



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DE LA TELOMERASA EN
AGAVE TEQUILANA VAR. AZUL DURANTE SU
CRECIMIENTO EN CONDICIONES DE CAMPO DE UNO A
SEIS AÑOS DE EDAD**

Tesis que presenta

ZAMARIA YOSELIN DE LA TORRE ESPINOSA

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

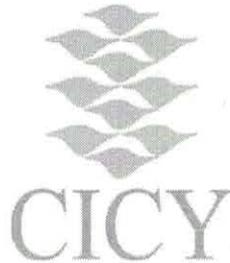
(Ciencias Biológicas: Biotecnología en Plantas)

Mérida, Yucatán, México

2020

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de Zamaria Yoselin de la Torre Espinosa, titulado "**Análisis de la actividad de la telomerasa en *Agave tequilana* var. Azul durante su crecimiento en condiciones de campo de uno a seis años de edad**" fue realizado en el Laboratorio de Marcadores Moleculares y Genómica Funcional de la Unidad de Biotecnología y en el Laboratorio 23 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Genómica y Biología Funcional de Plantas, bajo la dirección del Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer y Dr. Enrique Castaño de la Serna, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 20 de febrero de 2020.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:  _____

Nombre: Zamaria Yoselin De La Torre Espinosa

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada No. 242078 durante el periodo Enero 2014 - Diciembre 2018 para los estudios de doctorado y por financiar el proyecto Rejuvenecimiento mediante cultivo *in vitro*: *Agave* un modelo no. CB-2021-180757-Z.

Al Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer, por aceptar dirigir este trabajo de investigación, por permitirme ser libre de pensamiento y de ideas, por creer en mí y por darme todo lo que necesité durante toda mi formación académica.

Al Dr. Enrique Castaño de la Serna, por su tiempo, paciencia y dirección académica durante toda mi formación, por siempre atender mis mensajes desesperados y acudir siempre a cualquier situación adversa durante el desarrollo de este proyecto, porque a pesar de que sus métodos de enseñanza no sean convencionales, sin duda te prepara para ser una persona competitiva, nunca me equivoqué en pensar que tenía bastante que aprender de usted, por todo gracias.

A los doctores que formaron parte del comité tutorial, predoctoral y revisor de tesis: Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano, Dra. Blondy Canto Canché, Dr. Felipe Vázquez Flota, Dr. Juan Francisco Bremont, Dra. María Tamayo Ordóñez, el Dr. Manuel Martínez Estévez y Dr. Edwin Gallardo Gutiérrez, quienes con sus comentarios y observaciones ayudaron a mejorar el presente trabajo.

A los técnicos M en C. Adriana Quiroz Moreno, Ing. Wilma Aracely y M en C. Fabiola Escalante Erosa, por todo su apoyo técnico en el laboratorio durante el desarrollo de este trabajo; en especial a Adriana Quiroz, por su apoyo incondicional de forma técnica, académica y personal, gracias por compartir tu conocimiento y experiencia durante todos estos años, sin duda aprendí bastante, porque me diste lo más valioso que se puede llevar un estudiante de una institución, el conocimiento.

A mis compañeros del Laboratorio de Marcadores Moleculares, por toda la dirección y comentarios para decidir cuáles eran las mejores formas de dirigir el proyecto, por revisar los escritos, y su apoyo incondicional, muchas gracias por todo, me considero muy

afortunada de haber contado con compañeros de laboratorio tan unidos y proactivos, sin duda fui muy beneficiada por eso.

A mis compañeros del Laboratorio 24 de Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, por apoyarme en todo lo que necesitaba saber acerca de la parte bioquímica de mi proyecto, por su compañía durante las inmunizaciones.

Al Dr. Ignacio Islas Flores, por su capacitación en extracción de proteínas, por enseñarme las bases de cómo se tratan las proteínas, y mejorar en todos mis protocolos de investigación, por su retroalimentación académica que sin duda fueron cruciales para que se mejorara de manera positiva mi trabajo.

A la Dra. Eva Sykorova, por la dirección que me dio en el tema de telomerasas a nivel genético y proteico, por ayudarme con la estandarización del protocolo en agave y por sus recomendaciones durante todo el desarrollo del trabajo.

A la Dra. June Simpson, por permitirme realizar los análisis en la biblioteca transcriptómica tejido específica aún no publicada, por su ayuda en el aislamiento *in silico* del gen, por la retroalimentación académica acerca del desarrollo de *Agave tequilana* y por sus hermosas palabras motivacionales en la reunión que tuvimos durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Akram Sharim Méndez, Dr. Emanuel Avila de Dios y Dr. Peter Fijkus, por el asesoramiento en la parte bioinformática de mi trabajo, desde la identificación del gen *in silico*, en la búsqueda de copias del gen en el TSA y el modelado de proteínas.

A los doctores de la Unidad de Recursos Naturales, especialmente al Dr. Roger Orellana Lanza por el intercambio académico en aspectos botánicos del género *Agave*.

DEDICATORIAS

Dedicado a Félix Manuel de la Torre Jiménez, mi Padre, me hubiera encantado que este momento tan especial, pudieras ver lo que me tenía tan ocupada estos diez años. Tantos años de esfuerzo para por fin terminar y no estás, este trabajo te lo dedico a ti, porque después de tu sorpresiva ausencia, de que mi corazón se me partió en dos, aprender a trabajar con solo un cuarto de lo que era antes que te fueras, me tuve que aferrar con todo lo que pude para poder continuar, aferrarme a la idea de que éste era parte de lo que te llenaba de orgullo, todo lo que he hecho en mi vida era para y por los dos; MIS PADRES, los dos seres tan hermosos que me enseñaron la nobleza, la alegría, el amor, la felicidad, y la fortaleza, TODO lo que soy es por ustedes. Me duele que no estés para reír y llorar conmigo, pero más me duele no tener ese cálido abrazo que me das con cada medalla o título que colgamos en la pared, no escuchar tu voz con orgullo diciendo “esa es mi hija la más chiquita”, no esperarte para mi examen, no verte en navidad, ni en verano, no sentir tu mano en mi andar me tiene tan desconcertada, que he perdido la noción de mi presente. No te puedo prometer no llorar porque es inevitable, el día del padre, en tu cumpleaños, en las navidades, en tu aniversario luctuoso o cada vez que te extraño como loca, pero te prometo dar de mi lo mejor que pueda para llegar a ser la gran científica, tal cual me idealizaste todos estos años. TE AMO con todo mi corazón, un beso hasta el cielo, espero con todo mi corazón que la paz ya te haya encontrado, y la felicidad te esté abrazando muy fuerte. Espero que tu muy trágica muerte tenga como recompensa tu paz eterna.

Mamá, por toda la confianza que depositas en mí, por aceptar de la mejor manera la forma en la que estoy decidiendo conducirme y el sacrificio que haces, primero, al aceptar que tu hija esté fuera de su casa, que de antemano sé lo difícil que es para ti al tener otras costumbres tan diferentes a las actuales y, segundo, por el sacrificio que realizas al apoyarme económicamente con mi estancia fuera de mi estado de origen, gracias por enseñarme a ser fuerte, por enseñarme que no hay imposibles y dejarme volar al grado tal que con lo que me han dado hasta ahora, he alcanzado todas mis metas de vida, ser estricto es bueno mami, eso me ayudó a llegar acá, muchas gracias por todo, te amo infinitamente.

Mis hermanos Arcelia, Jose Alfonso, Carolina, por el apoyo siempre brindado en cada una de las etapas de mi vida, por educar a mis sobrinos a siempre esperarme, por darme esos nenes tan hermosos que quiero tanto, y por al igual que yo siempre ponerse muy contentos por cada meta de vida que voy obteniendo, los quiero.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS-----	v
INDICE DE TABLAS-----	vii
RESUMEN-----	1
ABSTRACT-----	3
INTRODUCCIÓN-----	1
CAPÍTULO I-----	4
ANTECEDENTES-----	4
1. EL TELÓMERO-----	4
1.1. Estructura y composición de los telómeros.....	4
1.2. Función de los telómeros.....	7
2. TELOMERASA-----	8
2.1. Estructura y función de la telomerasa.....	8
2.2. Actividad de la telomerasa en plantas.....	14
2.3. Estudios de la telomerasa en el género <i>Asparagales</i>	15
HIPOTESIS-----	17
OBJETIVO GENERAL-----	18
OBJETIVOS PARTICULARES-----	18
I. Determinar la función de la telomerasa durante el crecimiento de hoja en <i>A. tequilana</i> en plantas de uno a seis años.....	18
II. Identificar la secuencia nucleotídica y amonoácídica para la subunidad TERT en <i>A. tequilana</i>	18
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:-----	19
Diagrama general donde se muestra la estrategia la identificación de TERT y determinación de la actividad de la telomerasa en <i>Agave tequilana</i> -----	19
CAPÍTULO II-----	21
DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DE LA TELOMERASA EN HOJA DE AGAVE	

TEQUILANA VAR. AZUL DURANTE EL PERIODO VEGETATIVO EN CONDICIONES DE CAMPO-----	21
2.1. INTRODUCCIÓN-----	21
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS-----	23
2.2.1. Material vegetal.....	23
2.2.2. Histología -----	23
2.2.3. Ensayo de TRAP-----	24
2.2.4. Ensayo q-TRAP -----	25
2.2. RESULTADOS-----	26
2.2.1. Talla e histología de hoja por edad de la planta en 1-6 años.....	26
3.2.2. Actividad de la telomerasa durante el periodo vegetativo de hoja -----	29
2.3 DISCUSIÓN -----	34
cAPITULO III-----	39
CAPITULO III: Identificar la secuencia nucleotidica y amonoácidica para la subunidad TERT en <i>A. tequilana</i> -----	39
3.1. INTRODUCCION-----	39
3.2. MATERIAL Y METODOS -----	44
3.2.1. Aislamiento <i>in silico</i> y amplificación del Exón 9 de la secuencia TERT en <i>A. tequilana</i> (<i>AteqTERT</i>)-----	44
3.2.4. Ensayo de TRAP-----	45
3.2.5. Ensayo q-TRAP -----	46
3.2.7. Diseño de los péptidos-----	47
3.2.8. Detección de dilución del anticuerpo (Dot-Blot) -----	48
3.2.10. Western Blot-----	49
3.3. Resultados y discusión. -----	49
3.3.1. Identificación <i>in – silico</i> de TERT de <i>A. tequilana</i>	49

3.3.2. Análisis bioquímico de la secuencia AteqTERT	52
3.3.3. Identificación y diseño de anticuerpos de la subunidad TERT de <i>A. tequilana</i>	60
3.3.4. Actividad de telomerasa y expresión de TERT en una planta completa de <i>A. tequilana</i> de 2 años	62
3.4. Conclusión: -----	66
Capitulo IV-----	67
DISCUSIÓN GENERAL -----	67
CONCLUSIÓN GENERAL -----	71
PERSPECTIVAS -----	71
Referencias-----	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Interacción entre las proteínas de unión al telómero y el ADN telomérico en mamíferos.....	6
Figura 1.2. Estructura del ARN de la telomerasa en humanos.....	10
Figura 1.3.- Estructuración del Pseudoknot y sus motivos conservados.	11
Figura 1.4.Estructura 3D de TERT y sus dominios principales lineales.....	13
Figura 2.1. Planta de <i>A. tequilana</i> , demostración de largo y ancho de hoja media y estimación del area foliar.	25
Figura 2.2. Correccion lineal y análisis estadístico (ANOVA y Tukey comparativo) área foliar 1- 6 años de <i>A. tequilana</i>	26
Figura 2.3. Longitud y ancho de hoja media en plantas de <i>A. tequilana</i> con diferente edad.	27
Figura 2.4. Crecimiento, elongación y vascularización en hoja de <i>A. tequilana</i>	28
Figura 2.5. Estandarización del ensayo de TRAP en hojas de 1 año de edad en <i>A. tequilana</i>	30
Figura 2.6. Curva estándar de dilución de extracto precipitado TEX de 500 ng - 25 ng en meristemo TEX dilución	31
Figura 2.7. Analisis de TRAP cuantitativo en hoja media en la región IA, IB y EB de <i>A. tequilana</i>	32
Figura 2.8. Actividad de la telomerasa por TRAP assay e hoja media en plantas de <i>A. tequilana</i> de 1 – 6 años en la seccion IA.....	33
Figura 2.9. Actividad de telomerasa relativa de hoja 1 – 6 años en <i>A. tequilana</i>	34
Figura 3.1. Alineación de la secuencia de nucleótidos TERT.....	50
Figura 3.2. Identificación de nucleótidos, diseño de oligonucleótidos y amplificación por	

INDICE DE FIGURAS

PCR del exón 9 de la secuencia consenso de AteqTERT.....	51
Figura 3.3. Análisis de similitud de secuencia AteqTERT.	53
Figura 3.4. Identificación de los dominios específicos de TERT en la secuencia de aminoácidos AteqTERT	54
Figura 3.5. Modelado de la secuencia de aminoácidos de AteqTERT; los diferentes colores representan cada dominio de AteqTERT.....	56
Figura 3.6. Alineación e identificación de sitios de unión a ARN en el dominio TERB de la subunidad TERT.....	58
Figura 3.7. Identificación de la secuencia aminoácídica y el dominio RT de TERT en <i>A. tequilana</i>	61
Figura 3.8. Determinación de la sensibilidad del anticuerpo anti-ATER-3 y ATR-4 e identificación de TERT en extractos de <i>A.tequilana</i>	62
Figura 3. 9. Actividad y expresión de la telomerasa tisular específica en plantas completas de <i>A. tequilana</i> de 2 años de edad.....	63
Figura 3.10. Ensayo de actividad de telomerasa convencional.	65

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Variación de los motivos minisatélite de ADN telomérico y la longitud telomérica en diferentes organismos eucariotas. pb: pares de bases; kb: kilobases. N/D: no determinado. Modificado de (Greider 1990)..... 4

RESUMEN

La telomerasa es una enzima especializada encargada del mantenimiento y elongación de las regiones terminales de los cromosomas. En los últimos años, en mamíferos se ha observado que la telomerasa puede tener actividades no teloméricas enfocadas a los procesos de proliferación celular y ciclo celular. En el presente trabajo, utilizando métodos cuantitativos de actividad de telomerasa, morfología, histología y biblioteca transcricional TSA de *A. tequilana*, observamos que la actividad de la telomerasa durante el desarrollo vegetativo de la hoja media de *A. tequilana* está relacionada con los procesos de proliferación celular. Realizando el análisis de la expresión de TERT tejido específico, observamos que en meristemo hay una sobreexpresión de TERT, indicando que al estar expresado a la alta en un tejido donde hay muchas actividades celulares, puede que esta sobreexpresión sea producto de las actividades no teloméricas de la telomerasa.

ABSTRACT

Telomerase is a specialized enzyme responsible for the maintenance and elongation of the terminal regions of chromosomes. In recent years, in mammals, it has been observed that telomerase may have non-telomeric activities focused on the processes of cell proliferation and cell cycle. In the present work, using quantitative methods of telomerase activity, morphology, histology and TSA transcriptomic library of *A. tequilana*, we observed that telomerase activity during the vegetative development of the middle leaf of *A. tequilana* is more related to the processes of cell proliferation. By analyzing the expression of specific tissue TERT, we observed that in meristem there is an overexpression of TERT, indicating that when expressed in discharge in a tissue where there are many cellular activities, this overexpression may be the product of non-telomeric activities of telomerase.

INTRODUCCIÓN

Los telómeros, son regiones que se localizan y estabilizan en los extremos de los cromosomas eucariontes, están formadas por secuencias repetidas en tándem (minisatélites) y varias proteínas de unión específica a estas secuencias (Greider 1991); éstos presentan un único modo de replicación dado que la enzima ADN polimerasa (DNAPol) es incapaz de completar la síntesis del extremo 3' del ADN telomérico, por lo que se requiere una enzima especializada llamada telomerasa (Blackburn 1997).

La enzima ADN polimerasa (DNAPol) es una ribonucleoproteína que posee dos subunidades esenciales para su función catalítica. La primera es la ARN telomerasa llamada TER (**T**elomerase **R**NA, por sus siglas en inglés) y la segunda es un componente proteico que tiene actividad de transcriptasa reversa, denominada TERT (**T**elomerase **R**everse **T**ranscriptase, por sus siglas en inglés. TER contiene un templado (motivo repetido) que se une de manera específica al ADN telomérico (Greider and Blackburn 1985); mientras que TERT se encarga de sintetizar una copia de ADN telomérico a partir de TER (Greider and Blackburn 1987). Ambos componentes ayudan a mantener la integridad telomérica, elongando los extremos cromosómicos y estabilizando su longitud, y evitando así su acortamiento con cada ciclo de división celular (Wang and Blackburn 1997).

Según Blasco y colaboradores (1995 y 1997) la pérdida de función del gen que codifica para TERT en ratones, tiene efecto durante el crecimiento, y desarrollo del organismo, y su progenie. A partir de la sexta generación se observan pérdidas en la capacidad de proliferación celular, aberraciones cromosómicas, cariotipos anormales y en el caso de las hembras, el sistema reproductivo colapsado (Blasco *et al.*, 1996, 1997).

En mamíferos la actividad de la telomerasa ha sido ampliamente estudiada, y se sabe que dicha actividad está estrictamente regulada y es dependiente de la proliferación celular; esto se ha observado en células cancerígenas (Morales 2004; Liu 1999; Arvelo and Belair *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha observado que una actividad alta de la telomerasa mantiene la longitud telomérica, y mientras que la pérdida de su actividad provoca una disminución en la longitud de los telómeros, causando una erosión gradual de estas regiones, dando inicio a la senescencia celular hasta llegar a la apoptosis (Shawi and

INTRODUCCIÓN

Autexier 2008; Shammass *et al.*, 2005).

En plantas, la regulación de la telomerasa tiene que ser más flexible, debido a diversos factores ambientales que afectan la actividad de otras enzimas vitales (Ren *et al.*, 2004). Algunos autores reportan que la actividad de la telomerasa es tejido específica (Shippen and McKnight 1998; Fitzgerald *et al.*, 1996; Heller *et al.*, 1996a) por lo observado en diferentes especies como: *Nicotiana tabacco*, *Glycine max*, *Daucos carota*, *Brassica oleracea* var. *Bortritys*, *Zea mays*, *Hordem vulgare* y *Arabidopsis thaliana*; y es dependiente de proliferación celular, porque se encuentra mayormente representada en tejidos no diferenciados como los meristemos, o en procesos donde se induce la división celular (cultivos celulares de *Nicotiana tabacco*), ello sugiere que pueden llegar alcanzar la inmortalidad debido a que son células en división constante (Fitzgerald *et al.*, 1999). En contraste se ha observado baja actividad de la telomerasa en tejidos ya diferenciados como en hojas, anteras y raíz (Heller - Kilian, *et al.*, 1996b).

En plantas la correlación entre la longitud telomérica y actividad de la telomerasa no siempre se observa, existen reportes en la su mayoría de especies longevas como: *Ginko biloba*, *Pinus tabulaeformis* y *Panax ginseng*, (Liang *et al.*, 2015; Mu *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2011), y en cultivo *in vitro* de cebada (Killan *et al.*, 1998) que sugieren de la existencia de mecanismos alternativos que favorecen esta dinámica tal y como ocurre en otros organismos como; *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cervisiae* y *Tetrahymena termopila*. Entre estos mecanismos alternativos se dan una serie de procesos que prácticamente suplen la actividad de la telomerasa por completo, como en *Drosophila melanogaster* que utiliza un retrotransposón para mantener su longitud telomérica. Debido a ello, actualmente se tiene una serie de secuencias candidatas como son los genes ARN ribosomales, las secuencias ADN satélite posicionadas en regiones sub-teloméricas y los retroelementos (Ty1- copia) (Zeng *et al.*, 2011; Navajas-Pérez *et al.*, 2009; Fujiwara *et al.*, 2005) como los principales involucrados en los mecanismos alternativos del dinamismo en la longitud telomérica.

De acuerdo con lo reportado en *Agave tequilana* var. "Azul" (Rescalvo-Morales *et al.*, 2016) el dinamismo de la longitud telomérica en plantas *in vitro* (durante el proceso de organogénesis de las semanas 1 - 8), muestra un aumento gradual de la longitud cada semana. Asimismo, los autores reportan que en las planas con edad diferente crecidas

bajo condiciones de invernadero, la longitud telomérica es variable, en a los 6 meses de edad esta disminuida comparada con las plantas *in – vitro*. Además, hay un incremento de 6 meses a 1 año, y dicho incremento se mantiene de 1 – 3 años, y por último en las plantas de campo con edad de 1 – 6 años la longitud de sus regiones telomérica se mantiene entre los 25 kb. 31 kb.

Este trabajo está enfocado en realizar el análisis de la actividad de la telomerasa para entender el dinamismo en la actividad de esta enzima bajo condiciones de campo, para determinar si este es el único mecanismo responsable de la variabilidad de longitud de estas regiones, ya que como se sabe es el mecanismo mayormente utilizando en los organismos eucariontes.

En este trabajo se utilizó el método de Repetición Telomérica Cuantitativa Amplificada TRAP (q-TRAP), que mide la actividad de la enzima telomerasa, con el objetivo de entender si hay una relación directa entre la actividad y la longitud telomérica, o si se presenta otro tipo de mecanismo alternativo de restablecimiento telomérico como otras especies consideradas de ciclo de vida largo, debido a que en *Agave tequilana* se ha reportado que la mayor parte de su genoma está representado por retroelementos (Khaliq *et al.*, 2012; Bousios *et al.* 2007) y una familia ADN satélite clasificada en dos sub-familia localizadas en regiones teloméricas (Espinosa-Barrera *et al.* 2018).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. EL TELÓMERO

1.1. Estructura y composición de los telómeros

El telómero, es una estructura nucleoproteica especializada localizada en la región terminal de los cromosomas eucariontes. Esta nucleoproteína fue observada por primera vez por Hermann J. Muller en *Drosophila melanogaster* mediante estudios de citogenética clásicos en 1938. Años más tarde Barba McClintock (1941) utilizando como modelo a *Zea mays*, demostró que, la ausencia de estas estructuras provoca fusión de los extremos y ruptura del cromosoma. También demostró que la re-adquisición de esta estructura, restablece los daños generados por la falta de telómero concluyendo que desempeñan un papel crucial en la integridad de los cromosomas (McClintock 1941). Los telómeros son secuencias con motivos repetidos en tándem (ADN telomérico) y proteínas de unión específica al telómero (del inglés: telomeric binding protein, TBP) (Blasco 2005; Blackburn 2001; Riha *et al.*, 2001).

El motivo repetido telomérico y la longitud telomérica están considerados por diferentes autores que son especie específico así que son variables entre los diferentes grupos de organismos (Tabla 1).

Tabla 1.- Variación de los motivos minisatélite de ADN telomérico y la longitud telomérica en diferentes organismos eucariotas. pb: pares de bases; kb: kilobases. N/D: no determinado. Modificado de (Greider 1990).

Organismos	Motivo telomérico	Longitud promedio
<u>Ciliados</u>		
<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG	250 pb
<i>Paramecium</i>	TTGGGG/TTTGGG	100-500 pb
<i>Oxytricha</i>	TTTTGGGG	38 pb
<u>Flagelados</u>		
<i>Trypanosoma</i>	TTAGGG	2-7.5 kb
<u>Esporozoos</u>		

<i>Plasmodium</i>	TTTAGGG/TTCAGGGG	1.2-6.7 kb
<u>Levaduras</u>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TG ₁₋₃	350 pb
<i>Saccharomyces pombe</i>	T ₁₋₃ ACAG ₁₋₆	200-300 pb
<u>Algas</u>		
<i>Clamydomonas</i>	TTTTAGGG	300-350 pb
<u>Plantas</u>		
<i>Arabidopsis</i>	TTTAGGG	2-4 kb
<i>Asparagaceae</i>	TTAGGG	N/D
<i>Cestrum elegans</i>	TTTTTTAGGG	N/D
<u>Mamíferos</u>		
<i>Homo sapiens</i>	TTAGGG	10 kb

El ADN telomérico (ADNt) presenta una distribución asimétrica en el contenido de GC (guanina/citosina). Una de sus hebras es rica en guaninas (G) y está orientada en dirección de 5' al 3', denominada hebra “sobresaliente” o hebra G, es variable en los diferentes organismos y cada especie mantiene una longitud óptima de manera especie-específica (Blackburn 2001; Riha *et al.*, 2001). En el caso de los mamíferos, tienen una longitud aproximada de 60-100 nucleótidos (Phan 2010), presentando un alto grado de conservación, posiblemente se deba a la interacción que existe entre el ADN telomérico y una de las proteínas de unión específica al ADN (Lamb *et al.*, 2007).

