



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES
INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DE LA LONGITUD
DEL TELÓMERO EN *Ustilago maydis***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

M. C. Estela Anastacio Marcelino

ASESOR (ES) DE TESIS:

D C. Ma. Patricia Sánchez Alonso

El siguiente trabajo se realizó en el Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en el centro de Investigaciones Microbiológicas en el laboratorio de Bioquímica y Genética Microbiana. Contando también con el apoyo del CIBIOR del IMSS Metepec, Puebla. Así como de los congresos en donde se presentaron los resultados obtenidos en este trabajo.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATM	Ataxia talangiectasia mutada
ATR	Ataxia talangiectasia relacionada a Rad3
p53	Factor de transcripción supresor de tumor
p21	Supresor de tumor
ARN	Ácido ribonucleoproteico
Dc	Doble cadena
Cs	Cadena sencilla
DSB	Ruptura de ADN de doble cadena
Cola G	ADN de cadena sencilla rica en G localizado al final del cromosoma
Asa T	Burbuja de ADN telomérico formada por la unión de la cola-G y el ADN telomérico de doble cadena
Asa D	Media estructura de Holliday formada por la unión de la cola G y el ADN telomérico
TRF1 y 2	Regulador de la longitud del telómero 1 y 2 en mamíferos
RAP1	Proteína activadora represora 1 en mamíferos
TIN2	Proteína de interacción con TRF1
TPP1	Proteína primaria de unión a telómero 1 en mamíferos
ACD	También conocida como TPP1
POT1	Protección de telómeros 1
NHEJ	Reparación de extremos no homólogos
DDR	Respuesta a ADN dañado
RPA	Proteína de replicación A
Taz1	Homologo a TRF1 y TRF2
Rap1	Proteína activadora represora 1 en <i>S. cerevisiae</i>
Poz1	Posible homólogo de TIN2
Rad3	Cinasa maestra que traduce señales de respuesta a ADN dañado
Ccq1	Interactúa con Tpz1 para reclutar la telomerasa al telómero
Thr	Treonina
Est1	Telómeros cada vez más cortos 1
Y2H	Ensayo de doble híbrido
Tpz1	Ortólogo a TPP1
Pot1	Proteína de telómeros 1 en <i>S. cerevisiae</i>
TERRA	Repetidos teloméricos que tienen ARN
LTR	Repetidos teloméricos largos
TAS	Secuencias asociadas a telómero
ARNlnc	ARN largos no codificantes
kb	Kilobases
Y	Tirosina
L	Leucina
W	Triptófano
I	Isoleucina
T	Treonina
R	Arginina
MAL	Enzima hidrolizante de la maltosa
MEC	Enzima hidrolizante de la melobiosa
SUC	Enzima hidrolizante de la sacarosa
RTM	Gen que confiere resistencia a las malosas tóxicas

UCS	Secuencia río arriba conservada
VAR	Genes que expresan proteínas de superficie altamente polimórfica
VSG	Genes de glucoproteína de superficie
ESA G	Genes asociados al sitio de expresión
nt	Nucleótidos
STRs	Repetidos subteloméricos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
ARNnc	Ácido ribonucleico no codificante
DC	Disqueratosis Congénita
Est2	Transcriptasa reversa en <i>S. cerevisiae</i>
TERT	Transcriptasa reversa en mamíferos
TER1, TR ó	ARN telomerasa en mamíferos y levaduras de fisión
TERC	
RAP	Procesividad de adición de repetidos
ALT	Mecanismos alternativos
EST	Telómeros siempre cortos
PML	Cuerpos de leucemia promielocítica
rumT	Repetidos teloméricos de <i>U. maydis</i>
Cdc13	Control de división celular 13
Sir 2, 3 y 4	Reguladores de la información silenciosa
No-LTR	Repetido terminal no largo
HHT	Retrotransposones de tipo no-LTR específicos de telómeros
Ku70/Ku80	Complejo proteico que modula la accesibilidad a los extremos cromosomales
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
ORF	Marco de lectura abierto
ARN pol II	ARN polimerasa II
ARNnc	ARN no codificante
ARNm	ARN mensajero
RNP	Ribonucleoproteína
SDS	Duodecil sulfato de sodio
EDTA	Ácido etilendiamiltetraacético
BSA	Albumina sérica bovina
mmol	Milimol
cpm	Cuentas por minuto
Cq	Punto de cruce en el que la fluorescencia es detectada

INDICE GENERAL

	Contenido	Página
I	INTRODUCCIÓN	1
II	TELOMEROS	2
III	SECUENCIAS SUBTELOMÉRICAS	6
IV	TELOMERASA	10
	IV.1 Transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT)	11
	Dominio N-terminal (dominio TEN)	12
	Dominio de unión a ARN (Dominio TRBD)	12
	Dominio de transcriptasa inversa (dominio RT)	13
	Dominio C-terminal (dominio CTE)	14
	IV.2 Componente RNA telomerasa	15
	Estructura de plantilla (secuencia molde)	15
	Elemento 5' limítrofe (TBE)	16
	Estructura de pseudonudo	17
	Estructura del tallo terminal (STE)	17
	IV.3 Proteínas adicionales del complejo central de la telomerasa	19
V	SINTESIS DEL TELÓMERO POR LA ENZIMA TELOMERASA	19
VI	REGULACIÓN DE LA TELOMERASA	20
VII	ALARGAMIENTO DEL TELÓMERO POR RUTAS ALTERNATIVAS A LA TELOMERASA	22
VII	ANTECEDENTES	23
IX	JUSTIFICACIÓN	25
X	HIPÓTESIS	25
XI	OBJETIVO GENERAL	26
	XI.1 Objetivos particulares	
XII	ESQUEMA DE TRABAJO	27
XIII	MATERIAL Y MÉTODOS	28
	Cepas y plásmidos	28
	Extracción de ADN de <i>Ustilago maydis</i> .	28
	Evaluación de la longitud del fragmento terminal de restricción (TRF) del cromosoma.	29
	Transformación de <i>U. maydis</i>	30

	Extracción de ARN total de levadura	31
	Obtención de ARN de agallas de plántulas de maíz	32
	Pureza e integridad del ARN	32
	Síntesis de primera cadena (ADNc)	33
	PCR cuantitativo	34
	Cultivos sincronizados de <i>U. maydis</i>	35
	Infección de plántulas y obtención de tumoraciones	35
	Prueba de <i>Bal 31</i>	36
	Análisis de secuencias	37
XIV	RESULTADOS	38
	Objetivo 1. Obtención de mutantes telomerasa negativa de la cepa 521 de <i>Umaydis</i> mediante interrupción del gen <i>trt1</i> localizado en locus UMAG_11198 del mismo hongo.	38
	Objetivo 2. Determinar la abundancia relativa de los transcritos tanto de <i>trt1</i> , como de <i>tck2</i> , y <i>dkc</i> , en cultivos sincrónicos y no sincrónicos del hongo.	42
	Cuantificación de transcritos	44
	Cuantificación absoluta	54
	Cuantificación relativa	55
	Objetivo 3. Determinar la abundancia relativa de <i>trt1</i> y <i>dkc</i> en agallas de carbón del maíz.	57
	Objetivo 4. Determinar la abundancia absoluta de las secuencias <i>UTASa</i> y <i>UTASb</i> subtelomérica en <i>U. maydis</i> los cuales transcriben ARNs no codificantes similares a TERRA.	64
XV	DISCUSIÓN	70
XVI	CONCLUSIONES	76
XVII	PERSPECTIVAS	77
XVII	BIBLIOGRAFÍA	78

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Título</i>	<i>Página</i>
1	Esquema representativo de los telómeros.	3
2	Estructura de los telómeros en mamífero, levadura de fisión y levadura de gemación	3
3	Interacción de proteínas para regular el tamaño del telómero en levaduras	4
4	Estructuras de los extremos cromosomales de diversos eucariotas	7
5	Estructura de la telomerasa	14
6	Estructura del componente ARN de la telomerasa de ciliados, vertebrados y levaduras	17
7	Representación esquemática del extremo cromosomal de <i>U. maydis</i>	24
8	Producto de la reacción de PCR para verificar la obtención de mutantes <i>trt1</i> de la cepa silvestre 521	39
9	<i>Southern blot</i> de la mutante telomerasa negativa de <i>U. madis</i>	40
10	Análisis de la actividad de la exonucleasa <i>Bal31</i> por TRF en la cepa silvestre 521 y mutante telomerasa-negativa de <i>U. maydis trt1-1</i> .	41
11	Curva de crecimiento de células sincronizadas y liberadas en medio completo suplementado con complejo B después de ser sincronizadas por el método de ayuno	43
12	ARN de células sincronizadas	44
13	Gráficos obtenidos de los ensayos RT qPCR para los diferentes genes a analizar	50
14	Oligonucleótidos iniciadores seleccionados para las reacciones de RT-qPCR de cada gen	51
15	Determinación de genes de referencia	52
16	Gráficas obtenidas de los valores Cq del rango dinámico (curva de calibración) para cada gen a analizar	53
17	Gráficas mostrando la resta de los valores Cq del mismo número de copias del gen problema con los valores Cq de los dos genes de referencia,	54
18	Cuantificación absoluta de los transcritos de la subunidad catalítica de la telomerasa <i>trt1</i> , cinasa <i>tck2</i> , disquerina <i>dkc</i> , tubulina <i>TUB1</i> , actina <i>ACT1</i> , e histona H4 <i>HH4</i>	55
19	Cuantificación relativa de <i>trt1</i> , <i>tck2</i> , <i>dkc</i> y <i>HH4</i> en células sincronizadas de la cepa 521 de <i>U. maydis</i>	56
20	ARN de células haploides, tumor y plántula de maíz de <i>U. maydis</i>	57
21	PCR a punto final de los diferentes genes analizados en células haploides (521), en tumor 521/518 y en planta de maíz	58
22	RT-PCR de células haploides (521), de células de tumor 521/518 y plantas de maíz	59
23	Análisis del telómero en las mutantes Δhda a las 36 (A) y 200 generaciones (B).	60
24	Muestras de ARN de mutantes histona deacetilasas (Δhda) de la cepa 521	60

25	Amplificados de RT-PCR del gen <i>egl1</i> de expresión única en mutantes Δhda . B. RT-PCR de telomerasa en las cepas mutantes Δhda .	61
26	Cuantificación relativa de tres genes en mutantes <i>trt1</i> y Δhda .	62
27	Amplificados de la región subtelomérica <i>UTASa</i> y <i>UTASb</i>	65
28	RT-PCR de región subtelomérica para evidenciar la presencia de TERRA	66
29	Gráficos obtenidos de los ensayos RT qPCR para obtener el rango dinámico, la eficiencia de amplificación, la R^2 y el valor de la pendiente	67
30	Cuantificación absoluta de secuencias <i>UTASa</i> y <i>UTASb</i>	69

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla</i>	<i>Título</i>	<i>Página</i>
1	Descripción de cepas y plásmidos usados en este trabajo	28
2	Tabla de Iniciadores usados en este trabajo	33
3	Características requeridas de los primers para qPCR y temperatura de alineamiento adecuada para cada par de primer	46
4	Diluciones realizadas para obtener el número de copias deseadas	47
5	Valores de R^2 , eficiencia de amplificación y pendiente de los iniciadores diseñados para RT-qPCR	47
6	Valores de eficiencia de amplificación, R^2 y valor de la pendiente de los primers usados para <i>UTASa</i> , <i>UTASb</i> y <i>dkc</i> .	67

RESUMEN

Los telómeros son complejos especializados compuestos de proteínas, ADN no codificante, y ARN. Se encargan de mantener la estabilidad de los cromosomas durante cada ronda de replicación, son sustrato para su propia replicación por la enzima telomerasa, y participan en la organización nucleolar de los cromosomas. Debido a que las ADN polimerasas convencionales no pueden replicar totalmente el extremo de los cromosomas, los telómeros usan mecanismos especializados para asegurar su replicación. La telomerasa es un complejo ribonucleoproteico encargado de sintetizar los telómeros en la mayoría de los eucariotes; esta enzima se encarga de alinear su molde de ARN con el extremo saliente de cadena sencilla 3' (cola-G) y extendiéndolo por transcripción inversa; posteriormente la ADN polimerasas II sintetizan la cadena complementaria. La telomerasa es un complejo multiproteico formado por dos componentes centrales, una transcriptasa inversa que trabaja en conjunto con un ARNlnc funcional conocido como ARN de la telomerasa. La transcriptasa inversa tiene una organización estructural conservada en cuatro dominios funcionales: 1) dominio N-terminal, denominado dominio TEN, 2) dominio de unión a ARN (dominio TRBD), 3) dominio de transcriptasa inversa (dominio RT) y 4) un dominio C-terminal poco conservado (dominio CTE). El componente de ARN de la telomerasa varía tanto en longitud como en secuencia entre diferentes organismos y a pesar de esta diferencia en varios organismos, existen elementos estructurales necesarios para su función, como es el dominio central que incluye a la estructura de pseudonudo, la secuencia molde y el elemento limítrofe 5'.

Además de los telómeros la protección de los cromosomas requiere de secuencias adyacentes al telómero llamadas secuencias subteloméricas o Secuencias Asociadas a Telómero (TAS); las TAS forman un dominio estructural y funcionalmente diferente al resto del genoma, ya que presenta arreglos de secuencias interdispersas sobre el extremo de los cromosomas. Los genes en estas regiones muestran represión transcripcional en función de su distancia con el telómero, sin embargo pueden transcribirse y dar lugar a ARN largos no codificantes (lncRNAs). Las TAS mejor caracterizadas son las de la levadura *S. cerevisiae* e incluyen los elementos Y' y X. Los elementos Y' se localizan adyacentes al repetido telomérico, son altamente conservados y se pueden localizar de 0 a 4 copias en cada extremo cromosomal. El elemento X es una secuencia menos conservada que el

elemento Y', se encuentra en todos los extremos cromosomales de la levadura y se localiza yuxtapuesto al repetido telomérico o a los elementos Y'.

En ausencia de la actividad de la telomerasa, tanto levaduras como mamíferos son capaces de elongar su telómero a través de mecanismos alternativos (ALT), donde la pérdida de actividad de telomerasa produce un fenotipo de telómeros siempre cortos (EST: *ever short telomeres*) y muerte celular. En levaduras, se han definido dos rutas ALT por los factores involucrados en el alargamiento del extremo cromosomal en Tipo I y Tipo II dependiendo de los factores involucrados en la recombinación y el tipo de secuencia telomérica o subtelomérica amplificada.

Ustilago maydis, es un hongo basidiomiceto dimórfico causante de la enfermedad conocida como el carbón del maíz o huitlacoche. Este organismo es adecuado como sistema modelo para realizar estudios de biología celular y molecular de organismos eucariotes, actualmente es el arquetipo para la investigación sobre dimorfismo, fitopatogenicidad y virulencia, recombinación y reparación de ADN, transporte de ARN, control del ciclo celular, biorremediación, metabolismo de ARN, y más recientemente para el estudio del mantenimiento del extremo cromosomal. Los extremos cromosomales de *U. maydis* están constituido por repetidos de la secuencia TTAGGG, arreglados en tándem formando tramos de un tamaño promedio de 37 a 39 repetidos teloméricos. Hacia el extremo centrómero proximal de la región telomérica se encuentran dos tipos de elementos estructurales asociados al telómero denominados: *UTASa* y *UTASb* (*Ustilago Telomere Associate Sequence*) los cuales son estructuralmente similares a los elementos X y Y' de *S. cerevisiae*.

En *U. maydis* no se conoce como se lleva a cabo la regulación de la telomerasa ni que tan abundante o esencial es esta enzima en este hongo. Por lo que se analizó el perfil de expresión transcripcional de los genes que componen el centro catalítico de la telomerasa a lo largo del ciclo celular. Así como también se analizó la temporalidad de expresión de estos genes durante el ciclo de vida del hongo para determinar la probable vía de regulación de la telomerasa durante la diferenciación celular. También se obtuvieron mutantes negativas del componente proteico de la telomerasa. Por otro lado se obtuvo el patrón de expresión de abundancias relativas de estos genes en preparaciones de ARN total de cultivos sincronizados y en mutantes histona desacetilasas, e identifico ARN mensajeros de

trt1, *tck2*, *dkc3* durante la fase biotrófica del hongo. Además se determinó la presencia de transcritos TERRA de mutantes telomerasa negativas, en la cepa silvestre 521 y en cepas silvestres carentes de secuencias *UTASa*. Los resultados nos llevan a la conclusión que los genes del complejo telomerasa están diferencialmente regulados tanto en el desarrollo celular como en el proceso de diferenciación celular.

I. INTRODUCCIÓN

Todas las células eucariotas requieren de estructuras especializadas llamadas telómeros para mantener funcional cada extremo de los cromosomas, y mantener la estabilidad genómica. Los telómeros protegen la información genética contenida en los cromosomas; su función es servir de amortiguador, proporcionando sus secuencias de ADN no codificantes para la erosión que se produce en los extremos cromosomales durante la replicación del ADN en cada ciclo celular (Szostak y Blackburn, 1982; Zakian, 1995).

El acortamiento progresivo del telómero se produce debido a la replicación incompleta de los extremos abiertos de los cromosomas por las ADN polimerasas convencionales en cada ronda de replicación, este acortamiento es llamado “problema de la replicación de extremos” (Olovnikov, 1996). Algunas nucleasas recortan de manera controlada los telómeros, formando una cadena asimétrica, con un extremo saliente de cadena sencilla en el extremo 3' del telómero, estructura esencial para su propia protección, lo que provoca la pérdida de ADN telomérico después de la fase S (Lingner et al. 1995). El acortamiento de los telómeros asociado con la replicación del ADN limita el número de divisiones que puede llevar a cabo una célula antes de desencadenar el cese de su proliferación; éste número de divisiones es conocido como límite de Hayflick (Hayflick, 1961). Una vez que los telómeros se vuelven extremadamente cortos, la maquinaria de respuesta al daño del ADN se activa y las células entran en un cese a la división celular por medio de senescencia replicativa o sufren muerte celular programada (Artandi et al. 2005; Lundblad et al. 1989).

Una de las funciones esenciales de los telómeros es prevenir la activación de la ruta de respuesta al ADN dañado en el extremo natural de los cromosomas. Las lesiones del genoma son alertadas por análogos de las ATM y ATR cinasas. En mamíferos, la señal de daño da como resultado la activación de la ruta p53/p21, que induce detención del ciclo celular, desencadenando senescencia en un tipo de células (fibroblastos), o apoptosis en otras células (células somáticas). En ausencia de este punto de control, los telómeros se acortan, perdiendo su capacidad de proteger a los cromosomas (Denchi et al. 2007; Palm et al. 2008). Esta función es indispensable para mantener la integridad del cromosoma, ya que la reparación ilícita del extremo de los cromosomas podría dar lugar a fusiones de cromosomas. Dichas fusiones inducirían la detención mitótica y la muerte celular (Hayashi

et al. 2015) o causarían ciclos de rotura-fusión-puente en las subsiguientes divisiones celulares, lo que provocaría translocaciones, aneuploidía y finalmente inestabilidad genómica (McClintock, 1939).

II. TELÓMEROS.

Los telómeros son complejos especializados compuestos de proteínas, ADN no codificante, y ARN (Azzalin et al. 2007), su función es proteger el extremo de todos los cromosomas eucariotes, evitando ser reconocidos por la maquinaria de reparación de ADN dañado. Los telómeros, mantienen la estabilidad de los cromosomas durante cada ronda de replicación, son substrato para su propia replicación por la enzima telomerasa, y participan en la organización nucleolar de los cromosomas (Bryan y Cech, 1999; Zakian, 1996; Tomlinson et al. 2006).

En la mayoría de los eucariotas el ADN telomérico se compone de secuencias ricas en guanina y timina, regularmente cortas y arregladas en tándem, con orientación 5' a 3' hacia el final de los cromosomas. La mayor parte de los telómeros son de doble cadena (dc), y terminan en una cadena sencilla saliente (cs) llamada cola-G, necesaria para la síntesis y alargamiento de los telómeros (figura 1A). Los repetidos de ADN telomérico de doble cadena y de cadena sencilla están unidos a un complejo de proteínas especializadas llamada shelterina, y establecen una estructura de tipo heterocromático que empaqueta el extremo de los cromosomas para evitar que sean reconocidos por la maquinaria de respuesta a ADN dañado como ruptura de ADN de doble cadena (DSB), evitando encender vías de respuesta (Canudas 2011; Carneiro 2010). En esta estructura nucleoproteica la cola-G no está expuesta, sino que se oculta dentro del ADNdc formando una media estructura de Holliday llamada asa-D. Los telómeros así dispuestos forman una estructura similar a una asa D cuando la cadena sencilla se pliega e invade el ADN telomérico de doble cadena llamada asa-T (figura 1B), (Chan y Blackburn, 2002; Griffith, 1999; de Lange, 2004; Zakian, 1996).

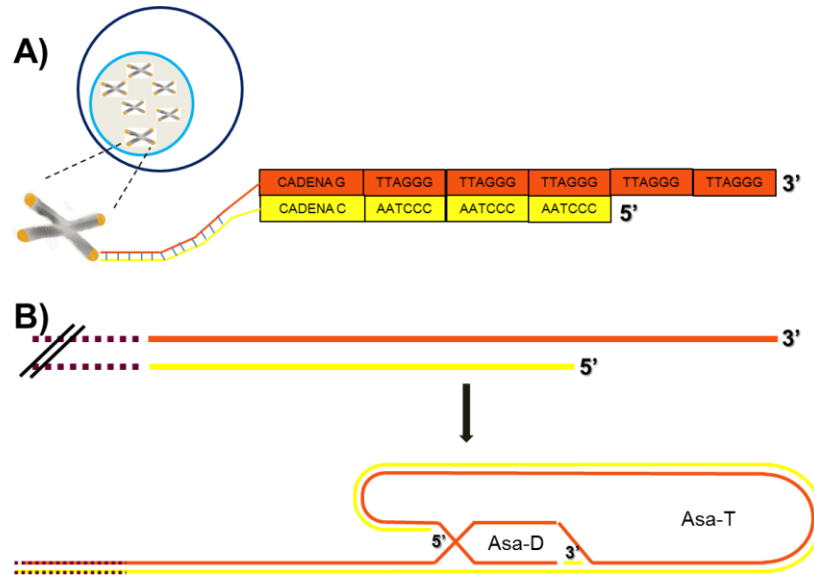


Figura 1: Esquema representativo de los telómeros. **A.** Organización del extremo cromosomal y tipo de secuencias teloméricas. **B.** formación del asa D y asa T (modificado de Palm 2008; Jain y Cooper 2010).

En mamíferos el complejo shelterina está formado por seis proteínas: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 (también conocido como ACD) y POT1 (figura 2). TRF1 y TRF2 se unen a ADNdc telomérico y reclutan a TIN2, el cual se asocia con TPP1. POT1 y TPP1 se unen directamente a ADNcs telomérico en la asa-D y la cola-G, así el complejo shelterina forma uniones entre el ADNdc y ADNcs y estabiliza la estructura telomérica, (de Lange, 2005). El heterodímero TPP1 / POT1 asegura el procesamiento apropiado de los extremos 3' teloméricos. Una interrupción en la interacción TPP1-POT1 ocasiona la desregulación de la longitud del extremo 3' e inducción de la ruta de señalización de ADN dañado dependiente de ATR en los telómeros. (Flint et al. 1997; Ye, 2004; Sandhu et al. 2019).

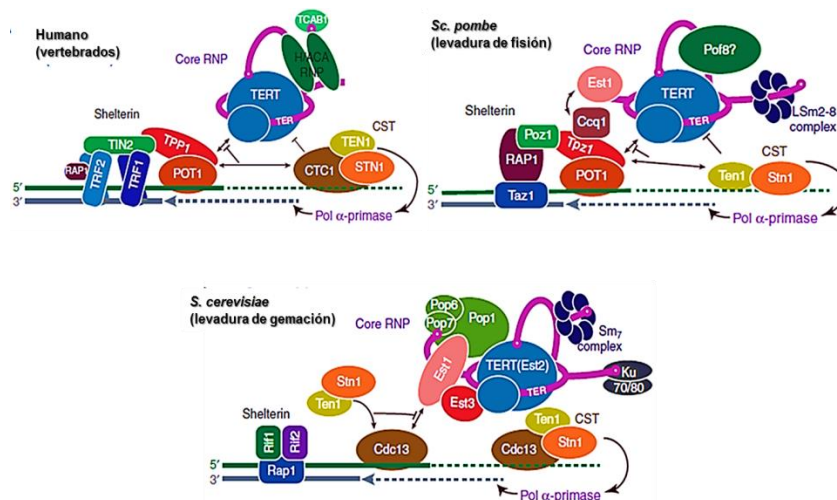


Figura 2: Estructura de los telómeros en mamífero, levadura de fisión y levadura de gemación. (Armstrong y Tomita, 2017)

TRF2 es requerido para la formación del asa-T (van Steensel et al. 1998), reprimiendo la ruta de respuesta a ADN dañado (DDR) dependiente de ATM y la de reparación de extremos no homólogos (NHEJ) (Benarroch- Popivker et al. 2016). RAP1 se une a TRF2; también se piensa que inhiben la ruta de reparación NHEJ y la de recombinación homóloga, (Sarchy et al. 2009; Sfeir et al. 2010). TRF2 y RAP1 son requeridos para la protección de los telómeros, aunque la localización de RAP1 en los telómeros de humano depende de TRF2. Interesantemente, TRF2 y RAP1 también se unen a secuencias internas de telómeros y modulan la transcripción (Ye et al. 2014). TRF1 es dispensable para la protección del extremo cromosomal, pero necesario para la síntesis de cadenas rezagadas durante la replicación del telómero (Sfeir et al. 2009). POT1, bloquea la unión de RPA (proteína de replicación A) al ADNcs telomérico, impidiendo así el reclutamiento de ATR (Denchi y de Lange T. 2007). TIN2 y TPP1 son los responsables de reclutar la telomerasa hacia los telómeros (figura 3).

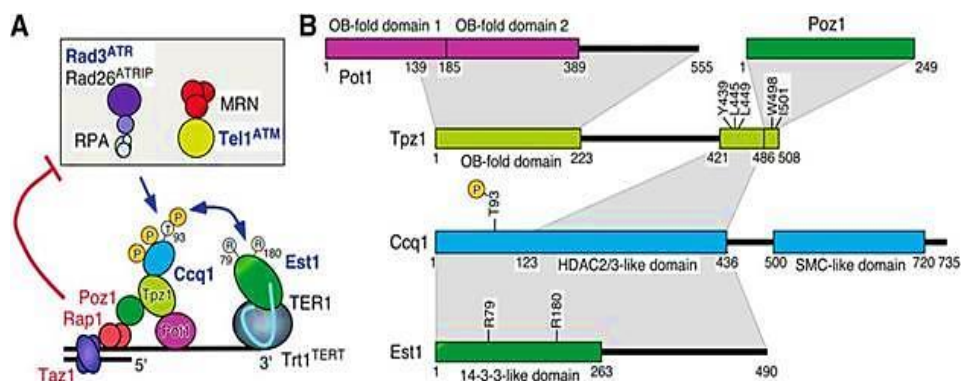


Figura 3. Interacción de proteínas para regular el tamaño del telómero en levaduras. **A)** Taz1, Rap1 y Poz1 regulan negativamente la extensión del telómero limitando la acumulación de la Cinasa Rad3^{ATR}, Ccq1 fosforilado en Thr93 y el reclutamiento de la telomerasa, mientras que el reconocimiento de la fosforilación de Ccq1 Thr93 por el dominio similar a 14-3-3 de Est1 promueven el reclutamiento de la telomerasa. **B)** Dominios de interacción proteína-proteína de shelterina y subunidades de la telomerasa, determinado por ensayos Y2H. El estudio identificó a Tpz1 Y439, L445 y L449 como críticos para la interacción Tpz1-Ccq1 y Tpz1 W498 e I501 como críticos para la interacción Tpz1-Poz1. Un estudio previo identificó Ccq1 T93 y Est1 R79 y R180 como críticos para la interacción Ccq1-Est1. (Harland et al. 2014).

En la levadura de fisión *Squizosachaomices pombe* (figura 2), la proteína de unión a ADNdc telomérica Taz1 (homólogo de TRF1 y TRF2 en mamíferos) apuntala la replicación del ADN telomérico e inhibe la ruta NHEJ (Miller and Cooper., 2006; Cooper JP. 2001). Pot1 (Protección de telómeros 1) se une directamente a ADNcs telomérico para

inhibir la degradación de extremos cromosomales (Cooper et al. 1997; Baumann y Cech, 2001). Como TRF1/2 en los mamíferos, Taz1 forma parte de la shelterina junto a Rap1, Poz1 (ortólogo TIN2), Tpz1 (ortólogo TPP1) y Pot1 (Miyoshi et al. 2008). De manera similar a mamíferos, la shelterina de la levadura de fisión también conecta el ADNdc y ADNcs telomérico, y se ha demostrado que el mantenimiento de esta conexión regula la actividad de la telomerasa a través de ciclos de fosforilación de Ccq1 (una subunidad adicional de la shelterina de *Sc. pombe*) por las cinasas Rad3^{ATR} and Tel1^{ATM}. Cuando Tpz1 interactúa con Ccq1, se fosforila en la posición Thr93, puede reconocer a la subunidad Est1p y reclutar la telomerasa e inhibir la formación de heterocromatina en el extremo cromosomal (Harland et al. 2014; Miyoshi et al. 2008; Tomita y Cooper., 2008). La unión de Tpz1 con Poz1 promueve la acumulación de Poz1 e inhibe la fosforilación de Ccq1, ésta entonces interactúa con la histona deacetilasa Clr3 y se inhibe su interacción con la telomerasa de la levadura de fisión, los telómeros no se alargan, y se promueve la heterocromatización del telómero y reprime la expresión de TERRA (Armstrong, 2018; Bettin et al. 2019). Se especula que TIN2 de mamíferos pueda ser un ortólogo de proteínas bifuncionales Poz1 y Ccq1 (figura 2), aunque cada proteína tiene un papel diferente la formación general del complejo shelterina, es crucial para mantener los telómeros y regular la acción de la telomerasa.

Aunque no se ha encontrado un complejo proteico similar a shelterina en *Saccharomyces cerevisiae*, es en este organismo donde mejor se ha estudiado la biología de los telómeros. En esta levadura, la proteína represora-activadora 1 (Rap1) se encuentra unida a los repetidos teloméricos de doble cadena, mientras Cdc13 (producto del gen de control de la división celular 13) se une a los repetidos teloméricos de cadena sencilla. Rap1 es un regulador negativo de la longitud del telómero, encargado de reclutar las proteínas reguladoras de la información silenciosa Sir2, Sir3 y Sir4 y los factores de interacción con Rap1, Rif1 y Rif2. Todos estos en conjunto con el ADN telomérico forman una estructura plegada y compacta a la que se conoce como telosoma (figura 2). (Conrad et al. 1990; Nugent et al. 1996; Tham y Zakian, 2002). Aunque estas proteínas no se asocian para unir el ADN telomérico dc y cs (figura 2c), cada proteína funciona para mantener la estructura del telómero y proteger los extremos del cromosoma.

A diferencia de las levaduras de gemación, de fisión, y de los mamíferos,

Drosophila melanogaster no tiene actividad de telomerasa; en esta especie los telómeros no están compuestos de repetidos teloméricos generados por la telomerasa. En la mosca de la fruta la mayoría de los extremos cromosomales tienen una serie de retrotransposones de tipo no-LTR (Long Terminal Repeats) específicos de telómero: Het-A, TART y TAHRE (abreviados como HTT) presentes en varias copias en los extremos de los cromosomas, produciendo arreglos mezclados cabeza-cola con orientación 5' hacia el extremo de los cromosomas (Mason et al. 1995; Capkova et al. 2008). El alargamiento del telómero es regulado por los genes, E(tc) y Tell (no caracterizados a nivel molecular) y por el complejo Ku70/Ku80. El complejo Ku70/Ku80 parece modular la accesibilidad a los extremos de los cromosomas, ya que la reducción de la actividad de Ku70/Ku80 aumenta la longitud del telómero sin afectar la transcripción de HTT (Melnikova et al. 2005).

