



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL  
UNIDAD IRAPUATO**

Identificación de intervenciones genéticas y farmacológicas que  
extienden la longevidad de la levadura en restricción dietética

Tesis que presenta:

**L.C.G. Erika Viridiana Cruz Bonilla**

Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias**

En la especialidad de biotecnología de Plantas

Director de tesis:

**Dr. Alexander de Luna Fors**

Irapuato, Guanajuato.

Noviembre, 2017

Identificación de intervenciones genéticas y farmacológicas que extienden la longevidad de la levadura en restricción dietética

Erika Viridiana Cruz Bonilla

Este trabajo de Tesis de Maestría se realizó en el Laboratorio 6 “Biología de Sistemas Genéticos” de la Unidad de Genómica Avanzada (Langebio) del CINVESTAV-IPN Irapuato bajo la dirección del Dr. Alexander de Luna Fors. En el comité de asesores participaron también los doctores Sean Michael Rovito y Ceil Abreu Goodger. Se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México a través del programa de Investigación Científica Básica (CB2015/164889) y el programa de becas para estudios de posgrado (CVU 711011), así como del CINVESTAV-IPN a través de una beca para obtención de grado.

## Agradecimientos

Durante el tiempo que tomé para realizar esta tesis, tuve la dicha de contar con el apoyo de muchas personas, las cuales me dieron su consejo tanto en las cuestiones laborales como las personales.

Primero quiero agradecer a mis padres, quienes siempre a la distancia han sido mis más grandes consejeros. Les agradezco todo el apoyo que me han brindado en mi búsqueda por el mundo científico.

A mi comité de tesis, Sean y Cei, quienes aportaron discusión y consejos para darle forma al proyecto que está plasmado en esta tesis.

A Alex de Luna, por su gentil dirección a lo largo de la maestría y por la ayuda en la discusión y planteamiento de los experimentos llevados a cabo en este proyecto. También muchas gracias por tu comprensión y paciencia durante las épocas difíciles que se presentaron este año.

Agradezco también a todos mis compañeros del laboratorio seis, los viejos y los nuevos, que de una u otra manera me han ayudado en la discusión, realización de experimentos y motivación necesaria para concluir mi maestría. Gracias a Sergio y Abraham por las discusiones y ayuda en la planeación de los experimentos. Gracias a Adriana y Diana por sus consejos para seguir adelante en la vida académica y los aspectos personales. Gracias a Selene, Alex Juárez, Daniel, Judith, Michelle, Mayra y Mauricio por su gran apoyo e increíble dinámica de laboratorio. Todos ustedes hacen que cualquier día sea extraordinario.

Y finalmente, le agradezco a mi querida Ximena, quién ha estado a mi lado en los momentos buenos y malos, además de que me ha dado apoyo e inspiración en los momentos en los que esta tesis parecía no terminar.

# Contenido

1. Resumen .....	1
2. <i>Abstract</i> .....	3
3. Introducción .....	5
3.1 La restricción dietética (DR) es una intervención que extiende la longevidad	5
3.1.1 Los procesos activados por la restricción dietética que extienden la longevidad .....	8
3.1.2 Las vías de señalización responsables de la extensión en esperanza de vida por restricción dietética .....	9
3.1.3 La vía de la restricción dietética está conservada en varios organismos ..	12
3.2 Levadura como modelo de envejecimiento .....	13
3.3 Otras intervenciones que extienden la longevidad también utilizan la vía de restricción dietética .....	14
3.4 Gln3 y la represión catabólica de nitrógeno .....	17
4. Antecedentes .....	19
5. Hipótesis .....	22
6. Objetivo general .....	22
6.1 Objetivos específicos .....	22
7. Materiales y métodos .....	23
8. Resultados .....	30
8.1 Elección de las mutantes candidatas a regular la longevidad independientemente de la restricción dietética .....	30
8.2 Ensayo piloto de CLS para verificar los efectos de las mutantes candidatas .....	31
8.3 Ensayo de CLS por cinética de crecimiento a gran escala para corroborar los efectos de las mutantes candidatas .....	35

8.4 Mutantes que extienden la longevidad tanto en condiciones de DR como NR .....	37
8.5 La metformina es un tratamiento farmacológico que extiende la longevidad aún en condiciones de restricción dietética.....	39
8.6 Los tratamientos farmacológicos imitadores de la DR continúan extendiendo la longevidad en algunas mutantes candidatas.....	42
8.7 Búsqueda de genes que interactúan con Gln3 para modular la longevidad	49
8.8 Cálculo de la epistasis y búsqueda de términos GO sobrerrepresentados en los genes que interactúan con <i>GLN3</i> .....	57
8.9 Probables mecanismos mediante los cuales la mutante <i>gln3Δ</i> aumenta la longevidad.....	64
8.10 La mutante <i>gln3Δ</i> no interactúa directamente con la vía de Tor para incrementar la longevidad. ....	68
9. Discusión.....	71
10. Conclusiones.....	75
11. Perspectivas.....	76
12. Referencias .....	79
13. Anexo .....	84

## 1. Resumen

La esperanza de vida es un fenotipo complejo que puede ser modulado tanto por factores genéticos como por factores ambientales. Una de las intervenciones ambientales que consistentemente extiende la esperanza de vida de varios organismos es la restricción dietética, la cual consiste en la reducción de la ingesta de alimentos sin causar malnutrición. Con la ayuda de organismos modelo, como *Saccharomyces cerevisiae*, algunos de los genes responsables de extender la longevidad en respuesta a la restricción dietética han sido identificados, muchos de los cuales se encuentran conservados a través de las especies. Este conjunto de genes responsivos a la restricción dietética se encuentra agrupado en lo que se conoce como “la vía de la restricción dietética”. Dado que se ha encontrado que muchos de los moduladores genéticos de la esperanza de vida pertenecen a la vía de la restricción dietética, queda la interrogante de si existen otras vías que podrían modular la esperanza de vida independientemente de esta vía.