En mamíferos, la hebra G y las TBP interactúan con el ADN telomérico de doble cadena para formar estructuras secundarias denominadas Bucle T (T-loop, en inglés) y Bucle D (D-loop, en inglés) mejor conocido como complejo shelterin (Fig.1.1) (Riha *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 1998; Longtine *et al.*, 1989) dando origen al “cap” que se encarga de proteger la integridad y estabilidad de los cromosoma (Sfeir and de Lange 2012; Zellinger and Riha 2007). El complejo shelterin se integra por seis proteínas: TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 y RAP1 (Fig.1.1) (De Lange 2005a; 2005b).

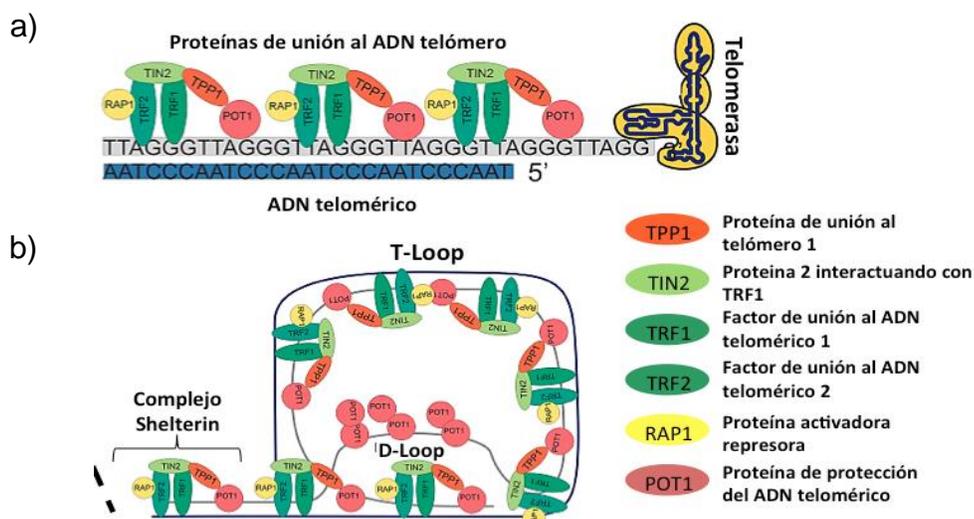


Figura 1.1.- Interacción entre las proteínas de unión al telómero y el ADN telomérico en mamíferos: a) Representación esquemática de la unión de la telomerasa al extremo 3' para la síntesis del ADN telomérico; b) Proteínas de unión al telómero y las estructuras secundarias (T-loop, D-loop y el complejo shelterin) en los extremos de los cromosomas (Imagen modificada de Robtsova, M.P. *et al.*, 2012).

Las proteínas TRF 1 y TRF2 (del inglés, Telomeric Repeat Binding Factor 1 y 2), presentan un dominio de interacción al ADN que les permite unirse de manera directa al ADN telomérico (Broccoli *et al.*, 1997, Van Steensel and de Lange 1997), y se sabe que pueden estar implicadas tanto en el mantenimiento de la longitud telomérica, como en la formación del complejo shelterin (Mattern *et al.*, 2004; Greider 1999; Broccoli *et al.*, 1997). TRF1 se une al ADN telomérico de doble cadena y TRF 2 se une ADNt de cadena sencilla (hebra "G") (Broccoli *et al.* 1997). TIN2 (del inglés, protein interacting TRF1 y 2) presenta dominios independientes que facilitan la interacción simultánea con TRF1, TRF2 (Kim *et al.*, 1999) y con el complejo TPP1-POT1, uniendo varios de los componentes del complejo shelterin (Hockemeyer *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Baumann and Cech 2001, Loayza and De Lange 2003). El dominio que se encuentra en la proteína TPP1 es específico para TIN2 y el dominio central de TIN2 es específico para la interacción con POT1, favoreciendo la unión del ADNt, formando parte del complejo que brinda protección al cromosoma (Frescas and de Lange 2014; Zhong *et al.*, 2012; Takai *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2003). La proteína TPP1 posee un domino que interacciona con la telomerasa y se

sugiere que TPP1 es quien dirige a la telomerasa hacia la hebra sobresaliente G para facilitar el reconocimiento del ADNt (Rajavel *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2011.). Por lo que proponen que TPP1 y POT1 están involucrados directamente en procesos de regulación de la actividad de la telomerasa (Hwang *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2011; Hockemeyer *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

En *Arabidopsis thaliana* se han caracterizado dos secuencias que son homologas a POT1, denominadas AtPOTa y AtPOTb tienen funciones diferentes; AtPOT1a, está asociado a la ribonucleoproteína (RNP) telomerasa y funciona como un regulador positivo en su actividad *in vitro* (Cifuentes-Rojas *et al.*, 2011). Mientras que AtPOT1b es requerido para interaccionar con las proteínas de unión al telómero y formar la “cap” en el cromosoma (Cifuentes-Rojas *et al.*, 2011). Así mismo, se han identificado diferentes proteínas con un dominio de afinidad al ADNt, denominado dominio Myb (Bilaud *et al.*, 1996); el cual se ha comprobado que interacciona con el ADN telomérico en diferentes especies, incluidas *Oryza sativa* (OsrTBP1), *Arabidopsis thaliana* (AtTBP1 y AtTBP2) (Zentgraf 1995, Kim *et al.* 1998, Marian *et al.* 2003) *Petoseelinium crispum* (PcMyb) y *Zea mays* (ZmTBP1) (Hofr *et al.* 2009).

En las plantas, a este complejo se le denomina “plant shelterin”, y aún se desconoce si las proteínas involucradas en su formación forma una estructura similar al complejo shelterin como se ha descrito en mamíferos (Schrumpfová *et al.*, 2008).

1.2. Función de los telómeros

La longitud de los telómeros puede determinar el número de divisiones que puede tener una célula, por lo cual, es utilizado como un marcador de la división celular (Harley 1991). En las células somáticas, los telómeros se acortan en cada proceso de división celular, hasta alcanzar una longitud mínima, la cual puede desencadenar la respuesta de daño al ADN, ocasionando la detención del ciclo celular (senescencia replicativa) (Rodriguez-Brenes and Peskin 2010; Shawi and Autexier 2008; Greider 1990, Yu *et al.*, 1990). El número de divisiones celulares que realice cada célula dependerá directamente de la longitud promedio de los telómeros de manera especie específica, por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* se necesita una longitud telomérica mínima de 1 Kb (Göhring *et al.*,

2014), mientras que en humanos la longitud mínima es 100 pb, y se ha sugerido que esta es la longitud mínima requerida para que se pueda formar las estructuras secundarias y por consiguiente las proteínas TRF1, TRF2, y todas las proteínas del complejo de shelterin (Capper *et al.*, 2007; Heacock *et al.*, 2004; Mattern *et al.* 2004;).

El mantenimiento de la integridad de los cromosomas es otra de las funciones principales de los telómeros, evitando que sus extremos se fusionen o sean degradados (Kazda *et al.*, 2012; McClintock 1941). En *Arabidopsis thaliana* la ausencia de la actividad de la telomerasa, provoca una disminución de la longitud de los telómeros, provocando fusión de los cromosomas, concluyendo que la actividad de la misma es necesaria para el mantenimiento y estabilidad del genoma en plantas (Riha *et al.*, 2001).

Las regiones teloméricas presentan un problema denominado “el problema de replicación”, en el cual la hebra rezagada (3'al 5') no es replicada completamente, provocando un acortamiento gradual del ADN telomérico. Una enzima que permite solucionar el “problema de replicación” es la telomerasa, que toma como molde la hebra sobresaliente y añade nucleótidos a partir de un cebador de ARN integrado a la enzima (Greider and Blackburn 1987; Olovnikov 1973).

2. TELOMERASA

2.1. Estructura y función de la telomerasa

La telomerasa es una ribonucleoproteína con actividad de transcriptasa inversa, la cual fue caracterizada en *Tetrahymena thermofila* (Greider and Blackburn 1987, 1989). Esta enzima está constituida por un componente proteico con actividad de transcriptasa reversa denominada TERT, con un tamaño aproximado de 127 KDA y un ARN de la telomerasa TER, con un tamaño aproximado de 153 KDA (Robtsova *et al.*, 2012).

TER contiene una región que actúa como molde para la síntesis de los telómeros (Sperger *et al.*, 2001; Antal *et al.*, 2002), y esta ha sido descrita en ciliados, levadura y algunos vertebrados (Podlevsky and Chen 2012; Zhang *et al.*, 2011; Blackburn and Collins 2011; Collins 2009; Theimer and Feigon 2006). Mientras que en plantas como *Arabidopsis thaliana*, aunque ya se ha logrado obtener la secuencia nucleotídica de TER

(Cifuentes-Rojas *et al.*, 2011), aun no sido reportada la función específica de cada uno de los componentes de TER en plantas. La secuencia de TER en plantas, ciliados y vertebrados, es poco conservada, pero TER tiene dominios que son los necesarios para que pueda realizar su función, que son los elementos estructurales (dominios) (Bhattacharya *et al.*, 1994; Sperger. 2001). TER está compuesta por los siguientes dominios: dominio con la región templada “RNA templete”, el Pseudoknot, los dominios de transactivación, y los dominios necesarios para garantizar la estabilidad *in vivo*. Los elementos que componen TER son importantes, debido a que son requeridos para la maduración y biogénesis del ARN, para el ensamble de la RNP, el trafico subcelular y por último en la regulación *in vivo* en la actividad de la telomerasa (Egan and Collins 2012).

El ARN templado de TER interactúa con la hebra “sobresaliente” G, y dirige la síntesis del ADN telomérico (Churikov and Price 2008). El templado TER esta flanqueado por dos elementos: el limite 5' y el limite 3' (Figura1.2), denominados elementos templados limitantes (template boundary element), debido a que se encuentran en la parte anterior y posterior al dominio ARN templado (Chen and Greider 2003). El limite 5' es una región compuesta por ADN de doble cadena, el cual se encarga de regular la estabilidad de los nucleótidos durante el proceso de síntesis del ADNt por TERT, por lo que se sigue que puede ser uno de los sitios de unión con TERT-TER, convirtiéndose en un elemento importante para el funcionamiento eficiente de la telomerasa (Liu *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2001; Greider and Blackburn 1985). El limite 3' es una estructura de cadena sencilla que estimula la actividad de la telomerasa, y le confiere la capacidad de añadir los nucleótidos al ADN templado, además de que el limite 3' contiene la unión N-terminal de TERT (Zhang *et al.*, 2011; Lai *et al.*, 2001; Mitchell and Collins 2000) .

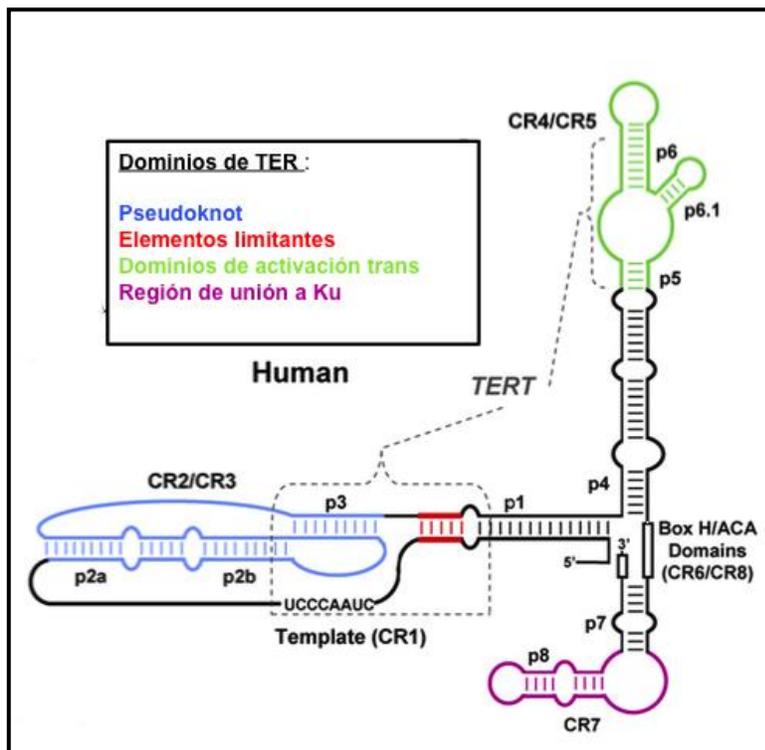


Figura 1.2.- Estructura del ARN de la telomerasa en humanos (hTER). pseudoknot (color azul); elementos limitantes (en rojo); dominios trans – activadores (en verde); región de unión a Ku (en rosa). Modificada de (Egan and Collins 2012)

El dominio pseudoknot es un elemento importante de la estructura de TER (Figura 1.2), y cambios en esta región resultan en una disminución en la actividad de la telomerasa (Gilley and Blackburn 1999). Se sugiere que el pseudoknot es necesario para la correcta orientación del duplex generado por la unión entre el motivo ARN templado y el sitio activo de la telomerasa (Blackburn & Collins 2011; Tzafati *et al.*, 2000;). Probablemente la viabilidad de la estructura de la telomerasa depende de dos conformaciones, el pseudoknot y stem-loop que son importantes para el funcionamiento de la telomerasa (Chen and Greider 2003). Un componente importante de este elemento es J2b/3, el cual forma un triplete de Hoogsenteen U*A*T (Fig. 1.3a) y un loop rico en uracilo, que dan lugar a una estructura stem-loop (P3) – J2b/3 (Figura 1.3b). Esta estructura facilita el mantenimiento, la integridad y la actividad de la telomerasa. Otro loop del elemento J2a/3 es rico en adenina (Figura 1.3a), el cual interactúa con los tripletes U*A*T de manera aleatoria, formando una estructura stem-loop (P3) – 2a/3 ayudando a la estabilización de

pseudoknot (Fig.1.3c) (Chen *et al.*, 2005). Por último el stem-loop formado con P3- P2b le brinda flexibilidad al ARN de la telomerasa durante los procesos de reconocimiento del motivo repetido y síntesis del ADNt (Chen and Greider 2003; Chen *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 1998).

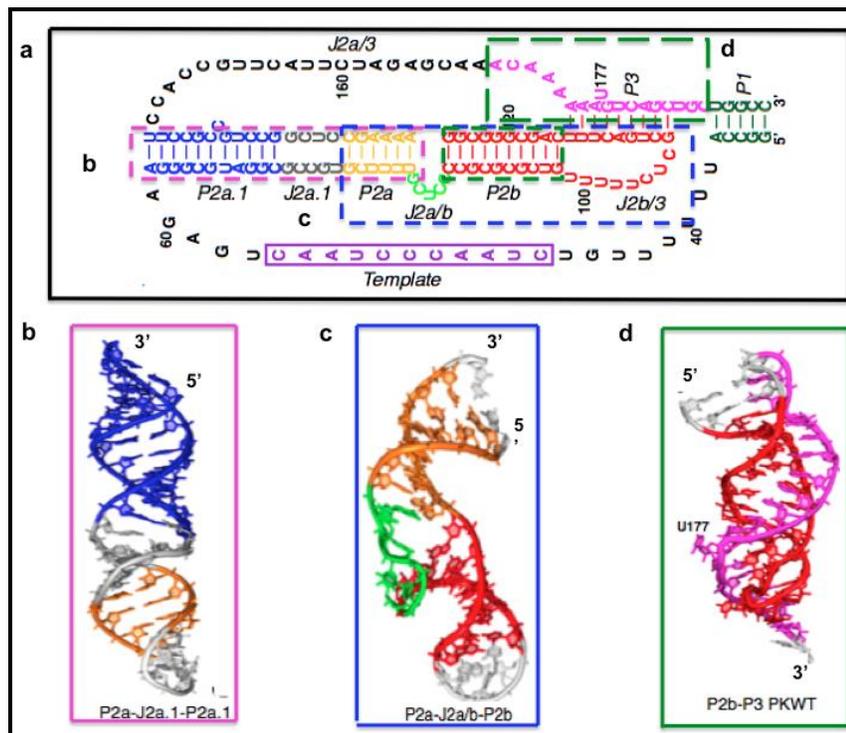


Figura 1.3.- Estructuración del Pseudoknot y sus motivos conservados; a) Motivos del ARN templado, Ja/3, P3, P1, P2a.1, P2, J a/b, P2b, J2b/3; b) Estructura 3D generada por la interacción de los motivos P2a-J2a.1-P2a.1; b) Estructura 3D de la interacción de los motivos P2a-Ja/b-P2b. c) Estructura 3D de la interacción de los motivos P2b-P3. Modificada de (Zhang *et al.* 2011).

Los dominios trans-activadores están formados por largos stem-loops, con loop asimétricos y nucleótidos simples, el cual consta de varias hélices estables (Figura 1.2) (Zhang *et al.*, 2011). Se sugiere que este dominio en humanos es importante para la formación correcta del pseudoknot, la adición de nucleótidos y el correcto procesamiento de la telomerasa durante la replicación e indispensable para el funcionamiento de la enzima (Chang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1998).

El dominio H/ACA (Figura 1.3), está presente en los RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs) y en los RNAs pequeños específicos de cuerpos cajal (scaRNAs) (Mitchell *et al.*, 1999). Este dominio se localiza en la región 3' terminal de TER en vertebrados, y está formado por una región de una sola cadena H-box (ANANNA en donde N es cualquier nucleótido), un stem-loop que contiene una caja CAB y una caja ACA en la hebra 3' terminal (Mitchell *et al.*, 1999; Collins and Gandhi 1998). Se ha observado en humanos que se requiere el dominio H/ACA para dar estabilidad al ARN de la telomerasa (Stern *et al.* 2012).

La subunidad catalítica TERT, es muy conservada en comparación con TER. Presenta cuatro dominios principales: el dominio de unión al ARN, conocido como TRBD (Figura 1.4). Este dominio a su vez se divide en los motivos RID 1 y RID 2 que son encargados de mantener la unión entre ambas subunidades en conjunto con otras proteínas de unión (Zhang *et al.*, 2011). Otro dominio es el de transcriptasa reversa, también conocido como dominio RT (transcriptase reverse) (Figura 1.4), con actividad catalítica, el dominio C-terminal (Azzalin *et al.*, 2007; Jacobs *et al.*, 2006;) (Figura 1.4) y el dominio N-terminal, denominado como dominio TEN (figura 4). Este último está involucrado en el proceso de unión facilitando la procesividad y la adición de nucleótidos al telómero (Ghosh *et al.*, 2012; Arkhipova I.R. *et al.*, 2003). La estructura primaria del dominio transcriptasa reversa presenta siete motivos conservados: 1, 2, A, B, C, D y E (Figura 1.4), los intrones de este dominio se denominan penelope – like (Zhang *et al.*, 2011).

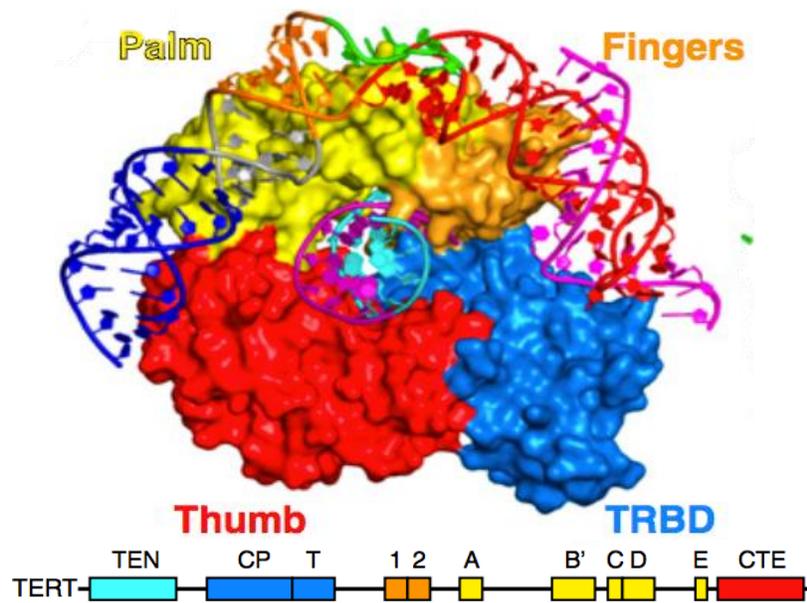


Figura 1.4.- Estructura 3D de TERT y sus dominios principales lineales; Azul turquesa – dominio N- terminal (TEN); azul – dominio de unión al ARN (TRBD); amarillo mostaza y amarillo – dominio transcriptasa reversa (RT), amarillo mostaza – motivos 1 y 2 formando el dominio dedos de inserción “insertion fingers domain” (IFD) del dominio RT, amarillo – motivos A,B’,C,D,E dominio palma de mano derecha “palm domain”; rojo – dominio C – terminal (CTE). Modificada de Zhang et al. 2011.

La telomerasa presenta varias funciones, dentro de las cuales se incluye el mantenimiento de la integridad telomérica, elongando los extremos cromosómicos, manteniendo y estabilizado la longitud telomérica, evitando el acortamiento del telómero. En este sentido diversos trabajos han correlacionado la disminución de la actividad de la telomerasa con el acortamiento de los telómeros y el aumento de la actividad de la telomerasa con el mantenimiento y elongación de los telómeros en diversos organismos, incluidas las plantas (Killan *et al.*, 1998; Fajkus *et al.*, 1996, 1998; Fitzgerald *et al.*, 1996,).

La ausencia de la telomerasa puede causar un acortamiento de los telómeros, seguido de la pérdida de la capacidad de proliferación celular, fusión de los cromosomas, y anomalías citogenéticas. En maíz, la deficiencia en la actividad de la telomerasa provoca que las plantas sobrevivan por cinco generaciones, y en la quinta generación se presenta esterilidad en las líneas germinales masculinas, seguido de un colapso total de su genoma (Lee *et al.*, 1998). En *Arabidopsis thaliana* la pérdida de la funcionalidad del

gen *AtTERT* que codifica para la subunidad catalítica de la telomerasa, afecta la capacidad de sobrevivencia, la cual puede culminar en el colapso del genoma (Lee and Blackburn 1993). En general la deficiencia de la telomerasa en estas especies provoca que se incrementen los niveles de daño citogenético y aumente hasta en un 40% la fusión de cromosomas (Riha *et al.*, 2001; Fitzgerald *et al.*, 1999).

2.2. Actividad de la telomerasa en plantas

En el caso de los mamíferos la actividad de la telomerasa es estrictamente regulada. Esta es mayor en tejidos que están en continúa división celular, mientras que los tejidos diferenciados como es el caso de tejidos epiteliales, hematopoyéticos, tejidos muscular presentan una menor actividad, sugiriendo que la actividad de la telomerasa es dependiente de la proliferación celular (Prowse *et al.* 1993; Piatyszek *et al.* 1995; Holt *et al.* 1997; Counter *et al.* 1998; Belair *et al.* 1998).

En plantas la actividad de la telomerasa es más flexible, debido a la plasticidad genética durante el desarrollo y la totipotencialidad que poseen algunas células vegetales. En cebada se observó que los tejidos de embriones y carpelos presentan mayor actividad de telomerasa, mientras que los tejidos más diferenciando como hoja y anteras la actividad de la telomerasa disminuía (Heller *et al.*, 1996c). Un estudio en soya mostró que existe mayor actividad de la telomerasa en meristemos, carpelos y raíz, pero una menor actividad en hoja y tallo (Fitzgerald *et al.*, 1996). En tomate y coliflor, se observó un comportamiento muy similar, en donde los tejidos menos diferenciados presentaban mayor actividad de la telomerasa, mientras que los tejidos diferenciados presentaron una baja o nula actividad (Shippen and McKnight 1998), por lo cual se ha propuesto que la actividad de la telomerasa es tejido específica, con cambios durante el desarrollo, por lo que se sugiere que la actividad de la telomerasa durante el proceso de diferenciación celular sea similar al de mamíferos, donde la actividad de la telomerasa en el proceso de diferenciación celular también es dependiente de la proliferación celular un fenómeno que ha sido mayormente observado en plantas consideradas de ciclo de vida corta (Chung *et al.* 2003; Killan *et al.*, 1998; Fajkus *et al.*, 1996, Fitzgerald *et al.*, 1996), recientemente se ha documentado que en *Ginkgo biloba* una especie considerada de ciclo de vida largo, la telomerasa no se relaciona con la longitud telomérica en plantas de diferentes edades sugiriendo que la actividad de la telomerasa era estacional dependiente.

En el proceso de cultivo *in vitro* hasta el momento se sabe, que en la sincronización de células en suspensión de *Nicotiana tabaccum*, existe una mayor actividad de la telomerasa durante la fase S del ciclo celular, y que durante el proceso de regeneración de las plántulas la actividad de la telomerasa es mantenida (Tamura *et al.*, 1999). Estos autores mencionan que la telomerasa puede mantener e incrementar la longitud telomérica, mediante una activación de esta enzima mediada por auxinas (Tamura *et al.*, 1999). Además, la actividad de la telomerasa y la relación con la longitud de los telómeros también ha sido observada en *Nicotiana tabacum*, en donde al inhibir o activar la telomerasa presenta diferencias en la longitud de los telómeros. De tal manera que cuando se inhibe la actividad de la telomerasa la longitud telomérica se reduce y en una actividad de la telomerasa no inhibida la longitud de los telómeros se mantenía, concluyendo que la telomerasa si es una enzima indispensable para mantener la longitud de los telómeros (Fijkus *et al.*, 1995).