III. SECUENCIAS SUBTELOMÉRICAS

La protección de los cromosomas requiere de componentes del telómero, y de las secuencias adyacentes al telómero llamadas secuencias subteloméricas o Secuencias Asociadas a Telómero (TAS); las TAS son mosaicos de secuencias moderadamente repetidas, son altamente polimórficas y poco conservadas incluso entre grupos taxonómicos relacionados. Se encuentran formando un dominio estructural y funcionalmente diferente al resto del genoma, compuesto de arreglos de secuencias interdispersas sobre el extremo de los cromosomas (Wellinger y Sen, 1997; Zaquian, 1996). En ellas se encuentra un número bajo de marcos de lectura abiertas, ya sea de genes o de elementos genéticos móviles e incluso de sus reminiscencias, en hongos y otros organismos frecuentemente se encuentran marcos de lectura abierta cuyos productos son homólogos a helicasas (Sánchez Alonso y Guzmán, 1998; Rehmeier et al. 2006; Inglis et al. 2005; Gao et al. 2002; Amann et al. 1996; Louis et al. 1992). Los genes en estas regiones muestran represión transcripcional en función de su distancia con el telómero, sin embargo pueden transcribirse y dar lugar a ARN largos no codificantes (lncRNAs) (Azzalin y Lingner, 2014; Pryde et al. 1997) figura 4.

En los cromosomas humanos la TAS se componen de bloques cortos de 10-15 kb de secuencias compartidas con muchos otros extremos distales de los cromosomas. Hacia la

región centrómero-proximal estos bloques son más largos de 30-45 kb, con homología compartida entre pocos extremos. Estos dos dominios subtelo méricos están separados por un tramo de repeticiones del tipo TTAGGG. También hay una secuencia de replicación autónoma adyacente a los repetidos teloméricos internos en algunos extremos (Royle, 1995; Flint et al. 1997a; Flint et al. 1997b). En humano, las TAS son al menos parcialmente necesarias, los rearrreglos de algunas secuencias subtelo méricas causan retraso mental (figura 4) (de Vries et al. 2003) figura 4.

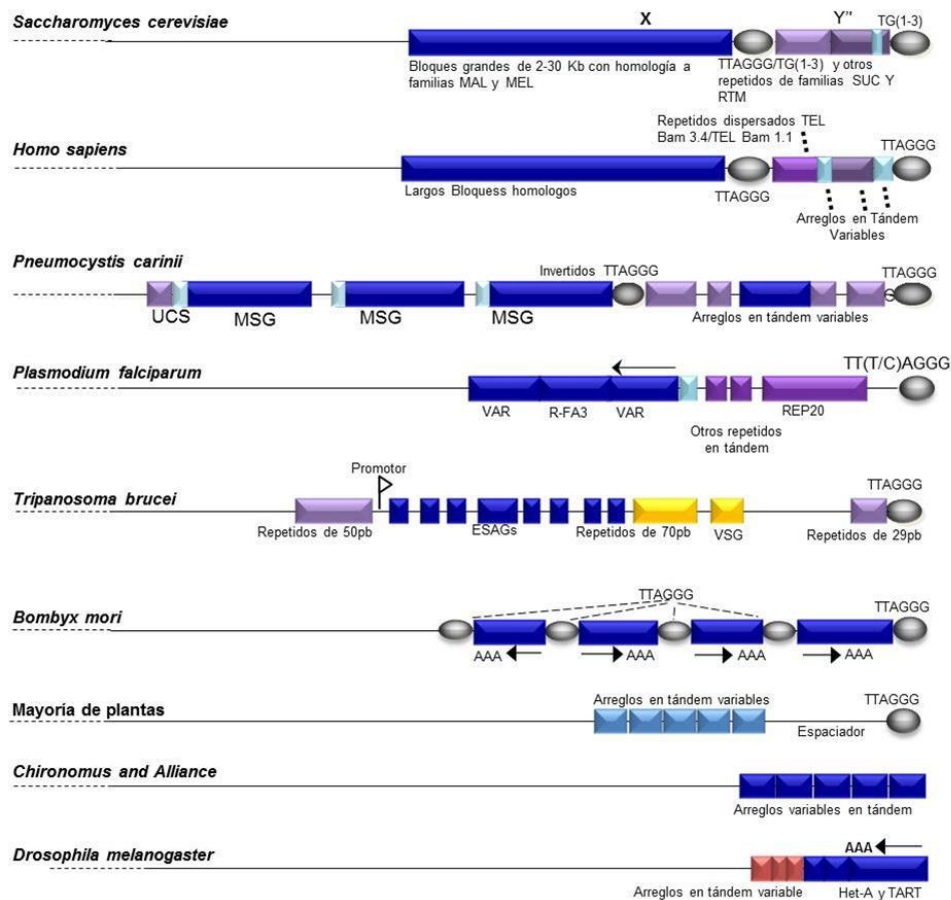


Figura 4. Estructura de los extremos cromosomales de diversos eucariotas. La mayoría de los extremos cromosomales de eucariotes consisten en una variedad de repetidos dispersos y arreglados en tándem medianamente dispersos (conjuntos de satélites y minisatélites). En *S. cerevisiae*, hay varias familias de genes (por ejemplo, MAL, MEL, SUC y RTM) y otros elementos repetidos. El telómero interno se repite y el elemento X divide la región subtelo mérica en dos dominios. Los extremos de los cromosomas humanos tienen minisatélites, repetidos dispersos y una estructura de dos dominios en la región similar a *S. cerevisiae*, con largos bloques homólogos compartidos por pocos extremos en el dominio proximal y las homología cortas compartidas por muchos extremos en el dominio distal. En *P. carinii*, hay un sitio de expresión único que contiene la secuencia conservada río arriba (UCS) adyacente a uno de varios genes de glucoproteína de superficie (MSG) principales. En *P. falciparum*, la familia de genes VAR codifica el receptor de superficie pfEMP1 altamente variable con muchas copias intercaladas entre repetidos subtelo méricos como R-FA3 y REP20. En *T. brucei*, un gen de glucoproteína de superficie (VSG) de variante única, de 100-200 copias teloméricas, se expresa a partir de un promotor subtelo mérico separado de VSG por varios genes asociados al

sitio de expresión (ESAG). *Drosophila* y otros insectos tienen satélites cerca a los telómeros. Estos a veces se asocian con elementos transponibles, Het-A y TART en el caso de *Drosophila* y TRAS y SART en el caso de *B. mori*. Las plantas usualmente tienen arreglos satelitales sobre o cerca de los telómeros y estos a veces tienen un ADN espaciador entre el satélite y el telómero. (Modificado de Pryde et al. 1997).

Las TAS de *Saccharomyces cerevisiae* son las mejor caracterizadas, se componen de una variedad de repetidos en tándem dispersos, además de albergar varias familias de genes y una familia de elementos transponibles (Louis et al. 1995). Las TAS incluyen los elementos Y' y X. Los elementos Y' se localizan adyacentes al repetido telomérico, son altamente conservados y se pueden localizar de 0 a 4 copias en cada extremo cromosomal. El elemento X es una secuencia menos conservada que el elemento Y', se encuentra en todos los extremos cromosomales de la levadura y se localiza yuxtapuesto al repetido telomérico o a los elementos Y'. Todos los elementos X tienen una secuencia conservada de aproximadamente 470 nt a la que se le ha denominado centro X. Adyacente al centro X se encuentran pequeñas secuencias nombradas STRs (*SubTelomeric Repeats*). Entre el elemento X y el elemento Y' se pueden encontrar segmentos cortos de repetidos teloméricos (figura 4) (Fourel et al. 1999; Louis et al. 1995; Louis et al. 1994).

Las secuencias asociadas a telómero no tienen una función bien definida, pero en muchos organismos se ha observado que pueden tener funciones importantes en fenómenos que ocurren frecuentemente en esa región (van Embden y Braun, 2019) por ejemplo:

- a. Son sitios con una gran riqueza de eventos recombinogénicos y plasticidad genómica. Las TAS son dinámicas ya que sufren cambios frecuentes por eventos de intercambio y recombinación llevando a la homogenización y dispersión de secuencias repetidas. Estos cambios se han observado en levaduras, humanos, y protozoarios como *Trypanosomas* y *Plasmodium* (Pryde y Louis, 1997). Los altos niveles de cambios vistos en la región subtelomérica no se observan en el resto del genoma, a excepción de regiones específicas en el mismo organismo que sufren una rápida diversificación evolutiva, como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en vertebrados (Stephens et al. 1999).
- b. Las TAS están sujetas a silenciamiento transcripcional por su cercanía al telómero. El silenciamiento se define como la inactivación de genes cercanos a una estructura represiva que provoca la formación de una cromatina silenciada

(similar a la heterocromatina), la cual persiste a través del ciclo celular y es dirigida por la interacción de secuencias de ADN silenciadoras, por proteínas de unión a secuencias silenciadoras y proteínas silenciadoras, las cuales interactúan de manera global con proteínas de unión a ADN y nucleosomas (Gasser y Cockell 2001; Moazed, 2001). La cromatina silenciada se forma únicamente sobre ciertas regiones, bloqueando el acceso de proteínas requeridas para la transcripción de genes cercanos a esta zona. El silenciamiento transcripcional se ha observado en *S. cerevisiae* (Lusting, 1998), *Schizosaccharomyces pombe* (Grewal, 2000); y en eucariotes superiores (Joseph et al. 2001).

- c. Debido al silenciamiento provocado por la compactación de ADN del telómero y las regiones subteloméricas, se pensó que los telómeros y las TAS no podían transcribirse, sin embargo desde hace una década se sabe que la región telomérica se transcriben dando lugar a transcritos conocidos como TERRA (*TElomere Repeat containing RNA*), éstos son ARNs largos no codificantes (ARNInc) los cuales se definen como transcritos de más de 200 pares de bases que carecen de marcos de lectura abiertos (ORF), en el extremo 5'. Los TERRA en humano parecen ser transcritos por la ARN Pol II, y al menos una parte de estos transcritos pueden estar poliadenilados, (Azzalin y Lingner, 2008; Azzalin and Lingner, 2014; Oliva-Rico and Herrera, 2017). Aunque TERRA se transcribe a baja escala, es importante para la estructuración del telómero, del cual es un componente, por lo que se le localiza principalmente en el núcleo. TERRA es un ARN que tiene además funciones regulatorias, sirve como secuestrante de hnRNP A1 permitiendo la unión de POT1 en la fase S tardía del ciclo celular, y regula el acceso de la telomerasa al extremo saliente 3'OH de cadena sencilla para el alargamiento del telómero (Flynn et al. 2011). Otras evidencias experimentales han demostrado que los ARNnc pueden estar involucrados en funciones biológicas epigenéticas, como la metilación del ADN (Schmitz et al. 2010), impronta genómica (Kanduri, 2016), organización nuclear (Mao et al. 2011), interacciones gen a gen (Hacisuleyman et al. 2014) y regulación de la estructura de la cromatina (Wang et al. 2011; Tsai et al. 2010), entre otros (Sun y Kraus, 2015).

- d. Es una región de cambios frecuentes en el control epigenético de sus funciones. En *Sc. pombe*, los marcadores de histonas asociados a la heterocromatina como HP1 y H3K9Me están presentes en los nucleosomas de la cromatina telomérica y subtelomérica, de manera similar a los de la heterocromatina constitutiva de las regiones pericentroméricas (van Emden y Braun, 2019; van Emden et al. 2019). La subunidad Ccq1 de la shelterina, al interactuar con el complejo SHREC, del cual forma parte la histona deacetilasa Clr3 y el remodelador de la cromatina Mit1 (SNF2-like), estabilizan las secuencias subteloméricas de la levadura de fisión a través de la remoción de H3K14ac y evitan las posibilidades de recombinación por intercambio de cromátidas hermanas o la pérdida espontánea de telómeros debido a DSB. En mamífero estas marcas son H3K9me3 y H4K20me3, junto con la presencia de HP1 y de las histonas metiltransferasas SUV39H1/H2 y SUV4-20H1 (García-Cao et al. 2003; Gonzalo et al. 2006; Koering et al. 2002). La estructura de la cromatina subtelomérica también puede ser regulada por la metilación directa del ADN, mediante las ADN metiltransferasas DNMT3a/3b y mantenida por la DNMT1. Esta metilación no solo está involucrada en la regulación negativa de la longitud del telómero, sino que también es esencial para evitar la recombinación homóloga intertelomérica (HR) (Gonzalo et al. 2006).

A diferencia de la región subtelomérica, la región telomérica está libre de metilación del ADN porque la modificación de la citosina se produce en una alta presencia de secuencias CpG, y la secuencia repetitiva que comprende el telómero es pobre en citosinas (5'-TTAGGG-3'). En la región subtelomérica hay hipermetilación por la alta presencia de secuencias CpG en presencia de los DNMTs, una condición epigenética asociada al silenciamiento transcripcional de los promotores asociados con genes activos. (Olivia-Rico, 2017).

IV. TELOMERASA

Debido a que las DNA polimerasas convencionales no pueden replicar totalmente el extremo de los cromosomas, los telómeros usan mecanismos especializados para asegurar

su replicación. La telomerasa es un complejo ribonucleoproteico encargado de sintetizar los telómeros en la mayoría de los eucariotes; esta enzima se encarga de alinear su molde de ARN con el colgante de cadena sencilla del telómero (cola-G), que porta en el extremo 3'-OH y lo extiende por transcripción inversa; posteriormente la ADN polimerasa II sintetiza la cadena complementaria. La telomerasa es activa en organismos unicelulares y es requerida para la proliferación indefinida de la población celular. En tejidos somáticos de eucariotes superiores como mamíferos, la telomerasa está fuertemente reprimida, pero expresada en linfocitos, células germinales y células madre (Don 2005; Wright et al. 1996; Lingner et al. 1997). La telomerasa se reactiva en aproximadamente el 90% de los cánceres, lo que contribuye a su capacidad replicativa ilimitada, sin embargo, la falta de actividad de esta enzima en humano y ratón provoca disqueratosis congénita (DC) (Liu et al. 2004); esta enfermedad se caracteriza por distrofia de uñas, leucoplaquia en la lengua y un patrón de pigmentación reticulado en cuello y pecho, además de ser frecuente la falla de médula ósea. La disqueratosis provoca en la descendencia un fenotipo de envejecimiento prematuro conocido como anticipación. Otros factores independientes de la telomerasa, como el estrés y la hiperoxia también contribuyen a la determinación de la extensión de vida de un organismo, y esto se demostró utilizando células troncales hematopoyéticas de ratón (Allsopp et al. 2003).

La telomerasa es un complejo multiproteico formado por dos componentes centrales, una transcriptasa inversa (Est2 en levaduras y TERT en mamíferos) que trabaja en conjunto con un ARNnc funcional conocido como ARN de la telomerasa (TER1 in levaduras por fisión y TR o TERC en mamíferos) (Lewis y Wuttke, 2012). Lo que diferencia a la telomerasa de diferentes ADN polimerasas dependientes de ARN es el uso de una plantilla, provista por TER para el alargamiento de los telómeros. La telomerasa es capaz de adicionar varios repetidos teloméricos durante un solo ciclo de unión al sustrato (Kelleher et al. 2002).

IV.4 Transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT)

El análisis de la familia de proteínas TERT de organismos evolutivamente distantes revela una organización estructural conservada que se puede dividir en cuatro dominios funcionales: 1) Un dominio N-terminal que contiene el bloque GQ moderadamente

conservado (dominio hipomutable I) denominado dominio TEN (Jacobs et al. 2006), 2) Un dominio de unión a ARN (dominio TRBD) con motivos conservados CP, QFP y T (dominios hipomutables II, III y IV, respectivamente), 3) Un dominio de transcriptasa inversa (dominio RT) formado por los motivos 1, 2, A, B, C, D, y E (Lingner et al. 1997) incluyendo un sitio IFD; y 4) Un dominio C-terminal poco conservado (dominio CTE) (Wyatt et al. 2010; Blackburn 2005; Bryan y Cech, 1999). Un enlazador hipermutable grande, no conservado, separa los dominios N-terminales y de unión a ARN. (Figura 5b)

Dominio N-terminal (dominio TEN). El dominio TEN es el sitio de interacción de TER con el ADN telomérico de cadena sencilla. Es necesario para que la telomerasa funcione *in vitro* e *in vivo*, no muestra similitud con ninguna región de otras proteínas; por lo tanto, es imposible presentar una posible estructura de esta región en base a la homología que procede únicamente de la secuencia de aminoácidos. El dominio TEN interacciona con el componente ARN y debe de ser hábil para unirse con el ADN, situación necesaria para el funcionamiento de la telomerasa, también es posible que promueva la síntesis repetitiva y procesiva del telómero (Collins et al. 2011).

Dominio de unión a ARN (Dominio TRBD). Debido a que la telomerasa requiere del componente proteico TERT y del componente ARN TER para la síntesis de los repetidos del ADN telomérico, el ensamble estable de estos dos componentes es esencial para la actividad de la enzima. Se ha demostrado que dos dominios de TERT median la interacción con el componente ARN telomerasa. Un dominio de unión a ARN localizado en el extremo N-Terminal (TEN) de la subunidad catalítica, formado por tres motivos específicos de la telomerasa llamados CP, QFP y T. Se ha mostrado que TEN proporciona el “sitio de unión” del ADN telomérico con el componente ARN telomerasa de levaduras, humanos y el protozoario *Tetrahymena*. Es un dominio de unión a ARN con alta afinidad en todas las TERTs, (Zvereva et al. 2010). TEN también tiene el dominio DAT, el cual se postuló que participa en el reclutamiento de la telomerasa con el complejo shelterina (Veverka et al. 2019). Una segunda interacción de baja afinidad con el ARN se encuentra aparentemente mediada por el dominio RIDI/dominio N-GQ. Así este dominio parece promover la adición de

repetidos teloméricos y complementación enzimática (O'Connor et al. 2005).

Dominio de transcriptasa inversa (dominio RT). Posee los siete motivos específicos de transcriptasas inversas de retrotransposones de organismos evolutivamente relacionados (1, 2, A, B, C, D y E), formando un sitio activo, donde los residuos de ácido aspártico coordinan los iones Mg^{2+} necesarios para la adición de dNTP's (Lingner et al. 1997; Belfordt et al. 2012). Lo que diferencia a las telomerasas de otras transcriptasas inversas es el sitio IFD entre los motivos A y B. En la estructura de forma de “mano derecha”, estos dos motivos se localizan en los dominios “palma” y “dedos”. El sitio IFD obtuvo su nombre porque parecía ser una inserción en el dominio de “dedos” (*Insertion in Fingers Domain*; [Richards et al. 2008]). Se encontraron residuos de aminoácidos conservados responsables de la catálisis. Estos son tres residuos de ácido aspártico localizados en los motivos A y C (Weinrich et al. 1997). También se encarga de posicionar la plantilla y alinear el extremo del sustrato en el extremo 3' (Xie et al. 2010; Qi et al. 2012).

Dominio C-terminal (dominio CTE). El dominio C-terminal de hTERT y Tt-TERT son esenciales para la actividad enzimática, mientras que en levaduras es dispensable. Sin embargo, análisis bioquímicos de Sc-Est2p del dominio C-terminal truncado demostró un papel para este dominio en la procesividad de adición de nucleótidos. Debido a que el dominio de pulgar de la RT del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) está posicionado de manera similar y es importante para la procesividad, se ha sugerido que puede formar el dominio de pulgar de la telomerasa (Kelleher C., 2002). Puede aumentar la asociación de ácidos nucleicos y/o contribuir con la función del dominio RT (Autexier y Lue, 2006; Wyatt et al. 2010).

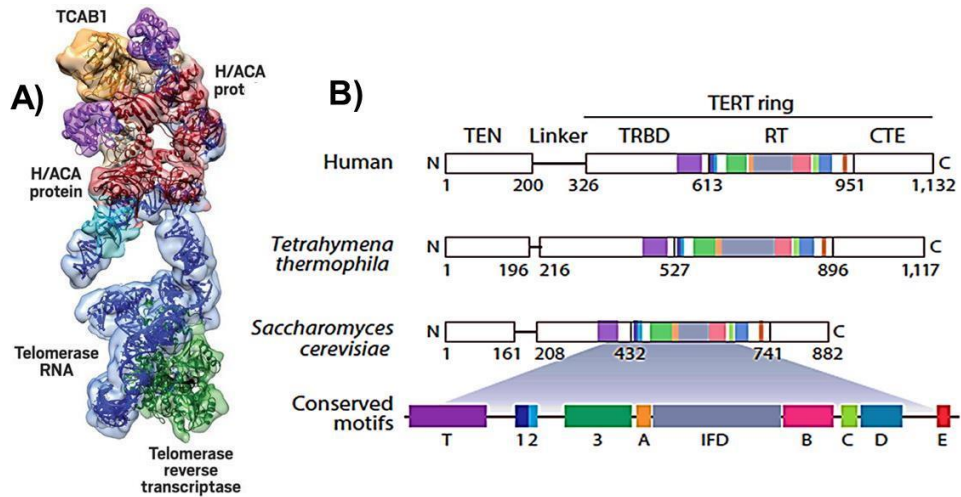


Figura 5: Estructura de la telomerasa. A) Estructura de microscopía crioelectrónica de la holoenzima telomerasa humana unida al sustrato con resolución subnanométrica, muestra dos lóbulos unidos por ARN flexible: el núcleo catalítico con la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) y motivos conservados de ARN de la telomerasa (hTR); y un H/ACA ribonucleoproteína (RNP). En el núcleo catalítico, el ARN rodea a TERT, adoptando una estructura terciaria bien ordenada con interacciones proteína-ARN sorprendentemente limitadas. El lóbulo H/ACA RNP comprende dos conjuntos de proteínas heterotetraméricas H/ACA y una proteína del cuerpo Cajal, TCAB1, (Duong, 2018). B) Esquema del componente proteico TERT de humanos, *Tetrahymena thermophila* y *Saccharomyces cerevisiae*. TERT está compuesto por el dominio TEN, y el anillo TERT que contiene TRBD, dominio RT y dominios CTE / thumb. Los límites del dominio se marcan de acuerdo con la secuencia de aminoácidos TERT. El motivo TERT T y los motivos 1, 2, 3, A, IFD, B, C, D y E se conservan a lo largo de la evolución. (Nguyen, 2018; Wu, 2018)

TERT forma una estructura en forma de anillo con el motivo TRBD, lo que hace un contacto considerable con el motivo CTE, aunque estén separados por el dominio RT (Gillis et al. 2008). El dominio RT se pliega en forma de una palma y dedos, similar a otras transcriptasas inversas (Das y Georgiadis, 2004; Rodgers et al. 1995). El sitio activo de la TR se encuentra en la palma y contiene aspartatos catalíticos ampliamente conservados y un ion Mg^{2+} (Gillis et al. 2008; Mitchell et al. 2010). El dominio CTE se enrolla alrededor para ponerse en contacto con el dominio TRBD y completar el anillo. De forma similar a las transcriptasas inversas retrovirales, el ácido nucleico se acopla en el centro del anillo, contactando a los dominios TRBD, RT y CTE (Mitchell et al. 2010). Figura 5.

IV.5 Componente RNA telomerasa

A diferencia del componente proteico, el componente ARN de la telomerasa varía tanto en longitud como en secuencia entre diferentes organismos, por ejemplo tiene una longitud de 147 nt en *Tetrahymena paravorax*, 451 nt en humano y 2425 nt en

Mycosphaerella graminicola, (Chen et al. 2000). A pesar de las diferentes secuencias de TER en varios organismos, existen elementos estructurales comunes necesarios para la función, y su presencia se confirmó mediante el análisis de TER de varios organismos evolutivamente distantes como el protozoo *Tetrahymena*, la levadura *Saccharomyces* (Zapulla y Cech, 2004, Dandjinou, 2004), mamífero y humano (Chen et al. 2000). Estas estructuras contienen el llamado dominio central que incluyen la estructura de pseudonudo, la secuencia molde y el elemento lindante o límite 5' (en protozoarios TBE, elemento limitante del templete). En protozoarios TER también contiene un elemento de reconocimiento de plantilla (TRE), elemento reconocido por la subunidad catalítica TERT. Todos los TER también contienen un sitio de unión a proteínas responsables de la maduración y estabilidad del TER (Zvereva et al. 2010). Es importante destacar que el dominio transactivador está presente en protozoarios y TER de humano, pero no en TER de levaduras (Zapulla, 2004; Dandjinou, 2004; Lin, 2004).

Los elementos estructurales TER son responsables de la catálisis y unión al componente proteico TERT (por tener componentes de unión a TER). Así, TER no solo sirve como plantilla para la catálisis, sino que también participa en este proceso. En mamíferos y protozoarios, TER contribuye en la procesividad de la telomerasa (Chen y Greider, 2003; Lai et al. 2003).

Estructura de plantilla (secuencia molde). Este elemento media la interacción de TER con el iniciador en el ADN telomérico. Generalmente, la longitud de la secuencia molde de TER es aproximadamente igual a la longitud de una copia y media del repetido telomérico, pero puede ser más larga o más corta (Lue et al. 2004). Los límites de la secuencia molde en TER están definidos por el tamaño de su misma estructura secundaria. En el extremo 3' se encuentra el sitio de alineamiento del iniciador, mientras que en el extremo 5' hay un elemento límite separando la secuencia molde del resto de la molécula. En *T. thermophila* se encuentra un elemento TRE en el componente TER (Miller y Collins, 2002), que sirve como reconocimiento de la secuencia molde de TER por la subunidad catalítica TERT (figura 6).

Elemento 5' límite (TBE). Este elemento se encarga de retrasar el alargamiento del

cebador más allá de cierta región en el sitio de la secuencia molde. Es una hélice que restringe la región de cadena sencilla de la telomerasa en levadura y telomerasa humana o una secuencia específica de la telomerasa en protozoarios (Zvereva et al. 2010)

En protozoarios, TBE es una secuencia de nucleótidos específica que se une a TERT de manera eficiente, mientras que en las levaduras y mamíferos es una estructura de tallo y horquilla (Lin et al. 2004, Chen y Greider, 2003). TBE en levadura se une a TERT y está directamente adyacente al sitio del molde. Esta estructura restringe la movilidad del sitio del molde de TER dentro del centro activo de la telomerasa de protozoarios debido a las interacciones ARN-proteína. Dicha movilidad es necesaria durante el alargamiento del cebador porque la posición de la secuencia molde con respecto al centro activo debe cambiar al agregar cada nucleótido. En la telomerasa humana, la movilidad de la secuencia molde está restringida debido a las interacciones ARN-ARN. En levaduras, TBE restringe no sólo la movilidad del ARN, sino también la accesibilidad a la cadena sencilla, ya que la estructura de tallo y horquilla está directamente adyacente a la estructura del molde. En *Schizosaccharomyces pombe*, TER (TER1), tiene una longitud de 1213nt y al igual que el ARN telomerasa de *S. cerevisiae* fue importante la formación de la hélice de ARN de doble cadena, lo que impide un mayor alargamiento del cebador (revisado en Zvereva, 2010). (Figura 6).

Estructura de pseudonudo. Es la zona de interacción de TER con TERT, se localiza de manera idéntica en relación con el sitio del molde (Theimer y Feigon, 2006). No solo es importante la estructura secundaria TER, sino también la secuencia de nucleótidos de los sitios altamente conservados dentro del pseudonudo y los sitios de cadena sencilla entre ellos (Theimer, y Feigon, 2006; Lin et al. 2004; Chen y Greider, 2005). La estructura de pseudonudo en el componente TER de humano está formada por las hélices P2b y P3, así como las asas J2b/3 y J2a/3 (Theimer et al. 2005). En *S. cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*, el pseudonudo interactúa con el componente proteico de la telomerasa. En mamíferos aparte del pseudonudo se encuentra una horquilla P6.1 conservada en el dominio altamente conservado CR4-CR5 que es necesario para la unión del componente TERT y para el funcionamiento *in vivo* e *in*

in vitro de la telomerasa. El dominio CR4-CR5 junto con la horquilla P6.1 se les denomina “dominios transactivadores”. En mamíferos el pseudonudo es importante para el alargamiento del telómero y en el caso de protozoarios tanto el pseudonudo como la horquilla IV son importantes (Zvereva, 2010).

Estructura del tallo terminal (STE). Esta estructura es necesaria para la actividad de la telomerasa en la mayoría de los sistemas que se han estudiado y, como el pseudonudo, su función precisa en la promoción de la catálisis de la telomerasa no se conoce bien (Theimer et al. 2006; Chan, 2017).

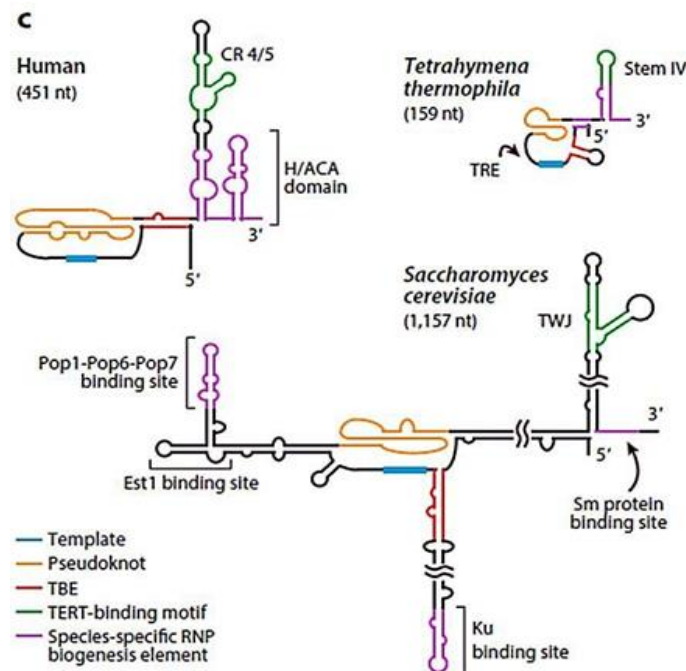


Figura 6: Estructura del componente ARN de la telomerasa de ciliados, vertebrados y levaduras. TER comparte motivos funcionales conservados que incluyen la plantilla, pseudonudo, TBE y la plantilla de unión a TERT, el asa IV en *T. thermophila* y TWJ en *S. cerevisiae* en TLC1 (Componente RNA de la telomerasa). Los sitios de unión de TER específicos de especie para proteínas implicadas en la biogénesis de TERT se indican en púrpura (Wu, 2017).

IV.6 Proteínas adicionales del complejo central de la telomerasa

Los componentes centrales de la telomerasa comprenden el ARN telomerasa (TER1 en levadura de fisión y TR o TERC en mamíferos) y el componente proteico de la telomerasa (Trt1 en levadura de fisión y TERT en mamíferos). Si bien, estos dos componentes principales por sí solos son necesarios para la síntesis de telómeros *in vitro*, existen proteínas accesorias de la telomerasa que contribuyen al ensamblaje, estabilización y tráfico de la telomerasa (Schmidt and Cech, 2015).

En la levadura de fisión, la familia de proteínas Sm se asocian con TR, lo que contribuye a la maduración y estabilidad de la telomerasa. Est1 se une directamente a TER1 y dirige la telomerasa a los telómeros a través de la interacción entre su dominio tipo 14-3-3 y el componente shelterina Ccq1 (Schmidt y Cech, 2015).

En los mamíferos, TERC, es parte de un grupo de ARN llamado H/ACA y se une a un complejo tetramérico, compuesto por las proteínas disquerina, NAF1, NHP2 y NOP10. Después de ensamblarse los componentes de la telomerasa TERT, TR y disquerina, hay interacción con una proteína llamada TCAB1 para facilitar el tráfico de telomerasa a los telómeros (Schmidt and Cech, 2015). La biogénesis de la telomerasa de mamíferos requiere además a la proteína chaperona de choque térmico (HSP 90) y P 23, que se unen a TERT para unirse a TERC (Jeong et al. 2016). En mamíferos, el ortólogo de levadura Est1, es EST1A (SMG 6), interactúa con TERT y puede unirse al ADNcs telomérico. Sin embargo, Est1A no está directamente involucrado en el reclutamiento de telomerasa, pero si en la protección y mantenimiento de los telómeros. También juega un papel en la descomposición de ARNm y parece afectar la abundancia de transcritos de ARN telomérico llamadas TERRA, que contribuyen a la regulación de la homeostasis de la longitud de los telómeros (Azzalin et al. 2007).

