{Lg}). La velocidad global de la reacción puede ser aumentada por cualquiera de los tres parámetros: nucleofilia, electrofilia y habilidad de grupo saliente. **A:** La velocidad de reacción aumenta si $X=\text{Se}$ dado que la nucleofilia del selenolato ($k_{\text{Nuc}}=k_1$, en el caso del Se) es mayor que la del tiolato ($X=\text{S}$, $k_{\text{Nuc}}=k_2$) y k_1 es mayor que k_2 . **B:** La velocidad de reacción aumenta si $X_c=\text{Se}$ dado que el selenio es más electrofílico que el azufre y $k_3(=k_{\text{EI}})$ es mayor que k_4 . **C:** La velocidad de reacción aumenta si $X_{\text{Lg}}=\text{Se}$, dado que el selenol tiene menor pK_a relativo al tiol y k_5 es menor que k_6 . Modificado de referencia [29].

Tanto el tiolato (RS^-) como el selenolato (RSe^-) son muy buenos nucleófilos, pero el RSe^- presenta una mayor nucleofilia lo cual es considerado como la principal causa por la que las reacciones que involucran al Se están potenciadas [30] (**Fig. 1.4 A**). Se piensa que esto también es así para reacciones en las que el ataque nucleofílico es sobre peróxidos (como en las GSHPX) y sobre sulfóxido de metionina (como en la MSRB1) [29].

Consistente con esta visión, de consenso en el área del Se, en las óxidorreductasas que contienen Sec y Cys como parte del sitio redox activo, la Sec ocupa siempre la posición “nucleofílica” que “dispara” la catálisis formando un intermediario selenil-sulfuro con el blanco, y nunca la posición “resolutiva” que participa en la resolución del intermediario selenil-sulfuro con el blanco (**Fig. 1.5**). Una vez formado el intermediario selenil-sulfuro con el blanco, el tiolato, denominado “resolutivo” (bien de la óxidorreductasa o exógeno como glutatión) ataca a este enlace, y en este paso el Se es electrófilo (acepta los electrones del tiolato), y el grupo saliente es el tiolato reducido del blanco. Se forma así un nuevo enlace selenil-sulfuro que debe ser reducido para regenerar la forma activa de la enzima, etapa en la cual el Se puede ser electrófilo o grupo saliente (**Fig. 1.5**).

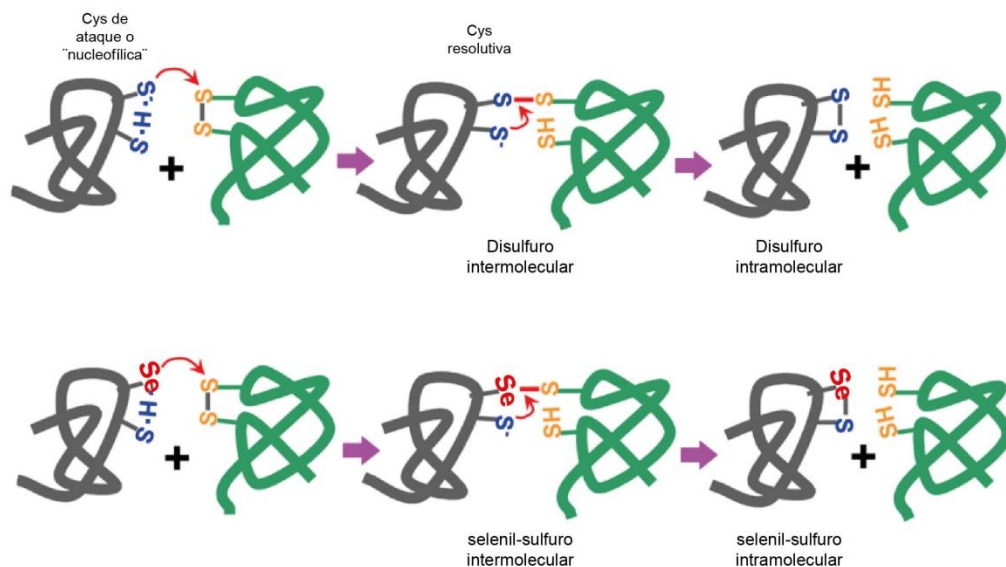


Fig.1.5: Mecanismo catalítico de una tiol-disulfuro oxidorreductasa representativa. La Cys de ataque o “nucleofílica” en forma de tiolato reacciona con el disulfuro de la molécula blanco y forma un disulfuro transitorio intermolecular. La Cys resolutive de la oxidorreductasa ataca el disulfuro intermolecular formando un disulfuro con la Cys de ataque, liberando el sustrato en su forma reducida. Las oxidorreductasas que contienen Sec y Cys en el sitio activo, Sec se encuentra en la posición de ataque inicial. Modificada de referencia[167].

Resulta claro de algunos casos estudiados que la reacción es más rápida cuando un RS^- ataca a un selenil-sulfuro que cuando ataca a un disulfuro análogo, y existe evidencia que el átomo de Se en el selenil-sulfuro sería mejor electrófilo (más propenso a aceptar electrones) que el azufre (**Fig. 1.4 B**), sin embargo, también se piensa que el RSe^- es un mejor grupo saliente que el RS^- (**Fig. 1.4 C**), debido a su pKa. Una combinación de factores que además de químicos tienen que ver con la accesibilidad de los átomos y el contexto proteico pueden propiciar una u otra vía para la regeneración de la enzima[29].

Otra característica de Sec es la mayor resistencia a la oxidación irreversible que Cys. Tanto Cys como Sec necesitan el grupo tiol o el selenol en la forma activa de las enzimas. Cuando se enfrenta a la exposición de un oxidante (e.g. H_2O_2), las dos enzimas pueden oxidarse reversiblemente a ácido sulfénico ($RSOH$) o ácido selenénico ($RSeOH$) (**Fig. 1.6**) o sobreoxidarse a ácido sulfínico (RSO_2^-) o ácido selenínico ($RSeO_2^-$). La forma RSO_2^- no puede ser reducida a la forma $RSOH$ por un tiol de bajo peso molecular (e.g. glutatión), debido a que el azufre del grupo RSO_2^- no es muy electrofílico. De hecho, para las peroxirredoxinas sobreoxidadas a sulfínico es necesaria otra enzima, la sulfirredoxina, para reducirlo a sulfénico, y para otros tioles proteicos la oxidación a sulfínico es irreversible[28]. En cambio, la forma $RSeO_2^-$ sí puede ser reducida sin asistencia catalítica debido a la mayor

electrofilia del Se (**Fig. 1.6**)[31]. Por último, la oxidación de RSeO_2^- a ácido selenónico (RSeO_3^-) es más difícil en comparación con la oxidación del RSO_2^- a ácido sulfónico (RSO_3^-). Esto también se relaciona con el carácter más electropositivo del Se[31] (**Fig. 1.6**).

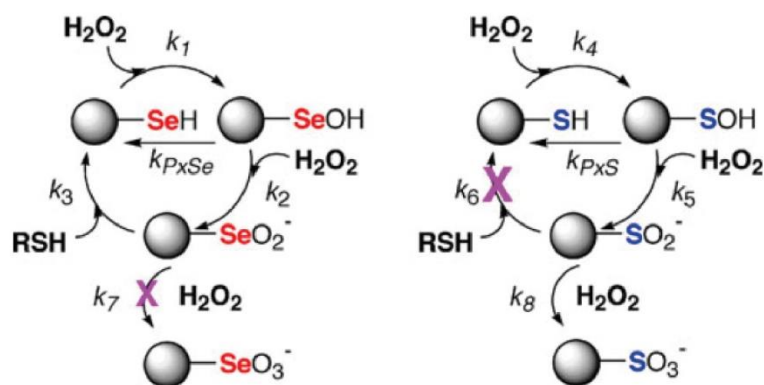


Figura 1.6: Comparación entre enzimas con Sec o Cys en la reacciones de oxidación. El selenol (RSeH) es más fácil de ser oxidado que el tiol (RSH) ($k_1 > k_4$), formando ácido selenénico (RSeOH) y sulfénico (RSOH), respectivamente. En presencia de un agente oxidante pueden continuar oxidándose a RSeO_2^- y RSO_2^- . Sin embargo RSeO_2^- es más fácil de ser reciclado a la forma activa RSeH que RSO_2^- a RSH ($k_3 \gg k_6$). Cuando el ácido sulfínico (RSO_2^-) reacciona con otro equivalente del oxígeno, es oxidado irreversiblemente a sulfónico (RSO_3^-) ($k_8 \gg k_7$). Tomado de referencia [28].

Si bien en algunas óxidoreductasas Sec tendría algunas propiedades biológicamente relevantes y operaría como una Cys optimizada para la catálisis redox, la evolución da cuenta de muchos ejemplos en los que Sec ha sido reemplazado por Cys (ver selenio y *C. elegans* sección 1.5). La escasez relativa de Se en la naturaleza en relación al azufre (1:1000) es una posible explicación para este fenómeno. Otra posibilidad del uso restringido del Se puede ser una mayor toxicidad del Se en relación al azufre, bien directa o bien indirecta por incorporación inespecífica de Sec en lugar de Cys en sitios en los que ambos residuos no son funcionalmente equivalentes (por ejemplo en disulfuros estructurales y en la catálisis no redox, tiol-dependiente, como en ciertas enzimas como las proteasas de cisteína o las glutatión transferasas)[32].

A manera de resumen, los enigmas sobre el Se son muchos, Elias Arner, uno de los referentes en el área, lo describe: “Los enigmas de las selenoproteínas son muchos, incluyendo su exclusiva vía de síntesis, sus roles en la naturaleza, propiedades catalíticas y curiosa aparición y patrón de expresión a través de la evolución. ¿Existe realmente algo verdaderamente único con respecto a las propiedades que

surgen de la presencia de un único átomo de Se, como es el presente en las selenoproteínas, comparado con las del azufre en los ortólogos con Cys? Parece ser que sí, pero ¿cuáles son?”[30].

1.2 Selenoproteínas⁵

El conjunto de selenoproteínas de una especie, denominado selenoproteoma, es un número reducido de proteínas. Las selenoproteínas están presentes en los tres dominios de lo viviente (Eukarya, Archaea y Bacteria) pero no en todas las especies, y el número de selenoproteínas en los distintos selenoproteomas varía mucho entre las especies. Por ejemplo, *Caenorhabditis elegans* y *Caenorhabditis briggsae* poseen sólo una selenoproteína con un residuo de Sec, por lo que toda la maquinaria de Sec es mantenida por un único residuo aminoacídico. El organismo con el mayor selenoproteoma descrito, en tanto, es el alga unicelular *Aureococcus anophagefferens* con 59 selenoproteínas. Por otro lado existen organismos como levaduras, plantas vasculares y algunos animales (la mayoría artrópodos) que no incorporan Sec [1].

La mayor parte de las selenoproteínas de función conocida son enzimas óxidoreductasas, con un residuo de Sec como parte del sitio redox activo. La característica de estar localizada exclusivamente en el sitio catalítico, tiene alguna excepción. La Selenoproteína P, por ejemplo, se diferencia de lo comúnmente asociado a selenoproteínas, dado que el número de residuos Sec varía enormemente. En mamíferos va desde 7 a 16 residuos (en humanos posee 10), y es una reserva de Se en el plasma[33].

El genoma humano codifica para 25 selenoproteínas, que incluye enzimas de función conocida como: tiorredoxinas reductasas, glutatión peroxidasa, deiodinasas de la hormona tiroidea, metionina-R-sulfóxido reductasa, selenofosfato sintetasa 2; y selenoproteínas de función desconocida: la selenoproteína T o SELENOT, SELENO15, SELENOW, SELENOV, SELENOM, SELENOH, SELENOO, SELENOI, SELENOK, SELENOS y SELENON[1].

Dado que en esta tesis se abordó la función de la selenoproteína T, se resume debajo los antecedentes en relación esta selenoproteína.

1.2.1 Selenoproteína T

La SELENOT es una selenoproteína originalmente identificada en mamíferos mediante estudios *in silico* [34]. Experimentos de expresión en células de mamífero y utilizando el isótopo ⁷⁵Se permitieron detectar una selenoproteína del tamaño esperado teóricamente. Análisis computacionales adicionales de su secuencia aminoacídica, revelaron la presencia de genes ortólogos en otros organismos[34]. En la mayoría de las especies SELENOT posee el aminoácido Sec, no así en *C.*

⁵ Nota: el uso de la raíz SELENO seguido por una letra ha sido lo aceptado por el comité HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*) como nomenclatura de los genes de vertebrados (itálica para los genes). En *C. elegans*, las reglas de nomenclatura indican que los genes pueden ser nombrado por tres o máximo cuatro letras en minúscula itálica seguido por un número y las proteínas en mayúscula. Por lo tanto al referirse al gen que codifica para la selenoproteína T se utilizará el símbolo *selt* y la correspondiente proteína SELT.

elegans, cuyas SELENOT contienen Cys en la posición homóloga de Sec[34] (**Fig. 1.7**). Cabe aclarar que en estos casos donde hay Cys en la posición de Sec y la función es desconocida, la proteína retiene el nombre asignado a mamíferos, independientemente de si contiene Cys o Sec (en este caso Selenoproteína T).

<i>Mus musculus</i>	MR-----LLLLLLVAASAVRSEASANLGG-----	25
<i>Homo sapiens</i>	MR-----LLLLLLVAASAMVRSEASANLGG-----	25
<i>Xenopus tropicalis</i>	MARSSGPLCLLLLGGVLVAGILSGASADGNG-----	30
<i>Danio rerio</i>	MG----KMRWLPFSAALLLWALCLHSASADN-----	26
<i>Drosophila melanogaster</i>	MERLTGRNVALLVLCCLCAGYALVFAEAGEKE-----	30
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.1	MSRFGVFIIIGVLFMSVCDVLRTEEHSMDENHVHEKDDFEAEFGDETDSDQ	50
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.2	MSRSGAIIIGLFFIASIFDVFRAEKEPPAE-----DSRLEDYLSSELETT	45

Subdominio Trx I

<i>Mus musculus</i>	-----VPSKRLKMQYATGPLLKFQICVSUGYRRVFEE	57
<i>Homo sapiens</i>	-----VPSKRLKMQYATGPLLKFQICVSUGYRRVFEE	57
<i>Xenopus tropicalis</i>	-----LPSKLLKMQYTAGPLLKFQICVSUGYRRVFED	62
<i>Danio rerio</i>	-----NGVKMKMQFATGPLLKFQICVSUGYKRVFEE	58
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----IPVTKFGQNI--PTMTFLYCYSCGYRKAFED	60
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.1	SFSQGTEDHIEVREQSSFVKPTAVHAKDLPRLRIFYCVSCGYKQAFDQ	100
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.2	AIPT-----VVNENSHSQDVVDSGFSKDLPKLTIILYCVSCGYKQAFNQ	88

Dominio hidrofóbico

<i>Mus musculus</i>	YMRVISQRYPDIRIEGENYLPQPIYRHIASFLSVFKLVLIIGLIIVGKDPF	107
<i>Homo sapiens</i>	YMRVISQRYPDIRIEGENYLPQPIYRHIASFLSVFKLVLIIGLIIVGKDPF	107
<i>Xenopus tropicalis</i>	YMRVISQRYPDIRIEGENYLPHPYRNIASFLSVFKLVLIIGLIIVGKDPF	112
<i>Danio rerio</i>	YTQALYQRYPDIRIEGENYLPPLRYRHIASFLSMFKLLIIGVILGKDPF	108
<i>Drosophila melanogaster</i>	YVGLLGEKYPIQVNGGNYDPPGLNLYLSKMIIFALKIIIVSVVSAVSPF	110
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.1	FTTFAKEKYPNMPIEGANFAPVLWKAQVVAQALSFKMAVLLVLLGGINPF	150
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.2	FYEFKAKYKYPGLVIEGGNFSDFWKGCLAQIVGVAKIGLIAIVITGSNPF	138

<i>Mus musculus</i>	AFFGMQAPSIWQWGQENKQVYACMMVFFLSNMIENQCMS	157
<i>Homo sapiens</i>	AFFGMQAPSIWQWGQENKQVYACMMVFFLSNMIENQCMS	157
<i>Xenopus tropicalis</i>	AFFGMQAPSVWQWGQENKQVYACMMVFFVSNMIENQCMS	162
<i>Danio rerio</i>	ALCGMQAPGIWVWSQENKIYACMMVFFVSNMIENQCMS	158
<i>Drosophila melanogaster</i>	TFLGLNTPSWWSHMQANKIYACMMIFFLGNMLEAQLISSGAFETLNDVP	160
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.1	ERFGLGYPQILQHAHGNKMSCLVFMGLNVEQSLISTGAFEVYLGNEQ	200
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.2	EYIGFGYPQILQTAHYNRFSYLLVFMIGNLFESTLSSGAFETLNDVP	188

Subdominio Trx II

<i>Mus musculus</i>	VWSKLESGHLPSMQQLVQILDNEMKLNVMDSIP-HHRS----	195
<i>Homo sapiens</i>	VWSKLESGHLPSMQQLVQILDNEMKLNVMDSIP-HHRS----	195
<i>Xenopus tropicalis</i>	VWSKLESGHLPSVQQLVQIILDNEMKLNVMDAIPHHRS----	201
<i>Danio rerio</i>	VWSKLESGHLPSMQQLVQI-----	177
<i>Drosophila melanogaster</i>	VWSKLQTRGFPSPEVLFQIIDNHLQFTEKVQENPDFVK-----	198
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.1	IWSKIESGRVPSPEFQMQLIDAQQLAVLGKAPVNTESFGEFQQTIV	244
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.2	IWSKISKERVPTQEEFLNLIIDLQKLTIR-----	216

Fig. 1.7: Secuencias aminoácidas de SELENOT de diferentes especies. El presunto motivo redox (CxxC) está resaltado en color gris. Este motivo puede contener Sec (U) o Cys (C) en la posición homóloga dependiendo de la especie. En naranja se indica el motivo conservado de la familia Redoxinas (Rdx) en el extremo C-terminal. En color gris claro se indica la región hidrofóbica que divide la unidad de plegamiento tiorredoxina, este último indicado en líneas violetas.

1.2.1.1 Estructura

Esta proteína posee un motivo redox N-terminal del tipo CxxU (e.g. humano) o CxxC (e.g. *C. elegans*) en una unidad de plegamiento tiorredoxina (Trx) y un motivo tGxFEI (las mayúsculas corresponden a residuos altamente conservados; las minúsculas a residuos más frecuentemente observados en esa posición y la x a cualquier residuo) conservado en la región C-terminal (**Fig. 1.7**)[35].

Es importante señalar algunas características de la unidad de plegamiento Trx. El dominio Trx tiene una estructura de $\alpha\beta$ con el siguiente orden de elementos de estructura secundaria: $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\alpha 2-\beta 3-\beta 4-\alpha 3$; este dominio puede ser dividido en dos subdominios, conectados por la hélice $\alpha 2$. Esta estructura permite la inserción adicional de segmentos tanto hacia el extremo C-terminal como hacia el N-terminal del dominio Trx, así como también la inserción antes o después de la hélice $\alpha 2$ [36] (**Fig. 1.8**).

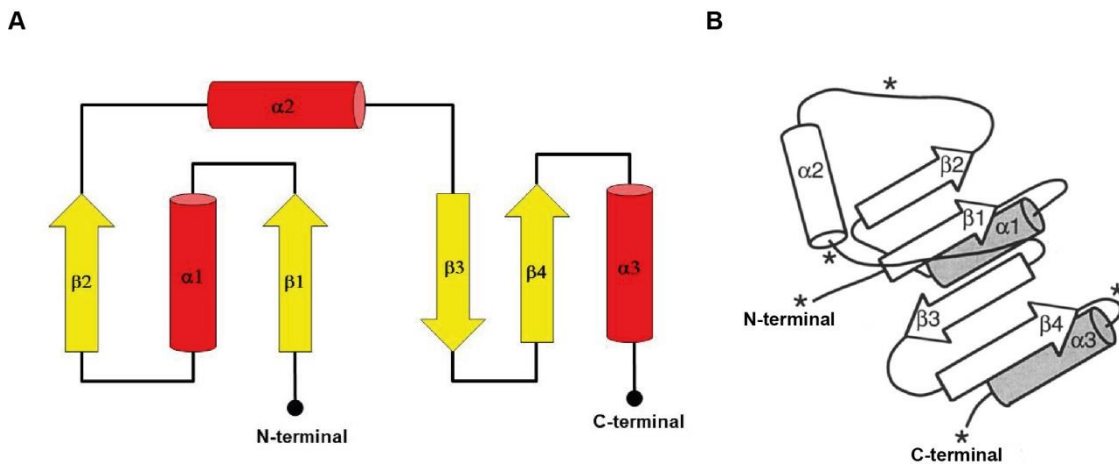


Fig. 1.8: Esquema de la unidad de plegamiento tiorredoxina. Se representa en forma de flechas las hebras β y como cilindros las hélices α . **A:** Estructura secundaria de la unidad de plegamiento tiorredoxina. **B:** Representación en el espacio de los elementos de estructura secundaria de la unidad de plegamiento tiorredoxina. Modificado de [36].

Esta estructura general y motivos específicos definen y caracterizan una familia de proteínas con plegamiento Trx denominada Redoxinas (Rdx). Esta familia incluye cuatro selenoproteínas de mamífero (SELENOT, SELENOV, SELENOW y SELENOH) y otras proteínas presentes en los tres dominios de lo viviente[35].

Una importante diferencia de la familia Rdx con la clásica unidad de plegamiento Trx, es la ausencia de la hélice $\alpha 2$ en al menos algunos integrantes de la misma, incluyendo SELENOT[35]. SELENOT es una Rdx particular ya que posee una inserción de alrededor de 70 aminoácidos, presuntamente transmembrana, entre los dos subdominios Trx (en la ubicación correspondiente a la hélice $\alpha 2$ que

conecta a los dos subdominios en la unidad de plegamiento Trx) (**Fig. 1.7**). Según predicciones *in silico* esta inserción contendría cuatro hélices α [37] (**Fig. 1.9**).

En el extremo N-terminal SELENOT posee una secuencia predicha por el servidor *SignalP* como un péptido señal, pero en dos trabajos independientes se demostró que la remoción del mismo no afecta la localización de la proteína[35].

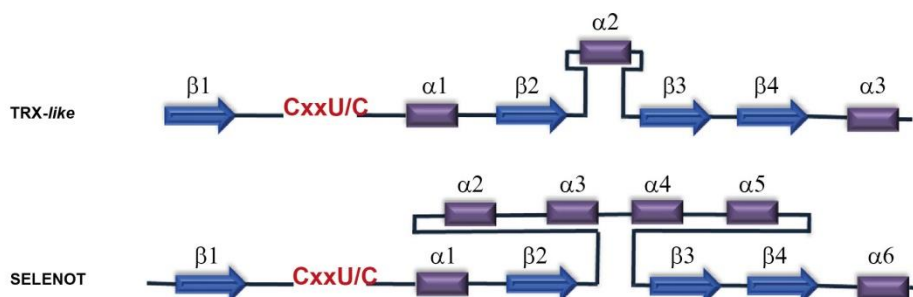


Fig. 1.9: Comparación de estructura secundaria de SELENOT con la unidad de plegamiento tioredoxina. Se representa en forma de flechas las hebras β y como rectángulos las hélices α . SELENOT posee una inserción de 4 hélices α en el lugar de la hélice $\alpha 2$ del core mínimo del dominio Trx. Tomado de [168].

1.2.1.2 Localización subcelular

La localización subcelular de SELENOT en células mamíferas es el retículo endoplasmático (RE)[38], pero no exclusivamente, localizándose también en aparato de Golgi [35,39] y ocasionalmente en la membrana plasmática[40].

La naturaleza hidrofóbica de las cuatro hélices α que dividen el dominio Trx sugiere que la proteína estaría anclada a la membrana del RE. Hay evidencia que la localización subcelular de SELENOT de ratón se debe a este dominio hidrofóbico ya que la delección de las regiones de los residuos 85-103 y 125-144 resultan en una localización de la proteína en el citosol[39,40]. El largo de esta región es suficiente para atravesar la membrana del RE al menos dos veces y poder formar el dominio Trx globular completo, bien hacia el lumen del RE (**Fig. 1.10 A**) o bien hacia el citosol (**Fig. 1.10 B**). Otra posibilidad sugerida es que SELENOT no sea una proteína de membrana y que esta región hidrofóbica interactúe con otra proteína del RE manteniéndola así en el compartimento (**Fig. 1.10 C**)[37], ya que SELENOT no posee la conocida secuencia de retención del RE, KDEL.

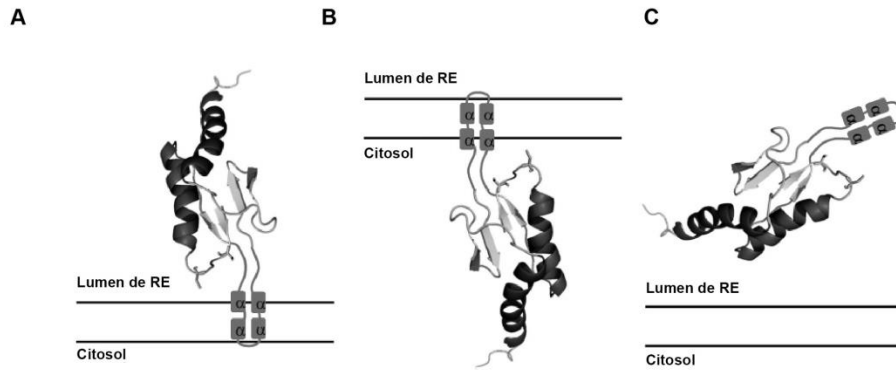


Fig. 1.10: Representación de tres posibles variantes de la topología de SELENOT en el retículo endoplasmático (RE). A y B: SELENOT mostrada como proteína de membrana, con el dominio tiorredoxina en el lumen del RE (A) o en el citosol (B). En C, SELENOT es representada como una proteína residente de RE. Tomado de [37].

1.2.1.3 Expresión celular

Estudios en rata indicaron que SELENOT es expresada en la mayoría de las estructuras embrionarias y luego esta expresión ubicua se restringe sólo a determinados órganos del adulto[35,39].

Análisis en diferentes estadios de embriones de rata determinaron que SELENOT se expresa ubicuamente y en los estadios más tardíos con una mayor expresión en cerebro, glándulas salivares, timo, pulmón y glándulas suprarrenales. En los adultos, se estudió el nivel de expresión del ARNm en diferentes tejidos y se determinó que el mayor nivel se encuentra en el lóbulo anterior de la pituitaria y en testículos; niveles moderados en cerebro, bazo, riñones y el nivel más bajo en corazón[39]. Otro estudio, detectó que en ratones el mayor nivel de ARNm de SELENOT en adultos se encuentra en riñón, encéfalo, corazón, timo y testículo[35].

La localización de SELENOT en el encéfalo adulto se restringe a una subpoblación de astrocitos concentrados a lo largo de la *rostral migratory stream* o RMS (la RMS es el camino que sigue un grupo de precursores neuronales que migran desde la zona subventricular anterior del cerebro hasta el bulbo olfatorio en mamíferos adultos[41]) y en las células de Bergmann en el cerebelo[42]. Experimentos de hibridación *in situ* en embriones de *Danio rerio* determinaron la expresión de los tres genes SELENOT en este animal. SELENOT2 muestra una expresión ubicua en el embrión y SELENOT1b también mostró una amplia expresión pero con una mayor acumulación en células de la sangre. El tercer parólogo, SELENOT1a se expresó predominantemente en células fotorreceptoras de los ojos y en las vesículas olfativas[43].

1.2.1.4 Función

SELENOT es una de las selenoproteínas cuya ausencia causa letalidad embrionaria en mamíferos[44]. El mecanismo de acción de SELENOT no se entiende completamente, pero se ha reportado el efecto de esta proteína en diferentes procesos fisiológicos y condiciones fisiopatológicas.

Se ha propuesto el rol de SELENOT en la regulación de la homeostasis del calcio (Ca^{2+}) a través de un mecanismo redox y en la secreción neuroendócrina en células en diferenciación y proliferación, en respuesta al neuropéptido pituitario activador de la adenilato ciclasa (PACAP)[39]. A partir de estudios en la línea celular PC12 (línea celular que deriva de células adrenales de rata) se ha evidenciado que la sobreexpresión de *SELENOT* silvestre, pero no la mutante de Sec→Ala, aumenta los niveles de Ca^{2+} intracelular y su silenciamiento afecta la movilización del Ca^{2+} desde el RE al citosol, movilización disparada por PACAP[39]. Este neuropéptido, actúa a través de receptores acoplados a proteína G y se lo vincula con la inducción de diferenciación de neuroblastos y la regulación de la biosíntesis y secreción de catecolaminas y neuropéptidos. Además, la expresión de *SELENOT* está regulada por los niveles de AMPc y Ca^{2+} intracelular los cuales son regulados por PACAP. A partir de los datos obtenidos, se ha propuesto un modelo del mecanismo de señalización involucrado en la regulación de la expresión de *SELENOT*: La unión de PACAP a sus receptores (PAC1-R, VPAC1-R y VPAC2-R) induce la activación de la cascada de señalización adenilato ciclasa (AC)/AMPc/ proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y la expresión génica de *SELENOT*. Una vez que SELENOT se localiza en el RE podría interactuar directa o indirectamente con canales o bombas de Ca^{2+} regulando así su actividad y la actividad secretoria de la célula[39] (**Fig. 1.11**).

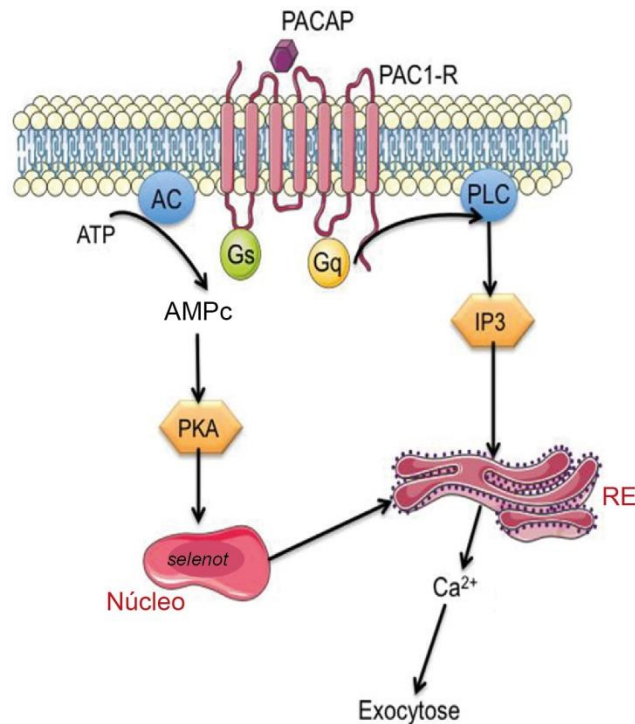


Fig. 1.11: Modelo propuesto de regulación de expresión de SELENOT y su rol en la homeostasis del calcio. Como consecuencia de la unión del neuropéptido PACAP con su receptor (PAC1-R) se activan las proteínas adenilato ciclasa (AC) y fosfolipasa C (PLC). La activación de la AC genera un aumento de AMPc y la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) afectando la expresión génica de *SELENOT*. Paralelamente, la activación de la PLC aumenta el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) el cual se une a los receptores de IP3 (IP3R) del retículo endoplasmático (RE) involucrados en el transporte de Ca^{2+} . Una vez que SELENOT se localiza en el RE podría regular la movilización del Ca^{2+} , por ejemplo modulando la respuesta de los IP3R. Tomado de [168].

En el páncreas, SELENOT es particularmente abundante en células productoras de insulina y somatostatina. Dado que PACAP y Ca^{2+} son dos factores involucrados en la secreción de insulina, se estudió el vínculo de SELENOT en esta función. Ratones KO condicionales deficientes en *SELENOT* en células β del páncreas exhiben intolerancia a la glucosa debido a una deficiencia en la producción o secreción de insulina en respuesta a PACAP[42]. Este rol en la secreción hormonal en células endócrinas también lo apoya un trabajo reciente que describe a SELENOT como una subunidad del complejo oligosacaryltransferasa tipo A (OST) indispensable para su integridad, para la homeostasis del RE y la secreción de hormonas glicoproteicas. Experimentos utilizando la línea celular AtT20 (células endócrinas secretoras de hormona corticotropina) determinaron que SELENOT es esencial en la producción basal e inducida de la hormona dado que la estimulación con el factor estimulante de corticotropina induce la expresión de *SELENOT*[40]. En estas células, la deficiencia en SELENOT elimina la secreción hormonal, genera un

aumento de componentes de la respuesta a proteínas mal plegadas de RE (Atf-6, Atf-4, ChoP, Bip) y aumenta la sensibilidad a inductores de estrés de RE (tunicamicina y DTT). Experimentos de coimmunoprecipitación revelaron una alta asociación de SELENOT con algunos miembros del complejo OST y la interferencia de su expresión tiene un directo impacto en la estabilidad de dicho complejo (**Fig. 1.12**)[40].

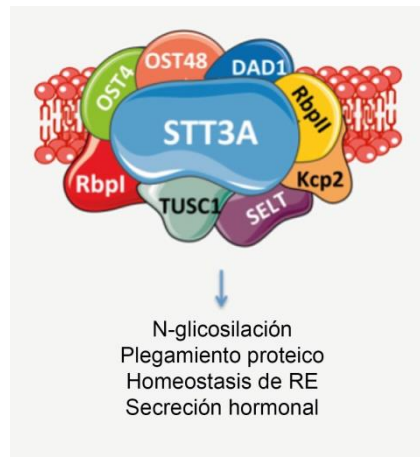


Fig. 1.12: SELENOT como subunidad del complejo oligosacariltransferasa (OST). El complejo OST está involucrado en la N-glicosilación, plegamiento y secreción de hormonas en células endócrinas. Tomado de [168].

En fibroblastos de ratón, se observó que la disminución de la expresión de *SELENOT* se veía acompañada por dos fenómenos: un aumento de la expresión de *SELENOW* y una disminución de la adhesión celular[45]. Si bien la función exacta de *SELENOW* no se conoce, se han identificado algunos blancos directos que apoyan su posible función antioxidante dependiente de glutatión (GSH)[35,46]. A pesar de que el perfil de localización subcelular de *SELENOT* y *SELENOW* se supone diferente, ambas pertenecen a la misma familia (Rdx) y este aumento de la expresión de *SELENOW* podría ser una compensación de la disminución de *SELENOT*. Este presunto rol óxidorreductasa de *SELENOT*, también es sugerido por el aumento de la expresión de genes de otras óxidorreductasas, en particular la carbonil reductatasa-3, la superóxido dismutasa- 1 y glutatión S transferasa[45].

Por otro lado, fue observado que la expresión de *SELENOT* es altamente inducida en las células del hígado durante el proceso de regeneración que ocurre luego de una parcial hepatectomía[38]. Estos datos apoyan que *SELENOT* estaría asociada con la ontogénesis, maduración de tejidos y mecanismos de regeneración, sugiriendo un rol esencial en el crecimiento celular y la actividad neuronal y endócrina.

Dado que la contracción del músculo liso es activada por Ca^{2+} -calmodulina y *SELENOT* ha sido descrita como reguladora de la homeostasis del Ca^{2+} , junto con evidencia que involucra a la deficiencia de Se con un mal funcionamiento muscular, se estudió el rol de *SELENOT* en este tejido. Concretamente se cuantificó la expresión génica a nivel de ARNm en músculo liso de distintos órganos en ratas con diferentes dietas de Se. El estudio demostró la sensibilidad de la expresión de *SELENOT* a la disponibilidad de Se y que el nivel de ARNm fue mayor en músculo de intestino y vasos sanguíneos en comparación con los otros tejidos[47]. Además, experimentos en el músculo liso de estómago confirman que el contenido de Ca^{2+} y calmodulina está regulado por *SELENOT*, por lo tanto se vincula a *SELENOT* con el funcionamiento de este tejido[48].

También hay reportes que adjudican a *SELENOT* un rol en el cerebro. Estudios en ratones KO condicionales deficientes en *SELENOT* en el sistema nervioso determinó que el tamaño de distintas estructuras del encéfalo de estos ratones es menor que el de los silvestres durante la primer semana de vida. Esto se asoció a la pérdida de neuroblastos y se podría relacionar con un aumento de niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) conduciendo a la apoptosis neuronal. En el estadio adulto, las alteraciones morfológicas desaparecen; sin embargo, los ratones tienen un comportamiento hiperactivo. Esto sugiere el rol de *SELENOT* en la protección de las neuronas en diferenciación y su requerimiento para el correcto funcionamiento en el adulto[49]. Con estos mismos ratones se demostró que son más sensibles al desarrollo de la enfermedad de Parkinson inducida por neurotoxinas (MPTP y rotenona), generando una discapacidad motora asociada con el estrés oxidativo y la neurodegeneración dopaminérgica. En ratones silvestres expuestos a las neurotoxinas MPTP y rotenona, se observa un aumento de la expresión de *SELENOT* en neuronas dopaminérgicas (DA) y astrocitos de la vía nigroestriatal, indicando que *SELENOT* está cumpliendo un rol en la prevención de la neurodegeneración. El efecto motor generado por las neurotoxinas se asocia a la disminución de la actividad tirosina hidroxilasa y por lo tanto disminución de contenido de dopamina. Este fenómeno se ve potenciado en ausencia de *SELENOT*, confirmando así su rol en la protección de las neuronas DA del estrés oxidativo[44] (**Fig. 1.13**). También está reportado un aumento de la expresión de *SELENOT* en cerebro de ratones sometidos a condiciones de hipoxia, pero la razón de este hecho se desconoce[50]. Todos los resultados sugieren que *SELENOT* juega un rol importante en el sistema nervioso en etapas tempranas así como un rol protector bajo condiciones de estrés.

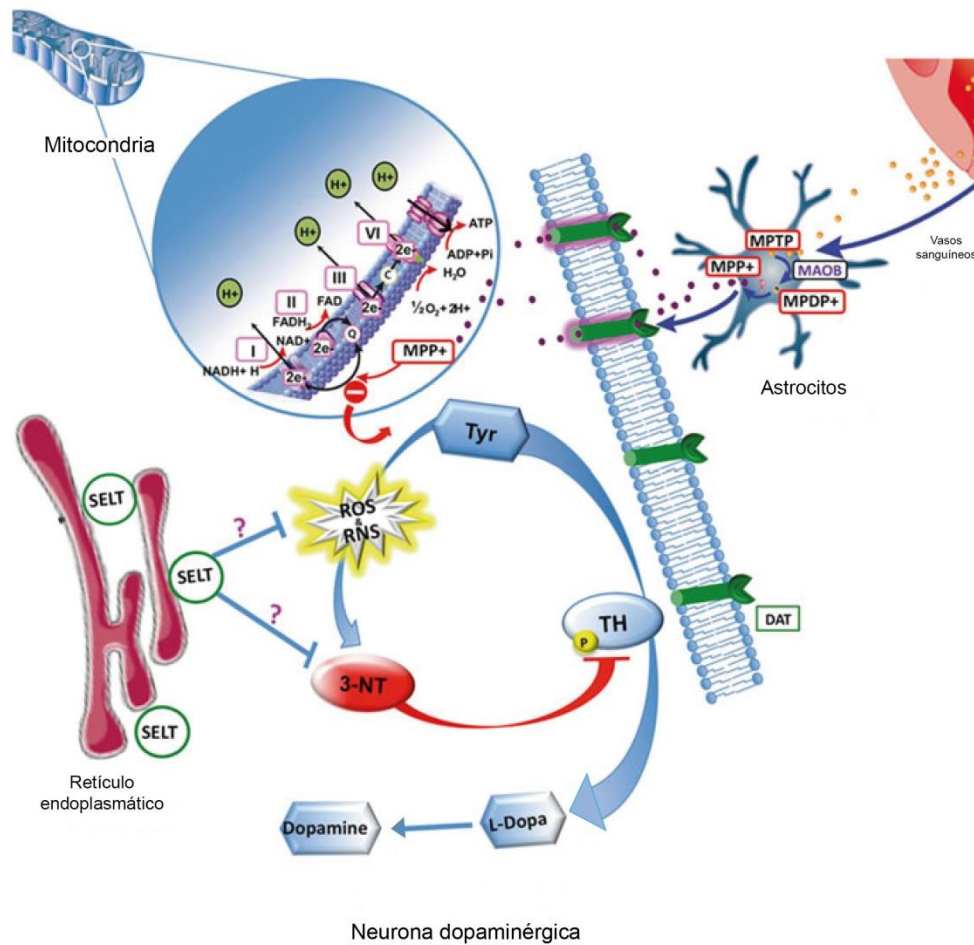


Fig. 1.13: Representación esquemática del efecto de SELENOT en neuronas dopaminérgicas luego de la administración de MPTP en ratones. La neurotoxina es tomada de la sangre a los astrocitos donde es convertido a MPP⁺ por la monoamina oxidasa B (MAOB). MPP⁺ es transportado al interior de la neurona por el transportador de dopamina (DAT), donde bloquea el complejo mitocondrial I conduciendo al estrés oxidativo. La producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS y RSN) conduce a la producción de 3-nitrosotirosina (3-NT) entre otros. Estos compuestos oxidantes, inhiben la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH), cuya forma activa es la fosforilada. La actividad de la TH consiste en la conversión de L-tirosina (Tyr) en L-3-4 dihidrofenilalanina (L-DOPA), precursor de dopamina. Tomado de referencia [169].

1.3 Metabolismo del selenio: lo que se conoce y desconoce

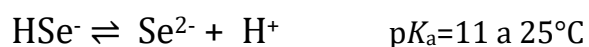
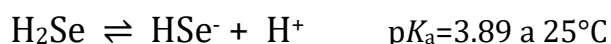
A pesar de los avances que ha habido sobre el metabolismo del Se, en particular sobre la biosíntesis y decodificación de Sec y la importancia de las selenoproteínas, quedan aún numerosas interrogantes en relación a otros aspectos del metabolismo de este oligoelemento. En efecto, se conoce poco en relación a su absorción, interconversión de especies químicas, detoxificación y excreción. En esta sección se incluyó información fragmentada, proveniente de diferentes organismos en los que hay diferentes tipos de estudios realizados.

1.3.1 Selenuro de hidrógeno: un metabolito intermediario clave

Diversos compuestos orgánicos e inorgánicos del Se son utilizados como fuente de Se, esto sugiere que las distintas formas químicas son transformadas a un intermediario común que luego será utilizado en la síntesis del selenocisteinil-ARNt^{Sec} encargado de la incorporación del aminoácido Sec en la cadena polipeptídica[51].

Está ampliamente aceptado que el selenuro de hidrógeno (y su forma deprotonada hidroselenuro) se encuentra en la intersección de varias vías metabólicas[32]. Está descrito el uso de selenuro de hidrógeno como fuente de Se para la enzima selenofosfato sintetasa (SPS) que lo utiliza como sustrato (*in vitro* y se presume *in vivo*) para la formación de selenofosfato (SePO₃³⁻), el dador de Se en la síntesis de Sec[52].

En solución acuosa el selenuro de hidrógeno se comporta como un ácido, la primera disociación tiene un pK_{a1} de 3.89 y se forma el anión hidroselenuro (HSe⁻) y la segunda disociación tiene pK_{a2} de 11 formándose el anión selenuro(2-) (Se²⁻)[53]. Las ecuaciones de equilibrio se muestran a continuación:



A pH=7.4 la forma predominante en solución acuosa es el anión HSe⁻. En esta tesis se va a nombrar “selenuro de hidrógeno” o “H₂Se” a la mezcla de H₂Se y HSe⁻ en solución acuosa a pH fisiológico.

El H₂Se es muy reactivo y se piensa que no podría estar presente en su forma libre[51]. La Km determinada para el Se en experimentos *in vitro* utilizando SPS y H₂Se, es elevada en relación a las concentraciones que son tóxicas *in vivo* y esto sugiere que si el sustrato real de la SPS es el H₂Se, *in vivo* el Se tendría que ser transferido directamente a la SPS. Estudios de la enzima Sec-liasa (enzima que reduce Sec formando alanina y H₂Se) han mostrado que el H₂Se obtenido a partir de Sec se une covalentemente a un residuo de Cys particular de la enzima (Cys375 en Sec-liasa de rata) y de esta manera es capaz de proveer de Se a la SPS *in vitro*.

Dado esto se propone que esta interacción entre proteínas sucede *in vivo*[52,54]. Por lo tanto, lo aceptado hasta ahora es que el H₂Se es el metabolito intermediario central del metabolismo asimilativo del Se.

1.3.2 Ingreso a las células y metabolización intracelular de formas orgánicas del selenio: selenometionina y selenocisteína.

En células animales, el mecanismo de absorción de las distintas formas del Se no es totalmente comprendido.

La selenometionina (SeMet) es la forma predominante de Se en la dieta[3,55]. El principal mecanismo por el cual es internalizado en las células epiteliales del intestino es a través de los sistemas de transportadores que transportan metionina[55]; mediante experimentos en oocitos de *Xenopus laevis* (expresando transportadores individuales) se evidenció que SeMet puede ser transportada por los sistemas de transporte B⁰AT1, B^{0,+r}BAT y SIT1[56].

Dentro de la célula, se han identificado dos vías metabólicas que convierten SeMet en H₂Se. Por una vía, SeMet puede ingresar en el ciclo de la metionina, ser convertida en seleno-homocisteína y luego metabolizada a Sec por la denominada vía de transelenación (análoga a la vía de transulfuración) que involucra a las enzimas cistationina β sintasa y cistationina y liasa[51].

La otra vía involucra también a la enzima cistationina y liasa y consiste en la transformación de SeMet en metil-selenol (CH₃SeH), metabolito importante en la síntesis de selenoproteínas, el cual sería desmetilado para formar el intermediario H₂Se[57], sin bien ésta reacción no se ha observado de manera directa.

Adicionalmente la SeMet puede ser incorporada de manera inespecífica en las proteínas en el lugar de metionina, dado que es sustrato de la metionil-ARNt^{Met} sintetasa[58].

La Sec que es incorporada en las selenoproteínas, es sintetizada en el propio ARNt^{Sec} como se describe en la sección 1.1.2. La existencia de Sec libre dentro de la célula es minoritaria probablemente debido a la reactividad de este compuesto, sin embargo en el contexto de un complejo que disminuya su reactividad podría ingresar a las células. También se puede generar Sec como producto de la proteólisis de selenoproteínas dentro de las células y ser utilizada como fuente de Se. No se conoce un mecanismo por el cual Sec ingrese a la célula, pero su absorción sería tan eficaz como la de SeMet[3]. A partir de experimentos en oocitos de *X. laevis* (expresando transportadores individuales) se determinó que la metil-Sec (CH₃-Sec) puede ser transportada al interior de las células por los sistemas de transporte B⁰AT1, B^{0,+r}BAT y SIT1 y los compuestos cistina y selenocistina por el sistema B^{0,+r}BAT[56].

En el interior de la célula, la Sec es el sustrato específico de la enzima Sec-liasa que cataliza su descomposición en alanina y H_2Se , de esta manera el Se puede ser reciclado para la síntesis de nuevas selenoproteínas[32,59].

La **Fig. 1.14** esquematiza la metabolización intracelular de distintas formas del Se descritas en mamíferos, incluyendo lo descrito en este apartado.

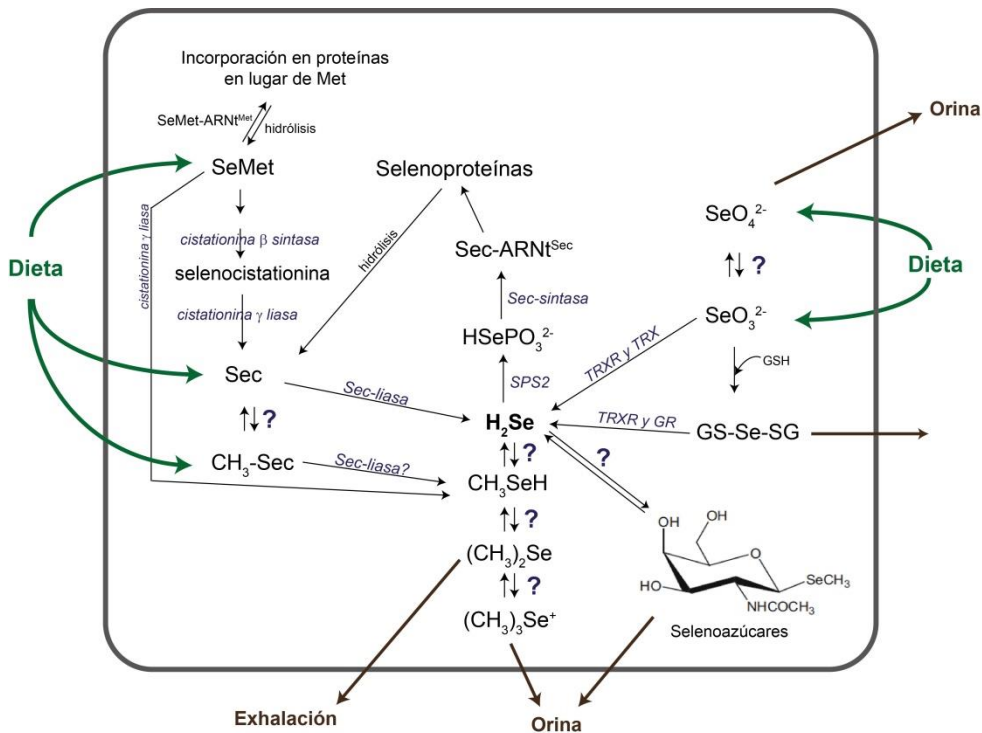


Fig. 1.14: Representación que reúne las vías conocidas del metabolismo intracelular de formas del selenio obtenidas en la dieta y sus formas de excreción en distintos tipos de células mamíferas. SeO_3^{2-} : Selenito, SeO_4^{2-} : Selenato, SeMet: Selenometionina, Sec: Selenocisteína, H_2Se : Selenuro de hidrógeno, CH_3SeH : Metilselenol, $HSePO_3^{2-}$: Selenofosfato, $(CH_3)_2Se$: Dimetilselenuro, $(CH_3)_3Se^+$: Trimetilselenonio, GS-Se-SG: Selenodiglutación, TRX: Tiorredoxina, TRXR: Tiorredoxina reductasa, GR: Glutación reductasa, GSH: Glutación reducido, SPS2: Selenofosfato sintetasa, Sec-ARNt^{Sec}: Selenocisteinil-ARNt^{Sec}, SeMet-ARNt^{Met}: Selenometionil-ARNt^{Met}. Las interconversiones de los compuestos con selenio representadas incluyen reacciones/transporte ubicuos y tejidos específicos.

1.3.3 Ingreso a las células de formas inorgánicas del selenio: selenito y selenato y metabolización intracelular.

Selenito (SeO_3^{2-}) y selenato (SeO_4^{2-}) son las principales formas inorgánicas del Se relevantes para los seres vivos. Estas especies son transportadas al interior de las

células por diversas permeasas, que si bien varían según los organismos, en general utilizan transportadores de sulfoaniones.

En bacterias se han identificado diferentes formas de ingreso de selenito y selenato. Estudios en *E. coli* muestran que el ion selenato, y en menor medida el selenito, ingresan a la célula a través del complejo transportador sulfato permeasa (formado por los genes *cysA*, *cysU*, *cysW* y *cysP*) pero se postula la existencia de un sistema de transporte adicional para el selenito el cual se desconoce[60]. Esto se apoya en *Clostridium pasteurianum*, *Salmonella entérica* y *Rhodobacter sphaeroides* donde se evidencia que la asimilación de selenato y selenito involucra dos sistemas de transportadores, uno para cada oxianión[61,62]. Por otra parte, en *E. coli* se identificó el gen *gutS*, cuya expresión aumenta en presencia de selenito, y se propone como posible transportador implicado en el transporte de selenito, si bien no sería el principal[62].

Adicionalmente en *R. sphaeroides* identificaron a la proteína codificada por el gen *smoK*, el cual se propone es un transportador de la familia de transportadores de unión a ATP (transportadores ABC) involucrado en la absorción de azúcares. La concentración inhibitoria mínima de selenito en bacterias mutantes en este gen aumenta 10 veces comparado con bacterias silvestres[61].

En levaduras, a pesar de que sus genomas no codifican para selenoproteínas, éstas asimilan Se: *Saccharomyces cerevisiae* cultivada con selenito o selenato es capaz de producir SeMet que será incorporada inespecíficamente en las proteínas en lugar de metionina[63]. Se han identificados diversos mecanismos de ingreso de las formas inorgánicas de este elemento. En *S. cerevisiae* se demostró que los transportadores de sulfato Sul1p y Sul2p son capaces de transportar selenato[64]. Por otro lado, se observó que los transportadores de fosfato Pho84p, Pho87p, Pho90p y Pho91p son transportadores que unen selenito según la concentración de fosfato en el medio[65]. El ingreso de selenito por transportadores de fosfato también ha sido reportado en la levadura *Candida albicans*[66], en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* y en varias especies de plantas[66]. Adicionalmente, el transportador de monocarboxilatos de cadena corta Jen1p (e.g. lactato y piruvato), también se ha descrito como involucrado en el transporte de selenito[67]. Sin embargo en todos los casos, se propone la existencia de algún sistema adicional de transporte de estos iones aún no descubierto.

En mamíferos la identidad de proteínas transportadoras de los iones selenito y selenato es incierta, pero hay evidencia en algunos tipo celulares acerca de sistemas de transporte involucrados.

Experimentos en células epiteliales de intestino utilizando inhibidores de la familia de transportadores de aniones SLC26, bloquean el transporte de selenato y el uso de sustratos como sulfato y oxalacetato también generan el mismo impacto en el transporte de selenato[11]. En ratas, el selenito administrado por vía intravenosa es internalizado selectivamente en los eritrocitos por el transportador que media el

intercambio de aniones, denominado banda 3 o SLC4A1[68]. Sin embargo, se desconoce el transporte de estos compuestos en otros tipos de células, y los mecanismos moleculares de los antes mencionados.

Una vez dentro de la célula, el selenito y selenato deben de ser reducidos a selenuro para poder ser incorporados como Sec en las selenoproteínas. Las vías metabólicas involucradas en este proceso no están totalmente dilucidadas y difieren en distintos organismos. Por simplicidad en esta revisión omitimos aspectos del metabolismo bacteriano, ausentes en los organismos eucariotas.

En muchos organismos, el GSH es considerado como un componente clave en la metabolización intracelular del Se; se propone que participa en la reducción no enzimática del selenito como primer paso en la conversión de selenito a H_2Se [60], el cual luego es utilizado en la síntesis de selenoproteínas[69]. Hay muchos posibles intermediarios del Se en estas reacciones con GSH, pero distintos experimentos demuestran que el selenodiglutatión (GS-Se-SG) es el principal producto formado[60,70].

Experimentos *in vitro* proponen al selenito y al selenodiglutatión como sustratos de la TRXR y tiorredoxina (TRX) en mamíferos [70,71] y de la tiorredoxina en *E. coli* (en *E. coli* la tiorredoxina reductasa (TrxR) no utiliza directamente el selenito o selenodiglutatión como sustrato, sino que sólo la tiorredoxina (Trx) es capaz de reducir al selenito o selenodiglutatión)[70,71]. Por otro lado, hay reportes que indican que la glutatión reductasa (GR) de mamíferos (y también la de levaduras) utiliza al selenodiglutatión como sustrato, no así la de *E. coli*[70]. Esta reducción del selenodiglutatión a glutatión-selenol (GS-SeH) por la GR y sistema tiorredoxina ha sido correlacionada con la biosíntesis de selenoproteínas en experimentos *in vitro*[70].

En suma, lo aceptado actualmente es que la reducción del selenito a selenuro puede ser llevada a cabo directamente por TRX y TRXR o vía el intermediario selenodiglutatión por la GR, TRXR y TRX[32,70,71] formando H_2Se el cual es utilizado para la síntesis de Sec [52]. Esto es consistente con resultados que muestran que la expresión de la GR y TRX son inducidas en cultivos de *R. sphaeroides* en presencia de selenito[61] y de GR, TRXR y TRX en *E. coli* con selenito[72].

El selenato no puede ser directamente reducido por GSH [51] por lo tanto, cuándo, dónde y cómo el selenato es reducido a selenito en mamíferos no está claro[73].

La **Fig. 1.14** incluye las vías de metabolización intracelular de las formas inorgánicas del Se descritas en mamíferos.

1.3.4 Rutas del selenio a nivel sistémico.

Las distintas formas de Se que ingresan con la dieta son internalizadas por el epitelio intestinal por distintos mecanismos, algunos conocidos, tratados en los

apartados anteriores. Diferentes selenocompuestos son transportados por la circulación sanguínea al hígado donde se sintetiza el principal transportador sistémico descrito fuente de Se del resto de los tejidos[74].

Los mecanismos involucrados en la salida de los selenocompuestos a la circulación así como el ingreso al hígado no se comprenden totalmente.

Como se mencionó anteriormente, en ratones el selenito administrado por vía intravenosa ingresa a los eritrocitos por el transportador SLC4A1 y se propone que es reducido a selenuro, liberado al torrente sanguíneo y se une mayoritariamente a la albúmina hasta ser transferido a los hepatocitos[51,68]. Los mecanismos involucrados en el eflujo y la unión a la albumina se desconocen[69]. Un mecanismo similar podría ser utilizado en los enterocitos como mecanismo de transporte del Se hacia el hígado, pero eso no ha sido identificado.

El mecanismo de ingreso de los selenocompuestos al hígado no ha sido totalmente dilucidado. Para el selenato se propone que ingrese a través del sistema de transporte de fosfato[51]. En el hígado los selenocompuestos son incorporados en la síntesis de selenoproteínas y en la forma de SELENOP es distribuido por la sangre al resto de los tejidos. SELENOP es el principal transportador sistémico de Se descrito y es principalmente sintetizado en el hígado[74].

En distintas células se han descrito receptores que median la endocitosis de SELENOP y por tanto el ingreso del Se a dichas células[75]. En los riñones, el receptor que se propone mediaría el ingreso de SELENOP a las células es Lrp2[76]. En las células de Sertoli murinas se detectaron vesículas con SELENOP y el receptor con el que interactúa es Lrp8[77]. En el sistema nervioso, Lrp2 estaría involucrado en la absorción de SELENOP en el plexo coroideo y células endimarias, mientras que Lrp8 (altamente expresada en neuronas) sería responsable de absorción de Se en las neuronas[74]. Resta dilucidar el mecanismo de ingreso de SELENOP en células que expresan selenoproteínas pero no expresan ninguno de los receptores caracterizados. Adicionalmente, SELENOP también es expresada en la mayoría de los tejidos donde actúa como reserva intracelular de Se. Se ha propuesto que la biosíntesis local de SELENOP sería importante en la protección del cerebro en condiciones de deficiencia de Se [78].

1.3.5 Detoxificación y excreción de selenio de las células.

Algunas bacterias y arqueas utilizan como mecanismo de detoxificación la reducción de oxianiones de Se a Se elemental (Se^0), el cual carece de toxicidad. Los gránulos de Se pueden generarse en el espacio periplásmico, asociado a la membrana celular o incluso extracelularmente, pero se desconoce el mecanismo de formación de estas partículas[79]. En *E. coli* se demostró que el crecimiento de estas bacterias en presencia de selenito resulta en la acumulación de Se^0 en la

membrana plasmática y en la pared celular[80]. Las bacterias *Rodospirillum rubrum* también reducen selenito, pero el Se elemental es exportado al exterior celular y en *R. sphaeroides* se acumulan en el citoplasma[61]. El número de microorganismos capaces de reducir selenito para formar estas partículas de Se⁰ es mucho mayor que los que utilizan selenato[79].

Otra forma de excreción del selenito y selenato descrito en bacterias implica procesos de metilación convirtiéndolos en compuestos volátiles, como el dimetilselenuro (CH₃SeCH₃) y dimetildiselenuro (CH₃SeSeCH₃) entre otros, y en algunas especies se han identificados metilasas responsables de estos procesos[79].

Las mismas estrategias de detoxificación fueron evidenciadas en *S. cerevisiae* y en *Aspergillus funiculosus*; organismos crecidos en altas concentraciones de selenito, acumulan el Se en vacuolas en forma de partículas de Se⁰[81]. Asimismo, formas metiladas del Se también han sido reportadas y se han sugerido diversas vías de metilación e identificado metilasas capaces de metilar especies de Se [79].

En mamíferos se ha descrito la eliminación del Se por dos vías principales: como selenoazúcares o como derivados metilados.

Los selenoazúcares son los principales metabolitos del Se en la orina. Se-metil-N-acetil-D-galactosamina (o selenoazúcar 1) es encontrado en la orina dentro de un rango de Se por debajo del nivel tóxico[82]. Otros selenoazúcares han sido identificados en la orina[83]. Los transportadores responsables de la exportación celular de estos compuestos no se han identificado. En condiciones de mayor cantidad de Se (rango tóxico), a los selenoazúcares se les suma trimetilselenonio ((CH₃)₃Se⁺), también eliminado en la orina, y dimetil selenuro, que es exhalado en la respiración[84]. Se propone que una metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina es responsable de las metilaciones del metilselenol, pero no han sido identificadas[57].

El(los) mecanismo(s) que regula(n) la producción de los metabolitos de excreción de Se no ha(n) sido elucidado(s), pero la excreción ha sido mostrada como principal responsable de mantener la homeostasis del Se en animales[3].

En humanos, hay evidencia de que luego de la ingesta de selenito, dentro de las especies de Se que aparecen en la orina se encuentra el selenato. Por lo tanto una pequeña fracción de selenito administrado oralmente sufre oxidación a selenato[84].

El selenodiglutatión también ha sido reportado como metabolito de excreción celular. Mediante experimentos utilizando una línea celular de hepatocitos se determinó compuestos pequeños de Se como producto de excreción; y una porción de estos se corresponde a selenodiglutatión[85]. Muchos conjugados de GSH son transportados por el transportador *multidrug resistant protein* (MRP)[85]. El mismo trabajo propone que el selenito ingresado en las células Hepa1-6 reacciona

con GSH para formar selenodiglutati3n, el cual es excretado de las c3lulas a trav3s del transportador activo MRP[85].

La **Fig 1.14** incluye algunos de los metabolitos de excreci3n del Se de mam3feros.

1.3.6 Utilización del selenio por las plantas

Las plantas no poseen la maquinaria de decodificación de Sec, por lo tanto el Se no es un elemento esencial, pero puede ser beneficioso. En concentraciones tisulares bajas, el Se promueve el crecimiento y productividad de la planta y potencia su resistencia a algunos tipos de estrés. Por lo tanto, las plantas absorben Se y lo asimilan en sus tejidos. Esto tiene una gran importancia para la red alimenticia ya que representan la principal entrada de Se en la cadena alimenticia[86].

La concentración de Se, composición y disponibilidad varía mucho de una región a otra. La acumulación de Se por las plantas está muy influenciada por su concentración y disponibilidad en el suelo pero además dentro del mismo ambiente las distintas especies difieren en su capacidad de acumularlo[86].

Las plantas utilizan distintos tipos de transportadores dependiendo de la forma de Se disponible. Son capaces de incorporar selenito y selenato (las formas del Se predominantes en el suelo) así como compuestos orgánicos. Una vez dentro de la planta, estos compuestos son transportados a las hojas y en los cloroplastos, el selenato y selenito pueden ser asimilados como SeMet y Sec a través de la vía de asimilación de azufre y así incorporados inespecíficamente en proteínas en el lugar de metionina y cisteína, respectivamente. Adicionalmente, la SeMet puede ser transformada en los compuestos dimetilselenuro y dimetilselenopropionato[87].

Las plantas se diferencian en cuanto a su capacidad de acumular Se, de producir compuestos volátiles y en la estrategia utilizada para evitar la toxicidad. Con respecto a su capacidad de acumular Se se pueden dividir en no acumuladoras y (hiper)acumuladoras. La principal diferencia entre ambos grupos es la capacidad de las últimas de transformar SeMet y Sec en selenoaminoácidos no proteicos, evitando así la incorporación de los mismos en las proteínas que conduce a su mal funcionamiento, y finalmente resultando tóxico[87].

1.4 *Caenorhabditis elegans*

1.4.1 Generalidades

C. elegans es un nematodo de vida libre y distribución cosmopolita. Usualmente habita en el suelo en regiones ricas en materia en descomposición, la cual le provee de su alimento: bacterias[88]. Su ciclo de vida dura 3 días a 25°C desde embrión hasta adulto grávido. Presenta dos formas sexuales: hermafrodita y macho, los cuales difieren en apariencia cuando son adultos (**Fig. 1.15**). Los hermafroditas producen oocitos y espermatozoides y pueden reproducirse por autofertilización. La gónada del hermafrodita primero produce los espermatozoides y lo almacena en la espermateca en el 4^{to} estadio larvario (L4). Cerca del estadio adulto la línea germinal produce oocitos. Los machos sólo producen espermatozoides y por lo tanto la única forma de reproducción que poseen es mediante la fertilización de los hermafroditas[89].

El hermafrodita adulto posee 959 células somáticas, mientras que el macho adulto posee 1031. Ambos poseen 5 pares de autosomas, los hermafroditas además poseen dos cromosomas sexuales X (XX), mientras que los machos sólo tienen uno, y se representan como X0. La mayoría de la descendencia generada por autofecundación son hermafroditas, sólo el 0.1-0.2% de la progenie son machos y resultan de la no-disyunción de los cromosomas X durante la meiosis. La generación de machos aumenta a una frecuencia de hasta el 50 % como producto de la fecundación cruzada[90].

Hermafrodita y macho tienen en general la misma anatomía y son de tamaño similar, aunque el macho es un poco más delgado y pequeño que el hermafrodita. La principal diferencia entre ambos es la organización de sus respectivas gónadas y la forma de la cola, ya que el macho desarrolla estructuras para facilitar la cópula. (**Fig. 1.15**).