La actividad de esta enzima es regulada por el estado celular, la diferenciación y desdiferenciación del tejido, así como la conformación compacta que pueden adoptar los telómeros, impidiendo el acceso de la enzima (Fajkus *et al.* 1998; Killan *et al.*, 1998; Fitzgerald *et al.*, 1996). En cuestión de actividad de la telomerasa y su correlación con la longitud telomérica en plantas consideradas de ciclo de vida largo en diferentes procesos de desarrollo, los factores que puedan alterar su actividad son poco conocidas por lo que todavía falta por aportar estudios, acerca de la correlación que existe en la actividad de la telomerasa y el dinamismo en la longitud telomérica.

2.3. Estudios de la telomerasa en el género *Asparagales*

Sycorova (2006) estudio y describió la subunidad TERT de la telomerasa en diferentes especies monocotiledóneas incluyendo a *Hosta rectifolia* (familia Asparagales). Mediante la amplificación del gen que codifica a esta proteína, el autor distinguió que la subunidad de TERT es conservada para especies monocotiledóneas. Así mismo, el análisis de TRAP utilizando el motivo repetido tipo humano y tipo *Arabidopsis* mostró que algunas especies pertenecientes a la familia *Asparagales* incluyendo al género *Agave* (Sýkorová *et al.*, 2006). Así mismo, se observó en *A. foucroydes*, por medio de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) muestra que el motivo telomérico es tipo humano (Roblert, M.L 2004), que telomerasa de este género sintetiza para telómeros tipo humano.

JUSTIFICACIÓN

En *A. tequilana* la longitud de los telómeros es tejido específico, y mantiene una longitud promedio entre 25 – 31 kb durante el desarrollo de órganos y tejidos. **Pero aún se desconoce si estos cambios en la longitud telomérica, es el reflejo de la dinámica de la actividad de la telomerasa en plantas bajo condiciones de campo y en condiciones *ex - vitro* en esta especie.** El comprender de que manera contribuye la telomerasa en la homeostasis de las regiones teloméricas en *A. tequilana* durante el desarrollo, permite describir cual es el mecanismo que esta involucrado en el mantenimiento telomérico durante la fase vegetativa en el desarrollo de esta especie.

Los estudios sobre la caracterización de TERT y TER ha puesto de manifiesto que se necesitan estos dos componentes para su estado activo, por lo tanto, el desarrollo de información molecular de esta enzima en *Agave tequilana* es importante para determinar si hay una correlación entre la expresión de la subunidad TERT y la actividad de esta enzima tejido-específica.

HIPOTESIS

Los cambios en la longitud telomérica (elongación y mantenimiento) en *Agave tequilana* son el resultado de los cambios en la actividad de la telomerasa, por lo tanto, es el mecanismo principal para la estabilidad en las regiones teloméricas. Si es posible esta relación; entre la longitud y la actividad, permitirá identificar el desarrollo de un marcador para determinación de edad o etapas de desarrollo en *A. tequilana*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad de la telomerasa tejido-específica de *Agave tequilana* bajo condiciones de campo durante el crecimiento de 1-6 años.

OBJETIVOS PARTICULARES

I. Determinar la función de la telomerasa durante el crecimiento de hoja en *A. tequilana* en plantas de uno a seis años.

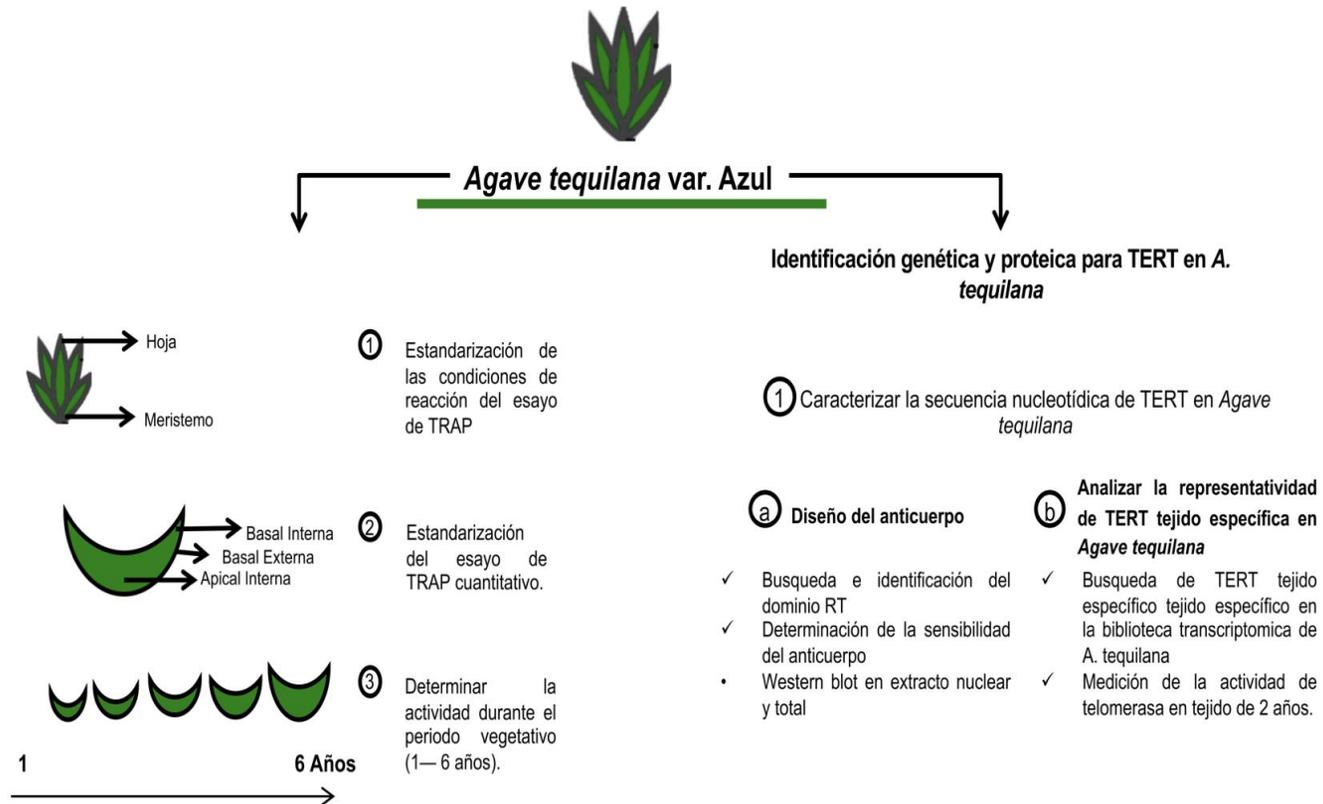
- Estandarizar el análisis de TRAP cualitativo y cuantitativo en *Agave tequilana*.
- Analizar la actividad de la telomerasa en diferentes tejidos durante el crecimiento de uno a tres años en plantas de *A. tequilana* bajo condiciones de campo
- Analizar la actividad de la telomerasa en hoja durante el crecimiento de uno a seis años en plantas de *A. tequilana* en condiciones de campo.

II. Identificar la secuencia nucleotídica y amonoácídica para la subunidad TERT en *A. tequilana*.

- Identificar y caracterizar la secuencia nucleotídica de TERT en *Agave tequilana*.
- Analizar la representatividad de TERT tejido-específica en la biblioteca transcricional en *Agave tequilana*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:

Diagrama general donde se muestra la estrategia la identificación de TERT y determinación de la actividad de la telomerasa en *Agave tequilana*



CAPÍTULO II

DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DE LA TELOMERASA EN HOJA DE AGAVE TEQUILANA VAR. AZUL DURANTE EL PERIODO VEGETATIVO EN CONDICIONES DE CAMPO

2.1. INTRODUCCIÓN

En plantas, al igual que en los humanos la actividad de telomerasa es dependiente de la proliferación celular, y se ha observado en diversas especies como; *Nicotiana tabacum*, *Glycine max*, *Daucus carota*, *Brassica oleracea*, *Zea may* y *Hordeum vulgare* (Fitzgerald *et al.*,1999; Fajkus *et. al.*,1996; Killan *et al.*,1998). Durante la repetición de los procesos de desdiferenciación y diferenciación celular, la actividad de la telomerasa mostró incrementar ligeramente en cada ronda regeneración, mientras la longitud telomérica permaneció estable durante ambos procesos, reflejando que existe mecanismo regulador de la telomerasa que puede compensar la pérdida replicativa del ADN telomérico (Fijkus *et al.*, 1998), así mismo, se determinó que la expresión de la telomerasa es dependiente de la concentración de reguladores de crecimiento, y las auxinas influyen en la fosforilación o desfosforilación del complejo de telomerasa, modulando la actividad de la telomerasa en el ciclo celular, y a su vez, dependiente del ciclo celular independientemente de la replicación del ADN, reflejando que la telomerasa esta regulada por ciclo celular durante el desarrollo de órganos y tejidos en células de tabacco BY-2 (Yang *et al.* 2002; Tamura *et al.*, 1996).

La plasticidad en plantas, requiere que la expresión de la telomerasa sea mas flexible, ya que las características de crecimiento y desarrollo dependen de cada especie. Hay especies que tienen ciclos de vida prolongados, por lo tanto, el desarrollo de sus tejidos puede llevar años (Procházková Schrupfová *et al.*,2019; González-García *et al.* 2015; Li y Gong 2011; Ren *et al.*, 2004;). La actividad de la telomerasa ha sido ampliamente estudiada en varias especies en plantas, sin embargo, el estudio en especies de ciclo de vida prolongados y desarrollo lento de tejidos es poco explorada, una de las limitantes sobre todo en árboles, es el acceso al material vegetal. Hasta el momento se han realizado estudios en hojas de *Gingko biloba* (Song *et al.*, 2011) y en needles de *Pinus longeva* (Flanary y Kletetschka 2005), muestran que la actividad de telomerasa depende del estado de crecimiento, es decir, dependiente de la proliferación y diferenciación

celular.

En nuestro grupo, hemos realizado recientemente diversos trabajos centrados en el estudio de la dinámica de la longitud de los telómeros en *A. tequilana* en condiciones de campo durante la edad (1-6 años de edad), donde se observó que la longitud de los telómeros se mantiene en un rango de 25 hasta 31 kb (Rescalvo-Morales *et al.*,2019). Además, en un estudio en diferentes tejidos (hojas, tallos, y raíces) analizados en *A. tequilana* y *A. fourcroydes* de uno a tres años en condiciones de invernadero. Se observó un comportamiento similar a las plantas de campo, independientemente de la especie y el tejido analizados (Rescalvo-Morales *et al.*,2016), lo que refleja que el mantenimiento de la longitud telomérica del tejido en *A. tequilana* y *A. fourcroydes* es necesario para el correcto desarrollo.

Agave tequilana var. *Azul* es una especie social y económicamente importante para la industria de México, ya que se utiliza para la fabricación de una bebida para producir tequila. *A. tequilana*, es una especie perenne (Little and Gentry 2006), monocárpica, con un ciclo de vida prolongado de aproximadamente de ocho años, el período vegetativo es de entre los seis a siete años, posteriormente inicia la fase sexual, el desarrollo de sus hojas es en roseta y permanecen durante la mayor parte del ciclo de vida (Little y Gentry 2006; Valenzuela 2011). Una de las características principales del género *Agave* y otras especies CAM es la succulencia de sus hojas, compuestas de células mesofílicas no diferenciadas con vacuolas agrandadas (Winter *et al.*, 2015; Dodd *et al.*, 2002). Las vacuolas agrandadas son esenciales en el almacenamiento de agua e inician el alargamiento celular, incrementando el tamaño de las células mesofílicas y el grosor de la hoja (Elizabeth A. Nelson; Tammy L. Sage; Rowan F.Sage. 2005).

La formación de los paquetes vasculares y células mesofílicas implican procesos de elongación, diferenciación y división activa, que estimulan el aumento de talla en la planta. Debido a esto, tomamos la hoja de *A.tequilana* como modelo para evaluar la morfología, los componentes celulares del tejido y la actividad de la telomerasa, utilizando TRAP cuantitativa (qTRAP, protocolo de amplificación de repetición de telomerasa cuantitativa) durante el desarrollo de la hoja en *A. tequilana* (1 – 6 años) en condiciones de campo,

para encontrar cuál es la participación de la telomerasa durante su crecimiento y si los cambios estructurales a través de su desarrollo están relacionados con el patrón de actividad relativa de la telomerasa.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal

Las plantas (*A. tequilana*) se colectaron en la hacienda "Mayapan" ubicada en Valladolid, Yucatán. Recolectamos la hoja media (ML) de plantas (Figura 2.1a) con diferentes edades de 1 a 6 años de tres plantas diferentes (réplicas biológicas). Se caracterizó el material utilizado para el ensayo de TRAP, evaluando la longitud (Figura 2.1b) y el ancho (Figura 1.5a) de la hoja. El material de la hoja se dividió en tres secciones diferentes, interna apical (IA), interna basal (IB) y externa apical (EA), siguiendo la caracterización de Palomíno et al., (2004) que reporta diferencias citológicas, utilizando para este estudio la región IA que es la que contiene mayor número de células en G2, en plantas de 1 a 6 años. Durante el transporte, el material vegetal se mantuvo a bajas temperaturas para evitar cambios en cualquier actividad y después se almacenó a -80°C.

El análisis estadístico de las medidas obtenidas de longitud y ancho de hoja en plantas de 1-6 años (Figura 2.1), se realizó aplicando un análisis de varianza ANOVA y Tukey, para longitud (Figura 2.1a) y ancho (Figura 1.2b), de hoja en el software Rstudio y los resultados fueron graficados en GraphPad Prism versión 6.0 (SIENTEC).

También se determinó el área foliar multiplicando la longitud por el ancho de la hoja, un método que es comúnmente utilizado para determinar la dimensión aproximada de tejido foliar en otras especies.

2.2.2. Histología

Tejido de hoja de plantas de 1 a 6 años se fijaron en FAA [formaldehído al 10% / ácido acético al 5% / etanol al 50% / agua destilada al 35%] durante 5 días, luego se deshidrataron a través de series graduales de etanol (30%, 50%, 70%, 85% y 96%). %, e incrustado en resina plástica (JB-4 Glycol Metacrilato; PolyScience, Warrington PA).

Los tejidos se seccionaron a un grosor de 3 a 5 μm y se tiñeron con azul de metileno

(M9140) como describen Pérez-Núñez et al. (2006), analizado en el microscopio Zeiss Axioplan 2 Upright light/ Fluorescence (especificación) y capturado las imágenes mediante el software AxioVision 4.8 y analizadas en objetivo 20 y 100 μm .

2.2.3. Ensayo de TRAP

Para el ensayo de actividad de la telomerasa (TRAP), los extractos de proteínas se prepararon como se describió anteriormente en Fitzgerald et al. 1990 y Sykorova et al. 2003. En resumen, se molieron 200 mg de tejido de la hoja en mortero con nitrógeno líquido, se re-suspendieron en 200 μl de tampón W [50 Tris-Ac mM, pH 7,5 / 5 mM MgCl_2 / glutamato de potasio 100 mM / EGTA 20 mM / PVP-40 al 1,5% / glicerol al 10% / PSMF 0,1 mM / DTT 1 mM / complejo de ribonucleótidos de vanadilo (SIGMA®)], y Centrifugaron 17.500 x g durante 15 min. Después de eso, las proteínas se precipitaron con PEG-8000 agregado a una concentración final del 10%, se mezclaron durante 30 minutos a 4 °C y se centrifugaron a 17.500 x g durante 5 minutos. El sedimento se re-suspendió en 20 μl de tampón W, se mezcló durante 30 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación, la concentración de proteína total se determinó en la fracción soluble del extracto de proteína enriquecido en telomerasa (TEX) con el método de Bradford (referencia).

El ensayo de TRAP convencional se realizó utilizando extractos de telomerasa que contenían 100 ng de proteína total mezclada con 1 μl de cebador de sustrato 10 μM (cebador TS21: 5'- GAC AAT CCG TCG AGC AGA GTT - 3', Fitzgerald et al. 1996), en 46 μl de amortiguador TRAP (Fitzgerald et al. 1996). Se incubó a 26 ° C durante 45 minutos (paso de elongación). Después de la etapa de elongación, la telomerasa se inactivó a 95 ° C durante 10 minutos y las muestras se enfriaron a 80 ° C (inicio en caliente). La etapa de amplificación de la PCR comenzó al agregar una mezcla que contiene 1 μl de 10 μM de cebador inverso (HUTPR: 5'- CCG AAT TCA ACC CTA AAA CCC TAA ACC CTA AAC CCC - 3', Sykorova et al. 2006) y 2 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen®), la mezcla de reacción se sometió a amplificación por 35 ciclos de 95 ° C / 30 s, 65 ° C / 30 s, 72 ° C / 30 s, seguido de una extensión final a 72 ° C / 5 min. Los productos TRAP se ejecutaron en PAGE al 12,5% en 0,5 TBE y se tiñeron con Syber safe® 1x; Los geles fueron escaneados por un GelDoc (modelo). Se utilizó el ensayo TRAP convencional para evaluar la actividad de la telomerasa en todas las muestras antes de evaluar en qTRAP

2.2.4. Ensayo q-TRAP

La medición cuantitativa de la actividad de la telomerasa se realizó utilizando la mezcla maestra SYBR Green Master (Applied Biosystems), TS21 y TELPR (la concentración de cada cebador en la mezcla de reacción fue de 0.25 μ M). Después de la etapa de extensión (45 minutos a 26 ° C) y la inactivación enzimática (15 minutos a 95 ° C), los productos de extensión se amplificaron en 30 ciclos de 30 segundos a 95 ° C, 60 segundos a 60 ° C (al final de este paso, se midió la fluorescencia). Para la determinación de la curva estándar, se utilizaron diluciones que contenían 500 ng, 200 ng, 100ng, 50ng y 25 ng de proteína total en 1 μ l de TEX de meristemo apical tejido con división celular activa, cada dilución se realizó por triplicado.

Para el testigo positivo de actividad de telomerasa se utilizó tejido meristemático a una concentración 100 ng de TEX en plantas de 1 a 3 años y en tejido de hoja (IA) a 100 ng en plantas de 1 – 6 años. El ensayo qTRAP se analizó por PCR en tiempo real Rotor-Gene 3000 (Qiagen) software 2.1.0.9. Los valores de Ct y la actividad telomerasa relativa se calcularon mediante el método delta-delta Ct, la normalización sigue el método Pffafl 2004 utilizando el control negativo en la curva estándar y el tejido de la hoja que se normalizó tanto con el control positivo (meristema) como con el control negativo (tampón w). La evaluación estadística se realizó con GraphPad Prism versión 6.0 (empresa).

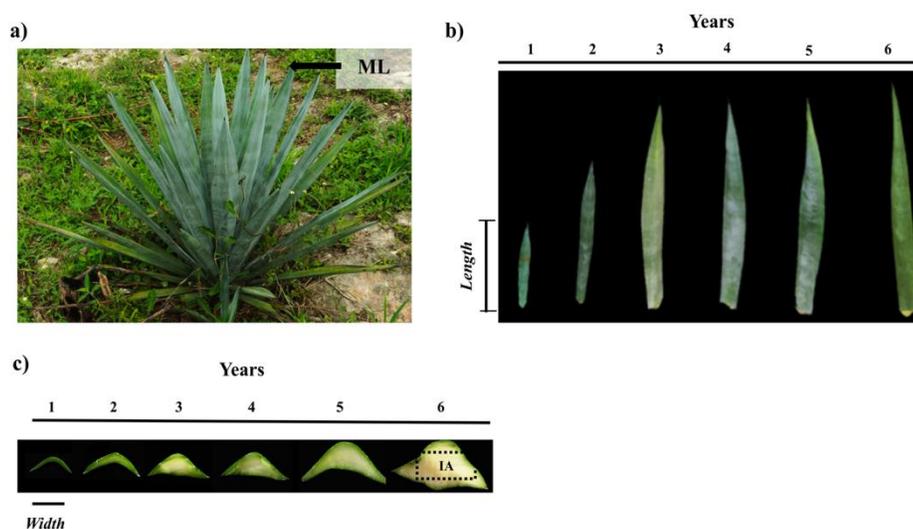


Figura 2.1.-Planta de *A. tequilana*, demostración de largo y ancho de hoja

media y estimación del área foliar; a) planta de 3 años de edad de *A. tequilana* y la posición de la hoja con la que se trabajó en este estudio en diferentes edades, b – c) representación de la hoja media de 1 – 6 años b) largo, y c) ancho.

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Talla e histología de hoja por edad de la planta en 1-6 años

Previo al análisis de la actividad de la telomerasa, se describió el material recolectado en plantas de *A. tequilana* de 1 a 6 años con el objetivo caracterizar el material vegetal tomando en cuenta la talla y los componentes celulares tejido específico en hoja. El análisis del área foliar en hojas mostró un incremento total de 4.5 veces durante el periodo de 1-6 años, con una fuerte correlación entre la edad y el área foliar durante el periodo vegetativo (1-6 años, R^2 : 0.90) (Figura 2.2a).

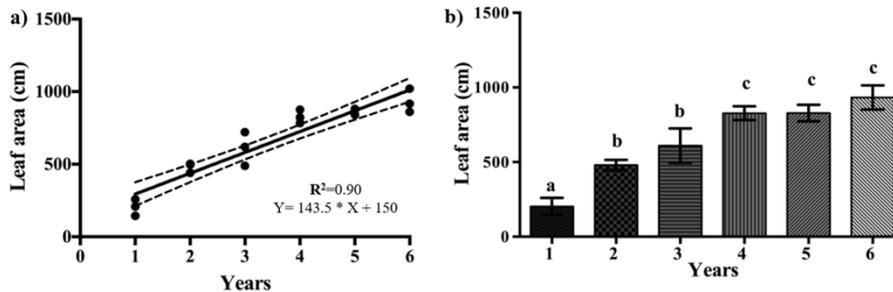


Figura 2.2. Corrección lineal y análisis estadístico (ANOVA y Tukey comparativo) área foliar 1- 6 años de *A. tequilana*; a) correlación lineal de área foliar, con un valor de $R^2 = 0.90$, mostrando un incremento en el área foliar con respecto a la edad, b) ANOVA y Tukey comparativo por edad de área foliar, Pvalue = 0.0001***, 1 – 2 años = 0.0043**, 2 – 3 años no significativo (ns), 3 – 4 años = 0.0242*.

Se realizó la comparación del tamaño de la hoja, en longitud (Figura 2.2a) y ancho de hoja en plantas de diferentes edades (Figura 2.2b). Observamos un aumento de 2.5 veces en el tamaño de la longitud y 1.8 veces en el ancho de 1-6 años. Además, determinamos que el tamaño de la longitud de la hoja aumentó entre las plantas de 1 y 2 años, las de 2 y 3 años y las de 3 y 4 años (75, 18 y 14%, respectivamente), el aumento del tamaño del ancho de la hoja fue de 39, 5 y 19%, respectivamente. El análisis de los datos en tamaño muestra que el aumento de la hoja se produce durante los primeros cuatro años de

desarrollo en condiciones de campo, y de 5 a 6 años el crecimiento es lento obteniendo un aumento de 7% para longitud (Figura 2.3a) y 1% para ancho (Figura 2.3b).

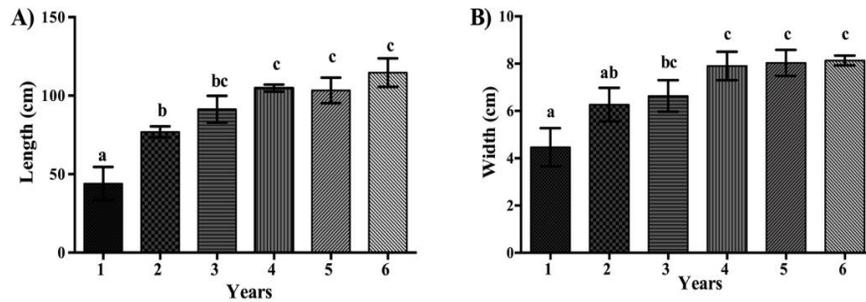


Figura 2.3.- Longitud y ancho de hoja media en plantas de *A. tequilana* con diferente edad.- a) gráfico que muestra el análisis estadístico de la longitud de hoja media a diferentes edades (1 a 6 años) la hoja con diferentes edades, observando que hay crecimiento de la hoja de 1 a 2 años, y de 3 a 4 años, b) gráfico que muestra el análisis estadístico de ancho de hoja media a diferentes edades (1 a 6 años) la hoja con diferentes edades, observando que hay crecimiento de la hoja de 1 a 4 años y diferencias significativa de 3 a 4 años.