En *S. cerevisiae* se ha encontrado que las proteínas Est1p y Est3p son requeridas para la actividad *in vivo* de la telomerasa pero no para la actividad *in vitro* (Hugues et al. 2000; Linger et al. 1997). El motivo de reconocimiento a ARN (RRM) está presente en la estructura primaria de Est1 y junto con Est2p establece contacto con la ARN telomerasa cerca del dominio molde y la región 3' terminal del ADN telomérico, esta interacción requiere además de la ayuda de Cdc13p. La unión de Est3p con Cdc13p aumenta significativamente el acceso de la telomerasa al telómero (Evans y Lundblad, 1999; Snow et al. 2003). Recientemente se han identificado las proteínas Pop1, Pop6 y Pop7 como componentes esenciales de la holoenzima telomerasa (Lemieux, 2016), y son importantes para la estabilización de Est1 y Est2 en la RNP de la telomerasa *in vivo*. Pop1, Pop6 y Pop7 son subunidades conocidas de RNasa encargadas de procesar las RNasaP y la RNasaP mitocondrial (MRP) (Esakova, 2010). A TER también se unen el complejo Sm7 encargados de estabilizar la ARN telomerasa, y el heterodímero yKu70/80 importante para la importación y/o retención de la telomerasa en el núcleo (Seto, 1999, Pflingsten, 2012).

V. SINTESIS DEL TELOMERO POR LA ENZIMA TELOMERASA

La telomerasa juega un papel crítico en el mantenimiento del telómero. Esto se logra a través de la unión de TPP1-TIN2 del complejo proteico shelterina en mamíferos, y Tpz1-Ccq1 en levadura de fisión (Armstrong y Tomita, 2017) con el homólogo de Cdc13 de *S. cerevisiae*, que recluta a la telomerasa. La enzima, una vez que se encuentra en el telómero, alinea el extremo 3' distal de cadena sencilla del telómero con el molde del ARN de la telomerasa formando un híbrido ADN/ARN y se agrega una repetición del motivo de ADN telomérico en el extremo 3'. Posteriormente la telomerasa realinea su plantilla de ARN en el extremo 3'OH del ADN sustrato y agrega otra repetición telomérica. La capacidad de un solo complejo de telomerasa para agregar múltiples repetidos en un solo ciclo celular sin disociarse se denomina procesividad de adición de repetidos (RAP) (Greider, 1991; Yang y Lee, 2015). El mecanismo exacto de como la telomerasa se puede repositionar en el molde no se conoce completamente pero Deshpande y Collins (2018), sugieren que la longitud del ARN monocatenario que flanquea la plantilla 3' es determinante en la procesividad de adición de repetidos, mientras que el ARN monocatenario que flanquea la plantilla 5' y P2a.1 son críticos para la actividad pero no para la procesividad.

El alargamiento del telómero se ha observado durante la fase S, y al finalizar esta, el acceso de la telomerasa es bloqueado por el complejo de CST; en mamíferos CST está compuesto por CTC1, STN1 y TEN1, y en levaduras por Cdc13, Stn1 y Ten1 (Chen y Lingner 2013). La telomerasa se une preferencialmente a los telómeros más cortos, lo que garantiza que se mantenga una longitud promedio del telómero en todos los cromosomas (Hug y Lingner 2006).

En *S. cerevisiae*, la asociación de la subunidad catalítica a los telómeros (Est2) es bifásica, con interacción máxima en la fase G1/S temprana y en la fase S/G2 tardía (Taggart et al. 2002). El pico de expresión de Est2 en la fase temprana G1/S, depende de la interacción TLC1/Yku80 y no es necesaria para el alargamiento del telómero (Fisher et al. 2004). El pico en la fase S/G2 tardía ocurre con la unión de TLC1-Est1 al telómero a través de la interacción Est1-Cdc13 (Chan et al. 2008). Así TLC1 no solo es importante por sus efectos sobre la actividad de la telomerasa, sino porque permite la asociación telomerasa-

telómero, a través del reclutamiento de Est2 a los telómeros durante la fase tardía S/G2, mientras Est1 desempeña una función de activación de la telomerasa (Evans y Lundblad 1999).

Después de la replicación, en levadura Stn1-Ten1 se une a Cdc13 para bloquear la interacción de la telomerasa (Churikov et al. 2013). Se han propuesto mecanismos similares en mamíferos y en levaduras de fisión, donde el complejo CST se asocia con TPP1 y Tpz1, respectivamente, durante la fase S. Además, el complejo recluta al complejo primasa- α -polimerasa, para rellenar la cadena complementaria de la nueva cadena de telómero sintetizada por la telomerasa (Feng et al. 2017; Grossi et al. 2004). Fuera de la fase S, los telómeros forman una estructura conocida como “estado no extendible” bloqueando el acceso a la telomerasa, (Teixeira, 2004).

En ausencia de la telomerasa el desgaste del telómero se produce después de cada ronda de replicación del ADN por el llamado “problema de replicación de extremos del ADN” (Olovnikov, 1996). Sin embargo, antes de que estos sean críticamente acortados y se comprometan las funciones de protección de las regiones codificantes, las células detienen el ciclo celular de forma permanente desencadenando el programa de senescencia, en este caso llamado “senescencia replicativa”. Algunas células madre, células progenitoras y eucariotes unicelulares expresan actividad de telomerasa y retrasan la senescencia replicativa. Cuando hay un equilibrio entre la adición y erosión de los telómeros, las células logran una longitud de telómero homeostática (Hug y Lingner, 2006). La homeostasis de la longitud del telómero se ha observado en eucariotes unicelulares y células germinales, permitiendo mantener los telómeros en futuras generaciones.

VI. REGULACIÓN DE LA TELOMERASA

La actividad de la telomerasa está altamente controlada, desde la expresión de sus componentes hasta el ensamble apropiado para el funcionamiento de los factores requeridos para reclutar y activar la telomerasa en los telómeros (Armstrong y Tomita 2017; Churikov et al. 2013; Schmidt y Cech 2015).

En eucariotes superiores los mecanismos que regulan la actividad de la telomerasa son variados: a nivel transcripcional, *splicing* alternativo, modificación post-transcripcional y post-traducciona, el ensamblaje de la holoenzima, la localización

subcelular de TERT y los mecanismos epigenéticos. Las actividades deficientes de la telomerasa y los telómeros cortos han sido implicados en la patobiología de varias enfermedades relacionadas con la edad y síndromes de envejecimiento prematuro. Por otro lado, la telomerasa está anormalmente sobreexpresada en más del 85% de tumores malignos de humano, siendo generalmente la expresión transcripcional de TERT el paso limitante para la re-activación de la holoenzima. En el humano la reactivación de la telomerasa en células somáticas incrementa el potencial replicativo del linaje celular y la probabilidad de inmortalización; es por esto que se la ha propuesto como potencial blanco terapéutico para curar el cáncer. La importancia de evaluar los factores que regulan esta enzima es fundamental, y los microorganismos pueden ser modelos de estudio relativamente simples para hacer inferencias del comportamiento biológico y molecular de organismos superiores (Amstrong y Tomita, 2018)

Mientras que en vertebrados, la mayoría de los mecanismos que regulan la actividad de telomerasa lo hacen de manera negativa y la van apagando conforme avanzan los eventos de diferenciación celular dejando la actividad de la enzima prácticamente indetectable en los tejidos somáticos totalmente diferenciados, en hongos microscópicos y levaduras los componentes de la telomerasa parecen expresarse constitutivamente en el nivel transcripcional. Los microorganismos eucariotas, de manera similar a los procariotas, se comportan como linajes celulares potencialmente inmortales, y la senescencia replicativa debida a la represión de la telomerasa no se ha encontrado de manera natural en ellos. En eucariotes inferiores la homeostasis del telómero se regula mediante el posicionamiento de la telomerasa activa en los extremos cromosomales que requieren alargarse. La unión del telosoma/shelterina y del complejo CST al complejo telomerasa regula el acceso de la última a su substrato, los telómeros y las proteínas de unión específicas del telómero juegan un papel muy importante.

Por otra parte, la longitud misma del telómero también es importante ya que determina el cambio entre los estados “extendible” o “no extendible” de los telómeros a través de mecanismos de “conteo” de moléculas de proteínas. Estos mecanismos le especifican a la célula cuando hace falta alargarlos y limitan cuando es necesario la actividad telomerasa (Hirano et al. 2009; Teixeira et al. 2004; Marcand et al. 1997), y aún más, el telómero más corto, una vez extendido en una célula mutante telomerasa negativa,

es la clave para el desencadenamiento de la senescencia (Xu et al. 2013).

Las secuencias subteloméricas también contribuyen al control del alargamiento del telómero. TERRA, el transcrito proveniente de las secuencias del ADN subteloméricos y del telómero, producto de la actividad de la ARN polimerasa II sobre esa región, se ha descrito como parte del complejo nucleoproteico de los telómeros (Azzalin y Lingner 2008). La naturaleza del extremo cromosomal, sea X o Y' por las TAS adyacentes al repetido telomérico, ejercen un control diferente sobre la expresión de TERRA, siendo los telómeros Y' los que favorecen su expresión transcripcional y contribuyen a la regulación de la longitud del telómero (Iglesias et al. 2011). El transcrito junto con la nucleoproteína heterogénea nuclear hnRNPA1 y Pot1 regulan el alargamiento de los telómeros desplazando RPA de los telómeros después de su replicación en la fase S, asegurando las funciones de protección y replicación en la temporalidad exacta del ciclo celular (Flynn et al. 2011).

VII. ALARGAMIENTO DEL TELÓMERO POR RUTAS ALTERNATIVAS A LA TELOMERASA

En ausencia de la actividad de la telomerasa, tanto levaduras como mamíferos son capaces de alargar su telómero o TAS a través de mecanismos alternativos (ALT). Este fenómeno fue descrito primero en *S. cerevisiae*; la pérdida de actividad de telomerasa produce un fenotipo de telómeros siempre cortos (EST: *ever short telomeres*) y muerte celular. Sin embargo, los telómeros desestabilizados por la erosión pueden activar la ruta de alargamiento de telómero alternativo (ALT) de manera esporádica, la cual dirige las secuencias teloméricas hacia la recombinación homóloga a través de la invasión de cadenas inter/intracromosómicas de los extremos de los cromosomas (Gadaleta et al. 2016; Lue y Yu, 2017; Lundblad y Blackburn, 1993; Lundblad, 2002). Se ha demostrado que en mecanismos ALT se encuentra involucrada la recombinación homóloga entre secuencias teloméricas; ésta se ha asociado con la formación de círculos extracromosómicos y es dependiente de Rad52, Rad50, Rad51 y Sgs1 (Le et al. 1999; Muntoni et al. 2005; Dunham et al. 2005; Aksenova et al. 2019). En levaduras, se han definido dos rutas ALT por los factores involucrados en el alargamiento del extremo cromosomal en Tipo I y Tipo II dependiendo de los factores involucrados en la recombinación (Rad51 y Rad 52) y (Rad50,

Rad52 y Sgs1) respectivamente, y el tipo de secuencia telomérica o subtelomérica amplificada (elemento Y' más segmentos cortos de secuencia telomérica) o (tramos heterogéneos de repetido telomérico), respectivamente (Teng y Zakian, 1999; Makovets et al. 2008; Huang, 2001). En humanos las células ALT positivas son caracterizadas por la longitud heterogénea del telómero, con la presencia de telómeros inusualmente cortos y largos y por la co-localización de telómeros con un tipo específico de dominios granulares denominados cuerpos PML (ProMyelocytic Leukemia bodies), los así llamados cuerpos PML asociados a ALT (APBs) (Muntoni et al. 2005; Dunham et al. 2005).

VIII. ANTECEDENTES

Ustilago maydis, es un hongo basidiomiceto dimórfico causante de la enfermedad conocida como el carbón del maíz o huitlacoche. Este organismo es adecuado como sistema modelo para realizar estudios de biología celular y molecular de organismos eucariotes, sus antecedentes se remonta a más de 100 años de estudio (Christensen, 1963), actualmente es el arquetipo para la investigación sobre dimorfismo, fitopatogenicidad y virulencia, recombinación y reparación de DNA, transporte de ARN, control del ciclo celular, biorremediación, metabolismo de RNA, y más recientemente para el estudio del mantenimiento del extremo cromosomal (Bautista-España et al. 2014; Lue y Yu, 2016; Swapna et al. 2018; Yu et al. 2018).

Los extremos cromosomales de *U. maydis* están constituido por repetidos de la secuencia TTAGGG, arreglados en tándem formando tramos de un tamaño promedio de 37 a 39 repetidos teloméricos (Guzmán y Sánchez 1994). En el borde del repetido telomérico se encuentra un segmento de 376 pb conservado en todos los extremos cromosomales del hongo. A esta secuencia se le denominó *rumT* (repetido de *Ustilago maydis* en telómero). La secuencia *rumT* presenta un tramo de aproximadamente 89 pb rico en A y T, el cual se especula que podría tener algún papel funcional (Sánchez y Guzmán, 1994). En estudios posteriores se mostró que esta secuencia también se encuentra interdispersa sobre regiones internas del extremo cromosomal (Sánchez, 1998) como se muestra en la figura 7.

Hacia el extremo centrómero proximal de la región telomérica se encuentran dos tipos de elementos estructurales asociados al telómero denominados: *UTASa* y *UTASb*

(*Ustilago* Telomere Associate Sequence) los cuales son estructuralmente similares a los elementos X y Y' de *S. cerevisiae*. *UTASa* es una secuencia muy conservada, localizada adyacente al repetido telomérico del hongo; al igual que el elemento Y', alberga un marco de lectura abierto de 2664 pb que conserva los siete motivos de la helicasa de la subfamilia de las helicasas recQ, denominado *USHER* (Sánchez Alonso et al. 1998; Vaquero Vera, 2003). *UTASb* comparte semejanza con el elemento X de *S. cerevisiae*, su tamaño es variable y presenta una región conservada de aproximadamente 1 kb semejante al elemento X de *S. cerevisiae* (Sánchez Alonso et al. 1998).

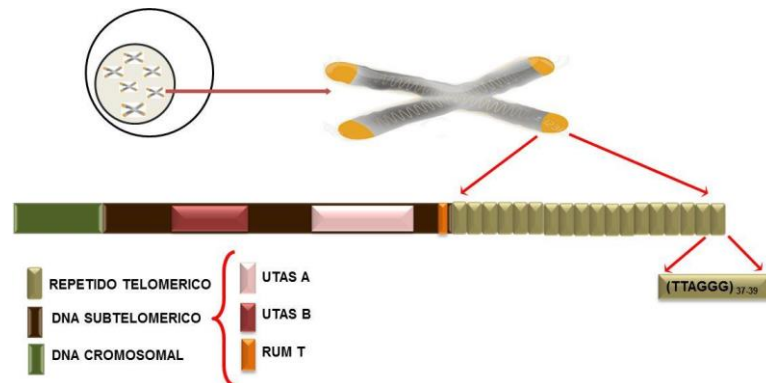


Figura 7: Representación esquemática del extremo cromosomal de *U. maydis*.

Un análisis bioinformático del locus UMAG_11198 de *U. maydis* (<http://mips.helmholtz-muenchen.de>) reveló que la transcriptasa inversa de la telomerasa (Trt1p) está codificada por un único marco de lectura abierto (ORF) de 4116 pb, que produce una proteína de 1371 aminoácidos y contiene todos los dominios conservados de la subunidad catalítica de la telomerasa de humanos, plantas y hongos. Estos dominios incluye los siete motivos conservados (1, 2, A, B9, C, D y E) en el dominio de transcriptasa inversa y los motivos conservados CP, QFP y T del dominio de unión a ARN, cuya función se requiere para la unión a la subunidad ARN (Bautista-España et al. 2014). (<http://mips.helmholtz-muenchen.de>).

La telomerasa de *U. maydis* fue puesta de manifiesto por su actividad, utilizando el protocolo de amplificación del repetido telomérico (TRAP) por Bautista-España, quien hizo la adaptación del protocolo descrito por Kim (1994), utilizando cada componente por separado o mediante el sistema comercial *TeloTAGGG*, de Roche. La actividad de telomerasa se detectó en esporidias de *U. maydis* mediante ensayos de TRAP-ELISA.

IX. JUSTIFICACIÓN

No se conoce como se lleva a cabo la regulación de la telomerasa ni que tan abundante o esencial es esta enzima en *U. maydis*. Por lo que es importante analizar el perfil de la expresión transcripcional de los genes que componen el centro catalítico de la telomerasa por la importancia de éstos durante la prosecución del ciclo celular. Así como analizar la temporalidad de expresión de estos genes durante el ciclo de vida del hongo (transición de la fase heterotrófica esporidia a la biotrófica) para determinar la probable vía de regulación de la telomerasa durante la diferenciación celular.

En este trabajo proponemos obtener mutantes negativas del componente proteico de la telomerasa, así como caracterizar el patrón de abundancias relativas de estos genes en preparaciones de ARN total de cultivos sincronizados y de agallas del carbón del maíz, e identificar ARN mensajeros de *trt1*, *tck2*, *dkc3* durante la fase biotrófica del hongo. Además de determinar el número de copias que se tiene de los elementos subteloméricos en mutantes telomerasa negativas y en la cepa silvestre 521.

X. HIPÓTESIS.

Algunos genes relacionados con componentes estructurales del complejo telomerasa de *U. maydis* y otros relacionados con la regulación de la formación del complejo están diferencialmente regulados durante el desarrollo celular y en el proceso de diferenciación celular. Además muy probablemente existan diferencias en esta regulación entre *U. maydis* y otros organismos homólogos levaduriformes.

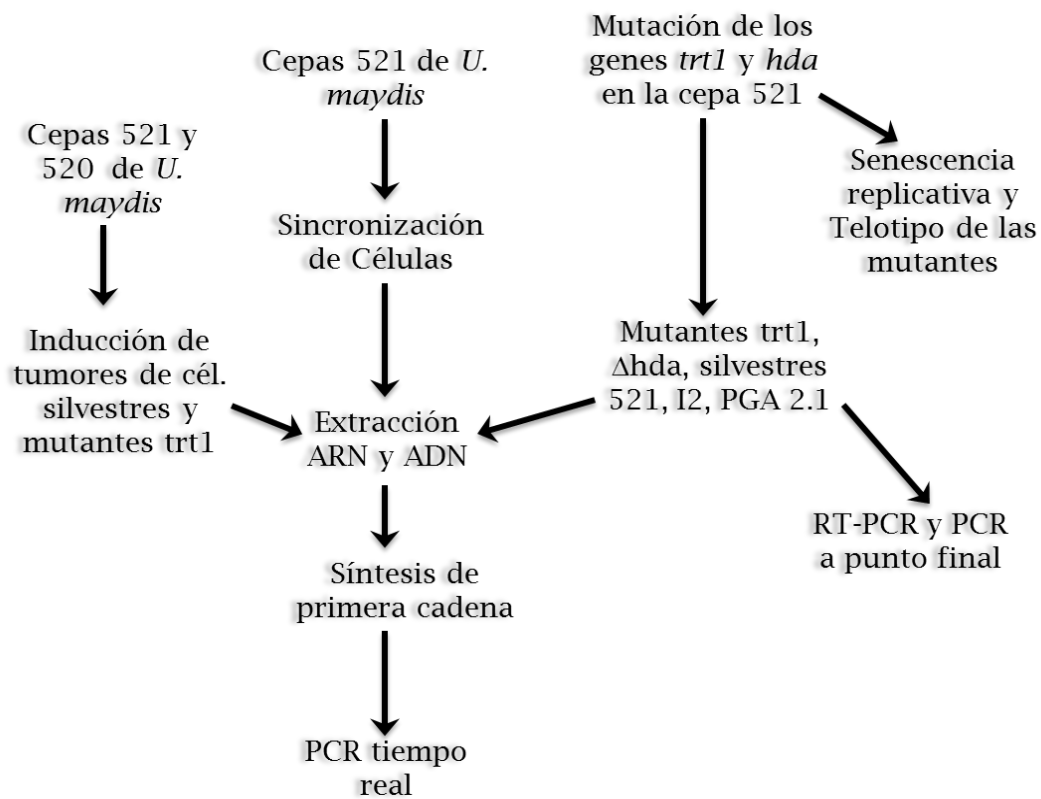
XI. OBJETIVO GENERAL

Análisis de patrones de expresión transcripcional de genes involucrados en la regulación de la longitud del telómero en cultivos sincrónicos y no-sincrónicos de esporidias de *Ustilago maydis*.

XI.1 Objetivos particulares:

- Obtención de mutantes telomerasa negativa de la cepa 521 de *U. maydis* mediante interrupción del gen *trt1* localizado en locus UMAG_11198 del mismo hongo.
- Determinar la abundancia relativa de los transcritos tanto de *trt1*, como de *tck2*, y *dkc* en cultivos sincrónicos y no sincrónicos del hongo
- Determinar la abundancia relativa de *trt1* y *dkc* en agallas del carbón del maíz
- Determinar la abundancia absoluta de las secuencias *UTASa* y *UTASb* de la región subtelomérica en *U. maydis*.

XII. ESQUEMA DE TRABAJO



XIII. MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas y plásmidos

Las cepas de *U. maydis* se crecieron en extracto de papa (200 g de papa y 20 g de azúcar morena) y en medio YEPS (1 % w/v extracto de levadura, 2 % w/v peptona de caseína y 2 % w/v sacarosa). El medio completo adicionado con 1 % de carbón activado (medió de apareamiento) se preparó como describe Holliday (1974) y se incubaron a 30 °C/250 rpm en agitación, o estacionario en medio gelificado.

E. coli XL1 BLUE MRF', (Stratagene, La joya, CA) se utilizó para propagar los plásmidos. El medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina se usó para el crecimiento de *E. coli*. Para las construcciones se usó el sistema de vectores para clonación pBluescript KS-/+ Stratagene.

Tabla 1: Descripción de cepas y plásmidos usados en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Características	Referencia
521	<i>alb1</i>	Cepas de laboratorio donada amablemente por Holloman W. K.	Kronstand y Leon, 1989.
518	<i>a2b2</i>		Comunicación personal
520	<i>a2b2</i>		Comunicación personal
I2	<i>a2b?</i>	Aislado natural de Irapuato, Gto. Donado por el Dr. Octavio Paredes CINVESTAV IPN, campus Guanajuato	Guzmán y Sánchez, 2014.
PGA2.1	<i>a2b?</i>	Aislado natural de Jalapa, Veracruz	Laboratorio de Microbiología Molecular y Celular CICM-ICUP
FB1	<i>alb1</i>	Progenie de la cruce de 521 con 518	Banuett, 1989
FB2	<i>a2b2</i>	Progenie de la cruce de 521 con 518	Banuett, 1989
trt1-1	<i>alb1</i>	<i>trt1::Hyg^r</i> superviviente Tipo I	Este trabajo
trt1-2	<i>alb1</i>	<i>trt1::Hyg^r</i> superviviente Tipo II.	Esté trabajo
W204	<i>alb1</i>	Progenie cruce 520/trt1	Esté trabajo
Δ14	<i>a2b2</i>	Progenie cruce 521/trt1-53	Este trabajo
Plásmido	Características		Referencia
pORFH1	<i>UTASa</i> clonado en el vector pBluescrip KS-		Tesis Lic. 2001
pLib5	<i>UTASb</i> clonado en el vector pBluescrip KS-		Sánchez Alonso y Guzmán, 1998
pDKC	<i>dkc1</i> clonada en el vector pBluescrip KS-		Esté trabajo
pCM1007	Cassette para la interrupción <i>trt1</i> utilizado en este trabajo		W. K. Holloman, comunicación directa
pTEL4	Contiene el fragmento de 250pb de los repetidos teloméricos		Sánchez Alonso, comunicación directa

Extracción de DNA del *Ustilago maydis*

Las cepas se crecieron en extracto de papa agar incubando 24 h a temperatura

ambiente. Se tomó una asada de esta placa e inoculó en 5 ml de extracto de papa líquido, e incubó a 30 °C/250 rpm durante 24 h (incubator shaker, Lab Line®), posteriormente se tomó 1ml a $DO_{600}=1$ y se inoculó en 200 ml de extracto de papa líquido e incubó a 30 °C/250 rpm durante 20 h. Se cosecharon las células por centrifugación a 2000 rpm en una centrífuga Eppendorf® centrifuge 5810, se congelaron las pastillas de células a -20 °C. Las células se maceraron con mortero de porcelana y nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se recuperó el polvo en un tubo de polipropileno y se le agregaron 5 ml de búfer de extracción (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % w/v SDS). Se agregaron 5 ml de fenol-cloroformo se mezcló vigorosamente y se centrifugó 20 min/3600 rpm a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se lavó dos veces con un volumen igual de cloroformo y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Al sobrenadante se agregaron 0.6 vol de isopropanol y se mezcló vigorosamente. El DNA se recuperó centrifugando a 3600 rpm/10 min a temperatura ambiente. La pastilla se lavó dos veces con etanol 70 % y se resuspendió en 500 µl de agua destilada. Las muestras de DNA se trataron con 5 µl RNAsa al 0.1 %, se lavó con fenol-cloroformo y cloroformo, se precipitó con etanol absoluto, las pastillas de ADN se lavaron con etanol 70 %, se resuspendieron en 200 µl de agua destilada PiSA®, y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Evaluación de la longitud del fragmento terminal de restricción (TRF) del cromosoma

Una vez obtenido el ADN total libre de ARN se hizo una dilución 1/100 y se leyó la absorbancia DO_{260} para cuantificar y ajustar la concentración de ADN a 1 µg. 10 µg de ADN se digirieron con la endonucleasa *PstI* (Thermo Scientific) de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial. Las bandas se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v disuelta en búfer 0.5 X TBE (10 X: 0.9 M Tris-Base; 0.88 M ácido bórico, 4 mM EDTA), y se corrió en el mismo búfer a 5 v/cm. La transferencia tipo se llevó a cabo en membranas de nailon (Amersham-GE) con solución amortiguadora SSPE 10 X. Los geles obtenidos con las muestras de ADN se trataron de la siguiente manera: 10 min en solución de HCl 0.2 N, 30 min en solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 N) y 20 min en solución neutralizante (Tris-HCl 1 M pH 7.9 y NaCl 1.5 M). La transferencia se dejó de 16 a 20 h, las membranas se fijaron con luz UV (120 000 µJ), 2 pulsos a una

longitud de onda de 302 nm.

Las hibridaciones se realizaron con la solución de Church y Gilbert, [(1984), 0.5 M Na₂HPO₄ pH 7.2, 7 % w/v de SDS, EDTA 1 mM y 1 % w/v de BSA]. La sonda que se usó fue un fragmento de la secuencia (TTAGGG)₃₇ y se marcó con dCTP [α -³²P]-3000 Ci/mmol a una concentración de 10⁸ cpm/ml, utilizando iniciadores de secuencia aleatoria (InvitrogenTM). Las hibridaciones se llevaron a cabo a 59 °C durante toda la noche; los lavados se hicieron 2 veces con 2 X SSPE, 0.1 % SDS a temperatura ambiente y 1 lavado con 0.4 X SSPE, 0.05 % SDS precalentada a 59 °C. La señal se detectó por autorradiografía en película radiográfica Kodak (Biomax®) con un tiempo de exposición de 4-72 h a una temperatura de -70 °C para obtener la imagen adecuada. Las autorradiografías se analizaron en un densitómetro y se les aplicaron los cálculos descritos por Harley et al. (1990) para determinar la longitud del telómero. Para su regeneración, se lavaron las membranas con una solución 0.1 % w/v SDS y 0.1 X SSPE durante 1 min en agitación constante; este tratamiento se repitió al menos dos veces más hasta alcanzar 50 cpm (cuentas por minuto) o menos. Para corroborar que la membrana ya no estaba marcada se expuso nuevamente en una autorradiografía en película radiográfica Kodak (Biomax®) con un tiempo de exposición de 24 h a una temperatura de -70 °C.

Transformación de *U. maydis*

La transformación se llevó a cabo como describe Tsukuda (1988). De un cultivo fresco de 16 h a una DO₆₀₀=1 se centrifugo a 2000 rpm/6 min; se tiró sobrenadante y se lavaron las células 2 veces con búfer SCS (50 mM citrato de sodio, 1 M sorbitol pH 5.8). Posteriormente se resuspendieron las células en 500 µl de búfer SCS y 20 mg de la enzima comercial Lysing enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma L1412) disuelta en SCS. Las células se incubaron 15 min a 37 °C. Se verificó la formación de protoplastos mediante una preparación fresca observada al microscopio con el objetivo 40X. Una vez formados los protoplastos se lavaron dos veces con búfer SCS y 1 vez con búfer STC (Sorbitol 1 M, Tris-HCl 10 mM; CaCl₂ 100 mM pH 7.). Los protoplastos se resuspendieron en 1 ml de búfer STC. En un tubo de polipropileno se le agregó 2 µl de heparina (50 mg/ml), 500 ng de DNA y 50 µl de la suspensión de protoplastos. Se dejó reposando 20 min sobre hielo y se le agregaron 500 µl de PEG 3350 al 40 % (w/v) disuelta en búfer STE, se mezcló muy

bien y se dejó sobre hielo 20 min. Se le agregó agar de regeneración fundido a una temperatura aproximada de 35 a 40 °C [Sacarosa 10 g; KNO₃ 1.5 g; solución de sales 63 ml (KH₂PO₄ 16 g; Na₂SO₄ 4 g; KCl 8 g; MgSO₄ 2 g; CaCl₂ 1 g; elementos trazas 8 ml (H₃BO₄ 60 mg; MnCl₂·4H₂O 140 mg; ZnCl₂ 400 mg; Na₂MoO₄·2H₂O 40 mg; FeCl₂·6H₂O 100 mg; CuSO₄ 400 mg)); sorbitol 1M y 0.8 % agarosa], se mezcló muy bien y se extendió sobre placas de agar de regeneración (sacarosa 10 g; KNO₃ 1.5 g; solución de sales 63 ml; sorbitol 1 M y 1.6 % de agar bacteriológico y el agente de selección). Las transformantes fueron visibles después de incubar a 30 °C durante 4 días. La concentración final de cada uno de los agentes de selección usados fueron: higromicina 200 µg/ml, o carboxin 4.8 µM. Las transformantes obtenidas fueron recuperadas sobre medio extracto de papa con su agente de selección para su caracterización.

Extracción de ARN total de levadura

Los cultivos se prepararon tomando una asada de la cepa de interés e inoculó en 5 ml de extracto de papa líquido, e incubó a 30 °C/250 rpm durante 24 h, posteriormente se tomó 1ml a DO₆₀₀=1 y se inoculó en 5ml de extracto de papa líquido e incubó a 30 °C/250rpm durante 12 h. Posteriormente, se inoculó a 200 ml de extracto de papa líquido 1 ml del precultivo a una DO₆₀₀=1 e incubó a 30 °C/250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀=1. Se cosecharon las células por centrifugación a 2000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5810-R, se congelaron las células a -20 °C. Las células se maceraron con mortero de porcelana y nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se recuperó el polvo en un tubo de polipropileno y se le agregaron 5 ml de búfer A (20 mM de acetato de sodio pH 5.5, 1 mM EDTA, 0.5 % w/v SDS), y 5 ml de fenol-ácido se mezcló vigorosamente y se centrifugó durante 20 min/3600 rpm/4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se lavó dos veces con un volumen igual de cloroformo y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Al sobrenadante se le agregó 0.6 vol de isopropanol y se mezcló vigorosamente. El ARN se recuperó centrifugando a 3600 rpm/10 min/4 °C. La pastilla se lavó 1 vez con etanol 70 % y se resuspendió en 500 µl de agua destilada. 100 µg ARN se trató con 2 µl ADNasa free ARNasa (La Roche & Co.), se lavó con fenol-cloroformo y cloroformo y precipitó con etanol absoluto. Las pastillas de ARN se lavaron con etanol 70 %, se resuspendieron en 50 µl de agua PiSA®, y almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Obtención de ARN de agallas de plántulas de maíz

De las agallas obtenidas de la infección de una plántula de maíz (tallos y hojas) se congelaron en nitrógeno líquido. Se maceraron en un mortero de porcelana con N₂ líquido, hasta obtener un polvo fino. Se recuperó el polvo en un tubo de polipropileno y se le agregaron 5 ml de búfer A (20 mM de acetato de sodio pH 5.5, 1 mM EDTA, 0.5 % w/v SDS), y 5 ml de fenol-ácido se mezcló vigorosamente y se centrifugó durante 20 min/3600 rpm/4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se lavó dos veces con un volumen igual de cloroformo y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Al sobrenadante se le agregó 0.6 vol de isopropanol y se mezcló vigorosamente. El ARN se recuperó centrifugando a 3600 rpm/10 min/4 °C. La pastilla se lavó 1 vez con etanol 70 % y se resuspendió en 500 µl de agua destilada. 100 µg ARN se trató con 2 µl ADNasa libre de ARNasa (La Roche & Co.), se lavó con fenol-cloroformo y cloroformo, se precipitó con etanol absoluto, las pastillas de ARN se lavaron con etanol 70 %, se resuspendieron en 50 µl de agua PiSA®, y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Pureza e integridad del ARN

La concentración y la calidad del ARN afecta el resultado del ensayo de RT-PCR. La pureza y cantidad del ARN se midió en espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesys® 10S UV-US) mediante la lectura de su absorbancia a una longitud de onda de 230 nm, 260 nm y 280 nm; todas las muestras tuvieron un índice 260/280=1.8-2.0 y 260/280=2.0-2.2. La integridad del ARN se observó en geles desnaturalizantes teñidos con bromuro de etidio, las bandas que corresponden al ARNr 28 S y 18 S, fueron visibles, siendo la banda 28 S dos veces más intensa que la 18 S.