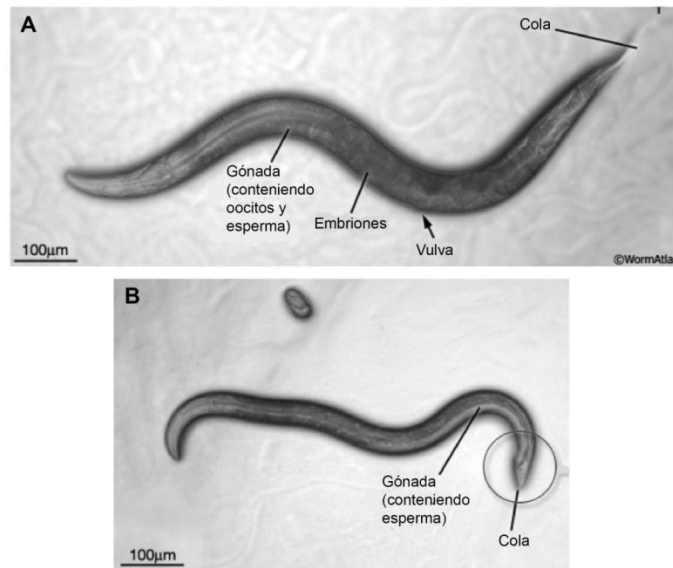


Fig. 1.15: Imágenes de estereomicroscopio de *C. elegans*. A: hermafrodita, **B:** Macho. Tomado de referencia [170].

1.4.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de este nematodo comprende una etapa embrionaria, cuatro estadios larvarios (L1-L4) y el adulto (**Fig. 1.16**).

La embriogénesis de *C. elegans* dura aproximadamente 15-16 horas a 20°C. Luego de la fertilización, se genera una “cáscara de huevo” que es prácticamente impermeable, permitiendo un desarrollo completamente independiente de la madre. Sin embargo, los embriones son usualmente retenidos en el interior del hermafrodita hasta el estadio de 24 células, cuando son expulsados del organismo. El embrión eclosiona fuera del útero cuando tiene 558 núcleos, transformándose en una larva L1, cuando comienzan a alimentarse y desarrollarse a través de los 4 estadios larvarios. Al final de cada estadio larvario ocurre una muda, durante la cual se sintetiza una nueva cutícula específica del estadio larvario que corresponda, eliminándose la cutícula anterior. Durante este período el bombeo faríngeo cesa y el animal entra en una breve etapa de letargo[89].

El nematodo adulto es fértil por cuatro días y luego vive entre 10 y 15 días adicionales. El hermafrodita adulto puede producir hasta 300 embriones (debido a la cantidad limitada de esperma) o puede aparearse con un organismo macho incrementando el número de progenie[89].

En determinadas condiciones de estrés (e.g. alimento escaso, temperaturas elevadas o alta densidad de población), las larvas L1 pueden activar un ciclo de vida alternativo en el que mudan primero a L2d y luego a un estadio L3 diferente, denominado larva “dauer”. La misma, es un estadio especializado en el cual el animal no se alimenta, es resistente a la desecación y puede sobrevivir hasta tres

meses sin seguir su desarrollo. Una vez que las condiciones mejoran, la larva dauer muda al estadio L4 retomando el desarrollo normal[90] (**Fig.1.16**).

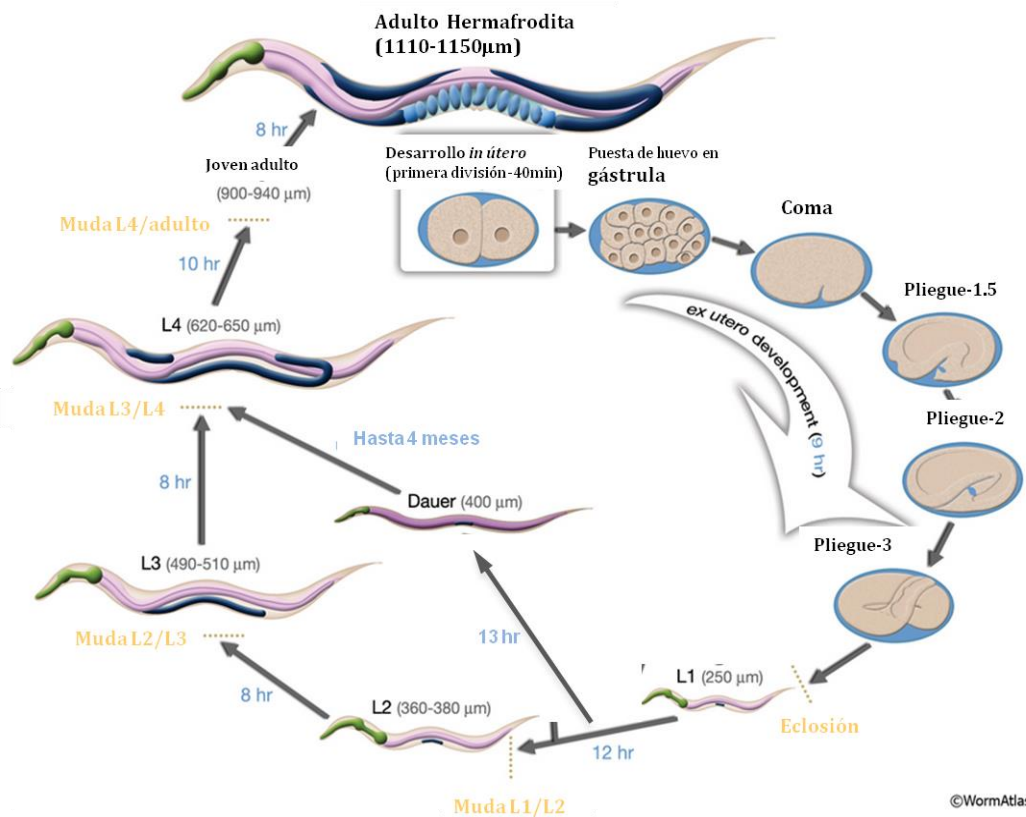


Fig. 1.16: Esquema del ciclo de vida de *C. elegans*. En la imagen se muestra el ciclo de vida del nematodo a 22°C. Los números sobre las flechas indican el tiempo que está el nematodo en determinado estadio. La primera división ocurre aproximadamente 40 minutos después de la fecundación. Los embriones inician su desarrollo en el útero del nematodo y posteriormente son expulsados aproximadamente 150 minutos después de la fecundación y durante la fase de gástrula. Tomado de referencia [90].

1.4.3 Anatomía

C. elegans tiene la típica organización corporal de un nematodo, la cual consiste en un tubo externo y otro interno separados por el espacio pseudocelómico. El tubo externo consiste en cutícula, hipodermis, sistema excretor, neuronas y músculos. El tubo interior comprende la faringe, intestino, y, en el adulto, las gónadas (**Fig.1.17**)[90].

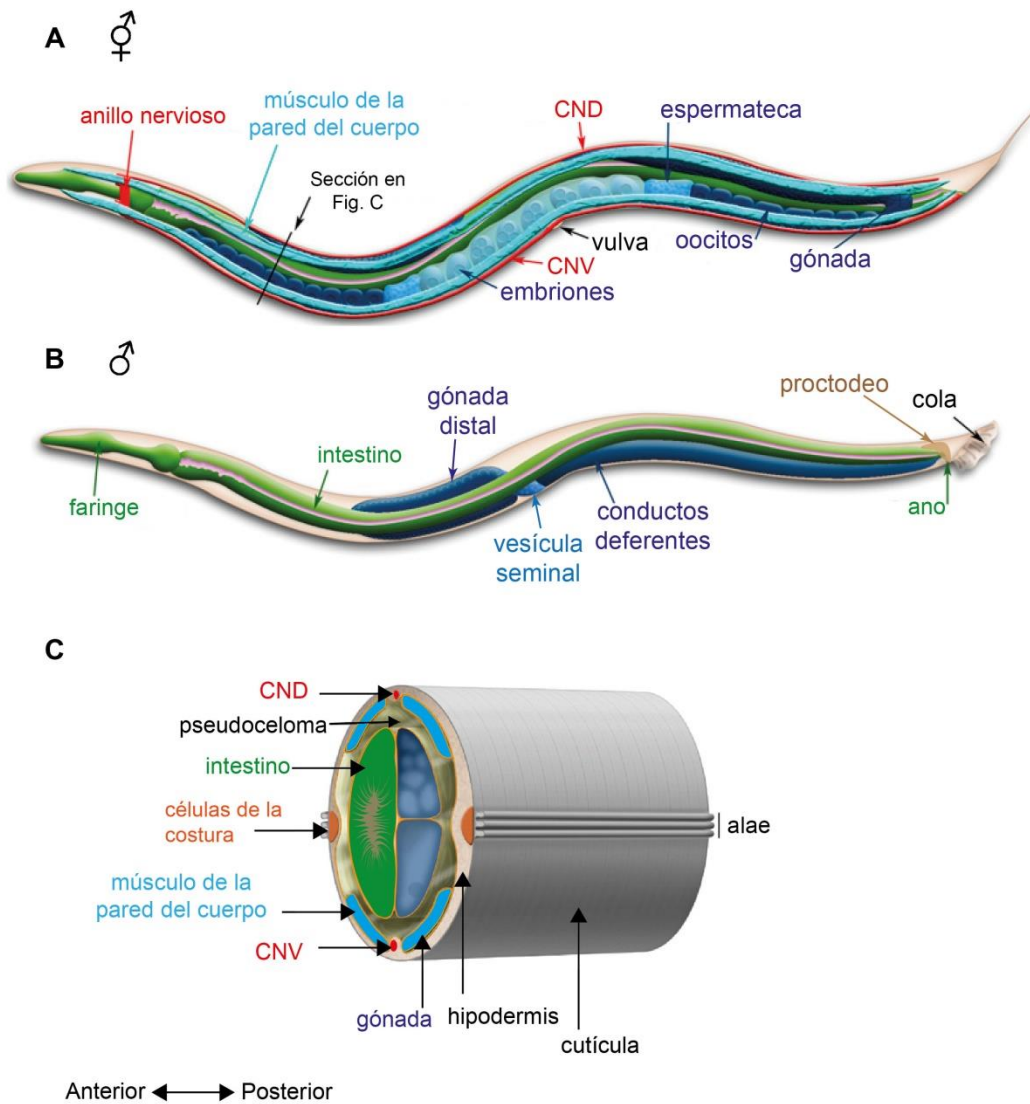


Fig.1.17: Anatomía de *C. elegans*. Principales características anatómicas de un hermafrodita (A) y un macho (B), vista lateral. A: El cordón nervioso ventral (CNV) y dorsal (CND) corren a lo largo del cuerpo desde el anillo nervioso. Se muestran 2 de los 4 cuadrantes de músculo de la pared del cuerpo. B: El sistema nervioso y los músculos se omiten para tener mejor visión del intestino y faringe. C: Sección transversal de la región anterior del gusano hermafrodita (punto indicado en A), mostrando los 4 cuadrantes musculares rodeados por la hipodermis y cutícula. El intestino y las gónadas se encuentran en la cavidad pseudocelómica. También se indican las células de la costura (o sutura) y el alae. Modificado de referencia [89].

1.4.3.1 *Hermafrodita adulto*

Sistema epitelial

La cutícula colágena recubre todo el exterior del gusano así como también la faringe y el recto, es flexible, protege al animal del medio exterior, mantiene su forma corporal y permite su movilidad al actuar como esqueleto externo. Varios tejidos se abren al exterior a través de la cutícula. El poro excretor está localizado en la línea media sobre el lado ventral de la cabeza, la vulva se encuentra en la mitad del cuerpo en posición ventral y el ano también tiene posición ventral justo antes del extremo caudal del animal. Adicionalmente alrededor de la boca y en el extremo posterior del cuerpo se abren al exterior neuronas sensoriales[90].

En *C. elegans* el sistema epitelial secreta la cutícula y está formado por células hipodérmicas y células epiteliales especializadas, que incluye las células de “sutura” que se disponen longitudinalmente y son responsables de la formación de una estructura denominada “alae” (**Fig. 1.17**), y las células interfaciales se localizan en la interfaz entre la hipodermis y otro tipo de tejidos o se abren al exterior a través de la hipodermis[91].

Sistema nervioso

Los hermafroditas poseen 302 neuronas. La mayoría de los cuerpos neuronales se encuentran en ganglios en la cabeza (mayoritariamente) y en la cola. Además de los ganglios, otros cuerpos neuronales se localizan a lo largo del cordón nervioso ventral y alguna dispersa a lo largo del cuerpo en posición lateral. Los procesos de la mayoría de las neuronas se extienden hacia varias regiones de sinapsis, como son el cordón nervioso ventral, cordón nervioso dorsal y el anillo nervioso en la cabeza (que envuelve la faringe), el cual constituye el principal neuropilo del animal (**Fig. 1.17 y 1.18**)[90].

La mayoría de las neuronas tienen una estructura simple de una o dos neuritas (o procesos) que salen del cuerpo celular y siguen casi la misma trayectoria en todos los animales. A excepción de las neuronas sensoriales, que poseen dendritas con morfologías muy especiales y fáciles de identificar, la mayoría de las neuritas no pueden ser distinguidas como axones o dendritas ya que funcionan enviando y recibiendo señales al cuerpo celular, por lo que se les denomina neuritas o procesos[92].

Cada neurona de *C. elegans* ha sido identificada mediante micrografía electrónica así como también las distintas conexiones entre ellas y otras células, constituyendo el “conectoma” más completo hasta el momento. El nombre de cada neurona consiste en 2 o 3 letras mayúsculas que indican la clase y en algunos casos se agrega un número[92].

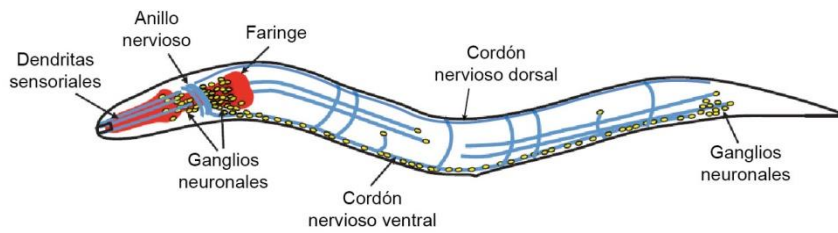


Fig. 1.18. Esquema representando generalidades del sistema nervioso de *C. elegans*. La mayoría de las neuronas se encuentran en los ganglios alrededor de la faringe junto con el anillo nervioso. Modificado de referencia [171].

A pesar de tener un sistema nervioso tan compacto, *C. elegans* es capaz de realizar diversos comportamientos complejos adicionales a los básicos (e.g. locomoción, forrajeo, alimentación y defecación). Puede discriminar entre distintos compuestos químicos, temperaturas y fuentes de comida y en función del estímulo moverse hacia el mismo o alejarse. También puede detectar la densidad y el sexo de gusanos que se encuentran cerca mediante señales que pueden difundir un corto trayecto, feromonas y cambios en el nivel de oxígeno. Adicionalmente cada sexo tiene comportamientos específicos: los hermafroditas depositan los embriones y los machos tienen comportamientos de cópula. La mayoría de estos comportamientos son plásticos y pueden ser modificados a través del aprendizaje y memoria, por ejemplo un primer encuentro con bacterias patógenas por un corto periodo de tiempo modifica el comportamiento desarrollado en un segundo encuentro, en el cual el patógeno será evitado. El alimento también es un modulador significativo de muchos comportamientos, incluyendo la puesta de embriones[92].

Los circuitos neuronales que están dedicados a cada uno de estos comportamientos se comunican vía interneuronas generándose niveles de jerarquía para su ejecución. Por ejemplo en presencia de un ambiente estresante donde la comida es escasa, la puesta de huevos es suprimida y cuando un ambiente rico en alimento es encontrado, la locomoción es suprimida permitiendo que el animal se alimente apropiadamente[92].

Sistema digestivo

C. elegans se alimenta a través de la faringe bilobulada, la cual bombea el alimento al intestino (a través de la válvula faríngeo-intestinal), aplastándola a medida que pasa a través del segundo lóbulo. El cuerpo principal del intestino está formado por 20 células, cada una con una densa capa de microvellosidades en su superficie apical. El contenido intestinal es eliminado al exterior vía una válvula rectal que conecta el intestino con el recto y el ano (**Fig.1.17**)[90].

Sistema muscular

La musculatura corporal de *C. elegans* está formada por músculo estriado y no estriado o liso. El primero que controla la locomoción se encuentra en todo el largo del animal formando la pared muscular del gusano, en forma de 4 cuadrantes, 2 dorsales y dos ventrales. El segundo, que controla los órganos internos, se encuentra a lo largo de la faringe y alrededor de la vulva, intestino y recto (**Fig. 1.17**)[90].

La conexión entre el músculo estriado con las neuronas motoras ocurre mediante unas prolongaciones, denominadas brazos musculares, que los músculos envían a los procesos neuronales que corren por el cordón nervioso ventral y dorsal[92].

Sistema excretor

El Sistema excretor está formado por 4 células localizadas en el lado ventro-posterior de la cabeza. Este sistema funciona como osmoregulador y en la eliminación de desechos[90].

Sistema celomocitos

En la cavidad pseudocelómica, los adultos de *C. elegans* poseen 6 células denominadas celomocitos, situadas como tres pares (derecho, izquierdo y ventral). Dada la capacidad de dichas células de endocitar y acumular macromoléculas del fluido de la cavidad, se ha sugerido que desempeña funciones del tipo inmunes y hepáticas[93].

Sistema reproductor

El sistema reproductor del hermafrodita consiste en una gónada somática, la línea germinal y un aparato para la puesta de huevos. La gónada es bilobulada, con un lóbulo extendiéndose hacia el extremo anterior del animal y el otro hacia el posterior. Cada lóbulo tiene una forma de U y comprende un ovario distal, un oviducto proximal y una espermateca que conecta a un útero común que contiene los huevos fertilizados en etapas tempranas de la embriogénesis[90].

La línea germinal se encuentra en los brazos distales de la gónada (ovario distal) y es un sincitio de núcleos de la línea germinal rodeando un citoplasma central. Las células germinales a medida avanzan en dirección proximal van sufriendo mitosis y meiosis y se desprenden del sincitio, alcanzando la diacinesis en el oviducto previo a la fertilización. El útero se abre al exterior a través de la vulva para expulsar los embriones (**Fig. 1.19**)[90].

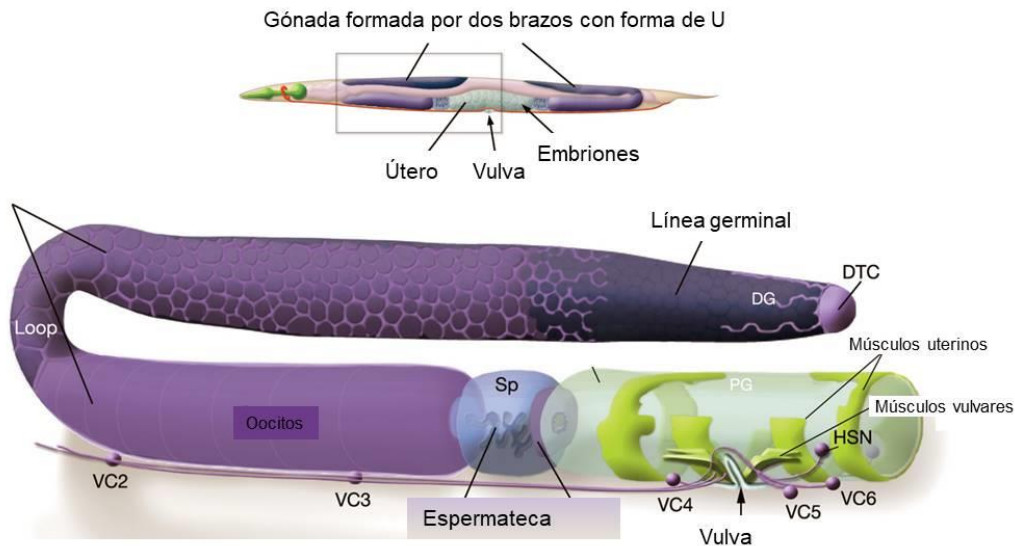


Fig. 1.19: Sistema reproductor de hermafrodita de *C. elegans*. Arriba, adulto hermafrodita, vista lateral, resaltando la localización de una mitad del sistema en el animal. Debajo, ampliación de una mitad del sistema reproductor; *distal tip cell* (DTC), gónada distal (DG), espermateca (Sp), VC2-6 y HSN son neuronas motoras que controlan la puesta de huevos. Modificado de referencia [172].

1.4.3.2 Macho adulto

Las diferencias más importantes entre el macho y el hermafrodita se observan en el aparato reproductor y en el copulador del macho, este último en el extremo posterior del cuerpo (**Fig. 1.15**). El sistema muscular del macho posee 41 músculos adicionales sexo específico y el sistema nervioso posee 385 neuronas (91 de las cuales son sexo específico).

La gónada del macho tiene sólo un lóbulo con forma de J, que se abre al exterior en la cloaca (ano) a través de una cámara epitelial rectal modificada denominado proctodeo. El proctodeo incluye dos espículas sensoriales utilizadas por el macho durante el apareamiento para localizar la vulva del hermafrodita, y mantenerla abierta durante la transferencia de esperma[90].

Las células meióticas en progresivos estadios de la espermatogénesis están distribuidas a lo largo de la gónada desde el extremo distal hacia la vesícula seminal. Las espermátidas maduras son almacenadas en la vesícula seminal y es liberada durante la cópula a través de la apertura cloacal[90] (**Fig. 1.17**).

1.4.4 *C. elegans* como organismo modelo

C. elegans es un organismo simple, tanto anatómica como genéticamente, de pequeño tamaño, con un rápido ciclo de vida y progenie numerosa. Es fácilmente mantenido en el laboratorio, a una temperatura entre 13-25°C y puede crecer en

placas de Petri con agar o en cultivo líquido, en ambos casos con la bacteria *E. coli* como alimento. Dado que *C. elegans* existe como hermafroditas que se autofecundan, un único animal puede poblar toda una placa y además las poblaciones pueden ser almacenadas por años mediante criopreservación[89].

Los animales son transparentes en todos sus estadios, esto es particularmente útil en microscopía. Tiene un número de células somáticas invariante, lo que ha permitido identificar el origen y destino de cada una de las células desde la fertilización hasta el estadio adulto en animales vivos y generar el linaje celular completo (Fig. 1.20). Adicionalmente se ha reconstruido la forma de cada una de sus células mediante micrografía electrónica[89].

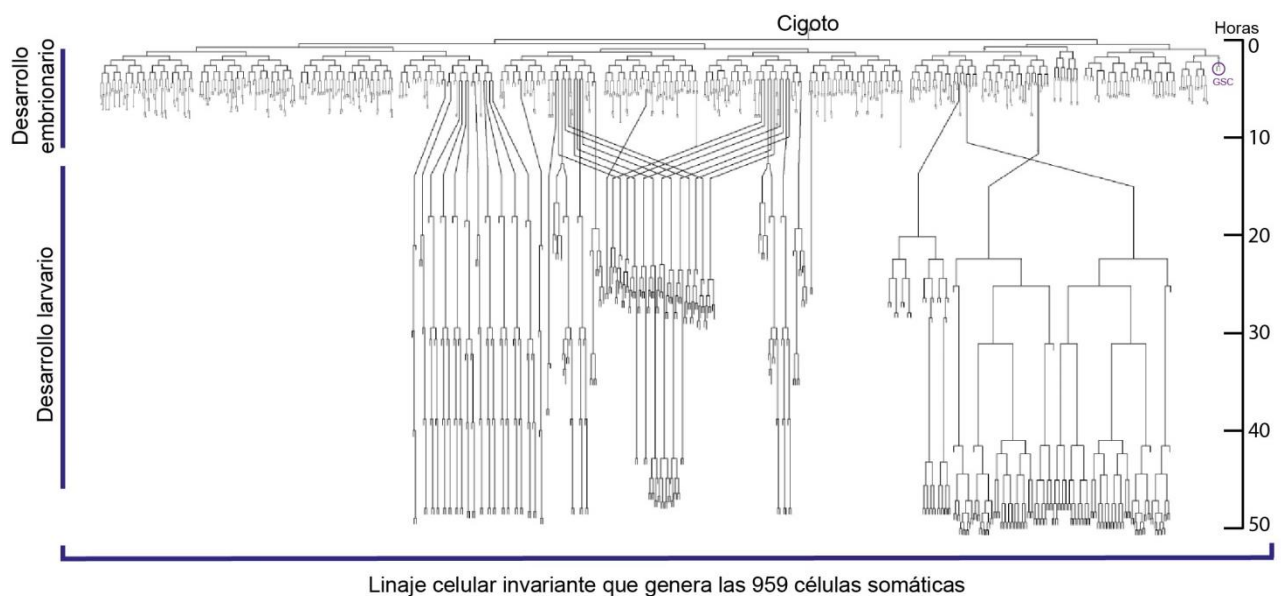


Fig. 1.20: Linaje celular de *C. elegans*. El cigoto genera todos los tejidos somáticos a partir de un linaje celular invariante. Dos células madre dan lugar a la línea germinal (GSC), indicado en violeta. Las GSC subsecuentemente se dividen de manera variable durante el desarrollo larvario para formar al tejido de la línea germinal que es mantenido en el adulto. Modificado de referencia[173]

El dimorfismo sexual de *C. elegans* es de gran utilidad para la genética, la autofecundación de los hermafroditas permite mantener las mutaciones homocigotas sin necesidad de apareamiento. Este tipo de reproducción de los hermafroditas sigue las reglas de segregación mendelianas, por lo tanto un padre heterocigota para un alelo recesivo, va a producir el patrón de segregación 1:2:1, y el 25% de la progenie será homocigota mutante para el alelo exhibiendo el carácter autosómico recesivo. Asimismo, la existencia de los machos resulta muy importante ya que permite el “traslado” de mutaciones entre estirpes, el

intercambio de material genético necesario para generar animales con diferente composición genética y el mapeo de genes[89].

La generación de transgénicos se puede realizar con relativa facilidad y son utilizados con muchos objetivos. Sobreexpresión de genes endógenos y exógenos, expresión de proteínas reporteras, análisis de patrón de expresión y localización de proteínas o dominios proteicos. El hecho de que el nematodo sea transparente, también ha permitido con relativa facilidad la determinación *in vivo* de cuándo y dónde es expresado algún gen específico, usando para ello construcciones etiquetadas con marcadores fluorescentes, así como también el estudio de elementos regulatorios de ADN. Adicionalmente existen reporteros fluorescentes que permiten el estudio de la actividad fisiológica de células *in vivo* y la herramienta de optogenética, la cual altera la actividad de neuronas individuales, también es muy útil en *C. elegans*[89].

El método más habitual para la generación de transgénicos es la microinyección de ADN en la zona distal de la gónada (**Fig. 1.21**). Esta técnica genera grandes arreglos extracromosomales de ADN que se heredan en la progenie (aunque no necesariamente toda la progenie hereda estos arreglos)[94]. En los últimos años se ha optimizado la generación de líneas transgénicas estables mediante CRISPR-Cas9 que inserta una única copia de un transgen en un sitio definido[95].

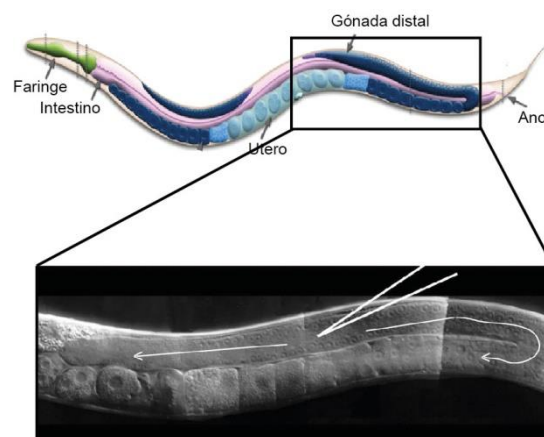


Fig. 1.21: Microinyección en la gónada de *C. elegans*. Se representa la posición óptima de inyección de la aguja en el citoplasma central del sincitio de la línea germinal distal. La solución de inyección debe fluir en ambas direcciones: a través de la línea germinal distal y proximal (flechas). Modificado de referencia[94].

Se dispone de poderosas herramientas de genética y genética reversa, debido a la facilidad para generar mutantes y de realizar interferencia por ARN (ARNi). En la técnica de ARNi, un ARN doble hebra (ARNdh) interfiere la expresión del gen de interés (*knock down*) mediante la destrucción del ARNm endógeno de secuencia

homóloga al ARNdh. Este ensayo se puede llevar a cabo mediante varios métodos: con ARNdh transcrito *in vitro* e inyectado directamente en sus gónadas (región del sincitio), sumergiendo el animal en una solución con ARNdh (*soaking*), o mediante la alimentación del animal con *E. coli* transformada con un plásmido diseñado para expresar ARNdh. En el caso de la alimentación o el *soaking*, el ARNdh es internalizado desde el ambiente, distribuyéndose en los tejidos somáticos y en la línea germinal y en la progenie se pueden observar los fenotipos[96]. Se han generado y están disponibles para la comunidad de investigadores de *C. elegans*, dos bibliotecas de ARNi con amplia cobertura del genoma. Esta técnica constituye uno de los métodos funcionales estándar de análisis en *C. elegans* y provee una alternativa y un complemento a los estudios de alelos mutantes clásicos.

Con respecto a la posibilidad de llevar a cabo experimentos genéticos, hay que destacar que existen dos proyectos (*C. elegans Gene Knock out Consortium* (GKC) y el *National Bioresource Project of Japan* (NBRP)) los cuales tienen como objetivo aislar mutantes de delección de todos los genes de *C. elegans*.

Las grandes similitudes existentes entre los procesos moleculares y celulares presentes en *C. elegans* y los presentes en otros animales de la escala evolutiva (metabolismo, regulación génica, biología de proteínas, estructura de los organelos y función) han convertido al gusano en un excelente organismo para el estudio de la biología de los metazoarios. Se estima que entre un 60 - 80% de los genes humanos tienen un ortólogo en el genoma de *C. elegans* y que aproximadamente un 40% de los genes conocidos asociados a enfermedades humanas tienen ortólogos claros en el genoma de *C. elegans*. De esta forma, muchos descubrimientos hechos en *C. elegans* tienen relevancia para el estudio de enfermedades humanas y animales[89].

Toda la información celular y genética generada por estudios de investigación en *C. elegans* está disponible en diversos recursos en internet, por ejemplo *WormBase* (www.wormbase.org), *Wormbook* (www.wormbook.org), *WormAtlas* (www.wormatlas.org), y contribuyen al éxito de la investigación en este organismo. Una breve historia de las investigaciones y descubrimientos claves en *C. elegans*, y los aportes a la biología en general de algunas de estas investigaciones se reseña en la referencia [89].

1.5 Selenio y *Caenorhabditis elegans*

El genoma de *C. elegans* codifica para una selenoproteína, la tiorredoxina reductasa 1 (TRXR-1), que contiene un residuo de Sec en el sitio redox activo C-terminal de la proteína y se localiza en el citosol. El genoma de *C. elegans* posee un segundo gen que codifica para TRXR, *trxr-2*, parálogo de *trxr-1*. TRXR-2 posee Cys en la posición homóloga a la de Sec en TRXR-1 y su localización es mitocondrial. Mutantes de delección en estos genes son viables y no se diferencian de la estirpe silvestre en condiciones de laboratorio estándares ni en condiciones de estrés oxidativo, por lo que en estas condiciones el Se en *C. elegans* no es esencial. Sin embargo la delección de *trxr-1* junto con la interferencia del gen que codifica para la GR (*gsr-1*) tiene un gran impacto en el proceso de muda de cutícula, conduciendo al arresto en los estadios larvarios[97].

Al igual que en otros organismos, en *C. elegans* el Se puede ser beneficioso o tóxico dependiendo de la concentración. Gusanos expuestos a un rango de 0.01-0.05 μM de selenito de sodio resulta en descendencia más numerosa, desarrollo acelerado y mejora en el deterioro locomotor característico de los animales más viejos (día 5 de estadio adulto), en comparación con organismos sin exposición al compuesto[98]. También en estas concentraciones el Se desarrolla efectos protectores frente a la exposición al plomo[99]. Este rol en la detoxificación de plomo, junto a otros metales pesados (arsénico y mercurio) ha sido demostrado en células de mamíferos[100].

El posible rol del Se como antioxidante también fue demostrado mediante la exposición a H_2O_2 junto con selenito de sodio, demostrando una disminución del efecto nocivo del H_2O_2 ; adultos silvestres expuestos a 1 mM de H_2O_2 durante 12 horas resulta en una letalidad del 40% y a 2 mM resulta en 100% de letalidad. Estos porcentajes disminuyen cuando gusanos silvestres se exponen a H_2O_2 (1 o 2 mM) junto con selenito de sodio (de 0 a 2 mM), demostrando la existencia de un rango de concentraciones en los cuales el selenito mejora la función antioxidante. Adicionalmente, la pre-exposición a 0.01 μM de selenito también aumenta significativamente la supervivencia de los gusanos expuestos a otros compuestos inductores de estrés oxidativo como juglona y paraquat, así como también a un estrés térmico. Sugiriendo que el selenito alivia el estrés más allá de la formación de ROS[101]. Por otro lado, se propone un rol de la TRXR-1 en los efectos beneficiosos del Se cuando se presenta en bajas cantidades: los mutantes en *trxr-1* son más sensibles que la estirpe silvestre cuando reciben un pretratamiento con selenito y posterior estrés oxidativo o térmico [101].

Una vía responsable de los efectos beneficiosos que ejerce el selenito a bajas concentraciones involucra al factor de transcripción DAF-16. El trabajo demuestra que en presencia de 0.01 μM de selenito ocurre la translocación al núcleo de DAF-16 y un aumento de expresión de algunos de sus genes blancos (como el gen que codifica para la superóxido dismutasa *sod-3*)[101]. En *C. elegans*, este factor de

transcripción (homólogo del factor FOXO3a de mamíferos) es un regulador central de muchos procesos biológicos (longevidad, almacenamiento de grasas, desarrollo, reproducción, respuesta a estrés) entre los cuales se encuentra la regulación de la expresión de genes de defensa antioxidante y de reparación del ADN[101].

C. elegans también ha sido utilizado como modelo de estudio de la toxicidad del Se. Ensayos de toxicidad con larvas de la estirpe silvestre determinaron que el selenato es menos tóxico que el selenito y que el selenuro. Se sabe que en larvas de *C. elegans* la dosis letal 50 (LD50, 50% lethal dose) para selenito y selenuro es de 0.20 mM, en tanto la LD50 para selenato es de 1 mM; estos valores reportados se corresponden a datos de viabilidad luego de incubaciones de 12 días[102]. Para el caso de gusanos adultos expuestos a selenito durante 12 horas el LD50 es 3.5 mM[103].

Otro grupo estudió la acumulación de Se en *C. elegans* y los metabolitos formados. Por un lado reportan que la forma orgánicas del Se, SeMet, es menos tóxica que el selenito, resultado consistente con lo reportado también en células de mamífero[104]. El análisis de las especies acumuladas luego de la exposición a las formas inorgánicas u orgánicas resultó en metil-Sec y S-adenosilSeMet luego de la incubación con SeMet, mientras que la exposición a selenito resultó sólo en la identificación de selenito de sodio[104].

En humanos y en otros animales está demostrado que el consumo de altas concentraciones de Se genera trastornos de motilidad. En *C. elegans* la presencia de concentraciones elevadas de Se en el medio genera inicialmente una alteración funcional y estructural de motoneuronas (afectando el movimiento y puesta de huevos) en concomitancia con un aumento en la generación de ROS[103,105] y posteriormente alteraciones musculares[106]. Los autores del estudio proponen que el efecto en la concentración de ROS intracelular podría deberse a la oxidación del GSH al reaccionar con el selenito, dado que el agregado de GSH alivia el estrés generado por selenito[103]. Mutantes en el gen que codifica para glutarredoxina-21 (*glrx-21*) son hipersensibles al Se y eliminan el efecto protector del GSH en presencia de Se. En este contexto, se propone que GLRX-21 podría formar disulfuros mixtos y así prevenir la depleción de glutatión[103].

En mamíferos está demostrado que la TRXR puede utilizar selenito como sustrato, reduciéndolo a selenuro. En *C. elegans* los mutantes de delección en *trxr-1* y *trxr-2* así como el doble mutante en presencia de 0-5 mM de selenito, selenato y selenuro de sodio no son más sensibles que los silvestres[102].

El factor de transcripción DAF-16 también está involucrado en la respuesta a concentraciones tóxicas de selenito. El mecanismo de activación que los autores proponen es el aumento de ROS, lo que inhibe la activación de AKT-1, (quinasa que fosforila e inactiva a DAF-16), activando así al factor DAF-16. Mutantes en *daf-16* son hipersensibles al selenito y la sobreexpresión de DAF-16 en intestino, rescata los daños de motilidad generados por el selenito. Se propone que la activación de

DAF-16 en el intestino protege de la degeneración neuronal provocada por ROS[106].

El análisis de los perfiles de expresión de gusanos silvestres en ausencia y presencia de Se identificó posibles genes involucrados en la respuesta a este elemento. Concretamente se reportó el aumento de la expresión de algunas óxidorreductasas y la disminución de la expresión de genes asociados a la cutícula [107]. Sin embargo el grupo no avanzó en la caracterización de estos genes en la respuesta o en el metabolismo del Se. Por otro lado, el análisis para obtener un “conjunto de genes involucrados específicamente en la respuesta al Se” excluyó los genes involucrados en la respuesta al azufre, los cuales son potencialmente claves en la respuesta al Se (como se describe en la sección 1.3).

La relevancia del Se en *C. elegans* también ha sido evidenciado en otros aspectos. Se ha visto que una preincubación con cantidades traza de selenito resulta en un aumento en la resistencia al patógeno *Pseudomonas aeruginosa* PA14 vía el factor de transcripción SKN-1 y el aumento de la expresión de genes de la respuesta inmune que usualmente se ven disminuidos luego de la infección por este patógeno[108]. En *C. elegans* el factor de transcripción SKN-1 juega un rol importante en la respuesta inmune, estrés redox y xenobiótico. Este aumento de la expresión de genes de la respuesta inmune, también se vió acompañado por un aumento en los genes glutatión S-transferasa (*gst-4*) y γ -glutamil cisteína sintetasa (*gcs-1*), ambas enzimas involucradas en el metabolismo del glutatión [108].

1.6 Respuestas a condiciones de estrés bajo la regulación del factor de transcripción HIF-1

Durante el desarrollo de esta tesis se identificó a HIF como un factor de transcripción clave en la respuesta al Se, es por ello que se reseña debajo la bibliografía en relación a este tema.

1.6.1 Factor inducible por hipoxia (HIF) y prolil hidroxilasa de HIF (PHD)

El factor inducible por hipoxia (HIF) es un factor de transcripción dimérico altamente conservado, compuesto por las subunidades HIF α y HIF β . Su rol más comprendido involucra la respuesta celular a concentraciones de bajo oxígeno mediante la activación de cientos de genes involucrados en el metabolismo, división celular, angiogénesis, homeostasis del hierro y apoptosis[109,110].

En mamíferos hay tres genes HIF α (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α), con un patrón de expresión parcialmente solapante. La ausencia de HIF-1 α funcional en ratones produce letalidad embrionaria debido a un severo defecto vascular[110]. HIF α posee dos dominios de transactivación los cuales se ha demostrado que intervienen en la interacción con una gran variedad de co-activadores transcripcionales[110,111].

En todas las especies estudiadas, un importante mecanismo de control de la actividad de HIF implica la rápida desestabilización y estabilización de HIF α regulada por la concentración de oxígeno. Esta regulación es mediada por la acción de la proteína prolil hidroxilasa EGLN (*egg-laying defective nine*) o PHD (*prolyl hydroxylase*), miembro de la superfamilia de proteínas dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato. En cambio, la subunidad HIF β (o ARNT *-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) es una proteína nuclear constitutiva que participa en otras respuestas transcripcionales adicionales[112].

En condiciones de normoxia, PHD hidroxila 1 o 2 residuos de prolina conservadas en el dominio ODD (*oxigen dependent degradation*) de HIF α . Esta hidroxilación aumenta la afinidad de la proteína VHL por HIF α . La proteína VHL (*Von Hippel Lindau tumor supresor*) es una subunidad del complejo E3 ubiquitina ligasa y al unirse a HIF α lo señala para su degradación en el proteosoma[112] (**Fig. 1.22**).

Frente a una baja tensión de oxígeno, la actividad de PHD disminuye, por lo tanto HIF α se vuelve más estable, se acumula y transloca al núcleo. Allí dimeriza con HIF β , y como heterodímero se une al motivo de secuencia consenso A/(G)CGTG denominado elemento de respuesta a hipoxia (HRE) dentro de la región regulatoria de sus genes blanco y activa la transcripción de cientos de genes involucrados en la respuesta a la hipoxia[110,112] (**Fig. 1.22**). La disponibilidad de otras proteínas y ligandos nucleares que interactúen con HIF-1, como co-activadores transcripcionales, también influenciarán la función de HIF[113].

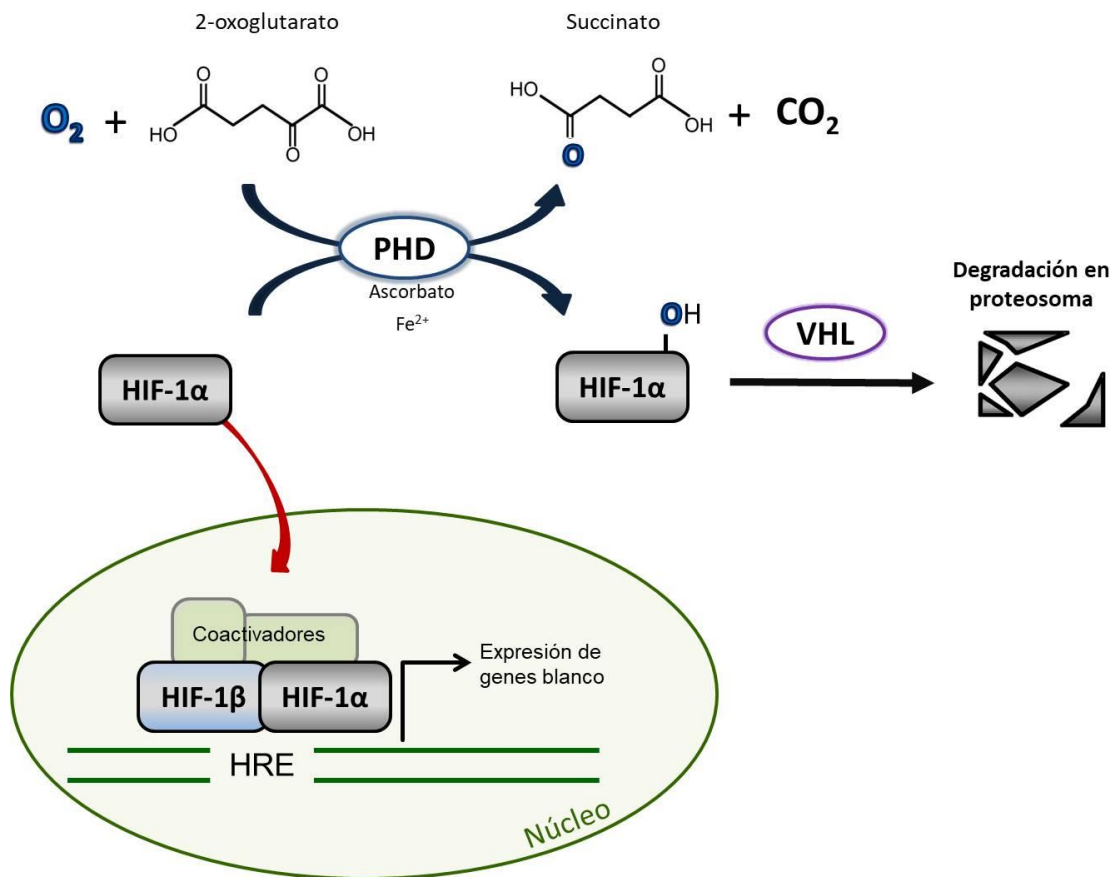


Fig.1.22: Reacción de hidroxilación de HIF-1 catalizada por PHD y consecuencias. En normoxia (flechas azules) PHD cataliza la prolil hidroxilación de HIF α , utilizando como co-sustratos oxígeno y 2-oxoglutarato y como co-factores hierro (Fe^{2+}) y ascorbato. HIF α hidroxilado es reconocido por la proteína VHL y marcado para su degradación en el proteosoma. En condiciones de bajo oxígeno (flecha roja), PHD está inactiva, HIF α se transloca al núcleo, dimeriza con HIF β y se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) regulando la expresión de sus genes blanco. Modificado de referencia[174].

La primer enzima PHD sensora de oxígeno se descubrió en *C. elegans* (la proteína EGL-9), el producto de un gen definido por mutaciones que causan defectos en la puesta de huevos (*egg-laying behavioral defect*)[112] y desde entonces ha sido descrita en múltiples organismos. En mamíferos hay tres genes diferentes que codifican para tres prolil hidroxilasas canónicas (PHD1 a 3) y más recientemente se ha identificado una cuarta PHD con dominio transmembrana de RE[114].

Para que PHD funcione como hidroxilasa requiere de oxígeno, 2-oxoglutarato, $Fe(II)$ y ácido ascórbico. Un átomo de oxígeno del dioxígeno es utilizado en la descarboxilación oxidativa del 2-oxoglutarato generando succinato y CO_2 . El otro

átomo de oxígeno es utilizado para la hidroxilación de un residuo de prolina de la molécula HIF α [114] (**Fig. 1.22**). Distintos estudios han medido la afinidad de la PHD por el oxígeno (utilizando péptidos de HIF α). La Km de las PHD para el oxígeno es significativamente mayor que la de otras dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y que la concentración de oxígeno intracelular. Por lo tanto, la actividad de la PHD es dependiente de los niveles de oxígeno cuando los otros sustratos y cofactores están presentes, siendo ésta la base bioquímica de la función de las PHD como sensores de oxígeno[114].

También se han descrito otras modificaciones postraduccionales, adicionales a la hidroxilación por EGLN, involucradas en la regulación de la actividad de HIF[113]. Por ejemplo en mamíferos, otro regulador negativo de HIF α es la asparagina hidroxilasa denominada factor de inhibición de HIF α (FIH1). Este factor hidroxila un residuo de asparagina conservado (asparagina 803 en HIF-1 α humano) y bloquea la interacción de HIF con los coactivadores p300/CBP. FIH mantiene suficiente actividad a niveles intermedios de hipoxia, niveles que son suficientes para estabilizar a HIF α , por lo tanto agrega un paso de regulación en la vía. FIH puede hidroxilar un amplio espectro de sustratos adicionales y su participación en la respuesta a hipoxia aún no es completamente comprendida[115].

1.6.2 Otros estímulos implicados en la respuesta de HIF

La actividad de PHD permite sentir e integrar información sobre el metabolismo celular y condiciones de estrés, detectando no sólo el oxígeno sino también otros metabolitos y preservar la homeostasis celular y el balance energético.

La enzima PHD utiliza como co-sustrato al 2-oxoglutarato (además del oxígeno), el cual participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en la mitocondria. Varios intermediarios del TCA (e.g. fumarato, succinato e isocitrato) inhiben a PHD por competencia con su co-sustrato natural 2-oxoglutarato. Por lo tanto condiciones que induzcan una acumulación de estos metabolitos, inhibirá la actividad de PHD culminando en la activación de HIF[116].

Por otro lado, en las células con alta proliferación el 2-oxoglutarato es producido principalmente a partir de glutamina por la glutaminólisis, y los niveles de este metabolito dependen de la disponibilidad de aminoácidos. En condiciones de restricción de aminoácidos, los niveles de 2-oxoglutarato disminuyen conduciendo a la inactivación de PHD[114].

Las especies reactivas del oxígeno también se han visto implicadas en la inhibición de PHD en parte porque altos niveles de ROS pueden oxidar el Fe(II) a Fe(III) y este último no puede ser utilizado como cofactor por la PHD. Pero el rol de ROS en la regulación de la actividad de PHD depende de los niveles y el tiempo de exposición y no es totalmente comprendido[114].

1.6.3 Otros blancos de PHD

Además de los efectos de PHD sobre HIF, también se ha identificado a las PHD como reguladores de otros blancos proteicos, aunque no en todos los casos es claro si la función hidroxilasa está involucrada. En mamíferos, se ha identificado a PHD involucrado en el control de la glucólisis mediante la estimulación la actividad de la piruvato quinasa M2 (una isoforma de la enzima piruvato quinasa de la glucólisis), causando su unión a HIF y promoviendo su actividad transcripcional[116]. Otro ejemplo de función de PHD independiente de HIF-1 es la inhibición de la quinasa IκB (IKK) de la vía NFκB en células B activadas, generando una disminución en la señalización de esta vía[116].

En *C. elegans* también se ha descrito un rol de PHD en la neurotransmisión independiente de la actividad de HIF. Mediante su interacción con la proteína LIN-10 (proteína que regula el reciclado de los receptores de glutamato GLR-1) regula el tráfico y localización del receptor de glutamato de manera dependiente del oxígeno[116].

1.6.4 Sistema HIF/EGLN en *C. elegans*

La vía HIF-1/EGLN/VHL está evolutivamente conservada. En *C. elegans* los homólogos de HIFα, HIFβ, EGLN y VHL de mamíferos están codificados por los genes *hif-1*, *aha-1*, *egl-9* y *vhl-1*, respectivamente[112].

Se ha identificado un rol de *hif-1* y *egl-9* en una variedad de procesos, incluyendo adaptación a temperatura elevada, desarrollo neurológico, respuestas comportamentales a oxígeno y dióxido de carbono, resistencia a patógenos y envejecimiento[117]. En este sentido es importante señalar que diferentes señales promueven la actividad transcripcional de HIF-1, pero causan patrones de expresión diferentes de los genes regulados por HIF-1[118,119]. Tanto en respuesta a hipoxia como H₂S hay acumulación de HIF-1 en todos los núcleos, pero el patrón de expresión de los genes blanco de HIF-1 no es el mismo con las diferentes señales; con hipoxia HIF-1 se enciende principalmente en intestino mientras que con H₂S HIF-1 se enciende en hipodermis[118]. Además, distintos trabajos han descrito a HIF-1 tanto como activador de la expresión génica así como también represor [120,121].

En *C. elegans* se han descrito dos mecanismos mediante los cuales EGL-9 regula a HIF-1, que son esquematizados en la **Fig. 1.23**. El mejor comprendido es la vía canónica sensible al oxígeno que involucra la hidroxilación de HIF-1 en la prolina 621 convirtiéndolo en un ligando de VHL-1 y desencadenando su degradación por el proteasoma (vía superior de **Fig. 1.23**)[117,120]. Adicionalmente, existe una vía con poca o ninguna participación de la actividad hidroxilasa de EGL-9 que involucra la interacción de EGL-9 con la proteína *scaffold* SWAN-1 y otros

componentes; los detalles de esta vía de activación se desconocen, pero se propone que EGL-9 actúa sobre la actividad transcripcional de HIF-1 (vía inferior de **Fig. 1.23**) [120,122].

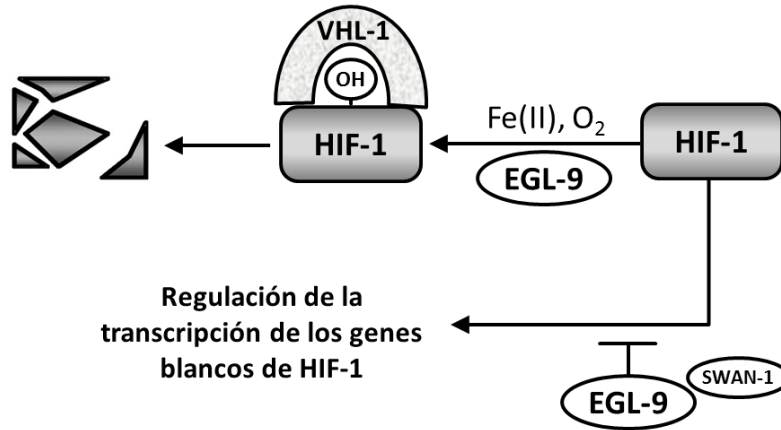


Fig. 1.23: Representación de los dos mecanismos descritos en *C. elegans* por los cuales EGL-9 regula negativamente a HIF-1. Esquema modificado de referencia[117].

Mediante el estudio de la respuesta contra la infección del gusano con bacterias patógenas, se ha propuesto que las dos vías de regulación que involucran a EGL-9 regulan distintas actividades de HIF-1 que son gen específicas. Concretamente se propone que la regulación no canónica de HIF-1 impide la actividad de HIF-1 como represor de la transcripción de genes involucrados en la respuesta de defensa contra *Staphylococcus aureus*, mientras que la vía canónica impide la actividad de HIF-1 como inductor de la expresión de genes involucrados en la defensa contra *Pseudomonas aeruginosa* PA01[120] (**Fig. 1.24**).

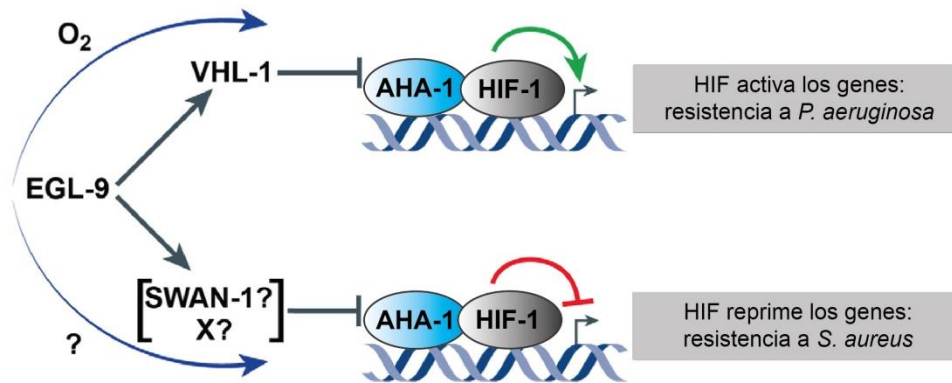


Fig. 1.24: Modelos de regulación de HIF-1 canónico y no canónico y expresión génica en respuesta a patógenos. La regulación canónica de HIF-1 implica la actividad hidroxilasa de EGL-9 y el marcado para su degradación por VHL-1. Esta vía controla la inducción de genes de HIF-1. El oxígeno es la señal que conduce a la vía canónica. La vía no canónica de regulación de HIF-1, independiente de la actividad hidroxilasa de EGL-9, requiere de la proteína SWAN-1 y otros componentes desconocidos. Esta vía controla la actividad represora de HIF-1. Las señales que regulan esta vía no canónica aún no se han dilucidado. Modificado de referencia [120]

1.6.5 Respuesta al H₂S mediada por HIF

En *C. elegans* el factor de transcripción HIF-1 es además esencial en la respuesta a sulfuro de hidrógeno (H₂S) y ácido cianhídrico (HCN)[119]. Esta respuesta involucra dos vías diferentes que incluyen genes blancos de HIF-1: por un lado se activa la transcripción de la sulfuro quinona reductasa (SQRD-1), enzima clave en la vía de oxidación del H₂S y por otro se activa la transcripción de la cianoalanina sintasa (CYSL-2), enzima responsable de la asimilación del ácido cianhídrico [119](Fig. 1.25).

SQRD-1 reduce los niveles de sulfuro en la mitocondria: actúa oxidando el H₂S y reduciendo a la ubiquinona, previniendo de esta manera que se alcance una concentración mayor a la tolerada. Esta vía requiere además a la proteína persulfuro dioxigenasa (ETHE-1) y a la sulfito oxidasa (SUOX-1)[123].

CYSL-2 cataliza la reacción de asimilación de HCN manteniendo así bajos niveles, sin embargo produce cantidades equimolares de H₂S. La enzima CYSL-1 (cisteína sintasa *like*) actúa en el siguiente paso de la vía consumiendo el H₂S generado. CYSL-1 pertenece a la familia de proteínas O-acetilserina(tiol)liasa (OAS-TL) y cataliza la síntesis de cisteína y acetato a partir de H₂S y O-acetil serina[124]. En *C. elegans* es parte de la vía de asimilación del HCN y relevante para la detoxificación de H₂S[119,125] (Fig. 1.25). Si bien CYSL-1 no aumenta en respuesta a H₂S, en presencia de este compuesto CYSL-1 funciona como una proteína de transducción de señal que se une directamente a EGL-9 y previene que EGL-9 inhiba a HIF-

1[119,125](Fig. 1.25). Estudios con CYSL-1 recombinante de *C. elegans* confirman la actividad enzimática O-acetilserina sulfidrilasa (OASS), pero con una Km para el sulfuro que es al menos un orden de magnitud mayor que otras cisteínas sintetas auténticas (de plantas y bacterias). Dado esto, se especula que la actividad cisteína sintasa de CYSL-1 en *C. elegans* podría ser insignificante fisiológicamente y que su relevancia vendría dada por su papel en la regulación de la vía EGL-9 / HIF-1 en presencia de H₂S[124,125].

H₂S y HCN son compuestos a los que el gusano se enfrenta en su ambiente natural; H₂S puede generarse a partir de la descomposición de moléculas orgánicas azufradas y el HCN puede ser producido por bacterias y plantas. El crecimiento de gusanos en presencia de concentraciones moderadas de H₂S confiere resistencia a la muerte por parálisis que causa *Pseudomonas* al producir HCN. Por lo tanto, se propone que el circuito CYSL-1→EGL-9→HIF-1→SQRD-1+CYSL-2 permite la óptima detección de H₂S (vía CYSL-1) y la posterior eliminación de H₂S y HCN (a través de SQRD-1 y CYSL-2). Además se sugiere que la activación de *hif-1* independiente de hipoxia sería parte de la respuesta adaptativa a los compuestos H₂S y HCN producidos por bacterias patógenas[119].

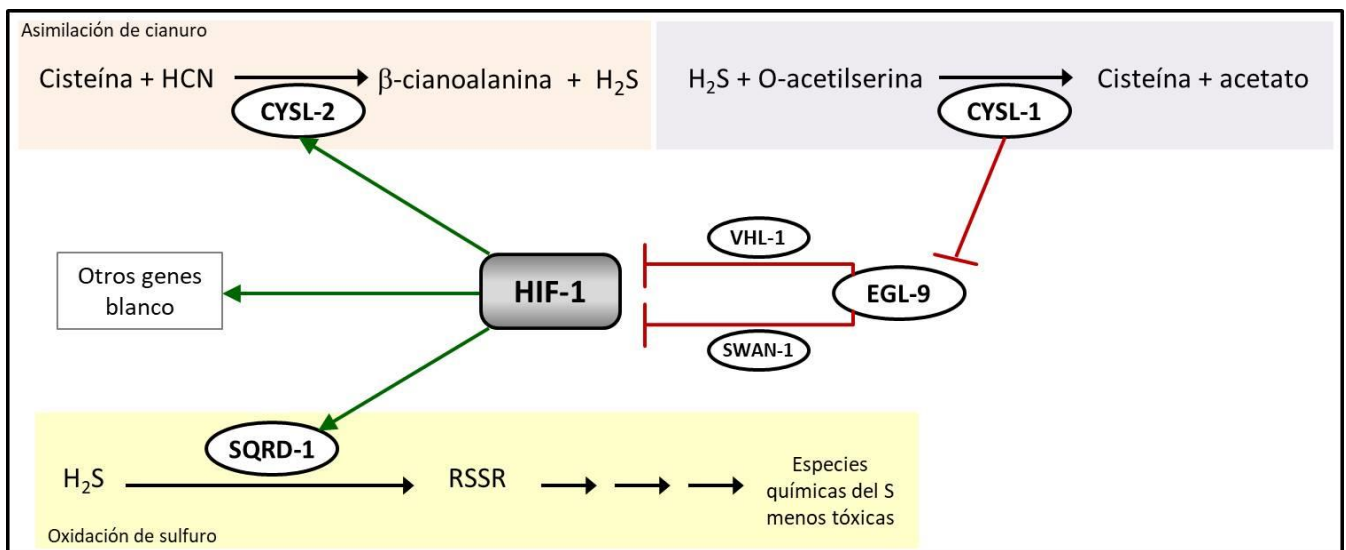


Fig. 1.25: Mecanismo propuesto para la activación de HIF-1 y consecuencias de la activación en las vías de asimilación de HCN y de oxidación del H₂S. En presencia de HCN y H₂S se activa HIF-1. La activación de HIF-1 induce la expresión de *cysl-2* y *sqrd-1*. SQRD-1 cataliza el primer paso de la vía de oxidación del H₂S produciendo compuestos con azufre que serán sustrato de otras enzimas de la vía, generando finalmente especies químicas del azufre menos tóxicas. CYSL-2 es la enzima clave en la asimilación de HCN, esta reacción produce H₂S. Además, en presencia de H₂S, ya sea producido del ambiente o endógenamente, CYSL-1 interacciona con EGL-9 y promueve la actividad de HIF-1. Modificado de referencia [119].

Otra proteína involucrada en la regulación negativa de HIF-1 independiente de VHL-1 es la proteína RHY-1[111]. El mecanismo propuesto es que participe en la cascada CYSL-1/EGL-9/HIF-1. RHY-1 es una proteína del tipo aciltransferasa de RE que disminuye la abundancia de CYSL-1. Se propone que en condiciones de normoxia, RHY-1 promueve la acetilación N-terminal de CYSL-1, una modificación conocida que altera las proteínas del tipo cisteína sintasa de plantas y así promovería la degradación de CYSL-1[111]. En condiciones de hipoxia y en condiciones de H₂S (acumulado endógenamente o del ambiente local) RHY-1 dejaría de funcionar, quedando CYSL-1 disponible para su interacción con EGL-9[125].

1.7 Objetivos

Estudio de la función de la selenoproteína T en *C. elegans* mediante un abordaje celular y comportamental.

Objetivos específicos

- I. Analizar la expresión celular y localización subcelular de *selt-1.1* y *selt-1.2*.
- II. Analizar los comportamientos asociados a la función de *selt-1.1* y *selt-1.2*.
- III. Analizar la respuesta a estrés redox de mutantes en *selt-1.1* y *selt-1.2*

Búsqueda de genes involucrados en la respuesta al selenio utilizando abordajes de genética directa e inversa.

Objetivos específicos

- I. Obtener mutantes resistentes al selenio mediante mutagénesis aleatoria y posterior selección utilizando concentraciones tóxicas de selenito de sodio.
- II. Mapear las mutaciones responsables del fenotipo de resistencia observado en los organismos seleccionados en presencia de condiciones tóxicas de selenio.
- III. Estudiar la vía EGL-9/HIF-1 en la resistencia al selenio y posibles genes regulados por el factor HIF-1 responsables del fenotipo de resistencia.
- IV. Estudiar los transportadores y enzimas de *C. elegans* potencialmente involucrados en el metabolismo del selenio.

2 Materiales y Métodos

2.1 Técnicas de *Caenorhabditis elegans*

2.1.1 Estirpes de gusanos y de bacterias.

Durante la realización de esta tesis se utilizaron distintas cepas de bacterias y del nematodo *C. elegans*. En las **Tablas 2.1, 2.2 y 2.3** se resumen las estirpes utilizadas en cada caso.

2.1.2 Medios utilizados para cultivo de *C. elegans*

Los componentes de los medios de *C. elegans* se describen a continuación:

- Medio NGM: NaCl 3 g/L, peptona 2.5 g/L, agar 17 g/L, colesterol 5 mg/ml, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 1 mM y buffer fosfato de potasio 0.025 M.
- Medio S-Basal (1L): 5.9 g NaCl, 50 mL buffer fosfato de potasio 1 M, 1 mL colesterol (0.5 mg/mL).
- Medio S Basal completo: Citrato de potasio 1% en peso, solución metales traza 1% (ver debajo composición), CaCl₂ 1M 0,3 %, MgSO₄ 1M 0,3%, el 100% se completa con S-basal.
- Buffer fosfato de potasio (KPO₄) (1 L): KH₂PO₄ 108.3 g, K₂HPO₄ 35.6 g. El pH de la solución preparada debe ser de 6.
- Colesterol (5 mg/mL): Colesterol 250 mg, Etanol 95 % c.s.p. 50 mL.
- Citrato de potasio 1M (1 L): Ácido Cítrico 20 g, Citrato de Potasio 293.5 g.
- Solución metales traza (1 L): EDTA disódico 1.86 g, FeSO₄ 7H₂O 0.69 g, MnCl₂ H₂O 0.2 g, ZnSO₄ 7H₂O 0.29 g, CuSO₄ 5H₂O 0.025 g.
- Solución de *bleaching*: 1 vol. de NaOH 5M: 1,5 vol. de NaOCl 4%: 2,5 vol. de H₂O.
- Buffer M9 (1 L): 3.0 g KH₂PO₄, 6.0 g Na₂HPO₄, 0.5 g NaCl, H₂O c.s.p.
- Solución de congelado 2X: NaCl 5.85 g/L, KH₂PO₄ 6.8 g/L, glicerol 300 g/L, NaOH 5.6 mM, MgSO₄ 0.3 mM.

2.1.3 Cultivo de *C. elegans*.

El mantenimiento general de las estirpes se realizó en placas de Petri de 5 cm con medio NGM (*Nematode Growth Medium*, composición en 2.1.2) agar con un césped de la cepa de *E. coli* OP50 como fuente de alimento, incubadas a 20°C.

Para el crecimiento en medio líquido se utilizó medio S completo (composición en 2.1.2) con bacteria OP50 y el procedimiento se puede dividir en dos etapas: 1- sincronización de gusanos y 2- sembrado de larvas en medio líquido.

1- Sincronización: 7-9 placas de 9 cm de NGM+OP50 con ~100 gusanos adultos se incuban a 20°C durante 1 semana. Una vez las placas se han enriquecido en gusanos adultos, se colectan con M9 estéril (3-4 mL por placa dos veces). Se

centrifugan a 600 g por 1 min y se descarta el sobrenadante. Se adicionan 10 mL de una solución alcalina de hipoclorito de sodio, denominada solución de *bleaching*. Se agita en vórtex cada 1-2 min y se monitorea el avance del proceso por observación con lupa. Cuando la mayoría de los gusanos están disueltos, se centrifugan a 1100 g por 2 min, y se descarta el sobrenadante. El *pellet* conteniendo los embriones se lava resuspendiéndolo con buffer M9 y centrifugando a la misma velocidad y tiempo. El lavado es repetido dos veces y luego los embriones se resuspenden en un volumen de 10 ml de M9 y se vierten a un matraz de 100 mL. Los embriones son entonces incubados a 20°C 210 rpm, durante 20 horas. En este tiempo todos los embriones eclosionarán y dado que el medio no posee comida, quedarán arrestadas en el estadio L1.