En este trabajo, presentamos una búsqueda a gran escala de mutantes de delección que extienden la esperanza de vida cronológica de levadura independientemente de la restricción dietética. A partir de un ensayo a escala genómica de mutantes de delección bajo condiciones de restricción dietética y no restricción, seleccionamos aquellas mutantes cuya esperanza de vida se encontraba relativamente incrementada en comparación a la esperanza de vida de la cepa silvestre en ambas condiciones. Las mutantes candidatas fueron evaluadas más a fondo mediante la medición de su esperanza de vida bajo condiciones que imitan la esperanza de vida, como el tratamiento con los fármacos rapamicina, metformina y espermidina, así como otras variantes de la restricción dietética. Encontramos dos genes candidatos cuya delección incrementa la esperanza de vida y cuyos efectos podrían actuar independientemente de la vía de la restricción dietética: *GLN3* y *BAS1*.

También reportamos el efecto de la combinación de los fármacos metformina y espermidina con el tratamiento de restricción dietética. Sugerimos que la metformina

podría actuar mediante mecanismos diferentes a los de la restricción dietética, ya que extiende la longevidad aún en combinación con la restricción dietética.

Para describir aquellos genes y procesos celulares mediante los cuales *gln3Δ* incrementa la esperanza de vida, llevamos a cabo un ensayo de interacciones genéticas en el cual medimos la esperanza de vida de las mutantes sencillas y dobles de *GLN3* contra una colección de factores de transcripción que controlan los principales procesos celulares en *S. cerevisiae* y genes cuya delección modifica la esperanza de vida. A partir del análisis de éste experimento proponemos que la mutante *gln3Δ* extiende la longevidad a través de la regulación de procesos celulares como la autofagia, la respiración celular y el control de ciclo celular, entre otros procesos.

## 2. Abstract

Lifespan is a complex phenotype that can be modulated by both genetic and environmental factors. One of the environmental interventions that consistently extends the lifespan of organisms is dietary restriction (DR), which consists on the reduction of food intake without causing malnutrition. With the aid of model organisms such as *Saccharomyces cerevisiae*, genes affecting lifespan in response to DR have been identified, many of which are conserved across species. This set of dietary responsive genes are grouped into what is known as the “dietary restriction pathway”. Since many of the genetic modulators of lifespan have been found out to belong to the DR pathway, the question remains whether or not there are other pathways that could modulate lifespan independently of this pathway.

In this project, we present a high-throughput genetic screening for knock-out mutants that extend the chronological lifespan of yeast independently of dietary restriction. Based on the data obtained from a genome-wide screening of knock-out mutants under conditions of DR and non-DR, we selected those mutants whose lifespan was increased relatively to wild type under both conditions. Candidate mutants were further tested by assessing lifespan under conditions that mimic dietary restriction, such as pharmaceutical treatment with rapamycin, metformin and spermidine, and other dietary restriction variants. We identified two candidate genes whose deletion mutant increments lifespan and which may act independently of the dietary restriction pathway: *GLN3* and *BAS1*.

Also, we report the effect of the combination of the pharmaceutical treatments metformin and spermidine with dietary restriction. We suggest that metformin may act through mechanisms that differ from those used by dietary restriction, since metformin extends lifespan even in combination with dietary restriction.

To describe the genes and cellular processes by which *gln3Δ* increases lifespan, we carried out a genetic-interaction assay by measuring the lifespan of double and single mutants of *GLN3* against a collection of transcriptional factors controlling the principal cellular processes in *S. cerevisiae* and genes whose deletion modifies

lifespan. From the analysis of this experiment, we propose that mutant *gln3Δ* extends lifespan through the regulation of cellular processes such as autophagy, cellular respiration and invasive growth, among others.

### 3. Introducción

#### 3.1 La restricción dietética (DR) es una intervención que extiende la longevidad

La restricción dietética es una intervención ambiental que consiste en la disminución de calorías ingeridas sin causar malnutrición. La reducción en alimento ingerido debe de ser mínimo entre 30-40% menos que la cantidad de alimento ingerido *ad libitum* [3]. Existen distintos tipos de restricción dietética dependiendo del elemento reducido en la dieta [4]. La restricción dietética se puede realizar disminuyendo proporcionalmente todos los elementos de la dieta, disminuyendo así el consumo total de calorías. También se puede realizar la restricción dietética al reducir únicamente la cantidad disponible de fuente de carbono o nitrógeno o el cambio de una fuente preferida de nutrientes a una que el organismo procese más difícilmente [5, 6]. Igualmente se ha demostrado que la disminución de ciertos aminoácidos específicos como la metionina también funciona como una forma de restricción dietética y extiende la longevidad [7].