Tabla 2: Tabla de Iniciadores usados en este trabajo

Genes	Primer	Secuencia	Tamaño (pb)	
Tubulina <i>TUB1</i>	TubA01For	AATGAGCCGCCACGACAGTTCC	171	
	TubA02Rev	TCCATACCCTCGCCACATAACCAG		
	TubA03For	TGCTCGGGTCTTCAGGGCTTCTT	262	
Actina <i>ACT1</i>	TubA04Rev	TGGTGCGGCAAATGTCGTAG	243	
	ACTMdup	CAACGCCCCGGCCTTCTACG		
	ACTMdlw	ATTTCCGCGTCTCGGCAGTGGTG	158	
	ACTendlw	AGCGCGGTGATCTCCTTTTG		
Histona H4 <i>HH4</i>	ACTendUp	TGTTCCAGCCTGCCTTCCTT	102	
	HH4dir	GGCGGCTAGGGTCTCGGCAA		
	HH4RtimeR	GACGCGCAAGACGACGGATAG	194	
	UmHH4F	CCAAGCCCGCTATCCGTCGTCT		
TERT <i>trt1</i>	HH4Rev	GGCCCTGGCGCTTGAGTG	116	
	TELRTIME	CGCGCATCTACAAGGACGAGTTTC		
	TELRTIMER	CGGTCAGAGTGTCGCGTATGTCG	253	
CGFMD05	GTCTTTCCGCATTACGTCTACAGG			
	CGFMR06	TCGCGGCGGCACCCAAGTT	903	
	EST2 FOR DD1	GGTACTTGCTTTGTGCAGC		
	EST2 REV DD1	CTAACGACTCGACTTCAG	1210	
	EST2 FOR DD1	GGTACTTGCTTTGTGCAGC		
	HYG REV DD1	TCAGGCTCTCGCTGAATTCC	1942	
	EST2 FDD2	TTGCGCAACTTCTACGAGACT		
	HYG REV DD1	TCAGGCTCTCGCTGAATTCC	161	
	Cinasa <i>ick2</i>	CIN INT TR UPP		AGACGTTGCTCACCTCCCTACA
		CIN INT TR LOW	CGGCCACGGTTGTCCATC	157
		CIN3' TR Low	GGGAAAACCTGCCAAACGAG	
Disquerina <i>Dkc</i>	CIN3' TR Upp	GGCCGTGCAGCAAGAACAGGA	127	
	DKCmD	CGTCCGGTGCACTTTCTGA		
	DKCmR	AGCGACTCGAGGGGACGGATGAC	118	
	UmDKCUp	GACTATTCCGGATGCCTCTGTCT		
	AltUMDKCLw2	CGCTTCTTGCTGTGCTGCTGTC		
UTAS a	DKC1U	GGATCCATGGCTCTTCCACTTGGTAC	619	
	DKC1L	GGATTCCGATTTCGCTCACTTGTCTTC		
	AVV 1	GGCTGGACCGCATGGTAA	2857	
	AVV 2	GACTGCGCTGGCATTCC		
	UTAS IF	GGAGTGATCATCTCGCCGTAACCTC	215	
	UTAS IR	TCTGCCCACTGATCACCATAACC		
	TR5Lib8For	AGGCGCTATCACTCTT	190	
	TR5Lib8Rev	GATAAACCGCTTCAAAA		
	TRLib8MidUpp	CGTCGGCGTTGGGTGTG	144	
	TRLib8MidLow	GACTCGGCTGGCATTCC		
	TR3RQL1Upp	GCTGTGCCATGCGGTATTCA	411	
	TR3RQL1Low	GTGGCCATCACGACTCCT		
	UTAS b	UTASb3For	CTGGGCGAAGCAAGTGAAGAG	91
		UTASb3Rev	ACCGGACAGGACATGAGCGATACC	
		Primer Dir 4	CCCATTACCCTCAGCAGAC	Repetidos telomericos
Primer Rev 4	TCGTTGGGGTGGAGGTGGAT			
Telómero	US/DOBAES	CGTGTCAACCGCTGATAG	1028	
	CX/DOBAES	CCTTACCCTTACCCTTACCCTAA		
	TS/RODOBAES	AATCCGTCGAGCAGACTT		
Endoglucanasa 1	Egl1fw	CGCTGGAATGGCAACACGATACTG	1028	
	Egl1rv	GATTGCTGCCGCCCGAAGGAG		

Síntesis de primera cadena (ADNc)

Para la síntesis de ADNc se usó el sistema comercial Thermo Scientific RevertAid H Minus Reverse Transcriptase®. Como iniciador se usaron iniciadores reversos específicos de cada gen de interés (Tabla2) incluyendo los genes de referencia para los ensayos de normalización. La síntesis de ADNc se realizó en dos pasos, usando 1 µg de

ARN. En el paso uno se colocó en un tubo de 200 μ l, 1 μ g de ARN total y 50 mM de iniciador reverso, se ajustó a 6.5 μ l con agua libre de nucleasas, la mezcla se desnaturalizó a 65 $^{\circ}$ C durante 5 min y se colocó sobre hielo. Posteriormente se le adicionaron 2 μ l de búfer de reacción 5 X, inhibidor de ARNasa 0.25 μ l, 0.5 μ l de transcriptasa inversa, ajustando volumen a 10 μ l. La mezcla se incubó 60 min a 45 $^{\circ}$ C, terminando con un ciclo de 70 $^{\circ}$ C durante 10 minutos. El ADNc se almacenó a -20 $^{\circ}$ C hasta su uso.

PCR Cuantitativo.

El PCR cuantitativo se realizó en IQTM5 Multicolor Real Time PCR Detection System de BioRad®. Para cada muestra de qPCR se realizaron tres replicas técnicas y dos repeticiones biológicas. Para cada par de iniciadores se incluyó un control sin molde (NTC) para detectar formación de dímeros de primers. La mezcla de reacción se preparó a temperatura ambiente como sigue: 1 μ l de ADNc, 1 μ l de primer directo 10 nM, 1 μ l de iniciador reverso 10 mM, 10 μ l de SYBR Green PCR Master Mix® (Thermo Scientific) y 7 μ l de agua. El master mix contiene la ADN polimerasa, el colorante SYBR Green, el colorante de referencia pasivo (ROX), junto con los componentes de reacción requeridos. Se usaron tubos individuales de tapa cóncava. La reacción se llevó a cabo de acuerdo con las indicaciones del fabricante: 1 ciclo de 95 $^{\circ}$ C/10 min; 40 ciclos 95 $^{\circ}$ C/15 s, 60-65 $^{\circ}$ C/30 s, 72 $^{\circ}$ C/30 s y para la curva de desnaturalización 60 ciclos a 65 $^{\circ}$ C aumentando 5 s en cada ciclo.

Para calcular el rango dinámico se hicieron diluciones de logaritmo 10 abarcando un rango de 1, 10, 100, 1000, 10,000, 100,000, y 1, 000,000 moléculas. Se obtuvo una línea recta en la concentración 100 a 1, 000,000 moléculas, que se utilizó como rango dinámico.

Los datos de cuantificación fueron analizados por el método de cuantificación absoluta y relativa. Para determinar y analizar los cambios relativos en los genes problema se aplicó el método de ciclo CT. Este método toma los valores CT obtenidos del equipo al hacer el experimento, tomando como referencia a la cepa silvestre 521 y aplicando la fórmula de Pfaffl (2001). Como referencia se usaron los genes de *ACT1* y *TUB1*, ya que mostraron niveles estables de expresión bajo diferentes condiciones para los valores de normalización. Como referencia a lo largo del ciclo celular se usó el gen de la histona H4, cuyo pico de expresión se ha reportado en la fase S. Como control negativo se hizo una

reacción sin templete. El análisis de las curvas de disociación que revelaron un solo pico, también nos ayudaron elegir el par de iniciadores con el que trabajamos.

Cultivos sincronizados de *U. maydis*

La sincronización de células se realizó por el método de ayuno, haciendo ligeras modificaciones al método descrito por Holliday (1965). La cepa 521 se creció en medio extracto de papa agar, posteriormente en medio YEPS sólido para poder hacer los precultivos en caldo YEPS. Los cultivos se crecieron en medio mínimo con nitratos (10 g sacarosa; 3 g KNO₃, 63 ml solución de sales pH 7; 100 µl de complejo B) hasta inicio de la fase estacionaria (en un tiempo no mayor a 16 h), las células se lavaron dos veces con medio de ayuno (KCl 0.01 M; MgCl₂ 0.0025 M; CaCl₂ 0.0025 M). El paquete celular se resuspendió en medio YEPS (1 % extracto de levadura; 2 % peptona de caseína y 2 % sacarosa pH 7) e incubó durante 35 min/30 °C/200 rpm. Las células se lavaron 3 veces con medio de ayuno y se resuspendieron en el mismo medio e incubaron durante 10 h. Se repitió el periodo de alimentación dos veces al día durante tres días. En el cuarto día a los cultivos sincronizados se les dio un periodo de alimentación como se indica anteriormente y se transfirió a medio completo (1.5 g NH₄NO₃; 2.5 g peptona de caseína; 10 g extracto de levadura, 10 g Sacarosa; 63 ml de solución de sales pH 7; 100 µl de complejo B) dejándolos crecer durante 1 h. Se tomaron muestras en intervalos de 20 min y se observaron al microscopio. Las alícuotas de células se fraccionaron en dos, una para extracción de ARN como se describe arriba y otra alícuota para citometría de flujo. Las muestras para citometría de flujo se lavaron con TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) y se resuspendieron en 500 µl de TBS. Se agregó un volumen igual de solución fijadora (50 % etanol y 10 % ácido acético) y se refrigeraron de 1 a 8 h a 4 °C, posteriormente se centrifugaron las muestras y resuspendieron en agua destilada PiSA®. (Onel, 1996).

Infeción de plántulas y obtención de tumoraciones

Los ensayos de apareamiento se realizaron co-inoculando 5 µl de las cepas a analizar (DO₆₀₀=10) en medio completo suplementado con carbón activado (1.5 g de NH₄NO₃; 2.5 g peptona de caseína; 10 g de extracto de levadura; 10 g de sacarosa; 63 ml

de solución de sales; 1 % w/v carbón activado). Las células que presentaron fenotipo fuz+ (presencia de filamento blanco,) (Banuett y Herskowitz, 1989) son las que se utilizaron para la infección de plántulas de maíz.

Para la inoculación de las plántulas de maíz las cepas de interés se sembraron en medio completo (1.5 g de NH_4NO_3 ; 2.5 g peptona de caseína; 10 g de extracto de levadura; 10 g de sacarosa; 63 ml de solución de sales;) y crecieron a 30 °C/200 rpm hasta alcanzar una $\text{D.O.}_{600}=1.0-1.2$. Las células se cosecharon por centrifugación a 2500 rpm/10 min, se eliminó el medio y se lavó con 10 ml de agua estéril. Las células se resuspendieron en 10 ml de agua estéril. Se leyó D.O._{600} , y se ajustó la suspensión a $\text{D.O.}_{600}=10$. Se mezclaron las células en relación 1:1 para inyectar 100 μl con jeringas de insulina a cada plántula. Las plántulas de maíz tuvieron de 4 a 5 días de emergidas. La inoculación se realizó en el tallo, 2 cm arriba de la raíz aproximadamente. La infección se comenzó a ver a partir del día 8-15. Del día 15 a 20 se cosecharon las agallas, se lavaron con tween20 al 0.1% y se congeló en nitrógeno líquido para pulverizar y extraer ADN y ARN como se describió anteriormente.

Prueba de *Bal 31*

Para tener la misma cantidad de ADN en todos los pozos de los geles se ajustó la concentración del ADN a 5 μg y se le agrego 3 μl de enzima *Bal31* (1 U/ μl). Se incubó durante 0, 10, 20 30 y 40 min/30 °C. Posteriormente se precipitó con etanol absoluto y acetato de amonio 7.5 M y se resuspendió en agua destilada estéril PiSA® para digerir con la endonucleasa *PstI* (Thermo Scientific) e incubó 2 h a 37 °C. Las bandas del ADN digerido se resolvieron en geles de agarosa al 1% disuelto en TBE 0.5 X y se corrió en cámara electroforética con el mismo búfer aplicando un voltaje de 5 V/cm. La transferencia se realizó como se indicó arriba.

Se usaron dos marcas de la enzima *BAL31* BioLabs (New England) y *BAL31* Takara (Bio, Shiga, Japón). Las concentraciones de ADN que se ensayaron fueron 0.5, 1, 2, 3 y 4 μg ; los tiempos que se manejaron fueron 0, 10, 20, 30 40, 60, 120 y 180 min y las concentraciones de enzima fueron 1, 2 y 3 U. *Bal31* TAKARA fue la enzima que mejor resultados nos dio.

Análisis de secuencias

La determinación de la estructura del gen *trt1* fue llevada a cabo por Bautista España D., utilizando las secuencias enviadas por el Dr. Peter Schreier colaborador del proyecto de secuenciación del genoma de *Ustilago maydis* (Convenio BUAP- Bayer Crop Sciences). Los ensayos de secuenciación adicionales se llevaron a cabo en el laboratorio de secuenciación del CINVESTAV-IPN, LANGEBIO, Campus Guanajuato.

XIII RESULTADOS

- **Objetivo 1.** Obtención de mutantes telomerasa negativa de la cepa 521 de *U. maydis* mediante interrupción del gen *trt1* localizado en locus UMAG_11198 del mismo hongo.

Para confirmar que *trt1* codifica la subunidad Trt1p de la telomerasa de *U. maydis*, se interrumpió este gen en la cepa haploide 521. Para la interrupción se usó un casete de interrupción convencional de 4,230 pb compuesto por una secuencia flanqueante de 847 pb (-11 a 836) río arriba y la otra de 1,334 pb (2,777 a 4,111) río abajo adyacente a los dominios TRBD y RT del gen, que fueron reemplazados por un marcador de selección quimérico ensamblado con el gen de higromicina fosfotransferasa (*hph*) bacteriana expresado bajo el control del promotor *hsp70* de *U. maydis* y una señal de terminación (figura 8A). El casete se separó del plásmido pCM1007 por digestión con *EcoRV* y fue utilizado para la transformación de *U. maydis* por el método descrito en material y métodos. Seis días después de la transformación crecieron 20 transformantes que fueron recuperadas en medio extracto de papa agar adicionado con 100 µg/ml de higromicina, e incubaron durante 48 h.

De las transformantes estables (dato no mostrado) se eligieron dos, aquí nombradas *trt1-1* y *trt1-2*. A *trt1-1* se le extrajo ADN total para analizar el patrón de amplificación mediante ensayos de PCR múltiple, utilizando iniciadores diseñados para detectar la ausencia de la región codificante de *trt1* y efectuar su reemplazo con el marcador de selección *hph*. La interrupción se detectó mediante la amplificación por PCR múltiple utilizando el iniciador directo EST2 FDD1 y los iniciadores reversos EST2 RDD1 e HyRDD1 (Tabla2), que amplifican fragmentos de 904 bp de *trt1* (posición 595 a 1,498) y de 1,286 pb (que abarca parte del gen *trt1* y parte del gen *hph*) respectivamente. Los iniciadores fueron provistos por W.K. Holloman); adicionalmente se usaron los iniciadores EST2FDD2 e HyRDD1 amplificando un fragmento de ADN de 1,942 pb (figura 8B), obteniendo dos mutantes de la cepa 521 de *U. maydis* (*trt1-1* y *trt1-2*). Figura 8C.

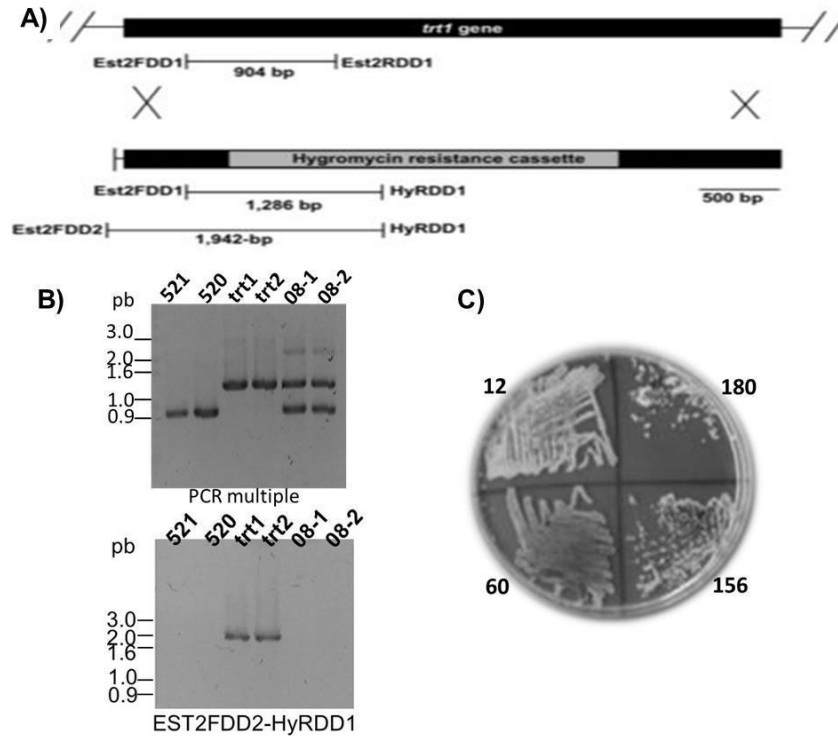


Figura 8: Producto de la reacción de PCR para verificar la obtención de mutantes *trt1* de la cepa silvestre 521. A) Esquema del casete de interrupción utilizado. B) Arriba, electroforesis del producto de amplificación por PCR usando los iniciadores EST2FORDD1, EST2REVDD1 Y HYGREVDD1, abajo, reacción de PCR usando los iniciadores: EST2FDD2 y HyRDD1. C) Disminución del potencial replicativa de la clona *trt1-1*

Para analizar la longitud del telómero, la mutante *trt1-1* se creció en cultivos continuos de 24 h (18 generaciones) hasta llegar a la generación 288 (Figura 8A y B, último carril). Se extrajo DNA cada 36 generaciones, se cuantificó y se examinó el fragmento de restricción terminal (TRF) por transferencia tipo *Southern blot* de digeridos genómicos de las muestras con *Pst1*, y usando como sonda un fragmento de 250 pb que contiene repetidos teloméricos de *U. maydis*, extraído del plásmido pCTR1 (vector que contienen la región proximal y distal del extremos cromosomal del hongo; Sánchez Alonso et al. 1994) para analizar los perfiles de la longitud del telómero y región subtelomérica. Al comparar el TRF de las diferentes generaciones de la mutante con el de la cepa silvestre, se observó un acortamiento progresivo de los telómeros después de 72 generaciones, y las señales de hibridación se desvanecieron a partir de la generación 252. Las mutantes sobrevivientes se comenzaron a obtener después de la generación 252, mostrando inicialmente ligeros reordenamientos en el patrón de hibridación como cambios en el tamaño de las bandas, su intensidad y aparición de barridos a lo largo de los dos últimos carriles (generaciones 252 y

288) (figura 9A). Los resultados nos indican que la telomerasa mantiene los telómeros de *U. maydis*, (figura 9A.)

Se buscó también el patrón de TRF de las secuencias adyacentes al sitio de corte con *PstI* de la región subtelomérica, para ello se detectó un fragmento *EcoRI* previamente detectado usando la sonda UT-4 del gen *UTASa* de región subtelomérica (Sánchez Alonso, 1994). En esta hibridación se observaron cambios menores en el patrón de hibridación. Estos cambios correlacionaron principalmente con un acortamiento de la secuencia similar a *UTASa* (figura 9B), sin embargo, en posteriores generaciones en el patrón TRF de sobrevivientes aparecieron dos bandas en la zona de resolución de alto peso molecular al igual que las bandas de hibridación derivadas de secuencias subteloméricas en las mutantes sobrevivientes (figura 9B).

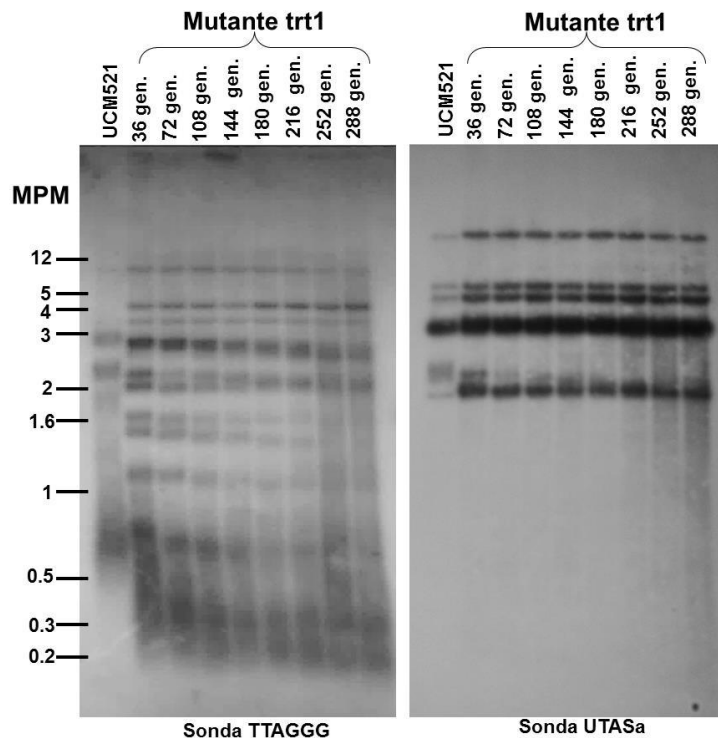


Figura 9. Southern blot de la mutante telomerasa negativa de *U. maydis*. A. Se usó como sonda un fragmento de 250 pb que contiene la secuencia con 37 repetidos teloméricos, obtenido del plásmido pCTR1. B. Se usó como sonda un fragmento de 800 pb (*BamHI-EcoRI*) del plásmido pORFHI que contiene la secuencia de *UTASa*.

Para probar que el barrido detectado es parte del extremo cromosomal, y no de regiones internas, se realizó una cinética de digestión con la exonucleasa *BAL31*. Utilizando 1 µg de ADN total de excelente calidad y 2 U/µg de *Bal31*, se dejó digerir 30, 60 y 90 minutos el ADN de la cepa silvestre 521, mientras que el ADN de la cepa *trt1-1* 10, 20 y 30

min utilizando 2 U/ μ g de ADN de *Bal31*, por tener muy amplificado el extremo cromosomal.

El acortamiento de telómero en la cepa 521 produce un cambio de los barridos teloméricos hacia una zona de bajo peso molecular y luego desaparece la señal. La membrana fue regenerada e hibridada con una sonda ADN_r (ADN ribosomal) para mostrar que los genes localizados en zonas internas no sufren un desplazamiento por disminución de peso molecular; aproximadamente la misma cantidad de ADN se colocó en todos los carriles. En la cepa *trt1-1* se observa una banda de 0.6 kb posiblemente la más expuesta a la digestión con la exonucleasa aproximadamente va disminuyendo (indicado por una flecha negra en la figura 10).

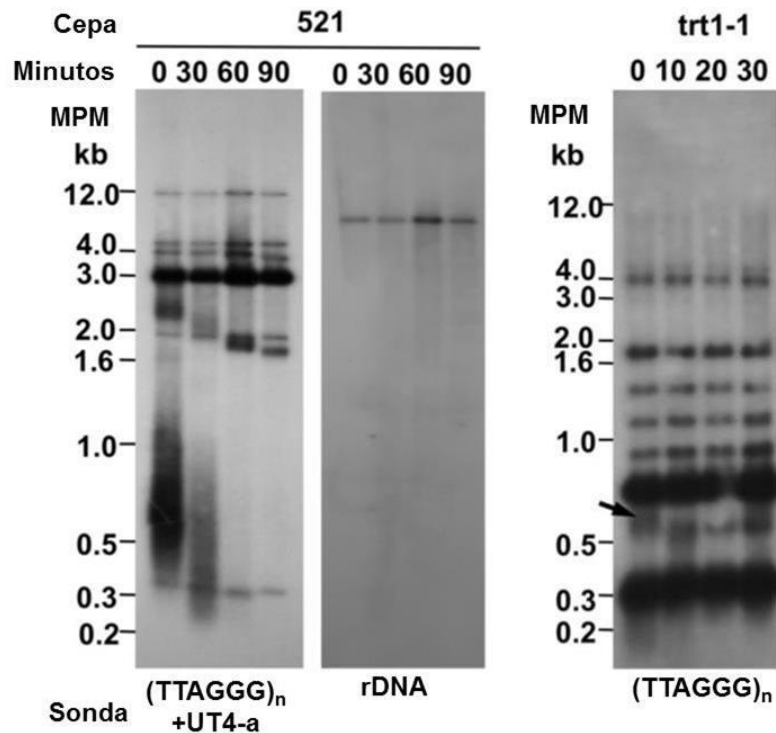


Figura 10: Análisis de la actividad de la exonucleasa *Bal31* por TRF en la cepa silvestre 521 y mutante telomerasa-negativa de *U. maydis* *trt1-1*. Se digirió ADN total de la cepa silvestre 521 y mutante *trt1-1*, se usó 2 U/ μ g de exonucleasa, el tiempo de reacción para cada muestra se indica en la imagen, así como la sonda que se usó.

La actividad de la telomerasa en extractos proteicos de esporidios de la cepa silvestre y la mutante *trt1-1* con el método de TRAP-ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas por protocolo de amplificación de repetición telomérica) fue llevado a cabo por Bautista España et al. 2014 y no se muestran los resultados en este documento, pero se encuentran en el artículo. Se prepararon los extractos proteicos a partir de esporidias de *U.*

maydis 521 y *trt1-1* y *trt1-2* que contenían la telomerasa con una actividad específica (actividad por masa equivalente de proteína). La actividad de la cepa silvestre muestra una actividad de 0.718 U mientras que en las cepas mutantes no hay actividad detectable. Con este resultado acompañado a los hallazgos anteriores, (Bautista España, et al. 2014) concluimos que *U. maydis* necesita de la enzima telomerasa *trt1* para sintetizar sus telómeros. Otros ensayos que no forman parte de los objetivos como la obtención y estudio de la progenie se llevaron a cabo por ambas autoras principales, pero no se encuentran dentro de los objetivos declarados. La cantidad total de plantas analizadas fue del orden de 10^3 y recuperación de cepas mutantes sobrevivientes de Tipo I y Tipo II like es de decenas. Ver artículo adjunto.

- **Objetivo 2.** Determinar la abundancia relativa de los transcritos tanto de *trt1*, como de *tck2*, y *dkc*, en cultivos sincrónicos y no sincrónicos del hongo

Sincronización de células. Las células se sincronizaron como se describe en material y métodos. El crecimiento de éstas se inició en medio completo de Holliday (1965), después de 1 h se tomaron alícuotas de 20 ml cada 20 min a partir del tiempo cero, a esta suspensión de células se les leyó DO_{600} y se observaron al microscopio para verificar la morfología celular (se aceptó de un 80 a un 90 % de células en fase G2 para iniciar los ensayos). En la figura 11A se muestran los resultados obtenidos al liberar del ayuno las células una vez sincronizadas.

Debido a que la morfología de las células está relacionada con los estados de progresión del ciclo celular del hongo, nos basamos en ésta para registrar el avance del crecimiento de los cultivos sincronizados (figura 11B) (Pérez-Martin et al., 2006). Las células en fase estacionaria de *U. maydis* están en fase G2, tienen forma de un cigarro, miden alrededor de 18 μm de largo y 5 μm de ancho, son diploides y tienen crecimiento vegetativo, produciendo normalmente un brote polar por ciclo celular, generalmente en el ápice de la célula en un ángulo aproximado de 30° a 45°. En la figura 11B se observan los brotes de las yemas conforme transcurre el tiempo hasta la replicación celular; el aumento progresivo de la densidad óptica nos indicó el progreso del ciclo celular y el aumento en la cantidad de células.

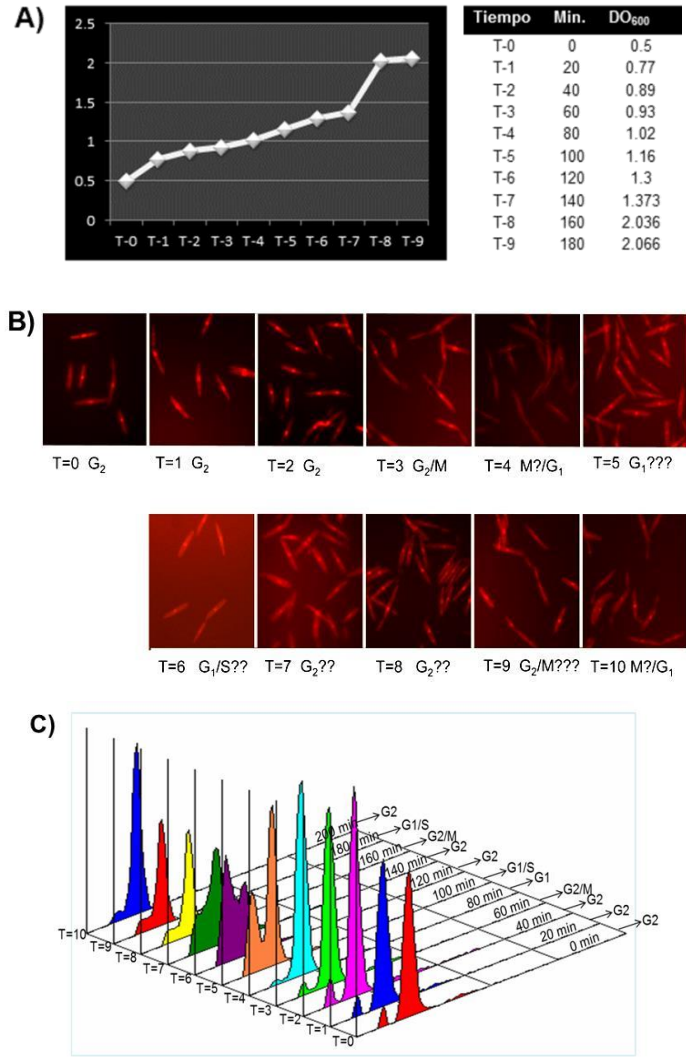


Figura 11: Curva de crecimiento de células sincronizadas y liberadas en medio completo suplementado con complejo B después de ser sincronizadas por el método de ayuno. A) se muestra la gráfica de las lecturas obtenidas al leer DO₆₀₀ de cada muestra tomada cada 20 min. B) Microscopia de las células sincronizadas. C) Gráfica de la citometría de flujo, en donde se muestran las fases del ciclo celular: fase G2 (G2), fase M (M), fase G1 (G1), fase S (S).