2- Sembrado de larvas L1: Se centrifugan la suspensión con larvas L1 a 1100 g por 2 min, se descarta el sobrenadante y se siembra en el medio S-completo (composición en 2.1.2) con bacteria OP50 (5 mg/mL). Se siembran 25 μ L de pellet de L1 pura en 250 mL de medio S. Estos gusanos se incuban a 20°C y 210 rpm hasta que alcanzan el estadio adulto. Para monitorear el estadio de los gusanos, se retiran alícuotas y se examinan en un portaobjeto en la lupa. Una vez alcanzado el estadio adulto, se pone el cultivo en una probeta de vidrio en baño de hielo por 1 hora. Al final de la incubación debería verse un *pellet* de gusanos en el fondo de la probeta. Se colectan los gusanos con una pipeta de vidrio y se transfieren a un tubo de 15 mL. Se centrifuga a 600 g por 1 min., se retira el sobrenadante y se lava el *pellet* varias veces con M9 frío. Repetir los lavados hasta que el sobrenadante se vea bien transparente, limpio de bacterias.

2.1.4 Visualización de *C. elegans*.

Para la observación de gusanos (del embrión al adulto los tamaños varían de 0.05 a 1 mm de largo) se dispuso de dos lupas las cuales alcanzaban una magnificación en el rango de 15x a 94x y de 12x a 75x.

2.1.5 Congelado de estirpes de *C. elegans*.

La solución para congelado se utilizó para criopreservar *stocks* de *C. elegans*.

Para el congelado de las estirpes, se toma 1 placa de 9 cm que tenga predominantemente gusanos en los estadios L1 y L2, después de 1 día de que se haya acabado la bacteria alimento. Se recuperan los gusanos con 3-5 mL de buffer M9 a un tubo de 15 mL y se agrega el mismo volumen de solución de congelado 2X, se mezcla, se alícuota en criotubos de 1mL y se almacena a -80°C. Inicialmente los criotubos se ubican en un bloque de espuma plast para permitir una congelación progresiva. Luego de 2 semanas uno de los tubos se descongela y se vierte el contenido en una placa de NGM con comida para monitorear el crecimiento de los

nematodos como control del correcto congelado. El resto de los tubos se mantienen a -80 °C en las cajas de almacenamiento de estirpe hasta su uso.

2.1.6 Limpieza de stocks contaminados, preparación de huevos y sincronización.

La limpieza de *stocks* contaminados por hongos o bacterias distintas a *E. coli* OP50 se realizó tratando gusanos hermafroditas adultos con la solución de *bleaching* (composición en 2.1.2). Esta solución elimina la contaminación y degrada a los nematodos de cualquier estadio larvario y adultos, únicamente sobreviven los embriones protegidos por su envoltura. Por ello, este procedimiento es también utilizado para obtener material de embriones y para sincronizar cultivos de *C. elegans* (como se describió anteriormente en 2.1.3).

Para realizar la descontaminación, en una placa NGM+OP50 nueva, fuera del césped de bacteria, se coloca una gota de 20 µL de la solución de *bleaching* fresca. Dentro de la gota se ponen aproximadamente 25 hermafroditas adultos grávidos.

La sincronización de gusanos se realiza como se describió anteriormente en la sección “cultivo de *C. elegans*”. La escala de trabajo es diferente según el objetivo de la sincronización. Anteriormente se describió el procedimiento de sincronización para el cultivo líquido de gusanos en donde la cantidad deseada es del orden de mililitros de gusanos. En otros casos, como es la sincronización de gusanos para ensayos en los que se necesitan alrededor de 10000 gusanos, se parte de 1-2 placas de NGM+OP50 de 9 cm rica en gusanos adultos. Una vez obtenida la población de L1 sincronizadas se siembran en placas nuevas de NGM+OP50, 4000 L1 por placa de 9 cm o 2000 por placa de 5 cm. Esa cantidad de L1 por placa permite obtener L4-jovenes adultos sin escasez de comida.

2.1.7 Montaje de los gusanos para observación al microscopio.

Se precalienta a 65°C 2% de agarosa en agua, se coloca una gota en el centro de un portaobjetos y se aplasta con otro portaobjetos de manera de obtener una película delgada. De esta forma queda una fina capa de agarosa sobre la cual se colocarán los gusanos y así no serán dañados al colocar el cubreobjetos encima. Estos soportes se denominan *pads*. Los gusanos se colocan sobre los *pads* en una gota de azida de sodio 60 mM.

Los embriones fueron obtenidos mediante un corte transversal de un gusano adulto grávido (en el caso de estadios tempranos) y tomados directamente de una placa (en el caso de estadios embrionarios más tardíos).

2.1.8 Microscopia confocal, Normasky y fluorescencia.

Para determinar el patrón de expresión de los genes *selt-1.1* y *selt-1.2*, se utilizó microscopia confocal. Los gusanos transgénicos adultos y larvas fueron visualizados bajo el microscopio TCS SP5 Leica DMI6000 y las imágenes capturadas con el programa Lasaf 2.7 y procesadas con el programa Fiji[126].

Para el análisis del patrón de expresión génica en los embriones *selt-1.1* y *selt-1.2* se utilizó microscopia de epifluorescencia y Normansky. Los embriones fueron visualizados bajo el microscopio Olympus IX81 con una cámara Hamamatsu ORCA ER y las imágenes capturadas con el programa 4.17 micro-manager [127]. Las imágenes fueron procesadas con los programas FIJI y Huygens 4.5.lp3.

2.1.9 Tinción con DiI

Para la visualización de las neuronas ADL, ASH, ASI, ASJ, ASK, AWB, PHA y PHB gusanos adultos transgénicos fueron incubados en 1 mL de buffer M9 con 0.6 µg/mL del compuesto DiI (*1,1'-dioctadecyl-3, 3, 3',3'-tetra methyl indocarbo cyanine perchlorate*) por 30 min con agitación suave. Luego los gusanos fueron lavados 4 veces con buffer M9 centrifugando cada vez a 600 g 1 min y sacando el sobrenadante. Finalmente se transfieren a una placa de NGM+OP50 para su recuperación por 16 horas a 20°C y se montan en un *pad* con azida para su visualización con microscopia de fluorescencia. El compuesto DiI es excitado a 550 nm y emite fluorescencia con un pico máximo a 580 nm.

2.1.10 Cultivo de *Escherichia coli* para ARNi.

Para realizar cultivos de *E. coli* se utilizó el medio Luria-Bertani (triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%).

Para los ensayos de ARNi, se utilizan bacterias *E. coli* de la cepa HT115 transformadas con el plásmido pL4440 portando la secuencia a interferir. El plásmido L4440 contiene el promotor de la ARN polimerasa T7 (inducible por IPTG), flanqueando el sitio de múltiple clonado y confiere resistencia a ampicilina. Los clones de ARNi se crecieron durante 16 horas a 37°C en medio LB líquido con el antibiótico a concentración final de 100 µg/mL e IPTG 1 mM para inducir el ARN interferente de doble hebra.

Uno o dos días antes de comenzar el experimento la bacteria es sembrada en placas con NGM agar, con 100 µg/mL de ampicilina y 1 mM de IPTG e incubadas durante 16 horas a 37°C.

De esta manera se produce ARNdh por la bacteria, el cual es ingerido por el gusano. Los clones para ARNi utilizados están listados en la **Tabla 2.2**.

2.1.11 Ensayos de ARNi.

La interferencia de la expresión de todas las tiol-disulfuro oxidorreductasas del RE (detalladas en **Tabla 2.2**) se realizó sobre gusanos adultos de la estirpe N2 y sobre el doble mutante *selt-1.1(tm3763);selt-1.2(tm3771)*. La interferencia de la expresión de *suox-1*, *cysl-3* y *gsr-1* fue realizada sobre gusanos N2. Se utilizaron bacterias *E. coli* HT115 con plásmidos sin inserto (vacío) o codificando para ARNdh de *dpy-11* como controles negativo y positivo, respectivamente (el ARNi de *dpy-11* genera gusanos más gordos y cortos que la estirpe silvestre N2).

Gusanos hermafroditas adultos se colocan en las placas NGM con bacteria interferente durante 1 hora y luego se retiran. Los embriones que quedan en la placa corresponden a la generación F0.

Para los experimentos de interferencia de las tiol-disulfuro oxidorreductasas del RE los fenotipos examinados desde la generación F1 hasta la F5 fueron: locomoción, desarrollo, muerte temprana y morfología.

En los experimentos de interferencia de *suox-1*, *cysl-3* y *gsr-1* gusanos de la generación F3 fueron transferidos a placas NGM agar con selenito de sodio 5 mM. El número de gusanos vivos a las 24 horas fue cuantificado. Para el caso de los interferidos con *suox-1* se incluyó la exposición de los mismos a placas NGM con sulfito de sodio 0.5 g/L como control.

2.1.12 Ensayos de desarrollo extraembrionario

Para evaluar el desarrollo extraembrionario se coloca en una placa 15-20 gusanos adultos grávidos durante 1 hora y luego son retirados. Por autofecundación de los hermafroditas quedarán en la placa embriones los cuales son evaluados cada día con respecto al estadio del ciclo de vida alcanzado. Para facilitar la designación de los estadios, se cuantifican los gusanos en tres categorías, menores al estadio L4 (es decir L1, L2 y L3), L4 y adultos.

2.1.13 Generación de organismos transgénicos.

Los organismos transgénicos fueron obtenidos de acuerdo al procedimiento descrito en [128]. Brevemente el protocolo consiste en la inyección de la construcción de interés en el brazo distal de la gónada del gusano, en el *core* citoplasmático que es compartido por los núcleos de la línea germinal, de modo que el ADN inyectado puede alcanzar muchos núcleos que darán lugar a la progenie.

Las técnicas de transfección con ADN requieren una co-transfección con un gen marcador detectable. El plásmido pL15EK que contiene el marcador de inyección

lin-15 (80 ng/μl) fue co-inyectado con las construcciones traduccionales y transcripcionales de *selt-1.1* y *selt-1.2*. e inyectadas en la estirpe MT19703 (*nIs394 III; lin-15AB(n765) X*). Para cada estirpe se aislaron al menos tres líneas independientes.

El plásmido pCFJ90, que contiene el marcador de inyección *Pmyo-2::mCherry::unc-54utr* fue co-inyectado con las construcciones traduccionales de *hif-1*, *cysl-1* y *vhl-1* e inyectadas en las estirpes ZG31 (*hif-1(ia4)*), RB899 (*cysl-1(ok762)*) y CB5602 (*vhl-1(ok161)*), respectivamente. Para cada estirpe se aisló una línea transgénica.

2.1.14 Integración de los arreglos extracromosomales al genoma.

Placas con más de 400 gusanos L4 son expuestas a rayos X (5 min 30 kVoltios y 10 min a 120 kVoltios). Luego de la irradiación se transfieren gusanos L4 a placas nuevas NGM+OP50, 5 gusanos por placa de 9 cm, 20 placas y se dejan crecer y reproducirse hasta que la placa quede sin alimento.

Una porción de estos gusanos se transfieren a 20 placas nuevas. Luego de 2 días, se pican 400 adultos a placas separadas, se deja que pongan la progenie y se selecciona aquella placa en la que la progenie es el 100% igual al gusano parental. Luego de identificar esta placa, se sigue transfiriendo gusanos a placas nuevas y verificando que la progenie es el 100% igual.

Dado que este procedimiento implica la radiación de gusanos y que podrían afectarse otras regiones del ADN adicionales a la de interés, luego de obtener la estirpe integrada se realizan al menos 2 retrocruzas con la estirpe silvestre.

Las estirpes QW1265 y QW1266 se obtuvieron según dicho protocolo.

2.1.15 Generación de machos.

La frecuencia de aparición de machos puede aumentarse mediante un choque térmico. Para esto, entre 20 y 30 hermafroditas L4 son incubadas a 37°C durante 1 hora en una placa de NGM con alimento, y luego se pasa a 20°C. Se espera que entre 2 y el 5% de la progenie sean machos. Una vez generados, el *stock* de machos se mantiene mediante su cruce con hermafroditas.

2.1.16 Retrocruzamientos con la estirpe silvestre.

Las estirpes obtenidas por mutagénesis aleatoria se retrocruzan seis veces con la estirpe silvestre con el fin de eliminar mutaciones no deseadas (diferentes a la de interés). Para esto se cruza un gusano hermafrodita de estadio L4 homocigota mutante (o transgénico en el caso de la integración) para el gen de interés con gusanos machos (entre 7-10) de la estirpe silvestre. Aproximadamente 3 días

después, los organismos parentales son descartados y se observa en la progenie la presencia de gusanos machos como indicativo de que ocurrió fecundación cruzada (la generación espontánea de machos ocurre en muy baja frecuencia y los gusanos hermafroditas pueden provenir de una autofecundación). De la generación F1 se toman gusanos machos (heterocigotas para el alelo mutante) y se cruzan con un hermafrodita silvestre en el estadio L4. La descendencia de este cruce (generación F2) será un 50% homocigota silvestre para el gen de interés y un 50% será heterocigota. En la progenie de un gusano heterocigota habrá un 25% de organismos homocigotas mutantes para el gen de interés (gusanos que se busca aislar).

Para aislar los gusanos F2 de genotipo heterocigota, se toman 10 gusanos hermafroditas de la generación F2 y se colocan en placas separadas (proceso denominado “primer *singling*”). Una vez que estos gusanos F2 se reproducen y se obtiene una F3 numerosa, los adultos de la F2 se analizan por PCR para determinar su genotipo e identificar aquellos que son heterocigotas. Una vez identificado un gusano F2 heterocigota, se busca en su progenie un organismo homocigota mutante para el gen de interés. Para esto, se toman 20 gusanos de la generación F3 y se colocan en placas separadas (proceso denominado “segundo *singling*”). Una vez que estos gusanos F3 dejan descendencia (generación F4), se analiza el genotipo de los 20 gusanos F3. Aquel organismo que sea homocigota mutante para el gen de interés, tendrá toda su progenie con el mismo genotipo (homocigota mutante).

Este proceso constituye una ronda de limpieza (en la que se realizaron dos cruces con la estirpe silvestre)(**Fig. 2.1**), luego de la cual se vuelve al comienzo para una segunda ronda y así hasta completar tres rondas de limpieza (seis cruces con la estirpe silvestre).

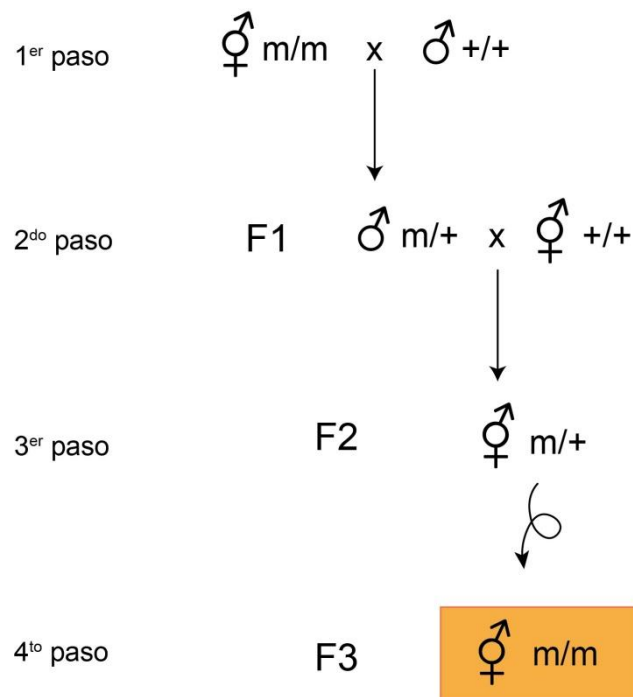


Fig. 2.1: Esquema genérico de una ronda de curado de una estirpe KO, representado un gen autosómico. Primer paso (primer retrocruzamiento): cruce entre organismo hermafrodita (♀) homocigota mutante (m) en el gen de interés con un macho (♂) silvestre WT ($+/+$). Toda la generación F1 es heterocigota ($+/m$). Segundo paso (segundo retrocruzamiento): un macho de la F1 se cruza con un hermafrodita silvestre. Un hermafrodita heterocigota de la generación F2 se autofecunda, dando lugar a la generación F3. El 25% de la generación F3 será homocigota mutante para el gen de interés.

El análisis genotípico de los gusanos se realiza por PCR. Para esto, se utilizan dos juegos de cebadores por cada gen de interés: un juego de cebadores que flanquean la deleción (*outer left-outer right* o OL-OR), y otro juego que incluye un cebador por fuera de la deleción y uno dentro de la secuencia deletada (*outer left-inner right* o OL-IR). Como resultado, para un organismo homocigota silvestre se espera un único producto de PCR con cada uno de los juegos de cebadores. Para un organismo homocigota para el alelo de deleción se espera un producto de PCR de menor tamaño que el silvestre utilizando los cebadores OL-OR y no se obtendrá producto con los cebadores OL-IR. Por último, para un organismo heterocigota para el gen de interés, se obtendrán dos productos de PCR con los cebadores *outers*, el de mayor tamaño correspondiente al alelo salvaje y el de menor tamaño correspondiente al alelo mutante. En tanto la amplificación realizada con los cebadores OL-IR, dará un único producto correspondiente al alelo silvestre (el alelo de deleción no se amplifica).

Cuando el gen mutante se desconoce, como por ejemplo luego de una mutagénesis química y posterior selección, la selección de los organismos de genotipo de

interés se realiza mediante el análisis del fenotipo asociado a la mutación de estudio. En el caso de esta tesis, en el cual se aislaron mutantes resistentes a concentraciones tóxicas de selenito se siguió este fenotipo para la selección de los gusanos durante el curado, el cual se realizó previo al mapeo del gen involucrado.

2.1.17 Generación de organismo doble mutante.

A partir de los organismos mutantes en *cysl-1(ok762)* y *egl-9(sa307)*, se generó el doble mutante. Este proceso involucra el cruce de un organismo hermafrodita homocigota mutante para uno de los genes de interés, con macho homocigota mutante para el otro gen, en este trabajo se utilizó hermafrodita *cysl-1(ok762)* y macho *egl-9(sa307)*. La descendencia de este cruce es heterocigota para los dos alelos de delección; esto se puede verificar por PCRs utilizando cebadores que flanquean la delección en uno y otro gen.

De la descendencia del cruce (generación F1) se elige un hermafrodita, se deja que se alcance la siguiente generación (F2), y sobre esta generación F2 se hace un análisis por PCR, para identificar los homocigotas mutantes para ambos genes. Como la proporción de individuos doble homocigota mutante en la generación F2 es 1/16, el número de individuos que habría que analizar por PCR para identificarlo es muy grande. Por ello, en la práctica se sigue la siguiente estrategia: se busca en la generación F2 un gusano que sea homocigota mutante para uno de los genes y heterocigota para el otro gen (la proporción de individuos con este genotipo en la F2 es de 4/16). Una vez identificado, se analiza la descendencia (generación F3) por PCR, en busca de aquel organismo que sea homocigota mutante para ambos genes. En el análisis por PCR se usa la misma estrategia que en el curado de las estirpes.

Una vez obtenida una estirpe doble mutante se la denomina formalmente siguiendo los códigos listados en el CGC y en la *Wormbase*. La comunidad de *C. elegans* (*WormBase*) asigna un código específico para nombrar estirpes, variaciones genéticas y transgenes que identifica a cada laboratorio dedicado a la investigación en *C. elegans*. El código de estirpes asignado al Laboratorio de Biología de Gusanos es IH. La estirpe doble mutante generada en esta tesis se le denominó: IH24: *cysl-1(ok762)X*; *egl-9(sa307)V*.

La estirpe IH18 se generó mediante el cruce de las estirpes QW1266 y VZ255.

2.1.18 Screening genético (F2 Mutant Screen) y selección de mutantes resistentes a concentraciones tóxicas de selenio.

Mutagénesis química aleatoria

En el *screen* de mutantes de la generación F2 se utiliza un compuesto mutagénico para inducir mutaciones en células de la línea germinal de gusanos hermafroditas de la estirpe silvestre. A partir de estos gusanos mutagenizados, luego de dos generaciones se producirán mutantes homocigotas. La **Fig. 2.2** ilustra un *screen* de mutantes en la generación F2.

El *screen* de F2s no-clonal se realizó según la referencia [129] con algunas modificaciones. Seis placas de 9 cm con gusanos de varios estadios se dejaron crecer hasta estar enriquecidas en gusanos del estadio L4, se levantaron con buffer M9 y se transfirieron a dos tubos de 15 mL. Se agregó ENU (N-ethyl-N-nitrosourea concentración final 0.5 mM) y se incubó 4 horas a 20°C con agitación. Los animales se recuperaron con buffer M9 y fueron lavados 3 veces, centrifugando cada vez a 600 g durante 1 min. Una vez lavados se transfirieron a dos placas de NGM+OP50 para su recuperación durante 2 horas. A partir de las placas con los gusanos mutagenizados, se transfirieron a nuevas placas de NGM gusanos en el estadio L4-jóvenes adultos, 60-70 gusanos por placa, 2 placas, (generación P0), y se dejan 16 horas a 20°C. De esta manera se obtienen gusanos adultos grávidos tempranos.

Los gusanos adultos grávidos (P0) se transfirieron a placas nuevas, 5 adultos por placa, 20 placas, se deja que pongan huevos por tres horas y se transfieren a una placa nueva (3 veces) y finalmente se descartan. Los huevos puestos en estas placas constituyen la generación F1. Se deja que los gusanos F1 se reproduzcan. Cuando las primeras larvas de la F2 empiezan a eclosionar, los gusanos adultos de la F1 son removidos. De esta manera queda en la placa la generación F2 la cual se analizará según el fenotipo buscado.

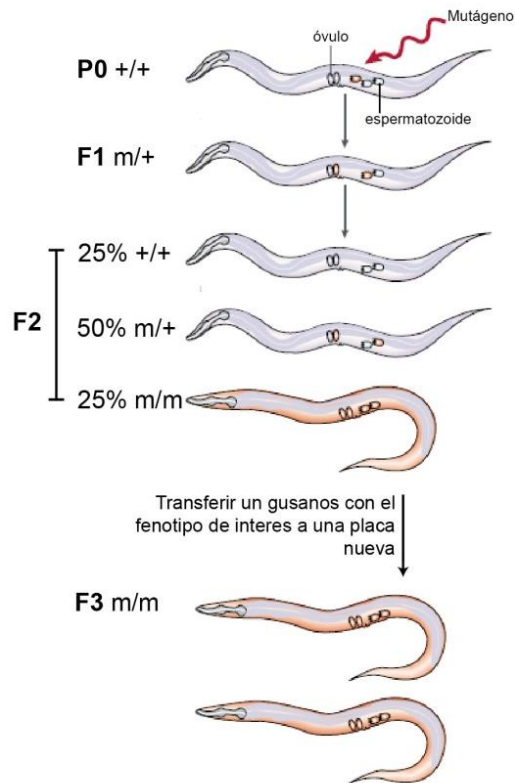


Fig.2.2: F2 Mutant screen. Esquema ilustrando un *screen* de mutantes en la F2. Una población de hermafroditas silvestres es expuesta a un mutágeno y las células van a ser afectadas al azar. Células germinales mutadas se representan en rojo. Por ejemplo, un espermatozoide podría tener mutado un gen que genere el fenotipo de interés. La fertilización de un oocito por este espermatozoide genera un organismo F1 heterocigota. Como los hermafroditas se autofecundan un 25% de la generación F2 será homocigota para la mutación y exhibirá el fenotipo de interés. Tomado de referencia [129].

Selección de organismos resistentes a concentraciones tóxicas de selenito de sodio

Una vez obtenida la población de gusanos de la generación F2 descendientes de los gusanos mutagenizados, se hizo dos procedimientos para la selección de mutantes resistentes a concentraciones tóxicas de selenito de sodio.

Como resultado del procedimiento de mutagénesis se obtuvieron 60 placas con F2. La mitad de las placas F2 se dejó que los gusanos llegaran al estadio de joven adulto y se los transfirió a placas con 10 mM de selenito de sodio. Luego de 72 horas, se recuperaron aquellos individuos vivos con el mejor aspecto y movimiento y se los transfirió a placas normales para su recuperación. Muchos de estos eran estériles, por lo cual se eliminaron y se continuó trabajando con la progenie de aquellos que eran fértiles (52 mutantes). Una vez la siguiente generación de los sobrevivientes al selenito alcanzó el estadio adulto, se los expuso a selenito de sodio 5 mM en medio líquido, 20-25 gusanos por pocillo de placa de 96 pocillos. Luego de 20 horas de incubación, aquellos que vivían y tenían movimiento, fueron transferidos a placas normales para su recuperación (22 mutantes). Con la progenie de los elegidos en este segundo paso de selección, se los transfirió a placas con 10 mM de selenito de sodio en medio sólido y luego de 72 horas se recuperaron los gusanos que vivían. Los organismos vivos luego de esta

incubación, fueron multiplicados para su criopreservación así como el trabajo posterior (5 mutantes).

Durante el proceso de selección descrito anteriormente, los mutantes recuperados eran aquellos en los que en la placa había mayor cantidad de sobrevivientes a simple vista, no se cuantificaba el número de gusanos vivos. Sin embargo, a partir de los 5 mutantes aislados en este procedimiento, se cuantificó el número de gusanos adultos vivos luego de 72 horas en 10 mM de selenito de sodio. De esta manera se seleccionó al mutante QW1264 para continuar trabajando.

Por otro lado, la otra mitad de placas F2 (30 placas), se dejó que llegaran a desarrollarse en adultos grávidos y se aislaron los embriones (F3) mediante *bleaching*. Los embriones F3 fueron expuestos a 5 mM de selenito de sodio en medio sólido (miles de embriones por placa). Luego de 96 horas, aquellos individuos que sobrevivieron y siguieron su desarrollo hasta el estadio L3 fueron transferidos a placas normales para su recuperación. Muchos eran estériles y se descartaron. Se continuó trabajando con 56 mutantes que dejaron progenie. Los gusanos adultos F4 fueron expuestos a 5 mM de selenito de sodio en medio líquido en placa de 96 pocillos (20 gusanos por pocillo). Luego de 24 horas, 32 mutantes fueron recuperados. Los embriones de la siguiente generación, fueron expuestos a 5 mM de selenito de sodio en medio sólido, y aquellos organismos que luego de 6 días siguieron su desarrollo hasta los estadios L3-L4 fueron recuperados (12 mutantes). Por último, la progenie de los mutantes aislados en el paso anterior, en estadio adulto, fueron expuestos en medio sólido a 10 mM de selenito de sodio y luego de 72 horas, aquellos que tenían la mayor cantidad de sobrevivientes, fueron elegidos (9 mutantes).

Durante el proceso de selección descrito anteriormente, los mutantes recuperados eran aquellos en los que en la placa había mayor cantidad de sobrevivientes (ensayos a partir de adultos en Se) o el número de embriones que eclosionaban y avanzaban en su desarrollo hasta estadios larvarios L3-L4 era mayor. Para los 9 mutantes aislados en este procedimiento se cuantificó el número de gusanos adultos vivos luego de 72 horas en 10 mM de selenito de sodio y se seleccionaron aquellos que tenían un número de sobrevivientes mayor al 50%. De esta manera quedaron seleccionados los mutantes QW1263 y QW1262 para continuar trabajando, en tanto los restantes fueron congelados.

2.1.19 SNP mapping con la estirpe hawaiana (HW)

El mapeo de grupo de ligamiento y región afectada en los mutantes obtenidos por mutagénesis química se realizó siguiendo el protocolo descrito en la referencia [130]. Este protocolo se expone brevemente en el **Anexo 4.2** junto con los resultados obtenidos.

2.1.20 Ensayos de toxicidad con selenito de sodio en placa.

En los ensayos de toxicidad con selenito de sodio en placa, al medio NGM agar fundido se le agregó la cantidad necesaria de selenito de sodio para concentraciones finales de 2, 5, 10 y 20 mM.

Para evitar posible interferencia del metabolismo del Se por parte de la bacteria OP50, se utilizó bacteria muerta. Para esto, un cultivo concentrado (20x) de bacteria se incubó a 65°C durante 30 min.

Entre 40-50 gusanos L4-jóvenes adultos fueron transferidos a las placas con selenito, y luego de 72 horas (o del tiempo indicado) se cuantifica el número de gusanos vivos y muertos. Aquellos gusanos que mueren por otro motivo, por ejemplo irse a las paredes de la placa y morir por desecación, no son incluidos en el resultado. Todos los días los gusanos sobrevivientes son transferidos a placas nuevas con selenito y los muertos descartados.

2.1.21 Ensayo de toxicidad en medio líquido utilizando *WMicrotracker*.

Worm Microtracker (WMicrotracker)

El equipo *Worm Microtracker* permite medir la actividad locomotora de gusanos en medio líquido en un formato de placa de 96 pocillos.

El mecanismo de detección del movimiento de basa en un sistema de haces de luz infrarroja y detectores. En la posición correspondiente a cada pocillo de la placa, dos haces de luz infrarroja atraviesan la base pocillo, la suspensión de gusanos y finalmente son detectados por un fototransistor. Cuando los gusanos por su movimiento interceptan los haces de luz, ocurre una fluctuación en la señal recibida por el fototransistor y la señal de salida de este es convertida digitalmente en un valor de actividad. Cuanto más movimiento haya en un pocillo, mayor será el número de veces que el haz de luz es interrumpido y eso es traducido en una mayor actividad locomotora. El uso de distintas concentraciones de una droga o un compuesto que afecte al gusano, se va a evidenciar en un cambio en la actividad locomotora del gusano.

La **Fig. 2.3** incluye un esquema del equipo así como también los pasos básicos de un ensayo utilizando el *WMicrotracker*.

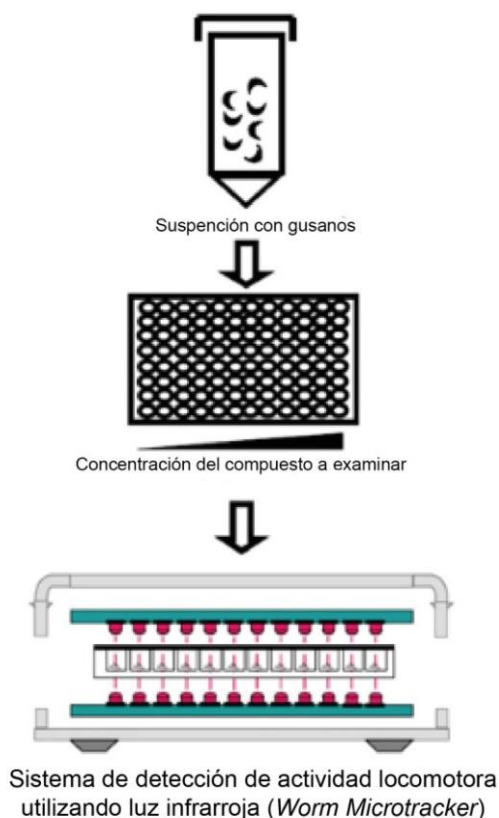


Fig. 2.3: Esquema de procedimiento de medida de actividad locomotora en el equipo *WMicrotracker*. Los gusanos en medio líquido son repartidos en una placa de 96 pocillos, 80-100 gusanos por pocillo. El compuesto de interés se agrega en distintas concentraciones. En el equipo se adjudica el tiempo total y los intervalos de tiempo a los cuales se desean adquirir medidas. La actividad locomotora se obtiene mediante la intercepción de los haces de luz por el movimiento de los gusanos en cada pocillo y transformada en el parámetro actividad. Modificado *Worm Breeder's Gazette*, Volumen 18, Numero 2. Comunicación personal con Sergio H. Simonetta.

*Ensayo de toxicidad utilizando *WMicrotracker**

Gusanos sincronizados en estadio L4 son transferidos a las placas de 96 pocillos, ~80 gusanos por pocillo en un volumen final de 100 μ L.

A partir de placas de NGM+OP50 con gusanos sincronizados, se levantan los gusanos L4 con buffer M9 y se transfieren a un tubo de 15 mL. Se centrifuga a 600 g durante 1 min y se saca el sobrenadante. Se lava 1-2 veces según la cantidad de bacteria que quede en el sobrenadante. Por último se resuspende el *pellet* de gusanos en el medio en el cual será realizado el experimento. En el caso de esta tesis fue H₂O.

En la mayoría de los experimentos se ensayaron 4 pocillos por condición por estirpe de gusano. Con esta placa, se procede a la cuantificación de motilidad en el *WMicrotracker* durante 15 minutos. Esta será la motilidad basal por pocillo, de esta manera se normaliza la actividad según el número de gusanos en cada pocillo. El compuesto a ser examinado se agrega en un volumen de 50 μ L. El selenito de sodio se disolvió en agua y se agregó para obtener las concentraciones finales de 2, 5, 10, 15 y 20 mM. En todos los casos se incluyó un control sin selenito.

Para los ensayos realizados con selenometionina (5, 10 y 20 mM) y sulfuro de hidrógeno (2, 6, 10, 14, 18 y 20 mM) se siguió el mismo procedimiento.

2.1.22 Análisis de datos

Test estadísticos

Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas fueron determinados a través de los test Shapiro-Wilk y Levene respectivamente, para lo cual se fijó un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0.05$).

Los datos que cumplieron con estos supuestos fueron analizados mediante test paramétricos. Para el caso de los ensayos de motilidad en diferentes compuestos utilizando el *WMicrotracker*, se utilizó el test ANOVA para comparar los resultados obtenidos entre las distintas concentraciones dentro de una estirpe y entre las distintas estirpes. En los casos en los que no se cumplía homogeneidad de varianza, se utilizó el test Welch. En ambos casos se utilizó un nivel de significancia de 0.05. En aquellos casos que hubo diferencias significativas, se utilizó el test *a posteriori* de Tukey para determinar entre qué grupos había diferencias significativas. En todos los casos se utilizó el programa Past.

Curva dosis respuesta

Los datos de actividad en función de la concentración fueron ajustados a la siguiente ecuación:

$$Y = min + \frac{(max - min)}{\left[\left(1 + \frac{x}{EC50} \right)^H \right]}$$

Donde Y es la actividad locomotora en presencia de selenito en relación a la actividad sin selenito, x es la concentración de selenito, max y min son las actividades locomotoras máximas y mínimas, $EC50$ es la concentración a la cual se alcanza un 50% de actividad locomotora y H es el coeficiente de Hill. Los datos están presentados como promedio \pm error estándar de la media.

2.2 Protocolos de biología molecular

La **Tabla 3.4** lista todos los cebadores utilizados en esta tesis.

2.2.1 Preparación de ADN genómico.

A- El ADN genómico utilizado como molde para la generación de las construcciones fusión a la proteína fluorescente verde (GFP) se purificó de acuerdo al siguiente protocolo:

1- 500 μ L de gusanos se incubaron en buffer con proteinasa K (10 mM Tris-HCl pH 8.0 con 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0.5% SDS, 20 μ g/ml de RNAsa A y 0.1 mg/ml de proteinasa K), 12 horas a 50°C.

El ADN se extrajo con fenol/cloroformo y centrifugación a 5000 g durante 15 min. Se repitió la extracción y se realizó una extracción final con cloroformo, siempre descartando la fase orgánica. El ADN en solución se precipitó por adición de 0.1 volumen de 3 M acetato de sodio pH 5.8 y 2 volúmenes de etanol. El ADN se removió en una pieza con una pipeta pasteur, y luego se lavó 2x con un volumen grande de etanol 70% frío. Se seca el *pellet* en un tubo abierto a temperatura ambiente hasta que se evapore todo el etanol y luego se resuspendió el ADN en buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Se dejó redisolverse a temperatura ambiente durante 24 horas y se almacena a 4°C.

B- *La extracción de ADN utilizado para enviar a secuenciar el genoma de las estirpes mutantes resistentes al Se, se realizó utilizando el kit Gentra Puregene Tissue, Qiagen. Al protocolo del kit se le adicionó un paso inicial de preparación de las muestras de gusanos y un paso de sonicación luego del agregado de la solución de lisis. Ambos se detallan a continuación:*

Para la preparación de muestras es muy importante tener la menor cantidad de bacteria posible. Se cosecharon gusanos de las placas con buffer M9, preferentemente cuando están casi sin comida y mínimo número de huevos, y se transfirieron a un tubo de 15 mL. Se lavó dos veces con M9, centrifugando a 600 g durante 1 min. Se resuspendió en 6 mL de M9 y se lo dejó con agitación suave durante dos horas (para el purgado de bacterias). Se realizó un lavado final con 15 mL de M9, y se almacena el *pellet* a -80°C durante un mínimo de 12 horas. Lo ideal es tener un *pellet* de gusanos de 1.5 mL.

Luego de agregar la solución de lisis, se sonicaron las muestras utilizando 15 pulsos de 1 seg., separados por pausas de 2 seg.

2.2.2 Worm PCR

En algunas de las retrocruzadas de mutantes con la estirpe silvestre N2, el genotipado se realizó mediante PCR, utilizando el ADN de uno o varios gusanos, dependiendo del caso, procedimiento denominado *Worm PCR*.

Se colocaron entre 15 y 20 gusanos en 25 µL de buffer de lisis de gusanos (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% NP-40 (IGEPAL), 0.45% Tween 20, 0.01% gelatina) y se le agregó 1 µL de Proteinasa K (20 mg/mL). Se congelaron los gusanos a -80°C durante 30 min para facilitar su ruptura. La mezcla se incubó a 65°C por 60 min y luego a 95°C por 15 min. En situaciones en las que se quiere analizar el genotipo de un único individuo, como es en los curados de estirpes, se coloca el gusano en 6 µL de buffer. Se utiliza 1 µL de la reacción para la realización de la PCR.

2.2.3 Clonados

*Construcciones reporteras utilizadas para estudiar la expresión de los genes *selt-1.1* y *selt-1.2*.*

Se utilizaron 4 construcciones con la GFP como reportero para determinar el patrón de expresión de *selt-1.1* y *selt-1.2*. Las fusiones transcripcionales *Pselt-1::gfp* and *Pselt-2::gfp* corresponden a los promotores de *selt-1.1* y *selt-1.2 upstream* la secuencia codificante de GFP. La secuencia promotora comprende la secuencia *upstream* de la secuencia codificante hasta el gen vecino (2 kbp y 0.6 kbp para *selt-1.1* y *selt-1.2*, respectivamente) (**Fig. 2.4**). Las secuencias fueron amplificadas usando los cebadores correspondientes incluyendo los sitios de restricción de Sall y BamHI para *Pselt-1.1* y Sall y HindIII para *Pselt-1.2* (**Tabla 2.4**). Como molde se utilizó ADN genómico de gusanos adultos (ver 2.2.1). Los productos de PCR fueron clonados en el vector pPD95.77. Las construcciones traduccionales *Pselt-1.1::selt-1.1::gfp* and *Pselt-1.2::selt-1.2::gfp* incluyen promotor, exones e intrones del gen de interés (**Fig. 2.4**) en marco con la secuencia codificante de la GFP. La secuencia 3'UTR del gen *unc-54* es provista por el vector. El vector y los sitios de restricción usados para el clonado fueron los mismos que para las construcciones transcripcionales.

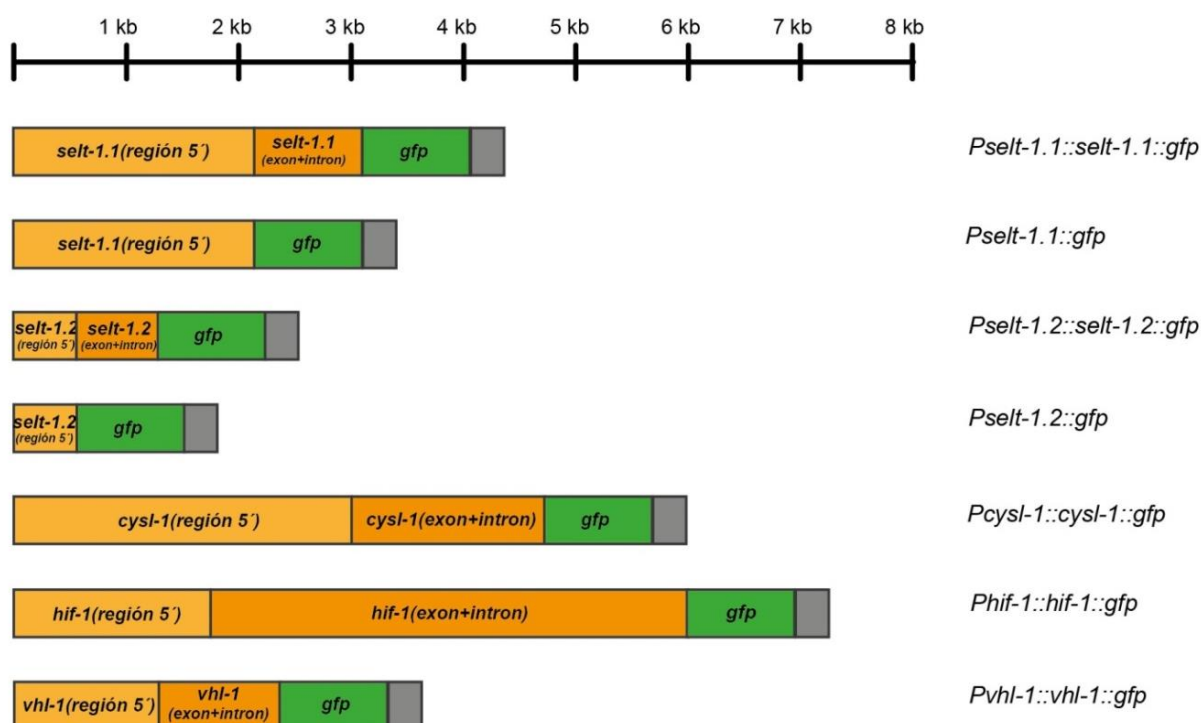


Fig. 2.4: Representación de las construcciones generadas en este trabajo y utilizadas para generar líneas transgénicas. En gris se representa el 3'UTR del gen *unc-54*, el cual es provisto en el vector usado (pPD9577).

Construcciones reporteras utilizadas para el rescate de fenotipo de estirpes mutantes en *hif-1*, *vhl-1* y *cysl-1*.

Para el rescate del fenotipo de las estirpes *hif-1(ia4)*, *vhl-1(ok161)* y *cysl-1(ok762)* se utilizaron construcciones traduccionales de dichos genes fusionadas a GFP (**Fig. 2.4**). En los tres casos se utilizó el procedimiento denominado *OEPR Cloning* (*Overlap Extension PCR and Recombination in vivo*) el cual es una adaptación del método de clonado *Restriction Free*. El detalle del procedimiento se puede ver en referencia [131]. La **Fig. 2.5** resume las etapas involucradas en este método de clonado. Brevemente, este método de clonado incluye:

1- Amplificación por PCR de secuencia de interés utilizando cebadores que poseen en el extremo 5' secuencias que hibridaran en el vector en el que se quiere clonar ("PCR 1").

El producto obtenido en la PCR 1 es purificado y utilizado como cebador, denominado *megaprimer*, junto con un cebador reverso que hibrida sólo en el vector de interés y así amplificar el vector con el inserto ("PCR 2"). El uso de este segundo cebador reverso, permite que la amplificación sea casi exponencial, aumentando así la eficiencia.

3- El producto de la PCR 2 es digerido con la enzima DpnI y se transforman células competentes TOP10F'. El uso de esta estirpe de bacteria permite que las secuencias homólogas sean reparadas *in vivo* por la recombinación homóloga en *E. coli*.

Los cebadores específicos para los insertos de interés, así como el cebador reverso específico para el vector utilizado (pPD9577) se detallan en la **Tabla 2.4**.

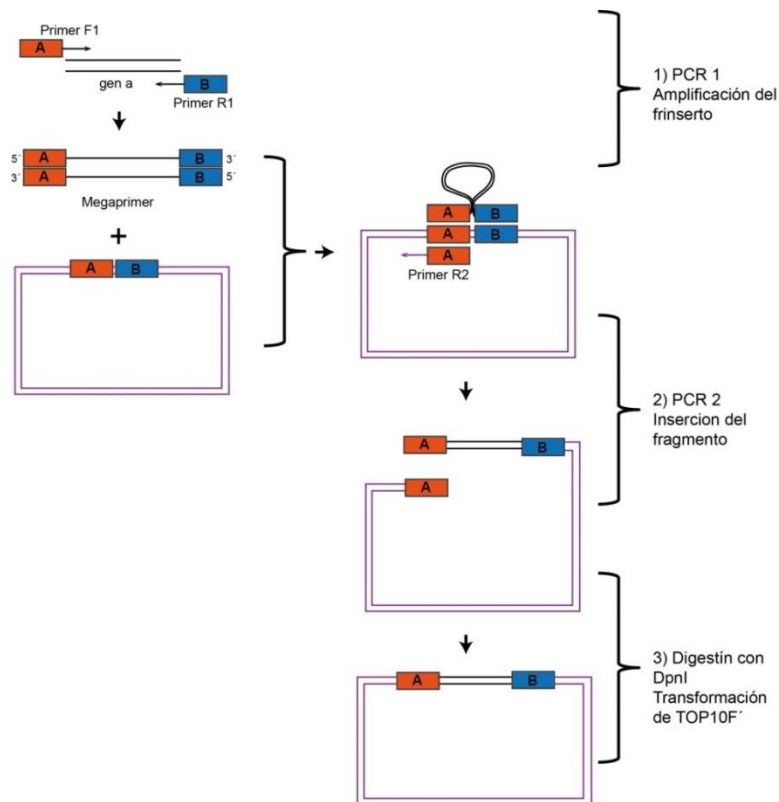


Fig. 2.5: Esquema del procedimiento seguido en el clonado de un inserto largo (mayor de 3 kb) en un vector mediante el método de OEPR Cloning. Modificado de [131]

Preparación de células competentes y transformación.

La preparación de células competentes y transformación de células se realizó mediante los métodos que se describe en la referencia [132].

Extracción de ADN plasmídico.

La extracción de DNA plasmídico de bacterias se realizó mediante el método de lisis alcalina que se describe en la referencia [133] o utilizando el kit *PureLink, Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen)*.

Secuenciación de construcciones generadas.

Todas las construcciones generadas fueron enviadas a secuenciar en la plataforma de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo. El servicio de secuenciación de ADN realiza secuenciación mediante el método de Sanger y el análisis de fragmentos con un analizador genético 3130 (*Applied BioSystems*).

2.2.4 Secuenciación de genoma de estirpes de *C. elegans* generadas.

Preparación de pool de recombinantes de la generación F2 de las estirpes mutantes.

Como método para el mapeo de la/s mutación/es, se eligió seguir la metodología de “*Variant Discovery Mapping*” en la cual el mutante se cruza con la estirpe original utilizada en la mutagénesis aleatoria y luego se aísla una población de distintos recombinantes de la F2 seleccionados por el fenotipo en estudio.

Nosotros utilizamos la estirpe silvestre Bristol-N2 del laboratorio en el cual se realizó la mutagénesis, descongelado para los cruces de secuenciado.

En concreto el procedimiento seguido con los mutantes QW1263 y QW1264 consistió en:

1. Cruce de hermafrodita mutante con macho silvestre y el aislamiento de 10 individuos de la F1.
2. Una vez alcanzada la F2, una parte de la F2 adulta se expuso a 10 mM de selenito de sodio en placas. El análisis de las proporciones de fenotipos en esta generación F2 permite identificar gusanos heterocigotas de la F1 heterocigota.
3. Una vez identificado un individuo F1 heterocigota, se eligen individuos de la F2 homocigotas para la mutación. Para esto, 80 gusanos de la F2 se transfieren a placas individuales y se espera se alcancen la generación F3. Gusanos de la F3 adulta son expuestos a selenito de sodio y aquella placa en la que el 100% de los gusanos es resistente, corresponde a un F2 parental homocigota para la mutación de interés. La homocigosis de los recombinantes F2 obtenidos fue re-testeada 2 veces más en cada mutante.

En este procedimiento 10 recombinantes independientes es el número mínimo de distintos recombinantes F2 necesarios para un posterior análisis del genoma exitoso. Nosotros obtuvimos 15 y 12 recombinantes independientes para QW1263 y QW1264, respectivamente.

El ADN se preparó como se describió en la sección “Preparación de ADN genómico” apartado 2.2.1.

Secuenciación de genomas.

La secuenciación de los genomas de las dos estirpes mutantes se realizó en la empresa *Novogene*, mediante la generación de bibliotecas de insertos de 350 pares de base, utilizando la plataforma *Illumina HiSeq*, con la estrategia de secuenciado PE150, y calidad $Q30 \geq 80\%$.

Análisis de genomas de C. elegans.

El procesamiento de los datos crudos inicialmente se realizó utilizando varios módulos de la plataforma *Galaxy* (<https://galaxyproject.org/>).

Para el análisis de *SNP mapping*, se utilizó el pipeline *CloudMap* (*CloudMap: A Cloud-Based Pipeline for Analysis of Mutant Genome Sequences*[134]) en la misma plataforma. Este análisis lo realizó la Dra. Maria Doitsidou de la Universidad de Edimburgo.

Tabla 2.1: Lista de estirpes de *C. elegans* generadas en esta tesis.

Estirpe	Transgen	Genotipo
IH18	<i>zfls129; vzEx91</i>	<i>lin-15(n765ts) X, Pselt-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK X; Ex[Pmyo-3::mcherry::tram-1]</i>
IH19	<i>zfls128</i>	<i>selt-1.1(tm3763) X; Pselt-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK V</i>
IH21	<i>ihEx1</i>	<i>hif-1(ia4)V; Ex[Phif-1::hif-1::gfp, Pmyo-2::mcherry]</i>
IH22	<i>ihEx2</i>	<i>cysl-1(ok762)X; Ex[Pcysl-1::cysl-1::gfp, Pmyo-2::mcherry]</i>
IH23	<i>ihEx3</i>	<i>vhl-1(ok161)X; Ex[Pvhl-1::vhl-1::gfp, Pmyo-2::mcherry]</i>
IH24		<i>cysl-1(ok762)X;egl-9(sa307)V</i>
QW1186	<i>zfex494</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Pselt-1.1::gfp, pL15EK]</i>
QW1187	<i>zfex495</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Pselt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1188	<i>zfex495</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Pselt-1.1::gfp, pL15EK]</i>
QW1189	<i>zfex496</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Pselt-1.1::gfp, pL15EK]</i>
QW1213	<i>zfex522</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Pselt-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK]</i>
QW1214	<i>zfex523</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Pselt-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK]</i>
QW1215	<i>zfex524</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Pselt-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK]</i>
QW1216	<i>zfex525</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Pselt-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK]</i>
QW1244	<i>zfex541</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[1.6kb upstream+Pselt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1245	<i>zfex542</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[1.6kb upstream+Pselt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1246	<i>zfex543</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[1.6kb upstream+Pselt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1247	<i>zfex544</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[1.6kb upstream+Pselt-1.2::selt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1248	<i>zfex545</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[1.6kb upstream+Pselt-1.2::selt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1249	<i>zfex546</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[1.6kb upstream+Pselt-1.2::selt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1257	<i>zfex551</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Pselt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1258	<i>zfex552</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Pselt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1259	<i>zfex553</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Pselt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1260	<i>zfex554</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Pselt-1.2::selt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1263		<i>egl-9(zf150)V curado 6X</i>
QW1264		<i>egl-9(zf151)V</i>
QW1265	<i>zfls128</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Pselt-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK V</i>
QW1266	<i>zfls129</i>	<i>lin-15(n765ts) X, Pselt-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK X</i>

Tabla 2.2: Lista de estirpes de *C. elegans* utilizadas en esta tesis.

Estirpe	Genotipo	Transgen	Origen
N2	<i>Aislado silvestre de Bristol</i>		CGC
CB4856	<i>Aislado silvestre de Hawai</i>		CGC
RB899	<i>cysl-1(ok762)X</i>		CGC
RB2535	<i>cysl-2(ok3516)II</i>		CGC
RB2436	<i>cysl-4(ok3359)V</i>		CGC
JT307	<i>egl-9(sa307)V</i>		CGC
TM4101	<i>ethe-1(tm4101)IV</i>		NBRP
VZ255	<i>Ex[Pmyo-3::mcherry::tram-1]</i>	<i>vzEx91</i>	Cedido por Antonio Miranda
RB867	<i>haf-1(ok705)IV</i>		CGC
VC449	<i>haf-4(gk240)I</i>		CGC
VC32	<i>haf-9(gk23)I</i>		CGC
ZG31	<i>hif-1(ia4)V</i>		CGC
VC287	<i>hmt-1(gk161)</i>		CGC
IH20	<i>lin-15(n765ts)X, Pselt-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK X; Prab-3::nls::rfp</i>	<i>zfls129; otls356</i>	Generado por Inés Carrera
VC40209	<i>mpst-7(gk514674)V</i>		CGC
NL147	<i>mrp-1(pk89)</i>		CGC
RB1713	<i>mrp-2(ok2157)X</i>		CGC
VC712	<i>mrp-4(ok1095)X</i>		CGC
RB1269	<i>mrp-8(ok1360)III</i>		CGC
NL132	<i>pgp-1(pk17)IV</i>		CGC
RB1045	<i>pgp-10(ok991)X</i>		CGC
VC26	<i>pgp-12(gk19)X</i>		CGC
VC134	<i>pgp-2(gk114)I</i>		CGC
VC2159	<i>pgp-4(gk1006)X</i>		CGC
RB959	<i>pgp-5(ok856)X</i>		CGC
RB1297	<i>rhy-1(ok1402)II</i>		CGC
IH4	<i>seld-1(tm3654)IV</i>		Mutante obtenido del CGC curado previo a esta tesis
IH6	<i>selt-1.1(tm3763)X</i>		
IH7	<i>selt-1.2(tm3771)V</i>		
IH8	<i>selt-1.1(tm3763);selt-1.2(tm3771)</i>		
TM3378	<i>sqrd-1(tm3378)</i>		NBRP
RB2535	<i>sqrd-2(ok3516)II</i>		CGC
RB1436	<i>sulp-1(ok1639)I</i>		CGC
RB1366	<i>sulp-2(ok1551)X</i>		CGC
RB1628	<i>sulp-4(ok2004)V</i>		CGC
VC3045	<i>sulp-7(ok3752)X</i>		CGC
RB2134	<i>sulp-8(ok2842)V</i>		CGC
LE436	<i>swan-1(ok267)V</i>		CGC

VB1414	<i>trxr-1(sv47)IV</i>		Cedido por Antonio Miranda
CB5602	<i>vhl-1(ok161)X</i>		CGC

CGC: *Caenorhabditis* Genetic Center, **NBRP:** National Bioresource Project of Japan

Tabla 2.3. Lista de bacterias utilizadas en la tesis.

Especie y estirpe	Genotipo o característica relevante	Origen
<i>E. coli</i> OP50	Auxótrofa para uracilo.	CGC
<i>E. coli</i> TOP10F'	F'[lacIq,Tn10(TetR)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1 nupG	Provisto por el Laboratorio PXF
<i>S. marcescens</i>	Aislado de paciente, especie verificada por secuenciación.	Provisto por la cátedra de microbiología de FQ
<i>P. aeruginosa</i> PA14	Estirpe UCBPP-PA14. Número de acceso: NC_008463.	Provisto por el Laboratorio Ubypa
<i>E. coli</i> XL-1	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)].	ATCC
<i>E. coli</i> HT115	Transformadas con el vector L4440 vacío o con los <i>target</i> de los siguientes genes*: C30H7.2- WBRNAi00003044 <i>pdi-3</i> (H06O01.1)- WBRNAi00003873 <i>dnj-27</i> - WBRNAi00037210 <i>ero-1</i> - WBRNAi00036491 Y57A10A.23 - WBRNAi00021100 <i>pdi-1</i> (C14B1.1) - WBRNAi00010719 C14B9.2 - WBRNAi00010732 Y49E10.4 - WBRNAi00020781 <i>nlp-6</i> (Y73B6BL.12) - WBRNAi00019077 <i>pdi-2</i> - WBRNAi00008357 F49H12.5 - WBRNAi00015347 <i>pdi-6</i> - WBRNAi00009753 C06A6.5- WBRNAi00010264 <i>dpy-11</i> - WBRNAi00008811 <i>gsr-1</i> -WBRNAi00012036	Provisto por Antonio Miranda
	<i>suox-1</i> - WBRNAi00016262 <i>cysl-3</i> - V-3C18 (<i>Source BioScience Life Sciences</i>)	Provisto por Andrea Calixto

* Junto con el gen a interferir se incluye el número de identificación de la *Wormbase* de las clonas de interferencia a utilizar.

Tabla 2.4. Lista de cebadores utilizados para los clonados.

Nombre	Secuencia
<i>hif-1</i> traduccional F	CGATGGATACGCTAACAACCTGGAAATGAAATAGGTACGCTAATAGGTTTGATTTTC
<i>hif-1</i> traduccional R	CTTTGGCCAATCCCGGGGATCCAGAGAGCATTGGAAATGGGG
<i>cysl-1</i> traduccional F	CGATGGATACGCTAACAACCTGGAAATGAAATTCACAACCAAAATTTAGGGCATTG
<i>cysl-1</i> traduccional R	CTTTGGCCAATCCCGGGGATCCCTCCATAATATCATAGTTGTGAAGA
<i>sa307</i> F	GTATCGTTGTTTCTCTGCCTTG
<i>sa307</i> R externo	GTCCCGTTCATAGAGTCGC
<i>sa307</i> R interno	CTTAGTGCGAGACCACGATTC
<i>ok762</i> F	CCAGCAGAAACAGATGATAG
<i>ok762</i> R externo	CTTTCGCGGATGTCGGTGTAC
<i>ok762</i> R interno	CTCAATGAGCGTGGTCACTC
pPD9577-R	ATTTCAATTTCCAAGTTGTTAGCGTATCCATCG
<i>vhl-1</i> traduccional F	CGATGGATACGCTAACAACCTGGAAATGAAATAAGATTGTTTGGTGAAGTGC
<i>vhl-1</i> traduccional R	CTTTGGCCAATCCCGGGGATCCTTGCTGAGGTCTCTGGGG
<i>selt-1.2</i> transcripcional y traduccional F	CAGAAGCTTAACCATAAACTAATTCAGTGA
<i>selt-1.2</i> transcripcional R	ACGGTCGACTTGATAGATGAAAAGAAGTTTC
<i>selt-1.2</i> traduccional R	ACGGTCGACACGAATAGTTTTCAATTGAAGATC
<i>selt-1.1</i> transcripcional y traduccional F	ACGGTCGACGTTAGGGAATGAAAAGTTG
<i>selt-1.1</i> transcripcional R	ACGGGATCCCCCAACCGTGACATCTG
<i>selt-1.1</i> traducción R	GGATCCGACAGTCTGTTGGAACCTCCAAATG

R: Cebador reverse y **F:** cebador directo.

3 Estudio de la función de la selenoproteína T

Antecedentes directos

En *C. elegans* identificamos dos genes que codifican para la selenoproteína T: los genes C35C5.3 y F28H7.4 los cuales nosotros denominamos *selt-1.1* y *selt-1.2*. Tanto SELT-1.1 como SELT-1.2 poseen el presunto motivo redox dentro de la unidad de plegamiento tiorredoxina así como el característico motivo tGxFEI de la familia Rdx.

Los genes *selt-1.1* y *selt-1.2* codifican para Cys en la posición homóloga a la Sec de SELENOT de mamíferos. Este hecho configura, en algún aspecto, una ventaja ya que siendo Cys y Sec residuos funcionalmente equivalentes, los estudios de SELENOT en *C. elegans* serán plenamente informativos en cuanto a la función de la proteína y evita problemas inherentes a la incorporación de Sec, como la eficiencia de su incorporación que no siempre es alta.

En nematodos, SELENOT es el único miembro de la familia Rdx presente. Este hecho también constituye una ventaja para el estudio de la función de SELENOT en este organismo: un fenotipo asociado a SELENOT sería *a priori* más evidente en ausencia de un mecanismo de compensación o redundancia como el postulado para SELENOW/SELENOT en mamíferos.

Se solicitaron las estirpes de delección *selt-1.1(tm3763)* y *selt-1.2(tm3771)* y se generó el doble mutante. Los tres mutantes son viables y no poseen diferencias fenotípicas en cuanto a longevidad, tamaño de progenie, morfología y locomoción con la estirpe silvestre. Dado este contexto, nos propusimos realizar un estudio de la función de SELT en *C. elegans* mediante un abordaje celular y comportamental.

Los resultados obtenidos fueron publicados en el artículo científico *Selenoprotein T is required for the pathogenic bacteria avoidance in Caenorhabditis elegans*, en la revista *Free Radical Biology and Medicine*, el cual se adjunta a continuación.

3.1 SELENOT es requerida para el fenotipo de evasión de bacterias patógenas en *Caenorhabditis elegans*

Laura Romanelli-Cedrez, Inés Carrera, Lucía Otero, Antonio Miranda-Vizuete, Marco Mariotti, Mark Alkema, Gustavo Salinas.

Resumen

La selenoproteína T (SELENOT) es una proteína de la familia Redoxinas asociada al retículo endoplasmático (RE) con un motivo CXXU dentro de un dominio de plegamiento tiorredoxina. Su función precisa en organismos pluricelulares no es completamente comprendida aunque ha sido demostrado en mamíferos estar involucrada en la homeostasis del Ca^{2+} y funciones antioxidantes y neuroendócrinas. En el presente trabajo, se utiliza el organismo *Caenorhabditis elegans* para el abordaje de la función de SELENOT a nivel organismo durante todo su ciclo de vida. *C. elegans* posee dos genes que codifican para SELENOT, los parálogos SELT-1.1 y SELT-1.2, los cuales poseen el motivo CXXC en lugar de CXXU. Nuestros resultados muestran la ocurrencia de un reemplazo de Sec por Cys y la duplicación génica en el linaje de nematodos. Demostramos que SELT-1.1 localiza en el RE de distintos tipos celulares incluyendo el sistema nervioso. En cambio, SELT-1.2 se localiza exclusivamente en el citoplasma de las neuronas AWB. Mutantes en *selt-1.1*, *selt-1.2* y el doble mutantes son viables, sin embargo los mutantes en *selt-1.1* se ven comprometidos en condiciones de estrés oxidativo inducido por rotenona. Además, demostramos que *selt-1.1*, pero no *selt-1.2*, es requerido para la evasión de las bacterias patógenas *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*. La evasión de señales de peligro como 2-nonanona también se ve significativamente afectada en el mutante en *selt-1.1*, pero no en el mutante en *selt-1.2*. En suma, nuestros resultados sugieren que *selt-1.1* podría ser un transductor redox para la nocicepción y *fitness* del organismo. Los resultados reflejan el uso de *C. elegans* como un modelo valioso para el estudio de procesos dependientes de SELENOT.

Todos los resultados presentados en el artículo fueron obtenidos por mí durante el desarrollo de la tesis de Doctorado, excepto los que corresponden a la minería de datos de secuencias y análisis filogenético de SELENOT de nematodos (**Fig. 1**), que fueron obtenidos por el Dr. Marco Mariotti (*Harvard School of Medicine*) y el cruce para generar la estirpe IH20, realizado por la Dra. Inés Carrera (Laboratorio Biología de Gusanos). La escritura de los resultados del artículo fue realizada enteramente por mí, recibiendo aportes de los coautores.

3.1.1 Artículo



Selenoprotein T is required for pathogenic bacteria avoidance in *Caenorhabditis elegans*



Laura Romanelli-Cedrez^{a,b}, Inés Carrera^a, Lucía Otero^a, Antonio Miranda-Vizuete^c, Marco Mariotti^d, Mark J. Alkema^e, Gustavo Salinas^{a,b,*}

^a Worm Biology Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay

^b Cátedra de Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^c Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CS IC/Universidad de Sevilla, 41013 Sevilla, Spain

^d Division of Genetics, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, United States of America

^e *C. elegans* Behavioral Genetics Laboratory, Neuroscience Department, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, United States of America

ARTICLE INFO

Keywords:

C. elegans
Nematode
Selenocysteine
Selenoprotein T
SelT
SelenoT
Serratia marcescens
Pseudomonas aeruginosa
Pathogenic bacteria avoidance

ABSTRACT

Selenoprotein T (SELENOT) is an endoplasmic reticulum (ER)-associated redoxin that contains the amino acid selenocysteine (Sec, U) within a CXXU motif within a thioredoxin-like fold. Its precise function in multicellular organisms is not completely understood although it has been shown in mammals to be involved in Ca²⁺ homeostasis, antioxidant and neuroendocrine functions. Here, we use the model organism *C. elegans* to address SELENOT function in a whole organism throughout its life cycle. *C. elegans* possess two genes encoding SELENOT protein orthologues (SELT-1.1 and SELT-1.2), which lack Sec and contain the CXXC redox motif instead. Our results show that a Sec→Cys replacement and a gene duplication were two major evolutionary events that occurred in the nematode lineage. We find that worm SELT-1.1 localizes to the ER and is expressed in different cell types, including the nervous system. In contrast, SELT-1.2 exclusively localizes in the cytoplasm of the AWB neurons. We find that *selt-1.1* and *selt-1.2* single mutants as well as the double mutant are viable, but the *selt-1.1* mutant is compromised under rotenone-induced oxidative stress. We demonstrate that *selt-1.1*, but not *selt-1.2*, is required for avoidance to the bacterial pathogens *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. Aversion to the noxious signal 2-nonanone is also significantly impaired in *selt-1.1*, but not in *selt-1.2* mutant animals. Our results suggest that *selt-1.1* would be a redox transducer required for nociception and optimal organismal fitness. The results highlight *C. elegans* as a valuable model organism to study SELENOT-dependent processes.

1. Introduction

Selenium (Se) is an essential trace element in many organisms, including humans and its deficiency in mammals is a contributing factor to various pathologies and disorders (reviewed in [1]). Se supports several cellular and organismal processes including development [2,3], immunity [4], reproduction [5], neuromuscular [2]. Se is required for the function of selenoproteins, which contain the 21st amino acid selenocysteine (Sec, three letter code or U, one letter code) as a catalytic redox-active residue [1,6,7]. Sec is a Se-containing analogue of Cys, where the selenol group of Sec fulfills the same redox role as the thiol group of Cys, but usually confers a catalytic advantage over thiol [8]. Sec is encoded by an in frame UGA codon and a

SElenoCysteine Insertion Sequence (SECIS) present in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of selenoprotein mRNAs, and decoded by a tRNA^{Sec}, a dedicated elongation factor (EfSec), and a SECIS-binding protein (SBP2) [9,10]. Selenoproteins of known functions serve as oxidoreductases. However, the function of several selenoproteins remains unknown or poorly understood.