La restricción dietética extiende la longevidad brindando protección contra la deterioración senescente, manteniendo a los organismos bajo este tratamiento en un estado físico y de salud óptimos [8, 9]. También retrasa la aparición de enfermedades típicas de la vejez, como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, la diabetes, entre otras [9]. Los efectos de esta intervención se han observado en una variedad de organismos tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus* y *Macaca mulatta*, entre otros [3].

Existen varias teorías del cómo la restricción dietética logra extender la esperanza de vida. La más antigua de ellas, formulada en 1935, propone que la extensión en la longevidad observada se debe al retraso en el crecimiento causada por la restricción dietética. Entonces se creía que el iniciar el tratamiento lo más pronto posible extendía más la longevidad ya que se impedía la aceleración del crecimiento

causada por el desarrollo del individuo. Sin embargo, un estudio en ratas encontró que no hay diferencia en el porcentaje de supervivientes entre un grupo de ratas cuyo tratamiento inició justo después del destete y otro grupo que inició la restricción dietética después de que los individuos se desarrollaran por completo [10]. Por otra parte, este estudio se vió respaldado por los resultados de Weindruch *et al* (1982), quienes reportan que iniciar el tratamiento de restricción dietética a ratones con un año de vida, los cuales a esa edad ya son considerados adultos completamente desarrollados, también extiende la longevidad [11]. Por lo tanto, la tendencia a se ha inclinado a pensar que la edad de inicio del tratamiento no determina la eficacia del mismo y muy probablemente la restricción dietética no aumenta la esperanza de vida al retardar el crecimiento.

Otra de las hipótesis propone que el aumento en la esperanza de vida se debe a la disminución de la grasa corporal en individuos bajo restricción dietética. Esta hipótesis surgió de la observación de que altos niveles de grasa corporal están asociados a muertes prematuras en humanos. Sin embargo, un estudio de Bertrand *et al* (1980) desafía esta hipótesis al reportar que no existe correlación entre la grasa corporal y la esperanza de vida [12].

También se ha propuesto que el efecto sobre la longevidad de la restricción dietética podría deberse a una reducción en la tasa metabólica en el organismo. Esto se propuso en 1977 a partir de los estudios que demostraban que la tasa metabólica en los humanos se hace más lenta al reducir la ingesta de alimentos. Si bien es cierto que la tasa metabólica disminuye al iniciar el tratamiento de restricción dietética, otros estudios en ratas y monos demostraron que esta disminución es solo temporal y que la tasa metabólica regresa a los mismos niveles que los de los sujetos no sometidos a la restricción dietética [13, 14]. El debate respecto a esta hipótesis continúa, ya que no existe un acuerdo respecto a cómo debería de reportarse la tasa metabólica.

Harman propuso en 1956 que el deterioro en el organismo que observamos como envejecimiento se debe al daño acumulado causado por los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno [15]. Entonces, se formuló la hipótesis de que la

restricción dietética extendía la longevidad al disminuir el daño oxidativo. Esta hipótesis parece ser en parte cierta, debido a que en ratones y monos sometidos a restricción dietética es apreciable una disminución en la acumulación de especies reactivas de oxígeno [16, 17]. Además, en apoyo a esta hipótesis se ha observado que en ratas bajo restricción dietética hay sobreexpresión de proteínas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa y catalasa [18]. Sin embargo, los efectos de la restricción dietética sobre la producción de especies reactivas de oxígeno y la expresión de proteínas antioxidantes no son consistentes a través de los organismos; en ratas sometidas a restricción dietética se observa una atenuación en la expresión de la proteína superóxido dismutasa, contrario a lo que se esperaría según la hipótesis, además que en *D. melanogaster* se ha reportado que no hay correlación entre la esperanza de vida y la producción de especies reactivas de oxígeno [19, 20]. Hoy en día sabemos que las especies reactivas de oxígeno juegan un papel en el envejecimiento; estos compuestos son los responsables de una parte del daño acumulado al propiciar el daño al ADN, proteínas y lípidos [3]. Sin embargo la sobreproducción de estos compuestos no tiene efectos solamente dañinos, ya que existe evidencia de que también ocupan papeles como reguladores de genes, señaladores celulares, reguladores de la diferenciación celular, etc. [21]. Por lo tanto se ha formulado una nueva hipótesis en la que el envejecimiento no se debe a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, sino a la perturbación de la red de señalización de las especies reactivas de oxígeno [21].

Finalmente, también se ha propuesto que la restricción dietética actúa como un estrés ligero al organismo y que este nivel de estrés es suficiente para incitar a los mecanismos de protección y así preparar al individuo para futuros agentes dañinos [22]. De esta manera se reduce el daño ocasionado al organismo y se extiende la longevidad. Se postula que esta respuesta evolucionó para mejorar la adecuación de los organismos durante épocas de hambruna al permitirles redireccionar los recursos disponibles de los procesos de reproducción y crecimiento hacia el mantenimiento y protección del organismo [23]. Esta teoría también predice que los mecanismos responsables del efecto de la restricción dietética sobre la longevidad

deben de estar genéticamente conservados y por lo tanto la restricción dietética tendrá efecto en una diversidad de especies [3, 23]. Al momento esta es la teoría prevalente del por qué la restricción dietética incita la extensión de la esperanza de vida, sin embargo los mecanismos exactos mediante los cuáles actúa no son conocidos para ningún organismo.