El tamaño y morfología de las células también fue registrado conforme a los hallazgos de Pérez-Martín (2006). Debido a que la separación de las células hijas no siempre ocurre antes de la siguiente gemación y no es posible discernir exactamente la transición G1/S y G2/M, como sucede en eucariotes superiores (Pérez-Martin et al. 2006). Las células de *U. maydis* fueron fijadas en solución de etanol/ácido acético, resuspendidas en TBS, y tratadas como describe Onel et al. 1996. Se realizó el ensayo de citometría de flujo por Beatriz Pérez-Romano en los Laboratorios Ruíz de Puebla. La figura 11C corrobora que efectivamente las células se encontraban sincronizadas desde la fase G2 y la

conclusión de dos ciclos celulares. Una vez corroborada la sincronización celular de *U. maydis* se continuó con la determinación de los transcritos de *trt1*, *tck2*, *dkc1* en esporidias sincronizadas.

Cuantificación de transcritos. El método de extracción de ARN se describió en material y métodos. Los coeficientes 260/280 de cada ARN estuvieron entre 1.95-2.1, confirmando la pureza de las muestras y el corrimiento de gel electroforético nos permitió corroborar la integridad de las muestras (figura 12A). También se corroboró que las muestras no tuviesen contaminantes de ADN al realizar un PCR sin retrotranscripción a las muestras de ARN tratadas con ADNasa, (figura 12B).

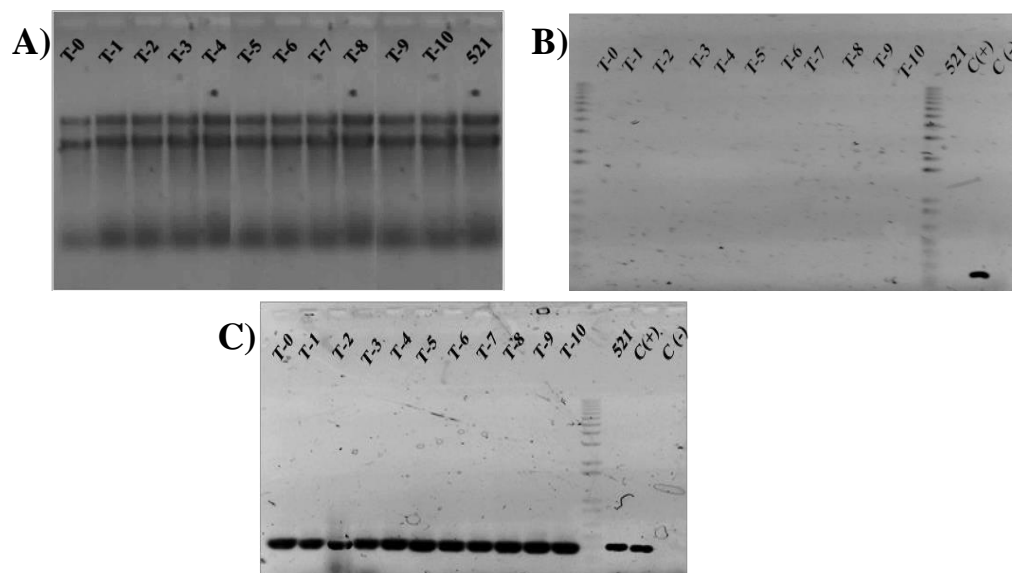


Figura 12: ARN de células sincronizadas. A) Gel de agarosa al 1% con las muestras de ARN extraído de células sincronizadas y tratadas con ADNasa, teñido con bromuro de etidio. B) Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio mostrando que el reamplificado de PCR hecho al ARN tratado con ADNasa no tiene productos de amplificación, comprobando que el ARN ya no tiene ADN. C) RT PCR de las muestras de ARN realizada con los primer TUB11-TUB12 de *TUB1* para verificar la integridad del ARN.

La integridad del ARN se probó mediante RT PCR específica para el gen de tubulina (*TUB1*) usando como primer reverso Tub12 (tabla 2) para la reacción. Para la amplificación de la primera cadena se usó el par de iniciadores Tub11 y Tub12 (tabla 2). En la figura 11C se puede apreciar un amplificado de aproximadamente 600 pb, lo que nos indica que el ARN está íntegro y lo podemos usar para realizar los ensayos de RT-qPCR. Las muestras son alícuotas de células obtenidas cada 20 minutos desde el minuto cero hasta 200 minutos, incubando las células sincronizadas en medio completo.

La optimización de condiciones de la reacción en cadena, temperaturas de alineamiento, tiempos de polimerización, concentración de magnesio se realizaron tomando en consideración el mejor diseño de iniciadores y la óptima la transcripción inversa mediante la selección del material biológico que se describe en materiales y métodos.

Las secuencias de los genes de interés se descargaron del sitio MIPS *Ustilago maydis* Database (MUMDB). Para el diseño de los oligonucleótidos iniciadores, se usó el programa PrimerSelect (LaserGene), se analizaron con BLAST (GeneBank NCBI) para verificar que solo amplificaran secuencias únicas. También se tomaron en cuenta las recomendaciones MIQE para la guía de información mínima requerida para la publicación de experimentos cuantitativos de PCR en tiempo real (Bustin et al. 2009) que incluye el producto de amplificación menor a 300pb, con un tamaño ideal entre 100 a 250 pb. Los iniciadores no se localizan dentro de un intrón, ni flanquean un intrón largo, no complementan entre ellos, ni con ellos mismos; no forman estructuras secundarias ni albergan secuencias repetitivas. La longitud de los iniciadores está entre 18 y 24 nt, su contenido de GC está entre 36 a 70 % y tienen temperaturas de alineamiento similares. Se diseñaron dos pares de primers para cada gen, se determinó la temperatura óptima de alineamiento por PCR a punto final, utilizando gradientes de temperatura de cada par de primer (tabla 3). Para este trabajo se ensayaron concentraciones de 0.5, 1, 10 y 100 mM para encontrar la concentración Cq de cada iniciador, la cual permite la producción más eficiente del producto, y fue para todos ellos de 10 mM. Otros componentes de la reacción que también pueden afectar su eficiencia son la concentración de MgCl₂, la pureza y concentración de templete. Para este trabajo se usó Máxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2 X), este búfer ya viene preparado a una concentración de 2 mM de MgCl₂; que después de verificar mediante el uso de otras cantidades de magnesio, se tomó como óptima. La pureza y concentración del templete de ADN y ARN se verificaron por espectrofotometría, y todas las muestras tuvieron un coeficiente 260/280=1.8-2.0 y 260/230=2.0-2.2. La verificación por tinción con EtBr en geles de agarosa se muestra en la figura 11A.

Tabla 3: Características requeridas de los primers para qPCR y temperatura de alineamiento adecuada para cada par de primer

Gen	Locus	Oligo	Longitud del primer	% de GC	TM	Tamaño del amplificado	Temp. alinea.
Telomerasa	UMAG_11198	TELRTImeD	22	54.5	59.5	116 pb	64°C
		TELRTImeR	22	59	59.6		
		CGFMD05	24	50	85	262 pb	68°C
		CGFMD06	16	58	73		
Cinasa	UMAG_11199	CIN INT TR UPP	22	54.55	63.38	161 pb	63°C
		CIN INT TR LOW	18	66.96	65.96		
		CIN3' TRUpp	21	61.9	70	157 pb	66°C
		CIN3' TR Low	19	52.64	60.63		
Disquerina	UMAG_00685	DKCUmD	20	55	57.9	127 pb	64°C
		DKCUmR	23	65.2	64.5		
		UmDKCUp	21	52.3	56.6	118 pb	60°C
		AltUMDKCLw2	24	54.1	59.9		
Tubulina	UMAG_01221	TubA01For	23	60.9	64	171 pb	64°C
		TubA02Rev	24	58.3	62.2		
		TubA03For	23	56.5	62.6	262 pb	60°C
		TubA04Rev	20	55	58.2		
Actina	UMAG_11232	ACTendUp	20	70	63.43	158 pb	64°C
		ACTendlw	20	61.9	58		
		ACTMdup	20	70	63.4	243 pb	64°C
		ACTMdlw	21	55	63.1		
Histona H4	UMAG_02710	UmHH4F	22	70	63.4	194 pb	64°C
		HH4Rev	18	61.9	62		
		HH4dir	20	65.6	64.7	102 pb	64°C
		HH4RtimeR	21	72	60.3		

El rango dinámico lineal de la reacción de qPCR se calculó para cada uno de los genes en estudio mediante una curva de calibración, estimando previamente, el número de copias de genoma de la cepa 521 contenidas en los estándares utilizados de ADN; el ADN total utilizado fue de alta calidad, y para calcular el número de moléculas se aplicó la fórmula:

$$\begin{aligned}
 \text{Peso molecular} &= (\text{Tamaño de genoma})(650 \text{ Dalton}) \\
 &= (2.05 \times 10^7) (650) \\
 &= \mathbf{1.33 \times 10^{10} \text{ UMA}}
 \end{aligned}$$

Una vez calculado el peso molecular, se hizo el cálculo para establecer cuando se tiene una molécula de DNA

$$\begin{aligned}
 \text{MOL} &= (\text{UMA})(1/\text{No. de Avogadro}) \\
 &= (1.33 \times 10^{10} \text{ g/mol}) (1.66 \times 10^{-24} \text{ mol}) \\
 &= \mathbf{2.21 \times 10^{-14} \text{ g.}}
 \end{aligned}$$

Una vez calculada la concentración que necesitamos para tener 1 copia de genoma total, se procedió a hacer las diluciones correspondientes. (Tabla 4)

Tabla 4: Diluciones realizadas para obtener el número de copias deseadas.

Moléculas	521 (g)
1 M	2.3×10^{-14}
10^1 M	2.3×10^{-13}
10^2 M	2.3×10^{-12}
10^3 M	2.3×10^{-11}
10^4 M	2.3×10^{-10}
10^5 M	2.3×10^{-09}
10^6 M	2.3×10^{-08}
10^7 M	2.3×10^{-07}
10^8 M	2.3×10^{-06}

Una vez establecidas las condiciones de amplificación, se procedió a realizar las reacciones de RT qPCR como se indica en material y métodos. Se estableció el valor Cq (punto de cruce en el que la fluorescencia es detectada) y determinó el nivel de la señal de fluorescencia que está por encima de la fluorescencia de fondo que dan los reactivos, los consumibles o el mismo equipo y poder considerar una señal confiable. En nuestro caso el ruido de fondo es detectado por el equipo iQ5 Bio-Rad y reportado en los gráficos Cq (figura 13).

Tabla 5: Valores de R^2 , eficiencia de amplificación y pendiente de los iniciadores diseñados para RT-qPCR

Gen	Primer	Eficiencia	Pendiente	R^2
Telomerasa	TELRTIME D	103.8	-3.239	0.998
	TELRTIME R			
	CGFMD05	80	-3.9	0.98
	CGFMD06			
Cinasa	CIN INT TR UPP	103.7	-3.236	0.986
	CIN INT TR LOW			
	CIN3' TR Upp	70	-2.6	0.95
	CIN3' TR Low			
Disquerina	DKCUM D	101.9	-3.277	0.997
	DKCUM R			
	UMDKC Upp	80	-3.9	0.9
	AltUMDKCLw2			
Tubulina	TubA01For	101.1	-3.205	0.997
	TubA02Rev			
	TubA03For	0.97	-3.7	0.97
	TubA04Rev			
Actina	ACTendUp	105.1	-3.205	0.998
	ACTendlw			
	ACTMdup	90	-3.8	0.96
	ACTMdlw			
Histona H4	UmHH4F	95	-3.63	0.982
	HH4Rev			
	HH4dir	80	-3.8	0.96
	HH4RtimeR			

La eficiencia de amplificación se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

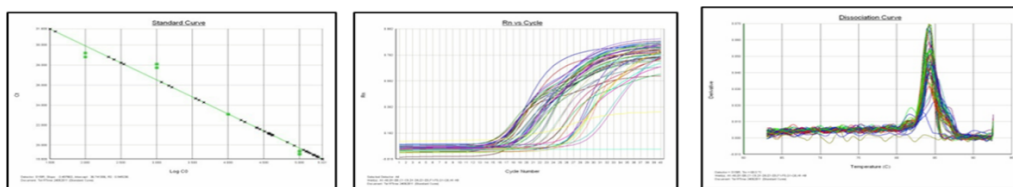
$$\text{Ecuación de Pfaffl: } E = 10^{-1/\text{slope}}$$

Donde E es la eficiencia de la reacción y el slope es la pendiente obtenida de los datos de la gráfica Cq (eje de la X) y la cantidad del template colocado en cada punto (eje Y). Valores obtenidos entre -3.6 y -3.1 corresponde a una eficiencia entre 90 y 110% (Pfaffl, 2001). Los valores obtenidos de eficiencia de amplificación, pendiente y R^2 se reportan en la Tabla 5, estos resultados se obtuvieron de cada experimento y los arrojo el programa del equipo.

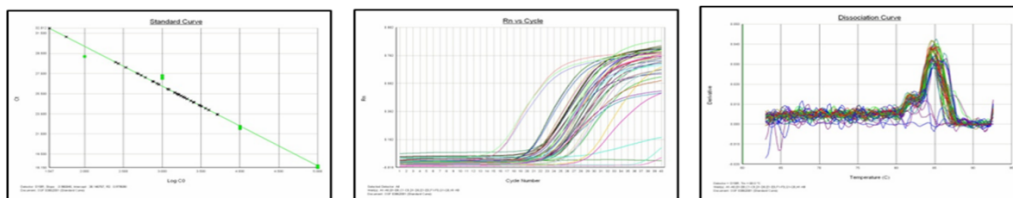
En los siguientes gráficos (figura 13) se muestran los resultados obtenidos de cada par de iniciadores determinado en el programa iQ5 Optical System Software de Bio-Rad. En estas gráficas observamos de lado derecho la curva de calibración, en medio la curva Cq y de lado izquierdo la curva de desnaturalización. De la curva de calibración se obtuvieron los datos de eficiencia de amplificación, la R^2 y el valor de la pendiente, de la curva Cq se sacan los valores de cuantificación y de la curva de desnaturalización se corrobora que hay solo producto de amplificación de los iniciadores seleccionados para analizar los genes de interés, como se observó en los amplificados de PCR a punto final en geles de agarosa. Las curvas de disociación en algunos pares de iniciadores se observa un solo pico y otros se observan más de dos, esto también nos permitió seleccionar con cuales iniciadores trabajaríamos (figura 13), ya que se eligieron los que mostraron un solo pico.

1. Subunidad *trt1*

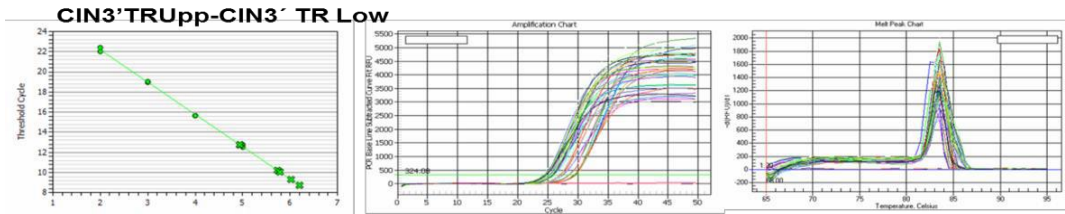
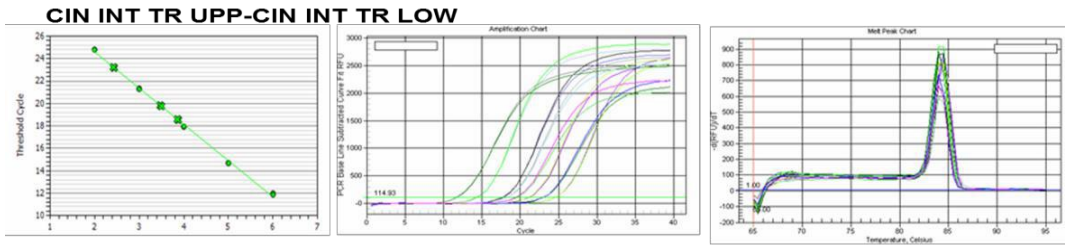
TELRTIME D-TELRTIME R



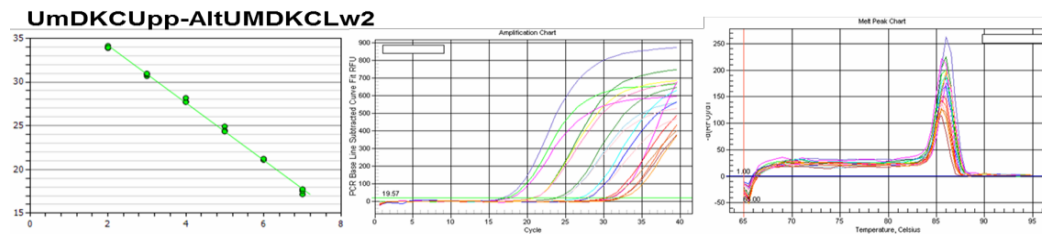
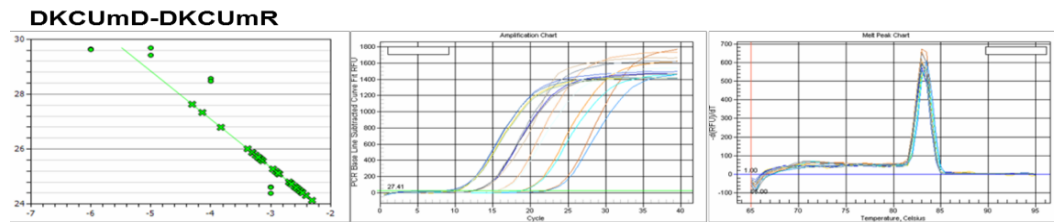
CGFMD05-CGFMD06



2. *tck2*

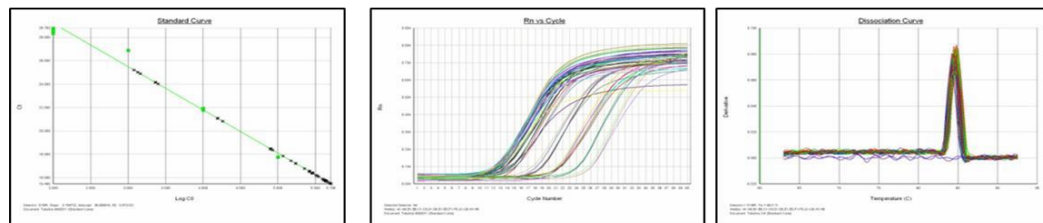


3. *dkc1*

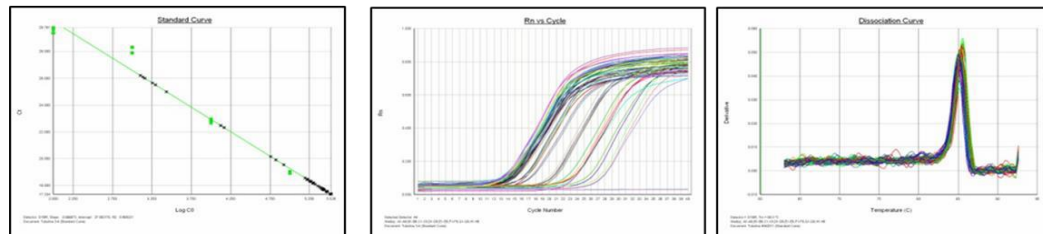


4. *tub a*

TubA01For- TubA02Rev

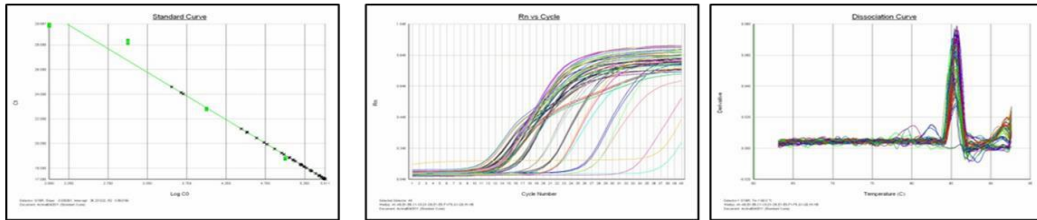


TubA03For- TubA04Rev

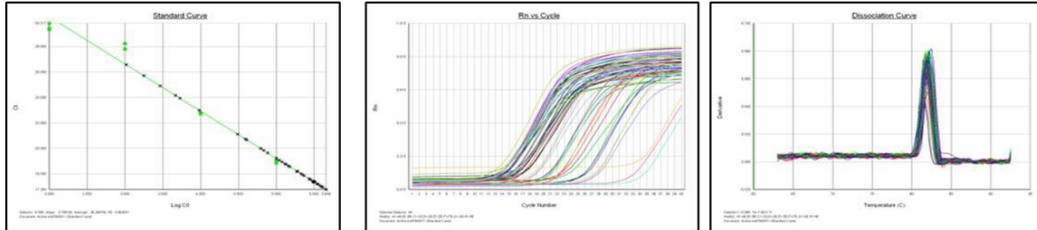


5. *β-act*

ACTendUp-ACTendLw

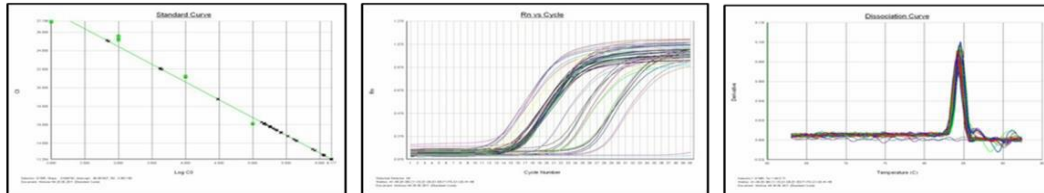


ACTMddUp-ACTMdLw



6. *HH4*

UmHH4F-HH4Rev



HH4dir-HH4RtimeR

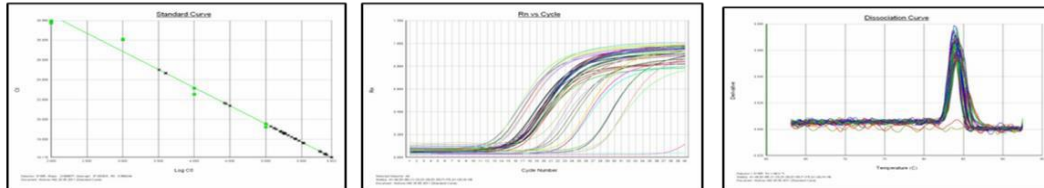


Figura 13: Gráficos obtenidos de los ensayos RT qPCR para los diferentes genes a analizar. De lado izquierdo se muestra la curva de calibración; en medio se muestra la curva C_q y de lado derecho se muestra la curva de desnaturalización.

En la figura 14 se enlistan los pares de iniciadores elegidos para hacer los ensayos de RT-qPCR. Para elegirlos se tomó en cuenta que presentaran producto único al amplificar tanto ADN como en la transcripción inversa del ARN, que los valores de la pendiente estuvieran entre -3.1 a -3.6, que el valor de la eficiencia de amplificación fueran lo más cercano a 100% y que el valor de la R² no fuera menor a 0.98. Para el gen *trt1* se eligió el par de primer TELRTimeD-TELRTIMEr; para el gen *tck2* el par de primer CININTTRUPP- CININTTRLOW; para el gen *dkc* DKCUMD-DKCUMR; para el gen *α-tub* TubA01For-TubA02Rev; para el gen *β-act* ACTendUp-ACTendLw y para el gen *HH4*

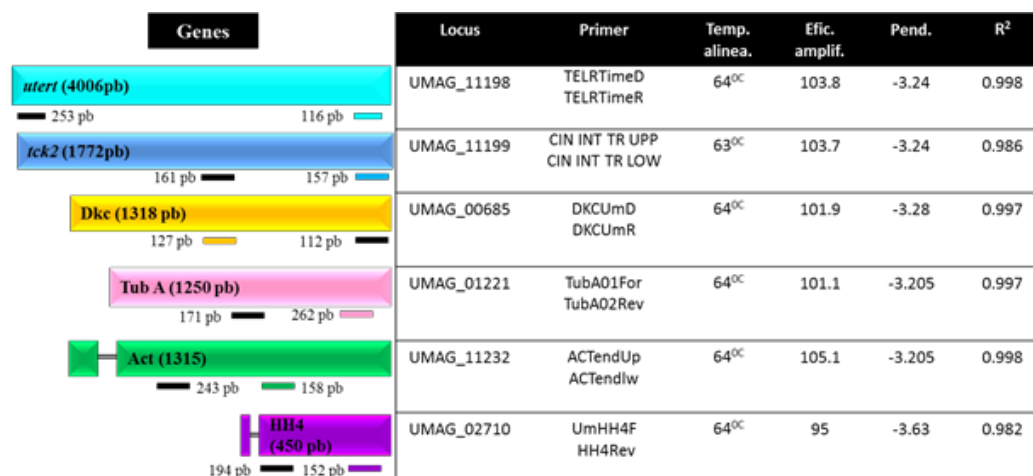


Figura 14: Oligonucleótidos iniciadores seleccionados para las reacciones de RT-qPCR de cada gen. También se indica su eficiencia de amplificación, el valor de la pendiente y el valor de R².

La elección de *ACT1* y *TUB1* como genes de referencia (genes normalizadores) se hizo siguiendo las recomendaciones MIQE, tomando en cuenta los datos recopilados en forma de Cq (ciclo de cuantificación, de acuerdo a MIQE) tanto para la muestra problema como para el de referencia, que permitieran controlar las variaciones en el rendimiento de extracción de ARN, de la transcripción inversa y la eficiencia de amplificación, así como comparar las concentraciones de transcritos

TubA01For-TubA02Rev amplifican un fragmento de 171 pb y se localizan en el extremo 3' del gen *TUB1*; mientras que TubA03For-TubA04Rev amplifica un fragmento de 262pb localizado en la región media del gen *TUB1*. Para los amplificadores del gen que codifica para *ACT1* se usaron los iniciadores ACTMdup-ACTMdlw que amplifican un fragmento de 243 pb y ACTendlw-ACTendUp con un amplificado de 158 pb. En la figura 15 se muestran los gráficos de los valores Cq (gráficos de lado izquierdo) de dos pares de iniciadores diseñados para cada gen; aunque para ambos genes se muestra un comportamiento similar con una variación no mayor a 0.5 Cq de diferencia, solo un par de iniciadores mostró valores más consistentes; para el caso de *TUB1* se eligieron a los iniciadores TubA01For y TubA02Rev y para el caso de *ACT1* ACTendUp y ACTendlw, debido a que estos iniciadores mostraron una regresión lineal con mayor tendencia a cero (figura 15, lado izquierdo). Los iniciadores para normalizar los genes de interés se utilizaron en la cuantificación relativa.

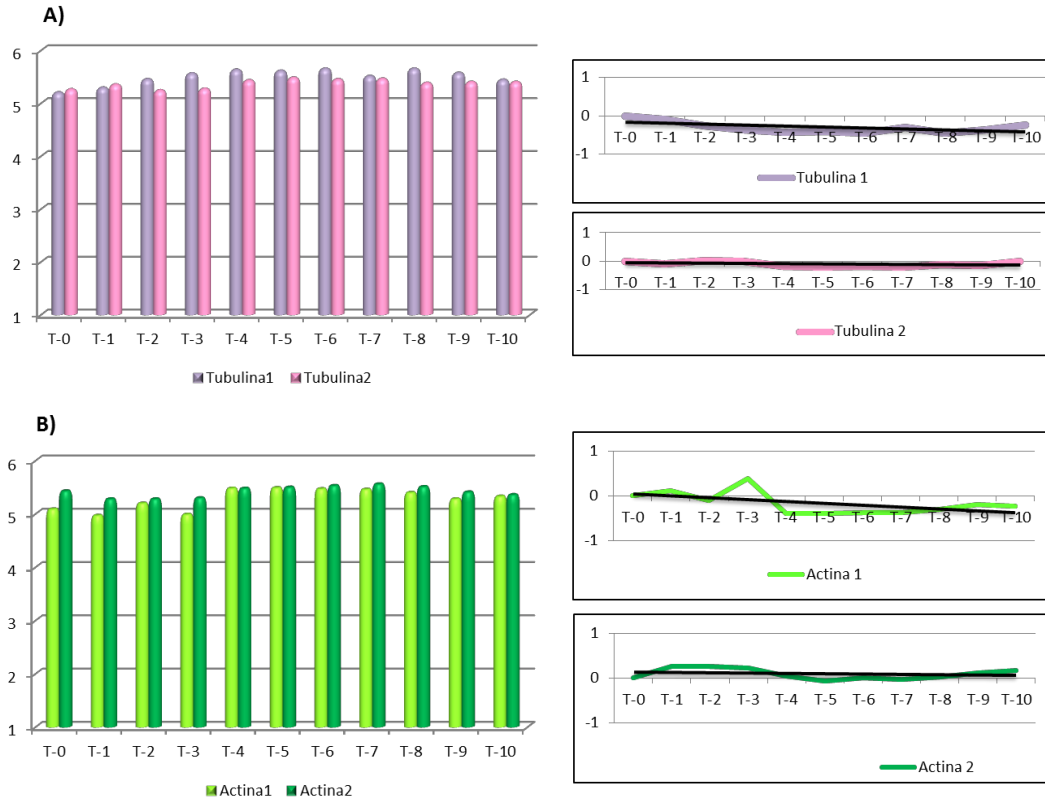


Figura 15: Determinación de genes de referencia. A) Gráfico de datos Cq de dos pares de iniciadores para el gen *TUB1*. Tubulina 1 representa a los primer Tuba03For y Tub04Rev; Tubulina 2 representa los resultados obtenidos con los primer Tuba01For y Tuba02Rev. B) Gráfico de datos Cq de dos pares de primers para el gen *ACT1*. Actina 1 representa los resultados obtenidos con los primers ACTMdUp y ACTMdlw; Actina 2 representa los resultados obtenidos con ACTendUp y ACTendlw.

Para la validación de los genes de referencia se probó si el método ddCq para la cuantificación relativa es el apropiado para usar, ya que las pendientes de las curvas deben ser idénticas entre sí. Para los cálculos matemáticos se tomó en cuenta el valor Cq obtenido del rango dinámico de cada dilución en el experimento, y se graficaron los datos obteniendo dos curvas paralelas rectas (Figura 15). Los valores Cq del mismo número de copias del gen problema se restaron con los valores Cq de los dos genes de referencia, el resultado de esta sustracción se graficó obteniendo una pendiente con tendencia a cero, a excepción del gráfico Actina-HH4, cuyo valor inicial está 0.5 más alto que el resto de los datos (Figura 16), Estableciendo las diluciones 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 moléculas como curva de calibración para cada ensayo y corroborando que el método ddCq es apropiado para nuestros ensayos.

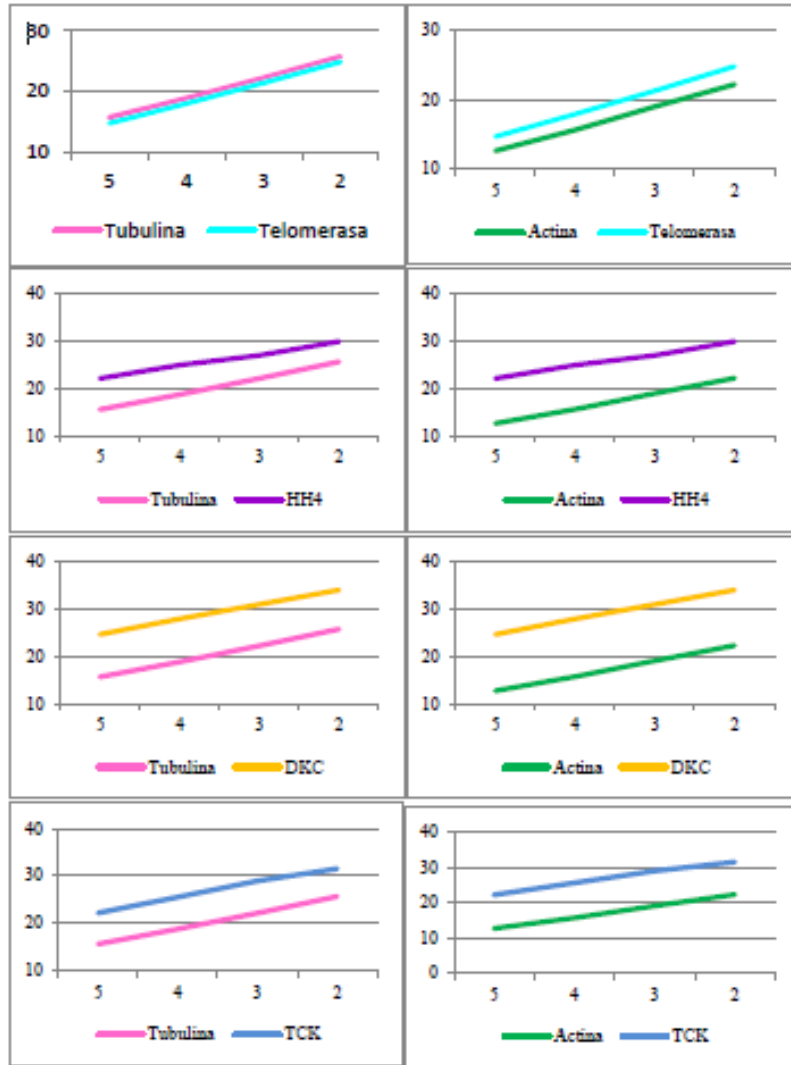


Figura 16: Gráficas obtenidas de los valores Cq del rango dinámico (curva de calibración) para cada gen a analizar. De lado izquierdo se tiene las gráficas del gen de referencia *TUB1* con los genes problema *trt1*, *dkc*, *tck2* e *HH4*. De lado derecho se tienen las gráficas del gen de referencia *ACT1* con los mismos genes antes mencionados. En ambos genes se observan un comportamiento similar y constante, mostrando dos pendientes muy similares. En el eje de las X se tiene 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 moléculas, en el eje de las Y se tienen los valores Cq de estas muestras.