Selenoproteins T, V, W, and H (SELENOT, SELENOV, SELENOW and SELENOH) and Rdx12 belong to the redoxin family of selenoproteins, and their precise functions remain elusive. Redoxins are presumed thiol/selenol-based oxidoreductases that possess a domain that belongs to the thioredoxin (Trx) folding unit with a CXXU or CXXC redox motif and a conserved C-terminal TGXFEI consensus motif that is considered the gene signature of the redoxin family [11].

Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum; NGM, nematode growth medium; Se, selenium; Sec, selenocysteine; SELENOT, selenoprotein T; SELT-1.1, selenoprotein T1; SELT-1.2, selenoprotein T2; Trx, thioredoxin. Note: the use of the root symbol SELENO followed by a letter has been recently accepted for vertebrate selenoprotein gene nomenclature. *C. elegans* gene nomenclature is restricted to a maximum of four letters and thus we used the previous root, *selt*, when referring to *C. elegans* genes

* Corresponding author at: Worm Biology Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay, Matajojo 2020, CP-11400 Montevideo, Uruguay.

E-mail address: gsalin@fq.edu.uy (G. Salinas).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.021>

Received 16 October 2016; Received in revised form 15 March 2017; Accepted 20 March 2017

Available online 24 March 2017

0891-5849/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

SELENOT has a discontinuous Trx domain, which is interrupted by transmembrane helices, that are presumed to anchor this protein to the endoplasmic reticulum membrane (ER) [11,12]. In mammals, *SELENOT* is an essential gene [13] and it has been implicated in the regulation of Ca^{2+} homeostasis, antioxidant and neuroendocrine functions [12,13]. *SELENOT* was identified as a gene that is regulated by the neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). Overexpression of wild-type *SELENOT*, but not a Sec→Ala mutant, in the catecholaminergic cell line PC12 resulted in an increase of the intracellular Ca^{2+} levels and growth hormone secretion [12]. *SELENOT* has been found to be expressed in mouse and human pancreatic β -cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance in conditional β -cells *SELENOT* knockout (KO) mice [14]. Recently, the conditional KO mice were shown to be more sensitive to Parkinson disease-inducing neurotoxins, leading to motor impairment associated with oxidative stress and decreased tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis [13]. These results suggest that *SELENOT* plays a role in the protection of dopaminergic neurons under stress conditions. Other experiments have shown that knockdown of *SELENOT* in mouse fibroblasts led to overexpression of other oxidoreductases, including the redoxin SELENOW, and altered expression of extracellular matrix genes and cell adhesion [15]. Yet, despite these advances, the function of *SELENOT* remains unknown.

In contrast with the relative high number of redoxins in mammals (*SELENOT*, *SELENOV*, *SELENOW*, *SELENOH*, and *Rdx12*), the *Caenorhabditis elegans* genome encodes only two redoxins, both belonging to the *SELENOT* subfamily, *SELT-1.1* and *SELT-1.2* [16]. Furthermore, *C. elegans* *SELT-1.1* and *SELT-1.2* contain Cys at the Sec homologous position in mammalian *SELENOT*.¹ Despite the lack of Sec, the selenoprotein T name is retained in *C. elegans*, and to follow *C. elegans* nomenclature, we will use *SELT* as name. This makes *C. elegans* a particularly suited organism to address the function of *SELENOT* proteins, since close homologs in which Sec is replaced by Cys do not seem to affect the protein function of selenoproteins [17,18]. In this work we show that the Sec to Cys replacement and gene duplication of *SELENOT* were two major evolutionary events in nematodes. We found that *C. elegans* *selt-1.1* and *selt-1.2* single mutant as well as the double mutant are viable. A detailed phenotypic analysis of *selt-1.1* and *selt-1.2* mutant strains revealed that *SELT-1.1*, but not *SELT-1.2*, have defects in nociception. Importantly, *SELT-1.1* is required for pathogenic bacteria avoidance. Our results highlight *C. elegans* as the first animal in which *SELENOT* function can be addressed at the organismal level.

2. Material and methods

2.1. Strains and culture conditions

The wild-type strain used in this study was *C. elegans* Bristol N2 (N2), which was grown monoxenically in the *Escherichia coli* strain OP50 as a food source. N2 and OP50 were obtained from the *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC). The general methods used for culturing and maintenance of *C. elegans* are described in [19].

The *selt-1.1(tm3763)* X and *selt-1.2(tm3771)* V deletion mutant strains were obtained from the *C. elegans* National Bioresource Project of Japan. A scheme depicting the deletions harbored by these strains is shown in Fig. 1. The deletion mutant strains were outcrossed 6-times with the N2 strain. All strains generated and used in this study are detailed in Supplementary Table 1.

Transgenic lines were obtained according to [20]. The pL15EK plasmid containing the injection marker *lin-15* (80 ng/ μL) was co-

injected with constructs containing either *Psel-1.1::gfp*, *Psel-1.2::gfp*, *Psel-1.1::selt-1.1::gfp* or *Psel-1.2::selt-1.2::gfp* cloned into the pPD95.77 plasmid and injected into *lin-15(n765ts)* animals. For each construct at least three independent transgenic lines were isolated and observed. The integrated transgenic QW1265 and QW1266 strains were obtained by X-ray irradiation.

The *E. coli* strain HT115 containing the empty pL4440 plasmid and the pL4440 derivative containing the ER thiol-disulfide oxidoreductases and *dpy-11* were kindly provided by Dr. Peter Askjaer (detailed in Supplementary Table 2).

2.2. Green Fluorescent Protein reporter constructs for expression and localization analysis

Four constructs using the Green Fluorescent Protein (GFP) as a reporter were generated to determine *selt-1.1* and *selt-1.2* expression patterns. The transcriptional *Psel-1.1::gfp* and *Psel-1.2::gfp* fusions correspond to *selt-1.1* and *selt-1.2* promoters upstream of the *gfp* coding sequence. The promoter sequences comprise the upstream sequence of coding sequence up to the beginning of the adjacent gene (2 kbp and 0.6 kbp for *selt-1.1* and *selt-1.2*, respectively) (Fig. 1). Sequences were amplified by PCR using appropriate primers including *Sall* and *Bam*HI restriction sites for *Psel-1.1*, and *Sall* and *Hind*III for *Psel-1.2* (Supplementary Table 3). Genomic DNA from adult worms of the N2 strain was used as a template. The PCR products were cloned into the pPD95.77 vector. Translational constructs *Psel-1.1::selt-1.1::gfp* and *Psel-1.2::selt-1.2::gfp* include promoter, exons and introns of the gene of interest (Fig. 1) in frame with the *gfp* coding sequence. The *unc-54* 3'UTR sequence provided by the vector was used in both, transcriptional and translational constructs. The restriction sites used for cloning and the vector were the same as for the transcriptional constructs fusions. A scheme depicting the sequence of *Psel-1.1::gfp*, *Psel-1.2::gfp*, *Psel-1.1::selt-1.1::gfp* and *Psel-1.2::selt-1.2::gfp* used for the transcriptional and translational reporter constructs is shown in Fig. 1.

2.3. DiI staining

Animals were incubated in 1 mL M9 buffer (KH_2PO_4 3 g/L, Na_2HPO_4 6 g/L, NaCl 5 g/L, MgSO_4 1 mM) solution with 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the compound DiI (1,1'-Diocadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate, $\text{C}_{59}\text{H}_{97}\text{ClN}_2\text{O}_4$) for 30 min with gentle shaking at room temperature. Then, worms were washed four times with M9, centrifuging at 600 g for 1 min, each time removing the supernatant and adding 1 mL of M9 again. After washing the worms were placed on a NGM-agar plate with food, allowed to recover overnight at 20 °C and imaged next day.

2.4. Fluorescence microscopy

Worms were mounted in a drop of 60 mM sodium azide, over a thin layer of 2% agarose. Individual animals were visualized under a microscope TCS SP5 Leica DMI6000 and images captured with Lasaf 2.7 software and processed with Fiji [21]. Embryos were visualized under a microscope Olympus IX81 with a camera Hamamatsu ORCA ER and images were captured with 4.17 micro-manager software [22]. The images were processed using FIJI and Huygens 4.5.1p3 programs. Embryos were obtained by a transverse cut in a gravid adult (for the early stages) or picked directly from the plate (for late embryonic stages) and mounted on a slide with an agarose layer as described above.

2.5. RNA interference assay

The expression of all *C. elegans* ER thiol-disulfide oxidoreductases containing the canonical ER retaining sequences (KDEL or variants of this motif) [23] were interfered by RNAi (Supplementary Table 2).

¹ The use of the root symbol SELENO followed by a letter has been recently accepted for vertebrate selenoprotein gene nomenclature. *C. elegans* gene nomenclature is restricted to a maximum of four letters and thus we used the previous root, *selt*, when referring to *C. elegans* genes. *selt-1.1* and *selt-1.2* designation is suggested by the wormbase as they represent recent duplication in nematodes.

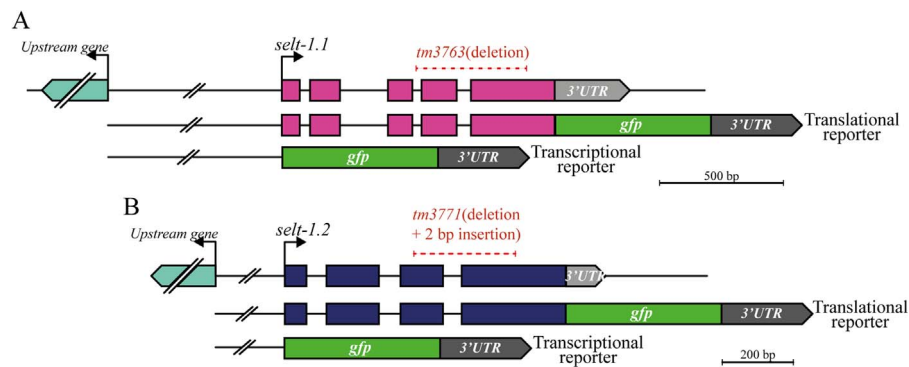


Fig. 1. *selt-1.1* (A) and *selt-1.2* (B) gene structure, deletion intervals and constructs generated for transgenic animals. Exons of the two genes are shown as pink (*selt-1.1*) and blue (*selt-1.2*) boxes connected by lines representing introns. *selt* 3'UTRs are shown as light grey boxes. The red dashed lines indicate the *selt-1.1*(*tm3763*) and *selt-1.2*(*tm3771*) deletion alleles. The *tm3763* mutation deletes 429 bases. The *tm3771* mutation deletes 275 bases and inserts 2 bases. A scheme of the translational and transcriptional constructs used for the generation of transgenic animals is shown below each gene. In both cases the 3'UTR used is the one from *unc-54* provided by the vector (pPD95.77) indicated by dark grey boxes. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

The *E. coli* strain HT115 containing the plasmid pL4440 encoding the gene of interest were grown over night at 37 °C in LB (Luria-Bertani) with 100 µg/mL ampicillin. Plasmids without an insert DNA (empty) or encoding *dpv-11* were used as negative and positive controls, respectively. The bacteria were plated in agar NMG 100 µg/mL ampicillin and 1 mM IPTG (required for induction of double-stranded RNA expression) and incubated over night at 37 °C. Twenty adult worms of N2 and the *selt-1.1*(*tm3763*); *selt-1.2*(*tm3771*) double mutant strain were placed on plates for 1 h and then removed leaving only the eggs, the latter corresponding to the F0 generation. Phenotypes were monitored from the F1 to the F5 generation. The differences in locomotion, development, early death and modified morphology between strains were monitored.

2.6. Volatile chemotaxis assays

Avoidance assays with 2-nonanone was performed according to [24], with the following modification: well fed adult worms were washed 3 times with NMG buffer, centrifuged at 600g for 1 min, each time removing the supernatant and adding 1 mL of NMG buffer again. Chemotaxis assays with isoamyl alcohol and 1-octanol was performed according to [25].

2.7. Pathogenic bacteria lawn avoidance assay

Lawns of *Serratia marcescens* (50 µL of an overnight LB culture) were cultured on 6-cm NGM plates overnight at room temperature. Approximately 20 young adult animals grown on OP50 were put in the center of the bacteria lawn [26]. The number of animals on each lawn was counted after 20 h. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 were grown overnight in LB culture without shaking. 30 µL overnight culture was seeded on 9-cm NMG plates and incubated for 24 h at room temperature. Approximately 30 well-fed L4-young adults were added on the assay plates. The number of animals remaining on the lawn after 24 h was counted [27].

2.8. Rotenone stress assays

Synchronized adults (~200) of N2 and *selt-1.1*(*tm3763*) strains were incubated 4 h with 50 µM of rotenone in M9 buffer at room temperature with gently shaking. After incubation, worms were washed two times with M9 centrifuged at 600g for 1 min, each time removing the supernatant and adding 1 mL of M9 again. Finally worms were transferred to 5 cm plates seeded with OP50 for 60 h and scored the number of alive and dead. In both cases vehicle control (DMSO 3%) were included. Experiments were repeated three times, each time

including two replicates per condition per strain.

2.9. Nematode SELENOT gene identification and phylogeny

The two *C. elegans selt* genes were identified through blast searches using the human gene as query. We then extended the search to all publicly available nematode genomes. For this task, all nematode assemblies available at NCBI were downloaded and searched iteratively with Selenoprofiles [28] using a profile alignment of SELENOT proteins progressively enriched in nematode sequences. The phylogenetic tree of the predicted protein sequences was reconstructed by maximum likelihood using phylml 3.0 [29], with the evolutionary model resulting from an automated selection procedure (LG), as explained in [30]. The protein tree was compared with the known species phylogeny, obtained from NCBI taxonomy [31] and refined according to [32].

3. Results

3.1. A *Sec* to *Cys* replacement and a *selt* gene duplication occurred in the nematode lineage

Using blastX homology searches with the human SELENOT protein we identified two *selt* genes, *selt-1.1* (formerly C35C5.3) and *selt-1.2* (formerly F28H7.4) in the *C. elegans* genome. Both *selt-1.1* and *selt-1.2* genes encode proteins that possess an N-terminal putative CVSC redox motif and the C-terminal GAFEI/V motif within a thioredoxin folding unit, which are the gene signature of the redoxin family. The thioredoxin domain is interrupted by a hydrophobic region, which constitutes the gene signature of the redoxin SELENOT (Supplementary Fig. 1). The identified *C. elegans* protein sequences were then retroblasted towards mammalian genomes and the single hit obtained was SELENOT.

Next, we examined the nematode lineage for the presence of *selt* genes. The majority of species of class *Chromadorea* have a single copy of *selt*, with exceptions of most species in the *Rhabditoidea* superfamily (which includes *C. elegans*), *Meloidogyne incognita*, and *Rotylenchulus reniformis* (Supplementary Fig. 2). Most *Caenorhabditis* genomes analyzed possess two *selt* genes (*selt-1.1* and *selt-1.2*) and *C. brenneri* possess a third *selt* gene, and *C. japonica* possess only a single *selt* gene, orthologous to *C. elegans selt-1.1* (Fig. 2 and Supplementary Fig. 2)[32]. *Caenorhabditis* spp. *selt-1.2* differs from *selt-1.1* (45% identity, 57% similarity), suggesting diversification of function after gene duplication. The third *selt* gene present in *C. brenneri* is highly similar in sequence to *selt-1.2*, suggesting a recent duplication event or a sequencing/assembly artifact. A similar explanation would account for the presumed *selt* gene duplication events observed in *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*.

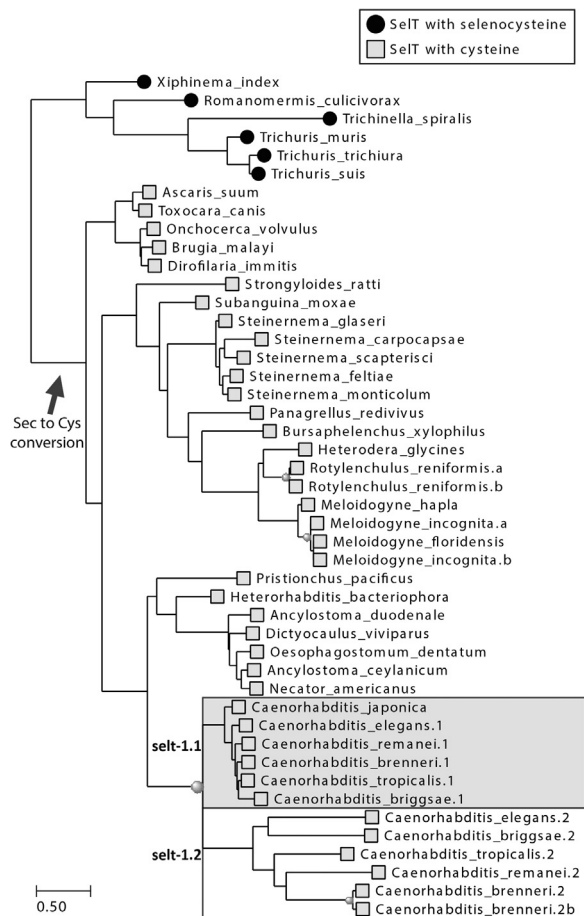


Fig. 2. Phylogenetic tree of nematode SELENOT genes. The Figure shows the phylogenetic tree of nematode SELENOT genes identified in this study, reconstructed based on their protein sequence. Black circles and grey rectangles are used to represent the Sec and Cys-containing SELENOT, respectively. Grey circles on the internal nodes are used to indicate the predicted gene duplication events. The group of *Rhabditioidea selt-1.1* and *selt-1.2* proteins is highlighted in light grey and white boxes, respectively. The scale represents the distance between protein sequences, in average substitutions per site.

Most animals possess a Sec-containing SELENOT. However, we found that nematodes that belong to class *Chromadorea* encode Cys-containing SELENOT, whereas those of the *Enoplea* class (e.g. *Trichuris muris*, *Trichinella spiralis*) encode Sec-containing SELENOT. In these latter cases we found an in frame UGA codon and a selenocysteine insertion signal (SECIS) at the 3'-UTR of the mRNA, as expected for selenoproteins. *Enoplea* is considered to be the most ancestral nematode lineage (Fig. 2)[33].

Altogether, these observations support that there were two major events in the phylogenetic history of nematode *selt*. At the root of *Chromadorea* (after the split with *Enoplea*), the Sec codon in *selt* was converted to a Cys codon, concomitant with the loss of the SECIS element. Later in *Rhabditioidea*, likely after the split of *C. japonica*, a *selt* gene duplication occurred resulting in the two extant genes, *selt-1.1* and *selt-1.2*. The reconstructed phylogenetic tree of *selt* genes (Fig. 2) is consistent with this history. An additional feature of nematodes SELT is the presence of a short N-terminal insertion rich in charged and hydroxylated amino acid residues (Supplementary Fig. 1), suggesting lineage specific interactions or post-translational modifications.

Finally, we performed thorough searches of other members of the redoxin family (SELENOV, SELENOW, SELENOH and Rdx12) in *C. elegans* and nematode genomes. SELENOT is the single member of this protein family present in nematodes. This makes the model organism *C. elegans* a valuable tool to study SELENOT function.

3.2. SELT-1.1 is expressed in neurons, epithelial and muscle cells

We first examined the expression of *selt-1.1* during the life cycle of *C. elegans*. In hermaphrodites and males GFP expression was observed in neurons, epithelial and muscle cells of transgenic animals carrying both transcriptional (i.e. *selt-1.1* promoter driving GFP expression) and translational (i.e. containing *selt-1.1* promoter, exons and introns driving GFP expression) constructs (Fig. 3). Since *selt-1.1* seemed to be broadly expressed in the nervous system, we crossed two integrated *Psel-1.1::selt-1.1::gfp* strains with a strain expressing the pan-neuronal marker *rab-3* fused to the red fluorescent protein (RFP) in the nuclei [34]. These crosses confirmed that SELT-1.1 is expressed in all neurons of the nervous system (Fig. 3A and C). The expression of *selt-1.1* in the ADL, ASH, ASI, ASJ, ASK, AWB amphid sensilla neurons was also confirmed by DiI staining (Supplementary Fig. 3) [35,36]. In the epithelia, *selt-1.1* is expressed in the hypodermal, arcade, pharyngeal, vulval and rectal cells (Fig. 3B and D). In contrast, *selt-1.1* was not found to be expressed in the intestine or in the gonad. Muscle cells expressing *selt-1.1* include the somatic muscle cells from head, neck and body wall as well as the non-striated pharyngeal muscles (Fig. 3B and E). The translational *Psel-1.1::selt-1.1::gfp* reporter revealed perinuclear localization (Fig. 3), consistent with the ER localization previously reported for mammalian SELENOT [12]. The ER localization of SELT-1.1 was confirmed by expressing into the QW1266[*Psel-1.1::selt-1.1::gfp*] the ER marker *tram-1* fused to mcherry in muscle cells [37] (Fig. 3E). SELT-1.1 expression was observed throughout development, from pre-bean embryonic stages to the adult stage. Embryos expressed GFP in most cells, also with a perinuclear localization (Fig. 4).

3.3. SELT-1.2 is only expressed in AWB neurons

In contrast to *selt-1.1*, both *Psel-1.2::selt-1.2::gfp* and *Psel-1.2::gfp* reporters were expressed exclusively in a single pair of bilateral symmetric sensory neurons located in the amphid, the main chemosensory organ of *C. elegans*. The neuron was identified as AWB by axon morphology, cell body position and by the co-localization with DiI dye (Fig. 5C). AWB neurons play a role in volatile avoidance to aversive odorants such as 1-octanol and 2-nonanone [36]. Since the promoter sequence of *selt-1.2* comprises only 0.6 kbp (see Fig. 1), we generated a second transcriptional reporter of *selt-1.2* using 2 kbp upstream of its coding sequence. This additional *selt-1.2* reporter was also expressed in AWB neurons, exclusively. Although SELENOT has been reported to be associated to the ER and the hydrophobic region that interrupts the Trx domain is, presumably, responsible for this localization, *Psel-1.2::selt-1.2::gfp* translational reporter is present in AWB soma, dendrites and axon (Fig. 5A). We amplified *selt-1.2* cDNA to examine whether mRNA variants may lead to different SELT-1.2 isoforms targeting the protein to different compartments. However, only the full length coding sequence predicted by the current gene model of the wormbase was amplified. GFP was detected from L1 larval stage to adult worms (in both hermaphrodites and males). Although we could not observe GFP expression in embryos, *selt-1.2* mRNA was detected by RT-PCR in these stages (data not shown).

3.4. *selt-1.1(tm3763)* and *selt-1.2(tm3771)* null mutants are viable, but the *selt-1.1(tm3763)* mutant is compromised under oxidative stress

To determine the function of SELT in *C. elegans* we analyzed the *selt-1.1(tm3763)*, *selt-1.2(tm3771)* and the *selt-1.1(tm3763); selt-1.2(tm3771)* mutant strains. The deletion allele *selt-1.1(tm3763)* lacks a complete Trx domain, including its redox active site. The *selt-1.2(tm3771)* deletion allele lacks an entire Trx hemidomain required for Trx function (Fig. 1). Thus, these mutants are most likely, null mutants. Both *selt-1.1(tm3763)* and *selt-1.2(tm3771)* mutants as well as the *selt-1.1(tm3763); selt-1.2(tm3771)* double mutant strain are viable,

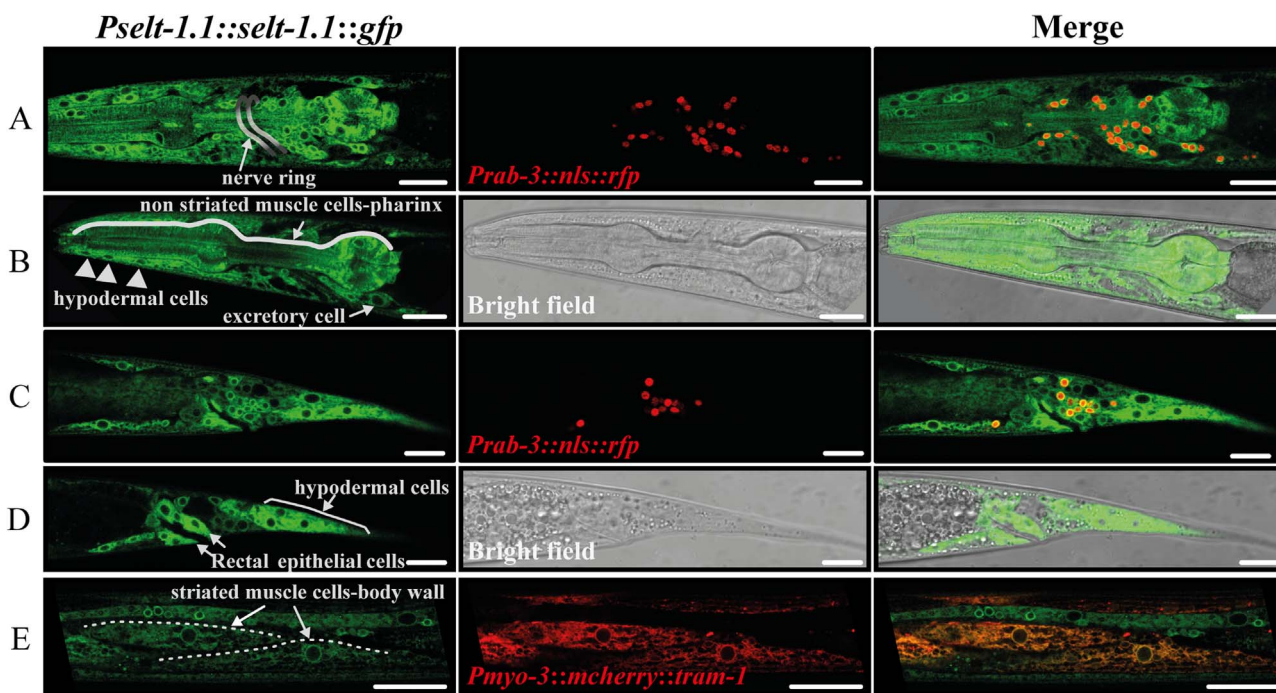


Fig. 3. *sel-1.1* is expressed in neurons, epithelial and muscle cells with an endoplasmic reticulum localization. Confocal images of selected planes at the same magnification show head, tail and mid-body regions. (A) Lateral view of the head of an L4 worm. Transgenic animals simultaneously expressing *Psel-1.1::sel-1.1::gfp* and *Prab-3::nls::rfp* (neuronal nuclear reporter) show the expression of *sel-1.1* in neurons anterior and posterior to the nerve ring. (B) Head lateral view of an adult worm. Hypodermal cells, pharynx muscle and the excretory cell are indicated. (C) Transgenic animals simultaneously expressing *Psel-1.1::sel-1.1::gfp* and *Prab-3::nls::rfp* show colocalization in tail neurons. (D) Tail lateral view of an adult worm. Hypodermal cells and rectal epithelium are indicated. (E) Middle body portion of an L4 worm. ER localization of SELT-1.1 fused to GFP. Transgenic animals simultaneously expressing *Psel-1.1::sel-1.1::gfp* and *Pmyo-3::mcherry::tram-1* (muscle cell ER reporter) show colocalization in the ER of body wall muscle cells, as demonstrated by the yellow color of the merged image. Scale bar: 20 μm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

allowing to assess the impact of SELENOT deficiency at an organismal level. *sel-1.1(tm3763)*, *sel-1.2(tm3771)* and the double mutant strain showed normal development, anatomy, motility, lifespan and brood size (Supplementary Fig. 4).

Because SELENOT is a presumed ER oxidoreductase, we interfered the expression of each thiol-disulfide oxidoreductase possessing the ER retention motif KDEL or HDEL (Supplementary Table 2). Neither differences in viability nor obvious phenotype were observed between

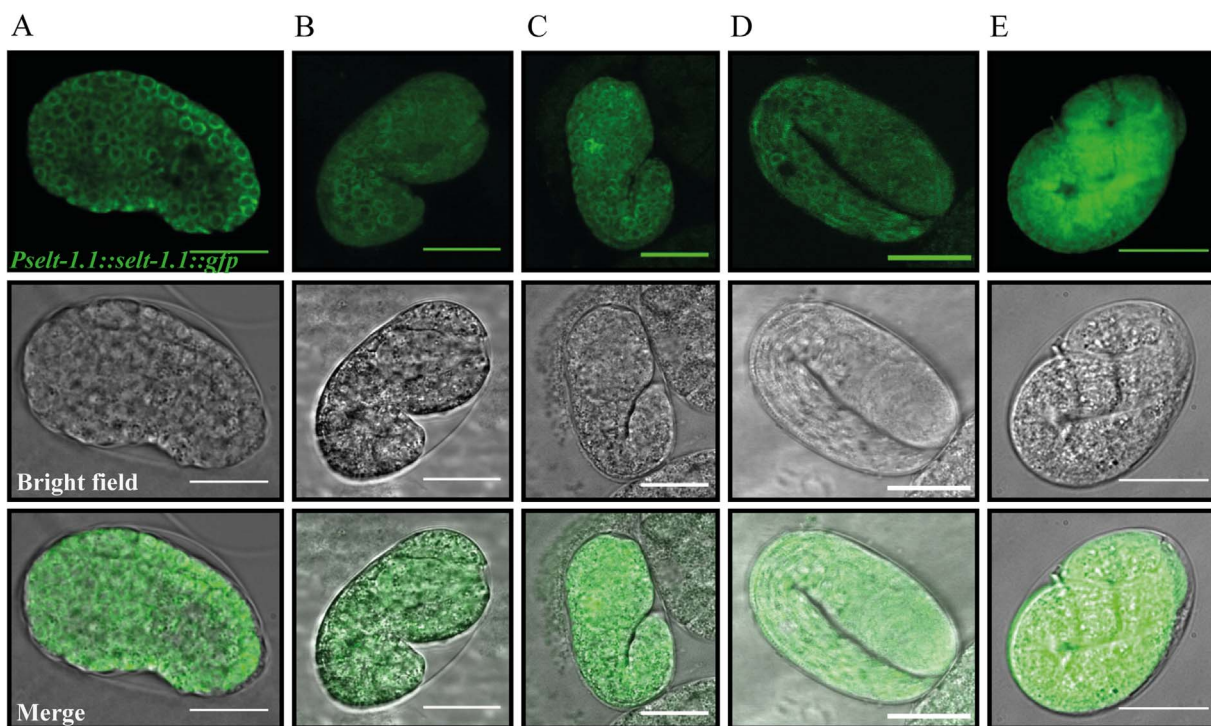


Fig. 4. *sel-1.1* is expressed during embryogenesis from the epidermal enclosure stage. Transgenic animals expressing translational construct *Psel-1.1::sel-1.1::gfp*, visualized by fluorescence microscopy. The stages shown are: bean (A), comma (B), 1-fold (C), 2-fold (D) and 3-fold (E) stage. Scale bar 20 μm.

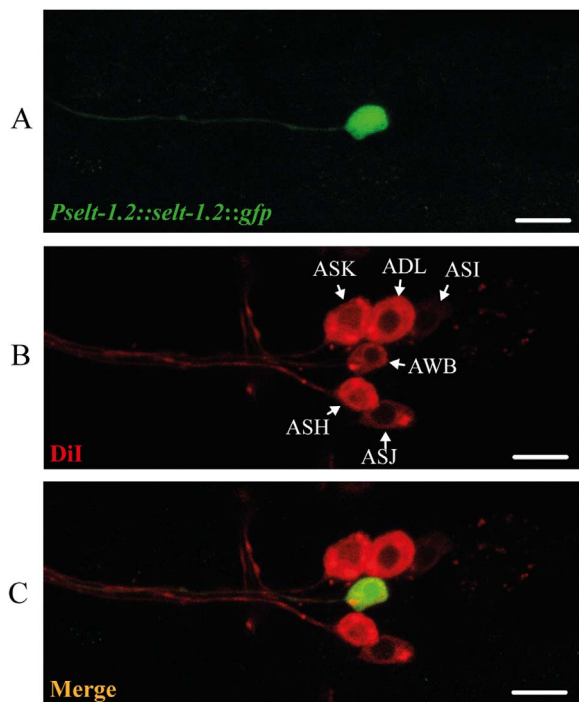


Fig. 5. *selt-1.2* is expressed in AWB neurons. Lateral view. (A) Expression of the translational construct *Psel-1.2::selt-1.2::gfp* in AWB. (B) Dye-filling with DiI of transgenic animal expressing *Psel-1.2::selt-1.2::gfp*. (C) Merge. Scale bar 10 μ m.

N2 and the double *selt-1.1(tm3763); selt-1.2(tm3771)* mutant strain upon RNAi of the 13 oxidoreductases.

In mammals, rotenone oxidative stress triggers *SELENOT* expression in dopaminergic neurons, and the conditional *SELENOT* KO mice are more susceptible to neurodegenerative rotenone stress [38]. Thus, we stressed the adults *selt-1.1* mutant with rotenone 50 μ M during 4 h in liquid culture. This strain was more susceptible to rotenone stress than N2. After 60 h of recovery with OP50, 16% of wild-type worms survived, while no *selt-1.1* mutant worm were alive (Fig. 6). Similar results were obtained allowing for one hour worm recovery.

3.5. 2-nonanone aversion is impaired in a *selt-1.1* mutant deletion strain

Since *selt-1.1* is expressed in most neurons and *selt-1.2* is expressed in the AWB chemosensory neurons involved in avoidance to aversive chemicals, we examined the avoidance behavior of the mutant strains towards the aversive odorant 2-nonanone. Strikingly, in the *selt-1.1(tm3763)*, but not in the *selt-1.2(tm3771)* mutant, is impaired the aversive response to 2-nonanone (Fig. 7). The double mutant strain showed an avoidance index similar to the *selt-1.1(tm3763)* mutant. Similarly, aversion to 1-octanol was impaired in the *selt-1.1(tm3763)* strain, (Supplementary Fig. 5). These results indicate that *selt-1.1*, but not *selt-1.2*, would be involved in 2-nonanone and 1-octanol aversion. Interestingly, *selt-1.1* is expressed in the three pairs of neurons that detect volatile repellants (ASH, ADL, and AWB, Supplementary Fig. 3).

A detailed behavioral analysis of *selt-1.1(tm3763)*, *selt-1.2(tm3771)* and the *selt-1.1(tm3763); selt-1.2(tm3771)* mutant strains showed that chemoattraction to isoamyl alcohol was not affected compared to N2 (Supplementary Fig. 6).

3.6. *selt-1.1* is required for *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* avoidance

Since *selt-1.1* is involved in 2-nonanone avoidance and it is

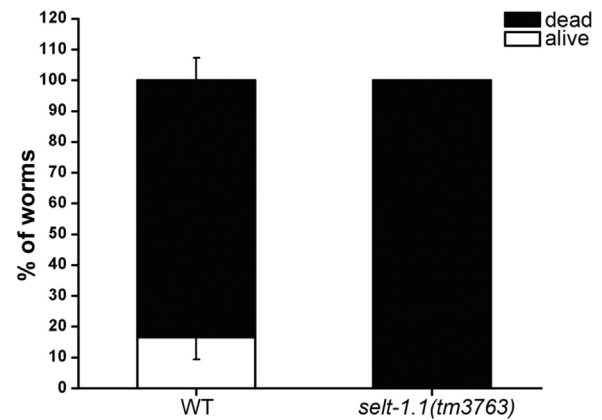


Fig. 6. Rotenone-induced oxidative stress is decreased in *selt-1.1* mutant. N2 and *selt-1.1* mutant were exposed to 50 μ M rotenone during 4 h. Columns indicate the percentage of worms alive (white) or dead (black). The graph corresponds to a representative assay with 2 plates per strain, 200 worms/plate. Three biological replicates were performed for this experiment with similar results. Error bars indicate SEM (standard error of the mean).

expressed in most neurons, and *selt-1.2* is expressed in AWB, which is involved in *S. marcescens* avoidance behavior [26], we examined whether SELT plays a role in the avoidance of bacterial pathogens. Both the *selt-1.1(tm3763)* mutant strain and the double mutant strain were unable to exit the bacterial lawn (Fig. 8A and B). Importantly, the *Psel-1.1::selt-1.1::gfp* expression in the *selt-1.1(tm3763)* mutant strain rescued the mutant phenotype (Fig. 8B). In contrast, the avoidance behavior to *S. marcescens* of *selt-1.2(tm3771)* mutant was similar to that of wild-type (Fig. 8A and B). These results indicate that *selt-1.1*, but not *selt-1.2*, is required in *S. marcescens* avoidance.

Since *P. aeruginosa* PA14 is also a pathogenic bacteria for *C. elegans*, we then examined the lawn avoidance behavior of *selt* mutants. Similar to the results obtained with *S. marcescens*, the *selt-1.1(tm3763)* but not the *selt-1.2(tm3771)* mutant, showed impaired avoidance of *P. aeruginosa* (Fig. 8B).

4. Discussion

The detailed phylogenetic reconstruction of *SELENOT* in nematodes revealed that Sec is the ancestral amino acid in the nematode lineage, and a Sec→Cys replacement occurred in the *Chromadorea* lineage. This is consistent with the fact that in eukaryotes Cys→Sec substitutions

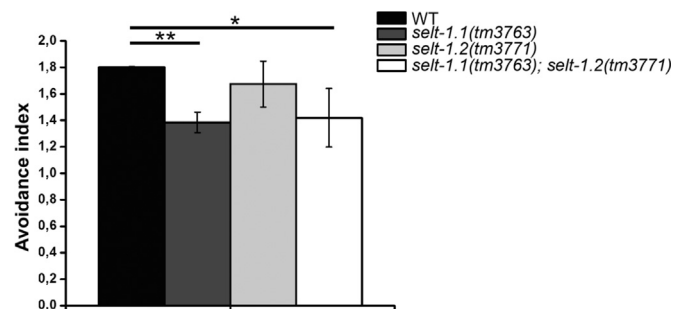


Fig. 7. *selt-1.1* is involved in 2-nonanone avoidance. Columns indicate the avoidance index to 2-nonanone. Wild-type and *selt* mutant strains were subjected to the avoidance assay with 0.6 μ L of 2-nonanone. Animals are placed in the center of the plate and observed which sector they enter during 12 min. The scoring method detects either repulsion (higher avoidance index) or attraction (lower index) reflecting an average of avoidance distances of the animals from the center line of the plate. WT, wild-type, *selt-1.1; selt-1.2* correspond to *selt-1.1(tm3763); selt-1.2(tm3763)* double mutant. Asterisks indicate a significant difference from the N2 value: (** $p = 0.0007$; * $p = 0.04$ by unpaired t -test). Values are mean \pm standard deviation (SD). The graph correspond to an assay with 2 plates per strain, 40–60 worms each. Six biological replicates were performed for this experiment with similar results.

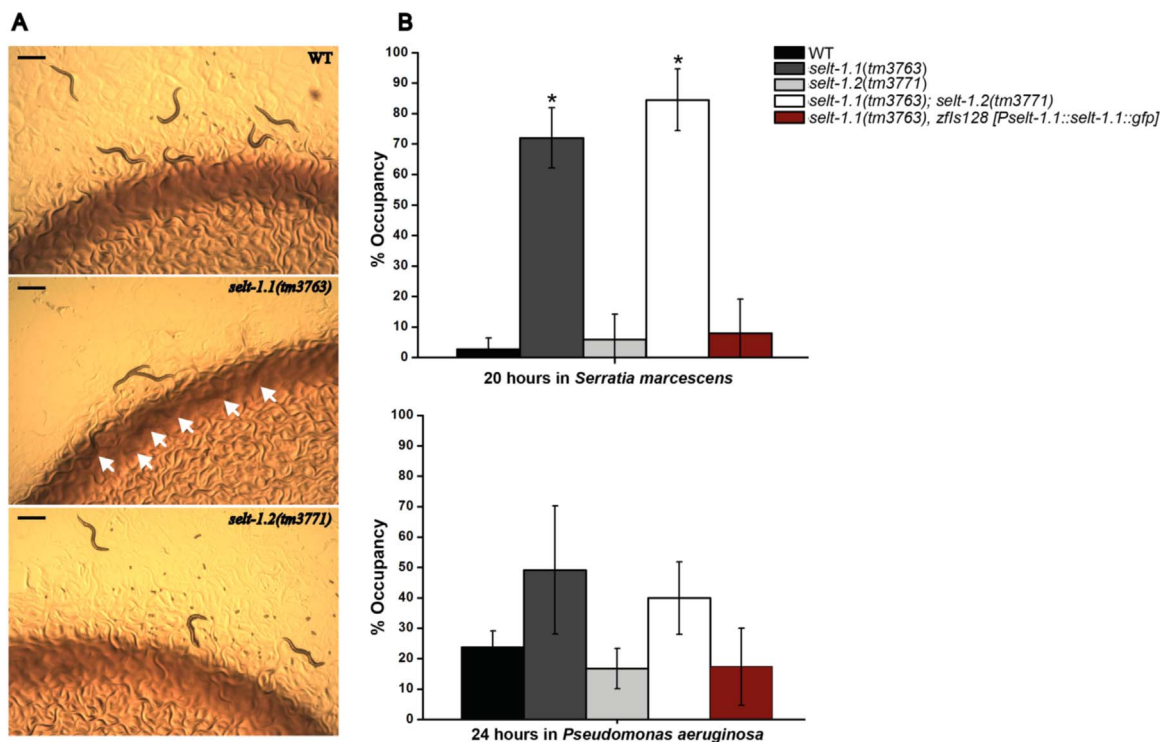


Fig. 8. *selt-1.1* is involved in pathogenic bacteria lawn avoidance behavior. (A) N2, *selt-1.1(tm3763)* and *selt-1.2(tm3771)* strains in *S. marcescens* assay plates are shown. Arrows indicate worms into the bacteria lawn. Scale bars correspond to 500 μ m. (B) Lawn occupancy on *S. marcescens* by N2 and *selt* mutants at 20 h and on *P. aeruginosa* at 24 h. Asterisks denote significant differences from the N2 and *selt-1.1(tm3763)*, *zfls128 [Psel-1.1::selt-1.1::gfp]* value (* $p=0.02592$, ANOVA and Tukey test). Error bars indicate SD. The results correspond to one representative assay with two plates per strain, 20 worms for *S. marcescens* and 30 worms for *P. aeruginosa* assays. Six biological replicates were performed for these experiments with similar results.

have not been documented [6], likely reflecting the need of a point mutation concomitant with the emergence of a SECIS element in the 3'UTR. Subsequently, a gene duplication occurred in the *Caenorhabditis* lineage leading two different SELENOT.

The animal model *C. elegans* offers key advantages to address the function of the redoxin SELENOT as is the only member of the redoxin family present in this organism and both SELT-1.1 and SELT-1.2 are putative Cys-containing oxidoreductases. Importantly, in contrasts with SELENOT deficiency in mice, which leads to early embryonic lethality [13]; our results demonstrate that *selt-1.1(tm3763)*, *selt-1.2(tm3771)* and the double *selt-1.1(tm3763); selt-1.2(tm3771)* *C. elegans* strains are viable. Thus, *C. elegans* is the first animal in which it is possible to perform studies on SELENOT deficiency throughout its development and lifecycle at the organismal level.

In mice and rats SELENOT has been associated with protection of dopaminergic neurons against oxidative stress and neuroendocrine function [12,13]. A conditional knockout mouse line in which SELENOT gene is disrupted in nerve cells exhibited reduced volume of the hippocampus, cerebellum, and cerebral cortex, accompanied by an increase of intracellular reactive oxygen species, indicating that SELENOT exerts a neuroprotective role essential during brain development [39]. Deep sequencing of human transcriptome showed that the brain and the adrenal and pituitary glands are the preferential tissues where SELENOT is expressed (<http://www.gtexportal.org/home/gene/SELT> [40]). Our results showed that *C. elegans selt-1.1* is expressed early in the embryonic development, from the pre-bean stage, and afterwards throughout the entire life cycle. In the adult worm *selt-1.1* is expressed in all neurons. In sharp contrast, we found that *selt-1.2* expression was restricted to a single pair of neurons (AWB).

The *selt-1.1* mutant provided clues regarding functions that are affected by this gene. We found that this mutant has impaired odorant

aversion response to 2-nonanone and 1-octanol. However, the *selt-1.1(tm3763)* mutant strain could not be rescued to the wild-type phenotype by our transgene *zfls128 [Psel-1.1::selt-1.1::gfp]* (data not shown), suggesting that for this specific phenotype, the wild-type level of expression was not reached. The aversive response to 2-nonanone involves mainly AWB neurons, while aversion to 1-octanol involves AWB, ASH and ADL neurons [41,42]. In both cases the aversion behavior also involves interneurons and muscle cells. Thus, aversion to these volatiles is in agreement with the expression pattern for this gene. It is important to mention that chemoattraction to isoamyl alcohol, a volatile chemical, was not affected in the *selt-1.1* mutant strain showing specificity in the nociceptive responses. Surprisingly, SELT-1.2, which is also expressed in AWB, is not involved in odorant aversion to 2-nonanone under the conditions assayed.

Both *selt-1.1* and *selt-1.2* are expressed in AWB, a pair of neurons involved in avoidance of the nematode pathogenic bacteria *S. marcescens* [26]. We found that *selt-1.1* mutant, but not *selt-1.2*, have a marked decreased in lawn avoidance behavior to *S. marcescens*. This decreased was statistically supported. Furthermore, complementation experiments rescue, to a great extent, this phenotype. Avoidance of *S. marcescens* is associated to the detection of serrawettin W2, a cyclic lipopeptidopentapeptide surfactant produced by the bacteria. The detection of this molecule and *S. marcescens* appears to be complex and context-dependent, involving both chemical and mechanosensation and likely involves G protein-coupled chemoreceptors and the Toll-like receptor gene *tol-1* [26,43]. Numerous cues result in initial attraction to *S. marcescens* followed by pathogen avoidance, reflecting an evolutionary balance between attraction to nutrition and pathogen infection. A recent study has implicated CO₂-activated BAG chemosensory neurons as required for avoidance of *S. marcescens* [44]. This study also identified TOL-1 signaling pathway having an important role in

pathogen avoidance. Importantly, the avoidance to *P. aeruginosa* PA14 was also impaired in the *selt-1.1* mutant organism. Besides the impaired avoidance behavior, we observed that the *selt-1.1* mutant worms remain at the edge of the pathogenic bacteria lawn as a bordering-like phenotype (Fig. 8A). OLL is another pair of neuron that has been involved in lawn avoidance to bacterial pathogens. HECW-1 activity is required in the OLL sensory neuron pair to negatively regulate pathogen avoidance behavior through inhibition of the neuropeptide receptor NPR-1. Interestingly, *npr-1* mutants showed impaired lawn avoidance and a bordering behavior phenotype [27]. The fact that AWB is involved in 2-nonanone and 1-octanol aversion and in bacterial pathogen avoidance suggests that SELT-1.1 might play a key role in this particular class of neurons.

Our results show that *selt-1.1* mutant worms are more susceptible to rotenone-induced oxidative stress, in agreement with SELENOT protective role of dopaminergic neurons against rotenone treatment in mammals. Rotenone exposure in *C. elegans* activates the p38 MAPK pathway, leading to decreased neurodegeneration of dopaminergic neurons [38]. Interestingly, this pathway is also involved in BAG-dependent detection of CO₂, which promotes pathogen avoidance [44], suggesting that SELT-1.1 could be a component of p38 MAPK pathway.

Overexpression of SELENOT in the catecholaminergic cell line PC12 resulted in an increase of the intracellular Ca²⁺ levels, whereas knockdown of *SELENOT* inhibited PACAP-stimulated release of Ca²⁺ from the ER and reduced growth hormone secretion. *C. elegans* SELT-1.1 has an ER localization, suggesting that SELT-1.1 would be an ER regulator, presumably by a redox-dependent mechanism, that plays an important role in signal transduction.

Surprisingly, we could not detect a phenotype associated to *selt-1.2*. The expression of *selt-1.2* appears to be restricted to the pair of neurons AWB. This suggests that the gene duplication that occurred in the *Caenorhabditis* lineage led to subfunctionalization or neofunctionalization. The *selt-1.2* gene derived from *selt-1.1* by duplication may have specialized into a specific subset of *selt-1.1* functions, or acquire a new specific function yet to be identified. Consistent with this view is the fact that *selt-1.2* showed a cytoplasmic localization.

Our results indicate that SELT-1.1 is required for microbial pathogen avoidance and its deficiency affects the response to nociceptive stimuli, indicating that *selt-1.1* is important for optimal organismal fitness. Our results suggest that SELT-1.1 is a redox ER-signal transducer or transducer regulator that controls important survival behaviors and highlight that *C. elegans* is a valuable model to study SELENOT-dependent processes.

Acknowledgements

We are grateful to the *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) and the Japanese National Bioresource Project for the Experimental Animal Nematode *C. elegans* for provision of *E. coli* and *C. elegans* strains. This work was supported by FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund, [COF 03/11]), International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology grant [CRP/URU14-01.ICGEB], NIH grant [GM084491] to M.J.A. and Universidad de la República [CSIC_INI_2013_916]. L.R. was recipient of postgraduate study fellowships from Agencia Nacional de Innovación e Investigación [POS_NAC_2012_1_8660] and Universidad de la República. I.C. was recipient of a posdoctoral fellowship from Agencia Nacional de Innovación e Investigación [PD_NAC_2013_11008]. We would like to thank Dr. Marcelo Comini (Institut Pasteur de Montevideo) and Dr. Jennifer Pirri (University of Massachusetts Medical School) for helpful discussions.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.021.

References

- [1] V.M. Labunsky, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles, *Physiol. Rev.* 94 (2014) 739–777, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00039.2013>.
- [2] U. Schweizer, Selenoproteins in the nervous system development, function and degeneration, in: D.L. Hatfield, M.J. Berry, V.N. Gladyshev (Eds.), *Selenium Its Mol. Biol. Role Hum. Heal*, 3rd ed., Springer, New York, New York, 2012, pp. 235–248, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-1025-6_18.
- [3] J. Köhrle, The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1853–1863, <http://dx.doi.org/10.1007/PL00000667>.
- [4] J.R. Arthur, R.C. McKenzie, G.J. Beckett, Immunity enhanced by trace elements: selenium in the immune system, *J. Nutr.* 133 (2003) 1457–1459.
- [5] V.N. Turanov, A. Anton, Malinowski, Mikalai. and Gladyshev, Selenium and Male Reproduction, in: D.L. Hatfield, M.J. Berry, V.N. Gladyshev (Eds.), *Selenium Its Mol. Biol. Role Hum. Heal*, 3rd ed., Springer, New York, New York, 2012, pp. 409–417, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-1025-6_32.
- [6] A.V. Lobanov, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1790 (2009). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.05.014>.
- [7] V.N. Gladyshev, Selenoproteins and selenoproteomes, in: D.L. Hatfield, M.J. Berry, V.N. Gladyshev (Eds.), *Selenium Its Mol. Biol. Role Hum. Heal*, 3rd ed., Springer, New York, New York, 2012, pp. 109–123, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-1025-6_9.
- [8] R.J. Hondal, E.L. Ruggles, Differing views of the role of selenium in thioredoxin reductase, *Amino Acids* 41 (2011) 73–89, <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-010-0494-6>.
- [9] D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, MINIREVIEW how selenium has altered our understanding of the genetic code, *Society* 22 (2002) 3565–3576, <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.22.11.3565>.
- [10] G.V. Kryukov, V.M. Kryukov, V.N. Gladyshev, New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 33888–33897, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.48.33888>.
- [11] A. Dikiy, S.V. Novoselov, D.E. Fomenko, A. Sengupta, B.A. Carlson, R.L. Cerny, K. Ginalski, N.V. Grishin, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, SelT, SelW, SelH, and Rdx 12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family, *Biochemistry* 46 (2007) 6871–6882, <http://dx.doi.org/10.1021/bi602462q>.
- [12] L. Grumolato, H. Ghzili, M. Montero-Hadjadje, S. Gasman, J. Lesage, Y. Tanguy, L. Galas, D. Ait-Ali, J. Leprince, N.C. Guérineau, A.G. Elkahloun, A. Fournier, D. Vieau, H. Vaudry, Y. Anouar, Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion, *FASEB J.* 22 (2008) 1756–1768, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-075820>.
- [13] L. Boukhar, A. Hamieh, D. Cartier, Y. Tanguy, I. Alsharif, M. Castex, A. Arabo, S. El Hajji, J.-J. Bonnet, M. Errami, A. Falluel-Morel, A. Chagraoui, I. Lihmann, Y. Anouar, Selenoprotein T exerts an essential oxidoreductase activity that protects dopaminergic neurons in mouse models of Parkinson's disease, *Antioxid. Redox Signal.* 24 (2016) 557–574, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2015.6478>.
- [14] G. Prevost, A. Arabo, L. Jian, E. Quelebec, D. Cartier, S. Hassan, A. Falluel-Morel, Y. Tanguy, S. Gargani, I. Lihmann, J. Kerr-Conte, H. Lefebvre, F. Pattou, Y. Anouar, The PACAP-regulated gene selenoprotein T is abundantly expressed in mouse and human β -cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance, *Endocrinology* 154 (2013) 3796–3806, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2013-1167>.
- [15] D.L. Sengupta, A., Carlson, B. A., Labunsky, V. M., Gladyshev, V. N., Hatfield, Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells., *Biochem. Cell Biol.* 87 (2009) pp. 953–961. doi:10.1139/o09-064.
- [16] S. Castellano, V.N. Gladyshev, R. Guigó, M.J. Berry, SelenoDB 1.0: a database of selenoprotein genes, proteins and SECIS elements, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 332–338, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm731>.
- [17] D.E. Fomenko, W. Xing, B.M. Adair, D.J. Thomas, V.N. Gladyshev, High-throughput identification of catalytic redox-active cysteine residues, *Science* 315 (80-) (2007) 387–389, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1133114>.
- [18] M. Mariotti, D. Santesmasses, S. Capella-Gutiérrez, A. Mateo, C. Arnan, R. Johnson, S. D'Aniello, S.H. Yim, V.N. Gladyshev, F. Serras, M. Corominas, T. Gabaldón, R. Guigó, Evolution of selenophosphate synthetases: emergence and relocation of function through independent duplications and recurrent subfunctionalization, *Genome Res.* 25 (2015) 1256–1267, <http://dx.doi.org/10.1101/gr.190538.115>.
- [19] S. Brenner, The genetics of *Caenorhabditis elegans*, *Genetics* 77 (1974) 71–94, <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200300625>.
- [20] C.C. Mello, J.M. Kramer, D. Stinchcomb, V. Ambros, Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences, *EMBO J.* 10 (1991) 3959–3970, [http://dx.doi.org/10.1016/0168-9525\(92\)90342-2](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9525(92)90342-2).
- [21] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods* 9 (2012) 676–682, <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- [22] A.D. Edelstein, M.A. Tsuchida, N. Amodaj, H. Pinkard, R.D. Vale, N. Stuurman, Advanced methods of microscope control using μ manager software, *J. Biol. Methods* 1 (2014) 1–10, <http://dx.doi.org/10.14440/jbm.2014.36>.
- [23] D.E. Fomenko, V.N. Gladyshev, Comparative genomics of thiol oxidoreductases

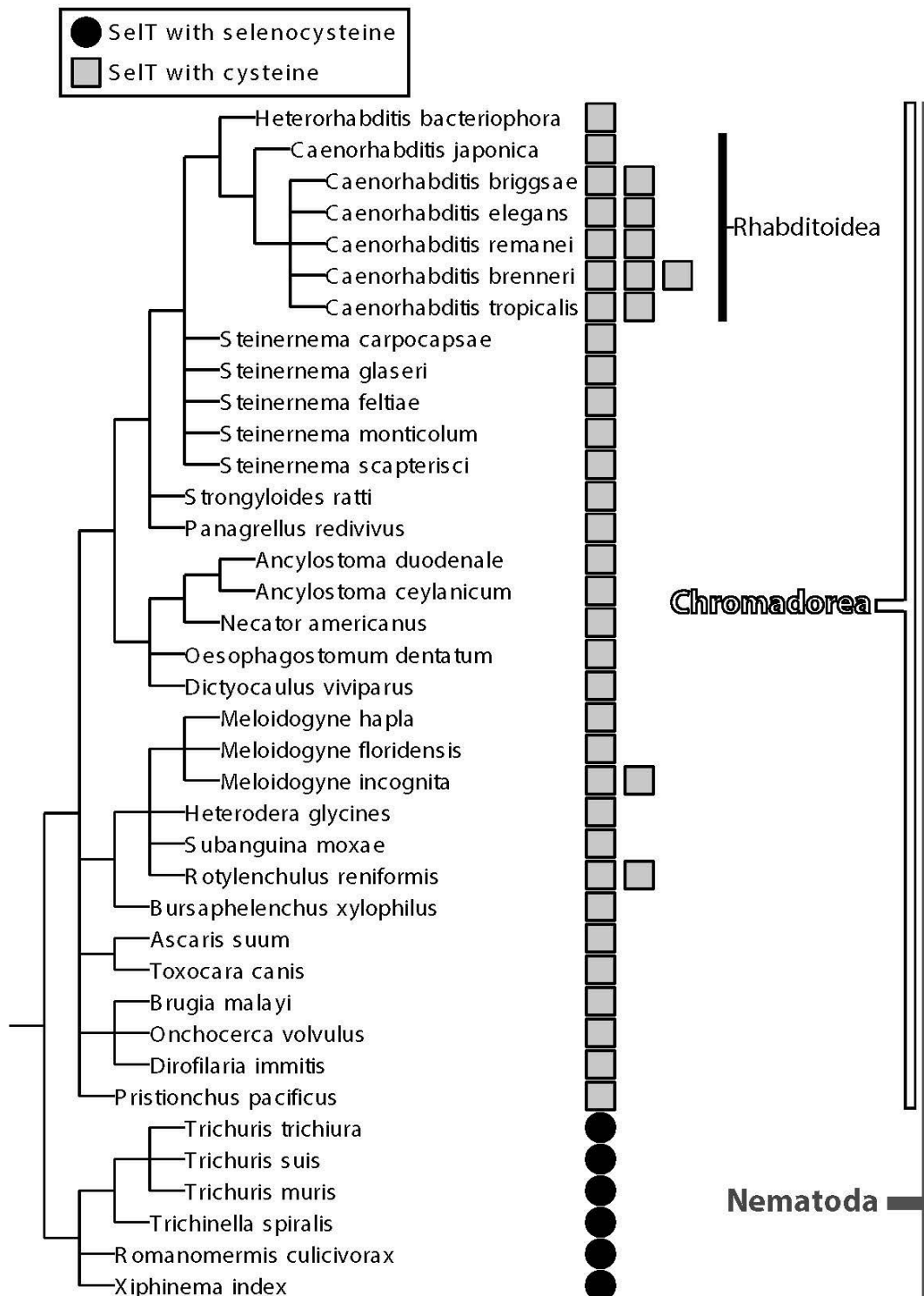
- reveals widespread and essential functions of thiol-based redox control of cellular processes, *Antioxid. Redox Signal.* 16 (2012) 193–201, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2011.3980>.
- [24] K.D. Kimura, K. Fujita, I. Katsura, Enhancement of odor avoidance regulated by dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*, *J. Neurosci.* 30 (2010) 16365–16375, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6023-09.2010>.
- [25] S. Ward, Chemotaxis by the nematode *Caenorhabditis elegans*: identification of attractants and analysis of the response by use of mutants., in: *Proceedings of the Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70 pp. 817–821. doi:10.1073/pnas.70.3.817, 1973.
- [26] E. Pradel, Y. Zhang, N. Pujol, T. Matsuyama, C.I. Bargmann, J.J. Ewbank, Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*., in: *Proceedings of the Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 pp. 2295–2300. doi:10.1073/pnas.0610281104, 2007.
- [27] H.C. Chang, J. Paek, D.H. Kim, Natural polymorphisms in *C. elegans* HECW-1 E3 ligase affect pathogen avoidance behaviour, *Nature* 480 (2011) 525–529, <http://dx.doi.org/10.1038/nature10643>.
- [28] M. Mariotti, R. Guigó, Selenoproteomes: profile-based scanning of eukaryotic genome sequences for selenoprotein genes, *Bioinformatics* 26 (2010) 2656–2663, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq516>.
- [29] S. Guindon, J.F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, O. Gascuel, New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0, *Syst. Biol.* 59 (2010) 307–321, <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- [30] M. Mariotti, P.G. Ridge, Y. Zhang, A.V. Lobanov, T.H. Pringle, R. Guigó, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes, *PLoS One* 7 (2012). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033066>.
- [31] E.W. Sayers, T. Barrett, D.A. Benson, S.H. Bryant, K. Canese, V. Chetvernin, D.M. Church, M. Dicuccio, R. Edgar, S. Federhen, M. Feolo, L.Y. Geer, W. Helmberg, Y. Kapustin, D. Landsman, D.J. Lipman, T.L. Madden, D.R. Maglott, V. Miller, I. Mizrahi, J. Ostell, K.D. Pruitt, G.D. Schuler, E. Sequeira, S.T. Sherry, M. Shumway, K. Sirotkin, A. Souvorov, G. Starchenko, T.A. Tatusova, L. Wagner, E. Yaschenko, J. Ye, Database resources of the National Center for Biotechnology Information, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 5–15, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn741>.
- [32] K. Kiontke, N.P. Gavin, Y. Raynes, C. Roehrig, F. Piano, D.H.A. Fitch, *Caenorhabditis* phylogeny predicts convergence of hermaphroditism and extensive intron loss., in: *Proceedings of the Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 pp. 9003–9008. doi:10.1073/pnas.0403094101, 2004.
- [33] B.H.M. Meldal, N.J. Debenham, P. De Ley, I.T. De Ley, J.R. Vanfleteren, A.R. Vierstraete, W. Bert, G. Borgonie, T. Moens, P.A. Tyler, M.C. Austen, M.L. Blaxter, A.D. Rogers, P.J.D. Lamshead, An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa, *Mol. Phylogenet. Evol.* 42 (2007) 622–636, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2006.08.025>.
- [34] N. Stefanakis, I. Carrera, O. Hobert, Regulatory logic of pan-neuronal gene expression in *C. elegans*, *Neuron* 87 (2015) 733–750, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.031>.
- [35] P.N. Inglis, G. Ou, M.R. Leroux, J.M. Scholey, The sensory cilia of *Caenorhabditis elegans*, *WormBook* (2007) 1–22, <http://dx.doi.org/10.1895/wormbook.1.126.2>.
- [36] C.I. Bargmann, Chemosensation in *C. elegans*, *WormBook* (2006) 1–29, <http://dx.doi.org/10.1895/wormbook.1.123.1>.
- [37] F. Muñoz-Lobato, M.J. Rodríguez-Palero, F.J. Naranjo-Galindo, F. Shephard, C.J. Gaffney, N.J. Szewczyk, S. Hamamichi, K.A. Caldwell, G.A. Caldwell, C.D. Link, A. Miranda-Vizuete, Protective role of DNJ-27/ERdj5 in *Caenorhabditis elegans* models of human neurodegenerative diseases, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 217–235, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.5051>.
- [38] M.R. Chikka, C. Anbalagan, K. Dvorak, K. Dombek, V. Prahlad, The mitochondria-regulated immune pathway activated in the *C. elegans* intestine is neuroprotective, *Cell Rep.* 16 (2016) 2399–2414, <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.077>.
- [39] M.T. Castet, A. Arabo, M. Bénard, V. Roy, V. Le Joncour, G. Prévost, J.-J. Bonnet, Y. Anouar, A. Falluel-Morel, Selenoprotein, T deficiency leads to neurodevelopmental abnormalities and Hyperactive behavior in mice, *Mol. Neurobiol.* (2015). <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-015-9505-7>.
- [40] The Broad Institute of MIT and Harvard, GTEx, (n.d.). <<http://www.gtexportal.org/home/gene/SELT>> (accessed 12 October 2016).
- [41] E.R. Troemel, B.E. Kimmel, C.I. Bargmann, Reprogramming chemotaxis responses: Sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*, *Cell* 91 (1997) 161–169, [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80399-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80399-2).
- [42] M.Y. Chao, H. Komatsu, H.S. Fukuto, H.M. Dionne, A.C. Hart, Feeding status and serotonin rapidly and reversibly modulate a *Caenorhabditis elegans* chemosensory circuit., in: *Proceedings of the Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 15512–15517. doi:10.1073/pnas.0403369101, 2004.
- [43] N. Pujol, E.M. Link, L.X. Liu, C.L. Kurz, G. Alloing, M.W. Tan, K.P. Ray, R. Solari, C.D. Johnson, J.J. Ewbank, A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*, *Curr. Biol.* 11 (2001) 809–821, [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00241-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00241-X).
- [44] J.P. Brandt, N. Ringstad, Toll-like receptor signaling promotes development and function of sensory neurons required for a *C. elegans* pathogen-avoidance behavior, *Curr. Biol.* 25 (2015) 2228–2237, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.037>.