### **3.1.1 Los procesos activados por la restricción dietética que extienden la longevidad**

A pesar de que no se conozcan todas las posibles causas de la extensión de la longevidad bajo condiciones de restricción dietética, sí se han reportado varios cambios fisiológicos comunes en respuesta a este tratamiento en varios organismos. Algunos de estos cambios son un incremento en la resistencia a varios estreses, disminución de la biogénesis de ribosomas o activación de la autofagia.

Se ha observado que el someter a los individuos a condiciones de restricción dietética también aumenta la resistencia a una variedad de estreses ambientales. En *C.elegans* se ha verificado que aquellos gusanos sometidos a DR presentan también incremento en su resistencia a estrés térmico [24, 25]. Igualmente *C. elegans* también presenta resistencia a estrés oxidativo cuando se encuentra bajo restricción dietética [25].

Otro de los cambios fisiológicos que se han observado en *C. elegans* y *Drosophila*, al iniciar el tratamiento con restricción dietética, es que aumenta la función mitocondrial y la tasa de respiración. La reducción en nutrientes conlleva a un cambio en la manera de administrar y producir la energía en la célula. Una dieta en restricción favorece la utilización de la vía de oxidación para obtener energía [26]. A su vez, la restricción dietética incrementa el número de mitocondrias y la expresión de genes mitocondriales, llevando a una mayor tasa de respiración [27]. En levadura también se ha reportado que aunque no siempre exista una mayor cantidad de mitocondrias en respuesta a restricción dietética, sí existe una mayor capacidad

respiratoria en las células debido a una sobreproducción de subunidades mitocondriales necesarias para llevar a cabo la fosforilación oxidativa [28].

La iniciación y elongación de la traducción también son procesos modificados por la restricción dietética. Bajo las condiciones de bajo nutrientes se ha detectado una menor biosíntesis de ribosomas y menor tasa de iniciación de la traducción. De acuerdo con esto, la inhibición de las proteínas ribosomales y factores de iniciación de la traducción en *C. elegans* en una dieta regular imita la extensión en longevidad observada en la restricción dietética [24].

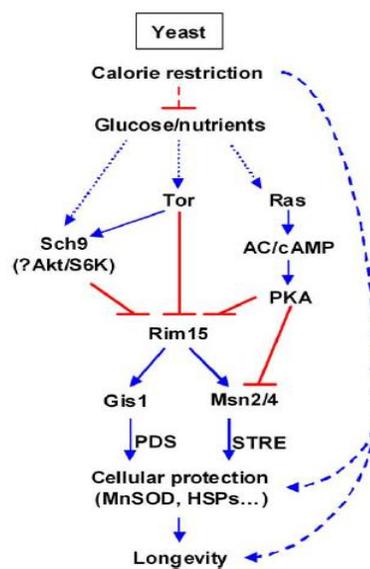
También se ha observado un aumento en la actividad autofágica en condiciones de restricción dietética. En condiciones de alto nivel de nutrientes la autofagia se encuentra reprimida, sin embargo, este proceso se activa en respuesta a niveles bajos de nutrientes. Se cree que en estas condiciones la activación de la autofagia sirve para reciclar componentes celulares y eliminar proteínas dañadas de la célula [26]. También en *C. elegans* se ha demostrado que la presencia de los genes que activan la autofagia es necesaria para la extensión de la longevidad en DR, la delección de estos genes suprime en parte el aumento de la esperanza de vida al iniciar el tratamiento con restricción dietética [29].

### **3.1.2 Las vías de señalización responsables de la extensión en esperanza de vida por restricción dietética**

En levadura, la extensión en la esperanza de vida observada en el tratamiento de restricción dietética depende principalmente de la regulación de las vías Tor/Sch9/Rim15 y Ras/cAMP/PKA/Rim15 (Figura 1). A este conjunto de vías de señalización celular se les conoce coloquialmente como la vía de la restricción dietética. Los principales reguladores de la vía Tor/Sch9/Rim15 y por los cual recibe su nombre, son los complejos TOR [26]. En levadura existen dos complejos: Tor1 y Tor2. Ambos son cinasas de serina/treonina encargadas de regular el crecimiento y la supervivencia celular, pero Tor1 es la cinasa con mayor efecto sobre estos dos fenotipos. Esta cinasa es el regulador maestro de la vía de Tor/Sch9/Rim15: al estar

activa favorece el crecimiento celular y la proliferación. En cambio, en condiciones de bajos nutrientes, la actividad de Tor1 disminuye y se aumenta la esperanza de vida de las células en división y quiescentes [30]. Las mutaciones de pérdida de función de *TOR1* simulan el tratamiento con restricción dietética y extienden la longevidad, mientras que la aplicación de la DR en estas mutantes no es capaz de extender en la misma medida la longevidad, lo que confirma que la regulación de Tor1 es un factor que regula el efecto de la restricción dietética [31].