Analizando la composición celular en los tejidos, obtuvimos que las células de mesófilo esponjoso (cabeza de flecha roja) y haces vasculares (cabeza de flecha negra) incrementan su talla de 1-6 años (Figura 2.4 a–l), en el corte transversal de 1 y 2 años, las células alrededor de los haces vasculares tienen un tamaño aproximado de 20-25 μm , y se observan las células que se encuentran localizadas en la epidermis de hoja (cabeza de flecha amarilla, Figura 2.4 a–b). En 3 años se observa un incremento en la talla de 1.5 veces mayor en comparación con 1 – 2 años, las células mesófilicas tienen un tamaño aproximado de 30-45 μm . En 4-5 años, el tamaño de las células del mesófilo incrementa a un tamaño de 40-45 μm (Figura 2.4 d–e). En tejido de 6 años el espacio intracelular del mesófilo incrementó notablemente a un tamaño aproximado de a 40-60 μm (Figura 2.4f).

Los haces vasculares o haces de fibra compuestos por xilema (x), floema (ph), xilema primario (xp), capa de fibra primaria (p.f.c) y capa de fibra secundaria (s.f.c) están marcados con cabeza de flecha negra (Figura 2.4i). En 1 y 2 años se observó la mayor cantidad de haces vasculares con tamaños heterogéneos (pero con mayor frecuencia de menor talla) (Figura 2.4 a-b). Para 3 años hay elongación y formación de haces

vasculares inmaduros (id) (cabeza de flecha gris) (Figura 2.4c). En 4–5 años, se observa que se siguen formando haces vasculares inmaduros, y hay elongación, pero el incremento de la talla es moderado. En 6 años, la mayoría son haces vasculares maduros, por lo tanto, ya se logran definir todos los conductos de un haz vascular mostrado en el corte longitudinal (Figura 2.4 l) a 20 μm , se observan totalmente elongados, principalmente en la capa de fibra primaria (p.f.c) y secundaria (s.f.c) (Figura 2.4 i).

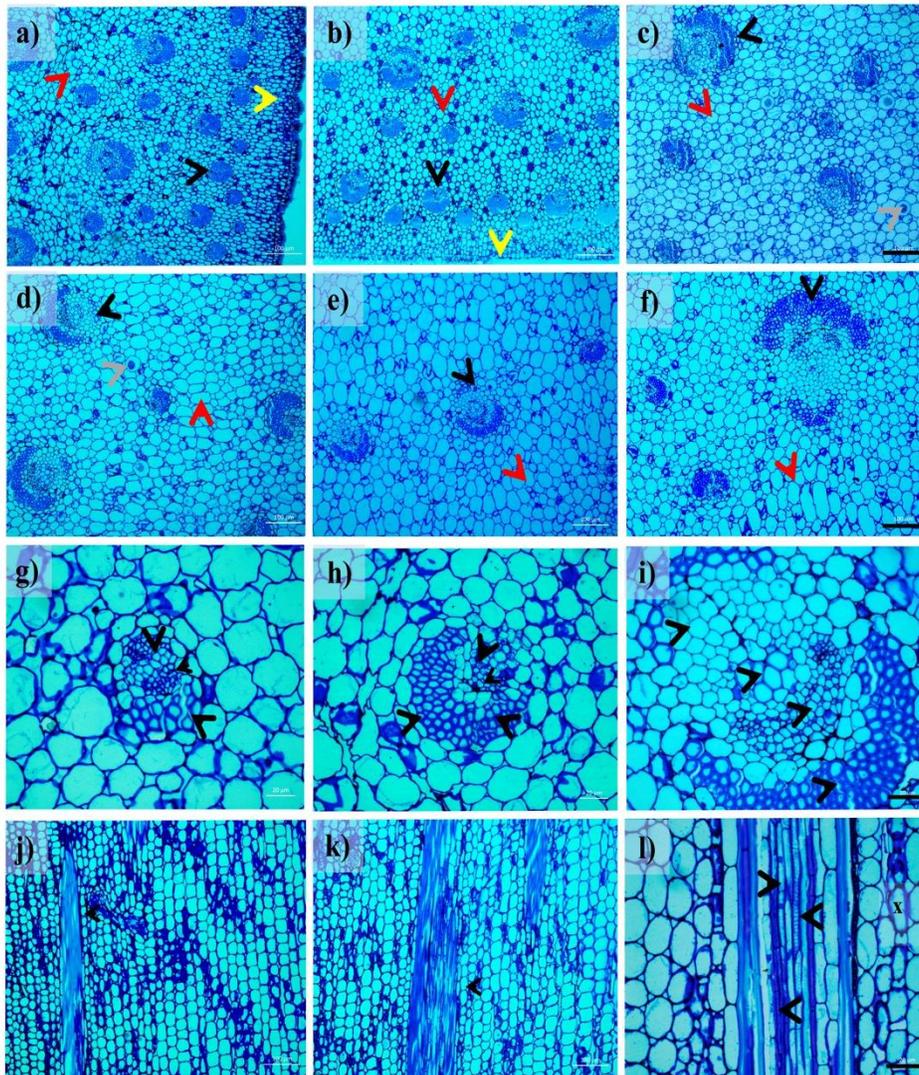


Figura 2.4. Cecimiento, elongación y vascularización en hoja de *A. tequilana*; cortes abaxiales de 1-6 años 100 μm de la región IA de hoja, a – b) muestra 1 – 2 años abundancia de haces vasculares (marcados con

cabeza de flecha negra), c) en 3 años, generación de nuevos haces vasculares (marcados con cabeza de flecha gris), inicio de elongación de las células del mesófilo esponjoso (marcado con cabeza de flecha roja) y cuerpos vasculares, d – f) 4 y 5 años, continua el incremento del espacio intracelular de las células del mesofilo esponjoso, g) 6 años, incremento del haz vascular y espacio intracelular de células de mesófilo; corte transversal a $20\ \mu\text{m}$, h) haz vascular de 1 año desarrollado, de tamaño pequeño, (marcado con cabeza de flecha negra), i) formación de nuevo haz vascular 3 años, (marcado con cabeza de flecha negra) j) haz vascular maduro 6 años; corte longitudinal a $100\ \mu\text{m}$, 1, 3 y 6 años k) 1 año, se observa como las células que componen el haz vascular aun no están compartimentalizadas, l) 3 años, el haz vascular comienza a diferenciar las células del haz vascular, m) diferenciación de todas las células que componen el haz vascular el tejido continua en un continuo crecimiento, elongación y vascularización de su tejido (marcados con cabeza de flecha negra).

Este análisis mostró que el crecimiento en hoja de *A. tequilana* es continuo pero le toma un periodo de aproximadamente 6 años en desarrollar sus componentes celulares para la formación del tejido interno en sus hojas.

3.2.2. Actividad de la telomerasa durante el periodo vegetativo de hoja

Para determinar la actividad de la telomerasa en hojas de *A. tequilana*, se realizó la estandarización del análisis de TRAP, se establecieron las condiciones de reacción para las etapas de; elongación y amplificación, se establecieron las condiciones de electroforesis vertical, así mismo se estableció el protocolo de extracto nuclear de actividad, y el método cuantitativo de actividad.

Una vez estandarizadas estas condiciones, se procedió a caracterizar el material vegetal en hoja media, basal y central. Como testigo positivo se utilizó puntas de raíz de *A. tequilana* y puntas de raíz de *Hosta racnifolia*, una planta de orden *Asparagales* (Figura 2.5a) con 200 - 50ng de extracto nuclear TEX. No se observaron diferencias significativas entre hoja media, basal y central, por lo que se procedió a trabajar con hoja media. De acuerdo a la caracterización citológica de hoja joven y adulta de Palomino, muestra que la región basal interna, presenta el mayor número de células en G_0 , y que la región apical interna presentaba más variación en el número de células en G_2 , por lo tanto decidimos evaluar las regiones apical interna (AI), basal interna (IB), basal externa (EB), con 200ng y 50ng de extracto nuclear TEX. Utilizando como testigo positivo meristemo de *A. tequilana* (Figura 2.5b). Se observó que la actividad es mayor en la región apical interna (AI), por lo tanto, se decidió trabajar con la región apical interna (IA), para medir la actividad en hojas

de diferente edad. Finalmente se realizó por duplicado para observar que el patrón de fragmentos obtenido y el análisis de TRAP era estable para *A. tequilana*.

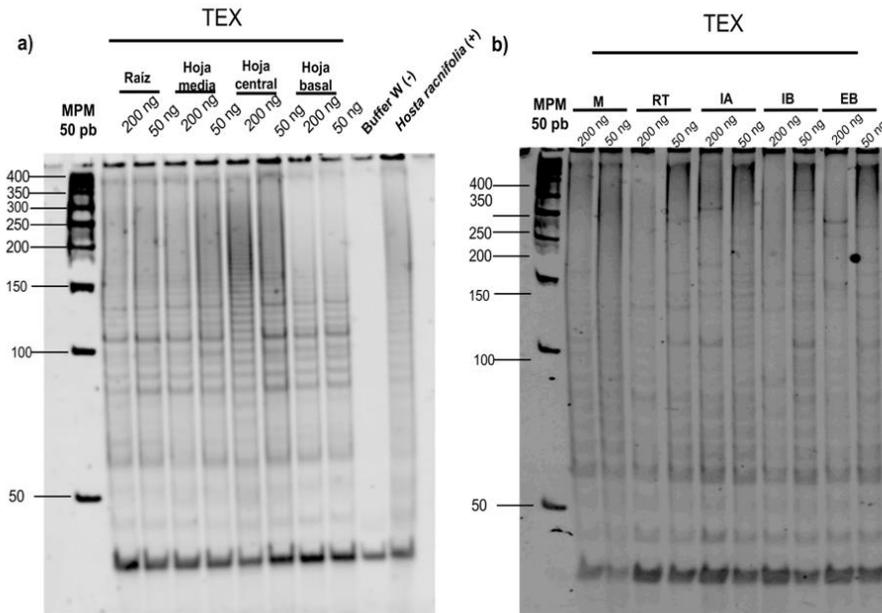


Figura 2.5.-Estandrización del ensayo de TRAP en hojas de 1 año de edad en *A. tequilana*; a) TRAP de hoja media, basal y central, mostrando el mismo patrón de fragmentos generados como testigo positivo se utilizó puntas de raíz de *Hosta racifolia* y testigo negativo el buffer W, b) TRAP de las regiones apical interna (AI), basal interna (IB) de hoja media, como testigo positivo se utilizó puntas de raíz de *A. tequilana* y meristemo, mostrando que se observa diferencia en el patrón de fragmentos entre las diferentes regiones analizadas, c) TRAP por duplicado biológico de la región AI, utilizando como testigo positivo meristemo de *A. tequilana*, 1.- extracto crudo 200ng, 2.- extracto crudo 50ng, 3.- TEX 200ng, 4.- TEX 50 ng.

Para determinar la eficiencia de amplificación, se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de extracto precipitado de meristemo (TEX) 500 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, se graficó el valor de Ct con las diferentes concentraciones con un valor $R^2= 0.97$ (Figura 2.6a), indicando que el valor de Ct es directamente proporcional a la concentración de extracto utilizado en reacción (Figura 2.6b).

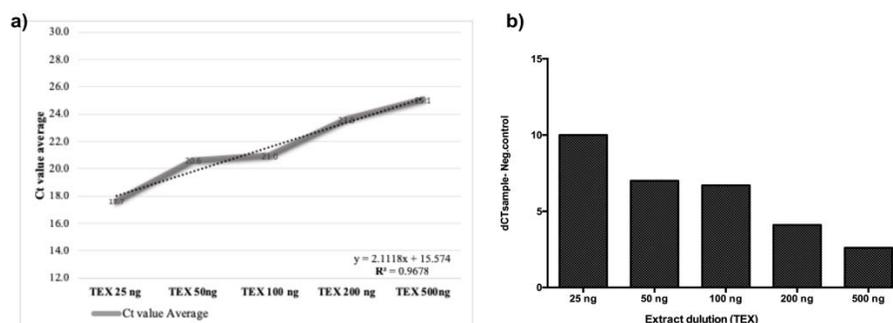


Figura 2.6.- Curva estándar de dilución de extracto precipitado TEX de 500 ng - 25 ng en meristemo TEX dilución (25 ng, 50ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng; a) Regresión gráfica lineal con un valor de $R^2 = 0,97$, b) actividad relativa de telomerasa normalizado, la actividad es proporcional a la concentración de extracto TEX

Posteriormente se determino la actividad por tiempo real, de la hoja media, basal y central (Figura 2.7a), y no se observaron diferencias significativas entre hoja media, basal y central. Por lo que se decidio trabajar con hoja media. Asi mismo se hizo la cuantificación de actividad en las diferentes regiones de la hoja AI, IB, EB, y no se observaron diferencias significativas en estas regiones (Figura 2.7b). Por lo tanto se procedio a evaluar la región AI, en hoja media, durante todo su desarrollo, porque la región AI en la caracterización morfológica e histológica es la que incrementa con respecto a la edad y la hoja media es la posición de la hoja que se mantiene durante todo el desarrollo de *A.tequilana*.

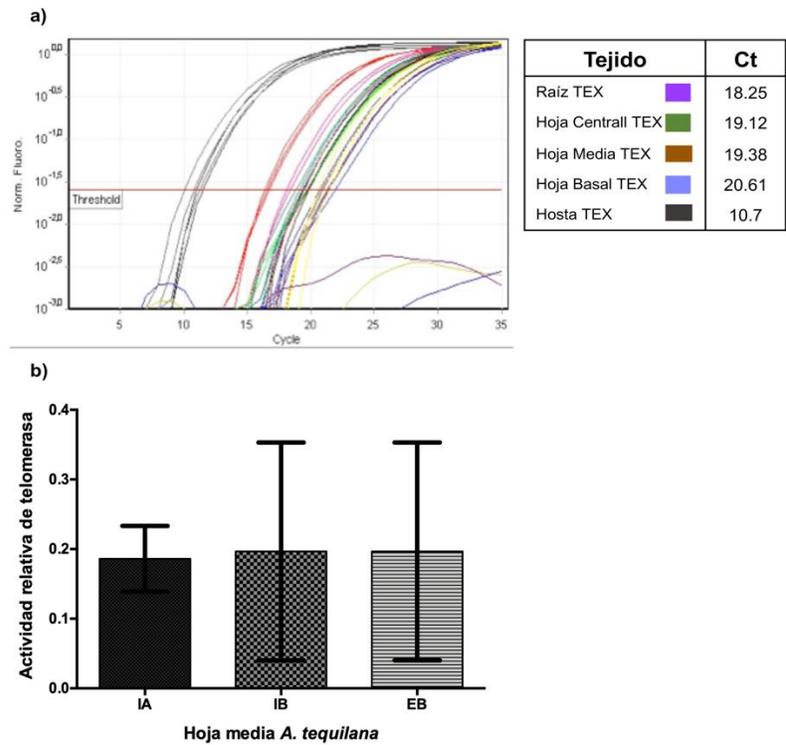


Figura 2.7.- Analisis de TRAP cuantitativo en hoja media en la región IA, IB y EB de *A. tequilana*; a) TRAP cuantitativo de hoja central, media y basal, muestra que no hay diferencias significativas en actividad entre las diferentes posiciones de la hoja, b) TRAP cuantitativo de cada las regiones de la hoja, apical interna (IA), basal interna (IB) y basal externa (EB), muestra que no hay diferencias significativas entre cada una de las regiones.

Utilizando el ensayo TRAP observamos que el patrón esperado de los productos TRAP se generó en todas las muestras de IA, por lo que la telomerasa es activa en todos los extractos de plantas de 1 a 6 años (Fig. 2.8).

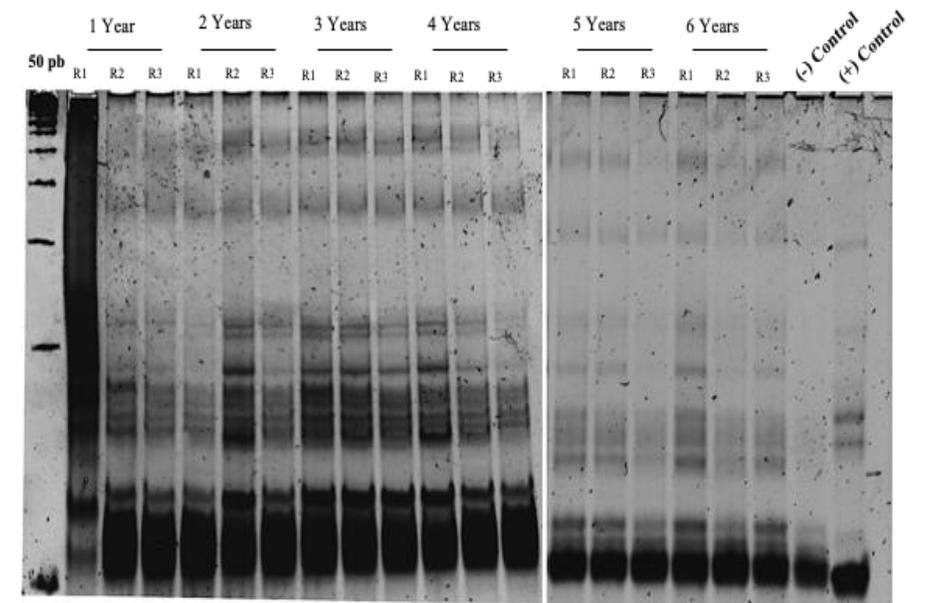


Figura 2.8.- Actividad de la telomerasa por TRAP assay e hoja media en plantas de *A. tequilana* de 1 – 6 años en la sección IA.- Separación de fragmentos generados y amplificados utilizando 100 ng de extracto de precipitado TEX en acrilamida al 12,5% teñido con syber safe® (1x) sigma con réplicas biológicas R1, R2 y R3, tampón de control negativo (-) W y precipitado de control positivo (+) extracto de tejido meristem TEX.

En la cuantificación de actividad de la telomerasa en hoja de 1 a 6 años, la telomerasa es detectada a la alta para todas las edades con cambios en la actividad durante el periodo vegetativo, con una diferencia significativa mayor a $P < 0.0001$ en hojas de 3-4 y de 5-6 años, la actividad relativa mas alta detectada fue para 3 y 6 años con respecto a las otras edades analizadas, observando un patrón de aumento de actividad de cada 3 años (Figura 2.9). Así mismo, se observó que durante el desarrollo en la fase vegetativa en hoja de 1 a 3 años, la actividad relativa de telomerasa es proporcional al incremento de la edad de la planta con valores de $ddCt = 0.049, 0.025, 0.014$ respectivamente.

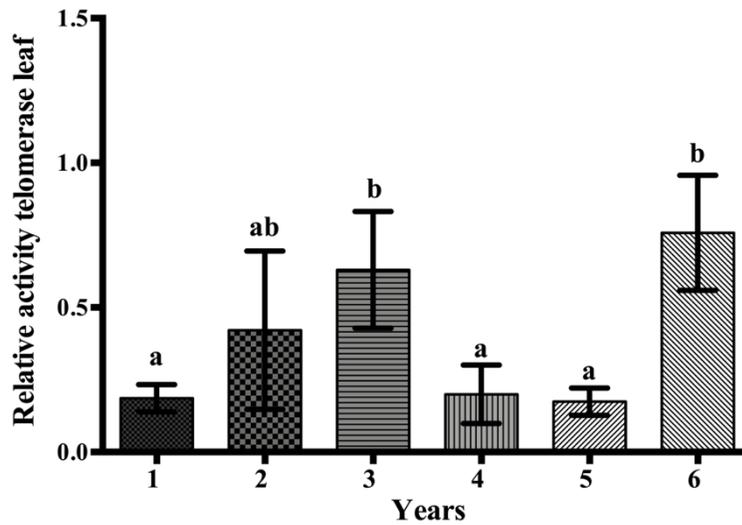


Figura 2.9.- Actividad de telomerasa relativa de hoja 1 – 6 años en *A. tequilana*; se observa actividad de telomerasa detectable en hoja en todas las edades analizadas, el análisis estadísticos ANOVA y Tukey comparativo muestra un valor de $p < 0.0001$ *** .

2.3 DISCUSIÓN

En este reporte, mediante los estudios morfológicos y de actividad de la telomerasa observamos que durante el crecimiento de la hoja, la talla de la hoja incrementa con respecto a la edad de la planta y esta se relaciona con los cambios estructurales observados en la región apical interna durante el periodo vegetativo en plantas con diferente edad (1-6 años) en *A. tequilana*. En el análisis de la actividad de la telomerasa para todas las edades analizadas, no hay diferencia en la actividad relativa de la telomerasa en la normalización con tejido meristemático (control de actividad positivo), por lo tanto, la actividad de telomerasa se determinó en todas las edades analizadas. Sýkorová demostró previamente que la telomerasa es activa para especies del género *Agave* (Sýkorová *et al.*, 2006), pero no hubo informes previos de su relación con la edad y el desarrollo de tejidos. Rescalvo -Morales informa que durante este período vegetativo en plantas en condiciones de campo (1-6 años), la longitud telomérica se mantuvo durante la edad en *A. tequilana*. En otras especies también se ha observado el mantenimiento telomérico durante el desarrollo del tejido como en *Melandrium album*, que determinan actividad detectable o alta actividad, sugiriendo que la actividad de la telomerasa contribuye al mantenimiento de los telómeros y de esta manera logra la estabilidad genética de los tejidos durante el crecimiento para que el tejido se desarrolle

satisfactoriamente (Riha *et al.*, 2007). Asimismo, se ha determinado en es especies de ciclo de vida prolongado, que el mantenimiento telomérico es necesario para mantener la vida útil como en, *Pinus aristata*, *Pinus monticola*, *Pinus resinous*, *Pinus taeda*, *Pinus palustris* (Flanary y Kletetschka 2005), *Pinus tabulaeformis* (Mu *et al.*,2015), *Gingko biloba* (Song *et al.*,2010). Al observar el mantenimiento de los telómeros en las regiones de la hoja de *A. tequilana* y de alta representatividad de la telomerasa en todas las edades, podemos sugerir la telomerasa en una hoja media de uno – seis años, contribuye al mantenimiento de las regiones teloméricas en *A. tequilana* durante el crecimiento en condiciones de campo.

Sin embargo, durante el desarrollo de la planta, la plasticidad y las características específicas de crecimiento presentan variabilidad considerable en la activación de la telomerasa a lo largo del crecimiento en los órganos y tejidos, específicamente en especies con un ciclo de vida prolongado (Flanary y Kletetschka 2005). En este sentido, se han realizado estudios de la actividad de la telomerasa en el tejido de la hoja en especies con ciclos de vida cortos mostrando niveles bajos o indetectables de telomerasa (Fitzgerald, McKnight y Shippen, 1996; Heller *et al.*, 1996) y por el contrario, en *Gingko Biloba* se ha observado que la actividad de la telomerasa en hojas es alta solo en las primeras etapas de crecimiento e indetectable al final de su ciclo (Song *et al.*, 2011), lo que refleja que la actividad de la telomerasa puede depender del estado de crecimiento de la hoja, a lo que ellos llamaron estacional – dependiente. Así mismo, se ha demostrado que la pérdida de la función TERT (*AtTERT^{-/-}*) en *A. thaliana* provoca, además del acortamiento telomérico, se altera el crecimiento de la raíz a partir de la quinta generación (G5), indicando nuevamente que el mantenimiento de la longitud telomérica y la actividad de la telomerasa son necesarias para mantener un correcto crecimiento de la raíz en la planta (González-García *et al.*, 2015). Interesantemente en este trabajo también reportan que hay una disminución en el número de células con división activa (González-García *et al.* 2015) y en otros trabajos se ha demostrado que en células con telómeros extremadamente cortos, la telomerasa activa mantiene una división constante evitando el proceso de senescencia celular (Heacock *et al.*, 2007), lo que sugiere que la célula necesita telomerasa activa y una longitud estable del telómero para mantener la división celular. Nosotros observamos en la caracterización morfológica que durante el crecimiento de la hoja de *A. tequilana* hay dos fases; la primera fase es la de elongación

de células mesofilicas y formación de haces vasculares en el tejido IA en 3 años de edad (Figura 2.4c) y la segunda es la fase de elongación de células mesofilicas y la diferenciación de haces vasculares en el tejido IA a los 6 años de edad (Figura 2.4 I), durante estas fases de transición en el crecimiento, la actividad de la telomerasa incrementa también en tres y seis años de edad, lo que pareciera indicar que la telomerasa durante el periodo de crecimiento de la hoja en *A. tequilana* está más relacionada a los cambios tisulares observados durante el desarrollo de la hoja, por lo tanto sugerimos que la actividad de la telomerasa está asociada con los procesos de proliferación celular durante su período vegetativo de las hojas, que hasta ahora en las plantas ha sido poco explorado.