Supplementary material

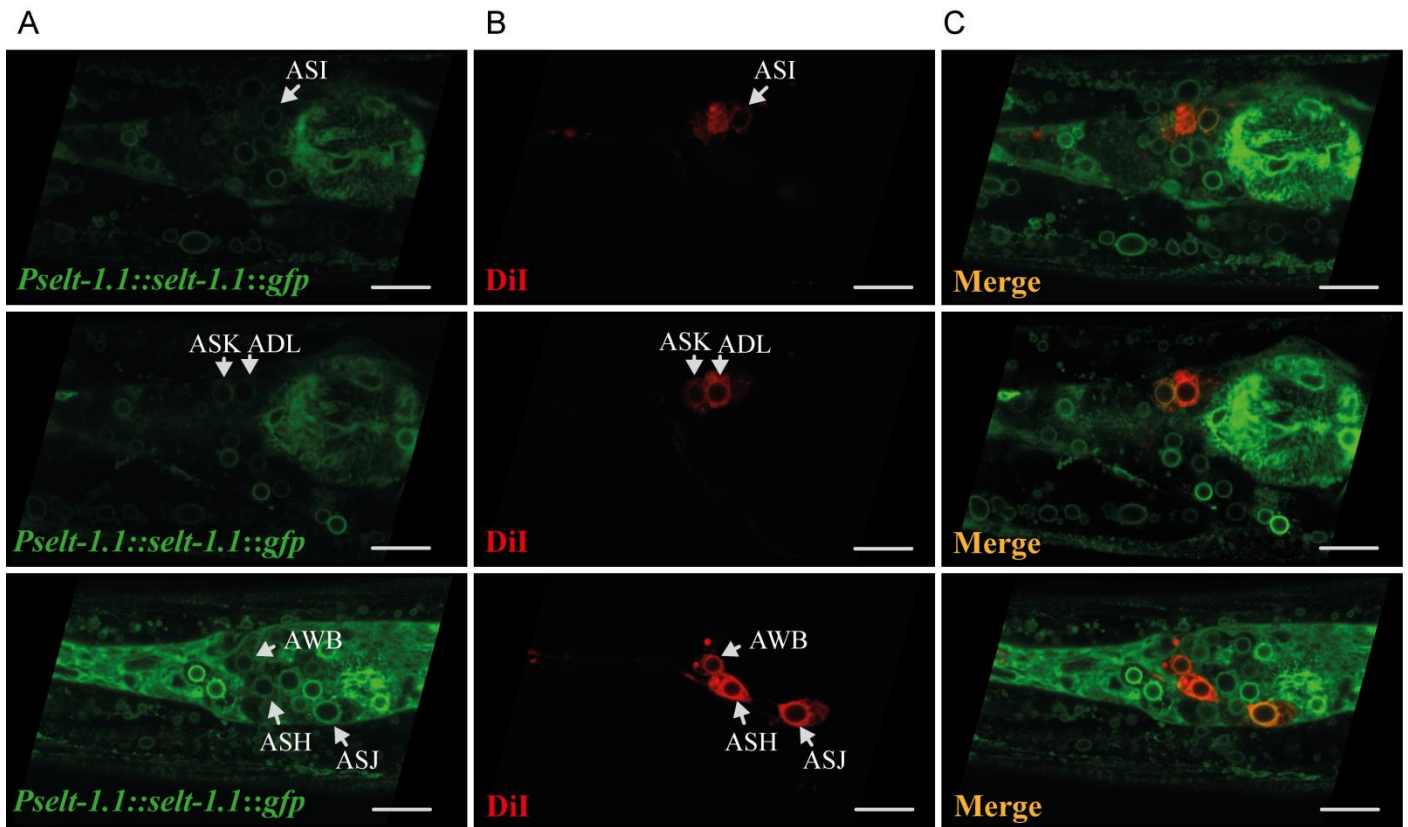
Supplementary Fig. 1. Sequences of *selT* from different species. The presumed redox motif (CXXC) is highlighted in dark gray. The redox motif may contain Sec (U) or Cys (C) in homologous position depending on the species. In orange is indicated the Redoxins conserved sequence at the C-terminal end. In light gray is indicated the hydrophobic region which divides the thioredoxin folding unit (indicated by purple lines). The red line indicates the N-terminal insertion present only in *C. elegans* SELT, rich in charged and hydroxylated amino acid residues (indicated in red font).

		<i>C. elegans</i> N-terminal insertion	
<i>Mus musculus</i>	MR-----LLLLLLVAASAVVRSEASANLGG-----		25
<i>Homo sapiens</i>	MR-----LLLLLLVAASAMVRSEASANLGG-----		25
<i>Xenopus tropicalis</i>	MARSSGPLCLLLGGLVAGILSGASADNG-----		30
<i>Danio rerio</i>	MG----KMRWLPPFSALLLWALCLHSASADN-----		26
<i>Drosophila melanogaster</i>	MERLTGRNVALLVLCLCAGYALVFAEGEKE-----		30
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.1	MSRFGVFIIGVLFMFSVCDVLRTEEHSHDENHVHEKDDFEAEFGDETDSQ		50
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.2	MSRSGAIIIGLFFIASIFDVFRAEKEPPAE-----DSRLEDYLSSELETT		45
		Trx subdomain I	
<i>Mus musculus</i>	-----VPSKRLKMQYATGPLLKFQICVSUGYRRVFEE		57
<i>Homo sapiens</i>	-----VPSKRLKMQYATGPLLKFQICVSUGYRRVFEE		57
<i>Xenopus tropicalis</i>	-----LPSKCLKMQYTAGPLLKFQICVSUGYRRVFED		62
<i>Danio rerio</i>	-----NGVKKMKMFATGPLLKFQICVSUGYKRVFEE		58
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----IPVTKFGQNI--PTMTFLYCYSCGYRKAFED		60
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.1	SFSQGTEDHIEVREQSSFVKPTAVHHAKDLPTLRIFYCVSCGYKQAFDQ		100
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.2	AIPT-----VVNENSHSQDVVDSGFSKDLPKLTILYCVSCGYKQAFNQ		88
		Hydrophobic domain	
<i>Mus musculus</i>	YMRVISQRYPDIRIEGENYLPQPIYRHIASFLSVFKLVLIIGLIIIVGKDPF		107
<i>Homo sapiens</i>	YMRVISQRYPDIRIEGENYLPQPIYRHIASFLSVFKLVLIIGLIIIVGKDPF		107
<i>Xenopus tropicalis</i>	YMRVISQRYPDIRIEGENYLPHPIYRNIASFLSVFKLVLIIGLIIAGKDPF		112
<i>Danio rerio</i>	YTQALYQRYPDIRIEGENYLPLPLYRHIASFLSMFKLLIIGVILIGKDPF		108
<i>Drosophila melanogaster</i>	YVGLLGEKYPQIQVNGGNYDPPGLNYYLSKMI FALKI I I IVSVVSAVSPF		110
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.1	FTTFAKEKYPNMPIEGANFAPVLWKAYVAQALS FVKMAVLVVLGGINPF		150
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.2	FYEFAKEKYPGLVIEGGNFSPDFWKGLAQIVGVAKIGLIAIVITGNSNP		138
		Trx subdomain II	
<i>Mus musculus</i>	AFFGMQAPSIWQWGQENKVYACMMVFFLSNMIENQCMS TGAF EITLNDVP		157
<i>Homo sapiens</i>	AFFGMQAPSIWQWGQENKVYACMMVFFLSNMIENQCMS TGAF EITLNDVP		157
<i>Xenopus tropicalis</i>	AFFGMQAPSVWQWGQENKVYACMMVFFVSNMIENQCMS TGAF EITLNDVP		162
<i>Danio rerio</i>	ALCGMQAPGIWVWSQENKIYACMMVFFSNMIENQCMS TGAF EITLNDVP		158
<i>Drosophila melanogaster</i>	TFLGLNTPSWWSHMQANKIYACMMI FFLGNMLEAQLIS SGAF EITLNDVP		160
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.1	ERFGLGYPQILQHAHGNKMSSCMLVFM LGNLVEQSLIS TGAF EVYLGNEQ		200
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.2	EYIGFGYPQILQTAHYNRFSYLLVFMIGNLFESTLSS TGAF EIFLGDKQ		188
<i>Mus musculus</i>	VWSKLESGHLP SMQQLVQILDNEMKLNVMDSIP-HHRS-----		195
<i>Homo sapiens</i>	VWSKLESGHLP SMQQLVQILDNEMKLNVMDSIP-HHRS-----		195
<i>Xenopus tropicalis</i>	VWSKLESGHLP SVQQLVQIIDNEMKLNVMDAIPHHRS-----		201
<i>Danio rerio</i>	VWSKLESGHLP SMQQLVQI-----		177
<i>Drosophila melanogaster</i>	VWSKLQTRFPSPPEVLFQIIDNHLQFTEKVQENPDFVK-----		198
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.1	IWSKIESGRVSPQEFMQLIDAQLAVLGKAPVNTESFGEFQQT		244
<i>Caenorhabditis elegans</i> SELT1.2	IWSKISKERVPTQEEFLNLIDLQLKTIR-----		216

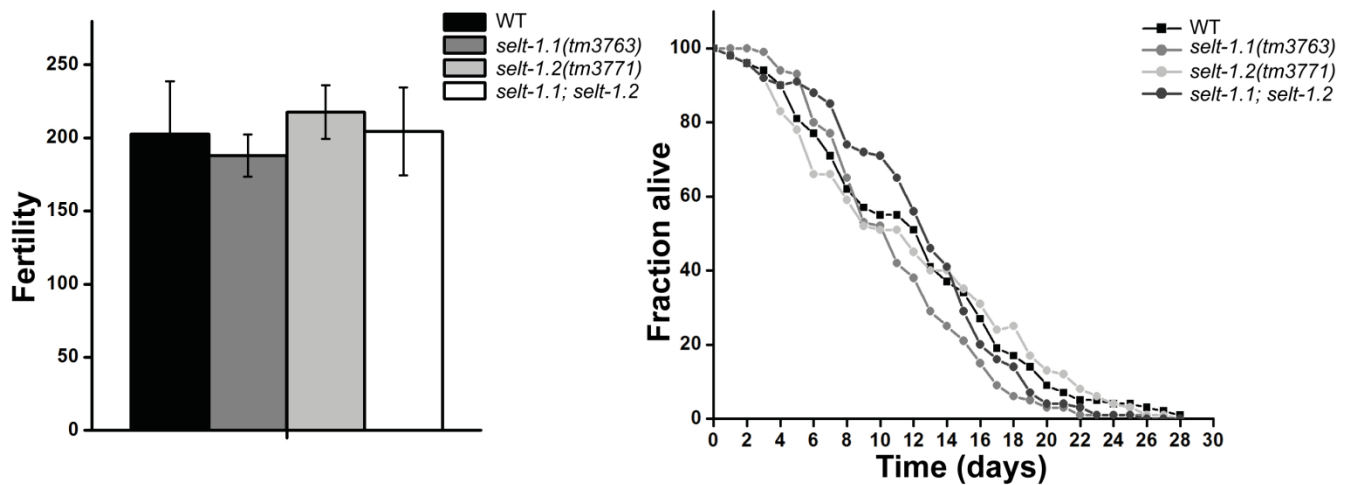
Supplementary Fig. 2. Sec and Cys containing *selT* genes identified across the nematode tree of species. The figure shows a rough phylogenetic tree of nematode species (source: NCBI taxonomy), annotated with the *SelT* genes that we identified in their genome. *SELT* proteins containing selenocysteine were found uniquely in the ancestral nematode lineage of Enoplea (bottom). The rest of nematodes (Chromadorea) replaced selenocysteine with cysteine in *SELT*. Then, a *SELENOT* gene duplication occurred within Rhabditoidea (top).



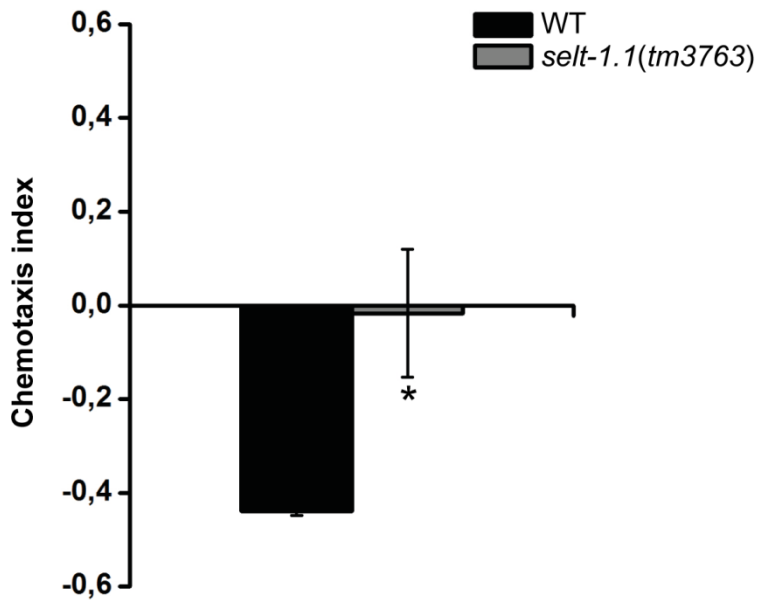
Supplementary Fig. 3. *selt-1.1* is expressed in the chemosensory neurons AWB, ADL and ASH. Confocal images of selected planes at the same magnification show a lateral view of an adult head. (A) Transgenic animals expressing *P_{selt-1.1}::selt-1.1::gfp*. (B) Dye-filling with Dil of transgenic animal expressing *P_{selt-1.1}::selt-1.1::gfp*. (C) Merge. Colocalization in ASI, ASK, ADL, AWB, ASH, ASJ is demonstrated by the yellow color of the merged image. Scale bar: 10 μ m.



Supplementary Fig. 4. *selt-1.1* mutant strain exhibited normal lifespan and brood size. (A) Columns indicate the brood size of *selt* mutants and wild type (WT) strains. The brood size indicates the number of eggs laid by one animal in its entire life. Each value corresponds to the mean progeny size of 10 worms. The experiment was performed three times, with similar results. Error bars indicate standard deviation (SD). (B) The graph corresponds to the survival curves of *selt* mutants and wild-type strains. The lifespan is measured by the number of days the animal is alive once the adult stage was reached. Each mutant strain was compared with the wild-type strain using the log-rank test (Kaplan-Meier), and no differences were determined.

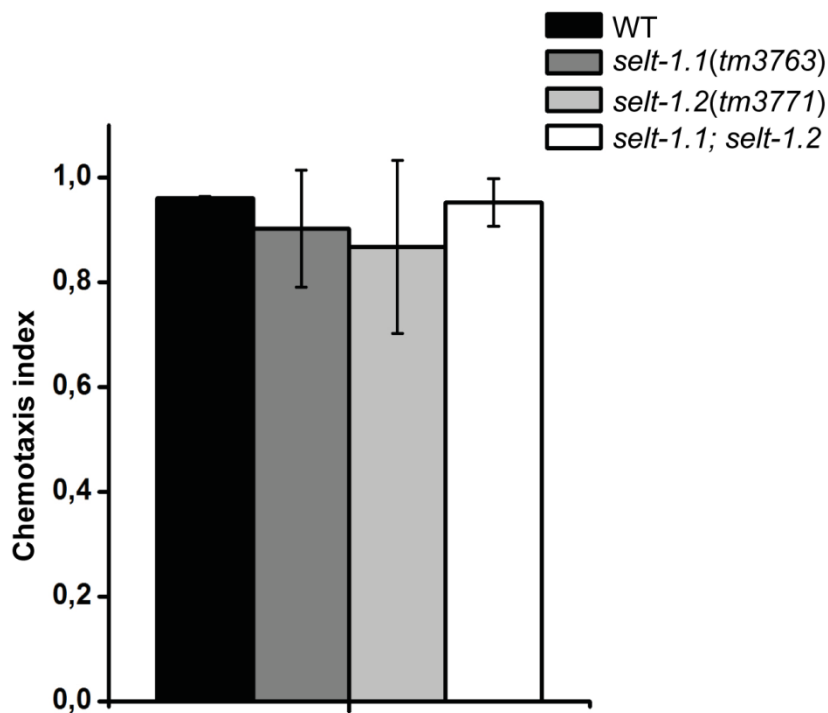


Supplementary Fig. 5. *selt-1.1* is involved in 1-octanol avoidance. Columns indicate the chemotaxis index to 1-octanol. Wild-type and *selt-1.1* mutant strains were subjected to the chemotaxis assay. 1 μ L of 1-octanol or control are placed 180 degrees opposite each other close the edges of the plate. Each point includes 1 μ L of sodium azide 1M that will paralyze worms once they reach the destination. Animals are placed in the center of the plate and after 1 hour the number of worms anaesthetized at each point is counted. The chemotaxis index = (number of animals at the odorant – number of animals at control) / total number of animals on the assay plate. WT, N2 wild-type. Asterisk indicates a significant difference from the N2 value: (* $p = 0.049$ by unpaired t test). Values are mean \pm standard deviation (SD). The graph corresponds to an assay with 2 plates per strain, 40-60 worms each. Six biological replicates were performed for this experiment with similar results.



$$CI = \frac{\# \text{ worms at 1-octanol} - \# \text{ worms at control}}{\text{total \# worms}}$$

Supplementary Fig. 6. *selt* mutants show normal chemoattraction to isoamyl alcohol. Columns indicate the chemotaxis index to isoamyl alcohol. Wild-type and *selt* mutant strains were subjected to the chemotaxis assay with 1 μ L of isoamyl alcohol (1:100 dilution in ethanol). 1 μ L of 1-isoamyl alcohol or control are placed 180 degrees opposite each other close the edges of the plate. Each point includes 1 μ L of sodium azide 1M that will paralyze worms once they reach the destination. Animals are placed in the center of the plate and after 1 hour the number of worms anaesthetized at each point is counted. The chemotaxis index = (number of animals at the odorant – number of animals at control) / total number of animals on the assay plate. WT, N2 wild-type. Values are mean \pm standard deviation (SD). The graph corresponds to an assay with 2 plates per strain, approximately 100 worms each. Three biological replicates were performed for this experiment with similar results.



$$CI = \frac{\# \text{ worms at isoamyl alcohol} - \# \text{ worms at control}}{\text{total \# worms}}$$

Supplementary Table 1. List of strains used and generated in this study.

Strain	Transgene	Genotype
IH6		<i>selt-1.1(tm3763) X</i>
IH7		<i>selt-1.2(tm3771) V</i>
IH8		<i>selt-1.1(tm3763) X; selt-1.2(tm3771)V</i>
QW1186	<i>zfex494</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Psel-1.1::gfp, pL15EK]</i>
QW1187	<i>zfex495</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Psel-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1188	<i>zfex495</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Psel-1.1::gfp, pL15EK]</i>
QW1189	<i>zfex496</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Psel-1.1::gfp, pL15EK]</i>
QW1213	<i>zfex522</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Psel-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK]</i>
QW1214	<i>zfex523</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Psel-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK]</i>
QW1215	<i>zfex524</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Psel-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK]</i>
QW1216	<i>zfex525</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Psel-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK]</i>
QW1265	<i>zfls128</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Psel-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK V</i>
QW1266	<i>zfls129</i>	<i>lin-15(n765ts) X, Psel-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK X</i>
QW1244	<i>zfex541</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[1.6kb upstream+Psel-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1245	<i>zfex542</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[1.6kb upstream+Psel-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1246	<i>zfex543</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[1.6kb upstream+Psel-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1248	<i>zfex545</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[1.6kb upstream+Psel-1.2::selt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1249	<i>zfex546</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[1.6kb upstream+Psel-1.2::selt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1247	<i>zfex544</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[1.6kb upstream+Psel-1.2::selt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1257	<i>zfex551</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Psel-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1258	<i>zfex552</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Psel-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1259	<i>zfex553</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Psel-1.2::gfp, pL15EK]</i>
QW1260	<i>zfex554</i>	<i>lin-15(n765ts) X; Ex[Psel-1.2::selt-1.2::gfp, pL15EK]</i>
IH18	<i>zfls129; vzEx91</i>	<i>lin-15(n765ts) X, Psel-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK X; Ex[Pmyo-3::mcherry::tram-1]</i>
IH19	<i>zfls128</i>	<i>selt-1.1(tm3763) X; Psel-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK V</i>
IH20	<i>zfls129; otls356</i>	<i>lin-15(n765ts) X, Psel-1.1::selt-1.1::gfp, pL15EK X; Prab-3::nls::rfp</i>
BY250	<i>vtls7</i>	<i>Pdat-1::dat-1::gfp</i>
VZ255	<i>vzEx91</i>	<i>Ex[Pmyo-3::mcherry::tram-1]</i>

Supplementary Table 2. List of genes whose expression was interfered by RNAi.

Gene	Wormbase ID
<i>pdi-1</i> (C14B1.1)	WBRNAi00010719
<i>pdi-2</i> (C07A12.4)	WBRNAi00008357
<i>pdi-3</i> (H06O01.1)	WBRNAi00003873
<i>pdi-6</i> (B0403.4)	WBRNAi00009753
F49H12.5	WBRNAi00015347
<i>dnj-27</i> (Y47H9C.5)	WBRNAi00037210
C14B9.2	WBRNAi00010732
Y49E10.4	WBRNAi00020781
<i>nlp-6</i> (Y73B6BL.12)	WBRNAi00019077
<i>ero-1</i> (Y105E8B.8)	WBRNAi00036491
C30H7.2	WBRNAi00003044
Y57A10A.23	WBRNAi00021100
C06A6.5	WBRNAi00010264

Supplementary Table 3. List of primers used for cloning.

	Sequence
<i>selt-1.2</i> transcriptional and translational forward primer	cagaagcttaaccataaaaactaattcagtgga
<i>selt-1.2</i> transcriptional reverse primer	acggtcgacttgatagatgaaaagaagtttc
<i>selt-1.2</i> translational reverse primer	acggtcgacacgaatagttttcaattgaagatc
<i>selt-1.1</i> transcriptional and translational forward primer	acggtcgacgtagggaatgaaaagttg
<i>selt-1.1</i> transcriptional reverse primer	acgggatcccccaaacctgacatctg
<i>selt-1.1</i> translational reverse primer	ggatccgacagtctgttggaactctccaaatg

4 Determinación de respuesta al selenio dependiente del factor de transcripción HIF-1

4.1 Aislamiento de mutantes resistentes a concentraciones tóxicas de selenio

Con el objetivo de determinar genes involucrados en el metabolismo del selenio, se utilizó la estrategia de genética directa y se realizó mutagénesis aleatoria de gusanos y posterior selección de gusanos resistentes a concentraciones tóxicas de este elemento.

4.1.1 Mutagénesis química de gusanos y selección de gusanos resistentes a concentraciones tóxicas de selenito de sodio.

Se realizaron dos procedimientos para la selección de gusanos mutagenizados resistentes a concentraciones de selenito de sodio tóxicas para la estirpe silvestre, tal como se describe en materiales y métodos (sección 2.1.18). Por un lado se realizó una selección inicial en gusanos jóvenes adultos de la F2 mutagenizada y luego de varios pasos de selección con selenito se aislaron 5 mutantes. En paralelo, se realizó una selección inicial en embriones de la generación F3 mutagenizada y luego de varios pasos de selección con selenito de sodio se aislaron 9 mutantes.

Con el objetivo de disminuir el número de mutantes con el cual continuar trabajando, se realizaron ensayos de toxicidad cuantificando el número de gusanos sobrevivientes luego de 72 horas en 10 mM de selenito de sodio eligiéndose 3 de las 9 estirpes con las cuales seguir trabajando. Los mutantes seleccionados para continuar el trabajo fueron: QW1262 y QW1263 (provenientes del *screening* iniciado en embriones) y QW1264 (proveniente del *screening* iniciado en adultos).

4.1.2 Caracterización fenotípica de mutantes aislados.

Con los mutantes seleccionados a partir del *screening* utilizando concentraciones tóxicas de selenito se realizó una caracterización cuantitativa del fenotipo resistencia al Se exponiendo gusanos adultos a selenito de sodio y cuantificando el número de gusanos vivos cada 24 horas. La estirpe utilizada como control silvestre fue la estirpe de referencia Bristol-N2 (N2). La **Fig. 4.1** representa los resultados obtenidos en la caracterización cuantitativa del fenotipo resistencia al Se de los mutantes QW1262, QW1263 y QW1264 a las 48 y 72 horas. A las 72 horas, las estirpes mutantes tienen un porcentaje de individuos vivos de más del 70% en los tres casos, a diferencia de la estirpe silvestre en la cual ningún individuo sobrevivió a estas condiciones (**Fig. 4.1 B**). La resistencia se sostiene con el paso de los días hasta el día 9-10 para las estirpes QW1263 y QW1264, siendo aún más prolongada para la estirpe QW1262 (**Fig. 4.2**).

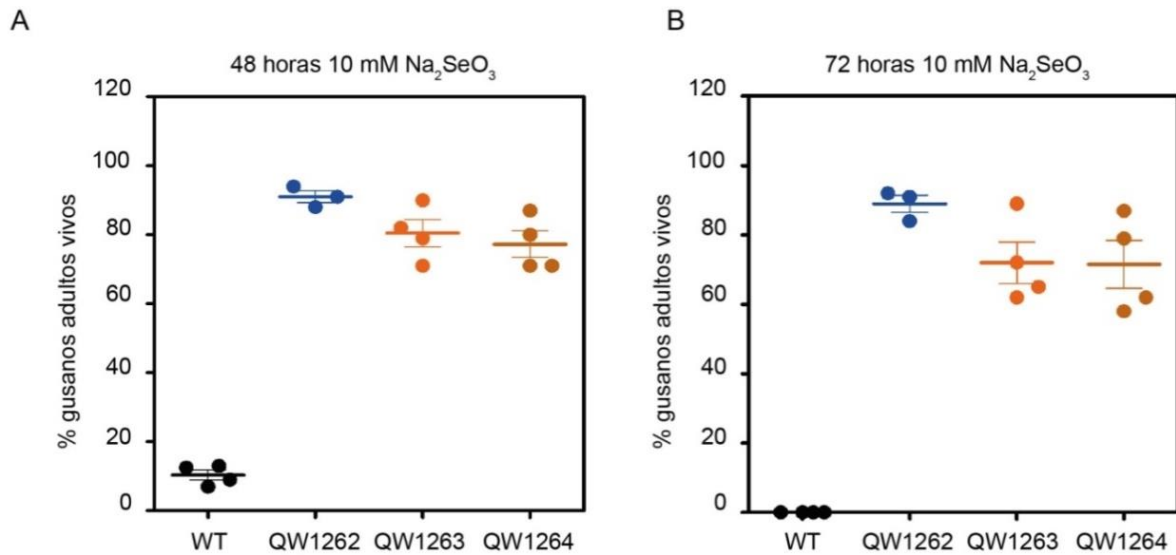


Figura 4.1. Supervivencia de las estirpes silvestre (WT) y mutantes QW1262, QW1263 y QW1264 en selenito de sodio a las 48 horas (A) y 72 horas (B). Los puntos indican promedio de gusanos adultos vivos después de 48 o 72 horas de incubación en 10 mM de selenito de sodio. La gráfica corresponde a 3 (QW1262) y 4 (WT, QW1263 y QW1264) ensayos con 2 placas cada uno por estirpe (50 gusanos por placa). Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

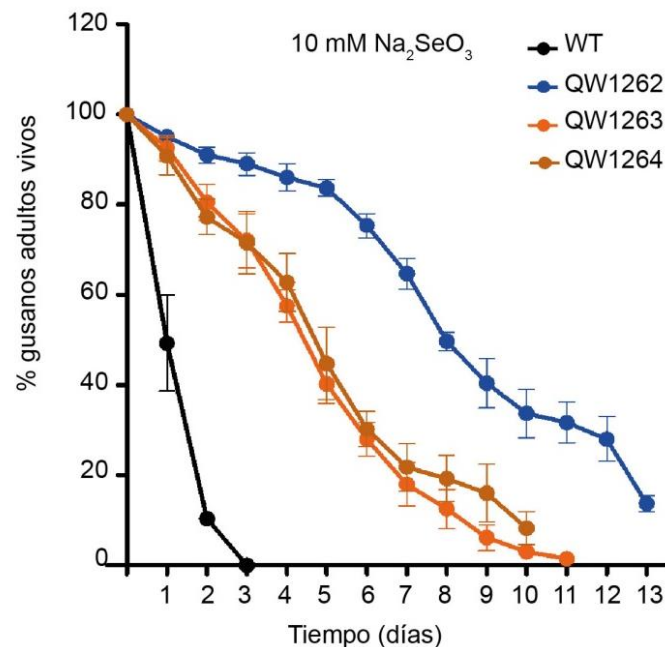


Figura 4.2: Longevidad de gusanos adultos en condiciones de selenio. Porcentaje de individuos vivos en condiciones de 10 mM de selenito de sodio de las estirpes silvestre (WT) y mutantes QW1262, QW1263 y QW1264. Los puntos indican promedio de gusanos adultos vivos y las barras de error corresponden al error estándar de la media. La gráfica corresponde a 3 (QW1262) y 4 (WT, QW1263 y QW1264) ensayos con 2 placas cada uno por estirpe (~50 gusanos por placa).

Adicionalmente se evaluó el desarrollo de las estirpes mutantes a partir de embriones en presencia de selenito. La **Fig. 4.3** muestra el desarrollo de las estirpes QW1263 y QW1264 en condiciones de 10 mM de selenito de sodio. Los embriones mutantes en presencia de selenito eclosionan y luego de 6 días algunos individuos alcanzan el estadio adulto. Cabe consignar que los embriones silvestres en estas condiciones no alcanzan a llegar al estadio de L4 y a las 72 horas están todos muertos. En los ensayos realizados para las estirpes QW1263 (3 ensayos) y QW1264 (2 ensayos) en condiciones de 10 mM de selenito de sodio (**Fig. 4.3**), los adultos alcanzados no fueron fértiles (no dejan descendencia). Sin embargo, en condiciones de 5 mM de selenito de sodio los adultos alcanzados a partir de huevos desarrollados en estas condiciones fueron fértiles y la descendencia fue viable (los embriones eclosionaron a larvas), a diferencia de la estirpe silvestre que embriones eclosionados en esta condición no alcanzan el estadio larvario L4. Cabe aclarar que en condiciones normales el desarrollo de las estirpes QW1263 y QW1264 no se diferenciaron del de la estirpe silvestre N2.

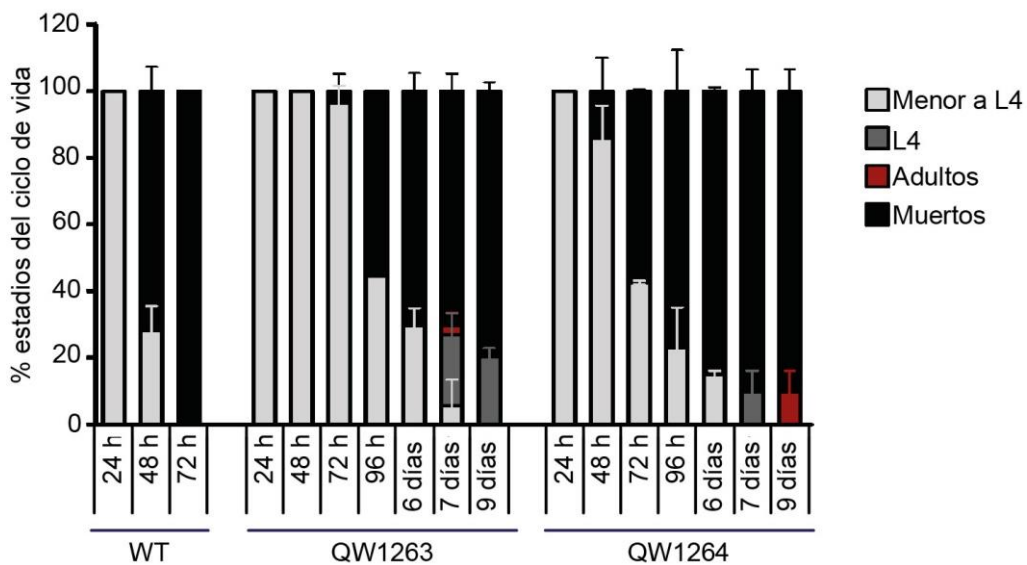


Figura 4.3: Desarrollo post-embrionario en condiciones de selenio. Proporción de individuos de cada estadio del ciclo de vida, a los diferentes días sucesivos en presencia de 10 mM de selenito de sodio. La gráfica corresponde a 1 experimento con 2 placas por estirpe (50-60 gusanos por placa). Los estadios se cuantificaron agrupando los individuos menores al estadio L4, en estadio L4, adultos y gusanos muertos. Para la estirpe QW1263 el experimento se realizó tres veces y para la estirpe QW1264 se realizó 2 veces, con resultados similares. Las barras de error corresponden a desviación estándar. WT: estirpe silvestre y QW1263 y QW1264: estirpes mutantes.

4.1.3 Caracterización genética inicial de los mutantes aislados

Modo de herencia

Para determinar el modo de herencia de las mutaciones, se realizaron cruces de los mutantes con la estirpe silvestre de referencia N2 y se analizó la progenie. En concreto los cruces realizados fueron: gusano hermafrodita mutante con gusano macho silvestre y sobre la F1 adulta se examinó el fenotipo en presencia de selenito de sodio.

Para los mutantes QW1263 y QW1264 se obtuvo como resultado que todos los machos y la mayoría de los hermafroditas de la generación F1 tenían un fenotipo silvestre (muertos luego de 72 horas en presencia de selenito) y una proporción de hermafroditas (entre 21 y 43%) con fenotipo mutante (vivos luego de 72 horas en presencia de selenito). Este resultado es consistente con una mutación recesiva autosómica, en donde la proporción de hermafroditas F1 de fenotipo mutante se puede explicar como resultado de la autofecundación del hermafrodita mutante parental. Para confirmar esta conclusión se analizó la generación F2.

Para el análisis de la F2, gusanos F1 hermafroditas se colocan en placas individuales para su autofecundación. Una vez alcanzada la F2, gusanos adultos se transfieren a placas con selenito de sodio y se cuantifica el número de muertos luego de 72 horas. En el caso de que un sólo gen esté involucrado y que la mutación sea recesiva, la autofecundación de un heterocigota F1 resultará en una generación F2 en la cual el 75% tiene fenotipo silvestre (no sobrevive en Se) y el 25% un fenotipo mutante (sobrevive en Se). Cuando se trata de una mutación dominante, las proporciones de fenotipo en la F2 son inversas (75% mutante y 25% silvestre).

Para los mutantes QW1263 y QW1264, la exposición a selenito de la generación F2 (producto de la F1 heterocigota) resultó en un porcentaje de gusanos mutantes entre 19 y 23% para QW1263 y entre 10 y 24% para QW1264. Este resultado es consistente con una mutación recesiva considerando que el fenotipo de resistencia a selenito de sodio a las 72 horas no es de un 100% de animales vivos. El detalle de los datos obtenidos se incluye en el **Anexo 4.1**.

Con los resultados obtenidos se concluyó que las mutaciones presentes en QW1263 y QW1264 son recesivas. Dado esto, se realizó un ensayo de complementación con el fin de determinar si la mutación responsable del fenotipo observado afecta el mismo *locus* en ambos mutantes. Se realizó el cruce de machos QW1263 con hermafroditas QW1264 y el cruce recíproco. El aislamiento de varios individuos de la F1 y el posterior análisis de la generación F2 resultó en que todos los aislados tenían entre 61 y 85% de gusanos resistente al selenito de sodio. Con estos resultados se puede concluir que QW1263 y QW1264 tienen el mismo *locus* afectado.

Para el caso del mutante QW1262, el fenotipo de la F1 obtenida del cruce de un hermafrodita mutante con un macho silvestre resultó en machos de fenotipo silvestre y un 26% de hermafroditas de fenotipo mutante, sin embargo el aislado de 6 y 10 hermafroditas F1 (en dos experimentos) y el posterior análisis de la generación F2 en presencia de selenito resultó para todos los casos en un porcentaje de gusanos de fenotipo mutante mayor al 36% (entre 36-87% en un experimento y entre 63-95% en el otro). Este resultado es, en principio, consistente con una mutación dominante. Además, el cruce recíproco (entre un macho QW1262 y un hermafrodita silvestre) no funcionó, es decir, el cruce resultó en una generación F1 sólo con hermafroditas. Esto puede tener diferentes explicaciones: i) los gusanos parentales no se están cruzando, ii) los embriones machos no son viables o iii) los machos mutantes parentales son estériles. El cruce se repitió tres veces, en condiciones que lo favorecen (gusanos jóvenes adultos, mayor cantidad de individuos machos que hermafroditas y una pequeña zona con bacteria en la placa que favorece el encuentro de gusanos) y el resultado se sostuvo igual. La posibilidad de que los machos mutantes sean estériles se descartó dado que el cruce entre machos y hermafroditas mutantes resulta en una progenie con un 50% de machos. Por último, con respecto a embriones no viables, no se examinó en detalle si todos los embriones en la placa eclosionaban o no. Usualmente cuando no hay machos producto de un cruce, se dice que el cruce no funcionó, pero podría suceder que exista un cruce exitoso y que sólo sea viable la progenie hermafrodita. Esto se podría analizar utilizando un reportero en la estirpe mutante, por ejemplo integrar al genoma mutante a la GFP y analizar la aparición del reportero en la progenie. El detalle de los datos obtenidos se incluye en el **Anexo 4.1**.

Este conjunto de resultados no es de interpretación sencilla; la condición de que el cruce de un macho mutante con un hermafrodita silvestre no sea exitoso o resulte en sólo progenie hermafrodita podría ser causa de la presencia de un rearrreglo cromosómico que afecte la dosis cromosómica de alguna proporción de la progenie. Dada la complejidad de este mutante *per se*, lo laborioso que se vuelve el curado de una estirpe con estas características y que contamos con otros dos mutantes adicionales, se resolvió no abordar la caracterización de este mutante en la tesis.

La **Tabla 4.1** resume los resultados obtenidos en la caracterización realizada.

Tabla 4.1. Resumen parcial de resultados obtenidos en la caracterización genética inicial de mutantes. ♀: indica hermafrodita, ♂: indica macho, WT: estirpe silvestre N2, QW1262, QW1263 y QW1264: mutantes resistentes a concentraciones tóxicas de selenio aislados en este trabajo. Paréntesis rectos indica fenotipo, el fenotipo mutante se refiere a resistencia en selenio.

Cruce	F1	F2	Conclusión
♀ QW1262 x ♂ WT	♀ y ♂	36-95% [mutante]	No determinado
♀ WT x ♂ QW1262	♀	No examinado	
♀ QW1263 x ♂ WT	♀ y ♂	~25% [mutante]	Mutación autosómica recesiva
♀ QW1264 x ♂ WT	♀ y ♂	~25% [mutante]	Mutación autosómica recesiva
♀ QW1263 x ♂ QW1264	♀ y ♂	~100% [mutante]	Alelos del mismo gen
♀ QW1264 x ♂ QW1263	♀ y ♂	~100% [mutante]	

Grupo de ligamiento

Con el objetivo de determinar el grupo de ligamiento y restringir la región del cromosoma en la que se encuentra la mutación de los mutantes QW1263 y QW1264, se realizó un mapeo mediante la técnica de *snip-SNP mapping*. En este procedimiento se comparan los diferentes polimorfismos entre la estirpe silvestre Bristol-N2 y la Hawaiana, según referencia[130]. El detalle de los datos obtenidos se expone en el **Anexo 4.2**.

Como resultado de este mapeo, se pudo identificar que la ubicación del gen afectado se restringe a la región entre las posiciones genéticas -5 y +6 del cromosoma V de *C. elegans*.

4.1.4 Mapeo de loci afectados en organismos resistentes a concentraciones tóxicas de selenito de sodio

Para la determinación del gen o genes afectados en las estirpes QW1263 y QW1264 se realizó la secuenciación del genoma de dichas estirpes. El análisis de los datos de secuenciación lo realizó la Dra. María Doitsidou según la referencia [135]. Como resultado se obtuvo que ambas estirpes poseen mutaciones distintas en el gen *egl-9*.

El gen *egl-9* codifica para una prolil hidroxilasa que actúa sobre el factor de transcripción HIF-1 (factor inducido por hipoxia), al cual regula negativamente[112]. La **Fig. 4.4** resume la reacción mediante la cual EGL-9 regula al factor de transcripción HIF-1.

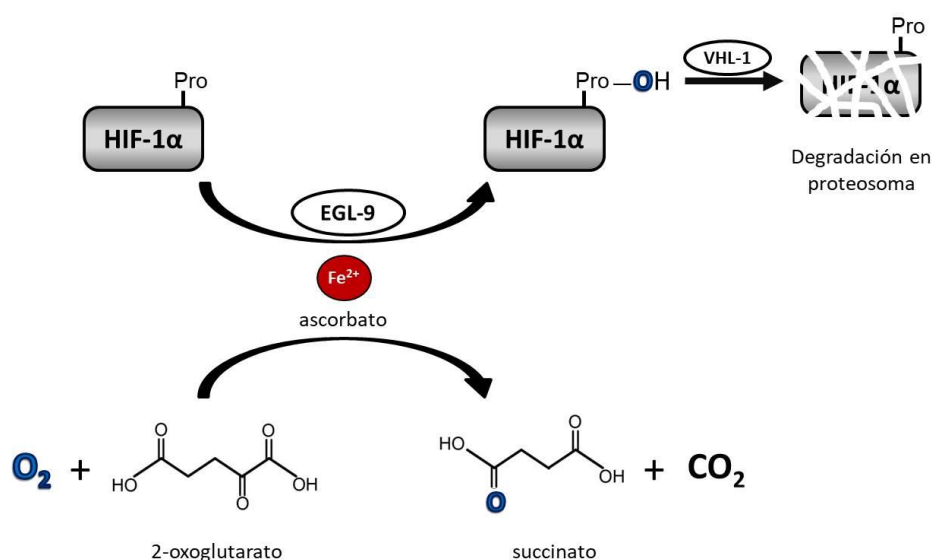


Fig. 4.4: Reacción de hidroxilación de HIF-1 catalizada por EGL-9. EGL-9 cataliza la prolil hidroxilación de HIF-1, utilizando como co-sustratos oxígeno y 2-oxoglutarato y como co-factores hierro (Fe²⁺) y ascorbato. Un oxígeno del sustrato dioxígeno es incorporado a la prolina de HIF-1 y el otro es incorporado en el succinato. HIF-1 hidroxilado es reconocido por la proteína VHL-1 y marcado para su degradación en el proteosoma. Tomado de referencia[174].

La estructura de EGL-9 contiene dos dominios principales, un dominio prolil hidroxilasa C-terminal y un dominio dedos de zinc tipo MYND (*myeloid, Nervy, and DEAF-1*) N-terminal (**Fig. 4.5 A**). La función del dominio MYND no está clara; en mamíferos PHD1 y PHD2 conservan este dominio y experimentos en células HeLa con PHD2 proponen a este dominio como responsable de modular la actividad hidroxilasa en algunos contextos. Mutantes *C. elegans* en este dominio no

presentan un cambio en los niveles de HIF-1 y sólo tiene un efecto marginal en la expresión génica de sus blancos[117].

La estirpe QW1263 (alelo *zf150*) posee una sustitución nucleotídica no sinónima (cAt→cCt: H→P) en la posición 1460 de la secuencia codificante del transcrito F22E12.4a (exón 8) afectando el codón 487. El residuo de histidina 487 forma parte del dominio hidroxilasa de la proteína EGL-9. Concretamente contribuye a la formación del bolsillo de unión a Fe(II) y participa en la coordinación del metal[112,117,136]. Mutantes en *egl-9* H487A, pierden la capacidad de hidroxilar a HIF-1 y por lo tanto la capacidad de desestabilizarlo y mutaciones del residuo análogo en la proteína PHD2 de mamífero (H313) también elimina la actividad hidroxilasa[117].

Por otro lado, la estirpe QW1264 (alelo *zf151*) posee una sustitución nucleotídica sin sentido (Caa→Taa: Q→stop) en la posición 685 de la secuencia codificante del transcrito F22E12.4a (exón 4) afectando el codón 229. Esta mutación introduce un codón de finalización de traducción prematuro, resultando en una proteína truncada.

Hay reportes de otros alelos de *egl-9* (*sa307*, *ia58*, *ia60*, *ia61 ok478* y *sa330*) que resultan en un fenotipo de HIF-1 estabilizada, resultando en mayor cantidad de proteína HIF-1 en condiciones de normoxia comparado con la estirpe silvestre. Esto indica que cada uno de los alelos mencionados tiene afectada la función involucrada en la degradación de HIF-1 dependiente de la hidroxilación[112,117]. Además, la expresión del gen *nhr-57* (gen blanco de HIF-1) en las estirpes mutantes *egl-9(ia58)*, *egl-9(ok478)*, *egl-9(sa307)* y *egl-9(ia61)* es mayor en comparación con la estirpe silvestre, demostrando que estos alelos tampoco son funcionales en su acción sobre la actividad transcripcional de HIF-1. Sin embargo, para los alelos *ia60* y *sa330* la sobreexpresión de *nhr-57* es menos pronunciada y se sugiere que las proteínas codificadas por *egl-9(ia60)* y *egl-9(sa330)* retienen cierta actividad represora de la actividad transcripcional de HIF-1[117]. La localización de estas mutaciones se expone en la **Fig. 4.5 B**. Los autores sugieren que para el caso del *egl-9(sa330)* las isoformas no afectadas por la mutación desempeñarían la función de represión de actividad, pero no profundizan en este punto así como tampoco en el caso del alelo *egl-9(ia60)*[117].

Por analogía con los datos reportados previamente, proponemos que los mutantes aislados en este trabajo, *egl-9(zf150)* y *egl-9(zf151)*, generan una protil hidroxilasa inactiva desde el punto de vista de la actividad enzimática. Dados los resultados, el análisis del mutante en *hif-1* se propone como el siguiente paso de estudio, el cual se describe en el siguiente apartado.

La **Fig. 4.5** representa los distintos transcritos descritos para el gen *egl-9* y la ubicación de las mutaciones presentes en las estirpes aisladas en este trabajo. También se incluyen otros alelos mutantes de *egl-9* que cuentan con estudios

demostrando el severo impacto en la función de degradación de HIF-1 a través de la vía EGL-9/VHL-1[117]. Además se esquematiza los dominios funcionales descritos para la proteína EGL-9 y su ubicación en la secuencia de ADN codificante.

Actualmente hay 8 transcritos de *egl-9* descritos (**Fig. 4.5 B**), si bien no se conocen detalles de expresión de todos ellos. Cabe notar que los alelos *zf150* y *zf151*, generados en este trabajo, no afectan a todos los transcritos alternativos de *egl-9*: *zf150* afecta 6 de los 8 transcritos alternativos y *zf151* afecta 7 de los 8 transcritos.

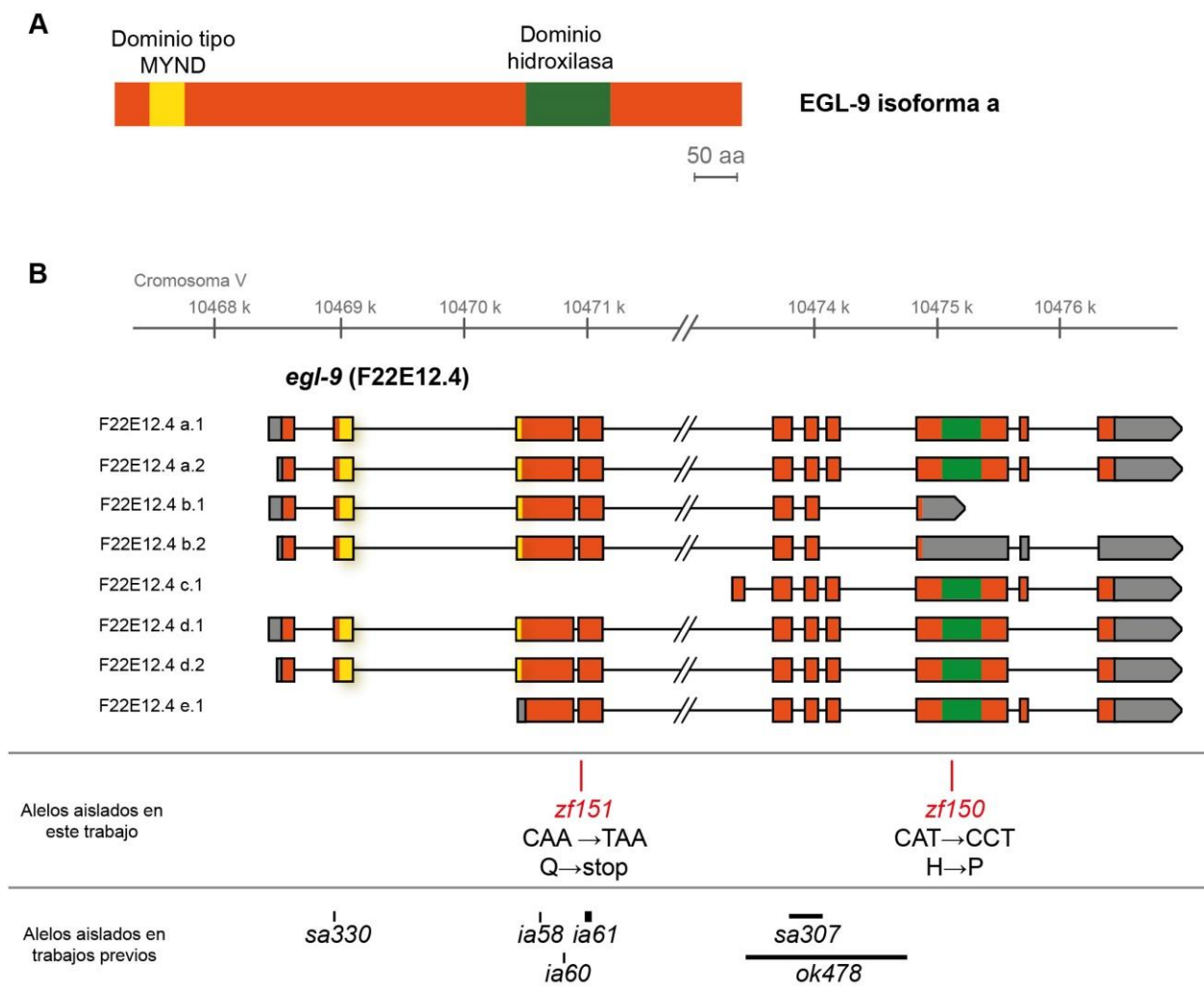


Fig. 4.5. Representación en A de los dominios proteicos de EGL-9 y en B los distintos transcritos posibles del gen *egl-9* en *C. elegans*, (F22E12.4a-e) indicando posición e identidad de alelos mutantes. A: Esquema de la estructura primaria de la proteína EGL-9 (isoforma a), indicando las regiones que constituyen los dominios hidroxilasa y MYND. aa: aminoácidos. **B:** La región codificante se representa en color anaranjado, las secuencias UTR en color gris y los intrones como líneas. En verde se indica la región que codifica para el dominio hidroxilasa y en amarillo para el dominio MYND, al igual que en A. Además se representa la localización y las modificaciones presentes en los alelos de *egl-9* de los mutantes aislados en el trabajo de tesis (alelos *zf150* y *zf151*) y la localización de algunos alelos mutantes reportados previamente: *sa330* (sustitución nucleotídica), *ia58* (delección 1 pb), *ia60* (inserción), *ia61* (duplicación de 5pb y sustitución nucleotídica), *sa307* (delección 243 pb), *ok478* (delección de 1225 pb e inserción de 6 pb).

4.2 Análisis de vía de señalización de HIF-1 en presencia de selenio

Dada la función de EGL-9 como regulador negativo de HIF-1, mutantes en *egl-9* acumulan la forma activa de HIF-1. A partir de esto, proponemos la hipótesis de que el fenotipo de resistencia al Se presente en los mutantes *egl-9* es consecuencia de la expresión de genes, bajo la regulación de HIF-1, involucrados en la detoxificación del Se. Por lo tanto se resolvió estudiar la vía de señalización de HIF-1 y su posible rol en respuesta a este elemento.

4.2.1 Cuantificación de fenotipo de resistencia al selenio utilizando el equipo *WMicrotracker*.

Para abordar el estudio de la vía de señalización de HIF, el análisis del fenotipo de resistencia al Se se cambió para un formato de ensayo en placa de 96 pocillos, utilizando el equipo *WMicrotracker ONE (Phylumtech)*. Este equipo cuantifica el movimiento de los gusanos en medio líquido durante el tiempo deseado (su funcionamiento está detallado en materiales y métodos, sección 2.1.21). El uso de este método otorga la ventaja de poder repetir el experimento con un alto número de gusanos, una cuantificación sistemática realizada por el equipo y sin necesidad de estar en contacto con las placas con Se durante mucho tiempo. El parámetro obtenido con el *WMicrotracker* es actividad locomotora y se refiere a la motilidad de una población de individuos lo cual puede traducirse en viabilidad de los mismos, gusanos muertos tienen actividad nula, aunque se requiere una examinación bajo la lupa confirmando la muerte. Además, como se mencionó en la introducción, a partir de determinada concentración de selenito, la movilidad de los gusanos comienza a verse comprometida, desencadenando parálisis y finalmente la muerte del organismo, por lo tanto realizar una cuantificación de la motilidad como índice de toxicidad de gusanos frente al Se es apropiada.

La **Fig. 4.6** muestra los resultados de un experimento representativo, utilizando el *WMicrotracker*, para la estirpe mutante *egl-9(zf151)* curada 5X (estirpe mutante retrocruzada 5 veces con la estirpe silvestre) y la estirpe silvestre N2. Se reporta las actividades locomotoras medidas cada 15 minutos durante 16 horas a 5 y 10 mM de selenito de sodio (**Fig. 4.6 A**) y la actividad a tiempo final normalizada con la actividad en el control sin selenito (**Fig. 4.6 B**). Se puede observar que la motilidad de la estirpe silvestre en presencia de selenito disminuye significativamente en comparación con la motilidad en el control sin selenito y de manera concentración y tiempo dependiente. En cambio, la estirpe mutante *egl-9(zf150)* no presenta una diferencia entre las actividades locomotoras en presencia de selenito y el control sin Se. Los resultados son similares para las estirpes mutantes *egl-9(zf151)* y *egl-9(sa307)*. La reproducción del fenotipo de resistencia en el mutante *egl-9(sa307)* apoya la propuesta de que HIF-1 resulta estabilizada en

los mutantes aislados en este trabajo y que la sobreexpresión de los genes blancos de HIF-1 sería responsable del fenotipo observado.

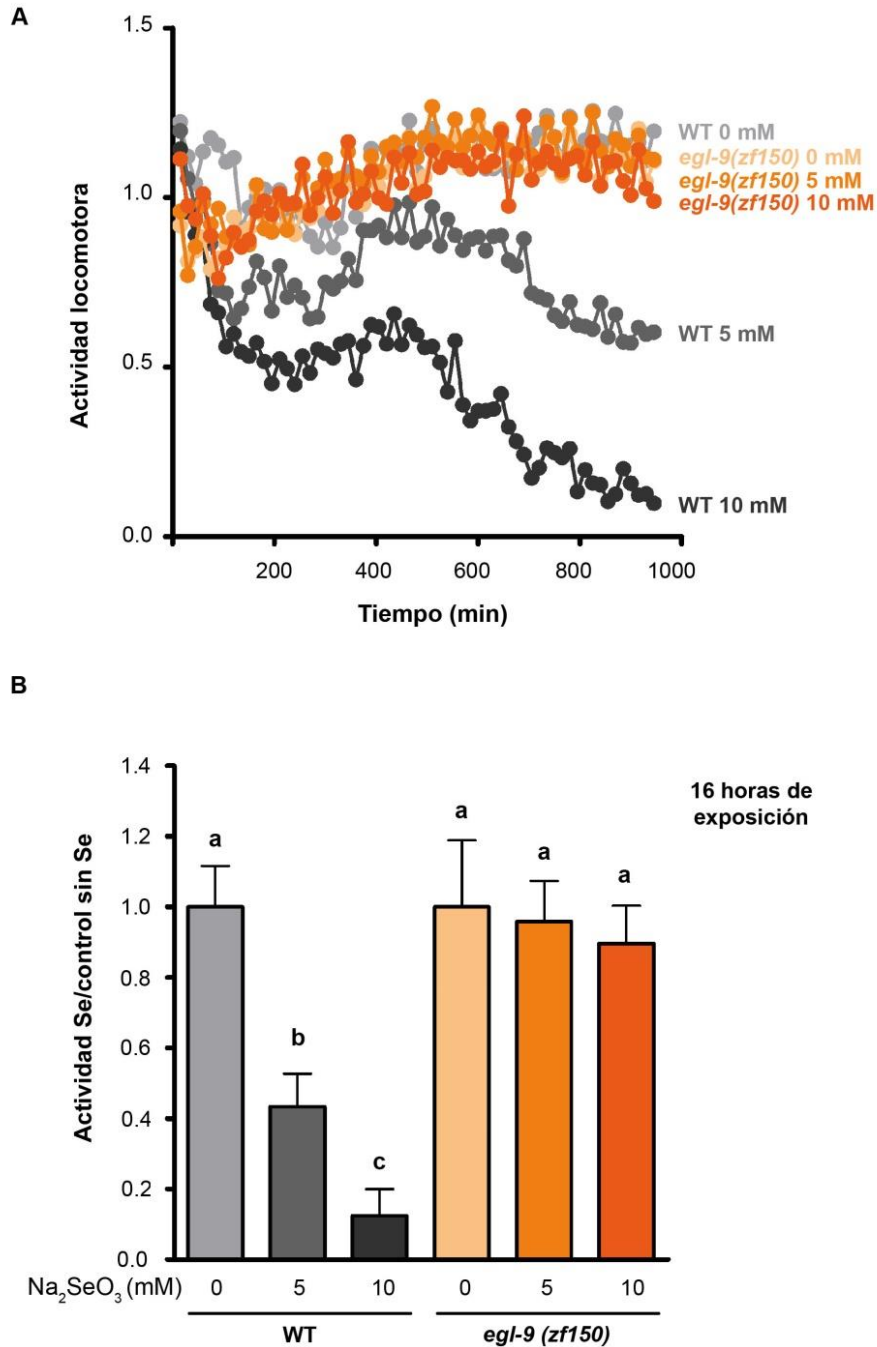


Fig. 4.6. Actividad de gusanos *egl-9(zf150)* durante 16 horas en presencia de 0, 5 y 10 mM de Na_2SeO_3 y actividad relativa Se/no Se en el tiempo final. En ambos casos el organismo silvestre (WT) se incluye como control. El parámetro actividad se refiere a la motilidad de una población de individuos. **A:** Los puntos indican el promedio de las actividades medidas cada 15 minutos durante 16 horas a las diferentes concentraciones de selenito de sodio (0, 5 y 10 mM). **B:** Las columnas indican promedio de actividad en selenito relativa al control sin selenito para cada estirpe. Las barras de error indican desviación estándar. Se realizó un ensayo de análisis de varianza (One-way ANOVA, $p=8.6\text{E}-12$) y posterior test de Tukey. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios. Cada gráfica corresponde a un ensayo representativo con 4 pocillos por condición por estirpe (80 gusanos por pocillo). Cuatro réplicas biológicas fueron realizadas con resultados similares.

El efecto sobre la motilidad de gusanos de la estirpe silvestre y mutante *egl-9(zf150)* también se estudió examinando un rango mayor de concentraciones de selenito de sodio. En la **Fig. 4.7** se muestra el resultado y a partir del ajuste de los datos experimentales a la ecuación de dosis-respuesta (ecuación presentada en materiales y métodos sección 2.1.22) se determinó el EC50 para la estirpe silvestre (6 ± 1 mM) en presencia de selenito de sodio durante 16 horas. Dado este resultado se utilizó entre 2-10 mM de selenito de sodio en los experimentos realizados con el resto de las estirpes examinadas.

Para poder calcular un EC50 para la estirpe mutante *egl-9(zf150)*, sería necesario tener datos a concentraciones mayores a las utilizadas o durante un tiempo de incubación mayor. De todos modos, cabe destacar que a 20 mM de selenito de sodio, cuando ya casi no hay organismos de la estirpe silvestre con actividad, la estirpe mutante aun presenta aproximadamente un 40% de actividad locomotora.

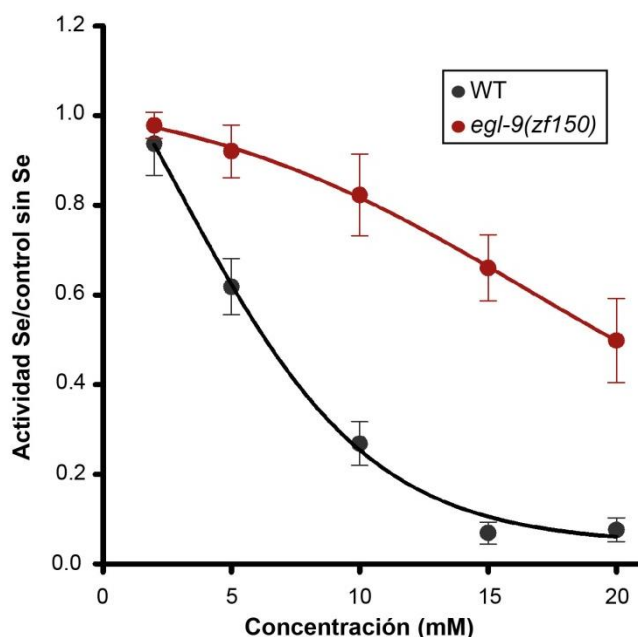


Fig. 4.7: Actividad de gusanos *egl-9(zf150)* y silvestre (WT) luego de 16 horas en presencia de 2, 5, 10, 15 y 20 mM Na_2SeO_3 . Los puntos indican promedio de actividad locomotora en selenito relativa al control sin selenito, para cada estirpe. La gráfica corresponde a 3 ensayos, cada uno con 4 pocillos por condición por estirpe (80 gusanos por pocillo), las barras de error corresponden al error estándar de la media. La línea representa el mejor ajuste a la ecuación de dosis-respuesta presentada en sección 3.1.21.2).

4.2.2 Determinación de participación de HIF-1, VHL-1 y SWAN-1 en respuesta al selenio.

Para determinar la participación de HIF-1 en el fenotipo de resistencia al Se, mutantes de delección en *hif-1* (*hif-1(ia4)*) fueron expuestos a condiciones de selenito tóxicas para la estirpe silvestre y se cuantificó la actividad locomotora durante 16 horas. Los mutantes en *hif-1* fueron hipersensibles al selenito de sodio (**Fig. 4.8**). A tiempo final, la motilidad de los gusanos *hif-1(ia4)* disminuye hasta aproximadamente cero en presencia de 5 mM de selenito de sodio mientras que en la estirpe silvestre aún se detecta aproximadamente un 30% de actividad (**Fig. 4.8 B**). Además se puede observar que esta caída en la actividad locomotora ocurre en menos tiempo de exposición al compuesto en la estirpe mutante en comparación con la estirpe silvestre tanto para 5 como 10 mM de selenito (**Fig. 4.8 A**).

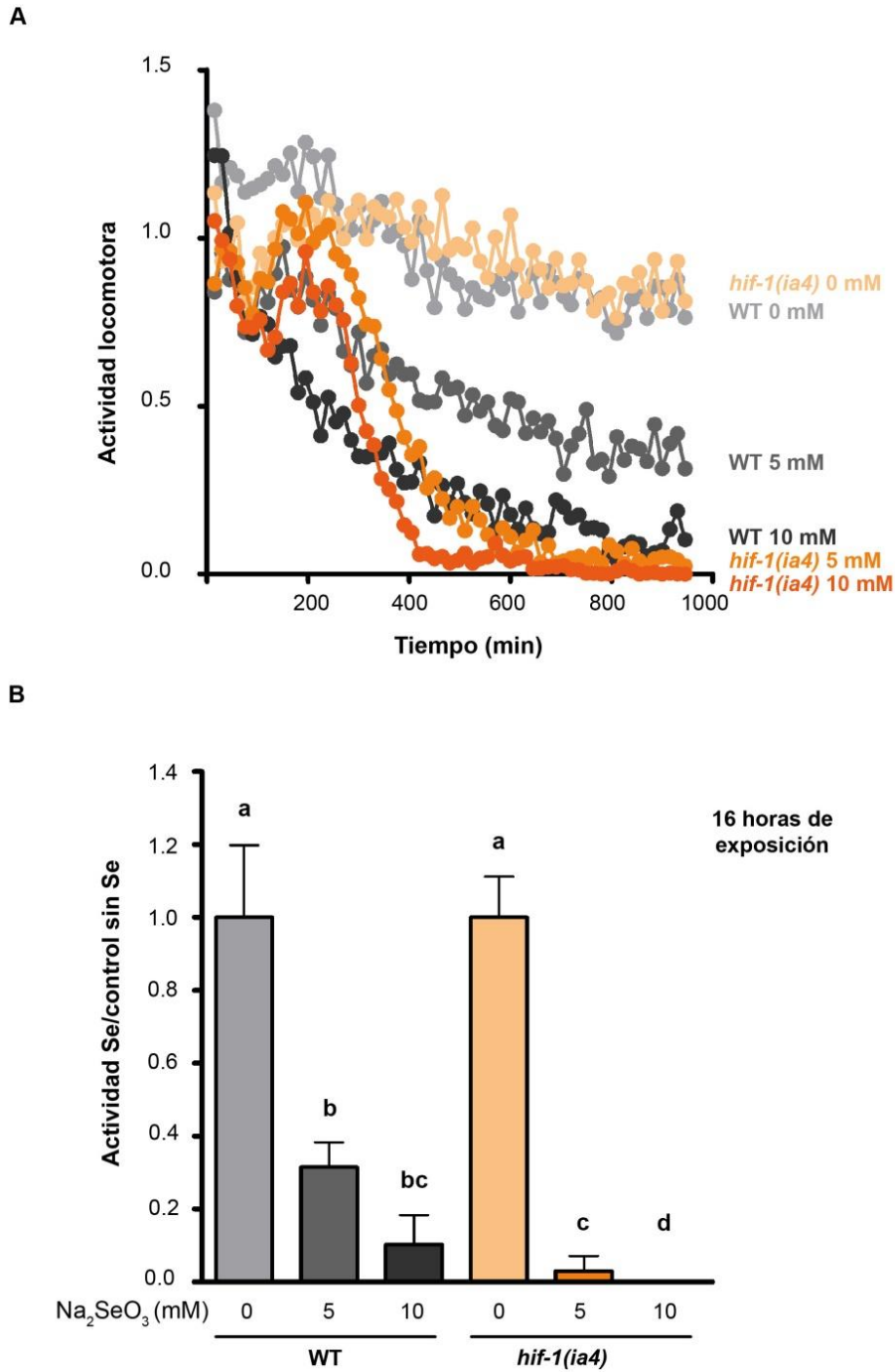


Fig. 4.8: Actividad de gusanos *hif-1(ia4)* durante 16 horas en presencia de 0, 5 y 10 mM Na₂SeO₃ y actividad relativa Se/no Se en el tiempo final. En ambos casos el organismo silvestre (WT) se incluye como control. El parámetro actividad se refiere a la motilidad de una población de individuos. **A:** Los puntos indican las actividades medidas cada 15 minutos durante 16 horas a las diferentes concentraciones de selenito de sodio, para cada estirpe. **B:** Las columnas indican promedio de actividad en selenito relativa al control sin selenito para cada estirpe. Las barras de error indican desviación estándar. Se realizó un ensayo de análisis de varianza (One-way ANOVA, $p=3.5E-9$) y posterior test de Tukey. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios. Cada gráfica corresponde a un ensayo representativo con 4 pocillos por condición por estirpe (80 gusanos por pocillo). Cuatro réplicas biológicas fueron realizadas con resultados similares.