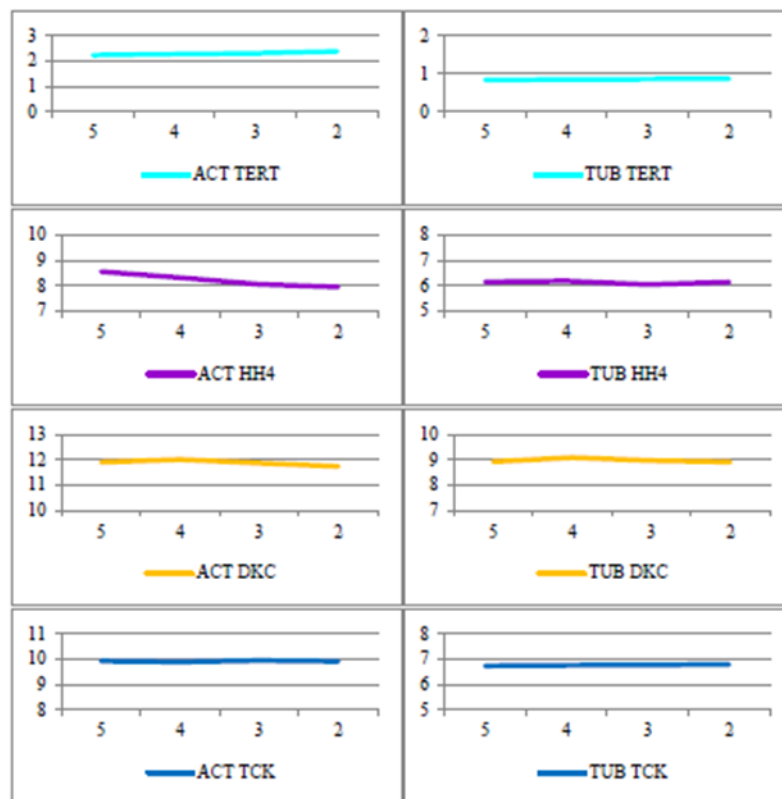


Figura 17: Gráficas mostrando la resta de los valores Cq del mismo número de copias del gen problema con los valores Cq de los dos genes de referencia, obteniendo una pendiente con tendencia a cero en la mayoría de las gráficas. Con esto se corrobora que podíamos usar el método ddCT en nuestros ensayos. En el eje de las X se tiene 10⁵, 10⁴, 10³ y 10² moléculas, en el eje de las Y se tienen los valores ΔCq (Cq gen referencia – Cq gen diana) del gen de referencia con el gen diana.

Cuantificación absoluta. En la cuantificación absoluta se mide la cantidad que se tiene de una secuencia en una muestra dada expresada como número de copias o concentración. Para hacer este tipo de mediciones es necesario establecer la eficiencia de amplificación y el rango de amplificación de cada uno de los iniciadores a analizar, para que con base a la fórmula de la pendiente se calcule en número de copias. En este trabajo los resultados se calculan en el programa (figura 13 lado izquierdo), y el número de copias de los transcritos para cada gen se reportan en la siguiente gráfica.

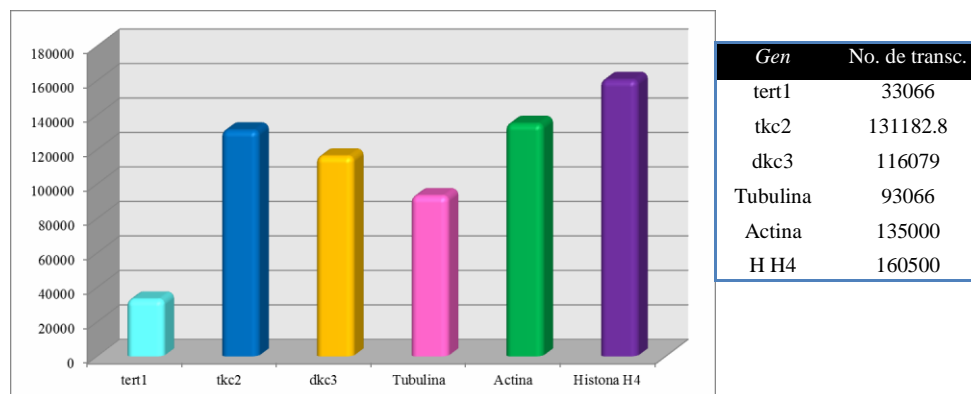


Figura 18: Cuantificación absoluta de los transcritos de la subunidad catalítica de la telomerasa *trt1*, cinasa *tkc2*, disquerina *dkc*, tubulina *TUB1*, actina *ACT1*, e histona H4 *HH4*. En el eje de las X se encuentra los transcritos analizados y en el eje de las Y el número de transcritos.

De acuerdo a los resultados obtenidos de cuantificación absoluta se observa que la expresión de los genes no es igual en todos los casos. En 1 µg de ARN total colocado en la reacción de transcripción inversa el programa iQ5 system de Bio-Rad indicó que la cepa silvestre 521 tiene 33066 copias de la subunidad catalítica de la telomerasa (*trt1*); del gen Cinasa (*tkc2*) tiene 131182 copias; del gen Disquerina (*dkc*) tiene 116079 copias; del gen Tubulina (β -*tub*) tiene 93066 copias; del gen Actina (α -*act*) tiene 135000 copias y del gen Histona H4 (*HH4*) 160500 copias, (figura 18) El análisis se discutirá en la siguiente sección.

Cuantificación Relativa. La cuantificación relativa mide los cambios en la expresión de un gen en respuesta a diferentes condiciones ya sea diferentes condiciones experimentales o muestras de tejidos. Los genes de referencia permiten corregir errores experimentales y técnicos. La ventaja de utilizar una cuantificación relativa es que no hay necesidad de generar una curva de calibración estándar. Existen diferentes modelos matemáticos disponibles para calcular la expresión relativa (Meijerink et al., 2001; Pfaffl, 2001; Liu and Saint, 2002), sin embargo, a la fecha el más utilizado es el método matemático de Pfaffl (2001), cuya fórmula matemática toma en cuenta la contribución de las eficiencias de amplificación del PCR, el valor de R^2 y el valor de la pendiente.

$$\Delta Cq \text{ de muestra} = (Cq_{\text{control diana}}) - (Cq_{\text{expresión diana}})$$

$$\Delta Cq \text{ del gen de referencia} = (Cq_{\text{control ref}}) - (Cq_{\text{expresión ref.}})$$

$$\text{Tasa de expresión relativa} = (EP_{\text{diana}})^{\Delta Cq_{\text{diana}}} / (EP_{\text{referencia}})^{\Delta Cq_{\text{referencia}}}$$

En el análisis de RT-qPCR para determinar la abundancia relativa de los transcritos,

usando el método de Pfaffl para normalizar los datos de *trt1*, *tck2* y *dkc* (figura 19), se encontró un aumento de transcritos del *trt1* durante la fase S, mientras los transcritos de *tck2* se encontraron aumentados durante las fases G2/M y de *dkc* se encontraron aumentados en la fase G1/S. Para verificar la sincronización de las esporidias sincronizadas se usó como control interno histona H4 (*HH4*), ya que se ha reportado que se expresa en la fase S (Onel et al. 1996), resultado que coincide con los resultados obtenidos en ensayos de RT PCR semicuantitativos. Tampoco se mostraron diferencias con ambos genes de referencia en ambos casos se mostraron los mismos picos de expresión para cada uno de los genes diana. Además de encontrar diferencia en la abundancia de amplificados como se observó en la cuantificación absoluta (figura 18), los resultados se discutirán adelante.

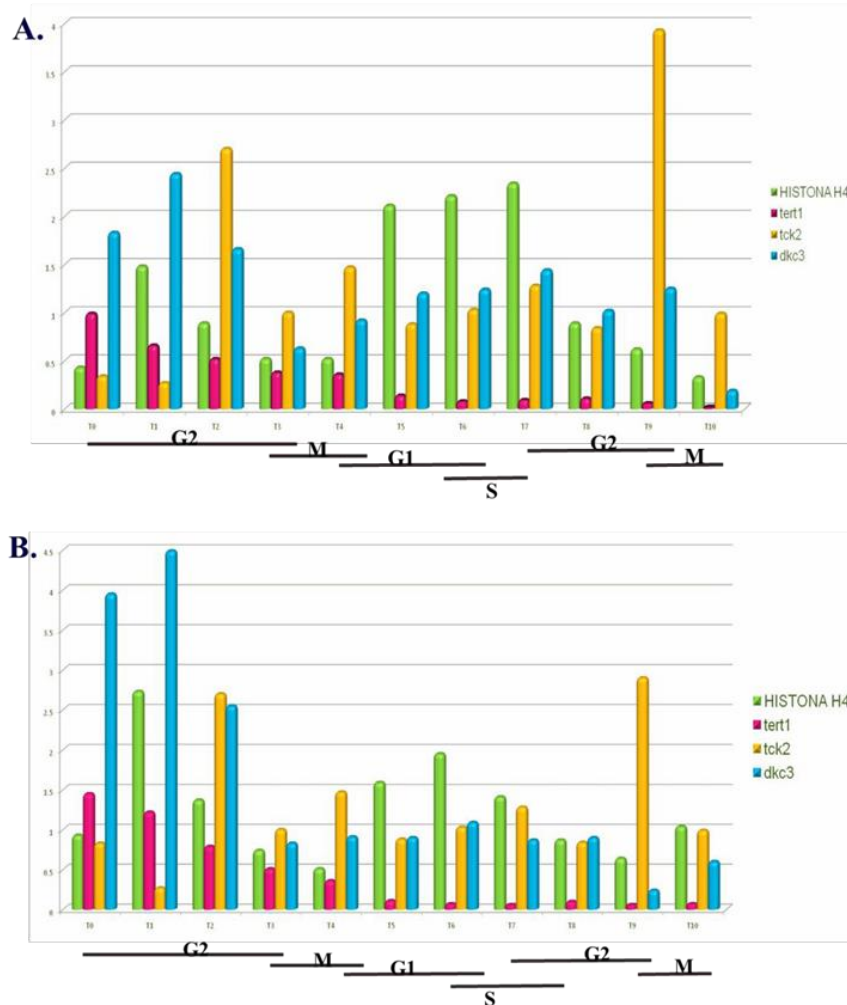


Figura 19: Cuantificación relativa de *trt1*, *tck2*, *dkc* y *HH4* en células sincronizadas de la cepa 521 de *U. maydis*. A. Cuantificación relativa con respecto al gen *TUB1*. B. Cuantificación relativa con respecto al gen *ACT1*.

- **Objetivo 3:** Determinar la abundancia relativa de *trt1* y *dkc* en agallas de carbón del maíz

La actividad de *trt1* de *U. maydis* en su fase dicariótica fue un punto importante de medir para determinar si los genes probados eran regulados durante la transición dimórfica. Para este ensayo se infectaron plantas de maíz como se describió en material y métodos. Las plantas se infectaron 5 días después que germinara la semilla con las cepas compatibles 521/518. Los tumores que crecieron se recolectaron 12 días después de la infección, cuidando que no tuvieran teliosporas, porque la melanina de estas células puede interferir en la obtención de la muestra. Para su recuperación, los tumores se cortaron con tijeras y se lavaron con tween20 al 0.2 %, se enjuagaron con agua destilada y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se extrajo el ARN y ADN y se limpió como se describe en material y métodos. Se verificó la pureza del ARN calculando el coeficiente 260/280 y 260/230, en todos los casos el coeficiente era mayor a 2; el ARN también se visualizó en gel de agarosa al 1 % para corroborar su integridad (figura 20A).

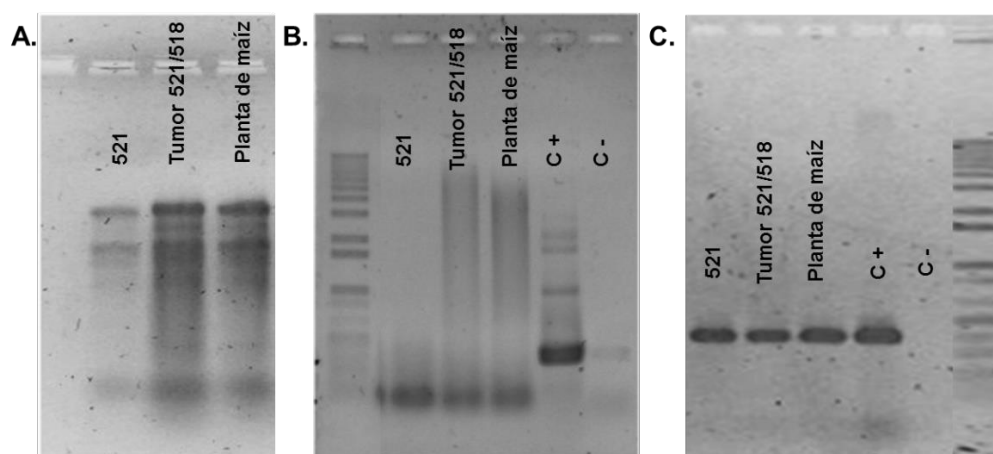


Figura 20. ARN de células haploides, tumor y plántula de maíz de *U. maydis*. A. Verificación de la integridad del ARN. B. Corroboración de eliminación de ADN del ARN por PCR punto final. C. Verificación de la integridad del ARN.

Se verificó que el ARN no tuviera ADN haciendo una reacción de PCR sin transcripción inversa para el gen de expresión constitutiva *TUB1* (figura 20 B), y RT-PCR a punto final con los mismos iniciadores (TubA01-TubA02) para corroborar la integridad del

RNA (figura 20 C). Se verificó que los iniciadores usados para amplificar los transcritos de los genes de β -*tub*, α -*act*, *trt1*, *tck2* y *dkc* de *U. maydis* no amplificaran en plantas de maíz, mediante PCR a punto final (figura 14). En la figura 20 se muestran los geles teñidos con EtBr de cada una de estas reacciones de PCR; en todos los casos se amplificó el ADNc en células haploides de la cepa 521 y en tumor 521/518, pero en planta no. Con esto corroboramos que los iniciadores usados solo amplificaran transcritos de *U. maydis* únicamente y no de planta. Por lo tanto se usaron estos iniciadores para hacer estos ensayos.

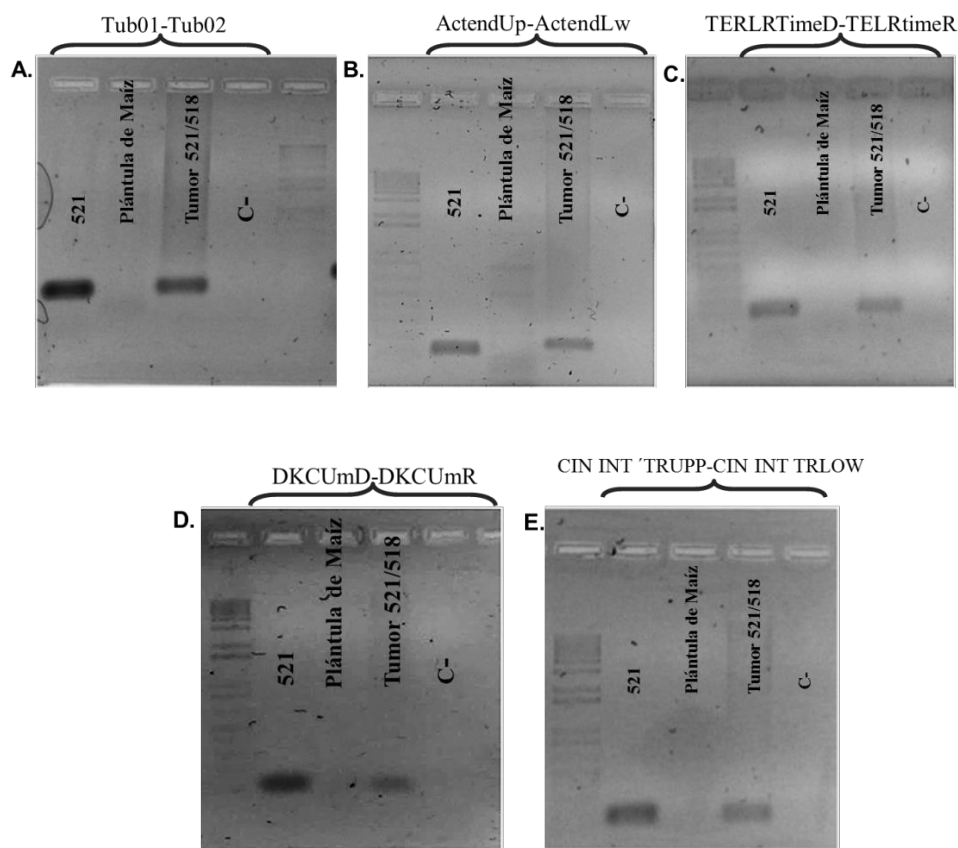


Figura 21. PCR a punto final de los diferentes genes analizados en células haploides (521), en tumor 521/518 y en planta de maíz. A. amplificado del transcrito de *TUB1*; B. amplificado del transcrito de *ACT1*; C. amplificado de *trt1*; D. amplificado del transcrito de *dkc* y E. amplificado del transcrito de *tck2*.

Después de verificar que los iniciadores no amplificaran transcritos de la planta, se realizó RT-PCR en dos pasos, en el primer paso se sintetizó la primera cadena (ADNc) usando como iniciador el iniciador reverso específico de gen, en el segundo paso se amplificó el ADNc, cada ensayo se realizó por triplicado en ensayos independientes. Los resultados se muestran en la figura 21 y en todos los casos los resultados fueron similares.

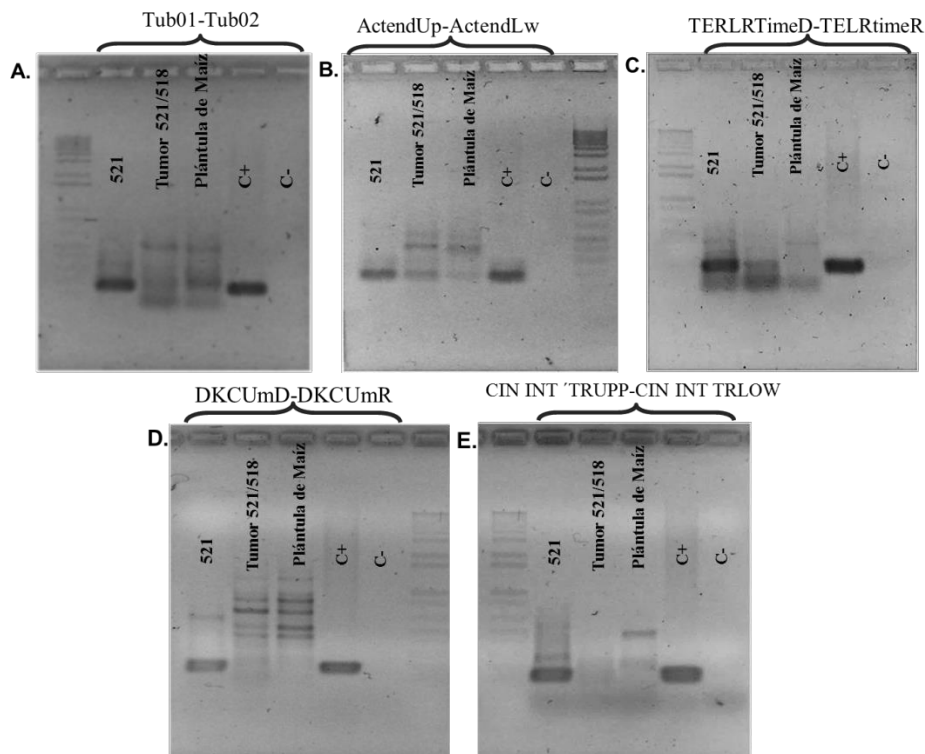


Figura 22: RT-PCR de células haploides (521), de células de tumor 521/518 y plantas de maíz. En la imagen se indica los primers que se usaron para cada gen. A. *TUB1*; B. *ACT1*; C. *trt1*; D. *dkc* y E. *tck2*.

En los resultados de RT-PCR se obtuvo amplificado en células haploides 521 y en el control positivo (ADN de 521). Mientras que en tumor y en planta se observan amplificados inespecíficos, y en algunos casos presenta más de dos bandas, algunas de ellas de tamaño similar (*TUB1*, *ACT1*, *dkc*), en el caso de *tck2* no amplificó el ARN de tumor.

También se cuantificaron por RT-qPCR la cantidad de transcritos y la actividad de *trt1* por el método de TRAP-ELISA, no detectando transcrito ni actividad en las muestras de tumor (dato no mostrado), por lo que se obtuvieron mutantes histona desacetilasas usando el casete de interrupción del gen *hda1* (Δhda) con el marcador de selección carboxin (Ramírez Cisneros, 2015, Tesis Maestría), ya que Reichmann en 2002 demostró que estas mutantes pueden expresar genes que solo se expresan en la fase dicariótica y no en la fase haploide. Se obtuvieron 7 mutantes se les analizó su telotipo mediante la técnica TRF-Southern blot, para ver si la mutación afectaba la replicación del telómero, (Figura 23).

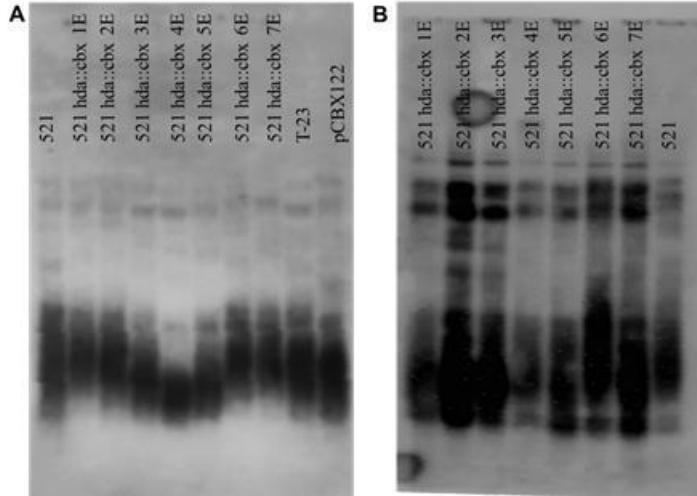


Figura 23: Análisis del telómero en las mutantes *Ahda* a las 36 (A) y 200 generaciones (B).

Las mutantes se hicieron crecer en cultivos continuos hasta 200 generaciones, se analizó el telotipo a 36 y 200 generaciones, los resultados obtenidos muestran un acortamiento de telómero en la cepa 521hda::cbx4E y en la cepa 521hda::cbx1E se observa un ligero aumento del tamaño del telómero a 36 generaciones (figura 23A), sin embargo conforme se crecieron durante varias generaciones el telómero se homogenizo en todos los casos como en la cepa silvestre.

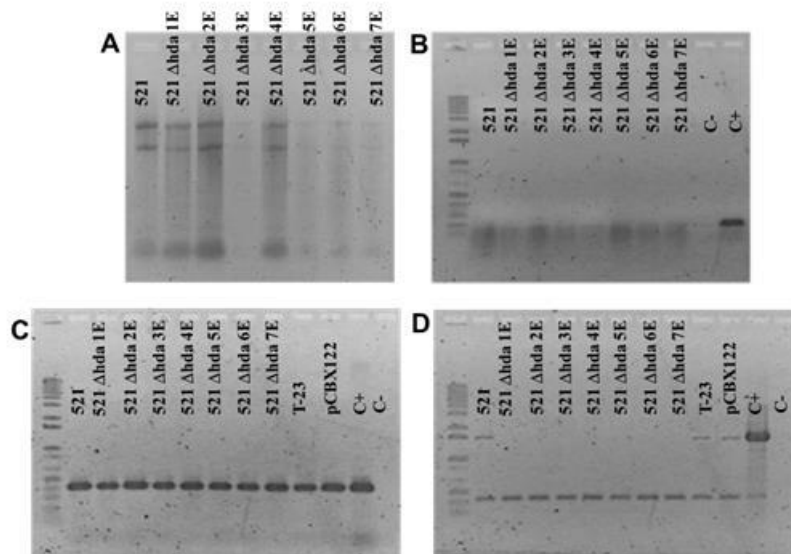


Figura 24. Muestras de ARN de mutantes histona deacetilasas (*Ahda*) de la cepa 521. A. gel de agarosa con las muestras de ARN de la cepa silvestre y las 7 mutantes *Ahda*. B. PCR del RNA para comprobar que las muestras no están contaminadas con ADN. C. RT-PCR para corroborar la integridad del ARN (primer Tub11 y Tub12, amplifican un fragmento de 404 pb). D. RT-PCR para corroborar la interrupción del gen histona deacetilasa con el casete de carboxin.

Una vez seleccionadas las mutantes *Ahda* se extrajo ARN y se eliminó el ADN con

ADNasa libre de ARNasas (figura 24 A y 24 B). Se hizo RT-PCR con los iniciadores Tub 11 y Tub 12 (amplificado de 404 pb) para el gen *TUB1*, usando el iniciador Tub 12 para la síntesis de ADNc obteniendo el amplificado esperado (figura 24 C) y RT-PCR para verificar la interrupción del gen en las mutantes, usando el iniciador REVCBX20 para la síntesis de ADNc y para la amplificación del ADNc se usaron los iniciadores HDA5UPPS-REVCX20 esperando un amplificado de 2500 pb (figura 25 A). En el gel se observa un amplificado de 2500 pb aproximadamente en la cepa silvestre cepa silvestre 521, en la cepa T-23 (inserción del fragmento *hda::cbx* de forma no homóloga en el genoma) y cepa 521 con el plásmido pCBX122 (plásmido con el marcador de selección que se usó para interrumpir el gen *hda*).

Reichmann en 2002 también identifico a la Histona Deacetilasa 1 (Hda1) como un factor que afecta la expresión de varios genes de expresión normal en el dicarion, dentro de estos genes esta *egl1*, una endoglucanasa que no se expresa en células haploides pero se induce fuertemente en el filamento de *U. maydis* (Schauwecker et al. 1995). Con estos antecedentes se realizó RT-PCR del gen *egl1* de las cepas mutantes (figura 25A), los resultados muestran presencia de transcritos en las mutantes Δhda , pero no en la cepa silvestre 521, en la cepa T-23 (inserción del gen interrumpido con el casete carboxin de forma no homóloga en el cromosoma) y cepa 521 con el plásmido pCBX122 introducido (plásmido con el marcador de selección que se usó para interrumpir el gen *hda*). Estos resultados nos corroboran que tenemos verdaderas mutantes Δhda .

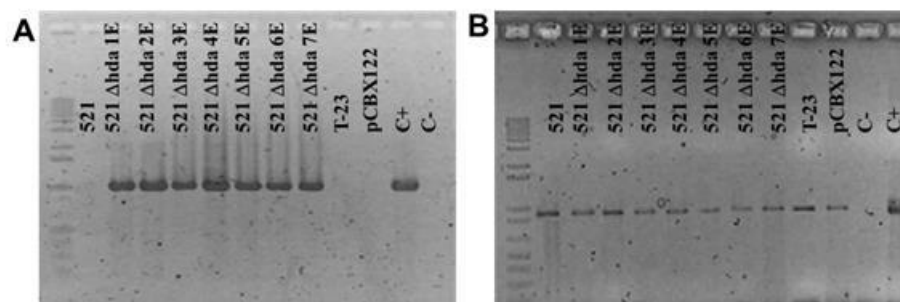


Figura 25: A. Amplificados de RT-PCR del gen *egl1* de expresión única en mutantes Δhda . B. RT-PCR de telomerasa en las cepas mutantes Δhda .

Una vez verificado que se tenían las mutantes Δhda , se hizo RT-PCR con los primers R3TDSFI-R3TR (amplificado de 910pb) para amplificar el extremo 3' del gen *trt1* (figura 25 B). Los amplificados mostraron amplificado de 900 pb aproximadamente en

todos los casos, observando amplificado en las 7 mutantes *Ahda* similar a las cepas silvestres.

Se realizó cuantificación relativa para conocer la actividad de *trt1* en células dicarióticas, así como también de *dkc* en mutantes $\Delta trt1$ y Δhda . La cuantificación relativa de *trt1* en mutantes Δhda indica una expresión similar en la cepa silvestre 521 y en las mutantes Δhda con un valor no mayor a 1.4 (figura 26A), lo cual nos indica que el número de transcritos es igual en células haploides y en células dicarióticas. Los resultados de cuantificación relativa del gen *dkc* muestran valores de 1.89 para $\Delta hda1E$, 1.22 para $\Delta hda2E$, 2.5 para $\Delta hda4E$, 1.9 para $trt1-1$ y 1.72 para $trt1-2$. En las mutantes Δhda la expresión aumenta casi dos veces en las mutantes que presentaron el telómero un poco más largo ($\Delta hda1E$) y con telómero corto ($\Delta hda4E$). El mismo resultado se observó en las mutantes *trt1*, sin embargo el valor no se puede considerar significativo, y esto corrobora los resultados ya reportados en células de humano, en donde disquerina ve afectada su expresión cuando se inhibe el componente ARN de la telomerasa, pero cuando se inhibe *trt1*, *dkc* no se ve afectada (Tung and Chang, 2003) (figura 26B).

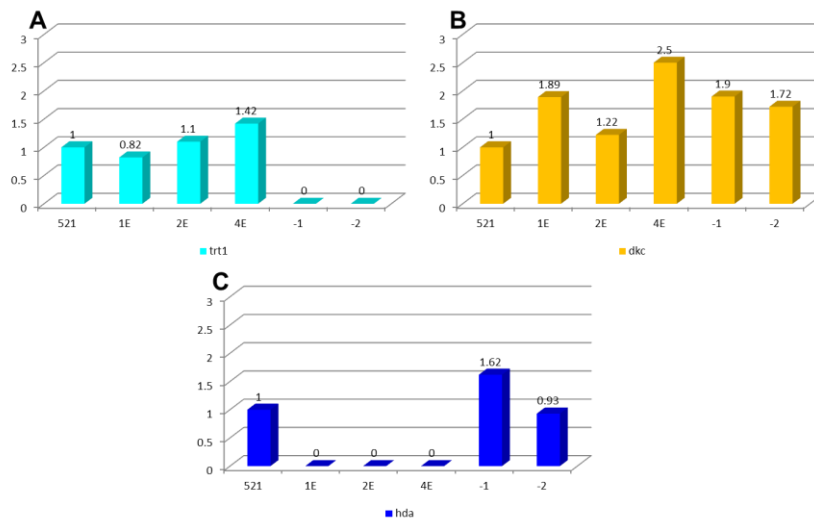


Figura 26: Cuantificación relativa de tres genes en mutantes *trt1* y Δhda . **A.** Cuantificación relativa del gen *trt1*. **B.** cuantificación relativa del gen *dkc*. **C.** cuantificación relativa del gen *hda* en mutantes $\Delta trt1$ y Δhda .