Durante el incremento de la talla en hojas CAM, se involucran múltiples procesos como división activa, elongación y diferenciación celular (Gonzalez 2010), en *A. thaliana* se ha demostrado que cualquier perturbación en el mecanismo molecular que controla a estos procesos afecta el tamaño final de los órganos y tejidos (Horguchi *et al.*, 2006; 2005), e.g. para el tejido de hoja en *A. thaliana* la sobreexpresión de los genes de transcripción que dirigen el crecimiento (GRF5) y los genes encargados del transporte de auxinas (AVP1) incrementan el área foliar en un 15 y 30% respectivamente en la longitud y un 25-24% respectivamente en ancho de la hoja (González *et al.*, 2015). Existe una serie de evidencia que refleja la importancia de las auxinas en los procesos de división y elongación celular, en líneas celulares de tabaco VBI-0 se determinó que 2,4-D promueve la división celular y ANA participa en los procesos de elongación celular. La actividad de la telomerasa en líneas celulares de tabaco BY-2 es dosis dependiente de la concentración de auxinas específicamente a 2,4-D, y durante los procesos de diferenciación y dediferenciación, muestran cambios en la actividad de la telomerasa se relacionan con los cambios dramáticos en las tasas de división celular, mientras que la longitud telomérica permanece estable en ambos procesos, sugiriendo la existencia de un mecanismo regulador de la telomerasa en células vegetales que compensa la pérdida replicativa del ADN telomérico y de esta manera proveer la estabilidad genómica en la célula (Fijkus *et al.*, 1998). Por lo tanto, durante el desarrollo, es necesario el mantenimiento de la longitud telomérica, a su vez, también se muestran que es importante mantener telomerasa activa en la célula, para mantener la división y la diferenciación durante el crecimiento de órganos y tejidos, reflejando que el correcto crecimiento de los

tejidos requiere una compleja interacción entre diferentes señalizaciones moleculares que se encargan de dirigir el desarrollo de una manera adecuada.

El conocer y entender como se encuentran las regiones teloméricas, como son reguladas, si hay mecanismos alternativos que ayudan a mantener la estabilidad genómica durante su desarrollo, es es una cuestión importante a entender, puesto que en el género *Agave*, tiene una diversidad de especies poliploides, de las cuales se desconoce la longitud de sus regiones teloméricas, si son mantenidas durante su desarrollo, si la telomerasa esta involucrada en el mantenimiento de estas regiones, o si por la complejidad de su genoma tenga otros mecanismos que también estén participando en la homeostasis de estas regiones, tal y como se observó en *Arabidopsis thaliana*, donde hay mecanismos alternativos que ayudan al restablecimiento de la longitud telomérica, por la inestabilidad genómica resultado de la mutante con telomerasa negativa *TERT*^{-/-} (Fijkus 2004).

CAPITULO III

CAPITULO III: IDENTIFICAR LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA Y AMONOÁCIDICA PARA LA SUBUNIDAD TERT EN A. TEQUILANA

3.1. INTRODUCCION

La telomerasa, es una enzima especializada a la que se le atribuido como función principal el mantenimiento y la elongación de la longitud telomérica, representa una de las soluciones al problema de la replicación, que se deriva de la incapacidad de la polimerasa en completar la síntesis del extremo 5' de la hebra rezagada del ADN, también se ha documentado que la telomerasa puede tener dos roles o modos de acción diferentes como; la unión a las secuencias teloméricas para el alargamiento telomérico, y la unión a secuencias no teloméricas para "reparación" de roturas cromosómicas produciendo telómeros del *novus*, observado por primera vez por Bárbara McClintock en cromosomas de maíz. La telomerasa es una ribonucleoproteína que requiere al menos dos subunidades para su función *in vivo* que son; el componente aminoácido, la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) subunidad que tiene la capacidad catalítica y el RNA de la telomerasa (TER) que contiene el motivo templado para el reconocimiento del ADN telomérico especie específico (Churikov and Price 2008), debido a que es un complejo ribonucleico, requiere que las interacciones aminoácidas y nucleotídica entre cada uno de sus componentes sea estable.

El templado TER, es una de las subunidades que tiene poca conservación en la secuencia nucleotídica pero se sabe, que tiene regiones que son mínimas necesarias para su función *in vivo* como los elementos límite 5' y 3' que flanquean el RNA templado (Chen and Greider 2003). El límite 5' se encarga de regular la estabilidad de los nucleótidos durante el proceso de síntesis del ADNt por TERT, por lo que se sigue que podría ser uno de los sitios de unión con TERT-TER, convirtiéndose en un elemento importante para el funcionamiento eficiente de la telomerasa (Liu *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2001; Greider and Blackburn 1985). El límite 3' es una estructura de cadena sencilla que estimula la actividad de la telomerasa, y le confiere la capacidad de añadir los nucleótidos al ADN templado, además de que el límite 3' contiene la unión N-terminal de TERT (Zhang *et al.*, 2011; Lai *et al.*, 2001; Mitchell and Collins 2000), el pseudoknot es un elemento que es importante en la estructura de TER, los cambios en esta región provocan

la disminución en la actividad de la telomerasa (Gilley and Blackburn 1999). Se ha sugerido, que el pseudonknot es necesario para la correcta orientación del duplex ya que genera la unión entre el motivo ARN templado y el sitio activo de la telomerasa (Blackburn & Collins 2011; Tzafatiet *et al.*, 2000), por lo tanto se cree que la viabilidad de la estructura en el RNA de la telomerasa depende de dos conformaciones, en el pseudonknot y stem-loop (Chen and Greider 2003). Dentro de los componentes principales del pseudonknot, se ha elucidado en humanos son los elementos J2b/3 y J2a/3, el elemento J2b/3 forma un triplete de Hoogsenteen U*A*T y un loop rico en uracilo, que dan lugar a una estructura stem-loop (P3) – J2b/3, lo que facilita el mantenimiento, la integridad y la actividad de la telomerasa, y el elemento J2a/3 es rico en adenina, el cual interactúa con los tripletes U*A*T de manera aleatoria, formando una estructura stem-loop (P3) – 2a/3 que ayuda a la estabilización de pseudoknot (Chen *et al.*, 2005), adicionalmente, las estructuras stem – loop formadas con P3 – P2b, le brindan la flexibilidad al ARN de la telomerasa durante los procesos de reconocimiento del motivo repetido y síntesis del ADNt (Chen and Greider 2003; Chen *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 1998). Actualmente, la elucidación de la estructura cristalizada de telomerasa en estado, en *Tetrahymena termophila* y *Homo sapiens*, nos permitió entender como sucede la interacción de cada una de las regiones de TER en TERT y la funcionalidad de los elementos en estado activo, lo primero que se observó en que la estructura cristalizada de *Homo sapiens* es que presenta una región P6 mas alargada en comparación con la de *Tetrahymena termophila* en las cuales uno de estos tallos no muestra interacciones RNA-proteína o RNA – RNA, así mismo se observó que la región P6.1, al igual que la región SL4 tienen un rol similar durante la interacción RNA – proteína que es la inserción en la interface entre el dominio TRBD y CTE. En *Tetrahymena termophila* se logró entender como es que cada uno de los elementos del RNA de la telomerasa interactúa con TERT para que la proteína sea activa, uno de los datos mas interesantes es que se mostró como el dominio TER t/pk en contacto con TERT formando un círculo cerrado que es llevado a cabo por el tallo 1 envolviendo al anillo TERT, quedando uno de los elementos límite de la región monocaténaria en la parte frontal del anillo y el pseudoknot en la parte posterior sobre el dominio CTE actuando como un acoplador molecular para mantener unido a el complejo. En humanos, se sugiere que esta región es importante para la formación correcta del pseudonknot, la adición de nucleótidos y el correcto procesamiento de la telomerasa durante la replicación e indispensable para el funcionamiento de la

enzima (Chang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1998,). En plantas, recientemente se han identificado algunas secuencias TR's en plantas superiores en donde interesantemente se demostró que la secuencia presenta regiones altamente conservadas en la comparación en plantas de orden *Asparagales*, *Solanaceas*, *Lamiales*, se identificaron dos regiones que flanquean el motivo repetido; que son una región 5' rico en guaninas y 3' rico en citosinas, así mismo se demostró de manera experimental que los TR's en plantas son dependientes de lncRNAs Pol - III y se encuentran asociados a diskarina, proteína que en Humanos ha sido elucidada como una proteína esencial para su biogénesis.

Por otro lado, sabemos que la subunidad transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) contiene los dominios discretos para que se lleve a cabo la maquinaria de síntesis de ac. Nucleicos, unión nucleotídica y selectividad durante la replicación del telómero, es la subunidad que ha sido ampliamente caracterizada y la que presenta mayor conservación en diferentes especies, sobre todo en la región CTE, tiene cuatro dominios principales que son los dominios TRBD, RT, C – terminal y el N – terminal; el dominio TRBD contiene los sitios de unión a RNA para la interacción ARN/proteína (TER/TERT), el dominio reversa transcriptasa (RT) tiene la función catalítica de la enzima, y por lo tanto, es encargado de la síntesis del ADN telomérico, este dominio presenta siete motivos conservados, que son; 1, 2, A, B, C, D y E (Zhang *et al.*, 2011), el dominio N – terminal (TEN) que se sugiere esta involucrado en estabilizar la procesividad del ADN telomérico (Ghosh *et al.*, 2012; Arkhipova I.R. *et al.*, 2003) y por último el dominio C- terminal (CTE) que recientemente se ha documentado que este dominio en conjunto con TRBD son indispensables para la interacción entre TERT y TR. En las diferentes telomerasas cristalizadas, se muestra que la telomerasa tiene una arquitectura circular en la interacción de cada uno de sus dominios a la que se le denominó anillo TERT. En plantas a pesar de que no se realizó ninguna cristalización de telomerasa, se han caracterizado las secuencias de la subunidad TERT de manera parcial o total en algunas especies como *Scilla peruviana*, *Doryantes excelsa*, *Ornithogalum*, *Iris tectorum*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, y *Allium cepa*, en estos estudios se han identificado los dominios característicos de esta subunidad, en el caso de *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana*.

En plantas, al igual que en los humanos la actividad de telomerasa es dependiente de la

proliferación celular, y se ha observado en diversas especies como; *Nicotiana tabacum*, *Glycine max*, *Daucus carota*, *Brassica oleracea*, *Zea may* y *Hordeum vulgare* (Fitzgerald *et al.*,1999; Killan *et al.*1998; Fajkus *et al.*,1996). En cebada se observó que los tejidos de embriones y carpelos presentan mayor actividad de telomerasa, mientras que los tejidos más diferenciados como; hoja y anteras la actividad de la telomerasa disminuía (Heller *et al.* 1996c). Un estudio en soya mostró que existe mayor actividad de la telomerasa en meristemas, carpelos y raíz, pero una menor actividad en hoja y tallo (Fitzgerald *et al.*, 1996). En tomate y coliflor, se observó un comportamiento muy similar, en donde los tejidos menos diferenciados presentaban mayor actividad de la telomerasa, mientras que los tejidos diferenciados presentaron una baja o nula actividad (Shippen and McKnight 1998), por lo cual se ha propuesto que la actividad de la telomerasa es tejido específica, y se sugiere que la actividad de la telomerasa durante el proceso de diferenciación celular sea similar al de mamíferos, donde la actividad de la telomerasa en el proceso de diferenciación celular también es dependiente de la proliferación celular que es un fenómeno que ha sido mayormente observado en plantas consideradas de ciclo de vida corta (Chung *et al.*, 2003; Killan *et al.*, 1998; Fajkus *et al.*, 1996; Fitzgerald *et al.*, 1996), recientemente se ha documentado que en *Ginkgo biloba* una especie considerada de ciclo de vida largo, la telomerasa no se relaciona con la longitud telomérica en plantas de diferentes edades sugiriendo que la actividad de la telomerasa era estacional dependiente.

Agave tequilana var. *Azul* es una especie social y económicamente importante para la industria de México, ya que se utiliza para la fabricación de una bebida alcohólica tequila, es una especie perenne (Little and Gentry 2006). En nuestro grupo, hemos realizado recientemente diversos trabajos centrados en el estudio de la dinámica de la longitud de los telómeros en *A. tequilana* en condiciones de campo durante la edad (1 - 6 años), donde se observó que la longitud de los telómeros se mantiene en un rango de 25 hasta 31 kb (Rescalvo-Morales *et al.*2019). Además, en un estudio en diferentes tejidos (hojas, tallos, y raíces) analizados en *A. tequilana* y *A. fourcroydes* de uno – tres -años en condiciones de invernadero. Se observó un comportamiento similar a las plantas de campo, independientemente de la especie y el tejido analizados (Rescalvo-Morales *et al.*,2016), lo que refleja que el mantenimiento de la longitud telomérico del tejido en *A. tequilana* y *A. fourcroydes* es necesario para el correcto desarrollo, también se ha

realizado diversos trabajos centrados en el estudio de la dinámica de la longitud de los telómeros en *A. tequilana* en condiciones de campo durante la edad (1 - 6 años), donde se observó que la longitud de los telómeros se mantiene en un rango de 25 hasta 31 kb (Rescalvo-Morales *et al.*,2019). Adicionalmente observamos que la actividad de la telomerasa en tejido de hoja en condiciones de campo de 1 – 6 años podría estar contribuyendo al mantenimiento telomérico, pero interesantemente en este trabajo muestra que la actividad de la telomerasa puede estar relacionada con los procesos de proliferación celular como; elongación y diferenciación celular. Debido a esto, el objetivo de este trabajo es realizar la caracterización *in silico* de TERT en *A. tequilana*, para evaluar si la expresión de TERT se correlaciona con la actividad tejido específica en plantas de dos años; para esto utilizamos la biblioteca transcriptómica de *A. tequilana* (Ávila de Dios datos no publicados) representado en TPM y análisis cuantitativo de actividad de telomerasa qTRAP. Observamos en este trabajo, que la secuencia consenso presenta todos los dominios característicos de la subunidad TERT, adicionalmente, observamos que en la predicción *in silico* del modelo estructural de TERT de *A. tequilana*, presenta el anillo TERT característico de los modelos cristalizados en estado activo de telomerasa en *Tetrahymena thermophila*, *Homo sapiens*, *T. Castenum*, se observaron algunas anotaciones biológicas interesantes, como; metales pesados Mg^{+2} , NUC y CH1 presentes en otras RNA's polimerasas o reversas transcriptas, y finalmente observamos que, no hay una correlación entre la expresión de TERT en TPM y la actividad de la telomerasa en tejido meristemático de dos años.

Así mismo, el uso de anticuerpos para la detección y localización de proteínas son método comúnmente utilizado para la identificación proteica, gracias a estas herramientas, el diseño de anticuerpos contribuyo a la identificación de dyskerina; y se determino que es una proteína nuclear asociada a snoARN's (ARN nucleolar) en el complejo H/ACA (Ribonucleoproteico nucleolar pequeño), un componente indispensable para el ensamble y estabilidad de la telomerasa (Venteicher *et al.* 2009) durante su biogénesis. Gracias a estas herramientas, el diseño de anticuerpos contribuyo a la identificación de la dyskerina como un componente principal para el ensamble y estabilidad de la telomerasa (Venteicher *et al.* 2009). Así mismo, por medio de anticuerpos se revelo la importancia de muchas proteínas que están involucradas la biogénesis y ensamblado de la telomerasa, como el TCAB (Telomerase CAB box), NHP2,

3.2. MATERIAL Y METODOS

NOP10, GAR1, NAF1 (Stern *et al.*, 2012; Blackburn and Collins 2011; Venteicher *et al.*, 2009).

La localización de las proteínas de unión al telómero como son TPP1, RAP1, TRF1 y 2 han favorecido al entendimiento de cómo es que se dan las interacciones entre estas proteínas y como se dan las interacciones en el ADN telomérico que permiten comprender cómo se regula la homeostasis en la longitud telomérica (De Lange 2005b). En esta sección, se planteo un segundo objetivo del trabajo que es identificar a TERT en *A. tequilana* por medio del diseño de anticuerpos

3.2. MATERIAL Y METODOS

3.2.1. Aislamiento *in silico* y amplificación del Exón 9 de la secuencia TERT en *A. tequilana* (*AteqTERT*)

Para la identificación de la secuencia candidata del gen que codifica para la subunidad TERT en *A. tequilana* se realizó la búsqueda de la secuencia consenso de la librería RNA – seq depositado en el NCBI, utilizando como secuencia molde la reportada y caracterizada de *Oryza sativa* (*osTERT*), se verifico identidad de TERT mediante un blastx en el NCBI databank y alineamiento manual con las secuencias TERT utilizando MUSCLE y UPGMA con un análisis bootstrap que implica 1000 repeticiones en la herramienta bioinformática Mega X® java versión 10.1 (versión restringida) Finalmente se hizo un análisis de similitud de secuencias mediante la construcción de un fenograma usando el método de Neighbor joining (Fig.1a).

Identificamos el exón 9 y 10, y se diseñaron cebadores específicos (Supplementay material) y fueron amplificadas por PCR siguiendo las indicaciones de la enzima Invitrogen® Taq DNA polymerase (No. Cat. 10342046), como templado se utilizó ADN genómico siguiendo el método Dellaporta (1998). Los productos de ADN fueron clonados utilizando TOPO® TA Cloning® PCR (No. Cat K4600-01) siguiendo las especificaciones de la casa comercial en células quimiocompetentes DH5 α^{TM} . Se realizó una selección positiva aislando clonas que crecieron en el medio selectivo Luria – Bertani suplementado con ampicilina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y X-gal 40 mg/ml. Las secuencias aisladas se compararon con la secuencia *in – silico* aislada y una especie de orden *Asparagales* previamente reportada y caracterizada.

3.2.3. Análisis de la secuencia aminoácídica y estructural de la secuencia *AteqTERT*

Para el análisis de la secuencia *AteqTERT* se realizó la traducción aminoácídica utilizando ORF finder bioinformatic Expasy resource portal (<https://web.expasy.org/translate/>) para identificar el codón de inicio, la secuencia obtenida se alineó con otras especies reportadas para plantas, y como grupos externos se utilizó a mamíferos y levaduras aplicando MUSCLE y UPGMA, y se construyó un fenograma usando el método de Neighbor joining. Posteriormente se identificaron los dominios utilizando dos herramientas bioinformáticas, ScanProSite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite>) y Geneious®11.0.3 (Restricted) java versión 1.8.0.

Para el modelado estructural de la secuencia *AteqTERT* se utilizó servidor I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). En el modelo fue visualizado utilizando "[UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis](#)" se identificaron los dominios de TERT, se observaron sus características hidrofílicas y se analizaron las anotaciones biológicas COFACTOR y COACH.

3.2.3. Material vegetal

Las plantas (*A. tequilana*) se colectaron en la hacienda "Mayapan" ubicada en Valladolid, Yucatán. Recolectamos un total de tres plantas completas de 6 meses de edad, las cuales fueron trasplantadas a macetas y colocadas en invernadero durante un año y medio, cumpliendo una edad aproximada de dos años. El material vegetal se dividió en hoja media, basal y central, meristemo y raíz, el tejido de las hojas colectadas se dividió en tres secciones diferentes, interna apical (IA), interna basal (IB) y externa apical (EA), de acuerdo a la caracterización citológica de hoja joven y adulta, que muestra que la región basal interna presenta el mayor número de células en G₀, y la región apical interna presenta más variación en el número de células en G₂, Palomino et al., (2004). Posteriormente, el material vegetal se almacenó a -80°C hasta su utilización.

3.2.4. Ensayo de TRAP

Para el ensayo de actividad de la telomerasa (TRAP), los extractos de proteínas se prepararon como se describió anteriormente en Fitzgerald et al. 1990 y Sykorova et al 2003. En resumen, se molieron 200 mg de tejido de la hoja en mortero con nitrógeno

3.2. MATERIAL Y METODOS

líquido, se re-suspendieron en 200 µl de tampón W [50] Tris-Ac mM, pH 7,5 / 5 mM MgCl₂ / glutamato de potasio 100 mM / EGTA 20 mM / PVP-40 al 1,5% / glicerol al 10% / PSMF 0,1 mM / DTT 1 mM / complejo de ribonucleótidos de vanadilo (SIGMA®)], y Centrifugaron 17.500 x g durante 15 min. Después de eso, las proteínas se precipitaron con PEG-8000 agregado a una concentración final del 10%, se mezclaron durante 30 minutos a 4 °C y se centrifugaron a 17.500 x g durante 5 minutos. El sedimento se re-suspendió en 20 µl de tampón W, se mezcló durante 30 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación, la concentración de proteína total se determinó en la fracción soluble del extracto de proteína enriquecido en telomerasa (TEX) con el método de Bradford (referencia).

El ensayo de TRAP convencional se realizó utilizando extractos de telomerasa que contenían 100 ng de proteína total mezclada con 1 µl de cebador de sustrato 10 µM (cebador TS21: 5´- GAC AAT CCG TCG AGC AGA GTT - 3´, Fitzgerald et al. 1996), en 46 µl de amortiguador TRAP (Fitzgerald et al. 1996). Se incubó a 26 ° C durante 45 minutos (paso de elongación). Después de la etapa de elongación, la telomerasa se inactivó a 95 ° C durante 10 minutos y las muestras se enfriaron a 80 ° C (inicio en caliente). La etapa de amplificación de la PCR comenzó al agregar una mezcla que contiene 1 µl de 10 µM de cebador inverso (HUTPR: 5´- CCG AAT TCA ACC CTA AAA CCC TAA ACC CTA AAC CCC - 3´, Sykorova et al. 2006) y 2 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen ®), la mezcla de reacción se sometió a amplificación por 35 ciclos de 95 ° C / 30 s, 65 ° C / 30 s, 72 ° C / 30 s, seguido de una extensión final a 72 ° C / 5 min. Los productos TRAP se ejecutaron en PAGE al 12,5% en 0,5 TBE y se tiñeron con Syber safe® 1x; Los geles fueron escaneados ChemiDoc® XRS+ Imager (#170-8265), Bio-Rad. Se utilizó el ensayo TRAP convencional para evaluar la actividad de la telomerasa en todas las muestras antes de evaluar en qTRAP

3.2.5. Ensayo q-TRAP

La medición cuantitativa de la actividad de la telomerasa se realizó utilizando la mezcla maestra SYBR Green Master (Applied Biosystems), TS21 y TELPR (la concentración de cada cebador en la mezcla de reacción fue de 0.25 µM). Después de la etapa de extensión (45 minutos a 26 ° C) y la inactivación enzimática (15 minutos a 95 ° C), los productos de extensión se amplificaron en 30 ciclos de 30 segundos a 95 ° C, 60 segundos a 60 ° C (al final de este paso, se midió la fluorescencia). Para la determinación

de la curva estándar, se utilizaron diluciones que contenían 500 ng, 200 ng, 100ng, 50ng y 25 ng de proteína total en 1 µl de TEX de meristemo apical tejido con división celular activa, cada dilución se realizo por triplicado.

Para el testigo positivo de actividad de telomerasa se utilizó tejido meristemático 100 ng de TEX, para los diferentes tejidos analizados se utilizó una concentración de 100 ng. El ensayo qTRAP se analizó por PCR en tiempo real Rotor-Gene 3000 (Qiagen) software 2.1.0.9. Los valores de Ct y la actividad telomerasa relativa se calcularon mediante el método delta-delta Ct, la normalización se realizó siguiendo el método Pffafl 2004 utilizando el control negativo en la curva estándar y en los diferentes tejidos se normalizó con el control positivo (meristemo de 1-3 años), que para la comparación de los diferentes tejidos hoja, raíz y meristemo se utilizó puntas de raíz, y para hoja media, basal y central se utilizó meristemo. La evaluación estadística y los gráficos se realizaron con GraphPad Prism versión 6.0 (empresa).

3.2.6. Análisis en el RNA-seq de 2 años en diferentes tejidos

La secuencia *AteqTERT* obtenida, se utilizo como secuencia consenso para realizar el análisis de la representatividad en el RNA-seq obtenido por secuenciación Illumina en diferentes tejidos y etapas de desarrollo de *A. tequilana*. Las lecturas obtenidas del RNA – seq, como se realizo el ensamblaje y como se normalizo en TPM se describen previamente por Zavala-García, Laura E (2018). En este análisis únicamente se tomo en cuenta los tejidos en etapa vegetativa con dos años (Ávila de Dios *et al*, datos no publicados). Los datos reportados son representados en transcripciones por millón, se aplico un ANOVA para determinar diferencias significativas entre niveles de expresión de meristemo (SAM), hoja y raíz La evaluación estadística y gráficos se realizaron con GraphPad Prism versión 6.0.

3.2.7. Diseño de los péptidos.

Para la determinación de epítopes y realizar el diseño de anticuerpos, se realizo una predicción de la configuración estructural de la secuencia aminoácidica de TERT obtenida anteriormente, utilizando I-TISSER. Esta plataforma bioinformática propone modelos de proteínas, con base en las estructuras proteicas cristalizadas y caracterizadas

3.2. MATERIAL Y METODOS

depositadas en las librerías proteicas de UniProt. Una vez determinada la estructura, se localizan las estructuras secundarias de la secuencia a.a. AteqTERT y se estiman las regiones mas hidrofílicas e hidrofóbicas, generalmente las epitopes para el diseño de anticuerpos son sobre las regiones mas disponibles, con un tamaño de secuencia aminoácidica entre 7- 15 aminoácidos, al final de su secuencia, se marca con una metionina y se manda sintetizar (Pepmic Co). Para eficientizar la respuesta imune, las secuencia peptídica diseñada se acopla a una proteína de alto peso molecular y de estructura compleja, en este diseño, se acoplo a una hemocianina de lapa californiana (KHL), aislada de *Megathura crenulata*. Una vez sintetizado el péptido y acoplado a la proteína KHL, se re – suspendio en amortiguador de fosfatos 0.5 M, a un PH = 7.5 a una concentración de 100 µg/0.1 ml.