Para confirmar este resultado, se expresó el alelo *hif-1* silvestre en el organismo mutante *hif-1(ia4)* y así determinar si el alelo silvestre es suficiente para rescatar el fenotipo hipersensible al selenito. Se generó el organismo transgénico *hif-1(ia4);Exhif-1::gfp* y sobre este organismo se evaluó si el fenotipo mutante revierte al silvestre. En efecto, el organismo transgénico en presencia de selenito recuperó el fenotipo observado en el organismo silvestre (**Fig. 4.9**).

Estos experimentos de toxicidad del Se se realizaron en placas de Petri con medio sólido y 30-40 gusanos por placa. El motivo por el cual se modificó el método de análisis se debe a que la estirpe transgénica tiene un arreglo extracromosomal y no todos los individuos poseen el transgen de interés, por lo tanto hay que seleccionar de a uno los gusanos transgénicos y transferirlos al medio con selenito. La manipulación de estirpes en las que todos los individuos son genotípicamente iguales se transfieren en buffer levantando con pipeta y estimando en número de gusanos. Para realizarlo en el *WMicrotracker* se necesita al menos 4 pocillos por condición por estirpe con 80 gusanos por pocillo, esto se hace un número muy grande para levantar de a uno a los gusanos.

En condiciones de 5 mM de selenito de sodio, se observó que ningún gusano de la estirpe mutante *hif-1(ia4)* sobrevivió luego de 20 horas, en tanto el porcentaje de gusanos vivos de la estirpe silvestre fue mayor al 80%. Consistente con el papel de HIF-1 en conferir resistencia a selenito, el porcentaje de gusanos vivos de la estirpe transgénica *hif-1(ia4);Exhif-1::gfp* fue similar al de la estirpe silvestre; sobrevivieron alrededor del 90% de gusanos luego de 20 horas en las mismas condiciones (**Fig. 4.9**). Estos resultados confirman la participación de HIF-1 en la respuesta al Se.

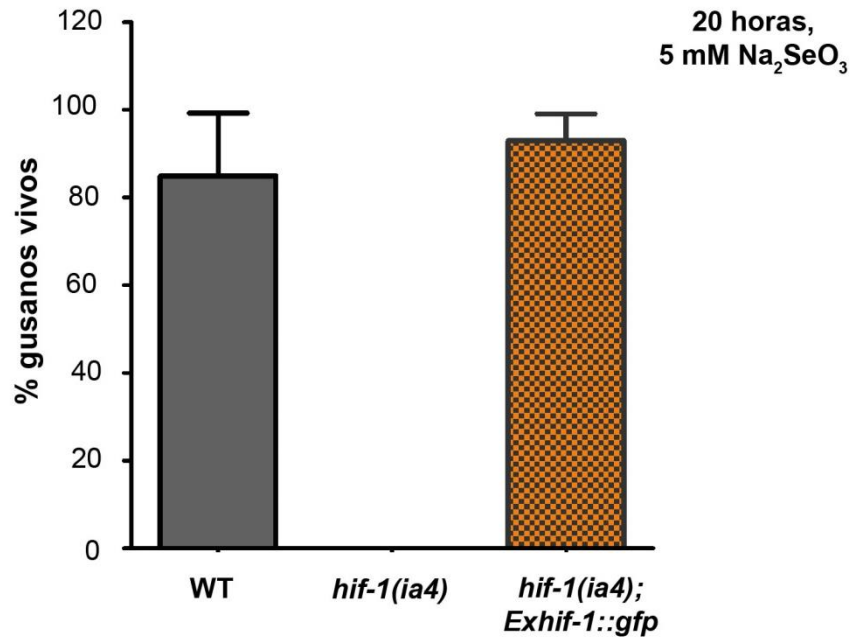


Figura 4.9: Supervivencia de las estirpes silvestre (WT), mutante *hif-1(ia4)* y transgénica *hif-1(ia4);Exhif-1::gfp* en presencia de 5 mM de selenito de sodio. Las columnas indican promedio de gusanos adultos vivos después de 20 horas de incubación en 5 mM de selenito de sodio. Las barras de error indican desviación estándar. La gráfica corresponde a 3 experimentos independientes con una placa por estirpe (30-40 gusanos por placa).

Como se describió en la introducción, se conocen dos mecanismos mediante el cual EGL-9 regula a HIF-1. El mejor comprendido involucra la hidroxilación de HIF-1 convirtiéndolo en un ligando de VHL-1 (*Hipel Lindau Tumor Supresor Protein*, componente del complejo E3 ubiquitina ligasa) y desencadenando la degradación de HIF-1 por el proteosoma[117,120]. Adicionalmente, existe una vía independiente de la actividad hidroxilasa que involucra a la proteína *scaffold* SWAN-1. Los detalles de esta vía de regulación no son totalmente comprendidos, pero se piensa que EGL-9 actúa sobre la actividad transcripcional de HIF-1[117].

Se analizó la respuesta al Se de los mutantes en los genes *vhl-1* y *swan-1*, involucrados en las vías de regulación que EGL-9 ejerce sobre HIF-1. Estos experimentos revelaron que el mutante en *vhl-1*, pero no el mutante en *swan-1*, es resistente a selenito 10 mM (**Fig. 4.10**) involucrando sólo a una de las vías en la regulación de HIF-1. Como se mencionó al inicio, están reportados mutantes en *egl-9* en los que se afecta la actividad hidroxilasa y retienen cierta capacidad de reprimir la actividad transcripcional del factor HIF-1. Mediante el resultado obtenido con la estirpe mutante en *swan-1*, se concluye que una posible actividad remanente de EGL-9 sobre la actividad transcripcional de HIF-1 no es relevante para el fenotipo observado.

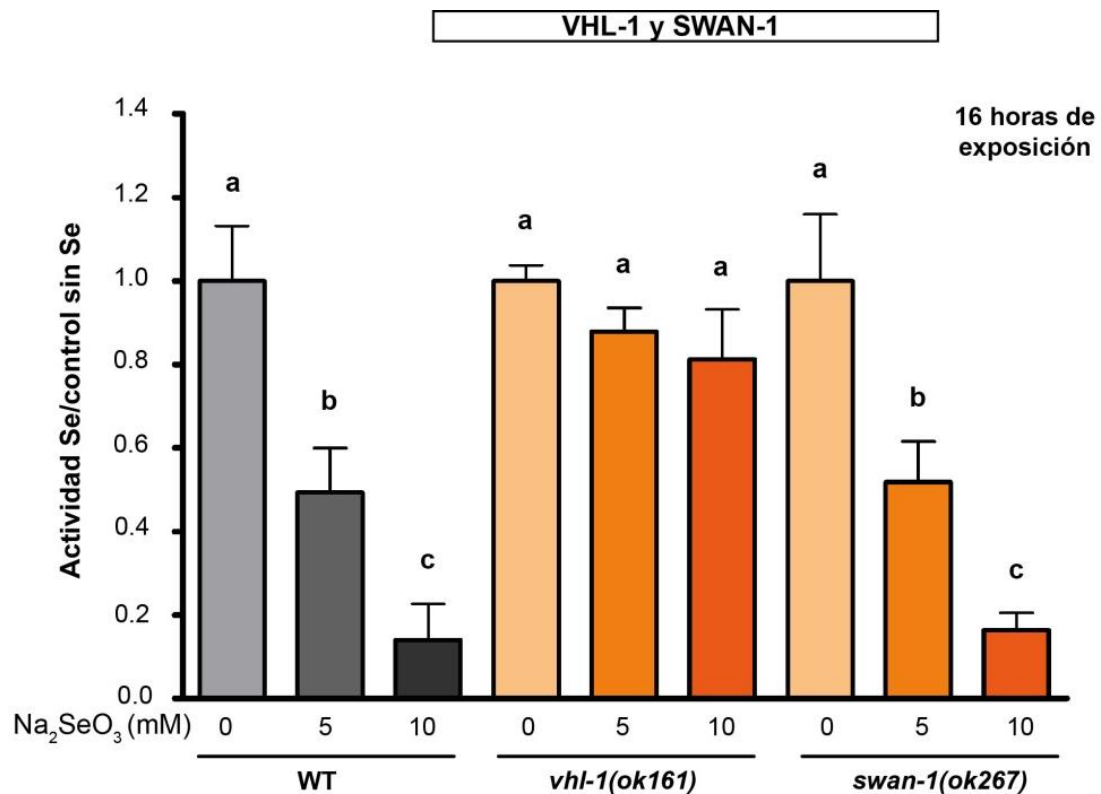


Fig. 4.10: Actividad relativa Se/no Se de gusanos *vhl-1(ok161)*, *swan-1(ok267)* y silvestre (WT) a las 16 horas en presencia de 0, 5 y 10 mM Na_2SeO_3 . El parámetro actividad se refiere a la motilidad de una población de individuos. Las columnas indican promedio de actividad en selenito relativa al control sin selenito para cada estirpe. Las barras de error indican desviación estándar. Se realizó un ensayo de análisis de varianza (Welch F test, $p=5.23\text{E}-11$) y posterior test de Tukey. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios. La gráfica corresponde a un ensayo representativo con 4 pocillos por condición por estirpe (80 gusanos por pocillo). Tres réplicas biológicas fueron realizadas con resultados similares.

Con el objetivo de confirmar el resultado obtenido con VHL-1, se generó el organismo transgénico *vhl-1(ok161);Exvhl-1::gfp* expresando el alelo silvestre de *vhl-1* en el organismo mutante *vhl-1(ok161)*. Esta estirpe transgénica en condiciones de 10 y 20 mM de selenito durante 20 horas de exposición se comportó igual al organismo mutante *vhl-1(ok161)* y por lo tanto más resistente que la estirpe silvestre. Sin embargo a las 48 horas hay una tendencia de la estirpe transgénica de ser más sensible al selenito que la estirpe *vhl-1(ok161)* (Fig. 4.11). Este resultado sugiere un rescate parcial del fenotipo mutante en la estirpe transgénica. Para realizar una conclusión robusta se requiere aumentar el número de réplicas. Asimismo, examinar el comportamiento en selenito de un alelo diferente de *vhl-1* sería otra forma de comprobar el resultado obtenido con el mutante de delección *vhl-1(ok161)*.

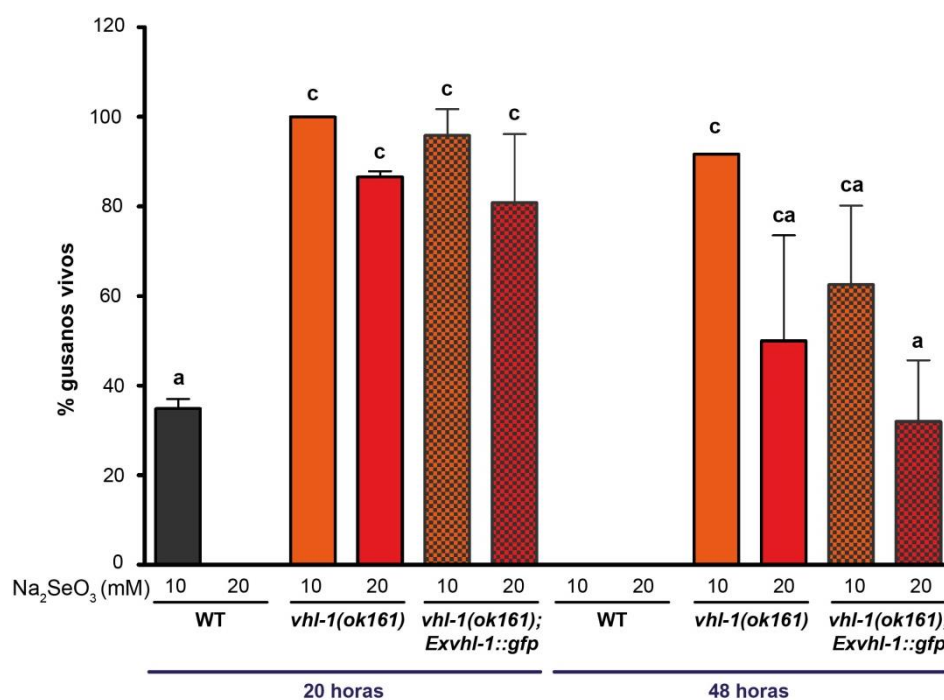


Figura 4.11: Supervivencia de las estirpes silvestre (WT), mutante *vhl-1(ok161)* y transgénica *vhl-1(ok161);Exvhl-1::gfp* en presencia de 10 y 20 mM de selenito de sodio a las 20 y 48 horas. Las columnas indican promedio de gusanos adultos vivos después de 20 y 48 horas de incubación en 10 y 20 mM de selenito de sodio. Las barras de error indican desviación estándar. Se realizó un ensayo de análisis de varianza (One-way ANOVA, $p < 0.05$) y posterior test de Tukey. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios. La gráfica corresponde a un experimento con dos placas por estirpe (20 gusanos por placa).

En conjunto, estos resultados confirman la participación de HIF-1 en la detoxificación de Se y que la inhibición de este factor de transcripción es debida a su hidroxilación por EGL-9 y posterior degradación en el proteosoma.

4.2.3 Determinación de CYSL-1 como regulador de EGL-9 en respuesta al selenio.

El factor de transcripción HIF-1, inicialmente asociado a la respuesta a condiciones de hipoxia, regula la expresión de genes involucrados en otras respuestas a estrés adicionales. En *C. elegans*, hay evidencia que describe que HIF-1 es esencial en la respuesta a ácido cianhídrico (HCN) y sulfuro de hidrógeno (H₂S)[119]. La exposición a concentraciones de H₂S no letales activa a HIF-1 y promueve la supervivencia de los animales durante dicha exposición. Esta activación de HIF-1 por H₂S involucra a la proteína CYSL-1 (cisteína sintasa *like*, miembro de la familia

de O-acetilserina(tiol)liasa)[124]. En *C. elegans* es parte de la vía de asimilación del HCN y la detoxificación de H₂S. Adicionalmente se propone a CYSL-1 como una proteína de transducción de señal que, en presencia de H₂S, se une directamente a EGL-9 impidiendo que EGL-9 inhiba a HIF-1[119,125](Fig. 4.12).

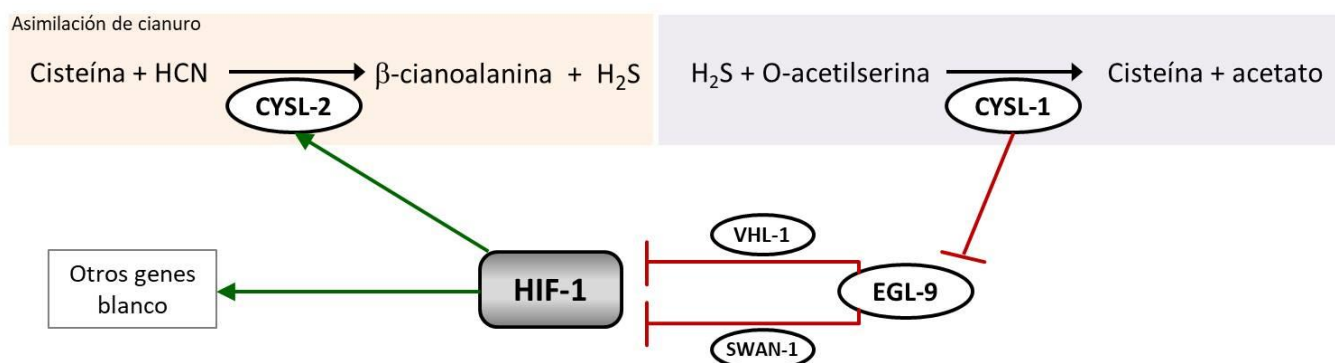


Fig. 4.12: (Fig. 1.25 parcial) Mecanismo propuesto para la activación de HIF-1 y consecuencias de la activación en las vías de asimilación de HCN. En presencia de HCN se activa la vía HIF-1. La asimilación de HCN produce H₂S. Además, en presencia de H₂S, ya sea producido del ambiente o endógenamente, CYSL-1 interacciona con EGL-9 y promueve la actividad de HIF-1. La actividad aumentada de HIF-1 induce la expresión de *cysl-2*, resultando en la eliminación HCN. Modificado de referencia [119].

En presencia de H₂S los gusanos silvestres sobreviven con una alta viabilidad a 50 ppm de H₂S, mientras que los mutantes de delección en *hif-1* no sobreviven a la exposición a 15 ppm de H₂S. Las estirpes mutantes en *egl-9* o *vhl-1*, en tanto, toleran concentraciones de H₂S letales para los gusanos silvestres (150 ppm)[118]. Estos resultados son muy similares a los obtenidos en esta tesis utilizando selenito.

Por otro lado, los gusanos mutantes en *egl-9* resistentes a selenito de sodio fueron examinados a concentraciones tóxicas de selenometionina (fuente orgánica de Se menos tóxica que el selenito[104]), y resultaron ser también resistentes a este compuesto (Fig. 4.13). El metabolismo de ambas especies de Se (selenito y selenometionina) se presume que converge en el selenuro de hidrógeno, un metabolito esencial para la síntesis de selenocisteína[32]. Dado esto, puede sugerirse que la vía involucrada en el fenotipo observado esté respondiendo al H₂Se, compuesto análogo al H₂S.

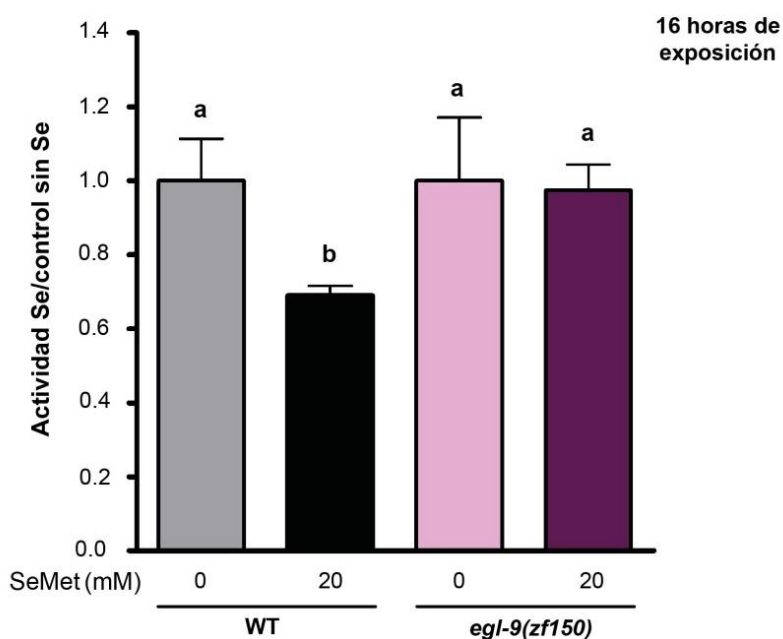


Fig. 4.13: Actividad relativa Se/no Se de gusanos *egl-9(zf150)* y silvestre (WT) a las 16 horas en presencia de 0 y 20 mM selenometionina (SeMet). El parámetro actividad se refiere a la motilidad de una población de individuos. Las columnas indican promedio de actividad en selenito relativa al control sin selenito para cada estirpe. Las barras de error indican desviación estándar. Se realizó un ensayo de análisis de varianza (One-way ANOVA, $p=0.0040$) y posterior test de Tukey. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios. La gráfica corresponde a un ensayo representativo con 4 pocillos por condición por estirpe (80 gusanos por pocillo). Tres réplicas biológicas fueron realizadas con resultados similares.

Con lo antes expuesto y dada la similitud de los átomos de azufre y Se, nos propusimos examinar si CYSL-1 es también importante en la respuesta al Se en *C. elegans*. Para esto se solicitó al CGC el mutante de delección en *cysl-1*, *cysl-1(ok762)*. Inicialmente realizamos controles con H_2S para verificar los resultados previamente reportados con esta molécula y la estirpe *cysl-1(ok762)* (Fig. 4.14 C). Luego se realizó el análisis de esta estirpe mutante frente a concentraciones tóxicas de selenito de sodio (Fig. 4.14 A). Estos experimentos revelaron que el mutante en *cysl-1* es más sensible al selenito que la estirpe silvestre y por lo tanto involucran a CYSL-1 en la respuesta al Se observada.

Para discriminar si la sensibilidad del mutante en *cysl-1* se debe a la interacción con EGL-9 o a la asimilación de H_2Se , se generó el doble mutante en *cysl-1* y *egl-9* (*cysl-1(ok762);egl-9(sa307)*).

En la exposición a selenito de la estirpe doble mutante *cysl-1;egl-9*, en contraste con la silvestre y mutante *cysl-1*, no hubo diferencias significativas entre la

actividad locomotora en presencia de selenito y el control sin compuesto (**Fig. 4.14 B**). La mutación con pérdida de función en *egl-9* suprime el fenotipo generado por la mutación con pérdida de función en *cysl-1*. Este resultado indica que CYSL-1 está “vía arriba” de HIF-1 y sugiere que, de forma análoga a lo propuesto con H₂S, CYSL-1 probablemente funcione como sensor de H₂Se; la presencia de Se promovería la interacción de CYSL-1 con EGL-9 y así la activación de HIF-1 independiente de hipoxia y finalmente la expresión de genes blancos de HIF-1.

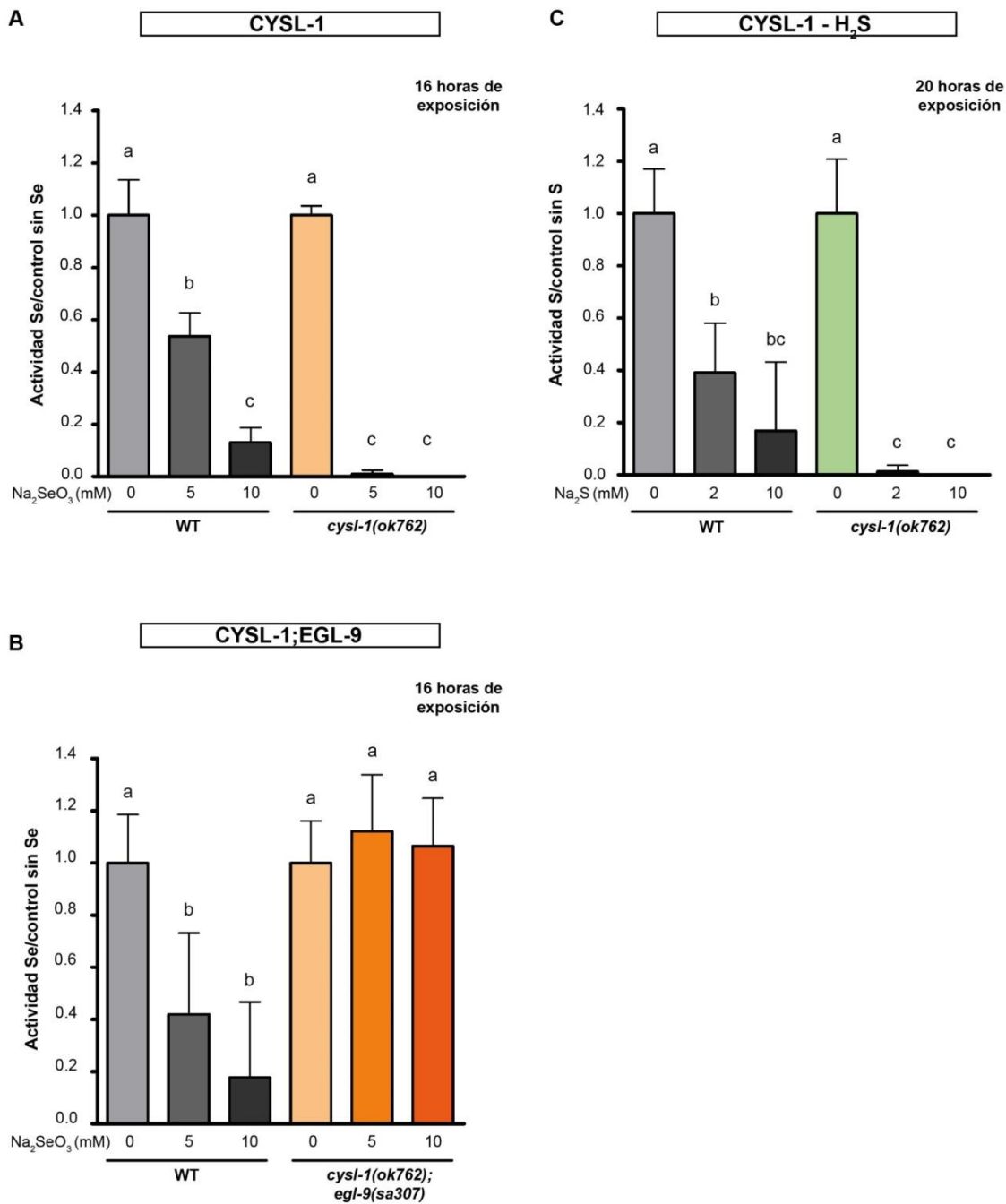


Fig. 4.14. A y B: Actividad relativa Se/no Se a las 16 horas de la estirpe silvestre (WT) y mutante *cysl-1(ok762)*(A) y el doble mutante *cysl-1(ok762);egl-9(sa307)*(B) en 0, 5 y 10 mM Na₂SeO₃. El parámetro actividad se refiere a la motilidad de una población de individuos. Las columnas indican promedio de actividad en selenio o azufre relativa al control sin el compuesto, para cada estirpe. Se realizó un ensayo de análisis de varianza (One-way ANOVA, $p=1.58E-14$ (A) y $p=4.91E-8$ (B)) y posterior test de Tukey. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios. Las gráficas corresponden a un ensayo representativo con 4 pocillos por condición por estirpe (80 gusanos por pocillo). Cinco réplicas biológicas para *cysl-1* y tres para *cysl-1(ok762);egl-9(sa307)* fueron realizadas obteniéndose resultados similares. C: Estirpe silvestre (WT) y *cysl-1(ok762)* en 0, 2 y 10 mM Na₂S Se realizó un ensayo de análisis de varianza (One-way ANOVA, $p=1.20E-06$) y posterior test de Tukey. La gráfica corresponde a un ensayo representativo con seis pocillos por condición por estirpe (80 gusanos por pocillo). Dos réplicas biológicas fueron realizadas con resultados similares.

Para confirmar el resultado obtenido con el mutante *cysl-1(ok762)* se generó el organismo transgénico *cysl-1(ok762);Ex cysl-1::gfp*, expresando el alelo silvestre de *cysl-1* en el organismo mutante. Esta estirpe transgénica en condiciones de selenito se comporta igual que el organismo mutante (**Fig. 4.15**), no recuperando el fenotipo silvestre. Dado que los gusanos de esta estirpe transgénica son organismos mosaico, sería necesario analizar nuevas líneas transgénicas, o generar una línea con el transgen integrado al genoma para descartar la posibilidad de que el alelo silvestre de *cysl-1* rescate el fenotipo mutante. Una alternativa para confirmar el resultado de CYSL-1 sería examinar la respuesta al Se de otros alelos mutantes. Adicionalmente podrían examinarse concentraciones menores de selenito que permitieran evidenciar un rescate parcial del fenotipo mutante.

También sería confirmatorio de los resultados que la expresión del alelo silvestre de *egl-9* en la estirpe doble mutante *cysl-1;egl-9* resulte hipersensible al selenito y por otro lado, la expresión del alelo silvestre *cysl-1* en el doble mutante resulte resistente a selenito. Las construcciones para la generación de dichos transgénicos ya fueron generadas, resta realizar la microinyección y posterior análisis de los organismos transgénicos.

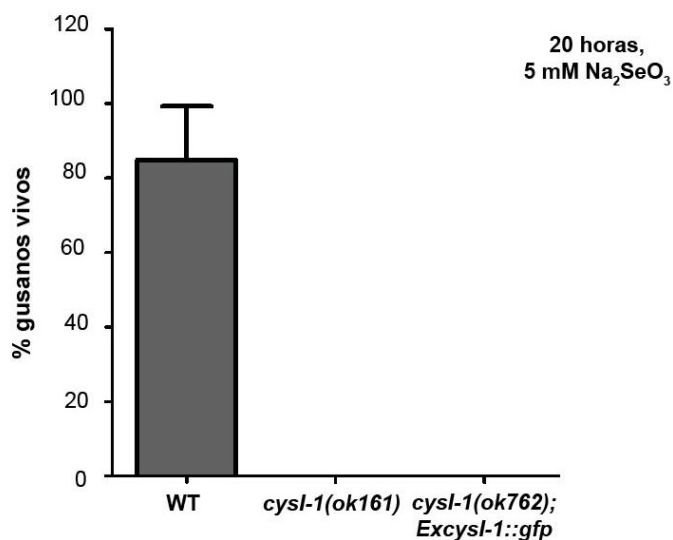


Figura 4.15: Supervivencia de las estirpes silvestre (WT), mutante *cysl-1(ok762)* y transgénica *cysl-1(ok762); Ex cysl-1::gfp* en presencia de 5 mM de selenito de sodio. Las columnas indican promedio de gusanos adultos vivos después de 20 horas de incubación en 5 mM de selenito de sodio. Las barras de error indican desviación estándar. La gráfica corresponde a 3 experimentos independientes con una placa por estirpe (30-40 gusanos por placa).

Adicionalmente, está descrito que en normoxia la proteína RHY-1 de *C. elegans* inhibe a HIF-1 independientemente de VHL-1. El mecanismo propuesto es que participe en la cascada CYSL-1/EGL-9/HIF-1. RHY-1 es una proteína del tipo aciltransferasa de retículo endoplasmático que regularía a la baja la abundancia de CYSL-1. Se propone que en condiciones de normoxia, RHY-1 promueve la acetilación N terminal de CYSL-1, una modificación que altera las proteínas cisteína sintasa de plantas, y así promovería la degradación de CYSL-1. En condiciones de hipoxia y en condiciones de H₂S (acumulado endógenamente o del ambiente local) RHY-1 dejaría de funcionar, quedando CYSL-1 disponible para su interacción con EGL-9[125].

Se solicitó el mutante de delección *rhy-1(ok1402)* y se examinó la respuesta al selenito. La actividad de los gusanos mutantes en *rhy-1* resultó igual a la estirpe silvestre (Fig. 4.16), reproduciendo el comportamiento en presencia de H₂S. Se concluye que *rhy-1* no estaría involucrado en la respuesta al selenito.

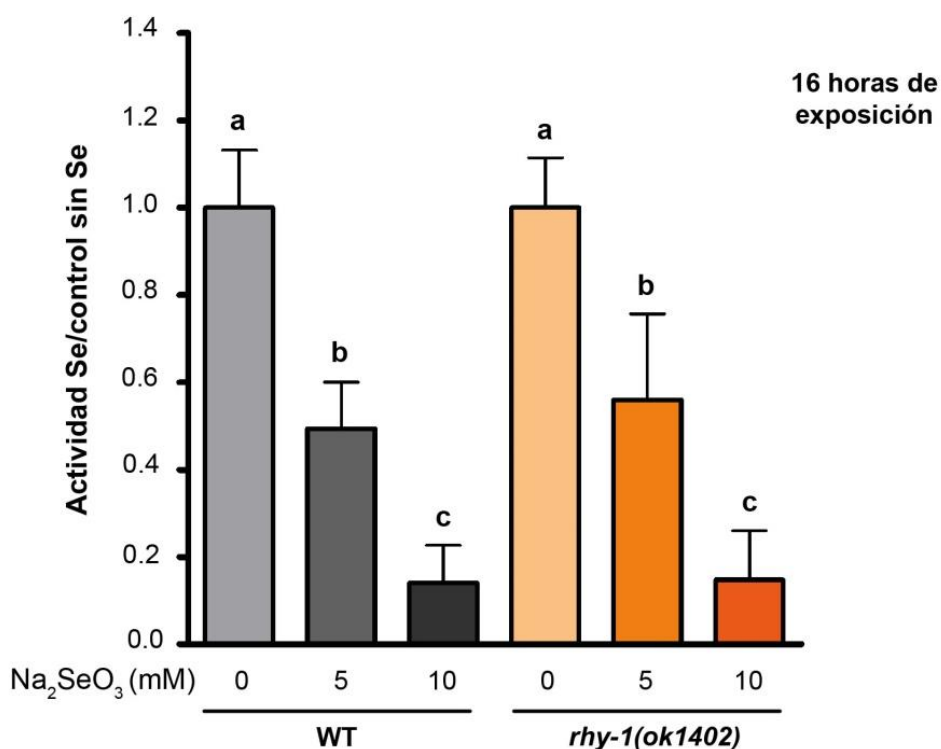


Fig. 4.16: Actividad relativa Se/no Se a las 16 horas de gusanos silvestre (WT) y *rhy-1(ok1402)* en 0, 5 y 10 mM Na₂SeO₃. El parámetro actividad se refiere a la motilidad de una población de individuos. Las columnas indican promedio de actividad en selenio relativa al control sin selenito para cada estirpe. Las barras de error indican desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con las estirpes correspondientes en condiciones sin selenito. Se realizó un ensayo de análisis de varianza (One-way ANOVA, $p=1.4E-9$) y posterior test de Tukey. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios. La gráfica corresponde a un ensayo con 4 pocillos por condición por estirpe (80 gusanos por pocillo).

4.2.4 Análisis de posibles efectores involucrados en la respuesta al selenio

Cascada de señalización CYSL-1/EGL-9/HIF-1 en respuesta a H₂S

La activación de HIF-1 en presencia de H₂S vía CYSL-1/EGL-9/HIF-1, induce cambios transcripcionales, algunos de los cuales son claves en la respuesta a H₂S. Está descrito que HIF-1 activa la transcripción de la sulfuro quinona reductasa (SQRD-1), enzima clave para la oxidación de H₂S[119]. Adicionalmente, *cysl-2*, uno de los parálogos de *cysl-1*, también es un blanco de HIF-1[125] y está demostrado que la enzima CYSL-2 (cianoalanina sintasa o CAS), es clave en la asimilación de HCN produciendo β-cianoalanina y H₂S[119]. Por otro lado, está reportado que el crecimiento de gusanos en concentraciones moderadas de H₂S confiere resistencia a la muerte por parálisis que causa la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* al producir HCN. Estos resultados han permitido proponer que el circuito CYSL-1→EGL-9→HIF-1→SQRD-1+CYSL-2 permite la detección de H₂S (vía CYSL-1) y la posterior eliminación de los metabolitos H₂S y HCN (a través de SQRD-1 y CYSL-2, respectivamente) y sugieren que la activación de HIF-1 independiente de hipoxia sería parte de la respuesta adaptativa a H₂S y HCN, producidos por bacterias patógenas [119].

Conociendo este modelo de regulación de la actividad de HIF-1 con H₂S, sumado a la similitud del Se y azufre y a que CYSL-1, EGL-9 y HIF-1 participan en la respuesta al Se, nos propusimos examinar si SQRD-1 y CYSL-2 son blancos importantes de HIF-1 en la respuesta al Se. Para esto se expusieron las estirpes mutantes de delección en *sqrd-1* y *cysl-2* en presencia de selenito de sodio. Como era esperado, la exposición de la estirpe *cysl-2(ok3516)* a selenito no tuvo un comportamiento diferente a la estirpe silvestre (**Fig. 4.22 A**). Dado la función descrita para CYSL-2, el cual utiliza HCN y cisteína para formar H₂S y β-cianoalanina, CYSL-2 no estaría involucrada en la respuesta al Se. En el supuesto caso de que la enzima SQRD-1 también oxidara el H₂Se, el resultado esperado sería que en condiciones de Se, la estirpe mutante fuese más sensible que la silvestre. La exposición de la estirpe mutante de delección *sqrd-1(tm3378)* no resultó en una sensibilidad al Se significativamente diferente a la estirpe silvestre; las diferentes cuatro réplicas del experimento dieron tendencias distintas (similar a la estirpe silvestre o levemente más resistente, por lo tanto la gráfica reportada es el promedio de los 4 experimentos y el error estándar de la media) (**Fig.4.18 A**). Como control se expuso la estirpe mutante *sqrd-1(tm3378)* en condiciones de H₂S y el resultado fue claramente el reportado anteriormente, más sensible que la silvestre (**Fig. 4.18 C**). Dado estos resultados, la respuesta al selenito no estaría mediada por SQRD-1.

C. elegans presenta un parálogo de *sqrd-1*, *sqrd-2*. Este gen ha sido propuesto como pseudogen, si bien no hay evidencia que lo confirme. Se examinó el mutante de delección *sqrd-2(ok3516)* con selenito y no se observaron diferencias con la estirpe silvestre (**Fig. 4.18 B**).

De cualquier manera, cabe consignar que sería importante reproducir estrictamente la situación análoga al H₂S utilizando H₂Se con las estirpes mutantes en *sqrd*. Con los resultados obtenidos hasta ahora, se descarta a la familia SQRD como posibles proteínas involucradas en la detoxificación de selenito.

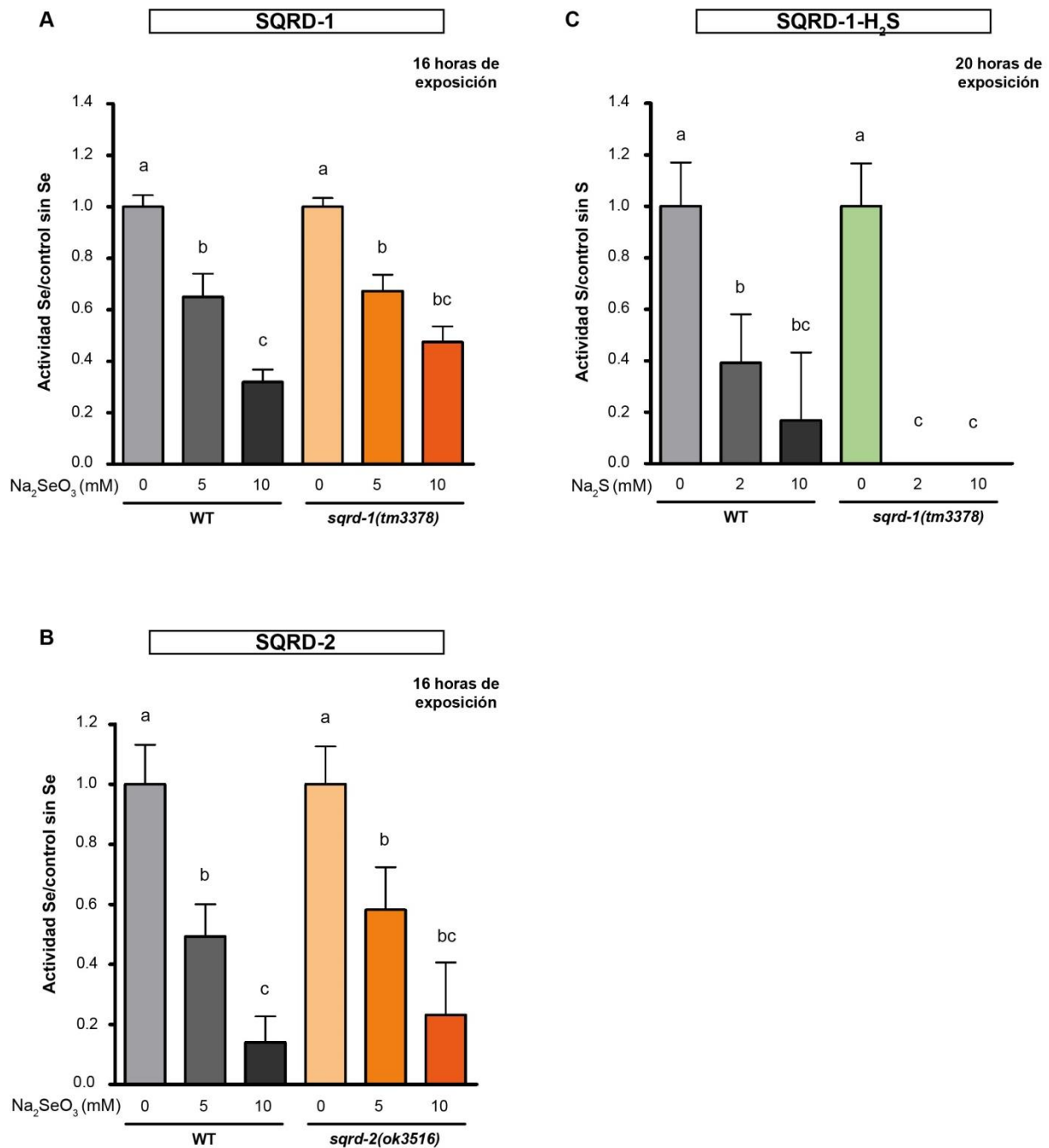


Fig. 4.18: A y B: Actividad relativa Se/no Se a las 16 horas de la estirpe silvestre (WT) y mutante *sqrd-1(tm3378)*(A) y *sqrd-2(ok3516)*(B) en 0, 5 y 10 mM Na₂SeO₃. El parámetro actividad se refiere a la motilidad de una población de individuos. Las columnas indican promedio de actividad en selenio relativa al control sin compuesto, para cada estirpe. Se realizó un ensayo de análisis de varianza (One-way ANOVA, $p=2.58E-15$ (A), $p=3.09E-9$ (B)) y posterior test de Tukey. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios. La gráfica corresponde a un ensayo representativo con 6 pocillos por condición por estirpe (80 gusanos por pocillo). Cuatro réplicas biológicas para *sqrd-1* y dos para *sqrd-2* fueron realizadas obteniéndose resultados similares. **C: Actividad relativa S/no S a las 20 horas de la estirpe silvestre y mutante *sqrd-1(tm3378)* en 0, 2 y 10 mM Na₂S.** Se realizó un ensayo de análisis de varianza (One-way ANOVA, $p=1.08E-6$) y posterior test de Tukey. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios. La gráfica corresponde a un ensayo representativo con 6 pocillos por condición por estirpe (80 gusanos por pocillo).

La vía de oxidación del H₂S que se inicia con SQRD-1 involucra otras tres enzimas: persulfuro dioxigenasa (PDO o ETHE-1), tiosulfato azufre transferasa (TST) y sulfito oxidasa (SUOX)[137] (Fig. 4.19).

En la vía de oxidación del H₂S mitocondrial, la primera enzima es la SQRD. Esta enzima oxida al H₂S y transfiere los electrones a la ubiquinona y al azufre, como sulfano, a una molécula aceptor. La identidad del aceptor del sulfano en condiciones fisiológicas aún está en discusión. Dependiendo de si el aceptor es el glutatión (GSH) o el sulfito (SO₃²⁻) se formarán los productos glutatión persulfuro (GSSH) (Propuesta A, Fig. 4.19) o tiosulfato (S₂O₃²⁻) (Propuesta B, Fig. 4.19). El GSSH producido puede ser utilizado por la enzima ETHE-1 (formando SO₃²⁻ y GSH) o por la TST (formando S₂O₃²⁻ y GSH). En cambio, el tiosulfato producido puede ser usado por la TST, formando GSSH y este último ser utilizado por la ETHE-1. Eventualmente el SO₃²⁻ es utilizado por la SUOX generando sulfato (SO₄²⁻)[123] (Fig. 4.19).

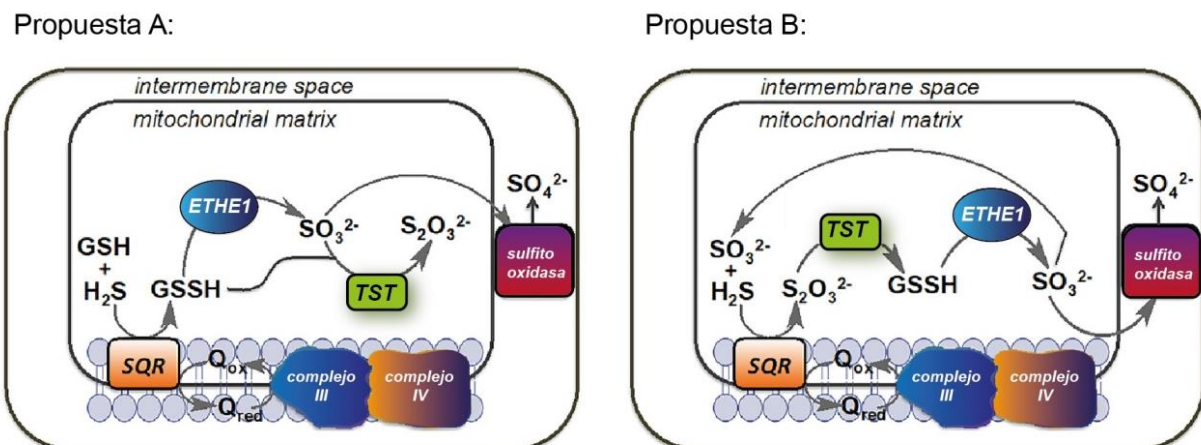


Fig. 4.19: Vía de oxidación de H₂S. La enzima sulfuro quinona reductasa (SQR) oxida al H₂S y transfiere los electrones a la ubiquinona. El azufre, como sulfano, es transferido a una molécula aceptor. En la propuesta A, el glutatión (GSH) es la molécula que acepta al sulfano y en la propuesta B es el sulfito (SO₃²⁻). TST: tiosulfato azufre transferasa, ETHE1: persulfuro dioxigenasa. Tomado de referencia [123].

El genoma de *C. elegans* codifica para los homólogos ETHE1 y SUOX humana y se corresponden con los genes *ethe-1* y *suox-1*. El homólogo de la TST humana con mayor identidad en *C. elegans* es la MPST-7 (mercaptopiruvato azufre transferasa 7). *C. elegans* posee 7 homólogos de la MPST (*mpst-1-7*).

Tanto la enzima SUOX como la TST son candidatos interesantes, ya que el selenito, especie química con la que se hizo el *screening*, es el análogo con Se del sulfito. Por otra parte la ETHE1 y también TST son relevantes dado que distintas vías pueden formar productos con enlaces selenosulfuro, como por ejemplo la formación de

selenoglutación y selenodiglutación[104], y de manera análoga a lo que ocurre con el azufre estas enzimas podrían catalizar su conversión a otras especies químicas.

Se obtuvieron de las estirpes disponibles, mutantes de delección en los genes *ethe-1* y *mpst-7*, las cuales fueron analizadas en presencia de selenito. Para el caso de ETHE-1, el mutante de delección *ethe-1(tm4101)* en la condición de 5 mM no resultó en una sensibilidad al selenito significativamente diferente a la de la estirpe silvestre. Sin embargo en presencia de 10 mM se puede observar una mayor resistencia al Se que la silvestre (**Fig. 4.20 A**). Esta tendencia se mostró en los dos experimentos realizados. Este resultado es opuesto al descrito con H₂S, en el cual la estirpe *ethe-1(tm4101)* no sobrevive a la exposición a 50 ppm de H₂S, condición tolerada por el silvestre[119].

Por otro lado, está descrito a los complejos de Se con glutatión como formas del Se que son excretadas de la célula. Si la enzima ETHE-1 utilizara como sustrato al selenoglutación, en el mutante se acumularía y podría ser excretado de las células, en este sentido podría ser que la ausencia de esta enzima resulte en un organismo más resistente a concentraciones más altas de Se. Asimismo, la acumulación de este compuesto podría ejercer algún rol indirecto (regulador) que resultase en el fenotipo observado. Adicionalmente, ver qué ocurriría con la estirpe mutante frente a la especie química selenoglutación o selenodiglutación podría aportar pistas adicionales. Cabe consignar que no se ha descrito que esta reacción sea reversible.

Con respecto a la exposición a selenito del mutante de delección *mpst-7(gk514674)* se observa que es más sensible que la estirpe silvestre (**Fig. 4.20 B**). La enzima TST, cataliza preferencialmente la formación de tiosulfato utilizando sulfito y glutatión persulfuro ($\text{SO}_3^{2-} + \text{GSSH} \rightarrow \text{GSH} + \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$)[123]. Si esta enzima catalizara las reacciones análogas con el Se, podría pensarse que el tioselenato es menos tóxico que el selenito.

El conjunto de los resultados obtenidos con los mutantes en *ethe-1* y *mpst-7* son consistentes con la idea de que la especie selenito sería la más tóxica de esta vía. Sería informativo analizar el comportamiento de estos mutantes frente a otras especies del Se y de un organismo doble mutante en estos genes.

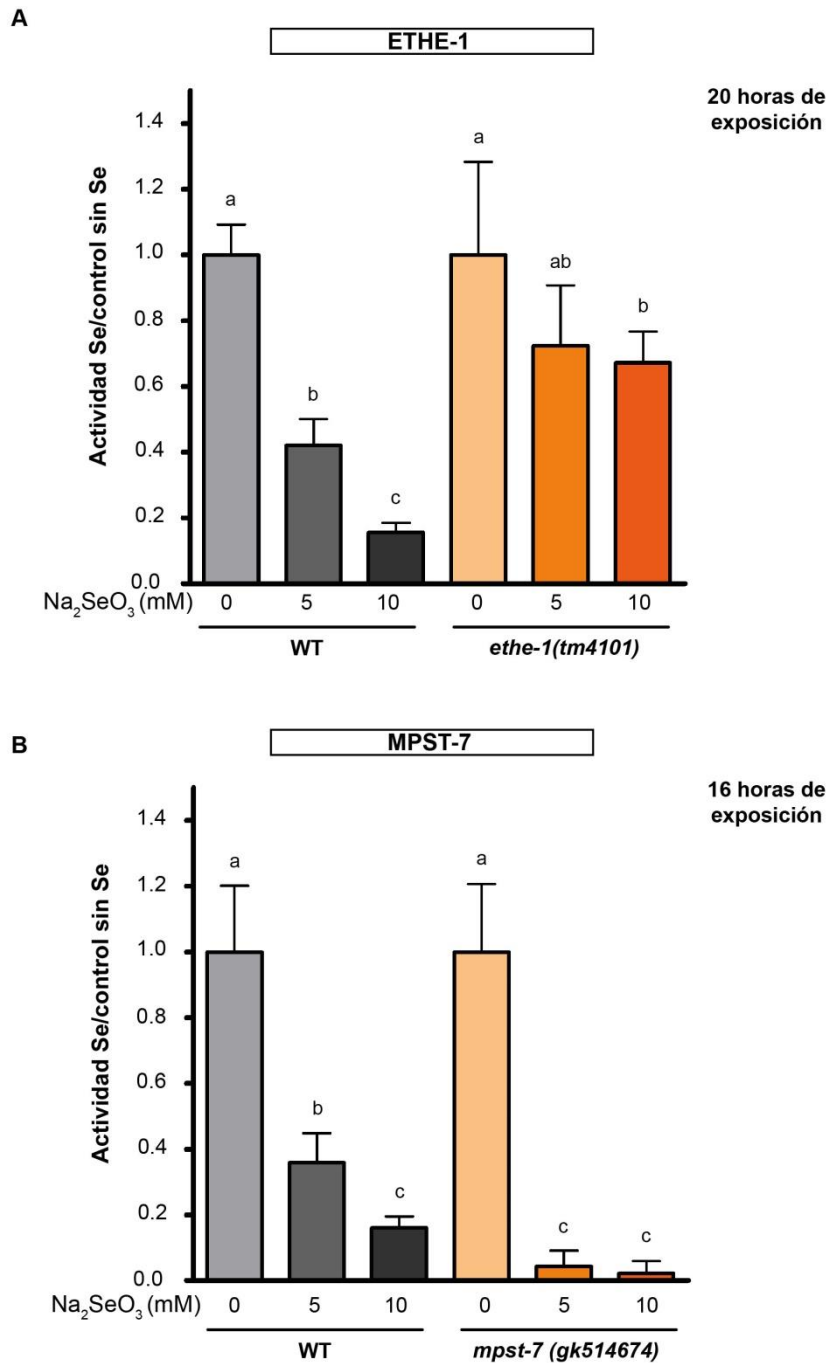


Fig. 4.20: Actividad relativa Se/no Se a tiempo final de gusanos silvestre (WT) y *ethe-1(tm4101)* (A) y *mpst-7(gk14674)* (B) en 0, 5 y 10 mM Na₂SeO₃. El parámetro actividad se refiere a la motilidad de una población de individuos. Las columnas indican promedio de actividad en selenito relativa al control sin selenito para cada estirpe. Las barras de error indican desviación estándar. Se realizó un ensayo de análisis de varianza (One-way ANOVA, $p=1.32E-10$ (A) y $p=1.19E-7$ (B)) y posterior test de Tukey. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios. Las gráficas corresponden a un ensayo con 4 pocillos por condición por estirpe (80 gusanos por pocillo). Se realizaron dos réplicas biológicas con resultados similares.

El gen *suox-1* es esencial y no se dispone de mutantes, por lo tanto se realizaron ensayos de ARN de interferencia (ARNi) interfiriendo la expresión del gen *suox-1* en la estirpe silvestre.

Los ensayos de ARNi se realizaron mediante la alimentación de los gusanos con bacterias que expresan el ARN doble hebra (ARNdh) de la secuencia que se desea silenciar. Estas bacterias que son utilizadas para el silenciamiento de genes poseen el gen de interés clonados en el plásmido pL4440. Como control negativo de la técnica se utilizan bacterias transformadas con el mismo vector sin inserto (vacío). La alimentación de los gusanos de la estirpe silvestre con la clona de interferencia o con el control se realizó durante cuatro generaciones.

Los gusanos adultos interferidos en el gen de interés fueron expuestos en medio sólido con 2 mM de selenito de sodio y cuantificado el número de gusanos vivos luego de 20 horas. No se observaron diferencias en la supervivencia entre la estirpe interferida y el control negativo. Adicionalmente, como control del éxito de la interferencia de la expresión génica de *suox-1*, se realizó la exposición de los gusanos interferidos a placas con sulfito de sodio 0.5 mM y resultaron significativamente más sensibles que el control (**Fig. 4.21**).

Por lo tanto, los resultados obtenidos descartan no sólo a SQRD-1, sino también a SUOX-1 como enzimas involucradas en la detoxificación de Se. En cambio, las enzimas ETHE-1 y MPST-7 podrían estar vinculadas con el metabolismo del Se. Para confirmarlo, además de repetir los experimentos ya realizados, podría examinarse la respuesta de las estirpes mutantes a otras especies químicas. Para el caso de MPST-1, esta descrita el análisis de la actividad enzimática *in vitro* utilizando lisado de gusanos[138]. Eventualmente podría examinarse el caso de MPST-7.

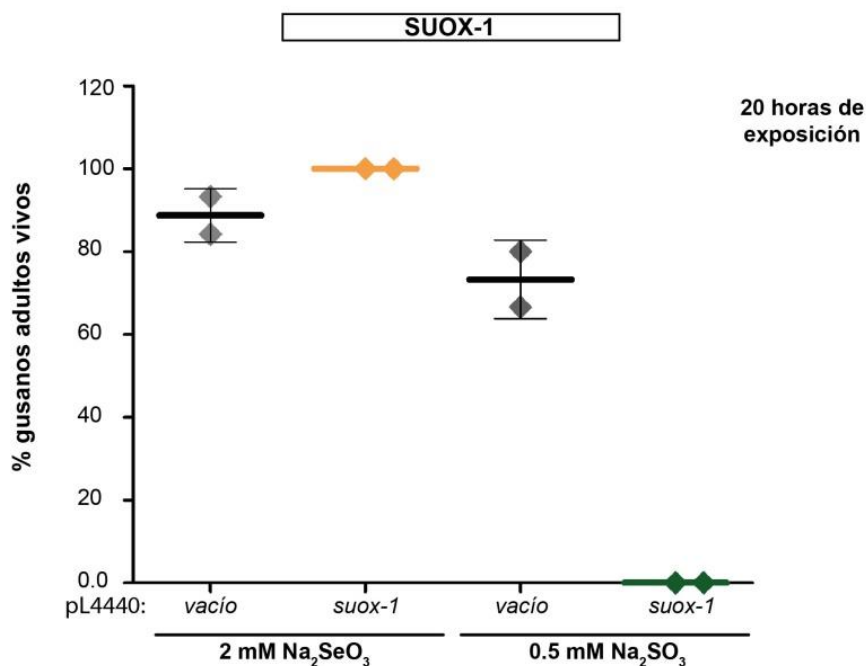


Figura 4.21: Supervivencia de gusanos de la estirpe silvestre con la expresión del gen *suox-1* interferida (*suox-1*) y el control negativo (*vacío*). Los puntos indican porcentaje de gusanos adultos vivos después de 20 horas en presencia de 2 mM de selenito de sodio (Na₂SeO₃) y 0.5 mM de sulfito de sodio (Na₂SO₃). La gráfica corresponde a 2 ensayos con una placa cada uno (30-40 gusanos por placa). Las barras de error corresponden a desviación estándar.

Por otro lado, la familia génica *cysl* (genes que codifican proteínas miembros de la familia OAS-TL) en *C. elegans* posee 4 integrantes[124], los ya mencionados CYSL-1 y CYSL-2 y dos más (CYSL-3 y CYSL-4). Se ha propuesto que *cysl-4* sería un pseudogen[124]. Experimentos *in vitro* sugieren que CYSL-3 podría detoxificar H₂S y S-sulfocisteína. Este mismo grupo propone la hipótesis de que CYSL-3 haya adquirido una nueva función que no ha sido asignada a las proteínas OAS-TL. La secuencia aminoacídica revela una variación en el bucle de unión a sustrato, CYSL-3 posee una leucina, mientras que CYSL-2, CYSL-1 y otros miembros de las enzimas OASS y CAS de plantas contienen una treonina o metionina. Dado que este residuo de leucina sólo está presente en CYSL-3 y 4 de nematodos, se ha propuesto que CYSL-3 tendría una actividad catalítica involucrando otro sustrato (distinto a S-sulfocisteína) en *C. elegans*[124]. Dado que no hay disponible mutante de delección en *cysl-3*, se realizaron ensayos de ARNi y posterior exposición a selenito de sodio de los gusanos interferidos. No se observaron diferencias entre los gusanos interferidos y el control sin interferir (**Fig. 4.22 C**).

Con respecto a CYSL-4 se examinó el mutante de delección *cysl-4(ok3359)*, el cual no mostró diferencias con la estirpe silvestre en presencia de selenito (**Fig. 4.22 B**).

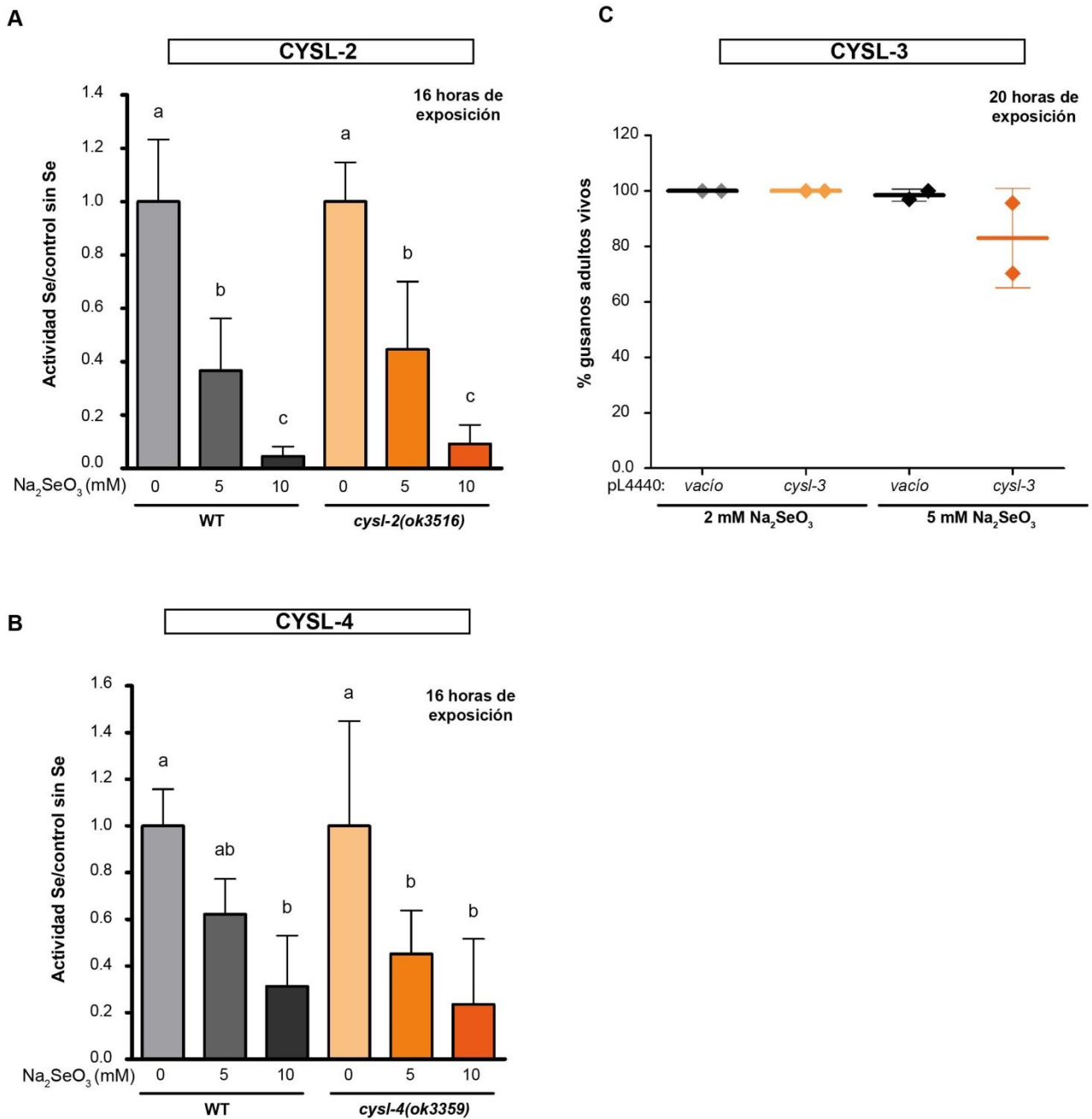


Fig. 4.22: A y B: Actividad relativa Se/no Se a las 16 horas de gusanos silvestre (WT) y *cysl-2(ok3359)* (A) y *cysl-4(ok3359)* (B) en 0, 5 y 10 mM Na₂SeO₃. El parámetro actividad se refiere a la motilidad de una población de individuos. Las columnas indican promedio de actividad en selenito relativa al control sin selenito para cada estirpe. Las barras de error indican desviación estándar. Se realizó un ensayo de análisis de varianza (One-way ANOVA, $p=1.72E-13$ (A) y $p=1.3E-5$ (B)) y posterior test de Tukey. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios. Las gráficas corresponden a un ensayo con 4 pocillos por condición por estirpe (80 gusanos por pocillo). C: Supervivencia de gusanos de la estirpe silvestre con la expresión del gen *cysl-3* interferida (*cysl-3*) y el control negativo (*vacío*). Los puntos indican porcentaje de gusanos adultos vivos después de 20 horas en presencia de 2 y 5 mM de selenito de sodio (Na₂SeO₃). La gráfica corresponde a 2 ensayos con una placa cada uno (30-40 gusanos por placa). Las barras de error corresponden a desviación estándar.

La **Tabla 4.2** resume los resultados obtenidos con todas las estirpes antes mencionadas en presencia de selenito de sodio y sulfuro.

Tabla 4.2. Respuesta de estirpes mutantes a condiciones tóxicas de selenito y sulfuro. *WT* se refiere a sensibilidad igual al organismo silvestre, *Resistente*: más resistente que el silvestre y *Sensible*: más sensible que el silvestre. * Tomado de referencia [8]. ** Tomado de referencia [7]. ~Realizado en esta tesis además de la referencia citada.

Estirpe	Selenito	Sulfuro
<i>egl-9(zf150)</i>	<i>Resistente</i>	<i>Resistente</i>
<i>egl-9(zf151)</i>	<i>Resistente</i>	<i>No examinado</i>
<i>egl-9(sa307)</i>	<i>Resistente</i>	<i>Resistente*~</i>
<i>hif-1(ia4)</i>	<i>Sensible</i>	<i>Sensible*~</i>
<i>vhl-1(ok161)</i>	<i>Resistente</i>	<i>WT*</i>
<i>swan-1(ok267)</i>	<i>WT</i>	<i>No Examinado</i>
<i>rhy-1(ok1402)</i>	<i>WT</i>	<i>No examinado</i>
<i>sqr-1(tm3378)</i>	<i>WT</i>	<i>Sensible**~</i>
<i>sqr-2(ok3516)</i>	<i>WT</i>	<i>No examinado</i>
<i>cysl-1(ok762)</i>	<i>Sensible</i>	<i>Sensible~</i>
<i>cysl-2(ok3516)</i>	<i>WT</i>	<i>WT**</i>
<i>ARNi de cysl-3</i>	<i>WT</i>	<i>No examinado</i>
<i>cysl-4(ok3359)</i>	<i>WT</i>	<i>WT**</i>
<i>cysl-1(ok762);egl-9(sa307)</i>	<i>Resistente</i>	<i>No examinado</i>
<i>ARNi de suox-1</i>	<i>WT</i>	<i>No examinado</i>
<i>ethe-1(tm4101)</i>	<i>WT?</i>	<i>Sensible**</i>
<i>mspt-7(gk514674)</i>	<i>WT?</i>	<i>No examinado</i>

Análisis de resultados reportados previamente sobre transcriptoma de C. elegans en presencia de selenito de sodio.

En 2014 se publicó un trabajo en el cual analizan el transcriptoma (mediante *microarrays*) de gusanos *C. elegans* expuestos desde el estadio larvario L1 hasta L4 a condiciones de 0, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4 mM de selenito de sodio. En este trabajo diferencian aquellos genes que cambian su expresión al menos 2x en condiciones sin Se (condiciones que denominan de “bajo Se”) comparado con 0.1 mM. Por otro lado también diferencian aquellos genes que cambian su expresión al menos 2x en condiciones de 0.2 y 0.4 mM de Se (condiciones que denominan de “alto Se”) en comparación con 0.1 mM. Los genes identificados los filtran por aquellos genes que cambian su expresión en presencia de sulfuro y cadmio (datos provenientes de otros trabajos). De esta manera reportan un conjunto de “genes específicos de condiciones de bajo Se” (0 versus 0.1 mM) y “genes específicos de condiciones de alto Se” (0.2 y 0.4 versus 0.1 mM). La lista de genes completa se puede encontrar en la referencia [107]. Como resultado dentro de los “genes específicos de bajo Se” (59 genes), describen que hay un enriquecimiento en funciones relacionadas con peptidasas. Por otro lado, dentro de los “genes específicos de alto Se”, hay un enriquecimiento de genes con funciones relacionadas con actividades oxidorreductasas (*gst-19*, *gst-16*) y de respuesta a condiciones de estrés como *hsp-16.1* y *hsp-16.48* y una significativa disminución de genes relacionados con componentes estructurales de la cutícula (e.g. colágeno). Sugiriendo que la toxicidad del Se en *C. elegans* causa un aumento de especies reactivas del oxígeno y conduce a el desencadenamiento de respuestas al estrés[107].