Tor1 actúa en conjunto con la cinasa de serina/treonina Sch9. En un medio rico, Sch9 se encuentra activo y promueve el crecimiento celular, activa la biosíntesis de proteínas de ribosomas y promueve la progresión del ciclo celular. Además Sch9 inhibe la respuesta general de estrés mediante la inhibición de la cinasa Rim15 [31]. Al igual que con Tor1, la inhibición ó deleción de Sch9 simula los efectos de la restricción dietética y aumenta la longevidad.



**Figura 1. Vías reguladoras de la longevidad mediada por restricción dietética en levadura.**

Se muestran los principales elementos de la vía de la restricción dietética: la vía Tor/Sch9/Rim15 y la vía Ras/Camp/PKA. Primero los nutrientes son sentidos y la señal traducida por los sensores Sch9, Tor y Ras. Las señales convergen en Rim15 el cual activa a los factores de transcripción de respuesta a estrés Gis1, Msn2 y Msn4. Figura modificada de Wei *et al.* (2008).

Por otra parte, existe la vía de Ras/cAMP/PKA/Rim15 que es necesaria para activar el efecto de la restricción dietética [31]. Esta vía comienza con la cinasa Ras2, la cual se encarga de activar otras cinasas de señalización: AC/cAMP y PKA. Esta última se encarga de reprimir a Rim15 y al factor de transcripción Msn2/4, inhibiendo así la respuesta celular al estrés. La deleción de cualquiera de estas cinasas también resulta en extensión de la longevidad y resistencia a estrés oxidativo y térmico [32].

Ambas vías, Tor/Sch9/Rim15 y Ras/cAMP/PKA/Rim15 convergen en la regulación de la cinasa Rim15, la cual se encarga de integrar las señales de ambas vías (Figura 1). La actividad de Rim15 es sensible a los niveles de glucosa en la célula: altos niveles de glucosa reprimen su actividad mientras que bajos niveles la activan y causan a su vez la activación de genes involucrados con la entrada a G<sub>0</sub> y respuesta a estrés [33].

Entre los genes más notorios regulados por Rim15 se encuentran *GIS1*, *MSN2* y *MSN4* [33]. Todos estos son factores de transcripción regulados positivamente por Rim15, que se encargan de inducir una variedad de genes responsables de la respuesta a estrés. Gis1 se encarga de activar aquellos genes de respuesta a estrés que en su promotor cuentan con el motivo PDS (*Post-Diauxic Shift*), mientras que Msn2/4 regula aquellos promotores con el motivo STRE (*Stress Response Element*) [34]. Deleción de estos factores de transcripción y de Rim15 causa una disminución en la esperanza de vida de levaduras en medio rico [31]. Debido a que Rim15, Gis1 y Msn2/4 son necesarios para el efecto sobre la longevidad de la restricción dietética, su deleción en condiciones de restricción dietética revierte casi totalmente la extensión de la longevidad causado por la restricción dietética, regresando a la levadura a una esperanza de vida similar a la del tipo silvestre sin tratamiento.

Es importante señalar que los genes aquí mencionados no son los únicos responsables de la extensión de la longevidad por restricción dietética. Se ha reportado que la triple mutante de *msn4Δmsn2Δgis1Δ* todavía muestra algo de extensión de la longevidad en condiciones de restricción dietética, indicando que existen otros genes aun respondiendo a la restricción dietética [35].

### 3.1.3 La vía de la restricción dietética está conservada en varios organismos

La restricción dietética es una intervención para extender el envejecimiento cuyo efecto se puede observar en varios organismos. Se ha reportado su efecto en organismos modelo como *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *M. musculus* y *R. norvegicus*. Su efecto también se ha reportado en otros organismos no modelos como arañas, peces, hamsters, perros y macacos [3]. Esto nos sugiere que existen elementos de la vía de la restricción dietética conservados en todos estos organismos.

El principal componente de la vía de la restricción dietética, el complejo Tor, se encuentra conservado en todos los genomas de eucariotas [36]. En algunos organismos el elemento principal de los complejos Tor, la cinasa Tor, se encuentra codificada en dos genes (*TOR1* y *TOR2*) como ocurre en levadura, mientras que en mamíferos esta proteína está codificada por un solo gen (mTOR) [26]. Muchos de los elementos del complejo Tor también están conservados en varios organismos. Los elementos Kog1, Lst8 y Tco89 del complejo Tor de levadura se conservan en *C. elegans* como DAF-15 y C10H11.8, en *Drosophila* como Raptor y CG3004 y en mamíferos como RAPTOR y mLST8 [26].

Otro de los elementos altamente conservados de la vía de la restricción dietética es el blanco de Tor, Sch9. En organismos como *C. elegans*, *Drosophila* y mamíferos, esta cinasa se encuentra conservada como RSKS-1, S6K y SK61/2 respectivamente. También se ha reportado que la proteína AKT de mamíferos (PKB) podría ser un homólogo de Sch9 ya que el expresar la proteína PKB en levadura logra rescatar parcialmente el fenotipo de una mutante *sch9Δ* [37].