La inmunización se realizó en conejos hembras de 3 meses de edad durante 90 días con un periodo de inmunización de 15 días, la primera inmunización llevó acabo preparando una solución, con adyuvante de Fraude (solución aceitosa concentrada con bacteria) 300 µl y el péptido sintetizado a una concentración final de 300 µg relación v:v. Después de la segunda inmunización se utilizaron 100 µl a una concentración final de péptido sinterizado 100 µg y con adyuvante de Fraude incompleto (solución aceitosa atenuada con bacteria). Se tomó muestra de sangre del conejo en el día cero como testigo negativo y a partir del día 15 se tomá muestra sanguínea para detectar dilución.

3.2.8. Detección de dilución del anticuerpo (Dot-Blot)

Para realizar la detección de la dilución del anticuerpo, se realizó un dot blot colocando en la membrana de nitrocelulosa 100, 10, 1, 0.1 µg de péptido sintetizado ATR-3 y ATR-4. Posteriormente la membrana se bloqueo con PBS 1X y leche baja en grasa Silhouette® al 5% durante 2 hrs a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados con PBS-T 1X al 0.1% de Tween20®. Despues del lavado, se incubó con el anticuerpo anti-TERT extraido del suero del conejo en diferentes diluciones; 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:4000 en PBS con leche al 3% durante toda la noche. La membrana se lavó tres veces despues de incubar con el anticuerpo primerio, posteriormente, se incubó por tres horas con el anti-conejo en una dilución 1:1000, lavar 3 veces por 15 min con PBS-T y reveló por ELC. Una vez detectada la dilución se realizó el western blot del extracto nuclear obtenido para el análisis de TRAP.

3.2.10. Western Blot

Para la detección de TERT, se probaron un total de cuatro protocolos extracción de proteínas nucleares (RIPA, CHAPS, Peterson y TRAP) y tres de proteínas totales (Fosfatos, Lab. Ingancio Islas, Lab. 24), de las cuales por medio de la separación SDS – PAGE, se verificó la integridad y la presencia de mayor cantidad de proteínas. El gel analizado muestra que los extractos con los mejores resultados son con dos protocolos para proteínas nucleares; método de Peterson (Peterson 1977) y método TRAP amortiguador W (Fitzgerald et al. 1996) y para proteínas totales del Dr. Ignacio Islas (Figura 3.8b).

Una vez que se realizó la desnaturalización de los extractos utilizando amortiguador Leammli 2x y la separación de proteínas por SDS-PAGE, el gel de poliacrilamida al 10%, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en medio húmedo, la transferencia se realizó durante toda la noche a voltaje de 20 V a 4°C, se añadió 0.1% de SDS al amortiguador de transferencia para reducir la formación de aglomerados. La membrana se tiñó con rojo de ponceau 1X para verificar si la transferencia fue adecuada, se lavó 3 veces con agua destilada estéril por 10 min y se bloqueó con leche al 5% (Svelty baja en grasa Nestle®) en PBS 1x durante 3 hrs, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-T 1x al 0.1% de Tween20® por 15 min. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo primario preparado con PBS 1X y leche al 3%, se utilizaron tres diluciones del anticuerpo 1/1000, 1/2000 y 1/4000, durante toda la noche a 4°C en agitación suave y sumergida en la solución. La eliminación del excedente de anticuerpo primario se realizó utilizando amortiguador de lavado PBS-T al 1% 3 veces por 15 min. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario anti-rabbit a una dilución de 1/1000 con PBS y leche al 3% durante 3 horas. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 15 min con PBS-T 1X al 0.1% con Tween20®, 2 lavados con PBS 1X y después la detección se realizó mediante quimioluminiscencia ECL.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.3.1. Identificación *in – silico* de TERT de *A. tequilana*.

Una de las subunidades que es indispensable para la función *in vivo* de la telomerasa es TERT, debido a ello con el fin de explorar al gen que codifica a TERT en *A. tequilana*, se

3.3. Resultados y discusión.

obtuvo una secuencia cDNA de 3525 pb *in silico*, que se obtuvo de la librería RNA-seq TSA de *A. tequilana* depositada en el NCBI, utilizando como query la secuencia de TERT reportada y caracterizada de *Oryza sativa*. Para corroborar que la secuencia consenso es correcta, se analizó la identidad utilizando otras secuencias TERT reportadas, observando que presenta similitud con secuencias TERT de orden *Asparagales*, como: *Scilla peruviana* especie perteneciente al género *Scilla* con un porcentaje del 88%, seguido de *Doryanthes excelsa* con un 86% y *Asparagus officinalis* con 82% (Figura 3.1a), indicando que la secuencia nucleotídica consenso pertenece a la secuencia del gen que codifica a la subunidad TERT (Figura 14b). Así mismo, se realizó la identificación de los exones utilizando como base los caracterizados previamente como; *Nicotiana tabacum* y *Oryza sativa* (Figura 3.2a), se amplificó el exón 9 del dominio RT de la subunidad de la telomerasa por medio de cebadores específicos (Figura 3.2b).

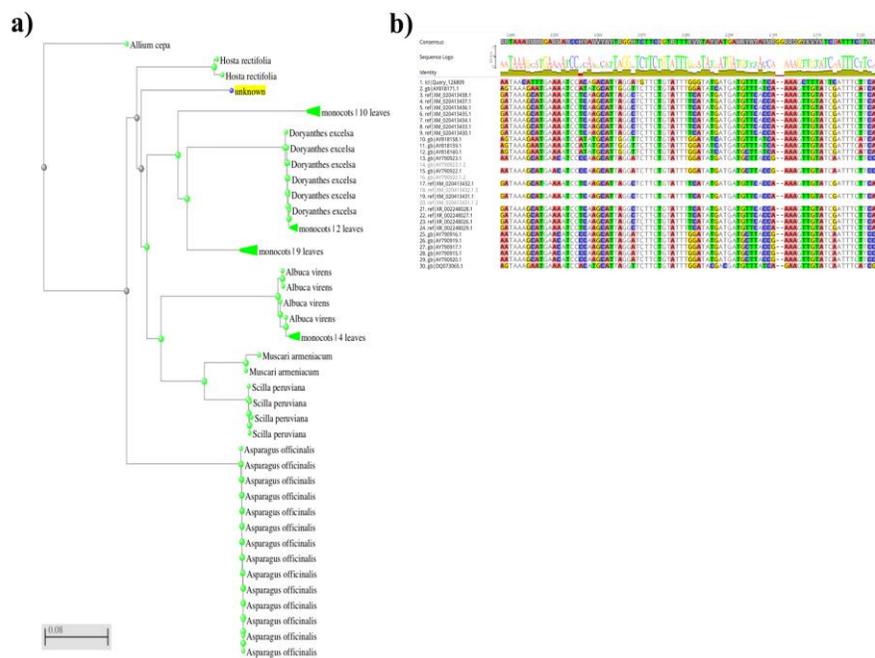


Figura 3.1.- Alineación de la secuencia de nucleótidos TERT; a) Fenograma que muestra que la secuencia consenso presenta similitud con otras secuencias TERT de nucleótidos reportadas en el NCBI; b) alineación de la secuencia de consenso con las especies TERT informadas en el NCBI utilizando UPGMA con un arranque de 1000 repeticiones realizado en Genius Java Versión 1.8.0_112-b15 (64 bits).

Las secuencias obtenidas como resultado de la amplificación de ADN genómico y clonación del producto de PCR, con un tamaño aproximado entre 750 – 1200 pb con la combinación de cebadores Fw_Exo9, Fw_Exo 9.a y Rv_Exo 10, las secuencias *AteqTERT* fueron depositadas en la base de datos de ADN del NCBI (Figura 3.2b). Finalmente, en el análisis similitud de secuencias muestra que tiene un porcentaje de similitud del 89% con la secuencia de consenso *AteqTERT* – RNA-seq y un 82 % para especies de orden *Asparagales*. Estos resultados, además de que ayudan a confirmar que la secuencia consenso corresponde a la subunidad TERT de *A. tequilana* también indican que la secuencia nucleotídica de TERT para el orden *Asparagales* es conservada.

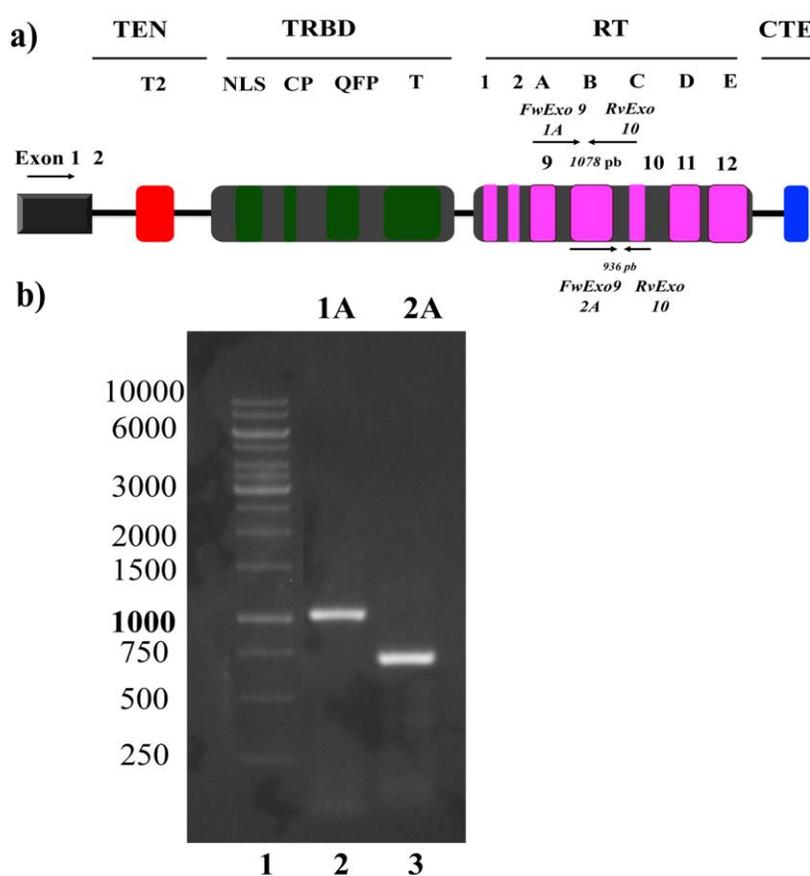


Figura 3.2.- Identificación de nucleótidos, diseño de oligonucleótidos y amplificación por PCR del exón 9 de la secuencia consenso de *AteqTERT*; a) Representación esquemática del gen TERT y la identificación de nucleótidos del exón 9 correspondiente a la región parcial del sitio catalítico, diseñamos dos oligonucleótidos directos para el exón 9; FwExo9 (1A) - FwExo9 (2A), y un solo

3.3. Resultados y discusión.

oligonucleótido inverso RvExo9; b) productos de PCR amplificados que usan 20 ng de ADN genómico como temple; 1.- marcador de peso molecular, 2.- Producto de PCR con la combinación FwExo9 (1A) + Rv Exo9, 3.- Producto de PCR con la combinación FwExo9 (2A) + RvExo9.

3.3.2. Análisis bioquímico de la secuencia AteqTERT

La secuencia aminoácídica consenso de *AteqTERT* presentó un tamaño aproximado de 1175 aminoácidos, se identificaron los motivos característicos de la subunidad TERT como; NTE, TRBD y RT. En el fenograma de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas con la secuencia aminoácídica TERT, utilizando como grupos externo mamíferos y levaduras, muestra que las secuencias de TERT que pertenecen a especies de orden *Asparagales*; *Scilla piruviana*, *Allium cepa*, *Iris tectorum* y *Hosta rectifolia* tienen un porcentaje de identidad del 96%, indicando que la secuencia aminoácídica es conservada para el orden *Asparagales* (Figura 3.3a). Asimismo, se observó un porcentaje de identidad del 86% para especies monocotiledóneas en comparación con especies dicotiledóneas, y un 74 por ciento para secuencia TERT como *Homo sapiens* y ratón (Figura 3.3a). Por lo tanto, la subunidad TERT de *A. tequilana* mostró ser conservada entre miembros del orden *Asparagales*; como se ha reportado previamente por Sykorova *et al.*, 2006. En este estudio, la caracterización *in silico* de la sub-unidad TERT, evidenció que la secuencia presenta los dominios característicos de TERT: NTE, TRBD, y RT (Figura 3.3b). El tamaño de la secuencia AteqTERT es de 1175 aminoácidos, y se sabe que el tamaño de TERT varía ligeramente entre especies como por ejemplo; *Oryza sativa* con 1260 a.a. (Oguchi *et al.*, 2004), *Zea mays* con 1188 a.a., *Arabidopsis thaliana* con 1123 a.a. *Scilla priviana* con 1227 a.a., *Iris tectorum* con 1295 a.a, además, los dominios encontrados en *Agave tequilana* coinciden con los que se reportaron en estas especies.

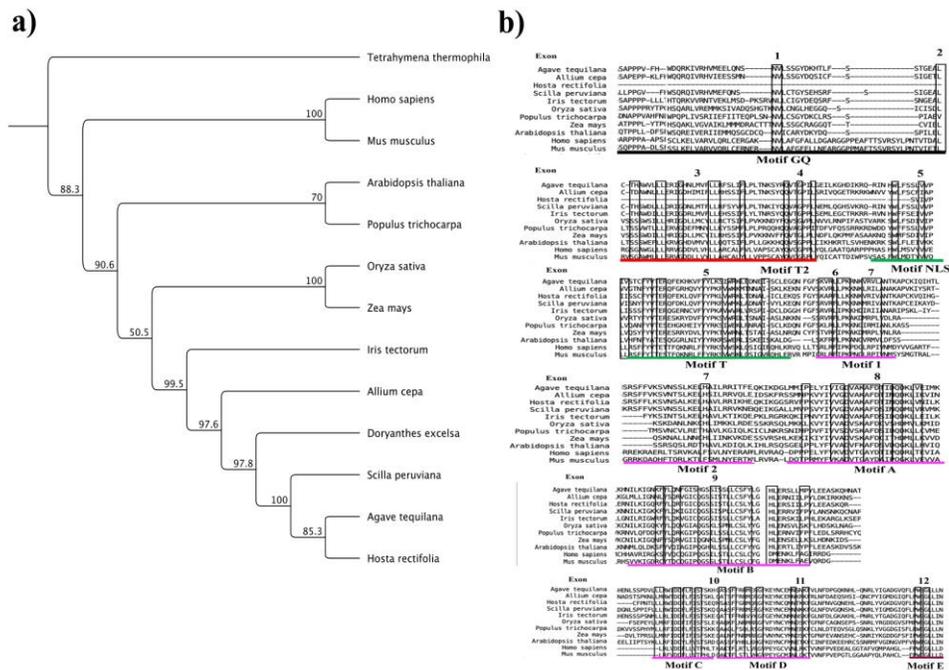


Figura 3.3.- Análisis de similitud de secuencia AteqTERT; a) Fenograma de secuencias de aminoácidos TERT informadas en diferentes especies de plantas, mamíferos y ciliados utilizando UPGMA con un arranque de 1000 repeticiones realizado en Genius Java Versión 1.8.0_112-b15 (64 bits), b) Identificación de dominios, motivos y exones en la secuencia AteqTERT usando UPGMA con un arranque de 1000 repeticiones realizado en Genius Java Versión 1.8.0_112-b15 (64 bits).

Durante la identificación de los dominios de las secuencias TERT, se observaron los motivos característicos en las secuencias aminoácidas analizadas, por ejemplo; la secuencia GQ, QFP, GLLL y T, motivos que son compartidos en diferentes especies. Estos motivos se encuentran ubicados en los dominios T2, TRBD y C-terminal respectivamente. El motivo T la secuencia aminoácida que es específica de la enzima telomerasas, la presencia de este motivo permite diferenciar a la telomerasa del resto de las RT's virales y es parte del dominio TRBD (Figura 3.4). La región C-terminal es esencial para la función catalítica, y muestra mayor conservación de motivos aminoácidos en diferentes especies analizadas, interesantemente se observó que la secuencia consenso de *AteqTERT* presenta el cambio aminoácido de leucina (L) o fenilefrina (P) a triptófano (W) en el motivo C, en la posición 2 aguas arriba del doble DD

3.3. Resultados y discusión.

catalítico de la subunidad TERT. Este cambio aminoácido, ha sido reportado previamente para algunas especies de orden *Asparagales*. En este sentido, también se ha reportado que la región N- terminal de la subunidad TERT, es la que presenta mas variación que el resto de los dominios, sin embargo, para el género *Asparagales* esta región es conservada, y esto incluye a la secuencia consenso de *A. tequilana*, ya que observamos que, en esta región, la mayoría de los motivos y la secuencia son conservadas. Finalmente, la secuencia consenso *AteqTERT* presentó un total de 12 exónes concordando con lo reportado para *Nicotiana tabacco*, *Oryza sativa* y otras especies del generó *Asparagales*, sin embargo, es importante mencionar que la cantidad de exones en secuencias TERT puede variar, ya que también se ha observado en algunas secuencias TERT pueden presentar hasta un total de 18 exones.



Figura 3.4.- Identificación de los dominios específicos de TERT en la secuencia de aminoácidos AteqTERT,

mostrando que tiene los dominios NTE, TRBD, RT y CTE.

Nosotros realizamos una predicción estructural con la finalidad de observar a nivel estructural como se observan los dominios característicos de TERT utilizando la herramienta bioinformática en línea I-TISSER. Esta plataforma, se basa en la identificación de las plantillas estructurales PDB de proteínas cristalizadas, y la implementación de algoritmos matemáticos por cofactor, COACH y el agrupamiento de “señuelos” (SPICKER), que permite agrupar las regiones en función de la similitud de estructura en pares, con el objetivo de proporcionar predicciones estructurales y funcionales. En este estudio, se observó que la estructura *AteqTERT* tiene una puntuación C = -1.15, el rango de confianza aceptable estructural 3D es [-5, 2]. Este valor se calculó en función del alineamiento de las plantillas, y los parámetros de convergencia de las simulaciones de ensamblaje, tomando en cuenta los átomos, los residuos aminoácidos expuestos, accesibilidad de la proteína y las estructuras alfa - beta laminar, para posteriormente basarse en esta estimación (puntaje C) y considerar la longitud (Puntaje TM y RMSD), el valor TM-score = 0.57 ± 0.15 y RMSD = 12.1 ± 4.4 Å, estos valores indican que la calidad del alineamiento y el modelado en 3D de la secuencia consenso es aceptable.

El modelo PDB que se utilizó fue el modelo 1 en la estimación enviada por la plataforma, el modelo cristalizado proteico con el que presento similitud estructural es el Mod. 6d6VA, que pertenece a la estructura de telomerasa en estado activo, cristalizada y caracterizada de *Tetrahymena thermophila*, la cual se caracterizó utilizando criomicroscopía electrónica, con una resolución de 4.8 Å. Este análisis lo primero que se observó es la ubicación de cada uno de los dominios característicos de la subunidad, para diferenciar a cada uno de los dominios se utilizaron diferentes colores, el color rojo para el dominio NTE, verde para el dominio TRBD, magenta para el dominio RT y azul para el CTE (Figura 3.5a). En este análisis mostro que la estructura de la telomerasa es similar a otras polimerasas reportadas e interesantemente a otros RT's virales (similar al puño de la mano izquierda), en un giro de 90° hacia enfrente, se observa que los dominios TRBD-RT-CTE forman el anillo TERT característico (Figura 3.5b). Uno de las aportaciones más interesantes en la estructura de *Tetrahymena thermophila*, se observó que el núcleo catalítico de la telomerasa tiene una arquitectura única entrelazada en sus interacciones, muestran que

3.3. Resultados y discusión.

el dominio RBD, RT y CTE forma un anillo denominado “anillo TERT” enlazado mediante un lazo TER loop 4 (L4) que se encarga del agrupamiento molecular de estos dominios, así mismo, en la estructura cristalizada en *T. Castenum* observan que estos tres dominios presentan el mismo anillo TERT, pero en esta estructura no se muestra si este anillo tiene una interacción adicional como en el caso de *Thetraymena thermophila*, ubicando los motivos mas cercanos al sitio activo, observamos que el sitio activo de TERT se encuentra ubicado entre las dos estructuras beta laminar del motivo C, los motivos B y C son los dedos de la enzima mas cercanos al sitio catalítico y el motivo 2 la estructura β – laminar mas cercana al sitio activo (Figura 3.5c), se localizo el sitio activo que en el caso de *AteqTERT* y otras TERT’s reportadas corresponde a la doble Asp en el dominio RT (Figura 3.5c). En *Tribollum Castaneum* la cristalización de TERT permitió conocer que la unión entre TERT y TER es mediada por los motivos 2 y B ya que se encuentran localizados cerca del sitio activo de telomerasa, nosotros observamos que estos motivos están cercanos al sitio catalítico, pero desconocemos si en TERT para plantas estos motivos tengan esta función.

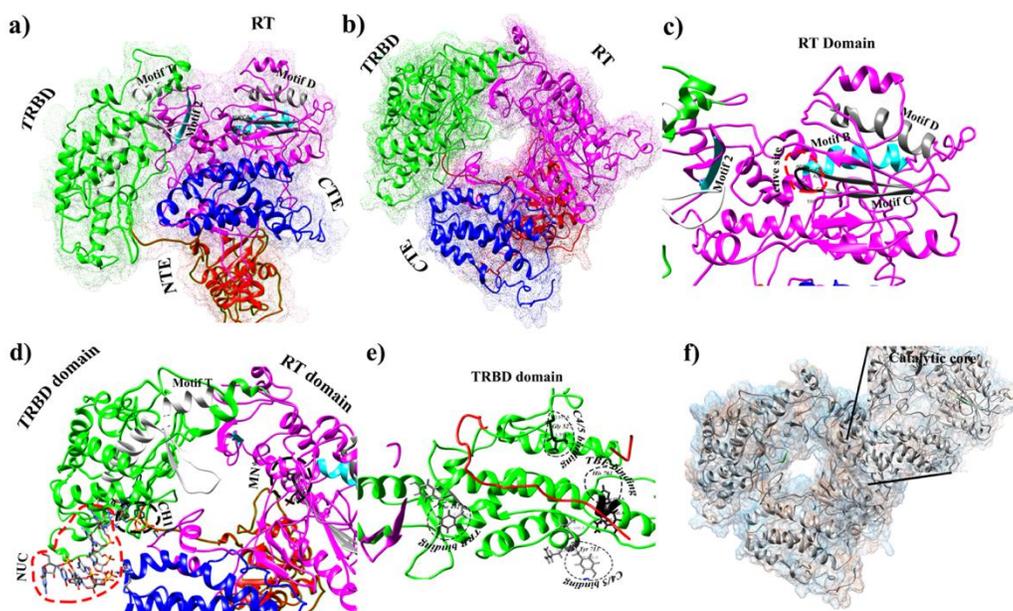


Figura 3.5.- Modelado de la secuencia de aminoácidos de *AteqTERT*; los diferentes colores representan cada dominio de *AteqTERT*; el dominio NTE - rojo, TRBD - verde, RT - rosa y CTE - azul, a) representación de la estructura de superficie 3D y la estructura laminar alfa-beta de *AteqTERT* con los diferentes dominios de TERT, b) interacción de los dominios de TERT en estructura de superficie y estructura alfa-beta que forman el anillo TERT característico, c) los

motivos conservados adyacentes al sitio activo B, C, D y 2, d) anotaciones biológicas del sitio de unión al ligando en el dominio TRBD; al ligando CH1 (3-desoxicitidina 5- trifosfato) y al sitio de unión al dominio de ácido nucleico (NUC) y RT al MN (Magnesio +2), e) sitios de unión de la subunidad TR en el dominio TRBD, f) análisis de la hidrofobicidad del estructura donde la coloración azul representa las regiones hidrofílicas y la coloración roja las áreas hidrofóbicas, los modelos PDB de la secuencia TERT y la predicción de anotaciones biológicas se obtuvieron utilizando la herramienta bioinformática I-TESSER, con un puntaje C = -1.15, puntaje TM = 0.57 ± 0.15 y RMSD = 12.1 ± 4.4 Å, las estructuras que visualizamos y editamos usando UCSF Chimera Quick versión 1.14.