La expresión cuantitativa de *hda1* en las mutantes *trt1* no muestra un aumento significativo ya que apenas aumenta 0.62 veces (figura 26C), lo que indica que los niveles de expresión no se ven alterados con respecto a la cepa silvestre. El transcriptoma de *U maydis* durante la transición dimórfica ya se publicó (Lanver et al. 2018.), y se corroboró

que el cambio en la expresión de *trt1* durante esa fase del ciclo de vida del hongo puede ser sutil, sin embargo la importancia de estos cambios de expresión para un gen de tan baja expresión y tan fuerte control transcripcional pueden tener un significado biológico, que en este momento desconocemos.

- **Objetivo 4:** Determinar la abundancia absoluta de las secuencias *UTASa* y *UTASb* de la región subtelomérica en *U. maydis* los cuales transcriben ARNs no codificantes similares a TERRA.

El alargamiento alternativo de los telómeros (ALT) es una vía independiente de la telomerasa pero dependiente de la recombinación para mantener la función protectora de los extremos cromosomales en ausencia de telomerasa. Como se comentó antes, se obtuvieron 2 tipos de sobrevivientes (trt1-1 y trt1-2), cuyos patrones de TRF son similares a los reportados en *S. cerevisiae* en donde las sobrevivientes tipo I mantienen sus extremos cromosomales amplificando el elemento Y' de la región subtelomérica, las sobrevivientes tipo II exhiben una repentina extensión del repetido telomérico de varios Kb. Debido a que las secuencias subteloméricas se transcriben en forma de ARN no codificante, el cual se desreprime por el acortamiento del telómero, nos interesó conocer 1) si se transcriben las secuencias subteloméricas *UTASa* (las cuales albergan el MLA de *USHER*), 2) cuántas veces se amplificaron las secuencias subteloméricas *UTASa* en cada tipo de superviviente, y 3) si *UTASb* también se transcribe en cada una de las dos supervivientes.

En un ensayo inicial se realizó PCR de diferentes cepas de laboratorio, se realizaron dos reacciones una con los primers AVVI-AVVII que amplifican dentro de los 7 motivos de las helicasas de la subfamilia RecQ (figura 27 A) que se encuentran conservados en la secuencia *UTASa* de región subtelomérica (*USHER*) generando un amplificado de 619 pb (tabla2, figura 27 B), el otro par de primer fue UTASIF-UTASIR, amplifican el MLA completo de la misma helicasa hipotética, obteniendo un amplificado de 2857pb (figura 27 C), y por último se amplificó la otra región subtelomérica *UTASb* con los primers UTASbMidF-UTASbMidR amplificando un fragmento conservado en todas las secuencias *UTASb* de 401pb (figura 27 D). Las cepas de laboratorio utilizadas fueron FB1, FB2, 521, 518, I2, PGA2.1, trt1-1, trt1-2 y como control se usó el plásmidos pORFH1 (contiene el ORF completo de *USHER* clonada en el vector pBLUESCRIP KS-). Los amplificados de *UTASa*, se obtuvieron en todas las cepas con ambos primers excepto en las cepas I2 y PGA2.1. I2 es un aislado de Irapuato, Gto y PGA2.1 es un aislado obtenido en el laboratorio de microbiología molecular y celular del CICM-ICUAP y que previamente se detectó que tenían un número muy bajo de copias de *USHER* (Sánchez Alonso et al. no

publicado). *UTASb*, amplificó en todas las cepas.

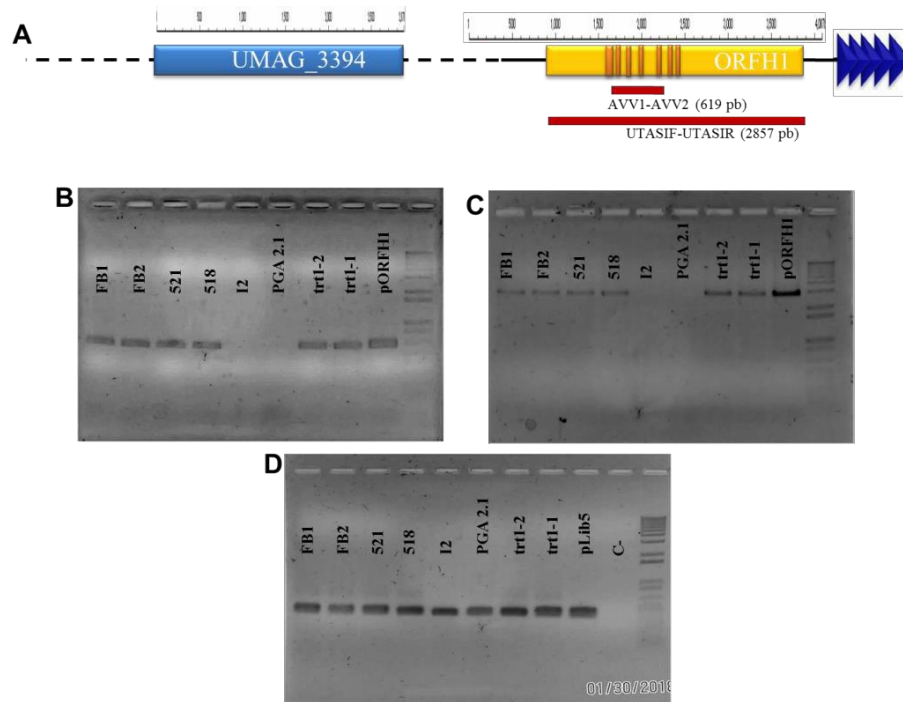


Figura 27: Amplificados de la región subtelomérica *UTASa* y *UTASb*. A. Representación esquemática indicando la posición de los amplificadores de *UTASa*. B. Amplificado de PCR con los primers AVVI-AVVII. C. Amplificado de PCR con los primers UTASIR-UTASIF. D. Amplificado de *UTASb* con los primers UTASbMidF-UTASbMidR. El marcador de peso molecular (MPM) es 1Kb leader de Invitrogen.

Como se mencionó, los telómeros pueden transcribirse en ARN largos no codificantes (ARNlnc) llamados TERRA su transcripción es altamente conservada en organismos eucariotes de diferente orden filogenético. Desde su descubrimiento se le ha asociado con una amplia variedad de funciones y diferentes estados teloméricos (Azzalin et al. 2017). La cadena rica en C proporciona la plantilla para la transcripción de TERRA a partir de regiones subteloméricas, por lo tanto las moléculas TERRA comienzan con un fragmento de secuencias subteloméricas seguido de un número variable de repetidos teloméricos. Además de TERRA, existen otras especies de ARNlnc originadas en los extremos de los cromosomas y que junto con TERRA forman parte del transcriptoma telomérico. En *S. pombe* estos ARNlnc ya han sido caracterizados, entre ellos se describe el ARN antisentido ARIA (del vocablo italiano aire, el complemento de “tierra”, terra). Así como en dos componentes ARN subteloméricos nombrados ARRET y α ARRET (Greenwood y Coopel, 2012; Bah et al. 2012). En el extremo 3' de TERRA y ARIA y en las especies de ARRET y α ARRET se presentan colas de poli(A). Con estos antecedentes

nosotros realizamos RT-PCR para evidenciar si *U. maydis* también tenía estos elementos por lo que se realizó la síntesis de primera cadena con los iniciadores específicos para *UTASa* tanto directo como reverso, así como también se realizó con oligo dT.

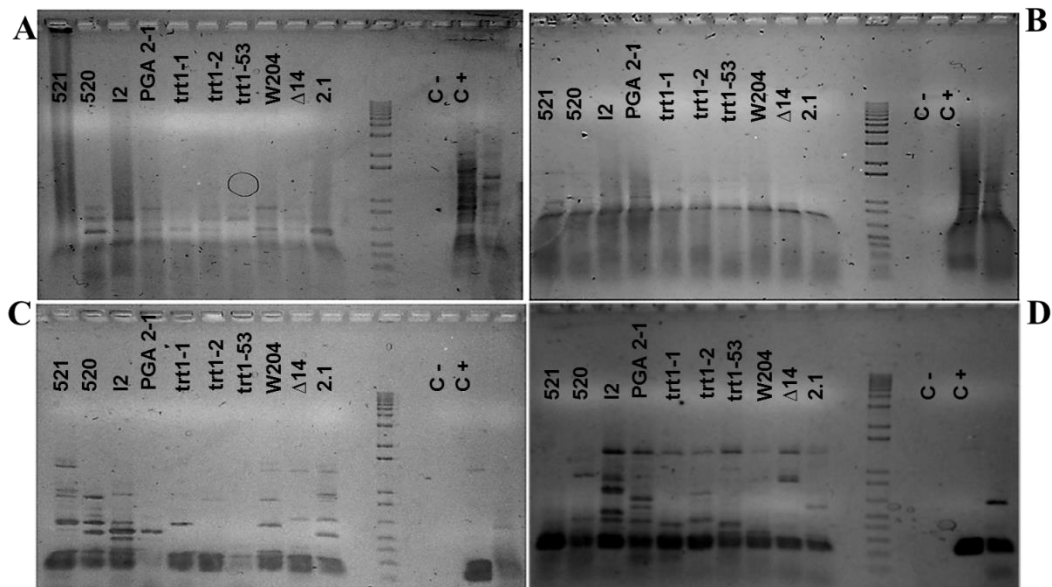


Figura 28: RT-PCR de región subtelomérica para evidenciar la presencia de TERRA. A. síntesis de primera cadena con el primer UTASIF (iniciador directo). B. Síntesis de primera cadena con el iniciador UTASIR (iniciador reverso). C. síntesis de primera cadena con oligo dT. D. síntesis de primera cadena con el iniciador CX (específico de telómero).

Los resultados indican que hay transcripción de la región subtelomérica en ambos sentidos (figura 28 A y 28 B), también se obtuvieron amplificados cuando se usó oligo dT para la síntesis de ADNc (figura 28 C) y cuando se usó un primer específico para la amplificación de telómero (figura 28 D). También podemos observar que además del amplificado del tamaño esperado (figura 28 C y 28 D) se obtuvieron otros tamaños diferentes. En el ensayo se usaron las cepas 521, 520 (cepas silvestres), I2 y PGA2.1 (cepas escasas en copias de *UTASa*), trt1-1 y trt1-2 (mutantes *trt1* de la cepa 521), trt1-54 (mutante *trt1* de la cepa 520), W204 (mutante *trt1* obtenida de la progenie 520/trt1-1) y Δ14 (mutante *trt1* obtenida de la progenie trt1-1/trt1-53).

Para la cuantificación absoluta de las copias de *UTASa* y *UTASb*, que nos permitiera conocer cuánto se amplificaron en las diferentes supervivientes, se acudió a ensayos de RT-qPCR. Se realizaron los cálculos estadísticos de acuerdo a las reglas MIQUE. Los

iniciadores que se usaron para *UTASa* TRLib8MidUpp-TRLib8MidLo, el tamaño de su amplificado es de 190pb; y para *UTASb* se usaron los iniciadores RTUtasb1For-RTUtasb1Rev con un tamaño de amplificado de 199pb y se ubica en la región conservada de las diferentes secuencias *UTASb*. Otro gen que se analizó fue *dkc* ya que se usó como gen de copia única y los iniciadores que se usaron DKCUMD-DKCUMR, el tamaño de amplificado es de 127pb (tabla 2).

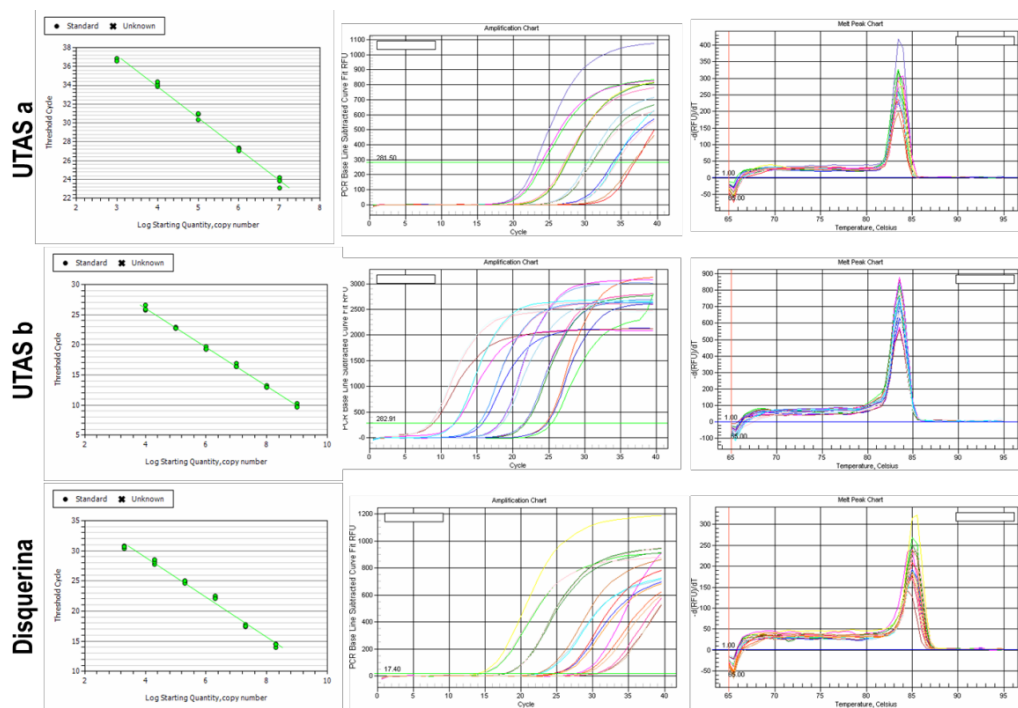


Figura 29: Gráficos obtenidos de los ensayos RT qPCR para obtener el rango dinámico, la eficiencia de amplificación, la R^2 y el valor de la pendiente. De lado izquierdo se muestra la curva de calibración; en medio se muestra la curva Cq y de lado derecho se muestra la curva de desnaturalización.

Para las curvas de calibración se usaron los plásmidos pORFH1 (secuencia *UTASa*), pLib5 (secuencia *UTASb*) y pDKC (secuencia disquerina). Los resultados de eficiencia de amplificación se muestran en la tabla 6, en donde se puede corroborar que la eficiencia de amplificación es de 100 % en los tres pares de primer, el valor de la R^2 es de 0.99, el valor de la pendiente es de -3.2 a -3.3. En la curva de desnaturalización también se observa un único producto y el mejor rango dinámico fue de 10^3 - 10^8

	Eficiencia	R^2	Pendiente
<i>UTASa</i>	100.1	0.993	-3.37
<i>UTASb</i>	104.2	0.998	-3.23
<i>Dkc</i>	100.6	0.99	-3.307

Tabla 6: Valores de eficiencia de amplificación, R^2 y valor de la pendiente de los primers usados para *UTASa*, *UTASb* y *dkc*.

Para hacer la cuantificación absoluta se usó como muestra biológica ADN de las cepas 521, trt1-1 y trt1-2. Nuestro interés se centraba en conocer si la expresión de *UTASa-TERRA* correspondía con la cantidad de copias de *UTASa* en las supervivientes Tipo I-like, comparándolas con las obtenidas en las supervivientes Tipo II-like. Después de hacer la cuantificación absoluta, se estimó la cantidad relativa de transcritos, y se usó como muestra biológica ARN de las mismas cepas. Las muestras cubrieron los requisitos solicitados por las reglas MIQE y los resultados de cuantificación absoluta para *UTASa* fueron de 35 copias para 521, 4900 copias para trt1-1 y 220 copias para trt1-2 es decir aumentaron 140 veces para trt1-1 y 6 veces para trt1-2 con respecto a la silvestre. Para *UTASb* se detectaron 58 copias para 521, 5122 copias para trt1-1 y 455 copias para trt1-2 es decir, aumentaron 88 y 7 veces, respectivamente con respecto a la cepa silvestre. Estos resultados son congruentes con lo observado en el ensayo de *Southern blot* de las mutantes *trt1*, en donde en las sobrevivientes Tipo I se aumenta el número de copias del elemento *UTASa* (similar al elemento Y' de *S. cerevisiae*).

Los resultados de cuantificación relativa indican un aumento de transcritos de *UTASa* en la cepa trt-1 de hasta 7.4 veces y en la cepa trt1-2 de 2.96 veces con respecto a la cepa 521 (figura 30 A) lo que indica que hay correlación con el DNA amplificado en la cuantificación absoluta. En *UTASb* la cantidad de transcritos no hubo mucha diferencia con respecto a la cepa silvestre 521 ya que para trt1-1 fue de 1.56 y para trt1-2 de 1.92 (figura 30 B), por lo que se puede observar que hubo sobreexpresión de transcritos y rearrreglos de secuencias *UTASa* en el extremo cromosomal en las sobrevivientes tipo I, participando así estos ARN teloméricos en el mantenimiento de extremos cromosomales en sobrevivientes tipo I, mientras que en las sobrevivientes tipo II no se ve aumento en la expresión de transcritos ni de rearrreglo de secuencias *UTASa* y *UTASb*, pero cuando se analiza su telotipo se observa un rearrreglo de telómeros muy alto, por lo que nos lleva a pensar que en las sobrevivientes tipo II el rearrreglo de telómeros está implicado en el mantenimiento de extremos cromosomales en este tipo de sobrevivientes. Faltaría hacer estudios adicionales para corroborar las rutas de mantenimiento para este tipo de células sobrevivientes.

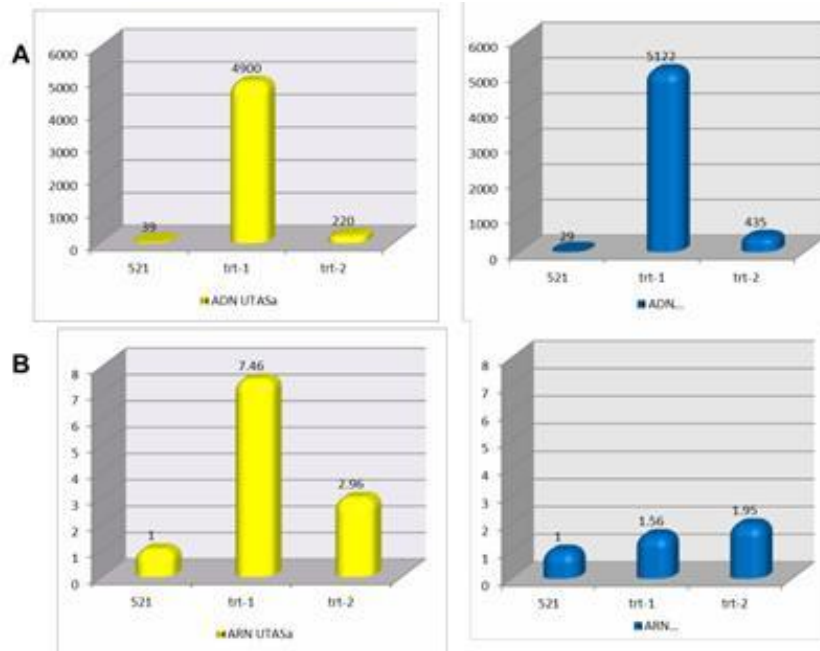


Figura 30: Cuantificación absoluta de secuencias *UTASa* y *UTASb* (A) y cuantificación relativa de transcritos *UTASa* y *UTASb* (B) de las cepas 521, trt1-1 y trt1-2.

XIV. DISCUSIÓN

U. maydis es un hongo alternativo que promueve nuevas ideas sobre el papel de las proteínas implicadas en la reparación de telómeros. Los telómeros de *U. maydis* fueron reportados en 1996 por Guzmán y Sánchez; y están compuestos por los repetidos TTAGGG, idénticas a las que se encuentran en mamíferos (Yu et al. 2013). También contiene un complejo nucleoproteico y una maquinaria de replicación similar a mamíferos, específicamente en el uso del ortólogo de BRCA2 Brh2 para promover reparación de ADN por recombinación (Holloman, 2011). El número de componentes shelterina candidatos se han identificado basados en el alineamiento de secuencias, pero la organización estructural de estos componentes son un poco diferentes de mamíferos (Sánchez-Alonso, 2008; Yu et al. 2013).

Este trabajo se inició con la identificación del locus UMAG_11198 (gen del componente proteico de la telomerasa) de *U. maydis* que alberga el gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa (*trt1*), realizado por Bautista-España (2014). El análisis de alineamiento indicó que codifica una proteína con todos los dominios TERT característicos (TEN, TRBD, RT y CTE) en el mismo orden y distancias informadas para otros TERT. También muestra similitud limitada con otros miembros de la familia, alineándose bien con los homólogos de humanos en el dominio Myb, Mientras que TRF1 y TRF2 de humano muestran un solo dominio Myb en su extremo C-terminal, UmTrf1 porta dos dominios Myb consecutivos cercanos al extremo N-terminal y estructuralmente se asemeja a la proteína de unión a telómero dúplex en *Yarrowia lipolytica* llamado Toy1 (Yu et al. 2018)

Al interrumpir el gen *trt1* provocó un acortamiento característico de los telómeros en mutantes deficientes en telomerasa, y la senescencia replicativa también se produce en estas mutantes, apareciendo como colonias estresadas, de crecimiento lento y replicación deficiente, como cultivos envejecidos (figura 7 B y 8). La aparición de sobrevivientes telomerasa negativas se obtuvo después de 180 generaciones, y se mostraron cambios en el patrón de hibridación Southern blot de las mutantes (figura 8 B), un fenotipo mostrado en mutantes telomerasa negativas de *S. cerevisiae* que carecen del gen TLC1, que codifica el componente ARN de la telomerasa en levaduras (Lundblad y Szostak, 1989). Las sobrevivientes post-senescentes también surgen entre mutantes deficientes en telomerasa en

U. maydis, como en las mutantes est2 de *S. cerevisiae* (Bautista-España et al. 2014; Chen et al. 2001), informando dos tipos de sobrevivientes en base al patrón de amplificación obtenido de las secuencias de los extremos cromosomales: Tipo I, que muestra una amplificación basada en recombinación de elementos Y 'subteloméricos y requiere funciones RAD51 y RAD52, y Tipo II en el que se encontraron repeticiones de telómeros largas y heterogéneas como productos amplificados con el requisito de las funciones RAD50, RAD52 y SGS1 (Teng y Zakian, 1999; Huang et al. 2001). En *U. maydis*, actualmente nos estamos enfocando en analizar las clases de sobrevivientes obtenidas similares a las de la levadura y los posibles mecanismos de recombinación en donde se involucra la región subtelomérica.

Se ha estudiado la relación entre el potencial replicativo y el alargamiento de los telómeros en diferentes eucariotas superiores (Blagoev, 2009; Grafi et al. 2007). La hTERT y el estado epigenético de las secuencias teloméricas y subteloméricas son importantes para el crecimiento, la proliferación y la diferenciación de células madre embrionarias o inducidas humanas (Yang et al., 2008; Yehezkel et al. 2011). Además, la única reactivación de la actividad de la telomerasa restaura el potencial replicativo y las funciones neurológicas de los ratones ancianos con deficiencia de telomerasa (Jaskelioff et al. 2011). Al buscar el papel de *trt1* en la finalización del ciclo de vida de *U. maydis*, encontramos que es importante para la formación de teliosporas, ya sea por su participación en funciones relacionadas con los telómeros o en funciones independientes de los telómeros en la diferenciación de las células fúngicas (Bautista España et al. 2014). Los mecanismos asociados con la formación de teliosporas en la célula telomerasa negativa están actualmente bajo investigación en nuestro grupo ya que el potencial replicativo y la viabilidad de *U. maydis* podrían tener un papel en la invasión exitosa de la planta. Ese resultado es complementario al hallazgo de Walbot & Skibbe (2010) que encontró el potencial de crecimiento del huésped como uno de los factores que influyen en el potencial patogénico en *U. maydis*. La investigación sobre el funcionamiento de la transcriptasa inversa de telomerasa de microorganismos patógenos podría proporcionar información adicional sobre los mecanismos implicados en la persistencia de la enfermedad.

En los resultados de TRF, se observaron largos tramos heterogéneos del telómero en la mutante *trt1-2*, resultados similares a los análisis TRF caracterizados en las

sobrevivientes tipo II de *S. cerevisiae est2*. Los fragmentos excesivamente amplificados de TAS vinculadas a segmentos cortos de secuencias teloméricas que ocurrió en la mutantes *trt1* es similar al patrón de sobreviviente tipo I de *S. cerevisiae*, se tendrían que hacer pruebas adicionales como analizar la expresión de RAD52, RAD54, RAD55 y RAD57 (proteínas involucradas en el mantenimiento del telómero Tipo I en sobrevivientes), para corroborar que se trata de este tipo de sobrevivientes.

Los resultados de cuantificación absoluta de los genes de interés nos permitieron observar la abundancia de cada uno de los genes analizados. Así tenemos que el gen *trt1* se expresa en menor cantidad que los genes *tck2*, *hh4*, *dkc*, *TUB1* y *ACT1*, teniendo un mayor número de transcritos *HH4* (figura 17), estos resultados concuerdan con los reportes hechos en *S. cerevisiae* y humanos en donde también el número de transcritos de telomerasa son pocos por ser un gen fuertemente regulado (Braun, 2018).

Ensayos de RT-PCR semicuantitativos realizados previamente en el laboratorio nos permitieron tener una idea de la abundancia relativa de los transcritos de *trt1* y del *tck2*, de los loci UMAG_11198 y UMAG_11199, en donde se encontró un aumento de transcritos de *trt1* durante la fase S, mientras los transcritos del segundo locus se encontraron aumentados durante las fases G2/M (Sánchez Alonso, comunicación directa); además de encontrar diferencia en la abundancia de amplificados. Para corroborar estos resultados se realizó RT-qPCR de cultivos sincronizados en la fase G2 (figura 10), en donde los resultados corroboraron un aumento del transcrito *trt1* durante la fase S tardía, en el caso de *tck2* hubo un aumento en la fase G2/M y de *dkc* en la fase G1/S (gráfica 2). Se usó como control interno de la sincronización a *HH4*, ya que es un gen fuertemente regulado y restringido a la fase G1/S y su nivel de expresión del transcrito es durante la fase S (Onel et al. 1996). Nuestros datos sugieren una correcta correlación entre microscopía, citometría y análisis de la expresión transcripcional en este organismo durante el ciclo celular (figura 10 y gráfica 2). Cuando se inició este trabajo se tenía la idea que *trt1* y *tck2* estaban en el mismo locus, al hacer los ensayos de RT-qPCR observamos expresión diferente para cada gen, mientras *trt1* tiene un pico de expresión en la fase S, el pico de expresión de *tck2* es en la fase G2/M, dos fases del ciclo celular diferentes. Otro hallazgo fue el del transcrito *trt1*, pero no de *tck2* en las células de la fase biotrófica del hongo, y la expresión de *tck2* en mutantes *trt1*-interrumpidas (dato no mostrado), lo que sugiere la expresión independiente

de ambos exones del locus y algún papel biológico para esta cinasa dependiente de ciclina que es importante de cesar en la fase biotrófica; estos estudios son relevantes para iniciar la disección del circuito regulatorio y la temporalidad del encendido y apagado de estos genes, desafortunadamente en las agallas del maíz se tiene una mezcla de células vegetales, micelio dicariótico del hongo, células diploides y teliosporas del mismo, y la determinación de la abundancia de transcritos en estas preparaciones de ARN limitaron la sensibilidad para la cuantificación de transcritos en esta fase del ciclo de vida del hongo, sin embargo, se usó un sistema alternativo usando mutantes histona deacetilasas negativas, que nos permitieron cuantificar estos transcritos y verificar que el nivel de transcripción tanto en esporidias como en células dicarióticas de *trt1* es igual, ya que *trt1* es un componente altamente regulado y responsable de la activación del complejo telomerasa. Los otros componentes como *ter* (componente ARN de la telomerasa) y *dkc* mantienen sus niveles de expresión relativamente constantes (Tung and Chang, 2002), Esto también se puede consultar en Lanver et al. (2018).

Disquerina forma parte de las proteínas adicionales del complejo telomerasa y junto con NHP2 y NOP10 son requeridas para la estabilidad y acumulación del componente ARN in vivo (Cerrudo et al., 2014); tiene dos funciones principales: ser un componente de partículas ribonucleoproteicas necesarias para la conversión sitio-específicas de residuos de uridina y pseudouridina en los ARNr y pequeños ARN nucleares y la segunda es unirse al componente de ARN de la telomerasa estabilizando el complejo enzimático de la telomerasa (Penzo et al. 2015). Por lo tanto, los niveles de *dkc* no están relacionados con la actividad del componente proteico *trt1*. Así como también el componente proteico TERT es regulable y responsable de la activación de la telomerasa, los otros componentes TERC, TEP1, Hsp90, p23 y disquerina mantienen su expresión a niveles relativamente constantes. Sin embargo, la inhibición de cualquier componente da lugar a la reducción de la actividad de la telomerasa, sugiriendo que cada subunidad es necesaria para la actividad enzimática completa (Chang, 2002).

Los transcritos *trt1* y *tck2* se encontraron en esporidias, aunque se ha reportado en otros organismos que la temporalidad de expresión durante el ciclo celular para cada uno de estos genes es distinta: TERT se transcribe durante la fase S tardía, y CDK11 se transcribe y traduce durante todo el ciclo celular. En humanos existen diferentes isoformas de las

cinastas similares Tck2 denominadas tipo PITSLRE y una isoforma pequeña e importante denominada isoforma 58 se traduce del ARNm de una isoforma mayor denominada 110 mediante IREs (Internal Ribosome Entry sites) solo en G2/M (Vladan et al. 2011)

La protección de los extremos cromosomales no está limitada a los componentes del telómero, incluye a las secuencias asociadas a telómero (TAS). Las TAS son transcripcionalmente activas que dan lugar a ARN_{inc}, vinculados con el mantenimiento y alargamiento del telómero en ausencia de actividad de telomerasa (Oliva-Rico et al. 2017). Al analizar la región subtelomérica en diferentes cepas de *U. maydis*, se corroboró la presencia de *UTASa* y *UTASb* (figura 24), excepto en dos cepas I2 y PGA2.1 que tienen un bajo número de copias de *UTASa*. Los resultados de RT-PCR a punto final para saber si en *U. maydis* hay presencia de transcritos TERRA, nos dan indicios de la presencia de transcritos TERRA (figura 25), detectando transcritos poliadenilados (figura 25 C), transcritos de región subtelomérica hacia telómeros (figura 25 A), de región subtelomérica *UTASa* (figura 25 B). Se realizó una primera cuantificación del número de copias de región subtelomérica, los cuales corroboran los resultados obtenidos por *southern blot*, donde se observa un aumento de secuencias *UTASa* y *UTASb* en la mutante *trt1-1*, y ligeramente elevado en la mutante *trt1-2*. En cuanto a la cuantificación relativa solo se observa ese aumento elevado de transcritos de *UTASa* en la mutante *trt1-1*, en la mutante *trt1-2* el aumento de transcritos es similar al aumento de número de copias de la cepa 521, y los transcritos *UTASb* en ambas mutantes no se ve aumentado (figura 30). Estos son resultados preliminares falta hacer sus réplicas para verificar los resultados y poder sacar una conclusión. Lo que sí es importante es que se logró estandarizar la técnica para poder realizar este ensayo.

En células cancerosas se activan los mecanismos de mantenimiento de los telómeros (TMM) para evitar la senescencia replicativa y lograr la inmortalidad regulando el aumento de la telomerasa o promoviendo la reparación por recombinación homóloga (HDR) en los extremos del cromosoma para mantener la longitud de los telómeros. En las mutantes telomerasa negativa de *S. cerevisiae*, la reparación del telómero basada en HDR conduce a la generación de "sobrevivientes" que escapan de la senescencia y se dividen indefinidamente. Recientemente, se ha establecido que el aumento de ARN_{inc}, TERRA (ARN de repetido telomérico), es un sello distintivo y novedoso de las células ALT.