La vía de regulación de la longevidad Ras/cAMP/PKA también se encuentra conservada en varios organismos. En el hongo filamentoso *Neurospora crassa* se encuentran conservados dos genes RAS: *ras-1* y *ras-2*, los cuales también regulan la longevidad [38]. La mutación *ras-1Δ* incrementa la esperanza de vida en *N. crassa* al igual que lo hace en *S. cerevisiae*, sin embargo, se desconocen los mecanismos río abajo encargados de este fenotipo. La proteína Ras también se encuentra

conservada en *Drosophila*, *C. elegans* y mamíferos como Ras, Let-60, N-Ras y H-Ras, respectivamente. Deleción de los genes que codifican estas proteínas resulta en la extensión de la esperanza de vida de los organismos mencionados, excepto en Let-60, donde es necesaria la sobreexpresión de esta proteína para obtener extensión sobre la longevidad [39-42]. La vía río debajo de Ras se encuentra también conservada en mamíferos como la vía Ras/ERK/MAPK, la cual trasduce la señal de presencia/ausencia de nutrientes a factores de transcripción encargados de activar genes de resistencia a estrés [41].

En animales, se conoce más acerca de la vía que regula a Ras. Esta vía se conoce como la vía de señalización de insulina/IGF-1 (IIS por sus siglas en inglés) y también se encuentra conservada en varios organismos. En *Drosophila*, *C. elegans* y mamíferos, la disminución de los niveles de glucosa inhibe a la vía IIS y se extiende la longevidad. En mamíferos, esta vía de señalización activa a ras mediante el complejo conformado por las proteínas SOS, Grb2 y la quinasa del receptor de insulina [41]. El efecto de esta vía depende de la regulación de los siguientes genes en *C.elegans*: DAF-16, un factor de transcripción FOXO; el factor de transcripción *heat-shock* HSF-1 y el factor de respuesta xenobiótico SKN-1 [43]. DAF-16 es necesario para la extensión de la longevidad ocasionado por la vía IIS. Este factor de transcripción es activado en respuesta el estrés o inanición, donde regula positivamente la expresión de genes de resistencia a estrés como catalasas, transferasas de glutatión y chaperonas.

### **3.2 Levadura como modelo de envejecimiento**

Todas las vías que regulan el envejecimiento en respuesta a la restricción dietética han sido descubiertas gracias al uso de organismos modelo de envejecimiento. Los organismos modelo más utilizados para estudiar el envejecimiento son *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. cerevisiae* y, en menor medida, *M. musculus*.

La levadura *S. cerevisiae* se ha usado como organismo modelo para estudiar el envejecimiento. Varias de sus características la han convertido en un buen modelo:

es un organismo unicelular con un genoma pequeño (aproximadamente 6000 genes) y muchos de sus genes tienen ortólogos en humano. Tiene un ciclo de vida corto y requiere de pocos recursos y cuidados para su cultivo [44]. También se cuenta con muchas herramientas para su análisis genético: existen protocolos definidos para realizar mutaciones en la levadura y se cuenta con la secuencia completa de su genoma.

En levadura se han establecido dos modelos de envejecimiento: El modelo replicativo y el modelo cronológico de envejecimiento [30]. El modelo replicativo define la esperanza de vida como el número de divisiones mitóticas que lleva a cabo una sola célula hasta su muerte. Este modelo de envejecimiento describe la senescencia de células que se dividen un número finito de veces, como los fibroblastos [44]. Por otra parte, el modelo cronológico de envejecimiento define la esperanza de vida cronológica (CLS por sus siglas en inglés, *chronological lifespan*) como el tiempo en el que una célula en fase estacionaria puede permanecer viable [30]. Este sistema se ha utilizado para modelar el envejecimiento de células pos-mitóticas. Cabe mencionar que el tratamiento con restricción dietética aumenta tanto la esperanza de vida cronológica como la esperanza de vida replicativa [3].

### **3.3 Otras intervenciones que extienden la longevidad también utilizan la vía de restricción dietética**

Aunque hoy en día se conocen algunos de los genes que modifican el envejecimiento y el efecto de silenciar o sobreexpresar estos genes, aún se desconoce el cómo estos genes interactúan entre sí. Además, los polimorfismos presentes en cada uno de los genes que modulan el envejecimiento podrían modificar la aportación de ese gen a la longevidad al organismo [45]. La combinación de estos dos factores, la interacción entre genes y los polimorfismos dentro de esos genes, podrían afectar el resultado de realizar una mutación en un organismo con un diferente fondo genético al organismo modelo en el cuál se verificó el efecto . Por tal motivo, el realizar terapias génicas en humanos, sin

conocer la manera en la cual los polimorfismos y las interacciones genéticas ayudan a determinar el envejecimiento, podría ser contraproducente [46]. Además, las terapias génicas necesarias para modificar la expresión de los genes reguladores de la longevidad conllevan riesgos en la práctica y existen dilemas éticos respecto a la aplicación de esta intervención [47]. Una alternativa para la terapia génica son las intervenciones ambientales, las cuáles producen cambios en el organismo similares a los causados por la modificación de los genes reguladores de la longevidad. Una de las intervenciones ambientales con mayor efecto sobre la longevidad es la restricción dietética, sin embargo en el contexto actual es desafiante llevar a cabo una dieta restringida en calorías por lo que se está realizando el esfuerzo de encontrar otras intervenciones ambientales que aumenten la esperanza de vida sana, es decir, que tengan beneficios sobre la prevención de enfermedades características de la vejez. La búsqueda se ha tornado hacia la extracción de compuestos naturales, los cuales podrían extender la esperanza de vida mediante la modulación de los efectos de los genes que regulan el envejecimiento [48]. Se han encontrado una gran cantidad de aislados de microorganismos y plantas que modifican la longevidad. Se esperaba que dentro de este conjunto de compuestos naturales existieran algunos que extendieran la longevidad regulando la actividad de la vía de la restricción dietética y otros que regularan nuevas vías para extender la longevidad. Sin embargo, la gran mayoría de las intervenciones que se han descubierto que extienden la longevidad lo hace a través de la vía de la restricción dietética [48].