Así mismo, estos autores determinaron que los motivos TBE en TRBD son necesarios para la interacción de TR con la subunidad TERT y son conservados en la familia de estas enzimas debido a ello, identificamos las regiones TBE y C4/5 binding en el dominio TRBD en la secuencia aminoácida (Figura 3.6) y en la estructura (Figura 3.6), mostrando que *AteqTERT* presenta los cuatro aminoácidos que componen los sitios de interacción TBE y C4/5 (Figura 3.5d), dos de los aminoácidos son conservados para todas las especies, pero los otros dos aminoácidos localizados parecen ser especie específicos (Figura 3.6).

3.3. Resultados y discusión.

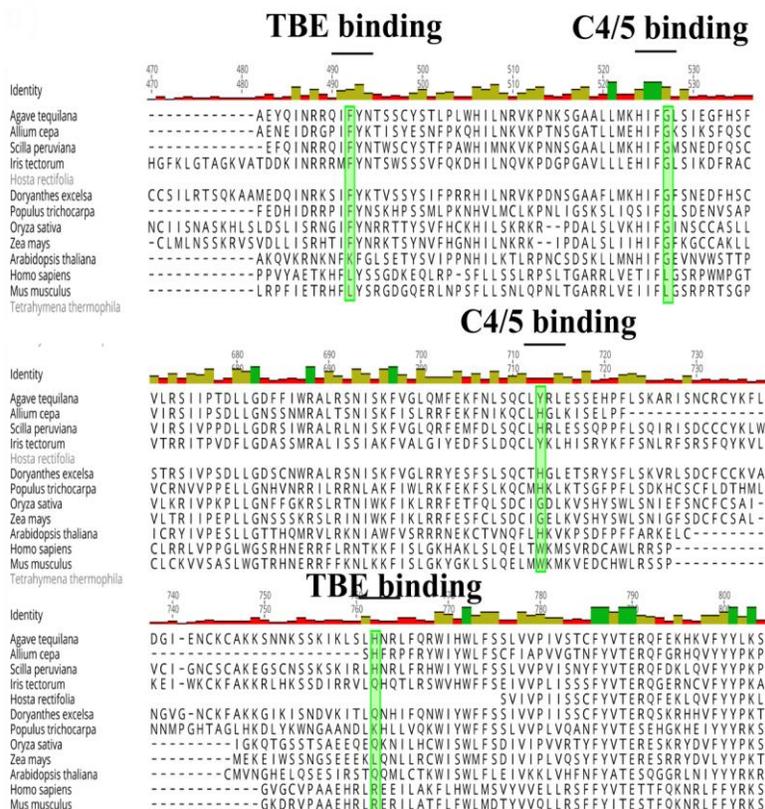


Figura 3.6.- Alineación e identificación de sitios de unión a ARN en el dominio TERB de la subunidad TERT

Los análisis realizados por COFACTOR y COACH permitieron analizar las anotaciones biológicas; como sitios de unión a ligandos (Figura 3.5d). El análisis de las anotaciones biológicas por COFACTOR mostró anotaciones biológicas similares a ARN's polimerasas como; NUC (ácidos nucleicos), CH1 (3'-deoxycytidine-5'-triphosphate), y Manganeso (2+), los ligandos CH1 y NUC se encuentran posicionados en los mismos residuos aminoácidos que son; 429, 430, 440, 443, 444, 445 en el dominio TRBD, y el ligando de MN se observo en la posición; 913, 914 que interesantemente corresponde a la doble Asp en el sitio catalítico del dominio RT (Figura 3.5d). Los modelos PDB's con los que se mostraron mayor similitud son; 1GX6 para el ligando MN que pertenece al RNA polimerasa del virus hepatitis C en complejo con UTP y manganeso, 3aOhD para el

ligando NUC que pertenece al complejo de RNA polimerasa – Gfh1, y por último el modelo PDB 1N38 para el ligando CH1 que pertenece al complejo reovirus polimerasa lambda 3. Para otras RNA's polimerasa o RT's virales, se sabe que estos ligandos contribuyen al proceso de síntesis de RNA, translocación nucleotídica e inician su actividad enzimática, indicando que posiblemente el ligando de MN observado en el sitio catalítico es necesario para dar inicio en la actividad de la telomerasa, ya que esta enzima utiliza como co-factor el Mg^{+2} , así mismo, los ligandos CH1 y NUC observados en el dominio TRBD nos lleva a pensar que posiblemente el ligando CH1 puede estar contribuyendo a la flexibilidad de translocación del ADN telomérico y NUC a la síntesis de ADN telomérico.

Una de las estructuras recientemente elucidadas de telomerasa es en *Theraymena thermophila* y contribuyo en gran parte a entender como suceden las interacciones aminoácidas entre cada uno de los dominios de TERT y el RNA de la telomerasa TER, y como a su vez estos ayudan a regular su función de una manera eficiente; dentro de todas estas interacciones, observan un lazo TER loop 4 que mantiene el agrupamiento entre los dominios del anillo TERT, posteriormente observan que el dominio t/pk del RNA templado en la telomerasa forma un círculo sobre y detrás del anillo TERT, de tal forma que el extremo limitante de la plantilla quede en la parte frontal y el pseudoknot en la parte posterior sobre el dominio CTE, que la interacción TERT – TEN junto con RBD y la parte inferior del círculo t/pka forman un conector estructurado flexible que a su vez facilita la interacción de TEN – TRAP (localizada en TER) formando un tercer anillo (TEN-RBD-TRAP) que bloquea físicamente al anillo TERT y secuestra a los extremos limitantes de unión en TER, por lo tanto proponen que el anclaje de TBE en RBD es necesario para definir el límite de la plantilla y evitar que físicamente que los nucleótidos que no son de la plantilla repetida se muevan al sitio activo (Jansson *et al.*, 2015), y por ultimo, proponen que el modelo para la síntesis de ADN es en forma de acordeón para síntesis de ADN telomérico , limitándose a la comprensión y extensión a los extremos de plantilla adyacentes. Adicionalmente, en *Trubullium castaneum* se observa que la superposición de TERT – TER pone bases accesibles en el solvente de manera adyacente y por enzima del sitio activo durante la unión de Ac. Nucleicos facilitando la selectividad de la enzima, la interacción entre el ADN sustrato y la región primer -gad localizada en el extremo 3' del ADN sustrato y el sitio activo lo que facilita la adición nucleotídica, en este sentido se sabe

3.3. Resultados y discusión.

que las fuerzas que las que participan en la unión pueden ser las interacciones hidrofílicas, pero la especificidad de unión parece ser controlada por los enlaces de hidrogeno y las interacciones electrostáticas, en el análisis de hidrofobicidad, muestra que las regiones hidrofóbicas se encuentran mayormente en dominio CTE de la estructura de *AteqTERT* y cerca del sitio catalítico de la enzima (Figura 3.5f), lo que nos lleva a pensar que en esta región es necesaria para la fidelidad de la enzima.

Finalmente, en la ultimas tres décadas de estudios en telomerasas de diferentes organismos muestran que las telomerasas difieren en sus propiedades catalíticas, en la procesividad y la fidelidad, e inclusive en algunos organismos funcionan como dímeros, que pueden estar relacionados con las actividades no canónicas de la subunidad, debido a ello consideramos que en plantas hay una gran necesidad de realizar estudios desde un punto de vista bioquímico, para poder entender como es que se lleva a cabo la interacción de cada uno de los dominios de TERT y TER, se lleva acabo la regulación desde el ensamble proteico.

3.3.3. Identificación y diseño de anticuerpos de la subunidad TERT de *A. tequilana*

Se realizó un análisis de similitud de secuencia (fenograma) en especies monocotiledóneas y dicotiledóneas con la secuencias aminoácídica de TERT, como grupos externos se utilizó a mamíferos (*Homo sapiens*) y levadura (Figura 3.7a). El análisis mostró que las secuencias de TERT tiene una similitud del 99% y una distancia de 0.17 para especies que pertenecen al género *Agave*, por lo tanto, sugerimos que la subunidad TERT para especies de *Agave*, como *Agave striata* y *Agave victoriae* (Figura 3.7a). En el análisis con otras especies que pertenecen al mismo orden Asparagales como *Scilla piruviana* y *Hosta rectifolia* presentan un porcentaje de similitud del 98% con una distancia de 0.18 y 0.19 respectivamente, por lo cual se puede sugerir que al menos esta subunidad es conservada para los miembros de esta familia (Figura 3.7a). Asimismo, se observó que el porcentaje de similitud es mayor para especies monocotiledóneas que en especies dicotiledóneas (Figura 3.7a). Para plantas, las secuencias aminoácídicas TERT se encuentran en el mismo clado indicando que es una subunidad conservada entre especies diferentes especies de plantas, también se observó que mamíferos (Hrdličková *et al.*, 2012) y levaduras se agrupan de manera similar (Haering *et al.*, 2000). La secuencia aminoácídica de *AteqTERT* presentó un tamaño aproximado de 1175

aminoácidos. Una vez estimada su estructura, se identificó el dominio RT (Figura 3.7b), y los sitios especie específico del dominio RT (Exón 9). El anticuerpo se diseño en el dominio RT y en los sitios con estructuras secundarias en el Exon 9 (Azul), cercana al Exon 9 (amarilla), con un total de 10 aminoácidos para ATER-3 y 11 a.a. para ATER-4 (Figura 3.7b).

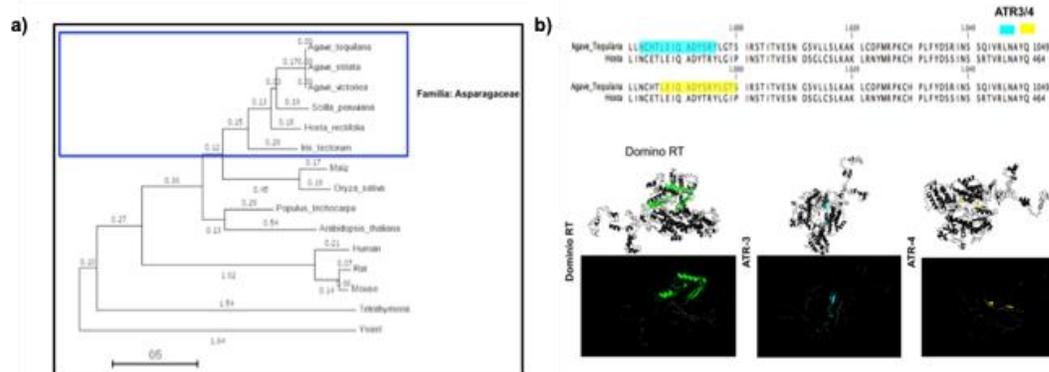


Figura 3.7.- Identificación de la secuencia aminoácídica y el dominio RT de TERT en *A. tequilana*; a) alineamiento utilizando MEGA versión 6.0, y el método de agrupamiento de Neighbor-joining tree, entre diferentes especies de plantas utilizando como grupo externo a mamíferos, ciliado y levadura, b) identificación del dominio RT en secuencia aminoácídica, y en el modelo 3D de la proteína marcado de color verde, la marca color azul aqua es la epitope diseñado para ATR-3 y la marca color amarillo es para ATR-4.

Una vez diseñados los anticuerpos se evaluó la sensibilidad del anticuerpo, obteniendo una sensibilidad de 1/1000 para ATR-3 y 1/4000 para ATR-4 (Figura 3.8a). Para el Western Blot se probaron tres protocolos de extracción de proteínas nucleares y totales, en hoja media, basal y central, obteniendo que en hoja media es donde se observa la mayor cantidad de proteínas de proteínas totales y nucleares (Figura 3.8b).

Para el western blot se utilizó como testigo positivo el anticuerpo monoclonal anti-TERT de conejo, que representa el dominio RT de la secuencia tipo humano, a una concentración de 0.1 μ g. Tomando como base la sensibilidad del anticuerpo mostrado en el dotblot 1/1000 para ATER-3 y ATER-4, observamos señales en el tamaño esperado para el anti-TERT como testigo positivo y dos señales que no se pudieron reproducir en experimentos posteriores para el extracto de Peterson y TRAP (Figura 3.8c), por lo tanto, se deba algún falso positivo.

3.3. Resultados y discusión.

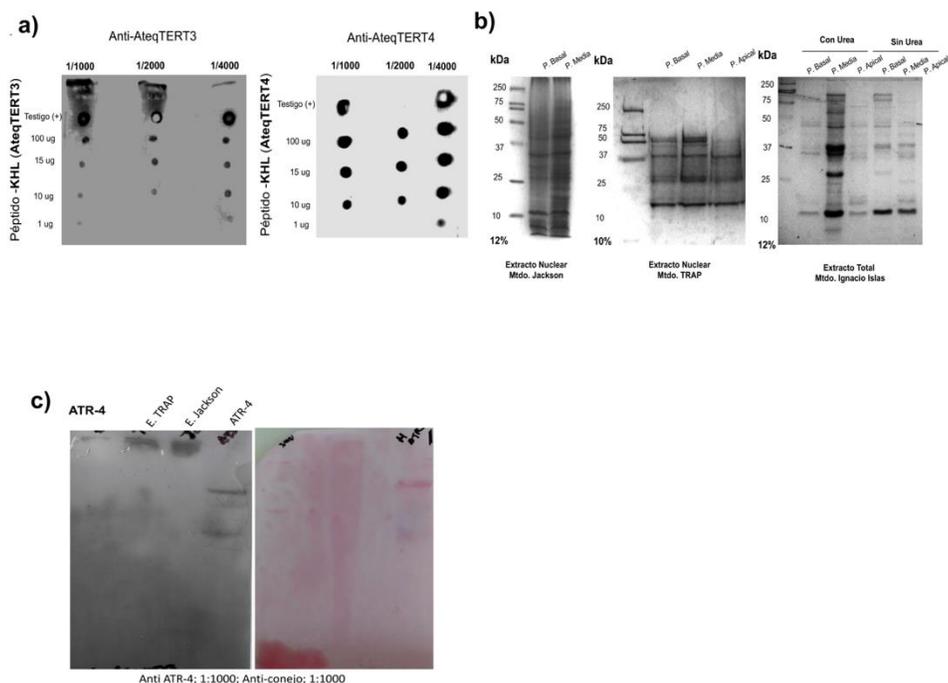


Figura 3.8.- Determinación de la sensibilidad del anticuerpo anti-ATER-3 y ATR-4 e identificación de TERT en extractos de *A. tequilana*; a) ATR-3 y ATR-4 con diferentes concentraciones del péptido sin conjugar y dilución del anticuerpo Anti – AteqTERT de conejo, b) gel de acrilamida al 12%, se verifica la integridad y separación de proteínas nucleares empleando el método de peterson y del extracto TRAP utilizando el método del Dr. Ignacio Islas, c) el Western blot de los extractos nucleares y extracto total; muestra que la transferencia de proteínas (tinción rojo de Ponceu 1X)–se realizó de manera eficiente, mientras que el film evidencia la señal para el extracto amortiguador TRAP y el de peterson, en la parte superior. Testigo positivo, Anti – TERT conejo subunidad TERT humano.

3.3.4. Actividad de telomerasa y expresión de TERT en una planta completa de *A. tequilana* de 2 años

Para determinar la actividad de la telomerasa de *A. tequilana*, la eficiencia de amplificación, se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de extracto de precipitado de meristemo (TEX) 500 µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg, 25 µg, con un R2 = 0.97 indicando que el valor de Ct es directamente proporcional al nivel de extracto utilizado en la reacción (De la Torre Z *et al.*, 2020).

Posteriormente, llevamos a cabo el análisis cuantitativo de TRAP para plantas completas de 2 años de *A. tequilana*. Se analizó la diferencia de actividad entre la hoja central,

media y basal, utilizando puntas de raíz de *A. tequilana* como control positivo (Fig.3.9b), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la hoja central y media, pero una distinción baja, entre hoja, en comparación con la hoja basal con un valor de $P = 0.01$ (Fig.3.9b). Asimismo, observamos que hay una actividad más significativa en la hoja central, seguida de la hoja central y la basal. El desarrollo de las hojas de *A. tequilana* en forma de roseta, la hoja central está más cerca de la zona meristemática y es la hoja más reciente; la hoja basal es la más antigua con tejido más diferenciado. Después de realizar el análisis en las diferentes posiciones de las hojas, se utilizaron las diversas secciones de la hoja central (apical interna (IA), basal interna (IB) y basal externa (EB)). Se usó una concentración de 200 ug y 50 ug de extracto nuclear TEX para TRAP convencional (Fig.3.10a) 3a) y 200 mg para TRAP cuantitativa usando meristemo como control positivo. Los resultados no muestran diferencias significativas entre las secciones IA, IB y EB (Fig.3.10b).

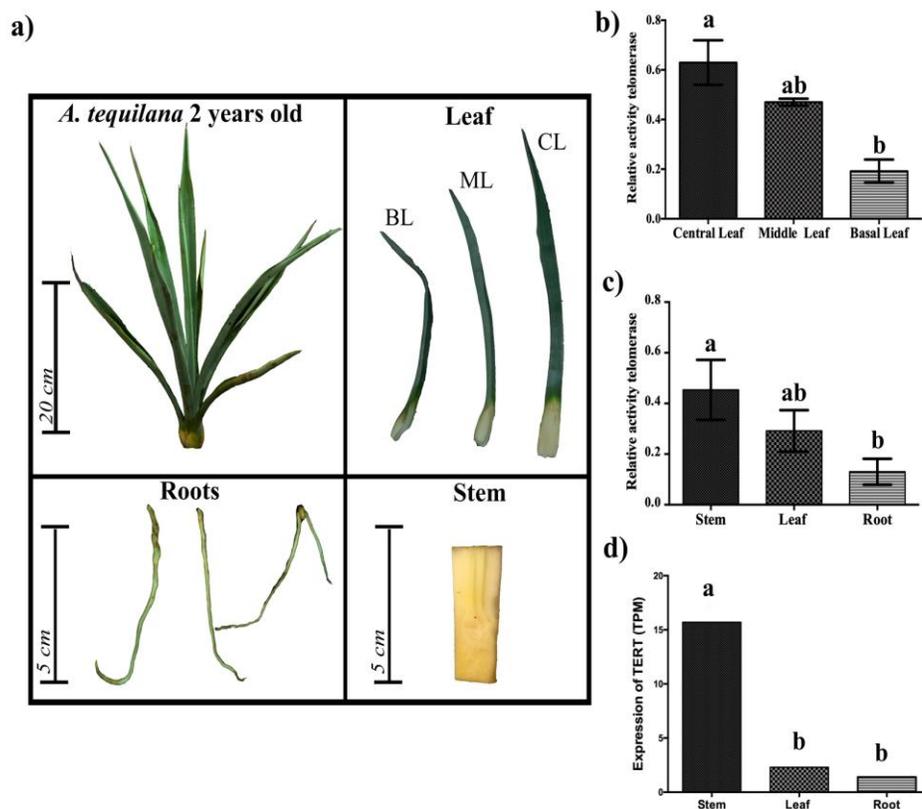


Figura 3. 9.- Actividad y expresión de la telomerasa tisular específica en plantas completas de *A. tequilana* de 2 años de edad; a) diferentes tejidos de toda la

3.3. Resultados y discusión.

planta de *A. tequilana* de 2 años de edad, hoja media (ML), basal (BL), central (CL), raíces y meristemo; b) actividad de telomerasa en la hoja central, media y basal; c) actividad de la telomerasa en diferentes tejidos, meristema, hoja y raíz medias, d) expresión de AteqTERT en TPM de meristema, hoja y raíz en plantas de *A. tequilana* de 2 años de edad

Finalmente, la actividad de la telomerasa se evaluó en el meristemo, la hoja central y la raíz a 200 µg. Utilizando las puntas de las raíces como control positivo, observamos que la actividad en comparación con las puntas de las raíces es inferior a tres órdenes de magnitud para los tejidos de meristemas y hojas. Por lo tanto, la actividad de la telomerasa es alta para meristemas y hojas medianas con diferencias significativas entre meristemas y raíces con un valor de $P < 0,0001$. Además, la diferencia en la actividad de la telomerasa entre la raíz y las puntas de las raíces es más significativa que tres órdenes de magnitud. El tejido con más actividad es el meristemo, seguido de la hoja media y con menos actividad en el tejido radicular. Por lo tanto, la actividad de la telomerasa es específica del tejido y depende de la proliferación celular, como se ha observado ampliamente en diversas especies, tales como; *Nicotiana tabacum*, *Glycine max*, *Daucus carota*, *Brassica oleracea*, *Zea mays* y *Hordeum vulgare* (Fitzgerald *et al.*, 1999; Killian *et al.*, 1998; Fajkus *et al.*, 1996).

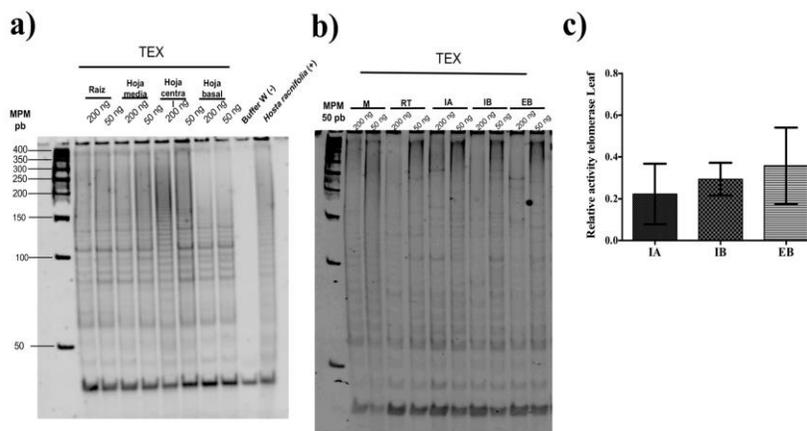


Figura 3.10.- Ensayo de actividad de telomerasa convencional de a) hoja media, basal y central, b) las diferentes regiones de la hoja; apical interna (IA), basal interna (IB) y basal externa (EB); ensayo de actividad de telomerasa cuantitativo de las diferentes regiones de la hoja; apical interna (IA), basal interna (IB) y basal externa (EB).

Sin embargo, en *Nicotiana tabacum* (Heller-Uszynska et al. 2002, Oguchi *et al.*, 2004), han determinado que hay tres copias del gen TERT y que la expresión de cada una de las copias del gen durante el desarrollo modifica la telomerasa actividad (Jurečková *et al.*, 2017). En el caso de *A. tequilana*, se ha observado preliminarmente con análisis transcriptómicos, hibridación fluorescente in situ y en el ADNc la existencia probable de dos copias del gen (datos no mostrados). Además, hemos demostrado por caracterización morfológica e histológica en hojas de *A. tequilana* de 2 años, no hay aumento en el tamaño de la planta ni un aumento significativo en la actividad en comparación con las plantas de un año (De la Torre Espinosa - Z *et al.*, 2020) revelando que puede ser una etapa estacionaria de crecimiento durante su desarrollo. La falta de correlación entre la expresión de TERT y la actividad de la telomerasa en el meristemo puede explicarse ya sea por la expresión de un gen variante que regula la actividad de la telomerasa positiva o negativa o TERT tiene actividades no teloméricas que participan en otros eventos

3.4. Conclusión:

celulares como; proliferación o alargamiento celular. Del mismo modo, otra posibilidad de no correlación entre la expresión del gen TERT y la actividad de la telomerasa puede incluir modificaciones postraduccionales ya que la fosforilación o desfosforilación del complejo de telomerasa también puede modificar su actividad.

3.4. CONCLUSIÓN:

En este trabajo, realizamos que la caracterización de TERT se realizó en *A. tequilana*, para evaluar si la expresión de TERT se correlaciona con la actividad específica del tejido en plantas de dos años; Para esto, utilizamos la biblioteca de transcriptoma de *A. tequilana* (datos no publicados de Ávila de Dios) representada en TPM y análisis cuantitativo de la actividad de telomerasa qTRAP. Observamos en este trabajo que la secuencia de consenso presenta todos los dominios específicos de la subunidad TERT. Además, encontramos que en la predicción *in silico* del modelo estructural de TERT de *A. tequilana*, presenta el anillo TERT característico de los modelos cristalizados de estado activo de telomerasa en *Tetrahymena thermophila*, *Homo sapiens*, *T. Castenum*, algunas anotaciones biológicas entretenidas fueron observados, tales como; Los metales pesados Mg ⁺², NUC y CH1 están presentes en las polimerasas o transcripciones inversas de otros ARN, y finalmente vemos que no hay correlación entre la expresión de TERT en TPM y la actividad de telomerasa en tejido meristemático de dos años.