Utilizando los datos que este grupo reporta se buscó dentro de los “genes de alto Se” la presencia de genes de *C. elegans* con evidencia de ser regulados por HIF-1. Como resultado de esta búsqueda, se encontró a *cysl-2* y *nhr-57* los cuales en presencia de 0.4 mM de selenito aumentan 2.91x y 2.5x respectivamente en comparación con 0.1 mM. Consistentemente, el análisis del transcriptoma de *C. elegans* en presencia de H₂S resultó en que ambos genes son regulados a la alta en respuesta a H₂S[139]. Estos resultados refuerzan el paralelismo de la respuesta al Se con la respuesta al H₂S.

Por otra parte, se buscó dentro de los genes de *C. elegans* cuya expresión varía frente al Se si alguno de ellos era homólogo de genes humanos descritos como blancos de HIF-1. Dentro de estos se encontró a *maf-1* el cual aumenta 2x su expresión en condiciones de 0.4 mM de selenito.

El aumento de la expresión de estos genes regulados por HIF-1 (*cysl-2*, *nhr-57* y *maf-1*) en condiciones de selenito también sostiene la participación de HIF-1 en la respuesta al Se.

El gen *nhr-57* codifica para un receptor nuclear huérfano, de expresión en el intestino, faringe, células excretoras y células gliales de la sensilla cefálica (*CEP*

sheath cells). Este gen pertenece a una clase divergente de receptores nucleares, con 281 miembros, la cual parece ser específica de nematodos[140]. Por otro lado, el gen *maf-1* codifica para una proteína que reprime la actividad de la ARN polimerasa III en determinadas condiciones de estrés[141]. Podría ser interesante profundizar en el estudio de la función de estos genes y un posible rol en la respuesta al Se.

Además de genes blancos de *hif-1*, dentro de los genes que cambian su expresión en alto Se se encuentra *mpst-3*, gen de la familia de las TST, familia de proteínas que inicialmente se propuso en este trabajo como posiblemente involucrada en la detoxificación de Se. Sólo se analizó la *mpst-7* debido a que es la de mayor homología con la TST humana, pero dado estos resultados de transcriptoma sería interesante e informativo analizar a otros miembros de esta familia de proteínas.

4.3 Análisis de las proteínas tiorredoxina reductasa, glutatión reductasa y selenofosfato sintetasa de *C. elegans* en presencia de selenio.

El genoma de *C. elegans* codifica para dos tiorredoxinas reductasas, una citosólica, TRXR-1, con un residuo de Sec en el sitio activo y otra mitocondrial, TRXR-2, con Cys en la posición homóloga a la Sec del sitio activo. A diferencia de los mamíferos, mutantes de delección en estos genes son viables, y no son más sensibles al estrés oxidativo, sin embargo la delección de *trxr-1* junto con la interferencia del gen que codifica para la GR (*gsr-1*) tiene un impacto en el proceso de muda de cutícula [102].

Tanto la TRXR como la GR han sido propuestas como enzimas involucradas en la metabolización del selenito a selenuro, por lo que mutantes de delección en dichos genes podrían tener un efecto en el fenotipo observado en presencia de selenito. Sin embargo tanto los mutantes de delección en *trxr-1*, *trxr-2* y el doble mutante no se comportan diferente a la estirpe silvestre en condiciones de 5 mM de selenito. Esto fue reportado en un trabajo previo y en el marco de esta tesis también se examinó obteniéndose el mismo resultado. Adicionalmente se examinó la interferencia de la expresión de *gsr-1* y la exposición a selenito, obteniendo el mismo resultado que para TRXR.

Por otra parte, la enzima selenofosfato sintetasa que cataliza la síntesis de selenofosfato, un precursor para la síntesis de Sec-ARNT^{Sec}, requiere como sustratos a una forma reducida del Se y ATP[52]. No está claro el sustrato de Se que la SPS utiliza *in vivo*, pero los experimentos *in vitro* sostienen que puede utilizar el H₂Se.

Dada la reacción que cataliza, la SPS consume H₂Se y en condiciones de exceso de selenito, es razonable proponer que en las células haya un exceso de H₂Se el cual la

SPS podría consumir dando lugar a selenofosfato. Este consumo podría aliviar en cierta medida la toxicidad del exceso de Se. De ser así, organismos deficientes en SPS serían más sensibles al Se que el organismo silvestre. Se examinó el comportamiento de la estirpe de delección en el gen que codifica para SPS, *seld-1(tm3654)*, en presencia de 5 y 10 mM de selenito de sodio y no resultó diferente a la estirpe silvestre. Asimismo, estos resultados son consistentes con el obtenido al exponer a mutantes *trxr-1(sv47)* a selenito, dado que la ausencia de *seld-1* tiene un impacto directo en la síntesis de TRXR-1.

4.4 Anexo 4.1

MODO DE HERENCIA DE MUTACIÓN EN QW1263 Y QW1264

La **Fig. 4.1.1** muestra el resultado de un cruce de QW1263 con la estirpe silvestre y el análisis de las generaciones F1 y F2 como experimento representativo. En el análisis de la generación F2 de los distintos F1 aislados, el resultado obtenido con 3 aislados F1 (A, C y D) fue de un porcentaje de gusanos de fenotipo mutante entre 19 y 23%. Esto es consistente con un F1 heterocigota y el alelo mutante recesivo (se calculó el estadístico χ^2 para validar la hipótesis planteada de mutación recesiva). Otros 4 aislados F1 (B, H, I y J) fue de un 70-90% de gusanos con fenotipo mutante. Esto es consistente con la presencia de F1 homocigotas mutantes resultado de la autofecundación del mutante parental. Por último, los aislados F1 E, F y G resultaron en una F2 con un 34-52% de gusanos con fenotipo mutante. Estas últimas proporciones, no se ajustan a ninguna de las proporciones clásicas, como por ejemplo 3:1 en el caso de un gen involucrado con un alelo dominante y otro recesivo. Esto puede tener diversas causas. Por un lado en los ensayos de resistencia al selenito se puede observar gran variabilidad, puede haber diferencias entre las distintas placas, o entre distintos lotes de placas, así como pequeños cambios en la temperatura que resulten en que un día sobrevivan más gusanos que otro día (los ensayos no se realizaron a temperatura controlada). Además, siempre existe variabilidad genética y en este caso hay que tener presente que estos mutantes provienen de una mutagénesis aleatoria, por lo que otros genes podrían estar modificados y existir algún tipo de potenciador del fenotipo. Por este motivo, antes de comenzar a realizar otro tipo de ensayos es necesario el curado de las estirpes mutantes, procedimiento que implica el retrocruce de la estirpe mutagenizada con la estirpe silvestre seleccionando los mutantes homocigotas para la mutación de interés, eliminando así posibles mutaciones en otras regiones del genoma.

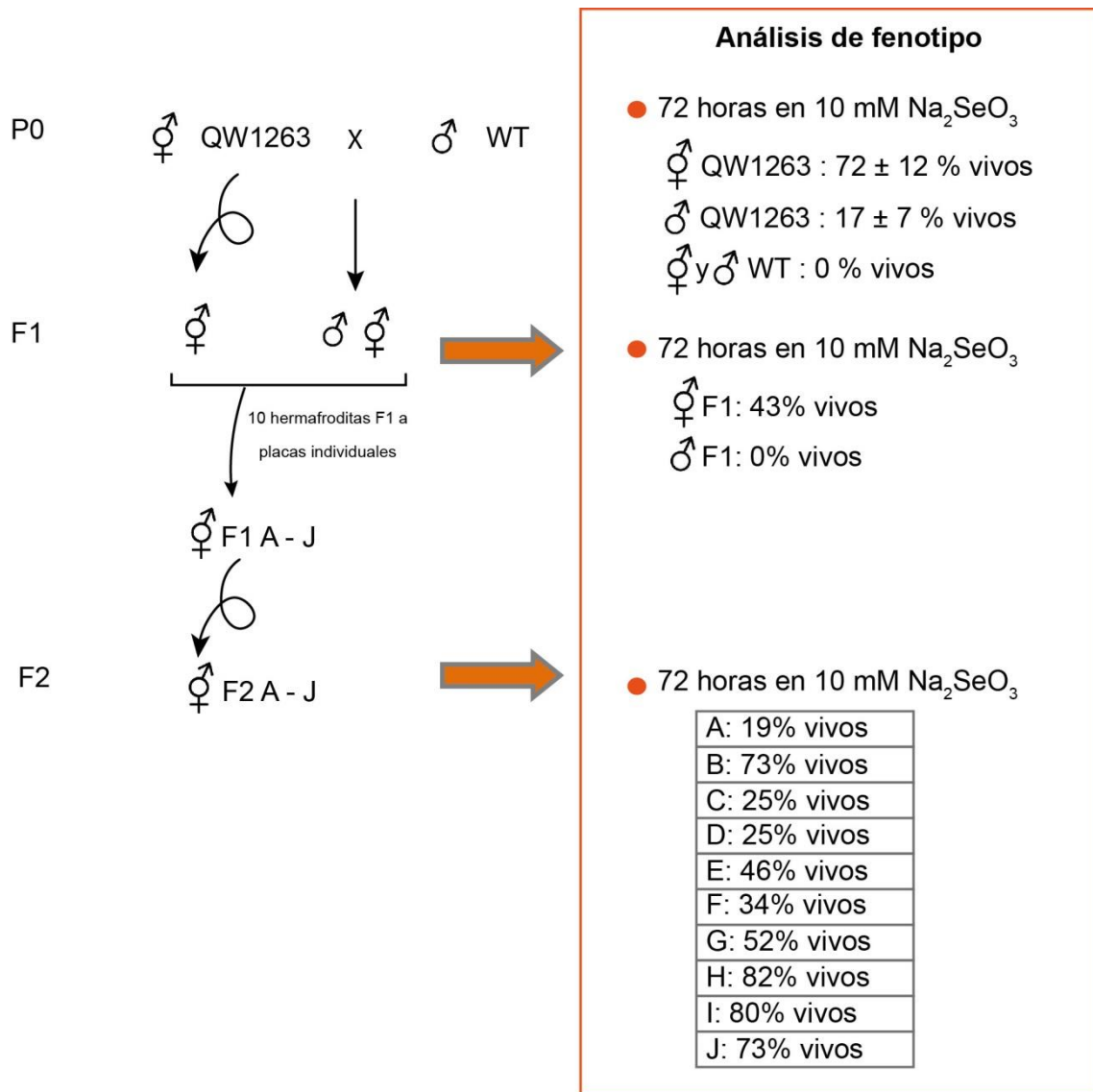


Figura 4.1.1: Cruces realizados para el estudio del modo de herencia de mutación en mutante QW1263. Se ilustran los cruces realizados y los resultados obtenidos con las distintas generaciones en presencia de 10 mM de selenito de sodio. ♀: indica hermafrodita, ♂: indica macho, WT: estirpe silvestre N2, QW1263: mutante resistente a concentraciones tóxicas de selenio aislados en este trabajo.

Para asegurar el resultado, también se realizó el cruce de un macho heterocigota F1 con un hermafrodita silvestre. Se aisló 4 individuos de la F2 y se analizó la F3 en presencia de Se. Como resultado se obtuvo que dos aislados F3 no tenían ningún gusano vivo (0% vivos) luego de 72 horas en presencia de Se, y los otros dos aislados tenían 15 y 21% de gusanos vivos a las 72 horas. Este resultado también es consistente con una mutación recesiva.

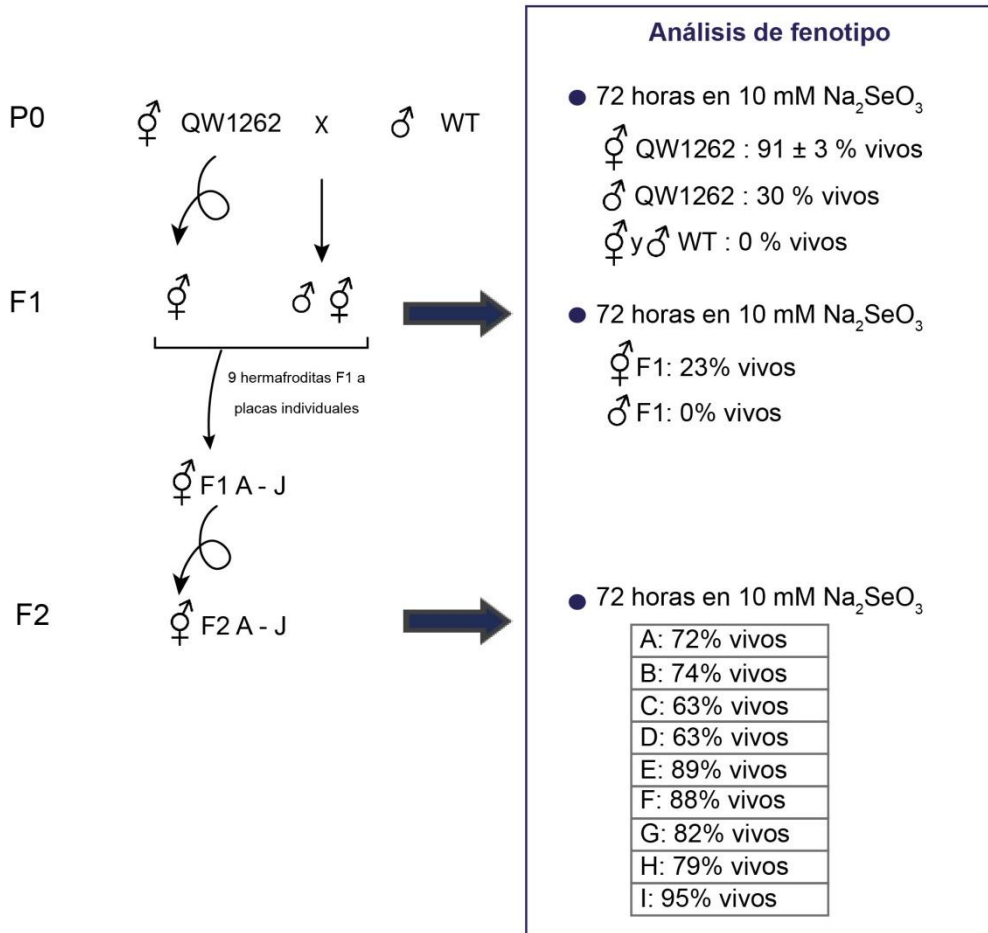
El conjunto de los datos, sostienen que se trata de un gen involucrado y que el alelo mutante es recesivo. Resultados análogos se obtuvo con el mutante QW1264. Para cada mutante se realizó este análisis dos veces con resultados similares.

MODO DE HERENCIA EN QW1262

La **Fig. 4.1.2** muestra el resultado de un cruce de QW1262 con la estirpe silvestre y el análisis de las generaciones F1 y F2 como experimento representativo. En el análisis de hermafroditas y machos F1 en presencia de selenito resulta en 0% de machos y 23% de hermafroditas vivos a las 72 horas. Este resultado es consistente con una mutación autosómica recesiva y el porcentaje de hermafroditas vivos se explica por autofecundación del hermafrodita P0. Sin embargo, luego de aislar varios hermafroditas F1 en placas diferentes y analizar su progenie resultó en: la progenie de los individuos A, B, C y D exhiben entre 63% y 74% de supervivencia y para los aislados E, F, G, H e I un porcentaje mayor a 79%. Este resultado puede explicarse como: los individuos A-D son heterocigotos para el gen de interés y la mutación es dominante y los individuos E-I son producto de la autofecundación del hermafrodita P0 y por lo tanto la resistencia es similar a este. Esto se repitió tres veces con resultados similares.

Dado que los datos anteriores se contradicen entre sí, se propuso examinar qué sucedía con el cruce recíproco. El resultado del cruce de un macho mutante con un hermafrodita silvestre resultó en una F1 de sólo hermafroditas. Por lo tanto, se propone que el mutante QW1262 se trata de una situación compleja en la cual se podría proponer que, entre otras causas, se trate de algún rearrreglo cromosómico que afecte la dosis cromosómica de la progenie. Se requiere más estudios para resolver la condición del mutante QW1262. La caracterización del mismo no se aborda en esta tesis.

Cruce A



Cruce B

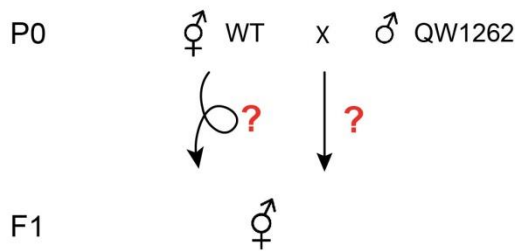


Figura 4.1.2: Cruces realizados para el estudio del modo de herencia de mutación(es) en mutante QW1262. Se ilustran los cruces realizados y los resultados obtenidos con las distintas generaciones en presencia de 10 mM de selenito de sodio. ♀: indica hermafrodita, ♂: indica macho, WT: estirpe silvestre N2, QW1262: mutante resistente a concentraciones tóxicas de selenio aislados en este trabajo.

4.5 Anexo 4.2

MAPEO DE GENES UTILIZANDO POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO ÚNICO ENTRE LAS ESTIRPES DE *C. ELEGANS* BRISTOL N2 Y HAWAIANA.

En la técnica *SNP Mapping*, polimorfismos de secuencia de ADN entre las estirpes silvestres Bristol N2 y Hawaiana CB4856 son utilizados como marcadores genéticos. Los polimorfismos de secuencia utilizados afectan sitios de reconocimiento de enzimas endonucleasas, resultando en productos de digestión de diferente tamaño (RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*)). Los autores de la referencia [130] identificaron 48 SNPs (8 por cromosoma) que modifican el sitio de restricción de la enzima *DraI* y diseñaron un conjunto de cebadores que permiten amplificar por PCR las regiones de estos 48 SNP utilizando las mismas condiciones y cuyos productos tienen un tamaño que se puede resolver en un gel de agarosa. Por lo tanto, es posible realizar las 48 PCRs en una única placa de 96 tubos y luego agregar la misma enzima a cada tubo. Este tipo de mapeo se divide en dos fases: i) mapeo de cromosoma, en el cual se identifica el cromosoma involucrado y una región aproximada dentro del mismo y ii) mapeo de intervalo, en el cual se ubica el gen de interés en un intervalo entre dos SNPs.

Inicialmente se cruzaron gusanos machos CB4856 con hermafroditas del mutante QW1264, resistente a selenito, para producir una F1 heterocigota. A partir de la autofecundación de la F1 heterocigota se aislaron 56 F2 homocigotas mutantes (en base al fenotipo mutante). Cada F2 en una placa individual se permite que se autofecunde y con los gusanos de la generación F3 se prepara ADN con el cual se harán las diferentes PCRs. De los 56 F2 homocigotas mutantes se obtuvieron 56 muestras de ADN.

Para el mapeo de cromosoma, se utiliza como ADN molde una mezcla de toda la población de recombinantes. Con este ADN proveniente de todo el pool de recombinantes se realizaron las PCRs con los 8 juegos de cebadores para cada cromosoma. Como control se utilizó mezcla de ADN de gusanos N2 y CB4856 para cada par de cebadores. La **Fig. 4.2.1** muestra los resultados obtenidos luego de las PCR utilizando los 8 juegos de cebadores de los cromosomas III y V y posterior digestión con la enzima *DraI*. El resultado esperado para aquellos SNPs que no están ligados a la mutación de interés es una mezcla 50:50 de productos de digestión de N2 y CB4856. En estas cosas, las bandas de los carriles con ADN de los mutantes se verán igual a las del control (mix N2/CB4856). Por otro lado, SNPs ligados a la mutación de interés estarán enriquecidos en bandas de N2. En este caso, en el carril de los mutantes se verá un enriquecimiento en la banda N2 y una disminución de la banda CB4856 en comparación con el carril control (mix N2/CB4856).

Como resultado del mapeo de cromosoma, se obtuvo un enriquecimiento en la banda N2 para los cebadores R10D12, F57G8 y Y6G8. En los productos obtenidos

con ADN mutante la banda correspondiente a N2 tiene una mayor intensidad en comparación con los controles (**Fig. 4.2.1 B**). Dado este resultado, se concluye que la mutación de interés está ligada al cromosoma V y en este punto se podría proponer que la posición genética estaría entre las posiciones +6 a +13.

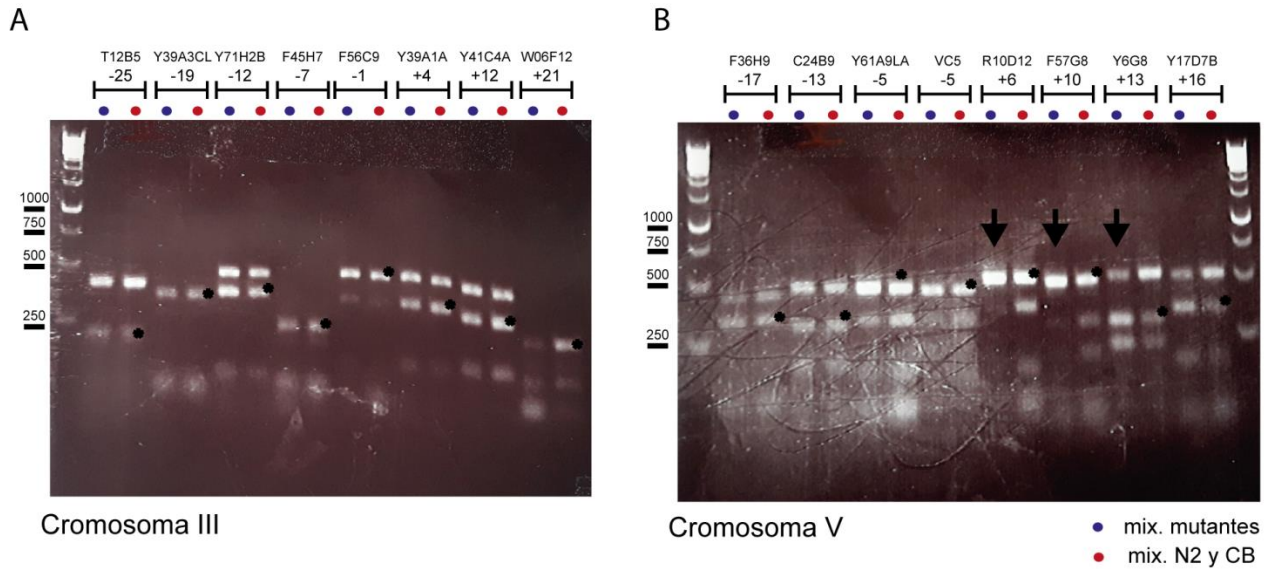


Fig. 4.2.1: Resultados obtenidos en la fase de mapeo de cromosoma para los cromosomas III (A) y V (B). Geles de agarosa mostrando el resultado del producto de digestión con DraI de las PCR realizadas utilizando 8 juegos de cebadores para los cromosomas III y V, utilizando como ADN molde una mezcla del ADN de los 56 F2 recombinantes QW1264 (mix. mutantes) y una mezcla de ADN de las estirpes control N2 y CB4856 (mix N2 y CB). Los números debajo del nombre del cebador utilizado en cada par de carriles corresponden a la posición genética del SNP en cuestión. Los asteriscos indican la banda correspondiente al resultado utilizando ADN molde de N2. Las flechas indican los carriles en los cuales el resultado con el ADN molde proveniente del mix de mutantes está enriquecido en la banda N2.

Una vez determinada la posición genética aproximada de la mutación, se continuó con el mapeo más fino de intervalo. Para esto, se analizó por PCR y posterior digestión con DraI el genotipo de cada uno de los recombinantes aislados. Dado que en el mapeo de cromosoma hay un enriquecimiento de N2 en las posiciones genéticas +6, +10 y +13, los pares de cebadores utilizados para el análisis genotípico de los 56 recombinantes fueron R10D12, Y6G8 y F57G8. La **Fig. 4.2.2** muestra el resultado obtenido luego de la digestión con la enzima DraI de los productos de PCR obtenidos con el par de cebadores R10D12. Los resultados obtenidos con cada uno de los individuos, con cada par de cebadores se resumen en la **Fig. 4.2.3**. Estos resultados sugieren que la mutación estaría localizada en una posición genética menor a +6. Con el resultado obtenido en el mapeo de cromosoma en la posición -5, en la cual parece haber un 50% de cada alelo (N2 y

CB4856), se podría proponer que la mutación se encuentra en la región cromosómica mayor a -5. Esto difiere en parte de lo obtenido en la aproximación obtenida en la primera fase del protocolo en la cual por intensidades de bandas se propone que la mutación estaría entre +6 a +13. Como se menciona anteriormente, en la primera fase, la posición genética es aproximada, dado a que se hace en base a las intensidades de las bandas de los productos de PCR, lo cual al ser PCR a tiempo final es semicuantitativo y posría resultar en un falso positivo.

Para restringir aun mas la región en la que se localiza la mutación, sería necesaria la utilización de cebadores localizados en este intervalo de -5 a +6 para poder restringir más la región que se ubica el gen de interés.

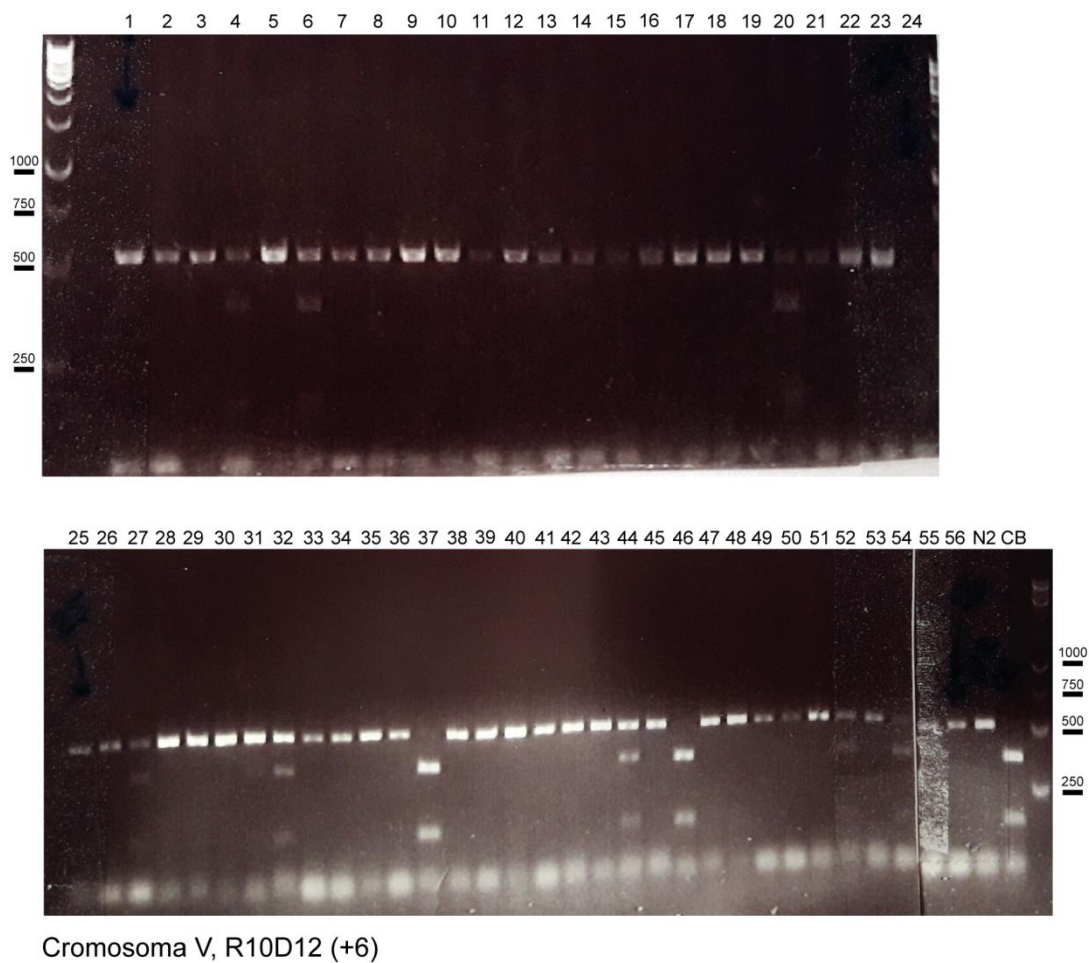


Fig. 4.2.2: Resultados obtenidos en la fase de mapeo de intervalo en el cromosoma V. Geles de agarosa mostrando el resultado del producto de digestión con DraI de las PCR realizadas utilizando el juego de cebadores R10D12. Cada carril corresponde al resultado obtenido utilizando como molde el ADN de uno de los 56 F2 recombinantes QW1264. Como controles se agregó el ADN de las estirpes N2 y CB4856 (carriles N2 y CB, respectivamente).

Cromosoma V

INDIVIDUOS	R10D12 (+6)	F57G8 (+10)	Y6G8 (+13)
1	N2	N2	HET
2	N2	N2	N2
3	N2	N2	N2
4	HET	HET	HET
5	N2	N2	HET
6	HET	HET	HET
7	N2	HET	HET
8	N2	N2	N2
9	N2	N2	N2
10	N2	N2	HET
11	N2	N2	N2
12	N2	N2	N2
13	N2	N2	N2
14	N2	N2	N2
15	N2	N2	N2
16	N2	N2	HET
17	N2	N2	HET
18	N2	N2	HET
19	N2	N2	HET
20	HET	HET	CB
21	N2	N2	N2
22	N2	N2	N2
23	N2	N2	N2
24	-	HET	CB
25	N2	N2	HET
26	N2	N2	HET
27	HET	HET	HET
28	N2	HET	HET
29	N2	N2	N2
30	N2	N2	N2
31	N2	N2	HET
32	HET	HET	HET
33	N2	N2	N2
34	N2	N2	N2
35	N2	N2	N2
36	N2	N2	N2
37	CB	CB	CB
38	N2	N2	N2
39	N2	N2	N2
40	N2	N2	N2
41	N2	HET	HET
42	N2	N2	HET
43	N2	N2	N2
44	HET	HET	HET
45	N2	N2	N2
46	CB	CB	CB
47	N2	N2	N2
48	N2	N2	N2
49	N2	N2	N2
50	N2	N2	N2
51	N2	N2	N2
52	HET	HET	HET
53	N2	N2	N2
54	HET	HET	CB
55	N2	N2	CB
56	N2	N2	N2

Fig. 4.2.3: Conjunto de resultados del mapeo de intervalo en el cromosoma V. Cada fila de la tabla ilustra el resultado de un animal recombinante, y cada celda coloreada representa el genotipo del recombinante en el SNP indicado. Homocigota N2 está representada en azul, heterocigotas N2/CB (HET) en celeste y homocigotas CB4856 (CB) en rojo. La celda blanca corresponde a PCR que no funcionó.

5 Análisis del rol de transportadores potencialmente involucrados en el metabolismo del selenio

En algunos organismos ciertas proteínas transportadoras de especies del azufre (e.g. transportadores de sulfato) han sido involucradas en el transporte del Se debido a cierta inespecificidad de reconocimiento de estas proteínas por los análogos de Se. Adicionalmente, otros transportadores de membrana se han vinculado con el transporte inespecífico del Se, e.g. los transportadores de aniones SLC26, el transportador de monocarboxilatos de cadena corta Jen1p, entre otros (ver también en sección 1.3). Dado esto, realizamos una búsqueda de datos en relación a proteínas involucradas en el transporte de membrana que se sabe que participan en el metabolismo del Se. Utilizamos las secuencias aminoacídicas de estas proteínas como *queries* (secuencias de búsqueda) para identificar por blast las proteínas de *C. elegans* con mayor homología. Para los genes de *C. elegans* que codifican para las proteínas identificadas solicitamos las correspondientes estirpes mutantes y los analizamos en presencia de selenito en el ensayo utilizando el *WMicrotracker*. La **Tabla 5.1** resume los genes utilizados como *query* en la búsqueda de homólogos en *C. elegans* y los *hits* obtenidos.

Tabla 5.1. Resumen de los genes/proteínas de bacterias, levaduras y mamíferos, utilizados como *query* en la búsqueda de homólogos en *C. elegans* y de los *hits* obtenidos.

Organismo	Mecanismos inespecíficos de absorción, metabolización y excreción de distintas formas de Selenio	Query utilizado	Homólogo en <i>C. elegans</i> (incluyendo el valor del índice <i>E-value</i> obtenido)
Bacterias			
<i>Escherichia coli</i>	Complejo sulfato permeasa (CysA, CysU, CysW y CysP)[60]	CysA (AAA23639.1)	<i>hmt-1</i> (<i>E-value</i> = $9e-23$) <i>haf-1</i> (<i>E-value</i> = $1e-22$) <i>haf-3</i> (<i>E-value</i> = $8e-22$) <i>pgp-5</i> (<i>E-value</i> = $2e-21$) <i>pgp-11</i> (<i>E-value</i> = $2e-21$) <i>abt-2</i> (<i>E-value</i> = $8e-21$) <i>pgp-2</i> (<i>E-value</i> = $2e-20$)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	SmoK, miembro de la familia de transportadores de unión a ATP involucrada en el transporte de sorbitol/manitol [61].	SmoK (AAC45769.1)	<i>haf-4</i> (<i>E-value</i> = $2e-23$) <i>haf-3</i> (<i>E-value</i> = $2e-22$) <i>pgp-9</i> (<i>E-value</i> = $1e-21$) <i>haf-9</i> (<i>E-value</i> = $3e-21$) <i>pgp-1</i> (<i>E-value</i> = $3e-21$) <i>pgp-4</i> (<i>E-value</i> = $8e-21$) <i>pgp-10</i> (<i>E-value</i> = $3e-20$) <i>pgp-12</i> (<i>E-value</i> = $4e-20$)
Levaduras			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Transportadores de sulfato Sul1p y Sul2p [142].	Sul1p (EWH19660.1)	<i>sulp-5</i> (<i>E-value</i> = $9e-41$) <i>sulp-2</i> (<i>E-value</i> = $2e-36$) <i>sulp-3</i> (<i>E-value</i> = $4e-35$) <i>sulp-8</i> (<i>E-value</i> = $1e-33$) <i>sulp-7</i> (<i>E-value</i> = $2e-31$) <i>sulp-6</i> (<i>E-value</i> = $6e-30$) <i>sulp-4</i> (<i>E-value</i> = $2e-28$)
Mamíferos			
<i>Homo sapiens</i>	Transportador intercambiador de aniones, isoforma a [11].	SLC26A1 (NP_439897.1)	<i>sulp-3</i> (<i>E-value</i> = $3e-72$) <i>sul-7</i> (<i>E-value</i> = $4e-71$) <i>sulp-5</i> (<i>E-value</i> = $5e-71$) <i>sulp-4</i> (<i>E-value</i> = $5e-66$) <i>sulp-8</i> (<i>E-value</i> = $2e-56$) <i>sulp-7</i> (<i>E-value</i> = $1e-33$) <i>sulp-1</i> (<i>E-value</i> = $2e-10$)
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Multidrug resistant protein</i> [85]. Proteínas involucradas en excreción de compuestos con glutatión.	MRP-1 (NP_071617.2)	<i>mrp-1</i> (<i>E-value</i> = 0) <i>mrp-2</i> (<i>E-value</i> = 0) <i>mrp-3</i> (<i>E-value</i> = 0) <i>mrp-4</i> (<i>E-value</i> = 0) <i>mrp-7</i> (<i>E-value</i> = 0) <i>mrp-8</i> (<i>E-value</i> = 0) <i>mrp-6</i> (<i>E-value</i> = $e-161$) <i>mrp-5</i> (<i>E-value</i> = $e-153$)

Los familias de genes *hmt* (*heavy metal tolerance factor*), *haf*, *pgp* (*P-glycoprotein related*) y *mrp* son transportadores de tipo ABC, dependientes de ATP.

5.1 Homólogos de proteínas de transporte de especies de azufre y selenio de bacterias

Diversos estudios proponen que los oxianiones selenito y selenato utilizan transportadores de iones del azufre para el ingreso a la célula. Estudios utilizando *E. coli* muestran que los iones selenato y selenito, ingresan a la célula a través del complejo transportador sulfato permeasa (formado por los genes *cysA*, *cysU*, *cysW* y *cysP*)[60,143]. Las bacterias deficientes en *cysA*, muestran una reducción en la incorporación de ⁷⁵Se, involucrando a esta proteína en el transporte de dicho compuesto[144]. Se buscó por blastP homólogos de las cuatro subunidades de la sulfato permeasa (CysA, CysU, CysW y CysP) y sólo proteínas homólogas a CysA están presentes en *C. elegans*. Dentro de los genes encontrados se incluyen miembros de la superfamilia de transportadores ABC, (HMT, HAF y PGP). El detalle de los genes obtenidos se lista en la **Tabla 5.1**. Por otro lado, el gen *gutS* en *E. coli* también se asocia al metabolismo del Se: está descrito que su expresión aumenta en presencia de Se y la predicción estructural de la proteína a la cual codifica se describe como posible transportador de membrana. Utilizando la secuencia proteica de GutS como *query* no se encontró proteínas homólogas en *C. elegans*.

En la bacteria *C. metallidurans* CH34 mutantes en el gen *dedA* son resistentes a altas concentraciones de selenito y la estructura predicha para la proteína, también la propone como posible transportador de selenito. No se encontraron proteínas homólogas a DedA en *C. elegans*.

En *R. sphaeroides* identificaron a la proteína codificada por el gen *smoK*, el cual se propone consiste en un miembro de la superfamilia de transportadores ABC, involucrado en la absorción de azúcares. Bacterias mutantes en *smoK* toleran concentraciones de selenito 10 veces mayores que las bacterias silvestres[61]. También para este caso, a partir de SmoK de *R. sphaeroides*, la búsqueda por blastP de homólogos en *C. elegans* resultó en miembros de las subfamilias de transportadores HAF y PGP.

Las proteínas obtenidas con mayor nivel de homología de detallan en la **Tabla 5.1**. En su mayoría, estas proteínas pertenecen a la superfamilia de transportadores denominados transportadores ABC, que utilizan ATP para la translocación de pequeñas moléculas a través de las membranas en la cual residen, ya sea en la membrana plasmática como en membranas intracelulares (RE, peroxisomas y mitocondria). Están involucrados en una gran variedad de funciones dentro de los que se encuentran mecanismos de protección o barrera para la exportación de drogas y toxinas desde las células, biogénesis de organelos y mecanismos de protección contra infecciones virales. En *C. elegans* hay 60 genes que codifican para proteínas miembro de esta superfamilia[145].

HMT-1 es una subfamilia de los transportadores ABC (su nombre del inglés: *heavy metal tolerance factor 1*). En *C. elegans* están descritos como involucrados en la

detoxificación de cadmio, arsénico y cobre. Su expresión se encuentra en los celomocitos (células que están distribuidas en el pseudoceloma del gusano, que se piensa que constituyen un “hígado primitivo”) así como en células intestinales, y algunas neuronas[146]. Su localización subcelular en células intestinales se restringe a los endosomas. Tanto la función descrita como su expresión son consistentes con un vínculo con la detoxificación del Se. Sin embargo la exposición de la estirpe *hmt-1(gk161)* a concentraciones de 5 y 10 mM de selenito no resultó en un fenotipo diferente a la estirpe silvestre.

La familia de proteínas HAF, contiene nueve miembros, también forman parte de la superfamilia de transportadores ABC. Se ha descrito la presunta función y localización de algunos miembros, mientras que otros aún no han sido estudiados. Está claro que las proteínas HAF-4 y HAF-9 funcionan como un heterodímero y son esenciales para la formación de los organelos específicos de las células intestinales denominados gránulos del intestino o “*gut granules*” (organelos relacionados con los lisosomas), los cuales aún no tienen una función precisa determinada[145]. Por otro lado, la proteína HAF-1 funciona como un homodímero en la mitocondria y participa en la respuesta a proteínas mal plegadas de la mitocondria participando en el transporte de péptidos desde la mitocondria al citosol[147]. La proteína HAF-6 se expresa principalmente en el intestino y tejido de la línea germinal y se ha determinado que cumple un rol esencial en la interferencia por ARN en *C. elegans*[148]. Dada la variabilidad de funciones encontradas para las proteínas de esta familia dentro del transporte de moléculas, nos preguntamos si podrían cumplir un rol en el transporte de metabolitos del Se. Con los resultados obtenidos mediante la exposición de las estirpes mutantes en los genes *haf-1*, *haf-3*, *haf-4* y *haf-9* a concentraciones de 5 y 10 mM de selenito de sodio, se descarta a estos transportadores con un rol en el transporte de selenito.

Por último, otra subfamilia de los transportadores ABC examinados fueron las P-glicoproteínas, o transportadores PGP. En *C. elegans* esta familia está formada por 15 miembros, sus funciones se desconocen, pero se ha determinado el patrón de expresión de la mayoría[149] y existen roles propuestos para algunos de ellos. Se ha vinculado a PGP-2 con un rol esencial en la formación de los gránulos del intestino, proponen a este transportador como encargado del control de la composición de membrana de dicho organelo y el tráfico a través de dicha membrana[150]. A PGP-3 se lo relaciona con un rol en la defensa contra toxinas provenientes de bacterias y hongos patógenos[151]. PGP-5 se ha propuesto con un rol en la resistencia tanto a bacterias patógenas como a la exposición a metales pesados[152].

Se realizó el análisis de las estirpes mutantes en los genes *pgp-1*, *pgp-2*, *pgp-4*, *pgp-5*, *pgp-10* y *pgp-12* con respecto a la actividad locomotora en condiciones de 5 y 10 mM de selenito de sodio durante 15 horas. La disminución de la actividad

locomotora de la estirpe mutante *pgp-1(pk17)* fue significativamente menor que la estirpe silvestre en presencia de selenito (**Fig. 5.1**). Este resultado sugiere que PGP-1 podría participar de alguna forma en el transporte de especies químicas de este elemento.

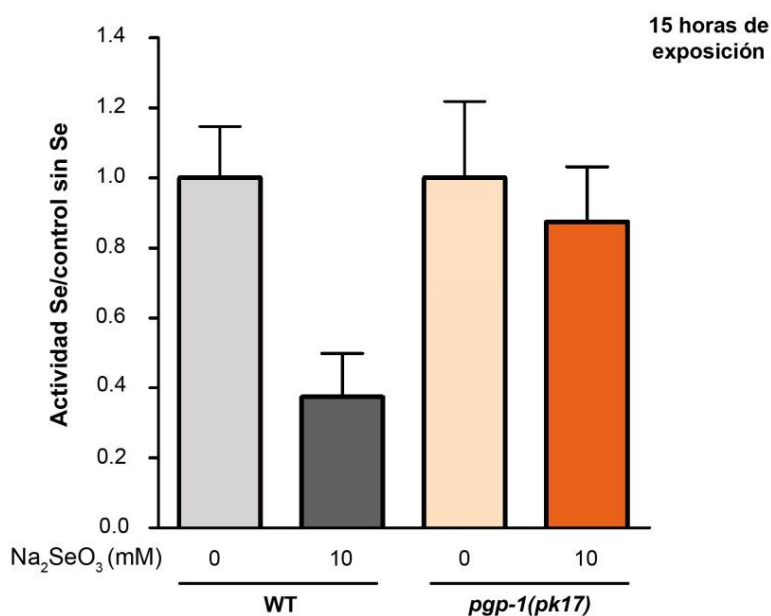


Fig. 5.1. Actividad relativa Se/no Se a las 15 horas de gusanos silvestre (WT) y *pgp-1(pk17)* en 0 y 10 mM Na₂SeO₃. El parámetro actividad se refiere a la motilidad de una población de individuos. Las columnas indican promedio de actividad en selenio relativa al control sin selenio para cada estirpe. La gráfica corresponde a un ensayo representativo con 4 pocillos para WT y 8 pocillos para *pgp-1* por condición por estirpe (80 gusanos por pocillo). Las barras de error indican desviación estándar. Se realizaron dos réplicas biológicas con resultados similares.

La proteína PGP-1 se expresa únicamente en la membrana apical de las células intestinales. Su función se desconoce, pero se descarta estar involucrada en la resistencia a drogas como emetina, ivermectina, cloroquina y colchicina dado que mutantes de delección *pgp-1(pk17)* no modifican la sensibilidad de *C. elegans* a estos compuestos[151]. Sin embargo un trabajo posterior involucran a PGP-1 en la resistencia a metales pesados. Evaluaron la capacidad de los organismos de desarrollarse en presencia de cloruro de cadmio y arsenito de sodio o la capacidad de recuperarse luego de una exposición temporal en el estadio adulto. En ambos casos la estirpe mutante en *pgp-1* resultó ser más sensible que la estirpe silvestre. Los autores, comparando a PGP-1 con MRP-1 (presunto rol de transporte de cadmio y arsénico formando complejos con GSH en faringe, intestino y vulva), proponen que PGP-1 probablemente no esté involucrado en el transporte directo de estos compuestos sino que sugieren la posibilidad de que PGP-1 esté

involucrado en el transporte de compuestos no identificados al momento o en la regulación de otro transportador ABC[153]. Un trabajo más reciente, hace un análisis de la tasa de bombeo faríngeo y velocidad (parámetro medido en medio sólido como el largo de la trayectoria realizada por segundo) y demuestra que los mutantes de delección en *pgp-1* superficialmente tienen un fenotipo de tipo silvestre, pero se diferencian significativamente en la tasa de bombeo faríngeo (mayor en la estirpe mutante) y en la velocidad de locomoción (menor en la estirpe mutante). Este mismo grupo propone a PGP-1, junto a otros miembros de la familia, como transportador involucrado en la respuesta frente a la droga moxidectina (MOX, droga utilizada como nematicida). Concretamente el resultado que reportan es que frente a la exposición de la estirpe mutante *pgp-1* a la droga, el bombeo faríngeo cesa a diferencia de la estirpe silvestre en la cual disminuye significativamente (en comparación al bombeo sin droga), pero no cesa completamente[154]. Este resultado sugiere a PGP-1 con un rol en la detoxificación de la droga MOX.

En contraste a lo reportado en los trabajos previos que describen al mutante en *pgp-1* como más sensible a determinados compuestos tóxicos, en esta tesis se describe que la deficiencia en PGP-1 se acompaña con una mayor resistencia al selenito de sodio. La estirpe utilizada en los tres trabajos es la misma (NL132). Nosotros no examinamos en la estirpe solicitada los fenotipos previamente observados con MOX, arsénico y cadmio; realizar este control resulta importante. También sería necesario expresar el alelo de *pgp-1* silvestre en la estirpe mutante de delección y ver si el fenotipo mutante es rescatado, tanto en el caso de la exposición a selenito como la exposición a los otros compuestos. De esta manera se confirmaría que el fenotipo observado se debe al gen *pgp-1* y no a una mutación en otro gen. Alternativamente se podría generar otro mutante de delección para este gen. Si el resultado no se confirmase, la secuenciación de la estirpe que da el fenotipo observado sería importante para identificar si otro *locus* está afectado. En cualquier caso la estirpe y el gen en cuestión deber ser estudiados, ya que el fenotipo observado es claro.

5.2 Homólogos de proteínas de transporte de especies de azufre y selenio de *Saccharomyces cerevisiae*

En *Saccharomyces cerevisiae* se demostró que los transportadores de sulfato Sul1p y Sul2p son capaces de transportar selenato[142]. A partir del gen Sul1p (EWH19660.1) de *S. cerevisiae*, se buscó por blastP homólogos en *C. elegans*. Los candidatos con mayor homología se listan en la **Tabla 5.1**.

En *C. elegans* hay 8 miembros de la familia sulfato permeases, *sulp-1* a *sulp-8*, cuyas funciones se presume es el transporte de aniones. La expresión de la mayoría de los transportadores Sulp fueron detectados en células polarizadas de la faringe, intestino y célula excretora, con funciones especializadas en los gusanos. A partir

de esto, se ha propuesto un rol fisiológico para muchos de los miembros de la familia de transportadores. La expresión de Sulp-3 en el músculo de la faringe (tejido que ha mostrado tener características mioepiteliales y rol importante en formación de la cutícula) se ha propuesto que la función de Sulp-3 facilitaría la acumulación de sustratos necesarios para la formación de la cutícula o funcionaría en la exportación de los sustratos desde la célula hacia fuera. La expresión en la célula excretoria de al menos tres de los transportadores (Sulp-4, 5 y 8) apoya la hipótesis de que estas proteínas participen en la secreción de electrolitos y fluidos desde el pseudoceloma al lumen del ducto de la célula excretora. La expresión intestinal (Sulp-1, 2, 7 y 8) apoya la importancia para este órgano en el transporte de aniones. Adicionalmente, los transportadores Sulp-1 y 2 se expresan en determinadas neuronas DA, en alguna de ellas en la cilia sensorial; el rol que cumplen en esta localización no está determinado. En conjunto, los datos exhiben la variabilidad de procesos en los que estos transportadores están involucrados [155].

Se solicitaron los mutantes de delección en *sulp-1*, *sulp-2*, *sulp-4*, *sulp-7* y *sulp-8* y se examinó la respuesta en presencia de 5 y 10 mM de selenito de sodio. En ninguna de las estirpes mutantes hubo diferencias con la estirpe silvestre, descartando a esta familia como posible transportadores de selenito. Una posibilidad es que también transporten Se pero en la forma de selenato, esta especie química no se examinó en la tesis.

5.3 Homólogos de proteínas de transporte de especies del azufre y Se de mamíferos

La identidad de proteínas transportadoras responsables de la absorción de los iones selenito y selenato en mamíferos se desconoce.

En experimentos con células epiteliales de intestino se demostró que la inhibición de transportadores de la familia SLC26 impacta el transporte de selenato[11]. Utilizando la proteína de humanos SLC26A7 (NP_439897.1) se buscó homólogos en *C. elegans* y las proteínas con mayor porcentaje de identidad fueron los transportadores de la familia Sulp (mencionados en el apartado anterior).

Los selenoaminoácidos son otra fuente de Se para la célula. Se propone que estos compuestos son incorporados a la célula por permeasas generales de aminoácidos [56] y una vez dentro de la célula pueden dirigirse por diferentes vías de metabolización[57]. Este grupo de transportadores no fue examinado en la tesis, pero sería interesante estudiar estos genes en respuesta a formas orgánicas del Se como SeMet.

Con respecto a la eliminación del exceso de Se, en hepatocitos está reportado una forma de eliminación a través de la formación de selenodiglutatión y su eflujo a través del transportador de membrana *MRP* (*multidrug resistant proteins*)[85]. A

partir de la proteína *multidrug resistance-associated protein 1* (NP_071617.2) de *Rattus norvegicus* se buscaron homólogos en *C. elegans* y como resultado se obtuvo los genes: *mrp-1* (*E-value* = 0), *mrp-2* (*E-value* = 0), *mrp-3* (*E-value* = 0), *mrp-4* (*E-value* = 0), *mrp-7* (*E-value* = 0), *mrp-8* (*E-value* = 0), *mrp-6* (*E-value* = e-161), *mrp-5* (*E-value* = e-153).

La exposición a 5 y 10 mM de selenito de sodio de las estirpes mutantes de delección en dichos genes no se diferenció de lo obtenido con la estirpe silvestre.

La **Tabla 5.3** resume los resultados obtenidos con cada estirpe ensayada.

Tabla 5.3. Respuesta de estirpes mutantes a condiciones tóxicas de selenito 5 y 10 mM. *WT* se refiere a sensibilidad igual al organismo silvestre, *Resistente*: más resistente que el silvestre.

Gen	Proteína	Genotipo de estirpe	Mutación presente en la estirpe	Selenito
<i>hmt-1</i>	Transportador ABC	<i>hmt-1(gk161) III</i>	Delección (2152 pb) (3 exones afectados)	<i>WT</i>
<i>haf-1</i>	Transportador ABC	<i>haf-1(ok705) IV</i>	Inserción + delección (1300pb) (3 exones afectados)	<i>WT</i>
<i>haf-3</i>	Transportador ABC	<i>haf-3(gk549) V</i>	Delección (1400 pb) (2 exones afectados)	<i>WT</i>
<i>haf-4</i>	Transportador ABC	<i>haf-4(gk240) I</i>	Delección (1600 pb) (5 exones afectados)	<i>WT</i>
<i>haf-9</i>	Transportador ABC	<i>haf-9(gk23) I</i>	No mapeado	<i>WT</i>
<i>pgp-1</i>	Transportador ABC	<i>pgp-1(pk17) IV.</i>	Delección (1200 pb) (3 exones afectados)	<i>Resistente</i>
<i>pgp-2</i>	Transportador ABC	<i>pgp-2(gk114) I</i>	Delección (1600 pb) (3 exones afectados)	<i>WT</i>
<i>pgp-4</i>	Transportador ABC	<i>pgp-4(gk1006) X.</i>	Inserción + delección (1230 pb) (3 exones afectados)	<i>WT</i>
<i>pgp-5</i>	Transportador ABC	<i>pgp-5(ok856) X.</i>	Delección (1000 pb) (4 exones afectados)	<i>WT</i>
<i>pgp-10</i>	Transportador ABC	<i>pgp-10(ok991) X.</i>	Delección (2000 pb) (7exones afectados)	<i>WT</i>
<i>pgp-12</i>	Transportador ABC	<i>pgp-12(gk19) X.</i>	Delección (2000 pb)-4 exones afectados	<i>WT</i>
<i>sulp-1</i>	Transportador de sulfato	<i>sulp-1(ok1639) I.</i>	Inserción + delección (1000 pb)-3 exones afectados	<i>WT</i>
<i>sulp-2</i>	Transportador de sulfato	<i>F14D12.5(ok1551) X.</i>	No mapeado	<i>WT</i>
<i>sulp-4</i>	Transportador de sulfato	<i>sulp-4(ok2004) V.</i>	Delección (2000 pb)-7 exones afectados	<i>WT</i>
<i>sulp-5</i>	Transportador de sulfato	<i>K12G11.2(ok1048) V.</i>	No mapeado	<i>WT</i>
<i>sulp-7</i>	Transportador de sulfato	<i>sulp-7(ok3752) X.</i>	Delección (700 pb)-3 exones afectados	<i>WT</i>
<i>sulp-8</i>	Transportador de sulfato	<i>ZK287.2(ok2842) V.</i>	Delección (400 pb)-1 exón afectado	<i>WT</i>
<i>mrp-1</i>	Transportador ABC	<i>mrp-1(pk82) X.</i>	Delección (3200 pb)-6 exones afectados	<i>WT</i>
<i>mrp-2</i>	Transportador ABC	<i>mrp-2(ok2157) X.</i>	Delección (1300 pb)-4 exones afectados	<i>WT</i>
<i>mrp-3</i>	Transportador ABC	<i>mrp-3(ok955) X.</i>	Delección (650 pb)-1 exón afectado	<i>WT</i>
<i>mrp-4</i>	Transportador ABC	<i>mrp-4(ok1095) X.</i>	Delección (1800 pb)-3 exones	<i>WT</i>
<i>mrp-8</i>	Transportador ABC	<i>mrp-8(ok1360)III</i>	No mapeado	<i>WT</i>

6 Discusión general, conclusiones y perspectivas

El Se es un elemento esencial en cantidades traza para muchos organismos. Este oligoelemento juega un papel clave en numerosos procesos fisiológicos que incluyen las funciones tiroidea, cardiovascular, neuromuscular, reproductiva e inmune[1,2]. Su deficiencia, asociada a dietas pobres en Se, provoca alteraciones bioquímicas que pueden desencadenar diversas patologías[11]. Los efectos fisiológicos en su mayoría, son mediados por las selenoproteínas, muchas de las cuales son enzimas antioxidantes, en las que el Se es parte del sitio activo. Por otro lado, un exceso de este elemento es tóxico y puede desencadenar una variedad de condiciones fisiopatológicas, no obstante los mecanismos subyacentes no son totalmente comprendidos[11].

A pesar de importantes avances, se desconoce la función de muchas selenoproteínas así como ciertos aspectos básicos del metabolismo del Se (vías de asimilación, metabolización y excreción de las distintas especies químicas del Se). Conocer la función de las selenoproteínas y entender completamente el metabolismo del Se permitirá establecer cómo los desequilibrios de este oligoelemento afectan procesos fisiológicos y qué intervenciones pueden ser útiles frente a estos desequilibrios.

6.1 Estudio de la Selenoproteína T

El estudio de SELENOT en *C. elegans* permitió proponer un rol de esta proteína en la respuesta de evasión de estímulos aversivos. *C. elegans* ha desarrollado un sistema quimiosensorial que le permite detectar una gran variedad de señales volátiles (olfativas) y disueltas (gustativas) entre otras, asociadas con el alimento, el peligro y otros organismos, y responder con diferentes comportamientos[156]. Mutantes de delección en *selt-1.1* no desarrollan la característica respuesta de repulsión a los odorantes aversivos 2-nonanona y 1-octanol. Adicionalmente la respuesta de evasión de las bacterias patógenas *S. marcesens* y *P. aeruginosa* también se vió afectada en estos mutantes. Esta respuesta involucra la integración de un conjunto de señales mediado por muchas neuronas que dirige una inicial atracción por la bacteria y luego su repulsión[157]. Las neuronas AWB fueron identificadas como las responsables de la detección de serrawetina W2 producida por la bacteria *S. marcesens* [157], las neuronas BAG detectan el CO₂ el cual es una señal de la actividad metabólica de la bacteria y ejercen una regulación negativa sobre AWB[158,159] y las neuronas ASJ participan en la detección de óxido nítrico (NO) el cual también constituye una señal de peligro, dado que es producido por bacterias patógenas como *P. aeruginosa*[160]. Sumado a esto, se sugiere que señales internas del organismo, como la activación de las vías del sistema inmune innato conservadas en gusanos en respuesta a la infección, también son integradas

para finalmente desencadenar el comportamiento de evasión de la bacteria y salida del césped bacteriano[161]. Dado el resultado obtenido con el mutante en *selt-1.1* podría sugerirse que SELT-1.1 ejerce un rol en estas neuronas en particular en el contexto del comportamiento de evasión. En las neuronas ASJ se determinó que la ditiol-disulfuro óxidoreductasa TRX-1 está involucrada en las respuesta neuronal frente a la detección de NO, mediante las actividades de transnitrosilación y denitrosilación, involucrando tanto los residuos de Cys del motivo redox CxxC, así como una Cys adicional[160]. De manera análoga SELT-1.1 podría cumplir un rol similar. Tanto SELT-1.1 como SELT-1.2 adicionalmente al motivo redox CxxC poseen dos y un residuo de Cys, respectivamente. Una estrategia para examinar un posible rol de SELT-1.1 en distintos tipos de neuronas es la expresión del gen bajo promotores específicos neuronales y la examinación del rescate fenotípico. Si esta función es particular de *C. elegans* o nematodos o se puede extrapolar a otros organismos no lo sabemos, pero cabe destacar que en el pez cebra (que posee tres SELENOT) la SELENOT1 α , que es la de mayor similitud con SELT-1.1 tiene una expresión restringida a neuronas sensoriales, en particular fotorreceptores y vesículas olfativas[43]. De manera análoga a TRX-1, que se expresa sólo en las neuronas ASJ, la señalización neuronal en respuesta a un estímulo podría ser una función de SELT-1.2, dada su expresión en AWB. Sin embargo ante los estímulos analizados en la tesis no se logró elucidar un rol funcional.

Por otro lado, los mutantes de delección en *selt-1.1* son más sensibles a un estrés oxidativo agudo inducido por rotenona. Esto es consistente con el rol protector de SELENOT de neuronas DA descrito en ratones. También está reportado que la exposición de *C. elegans* a rotenona activa la vía de señalización p38MAPK ejerciendo un rol protector a la neurodegeneración[162], y por otro lado hay evidencia de que el rol de las neuronas BAG en la evasión de bacterias patógenas involucra la activación de esta vía de señalización durante la embriogénesis[159]. En nuestro trabajo, la neurodegeneración generada frente al estrés por rotenona fue evaluada mediante la expresión de GFP bajo el promotor de neuronas DA *dat-1* en los mutantes nulos en *selt-1.1* y silvestres (resultados preliminares no mostrados). El número de gusanos con al menos una neurona DA afectada fue significativamente mayor en los gusanos mutantes, consistente con un posible rol de SELT-1.1 en esta vía de señalización.

Asimismo, la localización de SELT-1.1 en el retículo endoplasmático, apoya la evidencia obtenida en líneas celulares de mamíferos que sostiene un rol de SELT-1.1 como un regulador de la liberación del calcio desde el RE de manera redox-dependiente[39]. Por otro lado se ha propuesto a SELENOT como una subunidad del complejo oligosacaril-transferasa tipo A y la interferencia de su expresión tiene un directo impacto en la estabilidad de dicho complejo, regulando así la señalización de respuesta a proteínas mal plegadas[40]. La identificación en *C. elegans* de alguna proteína con la que interactúe SELT-1.1 aportaría a la

determinación de su función. Con este objetivo, nos propusimos la realización de experimentos de *trapping in vivo* y posterior *pull down* de posibles complejos con SELT. Esta estrategia sería también importante para identificar proteínas que interactúen con SELT-1.2 lo cual sería informativo de su función. A estos efectos, se generaron construcciones de los genes *selt-1.1* y *selt-1.2* con el motivo redox mutante en la Cys resolutive (CxxC→SxxC), fusionado a una extensión C-terminal para su posterior purificación. Dichas construcciones se utilizaron para la generación de organismos transgénicos en las estirpes mutantes de delección en *selt-1.1* y en *selt-1.2*. La expresión de las proteínas mutantes del tipo SxxC en el organismo KO correspondiente permitirían "atrapar" intermediarios covalentes del ciclo catalítico en el ambiente fisiológico (**Fig. 6.1**) el cual podría ser purificado mediante experimentos de coimmunoprecipitación. En esta misma línea, el análisis del fenotipo de evasión de bacterias en los transgénicos con la Cys mutada, así como la generación de otros transgénicos con los otros residuos de Cys modificados, revelarían si el rol de SELT-1.1 en dicho fenotipo involucra un mecanismo redox.

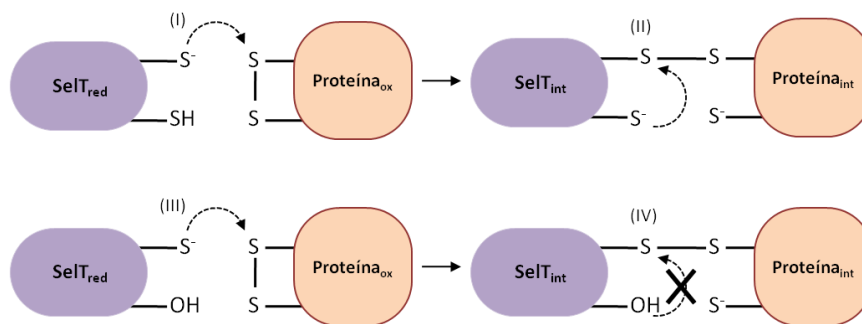


Fig. 6.1: Mecanismo de reacción propuesto para SELENOT a través del motivo redox CxxC. El esquema representa el mecanismo de reacción que comienza con el ataque nucleofílico de la Cys C-terminal sobre el disulfuro del blanco oxidado (I). Como resultado se forma un complejo intermedio con un disulfuro intermolecular (II), el cual luego es reducido por la "Cys de resolución" (II). Cuando la Cys resolutive es mutada a Ser el disulfuro intermolecular no puede ser reducido (IV) y el blanco queda atrapado.

En suma, los resultados obtenidos en *C. elegans* son consistentes con datos reportados en otros organismos, patrón de expresión así como rol protector de neuronas en condiciones de estrés oxidativo. Adicionalmente, se identificó un fenotipo asociado a la deficiencia de SELT-1.1 que involucra a esta proteína en la señalización de "peligro" (odorantes aversivos y patógenos) y respuesta de evasión. Dada el rol de SELENOT en la liberación de calcio desde el RE dependiente del motivo CxxC descrito en células mamíferas y lo reportado para TRX-1 en la

señalización neuronal, sugerimos que la participación de SELT-1.1 en la vía responsable del fenotipo de repulsión depende de un mecanismo redox. La elucidación de dicha vía de señalización en *C. elegans* puede ser informativa acerca de la función básica que cumple SELENOT en la célula y orientador de la función en otros tipos celulares, constituyendo así una herramienta valiosa para el estudio de la función de esta proteína. Por otro lado, la localización tan restrictiva de SELT-1.2 y la ausencia de los fenotipos observados para el mutante en *selt-1.2* sugieren una neofuncionalización restringida a la función de las neuronas AWB, luego de la duplicación génica del gen ancestral.

El conjunto de información relativa al rol de SELENOT en diferentes organismos, así como la esencialidad de esta proteína en mamíferos y la conservación de este gen durante la evolución (está presente en muchos organismos incluyendo protistas y plantas), sostienen el importante rol que esta proteína cumple tanto en el desarrollo como en el adulto. El conjunto de resultados, nos conducen a proponer un rol de SELENOT como un regulador o transductor de señales del RE con efectos en la supervivencia celular y del organismo, y por lo tanto con un impacto importante en el *fitness* del organismo.

6.2 Búsqueda de genes involucrados en el metabolismo del selenio mediante genética directa.

El eje de regulación EGL-9 VHL-1 HIF-1 está involucrado en la respuesta al selenio.

Para obtener pistas claves sobre el metabolismo del Se se utilizó una aproximación de genética directa. Por mutagénesis aleatoria y posterior selección a una concentración de selenito de sodio letal para la estirpe silvestre, se aislaron 9 mutantes. Se comenzó trabajando con 3 mutantes y en la determinación del modo de herencia de la(s) mutación(es) se determinó que 2 mutaciones son autosómicas recesivas y una de las mutaciones involucra un rearrreglo cromosómico, por lo que esta última estirpe se desestimó para estudios subsiguientes. Mediante secuenciación del genoma, se determinó que las dos estirpes poseen distintas mutaciones en el gen *egl-9*, en ambos casos proponemos resulta en una pérdida de función.