Entre los frutos de esta búsqueda se encuentra la rapamicina, la cual es un compuesto natural aislado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* AY B994 [48]. Este compuesto ha demostrado extender la longevidad de ratones al usarse en una concentración de 14 mg/kg [49]. Su efecto también se ha probado en *C. elegans* a una concentración de 100  $\mu$ M y en *D. melanogaster* a 200  $\mu$ M [50, 51]. Otro de los efectos deseables de la rapamicina es que se ha reportado que su uso ha proporcionado efectos protectores contra enfermedades relacionadas con la vejez; suprime el inicio de tumores en ratones proclives a desarrollar cáncer e impidió el avance de déficits parecidos al Alzheimer también en ratones [52, 53]. Se ha

descubierto que el aumento en longevidad en respuesta al tratamiento con rapamicina se debe a que este compuesto inhibe al complejo Tor, utilizando así la vía de la restricción dietética [51]. Además, este compuesto incita un incremento en la actividad autofágica y una disminución en la tasa de síntesis de proteínas, los cuáles son cambios asociados con el aumento de la esperanza de vida.

Otro compuesto que se ha descubierto extiende la longevidad es la poliamida espermidina, un compuesto derivado de la putrescina. Se ha observado que las poliamidas disminuyen su concentración conforme el organismo envejece [54]. De ahí que se planteó la posibilidad que la adición de otras poliamidas podría extender la longevidad. Bajo esta hipótesis, se descubrió el efecto de la espermidina al aplicarla a levaduras envejeciendo cronológicamente [55]. Su efecto extensor de la longevidad también se ha reportado en *C. elegans* y *Drosophila* mientras que en ratón incrementa la resistencia al daño oxidativo [55]. El efecto de la espermidina depende de la activación de la autofagia a través de la inhibición de acetilasas de histonas H3 [56].

La metformina también forma parte de los compuestos naturales que extienden la longevidad. Este compuesto es una biguanida extraída de la planta *Galega officinalis*. Es frecuentemente utilizada para el tratamiento de la diabetes tipo II debido a que inhibe la gluconeogénesis y disminuye los niveles de insulina [57]. Se ha observado que a una concentración de 50 mM extiende la esperanza de vida de *C. elegans* en un 40% [58]. Su efecto también se ha demostrado en ratones, donde en una dosis de 100 mg/kg aumentó la longevidad en un 38% [59]. Se han propuesto algunos mecanismos del cómo la metformina extiende la longevidad. Se sugiere que su efecto sobre la longevidad depende de AMPK, una cinasa transductora de señales sensible al estado energético de la célula. La metformina regula a AMPK al modular el balance AMP/ATP mediante la inhibición del complejo mitocondrial I [60]. Al activarse AMPK, esta cinasa reprime indirectamente al complejo Tor, extendiendo la longevidad.

Existen muchos otros compuestos naturales cuyo efecto sobre la longevidad está siendo estudiado como la curcumina y el resveratrol, pero todo parece indicar que estos compuestos también actúan a través de la vía de la restricción dietética [48].

### 3.4 Gln3 y la represión catabólica de nitrógeno

La célula tiene mecanismos para procesar diferentes fuentes de nitrógeno, los cuales se encargan de la regulación de permeasas y enzimas para el transporte y conversión de las fuentes de nitrógeno a compuestos más simples, los cuáles serán utilizados como bloques de construcción para aminoácidos y otros compuestos nitrogenados. Las diferentes fuentes de nitrógeno son asimiladas con distinta facilidad, de tal manera que existen fuentes preferidas de nitrógeno (como la glutamina y asparagina para levadura) y fuentes no preferidas (como la alantoina y  $\gamma$ -aminobutirato) [61].

El mecanismo de represión catabólica de nitrógeno (RCN) se encarga de regular la expresión de genes encargados de la asimilación de fuentes de nitrógeno, tal que en presencia de una fuente preferida de nitrógeno reduce la síntesis de enzimas y permeasas para fuentes no preferida. Esto ayuda a la optimización de los recursos de la célula [61].

La represión catabólica de nitrógeno en *S. cerevisiae* regula la expresión de los genes encargados de la asimilación de fuentes de nitrógeno a partir de la activación de dos factores de transcripción: Gln3 y Gat1, y de la represión de otros dos: Dal80 y Gzf3 [61]. Todos estos son factores de transcripción con un módulo de dedo de zinc el cual se adhiere a los promotores que contengan el motivo UAS<sub>NTR</sub> (GATAAG) [62]. Bajo una fuente no favorable de nitrógeno, Gln3 y Nil1 activan la expresión de genes sujetos a la regulación por nitrógeno, mientras que bajo una fuente preferencial de nitrógeno, Dal80 y Nil2 los reprimen [61]. Algunos de los genes sujetos a regulación por RCN son *GAP1*, *GHD2* y *PUT1* [63].