Además, se cree que los híbridos de ARN-ADN provocan HDR en los telómeros en células ALT para mantener la longitud y la función de los telómeros. En *S. cerevisiae* las sobrevivientes de tipo II, los niveles de TERRA aumentan de manera análoga a las células ALT humanas. Los niveles elevados de TERRA son independientes de las estructuras subteloméricas específicas de la levadura, es decir, la presencia o ausencia de elementos repetitivos Y'. Se sugiere que en términos de regulación TERRA, los sobrevivientes de levadura sirven como un modelo preciso que recapitula muchas características clave de las células ALT humanas (Misino, 2018).

XV. Conclusiones.

Al interrumpir exitosamente el gen *trt1* de *Ustilago maydis*, se complementó el análisis llevado a cabo por Bautista-España. Al obtener los dos tipos de sobrevivientes TipoI-like y TipoII-like para el mantenimiento de extremos cromosomales en ausencia de telomerasa, y al mismo tiempo corroborar el mantenimiento del telómero por la actividad de la enzima telomerasa.

Se cuantifico la abundancias relativas de transcritos del locus UMAG11198, UMAG11199, y UMAG00685 en preparaciones de ARN total de cultivos sincronizados de *U. maydis* de la cepa 521 (WT), y los resultados coincidieron con los reportados para humano y levadura.

Se estandarizo el método para cuantificar el número de repetidos de *UTASa* y *UTASb* por célula de *U. maydis* usando el método de cuantificación absoluta por qPCR y con ello cuantificar la cantidad de amplificadores de *UTASa* y *UTASb* que se producen por recombinación homóloga en las supervivientes TIPO I y TIPO II, hallando que la sobreexpresión de ellas está dada por la sobreamplificación de estos elementos.

La actividad del gen *trt1* y *dkc*, de células dicariótico es proporcional a su expresión durante el ciclo celular.

XVI. Perspectivas.

1. Comparar los resultados de sincronización de células por el método de ayuno con otro método de sincronización y así corroborar nuestros resultados
2. Analizar si la expresión de los genes Rad51, Rad54, Rad55 y Rad 57 en sobrevivientes TipoI-like y Rad52, Sgs1, Top3, Mre11, Rad50 y Rad59 en sobrevivientes TipoII-like, tienen la misma participación en *U. maydis* como en humanos y *S. cerevisiae*.
3. Buscar un sistema alternativo para poder estudiar la expresión de estos genes en células diploides.
4. Terminar el análisis de ARNlnc de extremos cromosomales en cepas silvestres, en cepas con bajo número de copias, así como en las mutantes *trt1-1*, *trt1-2* y en mutantes *trt1* de cepas con bajo número de copias.

XVII. Bibliografia.

Anna Y., Aksenova A. Y., and Mirkin S. G., (2019). At the Beginning of the End and in the Middle of the Beginning: Structure and Maintenance of Telomeric DNA Repeats and Interstitial Telomeric Sequences. *Genes*, **10**:118.

Allsopp R. C., Morin G. B., Horner J. W., DePinho R., Harley C. V. and Wiessman I. L., (2003). Effect of TERT over-expression on long-term transplantation capacity of hematopoietic stem cells. *Nature Med* **9**:369-371.

Amann J., Valentine M., Kidd V. J., Lahti J. M., (1996). Localization of chi1-related helicase genes to human chromosome regions 12p11 and 12p13: similarity between parts of these genes and conserved human telomeric-associated DNA. *Genomics*. 32(2):260-5.

Armstrong. A., Moiseeva V., Collopy L. C., Pearson S. R., Ullah T. R., Xi S. T., Martin J., Subramaniam S., Marelli S., Amelina H. and Tomita K. (2018). Fission Yeast Ccq1 is a modulator of telomerase activity. *Nucleic Acids Research*, 46(2):704-716.

Armstrong C. A. and Tomita K., (2017). Fundamental mechanisms of telomerase action in yeasts and mammals: understanding telomeres and telomerase in cancer cells. *Open Biol.* **7**: 160338.

Artandi S. E, Attardi L. D., (2005). Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**:881–890.

Autexier C. and Lue, N. F., (2006). The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu Rev. Biochem.* **75**:493-517.

Azzalin C. M. and Lingner J., (2015). Telomere functions grounding on TERRA firma. *Trends in Cell Biology*, **25**:1.

Azzalin C. M. and Lingner J., (2008). Telomeres. *Cell Cycle* **7(9)**:1161-1165.

Azzalin C. M., Reichenbach P., Khoriauli L, Giulotto E. and Lingner J., (2007). Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*, **318**:798–801.

Bah A., Azzalin C. M., (2012). The telomeric transcriptome: From fission yeast to mammals. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, **44**:1055–1059.

Banuet F., and Herskowitz I., (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 86(15):5878-82.

Baumann P., Cech T. R., (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 292:1171–1175.

- Bautista-España D., Anastacio-Marcelino E., Horta-Valerdi G., Celestino-Montes A., Kojic M., Negrete-Abascal E., Reyes-Cervantes H., Vázquez-Cruz C., Guzmán P., Sánchez-Alonso P., (2014). The telomerase reverse transcriptase subunit from the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *PLoS One*. **9**;9(10):e109981.
- Belfort M., Curcio M. J., Lue N. F., (2011). Telomerase and retrotransposons: reverse transcriptases that shaped genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**(51):20304-10.
- Benarroch Popivker D., (2016). TRF2-mediated control of telomere DNA topology as a mechanism for chromosome-end protection. *Mol. Cell*, **61**:274– 286.
- Bettin N. N., Pegorar C. O. and Cusanelli E., (2019). The Emerging Roles of TERRA in Telomere Maintenance and Genome Stability. *Cells* **8**:246.
- Blackburn E. H., (2005). Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett*. **579**(4):859-62.
- Blagoev K. B. (2009). Cell proliferation in the presence of telomerase. *PLoS One*, **4**:e4622.
- Braun D. M., Chung I., Kepper N., Deeg K. I. and Rippe K., (2018). TelNet - a database for human and yeast genes involved in telomere maintenance. *Genetics* **19**:32.
- Bryan T. M. and Cech T. R., (1999). Telomerase in the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol*, **11**:318-324.
- Bustin S. A. and Nolan T., (2004). Analysis of mRNA expression by real-time PCR. In *Real-Time PCR: An Essential Guide* (K. Edwards, J. Logan, and N. Saunders, eds.). *Horizon Bioscience, Norfolk*, pp 125-184.
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J., and Wittwer C. T., (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **54**(4): 611–622.
- Canudas S., Houghtaling B. R., Bhanot M., Sasa G., Savage S.A., Bertuch A.A., Smith S.,(2011). A role for heterochromatin protein 1g at human telomeres. *Genes Dev*. **25**:1807–1819.
- Capkova Frydrychovaa R., Biessmannb H., and Masona J. M., (2008). Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenet Genome Res*. **122**(3-4): 356–364.
- Carneiro T., Khair L., Reis C. C., Borges V., Moser B. A., Nakamura T. M, Ferreira M. G. (2010). Telomeres avoid end detection by severing the checkpoint signal transduction pathway. *Nature* **467**: 228–232.
- Chan, S. W. and Blackburn, E. H., (2002). New ways not to make ends meet: telomerase,

- DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene*, **21**:553-563.
- Chan A., Boule J-B., Zakian V. A., (2008). Two Pathways Recruit Telomerase to *Saccharomyces cerevisiae* Telomeres. *PLoS Genet* **4**(10): e1000236.
- Chan H., Wang Y., Feigon J., (2017). Progress in Human and Tetrahymena Telomerase Structure Determination. *Annual review of biophysics*. **46**:199–225.
- Chen J. L., Blasco M. A., and Greider C. W., (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*, **100**: 503-514.
- Chen J. L., and Greider C. W., (2003). Determinants in mammalian telomerase RNA that mediate enzyme processivity and cross-species incompatibility. *EMBO J.*, **22**:304-314.
- Chen J. L., and Greider C. W., (2005). Functional analysis of the pseudoknot structure in human telomerase RNA. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, **102**:8080-8085.
- Chen Q., Ijima A. and Greider C.W., (2001). Two survivor pathways that allow growth in the absence of telomerase are generated by distinct telomere recombination events. *Mol Cell. Biol*, **21**:1819–1827.
- Chen L.Y., Lingner J., (2013). CST for the grand finale of telomere replication. *Nucleus*, **4**:277–282.
- Church G. M, Gilbert W., (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **81**(7):1991-5.
- Churikov D., Corda Y., Luciano P., Géli V., (2013). Cdc13 at a crossroads of telomerase action. *Front Oncol*. **28**(3):39.
- Collins L.J., (2011). Characterizing ncRNAs in Human Pathogenic Protists Using High-Throughput sequencing Technology. *Front Genet*. **27**:2:96.
- Conrad M. N., Wright J. H., Wolf A. J., Zakian V. A., (1990). RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell*, **63**(4):739-50.
- Cooper J. P., (2001). Telomere transitions in yeast: the end of the chromosome as we know it. *Curr Opin Genet Dev.*, **10**(2):169-77.
- Cooper J. P., Nimmo E. R., Allshire R. C., Cech T. R., (1997). Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* **385**:744–747.
- Dandjinou A. T., Levesque N., Larose S., Lucier J. F., Abou Elela S., and Wellinger R. J., (2004). A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA. *Curr. Biol.*, **14**:1148-1158.

Das D. and Georgiadis M. M., (2004). The crystal structure of the monomeric reverse transcriptase from Moloney murine leukemia virus. *Structure*. 12(5):819-29.

Denchi E. L., de Lange T., (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* **448**:1068–1071.

de Lange T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19**:2100–2110.

de Lange T., (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**(4):323-9.

de Vries B. B., Winter R., Schinzel A., van Ravenswaaij-Arts C., (2003). Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J. Med Genet.* **40**(6):385-98.

Deshpande A. P. and Collins K., (2018). Mechanisms of template handling and pseudoknot folding in human telomerase and their manipulation to expand the sequence repertoire of processive repeat synthesis. *Nucleic Acids Research*, **46**(15):7886–7901.

Don M., Kwong B., Tanaka C., (2005). A diagnostic test for Ménière's Disease and Cochlear Hydrops: impaired high-pass noise masking of auditory brainstem responses. *Otol Neurotol.* **26**(4):711-22.

Dunham M. A., Neumann A. A., Fasching C. L. and Reddel R. R., (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nature Genet.* **26**: 447–450.

Thi Hoang D. N., Tam J., Wu R. A., Greber B. J., Toso D., Collins E. N. K., (2018). Cryo-EM structure of substrate-bound human telomerase holoenzyme. *Nature.* **557**:190–195.

Esakova O., and Krasilnikov A S., (2010). Of proteins and RNA: the RNase P / MRP family. *RNA*, 1725–1747.

Evans S. K., and Lundblad V., (1999). Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science*, **286**:117-120.

Feng W., Jasin M., (2017). Homologous Recombination and Replication Fork Protection: BRCA2 and More. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **82**:329-338.

Flint J., Thomas K., Micklem G., Raynham H., Clark K., Doggett N. A., King A., Higgs D. R., (1997). The relationship between chromosome structure and function at a human telomeric region. *Nat Genet* **15**:252-257.

Flint J., Bates G. P., Clark K., Dorman A., Willingham D., Roe B. A., Micklem G., Higgs D. R., Louis E. I., (1997). Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet* **6**:1305-1314.

Flynn R. L., Centore R. C., O'Sullivan R. J., Rai R., Tse A., Songyang Z., Chang S., Karlseder J., Zou L., (2011). TERRA and hnRNPA1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch

on telomeric single-stranded DNA. *Nature* **471**:532-536.

Fourel G., Revardel E., Koering C. E., Gilson E., (1999). Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions. *EMBO J.* **18(9)**:2522-37.

Gadaleta M. C., González-Medina A., Noguchi E., (2016). Timeless protection of telomeres. *Curr Genet.* **2(4)**:725-730.

García-Cao M., O'Sullivan R., Peters A. H., Jenuwein T., Blasco M. A., (2003). Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet.* **36(1)**:94-9.

Gao W., Khang C. H., Park S. Y., Lee Y. H., Kang S., (2002). Evolution and organization of a highly dynamic, subtelomeric helicase gene family in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genetics*, **162(1)**:103-12.

Gasser S. M., Cockell M. M., (2001). The molecular biology of the SIR proteins. *Gene.* **279(1)**:1-16.

Gillis A. J., Schuller A. P., Skordalakes E., (2008). Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT. *Nature.* **455(7213)**:633-7.

Gonzalo S., Jaco I., Fraga M. F., Chen T., Li E., Esteller M., Blasco M. A., (2006). DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* **8(4)**:416-24.

Grafi G., Ben-Meir H., Avivi Y., Moshe M., Dahan Y. and Zemach A. (2007). Histone methylation controls telomerase-independent telomere lengthening in cells undergoing dedifferentiation. *Dev Biol*, **306**:838-846.

Greenwood J. and Cooper J. P. (2012) Non-coding telomeric and subtelomeric transcripts are differentially regulated by telomeric and heterochromatin assembly factors in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* **40**:2956–2963.

Grewal S. I., (2000). Transcriptional silencing in fission yeast. *J Cell Physiol.* **184(3)**:311-8.

Griffith, J. D. et al. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, **97**:503-514.

Grossi S., Puglisi A., Dmitriev P. V., Lopes M., Shore D., (2004). Pol12, the B subunit of DNA polymerase alpha, functions in both telomere capping and length regulation. *Genes Dev.* **18**:992-1006.

Gúzman, P. A. and Sánchez, J. G. (1994). Characterization of telomeric regions from *Ustilago maydis*. *Microbiology.* **140**:551-557.

- Hacisuleyman E., Goff L. A., Trapnell C., Williams A., Henao-Mejia J., Sun L., McClanahan P., Hendrickson D. G., Sauvageau M., Kelley D. R., Morse M., Engreitz J., Lander E. S., Guttman M., Lodish H. F., Flavell R., Raj A., Rinn J. L., (2014). Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre. *Nat Struct Mol Biol.* **21(2)**:198-20.
- Harland J. L., Chang Y. T., Moser B. A., Nakamura T. M., (2014). Tpz1-Ccq1 and Tpz1-Poz1 interactions within fission yeast shelterin modulate Ccq1 Thr93 phosphorylation and telomerase recruitment. *PLoS Genetic*, **10(10)**:e1004708.
- Harley C. B., Futcher A. B., Greider C. W., (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* **345(6274)**:458-60.
- Hayashi M. T., Cesare A. J., Rivera T., Karlseder J., (2015). Cell death during crisis is mediated by mitotic telomere deprotection. *Nature.* **522**: 492–496.
- Hayflick L., Moorhead P. S., (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**:585–621.
- Hirano Y., Fukunaga K., Sugimoto K., (2009). Rif1 and rif2 inhibit localization of tel1 to DNA ends. *Mol Cell*, **33**:312-322.
- Holliday R., (1965). The Induction of Mitotic Recombination by Mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics*, **50**:323-335.
- Holloman W.K. (2011). Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*, **18**:748–754.
- Huang C. S, Chang K. J, Shen C. Y. (2001). Breast cancer screening in Taiwan and China. *Breast Dis.* **13**:41-8.
- Hug N. 1., and Lingner J., (2006). Telomere length homeostasis. *Chromosoma.* **115(6)**:413-25.
- Hughes T. R., Evans S. K., Weilbaecher R. G., and Lundblad V., (2000). The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Curr. Biol.*, **10**:809-812.
- Iglesias N., Redon S., Pfeiffer V., Dees M., Lingner J., Luke B., (2011). Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast. *EMBO Rep* **12**:587-593.
- Inglis P. W., Rigden D. J., Mello L. V., Louis E. J., Valadares-Inglis M. C., (2005). Monomorphic subtelomeric DNA in the filamentous fungus, *Metarhizium anisopliae*, contains a RecQ helicase-like gene. *Mol Genet Genomics*, **274(1)**:79-90.
- Jacobs S. A., Podell E. R., Cech T. R., (2006). Crystal structure of the essential N-terminal domain of telomerase reverse transcriptase. *Nat Struct Mol Biol*, **13**:218-225.

Jain D., and Cooper J. P., (2010). Telomeric strategies: means to an end. *Annu Rev Genet* **44**:243-269.

Jeong YY, Her J, Oh SY, Chung IK. (2016). Hsp90-binding immunophilin FKBP52 modulates telomerase activity by promoting the cytoplasmic retrotransport of hTERT. *Biochem. J.* **473**:3517–3532.

Kanduri C., (2016). Long noncoding RNAs: Lessons from genomic imprinting. *Biochim Biophys Acta.* **1859**(1):102-11.

Kelleher C., Teixeira M. T., Forstemann K., Lingner J., (2002). Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends Biochem Sci,* **27**:572-579.

Koering C. E., Pollice A., Zibella M. P., Bauwens S., Puisieux A., Brunori M., Brun C., Martins L., Sabatier L., Pulitzer J. F., Gilson E., (2002). Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity. *EMBO Rep.* **3**(11):1055-61.

Lanver D., Müller A. N., Happel P., Schweizer G., Haas F. B., Franitza M., Pellegrin C., Reissmann S., Altmüller J., Rensing S. A., Kahmann R., (2018). The Biotrophic Development of *Ustilago maydis* Studied by RNA-Seq Analysis. *Plant Cell.* **30**(2):300-323.

Lai C. K., Miller M. C., and Collins K., (2003). Roles for RNA in telomerase nucleotide and repeat addition processivity. *Mol. Cell,* **11**:1673-1683.

Le S., Moore J. K., Haber J. E. and Greider, C. W., (1999). RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics,* **152**: 143–152.

Lemieux B., Laterreur N., Perederina A., Noël J. F., Dubois M. L., Krasilnikov A. S., Wellinger R. J., (2016). Active yeast telomerase shares subunits with ribonucleoproteins RNase P and RNase MR. *Cell.* **165**:1171–1181.

Lewis K. A., Wuttke D. S., (2012). Telomerase and telomere-associated proteins: structural insights into mechanism and evolution. *Structure.* **20**(1):28-39.

Lin J., Ly H., Hussain A., Abraham M., Pearl S., Tzfati Y., Parslow T. G., and Blackburn E. H., (2004). A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for binding the telomerase reverse transcriptase protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **101**: 14713-14718.

Lingner J., Cech T. R., Hughes T. R., and Lundblad V., (1997). Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **94**:11190-11195.

Lingner J., Cooper J. P., Cech T. R., (1995). Telomerase and DNA end replication: no

longer a lagging strand problem? *Science* **269**: 1533–1534.

Liu D., Safari A., O'Connor M. S., Chan D. W., Laegeler A., Qin J., Songyang Z., (2004). PTOP interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nat Cell Biol*, **6**:673-680.

Liu W. and Saint D. A., (2002). Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**:347-353.

Louis E. J., Naumova E. S., Lee A., Naumov G., Haber J. E., (1995). The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics*, **136**:789-802.

Louis E. J., Naumova E. S., Lee A., Naumov G., Haber J. E., (1994). The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics*, **136**(3):789-802.

Louis E. J., Haber J. E., (1992). The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **131**(3):559-74.

Lue N. F, Yu E. Y., (2017). Telomere recombination pathways: tales of several unhappy marriages. *Curr Genet*. **63**(3):401-409.

Lue N. F. (2004). Adding to the ends: what makes telomerase processive and how important is it? *Bioessays*, **26**:955-962.

Lundblad V., (2002). Telomere maintenance without telomerase. *Oncogene* **21**:522–531.

Lundblad, V. and Blackburn, E. H., (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell*, **73**:347–360.

Lundblad V., Szostak J. W., (1989). A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell*, **57**: 633–643.

Makovets S., Williams T. L., Blackburn E. H., (2008). The telotype defines the telomere state in *Saccharomyces cerevisiae* and is inherited as a dominant non-Mendelian characteristic in cells lacking telomerase. *Genetics*. **178**(1):245-57.

Marcand S., Wotton D., Gilson E., Shore D.,(1997). Rap1p and telomere length regulation in yeast. *Ciba Found Symp.* **211**:76-93

Mason, J. M. & Biessmann, H., (1995). The unusual telomeres of *Drosophila*. *Trends Genet.* **11**: 58–62.

McClintock B., (1939). The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **25**(8):405-16.

- Meijerink J., Mandigers C., van de Locht L., Tonnissen E., Goodsaid F., and Raemaekers J., (2001). A novel method to compensate for differential amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J.Mol. Diagn.* **3**:55-61.
- Melnikova L. and Georgiev P., (2005). Drosophila telomeres: the non-telomerase alternative. *Chromosome Res.* **13**(5):431-41.
- Miller M. C., and Collins, K., (2002). Telomerase recognizes its template by using an adjacent RNA motif. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **99**:6585-6590.
- Miller K. M. , Rog O., Cooper J. P., (2006). Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature*, **440**(7085):824-8.
- Misino S, Bonetti D, Luke-Glaser S, Luke B. (2018). Increased TERRA levels and RNase H sensitivity are conserved hallmarks of post-senescent survivors in budding yeast. *Differentiation.* **100**:37-45.
- Mitchell M., Gillis A., Futahashi M., Fujiwara H., Skordalakes E., (2010). Structural basis for telomerase catalytic subunit TERT binding to RNA template and telomeric DNA. *Nat Struct Mol Biol.* **17**:513–8.
- Miyoshi T. and Ishikawa F., (2008). Conserved telomeric-end structures among fission yeast and humans. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* **53**(14):1850-7.
- Moazed D., (2001). Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol Cell.* **8**(3):489-98.
- Muntoni A., and Reddel R. R., (2005). The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum. Mol. Genet.* **14**:191–196.
- Nugent C. I., Hughes T. R., Lue N. F., Lundblad V., (1996). Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science.* **274**(5285):249-52.
- O'Connor C. M., Lai C. K., Collins K., (2005). Two purified domains of telomerase reverse transcriptase reconstitute sequence-specific interactions with RNA. *J Biol Chem.* **280**:17533–9.
- Oliva-Rico D., Herrera L. A., (2017). Regulated expression of the lncRNA TERRA and its impact on telomere biology. *Mech Ageing Dev.* **167**:16-23.
- Olovnikov A. M., (1996). Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp. Gerontol.* **31**:443-448.
- Onel K., Koff A., Bennett R. L., Unrad P. and Holloman W. K., (1996). The REC1 Gene of *Ustilago maydis*, which encodes a 3' + 5' xonuclease, couples DNA repair and completion of DNA synthesis to a mitotic checkpoint. *Genetics* **143**:165-174.

- Palm W., de Lange T., (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.* **42**:301–334.
- Pérez-Martín J., Castillo-Lluva S., Sgarlata C., Flor-Parra I., Mielnichuk N., Torreblanca J., Carbó N., (2006). Pathocycles: *Ustilago maydis* as a model to study the relationships between cell cycle and virulence in pathogenic fungi. *Mol Genet Genomics.* **276(3)**:211-29.
- Penzo M., Ludovini V., Treré D., Siggillino A., Vannucci J., Bellezza G., Crinò L., Montanaro L., (2015). Dyskerin and TERC expression may condition survival in lung cancer patients. *Oncotarget.* **6(25)**:21755-60.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* **29**:2002-2007.
- Pfingsten J. S., Goodrich K. J., Taabazuing C., Ouenzar F., Chartrand P., Cech T. R., (2012). Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model. *Cell* **148**:922–932.
- Pryde F. E., Gorham H. C., Louis E. J., (1997). Chromosome ends: all the same under their caps. *Curr Opin Genet Dev.* **7(6)**:822-8.
- Qi X., Li Y., Honda S., Hoffmann S., Marz M., Mosig A., Podlevsky J. D., Stadler P. F., Selker E. U., Chen J. J., (2012). The common ancestral core of vertebrate and fungal telomerase RNAs. *Nucleic Acids Res.* **41(1)**:450-62.
- Rodgers D. W., Gamblin S. J., Harris B. A., Ray S., Culp J. S., Hellmig B., Woolf D. J., Debouck C., Harrison S. C., (1995). The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92(4)**:1222-6.
- Sánchez-Alonso P. and Guzmán P., (1998). Organization of chromosome ends in *Ustilago maydis*. RecQ-like helicase motifs at telomeric regions. *Genetics.* **148(3)**:1043-54.
- Sánchez Alonso, P., Valverde, M. E., Paredes-López O., and Guzmán P., (1996). Detection of genetic variation in *Ustilago maydis* strains by probes derived from telomeric sequences. *Microbiology,* **142**:2931-2936.
- Sandhu R., Wei D., Sharma M., Xu L., (2019). An N-terminal Flag-tag impairs TPP1 regulation of telomerase function. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*
- Schmidt JC, Cech TR. (2015). Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes Dev.* **29**:1095–1105.
- Schmitz K. M., Mayer C., Postepska A., Grummt I., (2010). Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. *Genes Dev.* **24(20)**:2264-9.
- Seto A. G., Zaug A. J., Sobel S. G., Wolin S. L., Cech T. R., (1999). *Saccharomyces*

cerevisiae telomerase is a Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* **401**:177–180.

Snow B. E., Erdmann N., Cruickshank J., Goldman H., Gill R. M., Robinson M. O. and Harrington, I., (2003). Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. *Curr. Biol*, **13**: 698-704.

Szostak J. W., Blackburn E. H., (1982). Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell*. **29(1)**:245-55.

Swapna G., Yu E. Y., Lue N. F., (2018). Single telomere length analysis in *Ustilago maydis*, a high-resolution tool for examining fungal telomere length distribution and C-strand 5'-end processing. *Microb Cell*. **5(9)**:393-403.

Taggart A. K., Teng S. C., Zakian V. A., (2012). Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science*. **297(5583)**:1023-6.

Teixeira M. T., Arneric M., Sperisen P., Lingner J., (2004). Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase -extendible and -nonextendible states. *Cell* **117**:323-335.

Teng S. C., Zakian V. A., (1999). Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**:8083-8093.

Tham W. H., Zakian V. A., (2002). Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: implications for other organisms. *Oncogene*, **21**:512-521.

Theimer C. A., and Feigon J., (2006). Structure and function of telomerase RNA. *Curr. Opin. Struct. Biol*, **16**:307-318.

Theimer C. A., Blois C. A. and Feigon J., (2005). Structure of the human telomerase RNA pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function. *Mol. Cell*, **17**: 671-682.

Tsukuda T., Carleton S., Fotheringham S., Holloman W. K., (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol*, **8**:3703-3709.

Rehmeyer C., Li W., Kusaba M., Kim Y. S., Brown D., Staben C., Dean R., Farman M., (2006). Organization of chromosome ends in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Nucleic Acids Res*. **34(17)**:4685-701.

Richards R. J., Theimer C. A., Finger L. D., Feigon J., (2006). Structure of the *Tetrahymena thermophila* telomerase RNA helix II template boundary element. *Nucleic Acids Res*. **34**:816–25.

- Royle N. J., (1995). The proterminal regions and telomeres of human chromosomes. *Adv Genet*, **32**:273-315.
- Sarthy J., Bae N. S., Scrafford J., Baumann P., (2009). Human RAP1 inhibits non-homologous end joining at telomeres. *EMBO J.* **28(21)**:3390-9.
- Sfeir A., Kabir S., van Overbeek M., Celli G. B., de Lange T., (2010). Loss of Rap1 induces telomere recombination in the absence of NHEJ or a DNA damage signal. *Science*, **327(5973)**:1657-61.
- Sfeir A., Kosiyatrakul S. T., Hockemeyer D., MacRae S. L., Karlseder J., Schildkraut C. L., de Lange T., (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell*, **138(1)**:90-103.
- Schmidt J. C., Cech T. R., (2015). Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes Dev.* **29(11)**:1095-105.
- Theimer C. A., Feigon J., (2006). Structure and function of telomerase RNA. *Curr Opin Struct Biol.* **16(3)**:307-18.
- Tomlinson R. L., Ziegler T. D., Supakorndej T., Terns R. M., Terns M. P., (2006). Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell*, **17**:955–965.
- Tomita K. 1. and Cooper J. P., (2008). Fission yeast Ccq1 is telomerase recruiter and local checkpoint controller. *Genes Dev.* **22(24)**:3461-74.
- Tsai M. C., Manor O., Wan Y., Mosammamarast N., Wang J. K., Lan F., Shi Y., Segal E., Chang H. Y., (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*. **329(5992)**:689-93.
- van Emden T. S., and Braun S., (2019). TASKs for subtelomeres: when nucleosome loss and genome instability are favored. *Curr Genet.* **65(5)**:1153-1160.
- van Steensel B., and de Lange T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**:740–743.
- Vaquero Vera A., (2003), Tesis Maestría.
- Veverka P., Janovic T. and Hufr C., (2019). Quantitative biology of human shelterin and telomerase: searching for the weakest point. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**:3186.
- Vladan P. Bajić V. P., Su B., Lee H. G., Kudo W., Siedlak S. L., Živković L., Spremo-Potparević B., Djelic N., Milicevic Z., Singh A. K., Fahmy L. M., Wang X., Smith M. A. and Zhu A. (2011). Mislocalization of cdk11/pitslre, a regulator of the G2/M phase of the cell cycle, in alzheimer disease. *Cell. Mol. Biol. Lett*, **16(3)**:359-372
- Walbot V. and Skibbe D. S., (2010). Maize host requirements for *Ustilago maydis*

tumor induction. *Sex Plant Reprod*, **23**:1-13.

Wang W., Ye R., Xin Y., Fang X., Li C., Shi H., Zhou X., and Qi Y., (2011). An importin β protein negatively regulates MicroRNA activity in Arabidopsis. *Plant Cell*. **23**(10):3565-76.

Weinrich S. L., RMa L. P, Ouellette M., Tesmer V. M., Holt S. E., Bodnar A. G., Lichtsteiner S., Kim N. W., Trager J. B., Taylor R. D., Carlos R., Andrews W. H., Wright W. E., Shay J. W., Harley C. B., Morin G. B., (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet*, **17**(4):498-502.

Wellinger R. J., Sen D., (1997). The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer*, **33**:735-749.

Wright W. E., Piatyszek M. A., Rainey W. E., Byrd W., Shay J. W., (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet*. **18**:173–179.

Wu R. A., Heather E. U., Jacob M. V., and Collins K., (2017). Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis. *Annu. Rev. Biochem*. **86**:439–60.

Wyatt H. D., West S. C., Beattie T. L., (2010). InTERT preting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res* **38**:5609-5622.

Yang C., Przyborski S., Cooke M. J., Zhang X., Stewart R., Anyfantis G., Atkinson S. P., Saretzki G., Armstrong L. and Lako M. (2008). A key role for telomerase reverse transcriptase unit in modulating human embryonic stem cell proliferation, cell cycle dynamics, and in vitro differentiation. *Stem Cells*, **26**, 850-863.

Yehezkel S., Rebibo-Sabbah A., Segev Y., Tzukerman M., Shaked R., Huber I., Gepstein L., Skorecki K. and Selig S. (2011). Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblast-like derivatives. *Epigenetics*, **6**:63-75.

Ye J., Renault V. M., Jamet K., Gilson E., (2014). Transcriptional outcome of telomere signalling. *Nat Rev Genet* **15**(7):491-503.

Ye J. Z., Donigian J. R., van Overbeek M., Loayza D., Luo Y., Krutchinsky A. N., Chait B. T., de Lange T., (2004). TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem*. **279**(45):47264-71.

Yu E. Y., Hsu M., Holloman W. K., Lue N. F., (2018). Contributions of recombination and repair proteins to telomere maintenance in telomerase-positive and negative *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*. **107**(1):81-93.

- Yu E.Y., Kojic M., Holloman W.K., and Lue N.F. (2013). Brh2 and Rad51 promote telomere maintenance in *Ustilago maydis*, a new model system of DNA repair proteins at telomeres. *DNA Repair (Amst)* **12**:472–479.
- Xie M., Podlevsky J. D., Qi X., Bley C. J., Chen J. J., (2010). A novel motif in telomerase reverse transcriptase regulates telomere repeat addition rate and processivity. *Nucleic Acids Res.* **38(6)**:1982-96.
- Xu Z., Duc K. D., Holcman D., Teixeira M. T., (2013). The length of the shortest telomere as the major determinant of the onset of replicative senescence. *Genetics* **194**:847-857.
- Zakian V. A., (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science* **270**:1601–1607.
- Zakian V. A., (1996): Structure, function, and replication of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Annu Rev Genet*, **30**:141-172.
- Zappulla D. C., Cech TR., (2004). Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101(27)**:10024-9.
- Zvereva M. I., Shcherbakova D. M., Dontsova O. A., (2010). Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc)*. **75(13)**:1563-83.