EGL-9 es una prolil hidroxilasa que actúa sobre el factor de transcripción HIF-1, al cual regula negativamente[112,117]. Tanto HIF-1 como EGL-9 están evolutivamente conservados en animales, incluyendo el ser humano, y regulan la respuesta adaptativa a la hipoxia y a otras condiciones de estrés[163]. En determinadas condiciones de estrés (e.g. hipoxia), la actividad de EGL-9 disminuye, permitiendo que HIF-1 active la transcripción de sus genes blanco[112,117,163,164] (e.g. en hipoxia HIF-1 activa más de un centenar de genes involucrados en la respuesta a baja tensión de oxígeno[164]). Si bien en la tesis no

se examinó el efecto directo de las mutaciones en *egl-9* sobre la actividad de HIF-1, por analogía con otros alelos mutantes de *egl-9* proponemos que la estirpe *egl-9(zf150)* tiene afectada la actividad hidroxilasa de EGL-9 y *egl-9(zf151)* resulta en una proteína truncada no funcional. Esto además es apoyado por el hecho de que la estirpe mutante con pérdida de función *egl-9(sa307)* reproduce el fenotipo de resistencia al selenito. Podrían realizarse experimentos adicionales para confirmar el efecto sobre HIF-1 a nivel de proteína (e.g. *western blot* detectando HIF-1 en lisado de gusanos *egl-9(zf150)* y *egl-9(zf151)*). También podría analizarse HIF-1 a nivel de su actividad transcripcional examinando la expresión de un gen blanco de este factor fusionado a un reportero.

En este trabajo, se determinó que mutantes en *egl-9* son más resistentes a condiciones tóxicas de Se que la estirpe silvestre. Dada la función de *egl-9* como regulador negativo del factor de transcripción HIF-1, la hipótesis planteada es que el fenotipo de resistencia sea consecuencia de la activación constitutiva de HIF-1 y por lo tanto de la expresión de genes blancos de HIF-1 involucrados en mecanismos de detoxificación de Se.

Los resultados obtenidos indican que, efectivamente, HIF-1 tiene un papel clave en la respuesta al Se. Mutantes de delección en *hif-1* son hipersensibles al selenito comparado con la estirpe silvestre y este fenotipo mutante es rescatado mediante la expresión del alelo silvestre de *hif-1* en la estirpe mutante. La exposición a selenito de mutantes en dos genes clave de las vías alternativas de regulación de HIF-1, *vhl-1* y *swan-1*[117,120,122], indican que VHL-1 pero no SWAN-1 está involucrado en la regulación, ya que la estirpe mutante en *vhl-1* es resistente a concentraciones tóxicas de selenito. En conjunto, los resultados confirman la participación de HIF-1 en la respuesta al Se y que la vía de regulación del factor de transcripción implica su hidroxilación por EGL-9 y posterior degradación en proteosoma.

El estudio de la localización de HIF-1 utilizando una estirpe transgénica que exprese una fusión reportera con *hif-1* permitiría confirmar su translocación al núcleo en respuesta al Se, evidenciando la respuesta directa de HIF-1 frente a este estímulo. En el marco de la tesis se generó una estirpe con la construcción traduccional de *hif-1* fusionada a GFP así como también se solicitó una estirpe con la fusión integrada al genoma. El análisis del patrón de expresión luego de un estrés con selenito es una actividad prevista, a realizar en breve. También sería interesante examinar si la respuesta al Se está restringida o tiene mayor relevancia en determinado tejido u órgano; el promotor de *hif-1* es activo en todas las células y en condiciones de hipoxia o H₂S la proteína HIF-1 es estabilizada también en todas las células[118]. Sin embargo, hay trabajos que indican que la regulación de la actividad de HIF-1 restringida a un grupo celular, como neuronas o músculo, son capaces de rescatar parcialmente fenotipos de mutantes de delección en *hif-1*[165]. Por otro lado, está reportado que la activación del factor de transcripción *daf-16* en

el intestino rescata el fenotipo de neurodegeneración generado en presencia de concentraciones altas de selenito[106]. Podría ser interesante evaluar si la actividad neuronal (o en otro tejido) de HIF-1 es suficiente para la supervivencia en selenito.

HIF-1 regula la respuesta a distintos estreses adicionales a la hipoxia. En este sentido es importante señalar que diferentes señales como el H₂S y la hipoxia promueven la actividad transcripcional de HIF-1, pero causan patrones de expresión diferentes de los genes regulados por HIF-1[139]. El HCN y el H₂S activan la respuesta mediada por HIF-1, pero parte del mecanismo no es completamente comprendido. Ambos compuestos son inhibidores del complejo IV de la cadena de electrones de la mitocondria. El bloqueo de la cadena de electrones es una causa de aumento de ROS intracelular, estímulo que es capaz de influir en la activación de HIF-1[166]. Dentro de los genes regulados por HIF-1 en respuesta al H₂S, se encuentra *sqrd-1* el cual codifica para la enzima SQRD-1, esencial en la oxidación y detoxificación del H₂S. Adicionalmente el gen *cysl-2* también aumenta su expresión en condiciones de H₂S y HCN. La proteína CYSL-2 es miembro de la familia OAS-TL, características de bacterias y plantas, y cataliza la asimilación de HCN generando β-cianoalanina y H₂S. Corriente abajo de CYSL-2 funciona CYSL-1, parálogo del primero, el cual puede consumir el H₂S generado. Sin embargo, su rol más relevante no es la asimilación del H₂S mediante la actividad sulfidrilasa, sino que se propone un rol de CYSL-1 como sensor del H₂S y regulador negativo de EGL-9. En presencia de H₂S, CYSL-1 inactiva a EGL-9 y colabora con la actividad de HIF-1 y la regulación de la expresión génica. De esta manera se establece una especie de mecanismo de retroalimentación positiva con CYSL-2.

Mutantes de delección en *cysl-1* fueron más sensibles que la estirpe silvestre en presencia de selenito. Estos resultados involucran a CYSL-1 en la vía de respuesta al Se.

Para discriminar si la sensibilidad del mutante en *cysl-1* es debida a la interacción con EGL-9 o a la asimilación de H₂Se, se generó el doble mutante en *cysl-1* y *egl-9*. Esta estirpe confirió resistencia al selenito lo cual indica que CYSL-1 está “vía arriba” de HIF-1, probablemente como sensor de Se, de forma análoga a la respuesta al H₂S en la que interacciona con EGL-9 y promueve la activación de HIF-1.

La activación de HIF-1 independiente de hipoxia involucrando al circuito CYSL-1→EGL-9→HIF-1→SQRD-1+CYSL-2 que permite la detección de H₂S (vía CYSL-1) y la posterior eliminación de los metabolitos HCN y H₂S se propone sería parte de la respuesta adaptativa a H₂S y HCN, producidos por bacterias patógenas[119]. Es posible sugerir que esta vía de respuesta al Se tiene un papel adaptativo, fisiológico, en ambientes seleníferos.

En suma, el presente trabajo reveló que CYSL-1, EGL-9 y HIF-1 son claves en la respuesta de *C. elegans* al Se. A su vez se generan interrogantes en relación a los blancos de HIF-1 (los genes regulados por HIF-1) que pueden mediar esta respuesta. Resultados obtenidos en el trabajo publicado previamente sobre la regulación génica en condiciones de Se apoyan los resultados obtenidos en esta tesis y sugieren posibles blancos de HIF-1 que podrían ser examinados a futuro, como por ejemplo el gen *nhr-57*.

Los principales hallazgos de este módulo de la tesis, así como la interrogante principal derivada de los mismos se resumen la **Fig. 6.2**.

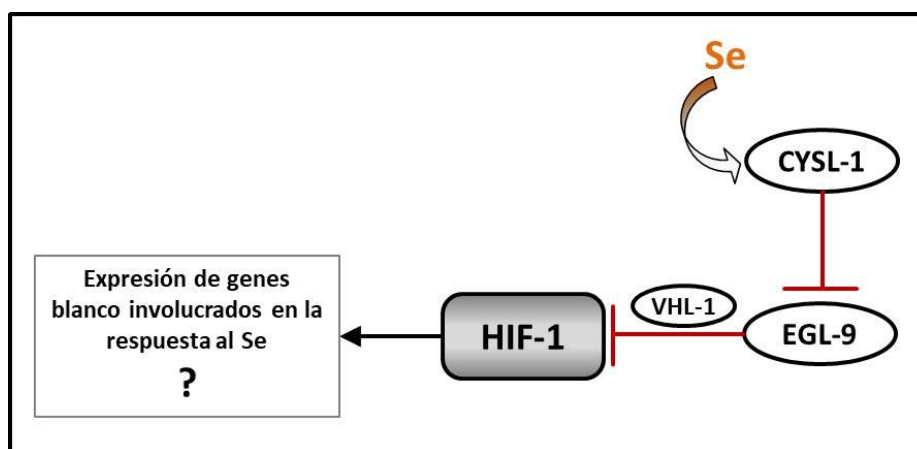


Fig. 6.2: Representación del mecanismo de detoxificación del selenio propuesto dado los resultados obtenidos. En presencia de selenio, la proteína CYSL-1 recluta a EGL-9, impidiendo la represión que EGL-9 ejerce sobre HIF-1. Además, en condiciones de alto selenio, dilucidamos que el mecanismo de represión de HIF-1 implica la hidroxilación del mismo y la participación de la proteína ubiquitin ligasa VHL-1.

La vía de oxidación de H₂S como posible blanco de HIF-1

Una vez determinada la participación de HIF-1 en la respuesta al Se, la siguiente pregunta fue cuáles son los genes regulados por HIF-1 responsables de esta respuesta. Diferentes elementos y resultados nos condujeron a proponer que H₂Se podría ser la especie química responsable de la activación de HIF-1 vía CYSL-1 y al gen *sqrd-1* como gen candidato regulado por HIF-1: i) la similitud de los átomos de azufre y Se, ii) la participación de SQRD-1 y CYSL-1 en la respuesta al H₂S, iii) los mutantes de delección en *egl-9* son resistentes tanto al selenito como a la selenometionina, formas del Se orgánica e inorgánica que se presume convergen en el metabolito celular H₂Se.

Por otro lado, la hipótesis de *sqrd-1* como posible blanco de HIF-1 en respuesta al Se también es apoyada por resultados obtenidos en el trabajo previo en el cual examinan el transcriptoma de *C. elegans* en presencia de selenito. Dentro de los

genes cuya expresión aumenta en presencia de 0.1 mM de selenito (en comparación con la condición sin Se) se encuentra el gen *sqrd-1*.

SQRD-1 cataliza la oxidación de H₂S. Si el H₂Se fuese sustrato de SQRD-1, los mutantes de delección en *sqrd-1* deberían ser más sensibles al Se, sin embargo la exposición de la estirpe *sqrd-1(tm3378)* a selenito no se diferenció con la estirpe silvestre. Sería necesario examinar estos mutantes en presencia de H₂Se para generar la situación análoga al H₂S.

El genoma de *C. elegans* además codifica para un parálogo de *sqrd-1*, *sqrd-2*. La exposición de mutantes en *sqrd-2* a selenito tampoco se diferenció con la estirpe silvestre. Por lo tanto, con los resultados obtenidos hasta el momento, se descarta la participación de la familia SQRD en la respuesta al selenito.

La vía de oxidación del H₂S involucra otras tres enzimas: persulfuro dioxigenasa (PDO o ETHE-1), tiosulfato transferasa (TST o MPST-7) y sulfito oxidasa (SUOX) (**Fig. 4.19**). La PDO cataliza la oxidación dependiente de oxígeno del persulfuro de glutatión ($GSSH + H_2O + O_2 \rightarrow SO_3^{2-} + GSH + 2H^+$). La TST exhibe una variedad de actividades de azufre transferasa. Preferencialmente cataliza la síntesis de tiosulfato utilizando como sustrato glutatión persulfuro ($GSSH + SO_3^{2-} \rightarrow S_2O_3^{2-} + GSH$) siendo la reacción directa la que preferentemente tiene lugar. En la oxidación del H₂S por la SQRD-1 se transfieren dos electrones a la ubiquinona y el azufre a una molécula aceptora que según sea el sulfito o glutatión, se produce tiosulfato o glutatión persulfuro, respectivamente. Estos productos podrán ser utilizados como sustratos por la PDO y la TST. Eventualmente el sulfito formado es consumido por la SUOX produciendo sulfato (SO_4^{2-}) [123] (**Fig. 4.19**).

Hay muchas reacciones descritas para el selenito dentro de la célula, y muchas de ellas involucran enlaces selenilsulfuro. Entre ellas una forma detectada *in vivo* y clasificada como forma de excreción del Se de las células es el selenodiglutatión (GS-Se-SG), en tanto el selenoglutatión (GSSeH) puede ser un metabolito intermediario formado dentro de las células.

Dado el contexto detallado antes, se propuso el estudio de un posible rol de las enzimas PDO y TST en el metabolismo del Se. El gen con mayor homología con el gen TST humano fue un miembro de la familia de las rodanesas azufre transferasa (en *C. elegans* denominada familia mercaptopiruvato azufre transferasa), *mpst-7*.

Se examinaron las estirpes de delección *ethe-1* y *mpst-7* en presencia de selenito. Los resultados obtenidos con estas estirpes no son totalmente concluyentes, pero sugieren que ambos genes podrían vincularse a la respuesta al Se. Por un lado, la estirpe mutante *ethe-1* muestra una tendencia a ser más resistente que la silvestre a 10 mM de selenito. Dada la reacción catalizada por esta enzima, en el supuesto caso de que utilice el selenoglutatión como sustrato, la acumulación del compuesto podría tener un efecto regulador que eventualmente podría contribuir al fenotipo

de resistencia observado. Sin embargo, los mutantes *ethe-1* en presencia de H₂S son más sensibles que los silvestres[119].

Por otro lado, la estirpe mutante en *mpst-7* muestra una tendencia a ser más sensible que la silvestre. En este caso, dado que la reacción que preferencialmente cataliza es la síntesis de tiosulfato utilizando sulfito como sustrato, si la MPST-7 utiliza al selenito como sustrato, contribuiría a la disminución de la concentración de selenito formando un análogo con Se del tiosulfato, que podría ser menos tóxica. Por lo tanto la ausencia de esta enzima resultaría en un organismo más sensible al selenito. Alternativamente, la no remoción de selenoglutación, otro posible sustrato de esta enzima, podría relacionarse con el fenotipo observado. La participación de la familia de proteínas MPST en el metabolismo del Se es apoyado por los datos de transcriptómica en el cual el gen que codifica para la MPST-3 aumenta en presencia de Se. Considerando que tanto ETHE-1 como MPST-7 utilizan glutatión persulfuro como sustrato (y eventualmente selenoglutación), al tiempo que ETHE-1 genera sulfito (y eventualmente selenito) y MPST-7 lo consume, sería importante evaluar el doble mutante, para poder diseccionar más finamente las respuestas observadas.

Finalmente, se examinó la respuesta de organismos deficientes en SUOX-1, sulfito oxidasa, en presencia de selenito. Dado que no se diferenció con la estirpe silvestre se descartó el rol de esta enzima en el metabolismo del Se.

Respuesta al selenio a nivel transcripcional

La respuesta a través de la activación de un factor de transcripción en presencia de Se ya había sido reportada en trabajos anteriores. Tanto el factor DAF-16 como SKN-1 han sido relacionados con la respuesta a Se.

La activación de DAF-16 en presencia de Se es propuesto como consecuencia del aumento de ROS generado en presencia de concentraciones tóxicas de selenito de sodio. El modelo sugiere que las especies reactivas del oxígeno inhiben la activación de AKT-1 (quinasa encargada de fosforilar e inactivar DAF-16), resultando en DAF-16 activo. La activación de DAF-16 resulta en una disminución de los efectos neurodegenerativos generados frente a la exposición de altas concentraciones de Se [101].

Por otro lado, el factor de transcripción SKN-1 regula la expresión de genes tanto en respuesta al selenito como al H₂S[108,139], situación análoga a lo propuesto en esta tesis para el factor HIF-1. Además, ambos factores de transcripción (HIF-1 y SKN-1) actúan juntos para coordinar la respuesta transcripcional en presencia de H₂S[139]. En *C. elegans* SKN-1 juega un rol importante en la respuesta inmune, estrés redox y xenobiótico, y el patrón de genes regulados es diferente según el tipo de estrés afrontado. Lo mismo sucede para HIF-1, el cual la mayoría de los genes que regula son diferentes en respuesta a hipoxia y en respuesta a H₂S[139].

En conjunto, es posible proponer que *C. elegans* posee mecanismos de respuesta a ambientes con Se que involucran una actividad coordinada por varios factores de transcripción, SKN-1, DAF-16 y HIF-1.

7 Agradecimientos

A Gustavo Salinas por su enseñanza constante, apoyo, generosidad y paciencia. Fue una gran suerte haberlo tenido como supervisor de tesis de grado y posgrado, y ahora poder seguir trabajando juntos.

A los compañeros que han sido parte del laboratorio de gusanos: Mariana Bonilla, Lucía Otero, Hugo Bisio, Vivian Pasquet, Inés Carrera, Jorge Pórfido, Cecilia Martínez y Gastón Risi. Ha sido muy enriquecedor y divertido haber compartido el trabajo con ustedes.

A los compañeros de la Cátedra de Inmunología, especialmente a la "casita del medio": Cecilia Fernández, Ana Ferreira, Álvaro Díaz, Fernanda Alonso, Leonardo Pelizza, Martín Fló, Valeria Silva, María Lamas, Maite Folhe, Lucía Minarrieta, Alvaro Pittini, Paula Seoane, y Cecilia Casaravilla. Fue un placer trabajar con ustedes.

A Mark Alkema, Jennifer K. Pirri, Yang-Chi Huang, Christopher M. Clark, Jeremy Florman and Claire Bernard, quienes de diferentes maneras colaboraron en el aprendizaje de la generación de organismos transgénicos, de organismos mutantes y el mapeo de mutaciones.

A Antonio Miranda, quien además de donarnos estirpes de gusanos y de bacterias para realizar experimentos de ARN de interferencia siempre estuvo a las órdenes en evacuar dudas y dar sugerencias que mejoren el trabajo.

A los compañeros del laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos por su gran apoyo cuando recién ingresamos al Instituto, su interés y aportes en las reuniones mensuales y constante colaboración en el trabajo.

A la Dra. María Doitsidou quien realizó el análisis de las secuencias del genoma de los mutantes.

A Andrea Calixto quien donó varias estirpes de bacterias para ARN de interferencia.

A la unidad de experimentación animal, los grupos de investigación liderados por José Badano y Flavio Zolessi y a Luis Inchausti, quienes de diferentes maneras colaboraron en hacer posible la generación de gusanos transgénicos en el Institut Pasteur de Montevideo.

A la Unidad de Cristalografía quienes donaron la Selenometionina y la estirpe de bacterias TOP10'.

A Marcela Díaz y Tabaré de los Campos de la Unidad de Microscopía quienes siempre dieron una mano con el uso de microscopios y análisis de imágenes.

A la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica por su apoyo en experimentos de proteómica (que finalmente no terminaron formando parte de la tesis, pero que fueron muy interesantes y enriquecedores en esta etapa de aprendizaje) y por la estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* PA14.

A los compañeros y compañeras de oficina y del resto del Instituto Pasteur que hacen el día a día muy agradable, además de siempre estar con disposición de colaborar con el trabajo.

Al *Caenorhabditis Genetic Center* y *National Bioresource Project*, los cuales fueron la fuente de la mayoría de las estirpes de *Caenorhabditis elegans* utilizado en la tesis.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Comisión Académica de Posgrado, PEDECIBA Biología y CSIC por el apoyo económico.

8 Referencias

- [1] V.M. Labunskyy, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles., *Physiol. Rev.* 94 (2014) 739–777. doi:10.1152/physrev.00039.2013.
- [2] M.P. Rayman, The influence of selenium to human health, *Lancet.* 356 (2000) 233–241. doi:10.1016/s0140-6736(00)02490-9.
- [3] I. of Medicine, Selenium, in: *Diet. Ref. Intakes Vitam. C, Vitam. E, Selenium, Carotenoids*, The National Academies Press, Washington, DC, 2000: pp. 284–319. doi:10.17226/9810.
- [4] L. Flohé, The labour pains of biochemical selenology: The history of selenoprotein biosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1790 (2009) 1389–1403. doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.031.
- [5] D.G. Barceloux, Selenium, *Clin. Toxicol.* 37 (1999) 145–172. doi:https://doi.org/10.1081/CLT-100102417.
- [6] V.N. Gladyshev, Selenoproteins and selenoproteomes, in: D.L. Hatfield, M.J. Berry, V.N. Gladyshev (Eds.), *Selenium Its Mol. Biol. Role Hum. Heal.*, 3rd ed., Springer New York, New York, 2012: pp. 109–123. doi:10.1007/978-1-4614-1025-6_9.
- [7] V.N. Gladyshev, Eukariotic Selenoproteomes, in: D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, M.J. Berry, U. Schweizer, P.A. Tsuji (Eds.), *Selenium Its Mol. Biol. Role Hum. Heal.*, 4th ed., Springer New York, New York, 2016: pp. 127–138. doi:10.1007/978-3-319-41283-2.
- [8] M. Conrad, C. Jakupoglu, S.G. Moreno, S. Lippl, A. Banjac, M. Schneider, H. Beck, A.K. Hatzopoulos, U. Just, F. Sinowatz, W. Schmahl, K.R. Chien, W. Wurst, G.W. Bornkamm, M. Brielmeier, Essential Role for Mitochondrial Thioredoxin Reductase in Hematopoiesis, Heart Development, and Heart Function, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 9414–9423. doi:10.1128/MCB.24.21.9414-9423.2004.
- [9] C. Jakupoglu, G.K.H. Przemek, M. Schneider, S.G. Moreno, N. Mayr, A.K. Hatzopoulos, M.H. de Angelis, W. Wurst, G.W. Bornkamm, M. Brielmeier, M. Conrad, Cytoplasmic Thioredoxin Reductase Is Essential for Embryogenesis but Dispensable for Cardiac Development, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 1980–1988. doi:10.1128/MCB.25.5.1980-1988.2005.
- [10] A. Seiler, M. Schneider, H. Förster, S. Roth, E.K. Wirth, C. Culmsee, N. Plesnila, E. Kremmer, O. Rådmark, W. Wurst, G.W. Bornkamm, U. Schweizer, M. Conrad, Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translates Oxidative Stress into 12/15-Lipoxygenase Dependent- and AIF-Mediated Cell Death, *Cell Metab.* 8 (2008) 237–248. doi:10.1016/j.cmet.2008.07.005.
- [11] S.J. Fairweather-tait, Y. Bao, M.R. Broadley, R. Collings, D. Ford, J.E. Hesketh, R. Hurst, Selenium in Human Health and Disease, *Antioxidants Redox Signal.* 14 (2011) 1337–1383. doi:10.1089/ars.2010.3275.
- [12] J. Köhrle, Selenium and the thyroid, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 22 (2015) 392–401. doi:10.1097/MED.000000000000190.
- [13] J. Handy, Diane, Loscalzo, Selenoproteins in Cardiovascular Redox pathology, in: G.V.N. Hatfield Dolph L., Berry Marla J. (Ed.), *Selenium Its Mol. Biol. Role Hum. Heal.*, 3rd ed., Springer New York, New York, 2012: pp. 249–259. doi:10.1007/978-1-4614-1025-6_19.
- [14] U. Schweizer, Selenoproteins in the nervous system development, function and degeneration, in: D.L. Hatfield, M.J. Berry, V.N. Gladyshev (Eds.), *Selenium Its Mol. Biol. Role Hum. Heal.*, 3rd ed., Springer New York, New York, 2012: pp. 235–248. doi:10.1007/978-1-4614-1025-6_18.
- [15] V.N. Turanov, Anton A, Malinouski, Mikalai. and Gladyshev, Selenium and Male Reproduction, in: D.L. Hatfield, M.J. Berry, V.N. Gladyshev (Eds.), *Selenium Its Mol. Biol. Role*

- Hum. Heal., 3rd ed., Springer New York, New York, 2012: pp. 409–417. doi:10.1007/978-1-4614-1025-6_32.
- [16] M. Vinceti, E.T. Wei, C. Malagoli, M. Bergomi, G. Vivoli, Adverse health effects of selenium in humans, *Rev. Environ. Health.* 16 (2001) 233–251. doi:10.1515/REVEH.2001.16.4.233.
- [17] M.H. Yoo, X.M. Xu, B. a. Carlson, A.D. Patterson, V.N. Gladyshev, D.L. Hatfield, Targeting thioredoxin reductase 1 reduction in cancer cells inhibits self-sufficient growth and DNA replication, *PLoS One.* 2 (2007) 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0001112.
- [18] M. Rother, Prokaryotic Selenoprotein Biosynthesis and Function, in: D.L. Hatfield, U. Schweizer, P. a. Tsuji, V.N. Gladyshev (Eds.), *Selenium Its Mol. Biol. Role Hum. Heal.*, 4th ed., Springer New York, New York, 2016: pp. 47–58. doi:10.1007/978-3-319-41283-2.
- [19] A. Bock, K. Forchhammer, J. Heider, C. Baron, Selenoprotein Synthesis an Expansion of the Genetic code, *Trends Biochem. Sci.* 16 (1991) 463–467.
- [20] S.C. Low, M.J. Berry, Knowing when not to stop: Selenocysteine incorporation in eukaryotes, *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996) 203–208. doi:10.1016/S0968-0004(96)80016-8.
- [21] W. Leinfelder, E. Zehelein, M.-A. Mandrand-Berthelot, A. Bock, Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine, *Nature.* 331 (1988) 723–725.
- [22] X.M. Xu, B.A. Carlson, H. Mix, Y. Zhang, K. Saira, R.S. Glass, M.J. Berry, V.N. Gladyshev, D.L. Hatfield, Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes, *PLoS Biol.* 5 (2007) 0096–0105. doi:10.1371/journal.pbio.0050004.
- [23] A. Böck, K. Forchhammer, J. Heider, W. Leinfelder, G. Sawers, B. Veprek, F. Zinoni, Selenocysteine: the 21st amino acid, *Mol. Microbiol.* 5 (1991) 515–520. doi:10.1111/j.1365-2958.1991.tb00722.x.
- [24] K. Forchhammer, W. Leinfelder, A. Bock, Identification of novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein, *Nature.* 342 (1989) 453–456. doi:10.1038/340301a0.
- [25] B.A. Carlson, X.-M. Xu, G. V. Kryukov, M. Rao, M.J. Berry, V.N. Gladyshev, D.L. Hatfield, Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA^{[Ser]_{Sec}} kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004) 12848–12853. doi:10.1073/pnas.0402636101.
- [26] M. Rother, A. Resch, R. Wilting, A. Böck, Selenoprotein synthesis in archaea, *BioFactors.* 14 (2001) 75–83. doi:10.1002/biof.5520140111.
- [27] P.R. Copeland, J.E. Fletcher, B.A. Carlson, D.L. Hatfield, D.M. Driscoll, A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs, *EMBO J.* 19 (2000) 306–314. doi:10.1093/emboj/19.2.306.
- [28] R.J. Hondal, E.L. Ruggles, Differing views of the role of selenium in thioredoxin reductase, *Amino Acids.* 41 (2011) 73–89. doi:10.1007/s00726-010-0494-6.
- [29] R.J. Hondal, S.M. Marino, V.N. Gladyshev, Selenocysteine in Thiol/Disulfide-Like Exchange Reactions 1,2, 18 (2013). doi:10.1089/ars.2012.5013.
- [30] E.S.J. Arnér, Selenoproteins — What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine ?, *Exp. Cell Res.* 316 (2010) 1296–1303. doi:10.1016/j.yexcr.2010.02.032.
- [31] E.L. Ruggles, G.W. Snider, R.J. Hondal, Chemical Basis for the Use of Selenocysteine, in: D.L. Hatfield, M.J. Berry, V.N. Gladyshev (Eds.), *Selenium Its Mol. Biol. Role Hum. Heal.*, 3rd ed., Springer New York, 2012: pp. 73–83. doi:10.1007/978-1-4614-1025-6_6.
- [32] K. Cupp-Sutton, M. Ashby, Biological Chemistry of Hydrogen Selenide, *Antioxidants.* 5 (2016) 42. doi:10.3390/antiox5040042.

- [33] V.N. Gladyshev, Eukaryotic Selenoproteomes, in: D.L. Hatfield, U. Schweizer, P.A. Tsuji, V.N. Gladyshev (Eds.), *Selenium Its Mol. Biol. Role Hum. Heal.*, 4th ed., 2016: pp. 127–138. doi:10.1007/978-3-319-41283-2.
- [34] G. V. Kryukov, V.M. Kryukov, V.N. Gladyshev, New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 33888–33897. doi:10.1074/jbc.274.48.33888.
- [35] A. Dikiy, S. V. Novoselov, D.E. Fomenko, A. Sengupta, B. a. Carlson, R.L. Cerny, K. Ginalski, N. V. Grishin, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, SelT, SelW, SelH, and Rdx 12: Genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family, *Biochemistry.* 46 (2007) 6871–6882. doi:10.1021/bi602462q.
- [36] J.L. Martin, Thioredoxin - a fold for all reasons, 131 (1995).
- [37] V. a Shchedrina, Structure–Function Relations, Physiological Roles, and Evolution of Mammalian ER-Resident Selenoproteins, *Antioxid. Redox Signal.* 12 (2010) 839–849.
- [38] Y. Tanguy, A. Falluel-Morel, S. Arthaud, L. Boukhzar, D.L. Manecka, A. Chagraoui, G. Prevost, S. Elias, I. Dorval-Coiffec, J. Lesage, D. Vieau, I. Lihrmann, B. Jégou, Y. Anouar, The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes, *Endocrinology.* 152 (2011) 4322–4335. doi:10.1210/en.2011-1246.
- [39] L. Grumolato, H. Ghzili, M. Montero-Hadjadje, S. Gasman, J. Lesage, Y. Tanguy, L. Galas, D. Ait-Ali, J. Leprince, N.C. Guérineau, A.G. Elkahoul, A. Fournier, D. Vieau, H. Vaudry, Y. Anouar, Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion., *FASEB J.* 22 (2008) 1756–1768. doi:10.1096/fj.06-075820.
- [40] A. Hamieh, D. Cartier, H. Abid, A. Calas, C. Burel, C. Bucharles, C. Jehan, L. Grumolato, M. Landry, P. Lerouge, Y. Anouar, I. Lihrmann, Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion, *EMBO Rep.* 18 (2017) 1935–1946. doi:10.15252/embr.201643504.
- [41] D. PURVES, Plasticity of Mature Synapses and Circuits, in: D. PURVES (Ed.), *Neuroscience*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2004: pp. 575–610.
- [42] G. Prevost, A. Arabo, L. Jian, E. Queleynec, D. Cartier, S. Hassan, A. Falluel-Morel, Y. Tanguy, S. Gargani, I. Lihrmann, J. Kerr-Conte, H. Lefebvre, F. Pattou, Y. Anouar, The PACAP-regulated gene selenoprotein T is abundantly expressed in mouse and human β -cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance, *Endocrinology.* 154 (2013) 3796–3806. doi:10.1210/en.2013-1167.
- [43] C. Thisse, A. Degrave, G.V.G. V. Kryukov, V.N. Gladyshev, S. Obrecht-Pflumio, A. Krol, B. Thisse, A. Lescure, Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish, *Gene Expr. Patterns.* 3 (2003) 525–532. doi:10.1016/S1567-133X(03)00054-1.
- [44] L. Boukhzar, A. Hamieh, D. Cartier, Y. Tanguy, I. Alsharif, M. Castex, A. Arabo, S. El Hajji, J.-J. Bonnet, M. Errami, A. Falluel-Morel, A. Chagraoui, I. Lihrmann, Y. Anouar, Selenoprotein T Exerts an Essential Oxidoreductase Activity That Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson’s Disease, *Antioxid. Redox Signal.* 24 (2016) 557–574. doi:10.1089/ars.2015.6478.
- [45] D.L. Sengupta, A., Carlson, B. A., Labunskyy, V. M., Gladyshev, V. N. & Hatfield, Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells., *Biochem. Cell Biol.* 87 (2009) 953–961. doi:doi:10.1139/o09-064.
- [46] P.D. Whanger, Selenoprotein expression and function-Selenoprotein W, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1790 (2009) 1448–1452. doi:10.1016/j.bbagen.2009.05.010.

- [47] M. Guo, X. Gao, N. Zhang, C. Qiu, C. Li, G. Deng, Effects of Se on the Diversity of SelT Synthesis and Distribution in Different Smooth Muscle Tissues in Rats, *Biol. Trace Elem. Res.* 170 (2016) 340–347. doi:10.1007/s12011-015-0444-y.
- [48] J. ping Li, J. xuan Zhou, Q. Wang, G. qin Gu, S. jin Yang, C. ye Li, C. wei Qiu, G. zhen Deng, M. yao Guo, Se Enhances MLCK Activation by Regulating Selenoprotein T (SelT) in the Gastric Smooth Muscle of Rats, *Biol. Trace Elem. Res.* 173 (2016) 116–125. doi:10.1007/s12011-016-0620-8.
- [49] M.T. Castex, A. Arabo, M. Bénard, V. Roy, V. Le Joncour, G. Prévost, J.-J. Bonnet, Y. Anouar, A. Falluel-Morel, Selenoprotein T Deficiency Leads to Neurodevelopmental Abnormalities and Hyperactive Behavior in Mice, *Mol. Neurobiol.* (2015). doi:10.1007/s12035-015-9505-7.
- [50] K. Ikematsu, R. Tsuda, S. Tsuruya, I. Nakasono, Identification of novel genes expressed in hypoxic brain condition by fluorescence differential display, *Forensic Sci. Int.* 169 (2007) 168–172. doi:10.1016/j.forsciint.2006.08.015.
- [51] K.T. Suzuki, Metabolomics of Selenium: Se Metabolites Based on Speciation Studies, *J. Heal. Sci.* 51 (2005) 107–114. doi:10.1248/jhs.51.107.
- [52] M.D. Wolfe, Selenophosphate Synthetase, *EcoSal Plus.* (2004). doi:10.1128/ecosalplus.3.6.1.1.2.
- [53] W.M. Haynes, ed., Dissociation Constants of Inorganic Acids and Bases, in: *CRC Handb. Chem. Phys.*, 96th Editi, CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 2016: pp. 5–92.
- [54] H. Mihara, R. Tobe, N. Esaki, Mechanism, Structure, and Biological Role of Selenocysteine Lyase, in: D.L. Hatfield, P. a. Tsuji, U. Schweizer, V.N. Gladyshev (Eds.), *Selenium Its Mol. Biol. Role Hum. Heal.*, 4th ed., Springer New York, New York, 2016: pp. 113–122. doi:10.1007/978-3-319-41283-2.
- [55] J. Fernandes, X. Hu, M. Ryan Smith, Y.M. Go, D.P. Jones, Selenium at the redox interface of the genome, metabolome and exposome, *Free Radic. Biol. Med.* 127 (2018) 215–227. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.002.
- [56] a. Nickel, G. Kottra, G. Schmidt, J. Danier, T. Hofmann, H. Daniel, Characteristics of transport of selenoamino acids by epithelial amino acid transporters, *Chem. Biol. Interact.* 177 (2009) 234–241. doi:10.1016/j.cbi.2008.09.008.
- [57] T. Okuno, H. Ueno, K. Nakamuro, Cystathionine gamma-lyase contributes to selenomethionine detoxification and cytosolic glutathione peroxidase biosynthesis in mouse liver., *Biol. Trace Elem. Res.* 109 (2006) 155–171. doi:10.1385/BTER:109:2:155.
- [58] C.A. Weller, M. Green, M e t h i o n y l - t R N A Synthetase Detected by [7 ~ Se] Selenomethionine in Lenses from Normal and Galactose-fed Rats .* Department of Biological Sciences , Hu . nter CoUeqe of The City University of New York , *Exp. Eye Res.* 8 (1969) 84–90. doi:10.1016/s0014-4835(69)80084-9.
- [59] N. Esaki, T. Nakamura, H. Tanaka, K. Soda, Selenocysteine Lyase , a Novel Enzyme That Specifically Acts on Selenocysteine, *Biol. Chem.* 257 (1982) 4386–4391.
- [60] R.J. Turner, J.H. Weiner, D.E. Taylor, Selenium metabolism in *Escherichia coli.*, *Biometals.* 11 (1998) 223–227.
- [61] M. Bebien, J.P. Chauvin, J.M. Adriano, S. Grosse, A. Verméglio, Effect of Selenite on Growth and Protein Synthesis in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 4440–4447. doi:10.1128/AEM.67.10.4440-4447.2001.
- [62] J. Guzzo, M.S. Dubow, A novel selenite- and tellurite-inducible gene in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 4972–4978. doi:10.1128/AEM.66.11.4972-4978.2000.
- [63] T. Kitajima, Y. Chiba, Selenomethionine metabolism and its toxicity in yeast, *Biomol.*

Concepts. 4 (2013) 611–616. doi:10.1515/bmc-2013-0033.

- [64] H. Cherest, J.-C. Davidian, D. Thomas, V. Benes, W. Ansorge, Y. Surdin-Kerjan, Molecular Characterization of Two High Affinity Sulfate Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genet. Soc. Am.* 145 (1997) 627–635. doi:10.1515/BC.2011.017.
- [65] M. Lazard, S. Blanquet, P. Fiscaro, G. Labarraque, P. Plateau, Uptake of selenite by *Saccharomyces cerevisiae* involves the high and low affinity orthophosphate transporters, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 32029–32037. doi:10.1074/jbc.M110.139865.
- [66] M. Kieliszek, S. Błażej, I. Gientka, A. Bzducha-Wróbel, Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 5373–5382. doi:10.1007/s00253-015-6650-x.
- [67] J.R. McDermott, B.P. Rosen, Z. Liu, Jen1p: A High Affinity Selenite Transporter in Yeast, *Mol. Biol. Cell.* 21 (2010) 3934–3941. doi:10.1091/mbc.E10.
- [68] K.T. Suzuki, Y. Shiobara, M. Itoh, M. Ohmichi, Selective uptake of selenite by red blood cells, *Analyst.* 123 (1998) 63–67. doi:10.1039/a706230c.
- [69] Y. Shiobara, K.T. Suzuki, Binding of selenium (administered as selenite) to albumin after efflux from red blood cells, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 710 (1998) 49–56. doi:10.1016/S0378-4347(98)00142-X.
- [70] M. Bjornstedt, S. Kumar, Selenodiglutathione Is a Highly Efficient Oxidant of Reduced Thioredoxin and a Substrate for Mammalian Thioredoxin Reductase*, (1992) 8030–8035.
- [71] S. KUMAR, M. BJÖRNSTEDT, A. HOLMGREN, Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non-stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen, *Eur. J. Biochem.* 207 (1992) 435–439. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb17068.x.
- [72] J. Kessi, K.W. Hanselmann, Similarities between the abiotic reduction of selenite with glutathione and the dissimilatory reaction mediated by *Rhodospirillum rubrum* and *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 50662–50669. doi:10.1074/jbc.M405887200.
- [73] Y. Kobayashi, Y. Ogra, K.T. Suzuki, Speciation and metabolism of selenium injected with ⁸²Se-enriched selenite and selenate in rats, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 760 (2001) 73–81. doi:10.1016/S0378-4347(01)00252-3.
- [74] U. Schweizer, L. Schomburg, J. Kohrle, Selenoprotein P Selenium Distribution in Mammals, in: D.L. Hatfield, U. Schweizer, P. a. Tsuji, V.N. Gladyshev (Eds.), *Selenium Its Mol. Biol. Role Hum. Heal.*, 4th ed., Springer New York, New York, 2016: pp. 261–274. doi:10.1007/978-3-319-41283-2_22.
- [75] R.F. Burk, K.E. Hill, Regulation of Selenium Metabolism and Transport, *Annu. Rev. Nutr.* 35 (2015) 150514143029003. doi:10.1146/annurev-nutr-071714-034250.
- [76] G.E. Olson, V.P. Winfrey, K.E. Hill, R.F. Burk, Megalin mediates selenoprotein p uptake by kidney proximal tubule epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 6854–6860. doi:10.1074/jbc.M709945200.
- [77] G.E. Olson, V.P. Winfrey, S.K. NagDas, K.E. Hill, R.F. Burk, Apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12290–12297. doi:10.1074/jbc.M611403200.
- [78] U. SCHWEIZER, F. STRECKFUß, P. PELT, B.A. CARLSON, D.L. HATFIELD, J. KÖHRLE, L. SCHOMBURG, Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply, *Biochem. J.* 386 (2005) 221–226. doi:10.1042/BJ20041973.
- [79] A.S. Eswayah, T.J. Smith, P.H.E. Gardiner, Microbial transformations of selenium species of relevance to bioremediation, *Appl. Environ. Microbiol.* 82 (2016) 4848–4859.

doi:10.1128/AEM.00877-16.

- [80] T.L. Gerrard, J.N. Telford, H.H. Williams, Detection of selenium deposits in *Escherichia coli* by electron microscopy, *J. Bacteriol.* 119 (1974) 1057–1060.
- [81] M.M. Ghariieb, G.M. Gadd, The kinetics of ⁷⁵[Se]-selenite uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and the vacuolization response to high concentrations., *Mycol. Res.* 108 (2004) 1415–1422. doi:10.1017/S0953756204001418.
- [82] Y. Kobayashi, Y. Ogra, K. Ishiwata, H. Takayama, N. Aimi, K.T. Suzuki, Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion withing the requiered to low-toxic range, *Pnas.* 99 (2002) 15932–15936. doi:10.1073/pnas.252610699.
- [83] D. Kuehnelt, N. Kienzl, P. Traar, N.H. Le, K.A. Francesconi, T. Ochi, Selenium metabolites in human urine after ingestion of selenite, L-selenomethionine, or DL-selenomethionine: A quantitative case study by HPLC/ICPMS, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 235–246. doi:10.1007/s00216-005-0007-8.
- [84] T. Jäger, H. Drexler, T. Göen, Human metabolism and renal excretion of selenium compounds after oral ingestion of sodium selenite and selenized yeast dependent on the trimethylselenium ion (TMSe) status, *Arch. Toxicol.* (2015). doi:10.1007/s00204-015-1548-z.
- [85] T. Imai, T. Kurihara, N. Esaki, H. Mihara, Glutathione contributes to the efflux of selenium from hepatoma cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78 (2014) 1376–1380. doi:10.1080/09168451.2014.918487.
- [86] L.W. Lima, E.A.H. Pilon-Smits, M. Schiavon, Mechanisms of selenium hyperaccumulation in plants: A survey of molecular, biochemical and ecological cues, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1862 (2018) 2343–2353. doi:10.1016/j.bbagen.2018.03.028.
- [87] N. Terry, A.M. Zayed, M.P. de Souza, A.S. Tarum, Selenium in Higher Plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51 (2000) 401–432. doi:https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.401.
- [88] L. Frézal, M.A. Félix, *C. elegans* outside the Petri dish, *Elife.* 2015 (2015) 1–14. doi:10.7554/eLife.05849.
- [89] A.K. Corsi, B. Wightman, M. Chalfie, A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*, *Genetics.* 200 (2015) 387–407. doi:10.1534/genetics.115.176099.
- [90] Z.F. Altun, D.. Hall, Introduction, in: L.A. Herndon (Ed.), *WormAtlas*, 2006. doi:doi:10.3908/wormatlas.1.1.
- [91] Z.F. Altun, D.. Hall, Epithelial system, hypodermis, in: L.A. Herndon (Ed.), *WormAtlas*, 2009. doi:10.3908/wormatlas.1.13.
- [92] Z.F. Altun, D.. Hall, Nervous system, general description, in: L.A. Herndon (Ed.), *WormAtlas*, 2011. doi:10.3908/wormatlas.1.18.
- [93] Z.F. Altun, D.. Hall, Coelomocyte system, in: L.A. Herndon (Ed.), *WormAtlas*, 2009. doi:10.3908/wormatlas.1.11.
- [94] T. Evans, Transformation and microinjection, *WormBook.* (2006) 1–15. doi:10.1895/wormbook.1.108.1.
- [95] D.J. Dickinson, B. Goldstein, CRISPR-based methods for *caenorhabditis elegans* genome engineering, *Genetics.* 202 (2016) 885–901. doi:10.1534/genetics.115.182162.
- [96] J. Ahringer, Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* Ravi S Kamath , Maruxa Martinez-Campos , Peder Zipperlen , Andrew G Fraser, (2000) 1–10.

- [97] J. Stenvall, J.C. Fierro-González, P. Swoboda, K. Saamarthy, Q. Cheng, B. Cacho-Valadez, E.S.J. Arnér, O.P. Persson, A. Miranda-Vizueté, S. Tuck, Selenoprotein TRXR-1 and GSR-1 are essential for removal of old cuticle during molting in *Caenorhabditis elegans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 1064–1069. doi:10.1073/pnas.1006328108.
- [98] W.H. Li, F.L. Hsu, J.T. Liu, V.H.C. Liao, The ameliorative and toxic effects of selenite on *Caenorhabditis elegans*, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 812–819. doi:10.1016/j.fct.2010.12.002.
- [99] W.H. Li, Y.C. Shi, I.L. Tseng, V.H.C. Liao, Protective Efficacy of Selenite against Lead-Induced Neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS One.* 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0062387.
- [100] A. V. Skalny, M.G. Skalnaya, A.A. Nikonorov, A.A. Tinkov, Selenium Antagonism with Mercury and Arsenic: From Chemistry to Population Health and Demography, in: D.L. Hatfield, U. Schweizer, P. a. Tsuji, V.N. Gladyshev (Eds.), *Selenium Its Mol. Biol. Role Hum. Heal.*, 4th ed., Springer New York, New York, 2016: pp. 401–410. doi:10.1007/978-3-319-41283-2.
- [101] W.H. Li, Y.C. Shi, C.H. Chang, C.W. Huang, V. Hsiu-Chuan Liao, Selenite protects *Caenorhabditis elegans* from oxidative stress via DAF-16 and TRXR-1, *Mol. Nutr. Food Res.* 58 (2014) 863–874. doi:10.1002/mnfr.201300404.
- [102] C.J. Boehler, A.M. Raines, R. a. Sunde, Deletion of Thioredoxin Reductase and Effects of Selenite and Selenate Toxicity in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS One.* 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0071525.
- [103] K.L. Morgan, A.O. Estevez, C.L. Mueller, B. Cacho-valadez, A. Miranda-vizueté, N.J. Szewczyk, M. Estevez, The glutaredoxin GLRX-21 functions to prevent selenium-induced oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*, *Toxicol. Sci.* 118 (2010) 530–543. doi:10.1093/toxsci/kfq273.
- [104] I. Rohn, T.A. Marschall, N. Kroepfl, K.B. Jensen, M. Aschner, S. Tuck, D. Kuehnelt, T. Schwerdtle, J. Bornhorst, Selenium species-dependent toxicity, bioavailability and metabolic transformations in: *Caenorhabditis elegans*, *Metallomics.* 10 (2018) 818–827. doi:10.1039/c8mt00066b.
- [105] A.O. Estevez, C.L. Mueller, K.L. Morgan, N.J. Szewczyk, L. Teece, A. Miranda-Vizueté, M. Estevez, Selenium induces cholinergic motor neuron degeneration in *Caenorhabditis elegans*, *Neurotoxicology.* 33 (2012) 1021–1032. doi:10.1016/j.neuro.2012.04.019.
- [106] A.O. Estevez, K.L. Morgan, N.J. Szewczyk, D. Gems, M. Estevez, The neurodegenerative effects of selenium are inhibited by FOXO and PINK1/PTEN regulation of insulin/insulin-like growth factor signaling in *Caenorhabditis elegans*, *Neurotoxicology.* 41 (2014) 28–43. doi:10.1016/j.neuro.2013.12.012.
- [107] C.J. Boehler, A.M. Raines, R.A. Sunde, Toxic-selenium and low-selenium transcriptomes in *Caenorhabditis elegans*: Toxic selenium up-regulates oxidoreductase and down-regulates cuticle-associated genes, *PLoS One.* 9 (2014) 23–25. doi:10.1371/journal.pone.0101408.
- [108] W.H. Li, C.H. Chang, C.W. Huang, C.C. Wei, V.H.C. Liao, Selenite enhances immune response against *Pseudomonas aeruginosa* PA14 via SKN-1 in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS One.* 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0105810.
- [109] G.L. Wang, G.L. Semenza, Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 1230–1237. doi:doi: 10.1074/jbc.270.3.1230.
- [110] G.L. Semenza, Hydroxylation of HIF-1:Oxygen Sensing at the Molecular Level, *Physiology (Bethesda).* 16 (2004) 176–182. doi:https://doi.org/10.1152/physiol.00001.2004.
- [111] C. Shen, Z. Shao, J.A. Powell-Coffman, The *Caenorhabditis elegans* rhy-1 gene inhibits HIF-1 hypoxia-inducible factor activity in a negative feedback loop that does not include vhl-1,

Genetics. 174 (2006) 1205–1214. doi:10.1534/genetics.106.063594.

- [112] A.C.R. Epstein, J.M. Gleadle, L.A. McNeill, K.S. Hewitson, J. O'Rourke, D.R. Mole, M. Mukherji, E. Metzen, M.I. Wilson, A. Dhanda, Y.M. Tian, N. Masson, D.L. Hamilton, P. Jaakkola, R. Barstead, J. Hodgkin, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, C.J. Schofield, P.J. Ratcliffe, C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation, *Cell*. 107 (2001) 43–54. doi:10.1016/S0092-8674(01)00507-4.
- [113] C. Shen, D. Nettleton, M. Jiang, S.K. Kim, J.A. Powell-Coffman, Roles of the HIF-1 hypoxia-inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans*, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 20580–20588. doi:10.1074/jbc.M501894200.
- [114] T.L. Nguyen, R. V. Durán, Prolyl hydroxylase domain enzymes and their role in cell signaling and cancer metabolism, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 80 (2016) 71–80. doi:10.1016/j.biocel.2016.09.026.
- [115] D. Samanta, G.L. Semenza, Maintenance of redox homeostasis by hypoxia-inducible factors, *Redox Biol.* 13 (2017) 331–335. doi:10.1016/j.redox.2017.05.022.
- [116] B.W. Wong, A. Kuchnio, U. Bruning, P. Carmeliet, Emerging novel functions of the oxygen-sensing prolyl hydroxylase domain enzymes, *Trends Biochem. Sci.* 38 (2013) 3–12. doi:10.1016/j.tibs.2012.10.004.
- [117] Z. Shao, Y. Zhang, J.A. Powell-Coffman, Two distinct roles for EGL-9 in the regulation of HIF-1-mediated gene expression in *Caenorhabditis elegans*, *Genetics*. 183 (2009) 821–829. doi:10.1534/genetics.109.107284.
- [118] M.W. Budde, M.B. Roth, Hydrogen Sulfide Increases Hypoxia-inducible Factor-1 Activity Independently of von Hippel-Lindau Tumor Suppressor-1 in *C. elegans*, *Mol. Biol. Cell*. 21 (2010) 4042–4056. doi:10.1091/mbc.E09.
- [119] M.W. Budde, M.B. Roth, The response of *Caenorhabditis elegans* to Hydrogen Sulfide and Hydrogen Cyanide, *Genetics*. 189 (2011) 521–532. doi:10.1534/genetics.111.129841.
- [120] L.G. Luhachack, O. Visvikis, A.C. Wollenberg, A. Lacy-Hulbert, L.M. Stuart, J.E. Irazoqui, EGL-9 controls *C. elegans* host defense specificity through prolyl hydroxylation-dependent and -independent HIF-1 pathways, *PLoS Pathog.* 8 (2012) 48. doi:10.1371/journal.ppat.1002798.
- [121] D. Ackerman, D. Gems, Insulin/IGF-1 and hypoxia signaling act in concert to regulate iron homeostasis in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS Genet.* 8 (2012). doi:10.1371/journal.pgen.1002498.
- [122] Z. Shao, Y. Zhang, Q. Ye, J.N. Saldanha, J.A. Powell-Coffman, *C. elegans* swan-1 binds to egl-9 and regulates hif-1-mediated resistance to the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* pao1, *PLoS Pathog.* 6 (2010) 91–92. doi:10.1371/journal.ppat.1001075.
- [123] M.R. Filipovic, J. Zivanovic, B. Alvarez, R. Banerjee, Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation, *Chem. Rev.* 118 (2018) 1253–1337. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00205.
- [124] R. Vozdek, A. Hnízda, J. Krijt, L. Šerá, V. Kožich, Biochemical properties of nematode O-acetylserine(thiol)lyase paralogs imply their distinct roles in hydrogen sulfide homeostasis, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1834 (2013) 2691–2701. doi:10.1016/j.bbapap.2013.09.020.
- [125] D.K. Ma, R. Vozdek, N. Bhatla, H.R. Horvitz, CYSL-1 interacts with the O₂-sensing hydroxylase EGL-9 to promote H₂S-modulated hypoxia-induced behavioral plasticity in *C. elegans*, *Neuron*. 73 (2012) 925–40. doi:10.1016/j.neuron.2011.12.037.
- [126] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P.

- Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods.* 9 (2012) 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019.
- [127] A.D. Edelstein, M. a Tsuchida, N. Amodaj, H. Pinkard, R.D. Vale, N. Stuurman, Advanced methods of microscope control using μ Manager software, *J. Biol. Methods.* 1 (2014) 1–10. doi:10.14440/jbm.2014.36.
- [128] C.C. Mello, J.M. Kramer, D. Stinchcomb, V. Ambros, Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences., *EMBO J.* 10 (1991) 3959–70. doi:10.1016/0168-9525(92)90342-2.
- [129] E.M. Jorgensen, S.E. Mango, The art and design of genetic screens: *caenorhabditis elegans*., *Nat. Rev. Genet.* 3 (2002) 356–369. doi:10.1038/nrg794.
- [130] M.W. Davis, M. Hammarlund, T. Harrach, P. Hullett, S. Olsen, E.M. Jorgensen, Rapid single nucleotide polymorphism mapping in *C. elegans*., *BMC Genomics.* 6 (2005) 118. doi:10.1186/1471-2164-6-118.
- [131] C.J. Liu, H. Jiang, L. Wu, L.Y. Zhu, E. Meng, D.Y. Zhang, OEPR cloning: An efficient and seamless cloning strategy for large- and multi-fragments, *Sci. Rep.* 7 (2017) 2–8. doi:10.1038/srep44648.
- [132] R.H. Miller, <PNAS-1989-Chung-2172-5.pdf>, 86 (1989) 2172–2175. doi:10.1016/j.jmaa.2007.08.036.
- [133] J. Sambrook, D.W. Russell, Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Miniprep, in: *Molecular Cloning. A Lab. Manual.*, third, Cold Spring Harbor, New York, 2001: p. 1.32-1.34.
- [134] G. Minevich, D.S. Park, D. Blankenberg, R.J. Poole, O. Hobert, CloudMap: A cloud-based pipeline for analysis of mutant genome sequences, *Genetics.* 192 (2012) 1249–1269. doi:10.1534/genetics.112.144204.
- [135] M. Doitsidou, S. Jarriault, R.J. Poole, Next-generation sequencing-based approaches for mutation mapping and identification in *Caenorhabditis elegans*, *Genetics.* 204 (2016) 451–474. doi:10.1534/genetics.115.186197.
- [136] M.A. McDonough, V. Li, E. Flashman, R. Chowdhury, C. Mohr, B.M. Lienard, J. Zondlo, N.J. Oldham, I.J. Clifton, J. Lewis, L.A. McNeill, R.J.M. Kurzeja, K.S. Hewitson, E. Yang, S. Jordan, R.S. Syed, C.J. Schofield, Cellular oxygen sensing: Crystal structure of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (PHD2), *103 (2006) 9814–9819.* doi:10.1073/pnas.0601283103.
- [137] T. V. Mishanina, M. Libiad, R. Banerjee, Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways, *Nat. Chem. Biol.* 11 (2015) 457–464. doi:10.1038/nchembio.1834.
- [138] B. Qabazard, L. Li, J. Gruber, M.T. Peh, L.F. Ng, S.D. Kumar, P. Rose, C.-H. Tan, B.W. Dymock, F. Wei, S.C. Swain, B. Halliwell, S.R. Stürzenbaum, P.K. Moore, Hydrogen sulfide is an endogenous regulator of aging in *Caenorhabditis elegans*., *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 2621–30. doi:10.1089/ars.2013.5448.
- [139] D.L. Miller, M.W. Budde, M.B. Roth, HIF-1 and SKN-1 coordinate the transcriptional response to hydrogen sulfide in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS One.* 6 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0025476.
- [140] T. Miyabayashi, M.T. Palfreyman, A.E. Sluder, F. Slack, P. Sengupta, Expression and function of members of a divergent nuclear receptor family in *Caenorhabditis elegans*., *Dev. Biol.* 215 (1999) 314–331.
- [141] A.A. Michels, A.M. Robitaille, D. Buczynski-Ruchonnet, W. Hodroj, J.H. Reina, M.N. Hall, N. Hernandez, mTORC1 Directly Phosphorylates and Regulates Human MAF1, *Mol. Cell. Biol.*

30 (2010) 3749–3757. doi:10.1128/MCB.00319-10.

- [142] B.P. Rosen, Z. Liu, NIH Public Access, *Environ. Int.* 35 (2010) 512–515. doi:10.1016/j.envint.2008.07.023.Transport.
- [143] C. Lindblow-Kull, F.J. Kull, A. Shrift, Single transporter for sulfate, selenate, and selenite in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* 163 (1985) 1267–1269. doi:10.1007/s10470-009-9420-9.
- [144] S. Müller, J. Heider, A. Böck, The path of unspecific incorporation of selenium in *Escherichia coli*, *Arch. Microbiol.* 168 (1997) 421–427. doi:10.1007/s002030050517.
- [145] H. Kawai, T. Tanji, H. Shiraishi, M. Yamada, R. Iijima, T. Inoue, Y. Kezuka, K. Ohashi, Y. Yoshida, K. Tohyama, K. Gengyo-Ando, S. Mitani, H. Arai, A. Ohashi-Kobayashi, M. Maeda, Normal Formation of a Subset of Intestinal Granules in *Caenorhabditis elegans* Requires ATP-binding Cassette Transporters HAF-4 and HAF-9, Which Are Highly Homologous to Human Lysosomal Peptide Transporter TAP-Like, *Mol. Biol. Cell.* 20 (2009) 2979–2990. doi:https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0912.
- [146] M.S. Schwartz, J.L. Benci, D.S. Selote, A.K. Sharma, A.G.Y. Chen, H. Dang, H. Fares, O.K. Vatamaniuk, Detoxification of multiple heavy metals by a half-molecule ABC transporter, HMT-1, and coelomocytes of *Caenorhabditis elegans*, *PLoS One.* 5 (2010). doi:10.1371/journal.pone.0009564.
- [147] C.M. Haynes, Y. Yang, S.P. Blais, T.A. Neubert, D. Ron, The Matrix Peptide Exporter HAF-1 Signals a Mitochondrial UPR by Activating the Transcription Factor ZC376.7 in *C. elegans*, *Mol. Cell.* 37 (2010) 529–540. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.015.
- [148] P. Sundaram, B. Echalier, W. Han, D. Hull, L. Timmons, ATP-binding Cassette Transporters Are Required for Efficient RNA Interference in *Caenorhabditis elegans*, *Mol. Biol. Cell.* 17 (2006) 3678–3688. doi:https://doi.org/10.1091/mbc.e06-03-0192.
- [149] Z. Zhao, J.A. Sheps, V. Ling, L.L. Fang, D.L. Baillie, Expression analysis of ABC transporters reveals differential functions of tandemly duplicated genes in *Caenorhabditis elegans*, *J. Mol. Biol.* 344 (2004) 409–417. doi:10.1016/j.jmb.2004.09.052.
- [150] L.K. Schroeder, S. Kremer, M.J. Kramer, E. Currie, E. Kwan, J.L. Watts, A.L. Lawrenson, G.J. Hermann, Function of the *Caenorhabditis elegans* ABC Transporter PGP-2 in the Biogenesis of a Lysosome-related Fat Storage Organelle, 18 (2007) 995–1008. doi:10.1091/mbc.E06.
- [151] A. Broeks, H.W.R.M. Janssen, J. Calafat, R.H.A. Plasterk, A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins, *EMBO J.* 14 (1995) 1858–66. doi:10.1016/0169-4758(95)80199-5.
- [152] L.C. Kurz, M. Shapira, K. Chen, D.L. Baillie, M.-W. Tan, *Caenorhabditis elegans* PGP-5 is involved in resistance to bacterial infection and heavy metal and its regulation requires TIR-1 and p38 map kinase cascade., *Biochem Biophys Res Commun.* 363 (2007) 438–443. doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.190.
- [153] A. Broeks, B. Gerrard, R. Allikmets, M. Dean, R.H.A. Plasterk, Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*, *EMBO J.* 15 (1996) 6132–6143.
- [154] E.E. Bygarski, R.K. Prichard, B.F. Ardelli, Resistance to the macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter P-glycoproteins: Implications for control of drug resistant parasitic nematodes, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4 (2014) 143–151. doi:10.1016/j.ijpddr.2014.06.002.
- [155] T. Sherman, M.N. Chernova, J.S. Clark, L. Jiang, S.L. Alper, K. Nehrke, M.N. Chernova, J.S. Clark, S.L. Alper, K. Nehrke, The abts and sulp families of anion transporters from *Caenorhabditis elegans*, 14642 (2019) 341–351. doi:10.1152/ajpcell.00071.2005.

- [156] C.I. Bargmann, Chemosensation in *C. elegans*, WormBook. (2006) 1–29. doi:10.1895/wormbook.1.123.1.
- [157] E. Pradel, Y. Zhang, N. Pujol, T. Matsuyama, C.I. Bargmann, J.J. Ewbank, Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104 (2007) 2295–2300. doi:10.1073/pnas.0610281104.
- [158] G. Harris, Y. Shen, H. Ha, A. Donato, S. Wallis, X. Zhang, Y. Zhang, Dissecting the signaling mechanisms underlying recognition and preference of food odors., J. Neurosci. 34 (2014) 9389–403. doi:10.1523/JNEUROSCI.0012-14.2014.
- [159] J.P. Brandt, N. Ringstad, Toll-like Receptor Signaling Promotes Development and Function of Sensory Neurons Required for a *C. elegans* Pathogen-Avoidance Behavior, Curr. Biol. 25 (2015) 2228–2237. doi:10.1016/j.cub.2015.07.037.
- [160] J.M. Kaplan, Q. Hall, Y. Zhang, Y. Hao, W. Yang, J. Ren, *C. elegans* avoidance of *Pseudomonas*: thioredoxin shapes the sensory response to bacterially produced nitric oxide, bioRxiv. (2018) 289827. doi:10.1101/289827.
- [161] J.D. Meisel, D.H. Kim, Behavioral avoidance of pathogenic bacteria by *Caenorhabditis elegans*, Trends Immunol. 35 (2014) 465–470. doi:10.1016/j.it.2014.08.008.
- [162] M.R. Chikka, C. Anbalagan, K. Dvorak, K. Dombeck, V. Prahlad, The Mitochondria-Regulated Immune Pathway Activated in the *C. elegans* Intestine Is Neuroprotective, Cell Rep. 16 (2016) 2399–2414. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.077.
- [163] M. Ivan, W.G. Kaelin, The EGLN-HIF O₂-Sensing System: Multiple Inputs and Feedbacks, Mol. Cell. 66 (2017) 772–779. doi:10.1016/j.molcel.2017.06.002.
- [164] W. Liu, S.M. Shen, X.Y. Zhao, G.Q. Chen Dr., Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1, Int. J. Biochem. Mol. Biol. 3 (2012) 165–178.
- [165] J.A. Powell-Coffman, Hypoxia signaling and resistance in *C. elegans*, Trends Endocrinol. Metab. 21 (2010) 435–440. doi:10.1016/j.tem.2010.02.006.
- [166] S.J. Lee, A.B. Hwang, C. Kenyon, Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity, Curr. Biol. 20 (2010) 2131–2136. doi:10.1016/j.cub.2010.10.057.
- [167] D.E. Fomenko, S.M. Marino, V.N. Gladyshev, Functional Diversity of Cysteine Residues in Proteins and Unique Features of Catalytic Redox-active Cysteines in Thiol Oxidoreductases, Mol. Cells OS. (2008) 228–235. doi:10.1016/j.bbi.2008.05.010.
- [168] Y. Anouar, I. Lihmann, A. Falluel-Morel, L. Boukhzar, Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection, Free Radic. Biol. Med. 127 (2018) 145–152. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.076.
- [169] L. Boukhzar, Y. Tanguy, H. Abid, M. Castex, A. Hamieh, I. Alsharif, D. Cartier, G. Prevost, A. Falluel-Morel, I. Lihmann, A. Changraoui, Y. Anouar, Selenoprotein T: From Discovery to Functional Studies Using Conditional Knockout Mice, in: D.L. Hatfield, U. Schweizer, P. a. Tsuji, V.N. Gladyshev (Eds.), Selenium Its Mol. Biol. Role Hum. Heal., 4th ed., Springer New York, New York, 2016: pp. 275–286. doi:10.1007/978-3-319-41283-2.
- [170] D. Lints, R. and Hall, Male introduction, in: L.A. Herndon (Ed.), WormAtlas, 2009. doi:doi:10.3908/wormatlas.2.1.
- [171] C. Fang-Yen, M.J. Alkema, A.D.T. Samuel, Illuminating neural circuits and behaviour in *caenorhabditis elegans* with optogenetics, Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 370 (2015). doi:10.1098/rstb.2014.0212.
- [172] R. Lints, D. Hall, Reproductive system, overview, in: L.A. Herndon (Ed.), WormAtlas, 2009.

doi:10.3908/wormatlas.1.22.

- [173] J. Kimble, S. H. C. elegans germline stem cells and their niche, in: *Stemb.* [Internet], Harvard Stem Cell Institute, Cambridge (MA), 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK174453/figure/celegansgermlinestemcellsandtheirniche>.
- [174] P. Koivunen, R. Serpi, E.Y. Dimova, Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase inhibition in cardiometabolic diseases, *Pharmacol. Res.* 114 (2016) 265–273. doi:10.1016/j.phrs.2016.11.003.