,

CAPITULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se realizó el análisis morfológico y actividad de la telomerasa durante el periodo vegetativo en el desarrollo de la hoja de *A. tequilana*, encontrando que la actividad de la telomerasa se relaciona más con las actividades celulares que involucra un desarrollo correcto de órganos y tejidos. En este sentido, para la actividad de la telomerasa se ha reportado con anterioridad que la telomerasa es dependiente de la proliferación celular, pero hasta el momento, en plantas, no se había elucidado cual es el papel de la telomerasa en los procesos de la proliferación celular. Nosotros observamos que la actividad de la telomerasa incrementa cuando hay elongación celular en células del mesófilo y haces vasculares, formación de haces vasculares y diferenciación celular. En mamíferos, se ha demostrado que la pérdida de función de TERT además de modificar la talla de las células, provoca cambios en la composición tisular del tejido, así mismo, también se ha demostrado que la ausencia de telomerasa suprime la capacidad proliferativa en células de la epidermis de ratón, lo que provoca un acortamiento telomérico afectando el crecimiento del cabello. Estos estudios demuestran que la longitud telomérica y la actividad de la telomerasa son necesarios para el correcto desarrollo de los tejidos, pero también muestra que la actividad de la telomerasa esta relacionada con las actividades proliferativas independientemente del mantenimiento telomérico, esto se demostrado en hTERT donde se observa que regula aproximadamente 300 genes, incluidos los genes implicados en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Majerská *et al.*, 2011). Además, se ha descubierto que la telomerasa puede promover el crecimiento descontrolado de las células cancerosas, a través de la interacción de las vías involucradas en la regulación del ciclo celular, por ejemplo, el factor pRB (Serrano *et al.*, 1993). Además, en las células de mamíferos, la sobreexpresión de TERT causa hiperplasia en el tejido cardíaco (alargamiento en los tejidos), lo que sigue que hay una participación de la telomerasa en los procesos de alargamiento celular (Oh *et al.*, 2001). En plantas, todavía no se tiene muy claro cual es la participación de la telomerasa en los procesos de proliferación celular, sin embargo, con este estudio se genera un antecedente durante el desarrollo de la hoja de *A. tequilana*, que muestra que la actividad de la telomerasa puede estar

relacionada con los procesos de proliferación celular independientemente del mantenimiento celular.

La caracterización de AteqTERT mostró que la sub-unidad es conservada entre el orden Asparagales; como se ha reportado previamente por Sykorova et al 2003 (Fajkus *et al.*, 2008). En este estudio, se realizó la caracterización *in silico* de la sub – unidad TERT, observamos que la secuencia de TERT presenta tres de los cuatro dominios principales denominados: NTE, TRBD, y RT con un tamaño de 1175 aminoácidos. El diseño de anticuerpos y el aislamiento de la subunidad por medio de técnicas de biología molecular nos podrían dar información acerca de cómo se lleva a cabo la regulación de la actividad de la enzima, pero también nos permite conocer cuáles son las interacciones de TERT con otras proteínas durante el desarrollo. Durante el análisis de la representatividad de TERT en la biblioteca transcriptómica de *A. tequilana*, observamos que en tejido de meristemo la representatividad de TERT no se correlaciona con la actividad de la telomerasa. En otros trabajos, en monocotiledóneas han mostrado que la actividad de la telomerasa se encuentra regulada durante su desarrollo. Sin embargo, la expresión del gen TERT en etapas de desarrollo estacionario, la expresión del gen, no se correlaciona con la actividad de telomerasa obtenida, sugiriendo que la amplia diversidad de variantes del gen por splicing alternativo pueden estar participando en la regulación positiva o negativa del gen (Oguchi *et al.*, 2004). Así mismo, observaron altos niveles de expresión del gen TERT en tejidos con alta división celular, por lo tanto también sugieren que el gen puede estar participando en actividades celulares, independientemente del mantenimiento telomérico. Así mismo, *Nicotiana tabacum* (Oguchi *et al.*, 2004; Heller-Uszynska *et al.* 2002), han determinado que existen tres copias del gen de TERT y la expresión de cada copia del gen durante el desarrollo y modifica la actividad de la telomerasa (Jurečková *et al.*, 2017). Para *A. tequilana*, durante el aislamiento del Exon 9 y el Exon 10 hemos observado que probablemente tenemos dos copias del gen que al igual que *Nicotiana tabacum* puede que la expresión de estos puedan estar modificando la actividad tejida específica. Lo interesante de este trabajo es que nosotros estamos observando que la actividad de la telomerasa se relaciona con las actividades celulares, lo que nos hace pensar en cómo será su regulación genética y sus interacciones con otros genes durante su periodo de crecimiento que dan como resultado la actividad observada.

Sin duda, la identificación de TERT en el extracto nuclear y la determinación de la expresión cuantitativa por RT-PCR y tiempo real, nos ayudara a entender; cuanta cantidad de proteína esta presente en el extracto, que porcentaje es activo y cuanto se expresa, y como se regula la actividad de la telomerasa durante el desarrollo.

CONCLUSIÓN GENERAL

En conclusión, la actividad de la telomerasa en hojas de *A. tequilana* durante su desarrollo tiene dos funciones importantes; 1.- contribuye al mantenimiento de la longitud telomérica, para proporcionar estabilidad genómica durante el desarrollo y 2.- participa en las actividades de la proliferación celular, de esta manera se mantiene la división, elongación y diferenciación celular activos y así se logra el correcto crecimiento del tejido.

La expresión de TERT no se correlaciona con la actividad obtenida en tejidos de dos años probablemente por que este siendo regulada a nivel transcripcional o pos-traducciona de forma tejido específica.

PERSPECTIVAS

- Identificación de TERT en extractos nucleares y totales, para determinar concentración de proteína.
- Expresión del gen TERT tejido específica durante el desarrollo de *A. tequilana*
- Determinar el número de copias del gen y en caso de haber más de una determinar la expresión de sus variantes.
- Aislamiento del gen completo de TERT para el estudio de cada una de sus regiones, para la identificación de sitios de unión a proteína e iniciar con el estudio de la regulación, río arriba o río abajo en la señalización con otras proteínas involucradas en el desarrollo, que nos permita identificar el papel de la telomerasa en los procesos de proliferación celular, en el ciclo celular, elongación, división y diferenciación celular.
- Estudio de las señalizaciones moleculares que están involucrados en el correcto desarrollo y crecimiento de órganos y tejido.
- Análisis en cada una de las fases de desarrollo de *A. tequilana*, para entender los procesos que llevan a la senescencia en plantas.

Referencias

- Arvelo, F., and A. Morales. 2004. Telomero, telomerasa y cancer. *Acta Cientifica Venezolana* 55:288–303.
- Baumann, P., and T. R. Cech. 2001. Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science (New York, N.Y.)* 292:1171–5.
- Belair, C. D., T. R. Yeager, P. M. Lopez, and C. a. Reznikoff. 1998. Telomerase activity: A biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. *Journal of Urology* 160:620–621.
- Bilaud, T., C. E. Koering, E. Binet-Brasselet, K. Ancelin, A. Pollice, S. M. Gasser, and E. Gilson. 1996. The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. *Nucleic Acids Res.* 24:1294-1303.
- Blackburn, E. H. 1997. The telomere and telomerase: nucleic acid-protein complexes acting in a telomere homeostasis system. A review. *Biochemistry. Biokhimiia* 62:1196–1201.
- Blackburn, E. H. 2001. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106:661–673.
- Blackburn, E. H., and K. Collins. 2011. Telomerase: An RNP enzyme synthesizes DNA. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3:1–9.
- Blasco, M. 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature reviews. Genetics* 6:611–22.
- Blasco, M. A., H. W. Lee, M. P. Hande, E. Samper, P. M. Lansdorp, R. A. DePinho, and C. W. Greider. 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91:25–34.
- Blasco, M. a, M. Rizen, C. W. Greider, and D. Hanahan. 1996. Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis. *Nature genetics* 12:200–204.
- Bousios, A., I. Saldana-Oyarzabal, A. G. Valenzuela-Zapata, C. Wood, and S. R. Pearce.

2007. Isolation and characterization of Ty1-copia retrotransposon sequences in the blue agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) and their development as SSAP markers for phylogenetic analysis. *Plant Science* 172:291–298.
- Broccoli, D., A. Smogorzewska, L. Chong, and T. de Lange. 1997. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nature genetics* 17:231–5.
- Cai, L., L. Chen, S. Raghavan, R. Ratliff, R. Moyzis, and A. Rich. 1998. Intercalated cytosine motif and novel adenine clusters in the crystal structure of the *Tetrahymena* telomere. *Nucleic Acids Research* 26:4696–4705.
- Chang, J. T. C., Y. L. Chen, H. T. Yang, C. Y. Chen, and A. J. Cheng. 2002. Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits. *European Journal of Biochemistry* 269:3442–3450.
- Chen, J. J.-L., M. A. Blasco, and C. W. Greider. 2000. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* 100:503–14.
- Chen, J. L., and C. W. Greider. 2003. Template boundary definition in mammalian telomerase. *Genes and Development* 17:2747–2752.
- Chung, H., Y. Hirata, S. Ando, S. Kamachi, and S. Sakai. 2003. Mechanism regulating telomerase activity in *Oryza sativa* L. *Plant Science* 165:43–54.
- Churikov, D., and C. M. Price. 2008. Pot1 and cell cycle progression cooperate in telomere length regulation. *Nature Structural & Molecular Biology* 15:79–84.
- Cifuentes-Rojas, C., K. Kannan, L. Tseng, and D. E. Shippen. 2011. Two RNA subunits and POT1a are components of Arabidopsis telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:73–78.
- Collins, K., and L. Gandhi. 1998. The reverse transcriptase component of the *Tetrahymena* telomerase ribonucleoprotein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:8485–8490.
- Counter, C. M., M. Meyerson, E. N. Eaton, L. W. Ellisen, S. D. Caddle, D. A. Haber, and R.

- A. Weinberg. 1998. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene* 16:1217–22.
- Egan, E. D., and K. Collins. 2012. Biogenesis of telomerase ribonucleoproteins. *RNA* 18:1747–1759.
- Espinosa-Barrera, L. A., L. F. Sánchez-Teyer, A. Quiroz-Moreno, and J. A. Narváez-Zapata. 2018. Identification and characterization of a new satellite-like DNA family in three *Agave* species. *Plant Gene* 16:8–18.
- Fajkus, J., M. Dvořáčková, and E. Sýkorová. 2008. Analysis of telomeres and telomerase. *Methods in Molecular Biology* 463:267–296.
- Fajkus, J., J. Fulnečková, M. Hulánová, K. Berková, K. Říha, and R. Matyášek. 1998. Plant cells express telomerase activity upon transfer to callus culture, without extensively changing telomere lengths. *Molecular and General Genetics* 260:470–474.
- Fajkus, J., A. Kovarik, and R. Kralovics. 1996. Telomerase activity in plant cells. *Federation of European Biology Society Letters* 391:307–309.
- Fitzgerald, M. S., T. D. McKnight, and D. E. Shippen. 1996. Characterization and developmental patterns of telomerase expression in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:14422–7.
- Fitzgerald, M. S., K. Riha, F. Gao, S. Ren, T. D. McKnight, and D. E. Shippen. 1999. Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from *Arabidopsis* inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:14813–14818.
- Frescas, D., and T. de Lange. 2014. TRF2-tethered TIN2 can mediate telomere protection by TPP1/POT1. *Molecular and Cellular Biology* 34:1349–62.
- Fujiwara, H., M. Osanai, T. Matsumoto, and K. K. Kojima. 2005. Telomere-specific non-LTR retrotransposons and telomere maintenance in the silkworm, *Bombyx mori*.

- Ghosh, A., G. Saginc, S. C. Leow, E. Khattar, E. M. Shin, T. D. Yan, M. Wong, Z. Zhang, G. Li, W.-K. Sung, J. Zhou, W. J. Chng, S. Li, E. Liu, and V. Tergaonkar. 2012. Telomerase directly regulates NF- κ B-dependent transcription. *Nature cell biology* 14:1270–81.
- Gilley, D., and E. H. Blackburn. 1999. The telomerase RNA pseudoknot is critical for the stable assembly of a catalytically active ribonucleoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:6621–6625.
- Göhring, J., N. Fulcher, J. Jacak, and K. Riha. 2014. TeloTool: A new tool for telomere length measurement from terminal restriction fragment analysis with improved probe intensity correction. *Nucleic Acids Research* 42:1–10.
- González-Suárez, E., E. Samper, A. Ramírez, J. M. Flores, J. Martín-Caballero, J. L. Jorcano, and M. A. Blasco. 2001. Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *European Molecular Biology Organization Journal* 20:2619–2630.
- Greider, C. W. 1990. Telomeres, telomerase and senescence. *BioEssays* 12:363-369.
- Greider, C. W. 1991. Telomeres. *Current Opinion in Cell Biology* 3:444–451.
- Greider, C. W. 1999. Telomeres do D-loop-T-loop.
- Greider, C. W., and E. H. Blackburn. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* 43:405–413.
- Greider, C. W., and E. H. Blackburn. 1987. The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51:887–898.
- Greider, C. W., and E. H. Blackburn. 1989. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337:331–7.
- Haering, C. H., T. M. Nakamura, P. Baumann, and T. R. Cech. 2000. Analysis of

telomerase catalytic subunit mutants in vivo and in vitro in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:6367–72.

Harley, C. B. 1991. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation Research DNAging* 256:271–282.

Heller-Uszynska, K., W. Schnippenkoetter, and A. Kilian. 2002. Cloning and characterization of rice (*Oryza sativa* L) telomerase reverse transcriptase, which reveals complex splicing patterns. *The Plant Journal : for cell and molecular biology* 31:75–86.

Heller, K., a Kilian, M. a Piatyszek, and a Kleinhofs. 1996a. Telomerase activity in plant extracts. *Molecular and General Genetics : MGG* 252:342–5.

Heller, K., a Kilian, M. a Piatyszek, and a Kleinhofs. 1996b. Telomerase activity in plant extracts. *Molecular and General Genetics* 252:342–5.

Heller, K., A. Kilian, M. A. Piatyszek, and A. Kleinhofs. 1996c. Telomerase activity in plant extracts. *Molecular Genomics and Genetic* 252:342–345.

Hockemeyer, D., W. Palm, T. Else, J.-P. Daniels, K. K. Takai, J. Z.-S. Ye, C. E. Keegan, T. de Lange, and G. D. Hammer. 2007. Telomere protection by mammalian Pot1 requires interaction with Tpp1. *Nature Structural & Molecular Biology* 14:754–761.

Hofr, C., P. Sultesová, M. Zimmermann, I. Mozgová, P. Procházková Schrupfová, M. Wimmerová, and J. Fajkus. 2009. Single-Myb-histone proteins from *Arabidopsis thaliana*: a quantitative study of telomere-binding specificity and kinetics. *The Biochemical Journal* 419:221–228, 2 p following 228.

Holt, S. E., D. L. Aisner, J. W. Shay, and W. E. Wright. 1997. Lack of cell cycle regulation of telomerase activity in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:10687–10692.

Hrdličková, R., J. Nehyba, S. L. Lim, F. Grützner, and H. R. Bose. 2012. Insights into the evolution of mammalian telomerase: Platypus TERT shares similarities with genes of

- birds and other reptiles and localizes on sex chromosomes. *BioMed Central Genomics* 13:216.
- Hwang, H., N. Buncher, P. L. Opresko, and S. Myong. 2012. POT1-TPP1 regulates telomeric overhang structural dynamics. *Structure* 20:1872–1880.
- Jurečková, J. F., E. Sýkorová, S. Hafidh, D. Honys, J. Fajkus, and M. Fojtová. 2017. Tissue-specific expression of telomerase reverse transcriptase gene variants in *Nicotiana tabacum*. *Planta* 245:549–561.
- Kazda, A., B. Zellinger, M. Rössler, E. Derboven, B. Kusenda, and K. Riha. 2012. Chromosome end protection by blunt-ended telomeres. *Genes and Development* 26:1703–1713.
- Khalid, I., M.A. Khan, and S. Pearce. 2012. Ty1-Copia retrotransposons are heterogeneous, extremely high copy number and are major players in the genome organization and evolution of *Agave tequilana*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59:575–587.
- Killan, A., K. Heller, and A. Kleinhofs. 1998. Development patterns of telomerase activity in barley and maize. *Plant Molecular Biology* 37:621–628.
- Kim, J. H., W. T. Kim, and I. K. Chung. 1998. Rice proteins that bind single-stranded G-rich telomere DNA. *Plant Molecular Biology* 36:661–672.
- Kim, S. H., S. Han, Y. H. You, D. J. Chen, and J. Campisi. 2003. The human telomere-associated protein TIN2 stimulates interactions between telomeric DNA tracts in vitro. *European Molecular Biology Organization Journal* 4:685–691.
- Kim, S. H., P. Kaminker, and J. Campisi. 1999. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nature Genetics* 23:405–412.
- Lai, C. K., J. R. Mitchell, and K. L. Collins. 2001. RNA Binding Domain of Telomerase Reverse Transcriptase. *Molecular and Cellular Biology* 21:990–1000.
- Lamb, J. C., W. Yu, F. Han, and J. a. Birchler. 2007. Plant chromosomes from end to end:

- telomeres, heterochromatin and centromeres. *Current Opinion in Plant Biology* 10:116–122.
- De Lange, T. 2005a. Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes and Development* 19:2100–2110.
- De Lange, T. 2005b. Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres.
- Lee, M. S., and E. H. Blackburn. 1993. Sequence-specific DNA primer effects on telomerase polymerization activity. *Molecular and Cellular Biology* 13:6586–99.
- Liang, J., C. Jiang, H. Peng, Q. Shi, X. Guo, Y. Yuan, and L. Huang. 2015. Analysis of the age of *Panax ginseng* based on telomere length and telomerase activity. *Scientific reports* 5:7985.
- Liu, D., M. S. O'Connor, J. Qin, and Z. Songyang. 2004. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *Journal of Biological Chemistry* 279:51338–51342.
- Liu, J. P. 1999. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13:2091–104.
- Loayza, D., and T. De Lange. 2003. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 423:1013–8.
- Longtine, M. S., N. M. Wilson, M. E. Petracek, and J. Berman. 1989. A yeast Telomere Binding Activity binds to two related telomere sequence motifs and is indistinguishable from RAPT. *Current Genetics* 16:225–239.
- Marian, C. O., S. J. Bordoli, M. Goltz, R. A. Santarella, L. P. Jackson, O. Danilevskaya, M. Beckstette, R. Meeley, and H. W. Bass. 2003. The maize Single myb histone 1 gene, *Smh1*, belongs to a novel gene family and encodes a protein that binds telomere DNA repeats in vitro. *Plant Physiology* 133:1336–50.

- Mattern, K. A., S. J. Swiggers, A. L. Nigg, B. Lowenberg, A. B. Houtsmuller, and J. M. Zijlmans. 2004. Dynamics of protein binding to telomeres in living cells: implications for telomere structure and function. *Molecular Cell Biology* 24:5587–5594.
- McClintock, B. 1941. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* 26:234–282.
- Mitchell, J. R., J. Cheng, and K. Collins. 1999. A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Molecular and Cellular Biology* 19:567–76.
- Mitchell, J. R., and K. Collins. 2000. Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Molecular cell* 6:361–71.
- Mu, Y., L. Ren, X. Hu, Y. Zhao, H. Li, H. Lu, and D. Liu. 2015. Season-specific changes in telomere length and telomerase activity in Chinese pine (*Pinus tabulaeformis* Carr.). *Russian Journal of Plant Physiology* 62:487–493.
- Navajas-Pérez, R., T. Schwarzacher, M. Ruiz Rejón, and M. A. Garrido-Ramos. 2009. Characterization of RUSI, a telomere-associated satellite DNA, in the genus *Rumex* (Polygonaceae). *Cytogenetic and Genome Research* 124:81–89.
- Oguchi, K., K. Tamura, and H. Takahashi. 2004. Characterization of *Oryza sativa* telomerase reverse transcriptase and possible role of its phosphorylation in the control of telomerase activity. *Gene* 342:57–66.
- Olovnikov, A. M. 1973. A theory of marginotomy. *Journal of Theoretical Biology* 41:181–190.
- Peterson, G. L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83:346–356.
- Phan, A. T. 2010. Human telomeric G-quadruplex: Structures of DNA and RNA sequences.

- Piatyszek, M. a., N. W. Kim, S. L. Weinrich, K. Hiyama, E. Hiyama, W. E. Wright, and J. W. Shay. 1995. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Methods in Cell Science* 17:1–15.
- Prowse, K. R., A. A. Avilion, and C. W. Greider. 1993. Identification of a nonprocessive telomerase activity from mouse cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:1493–1497.
- Rajavel, M., M. R. Mullins, and D. J. Taylor. 2014. Multiple facets of TPP1 in telomere maintenance.
- Ren, S., J. S. Johnston, D. E. Shippen, and T. D. McKnight. 2004. *TELOMERASE ACTIVATOR1* induces telomerase activity and potentiates responses to auxin in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 16:2910–2922.
- Rescalvo-Morales, A., K. M. Monja-Mio, G. Herrera-Herrera, M. L. Robert, and L. F. Sánchez-Teyer. 2016. Analysis of telomere length during the organogenesis induction of *Agave fourcroydes* Lem and *Agave tequilana* Weber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 127:135–143.
- Riha, K., T. D. McKnight, L. R. Griffing, and D. E. Shippen. 2001. Living with genome instability: plant responses to telomere dysfunction. *Science (New York, N.Y.)* 291:1797–1800.
- Rodriguez-Brenes, I. a, and C. S. Peskin. 2010. Quantitative theory of telomere length regulation and cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:5387–5392.
- Schrumpfová, P. P., M. Kuchař, J. Paleček, and J. Fajkus. 2008. Mapping of interaction domains of putative telomere-binding proteins AtTRB1 and AtPOT1b from *Arabidopsis thaliana*. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 582:1400–1406.
- Sfeir, A., and T. de Lange. 2012. Removal of Shelterin Reveals the Telomere End-Protection Problem. *Science* 336:593–597.

- Shammas, M. a, H. Koley, R. B. Batchu, R. C. Bertheau, A. Protopopov, N. C. Munshi, and R. K. Goyal. 2005. Telomerase inhibition by siRNA causes senescence and apoptosis in Barrett's adenocarcinoma cells: mechanism and therapeutic potential. *Molecular cancer* 4:24.
- Shawi, M., and C. Autexier. 2008. Telomerase, senescence and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 129:3–10.
- Shippen, D. E., and T. D. McKnight. 1998. Telomeres, telomerase and plant development.
- Song, H., D. Liu, F. Li, and H. Lu. 2011. Season- and age-associated telomerase activity in *Ginkgo biloba* L. *Molecular Biology Reports* 38:1799–1805.
- van Steensel, B., and T. de Lange. 1997. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385:740–3.
- Stern, J. L., K. G. Zyner, H. a. Pickett, S. B. Cohen, and T. M. Bryan. 2012. Telomerase Recruitment Requires both TCAB1 and Cajal Bodies Independently. *Molecular and Cellular Biology* 32:2384–2395.
- Sýkorová, E., A. R. Leitch, and J. Fajkus. 2006. Asparagales telomerases which synthesize the human type of telomeres. *Plant Molecular Biology* 60:633–646.
- Takai, K. K., T. Kibe, J. R. Donigian, D. Frescas, and T. de Lange. 2011. Telomere Protection by TPP1/POT1 Requires Tethering to TIN2. *Molecular Cell* 44:647–659.
- Taylor, D. J., E. R. Podell, D. J. Taatjes, and T. R. Cech. 2011. Multiple POT1-TPP1 proteins coat and compact long telomeric single-stranded DNA. *Journal of Molecular Biology* 410:10–17.
- Venteicher, A. S., E. B. Abreu, Z. Meng, K. E. McCann, R. M. Terns, T. D. Veenstra, M. P. Terns, and S. E. Artandi. 2009. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science (New York, N.Y.)* 323:644–8.
- Wang, F., E. R. Podell, A. J. Zaug, Y. Yang, T. R. Cech, P. Baciú, and M. Lei. 2007. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* 445:506–

10.

Wang, H., and E. H. Blackburn. 1997. De novo telomere addition by *Tetrahymena* telomerase in vitro. *European Molecular Biology Organization Journal* 16:866–879.

Wang, H., D. Gilley, and E. H. Blackburn. 1998. A novel specificity for the primer-template pairing requirement in *Tetrahymena* telomerase. *European Molecular Biology Organization Journal* 17:1152–1160.

Yang, S. W., E. Jin, I. K. Chung, and W. T. Kim. 2001. Expression of telomerase activity is closely correlated with the capacity for cell division in tobacco plants. *Journal of Plant Biology* 44:168–171.

Yu, G. L., J. D. Bradley, L. D. Attardi, and E. H. Blackburn. 1990. In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs. *Nature* 344:126–32.

Zeng, Z., B. Min, J. Huang, K. Hong, Y. Yang, K. Collins, and M. Lei. 2011. Telomerase and Retrotransposons: Reverse Transcriptases That Shaped Genomes Special Feature Sackler Colloquium: Structural basis for *Tetrahymena* telomerase processivity factor *Teb1* binding to single-stranded telomeric-repeat DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:20357–20361.

Zentgraf, U. 1995. Telomere-binding proteins of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 27:467–475.

Zhang, Q., N.-K. Kim, and J. Feigon. 2011. Architecture of human telomerase RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:20325–32.

Zhong, F. L., L. F. Z. Batista, A. Freund, M. F. Pech, A. S. Venteicher, and S. E. Artandi. 2012. TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. *Cell* 150:481–494.