El factor de transcripción principal para la expresión de genes regulados por nitrógeno es Gln3. *GLN3* es expresado constitutivamente en la célula; su papel dentro de la represión catabólica de nitrógeno depende de su posición dentro de la célula. En presencia de una fuente preferida de nitrógeno, Gln3 se encuentra fosforilado y secuestrado en el citosol por Ure2. En cambio, en presencia de una fuente no preferida de nitrógeno, Gln3 es desfosforilado y exportado al núcleo donde comienza la expresión de los genes sensibles a fuente de nitrógeno [64].

Existen varias cinasas encargadas de la transducción de señales del medio y regulación de Gln3. Tor1 y Tor2 son capaces de fosforilar a Gln3 en respuesta al estado nutricional. En una buena fuente de nitrógeno, Tor se encuentra activo y fosforila a Gln3, lo cual ocasiona la inhibición de los genes regulados por nitrógeno. Se ha observado que la inhibición de Tor mediante el tratamiento con rapamicina ocasiona la desfosforilación de Gln3 y su acumulación en el núcleo [64].

Gln3 también es regulado por los niveles de glucosa en el medio. Bajos niveles de glucosa libera la represión de los genes normalmente regulados por RCN [63]. En un estudio se descubrió que Gln3 es necesario para la expresión de los genes reprimidos por el mecanismo RCN en condiciones de baja glucosa ya que una cepa con la mutación *gln3Δ* es incapaz de expresar los genes reprimidos por RCN en condiciones de baja glucosa. El responsable de la fosforilación y cambio de localización de Gln3 en respuesta a los niveles de glucosa es la cinasa Snf1 [63]. Snf1 es un homólogo de la cinasa AMP-dependiente el cual fosforila a Gln3 en condiciones de baja glucosa. La fosforilación realizada por Snf1 a Gln3 tiene el efecto contrario que la fosforilación de Tor. La fosforilación por Snf1 promueve la acumulación nuclear de Gln3, tal vez promoviendo la importación de Gln3 al núcleo o inhibiendo su exportación hacia el citoplasma.

De esta manera, Gln3 ayuda a la célula a manejar sus recursos cuando ésta se encuentra en periodos de hambruna, ya que le permite utilizar otras fuentes de carbono y nitrógeno para obtener energía y elementos para la biosíntesis de otras moléculas.

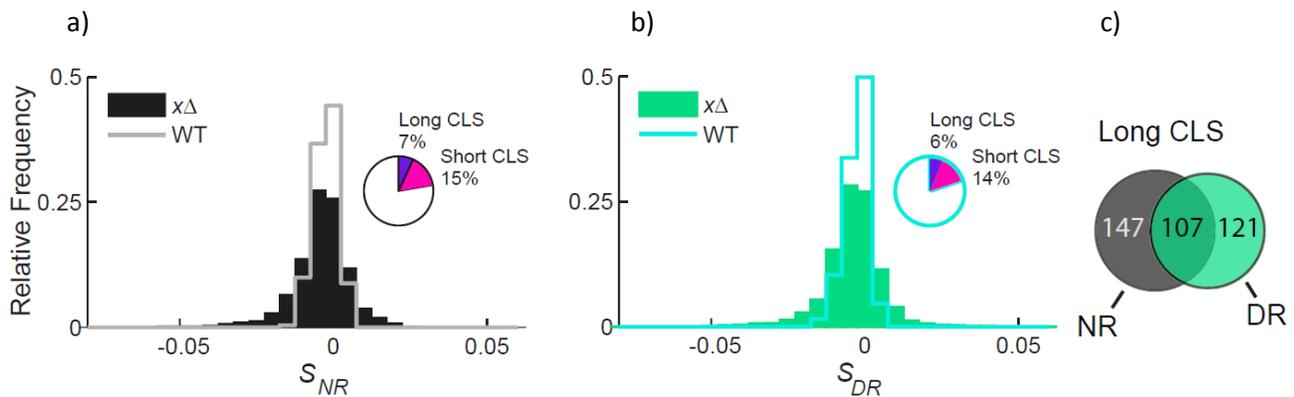
## 4. Antecedentes

Se han realizado esfuerzos por identificar genes y vías que extiendan la longevidad de un organismo robustamente. Como se ha mencionado en la introducción de este trabajo, la gran mayoría de los genes que regulan el envejecimiento son factores que responden al estado energético de la célula. Se ha descubierto que todos estos factores interactúan entre sí y actúan a través de una gran vía que se conoce como la vía de la restricción dietética. La vía toma ese nombre debido a que, al encontrarse el organismo bajo una restricción de nutrientes, la inhibición o activación de los factores que conforman esta vía aumenta la longevidad. Otras intervenciones ambientales y farmacológicas también aparentan regular los genes que conforman a la vía de la restricción dietética, como es el caso de la extensión en la esperanza de vida observada en levaduras sometidas a estrés oxidativo o térmico, o al de levaduras tratadas con los fármacos rapamicina o espermidina [48, 65].

En este contexto surge la duda de si la restricción dietética es la única vía en la célula capaz de regular y extender la longevidad. De existir vías adicionales e independientes a la vía de restricción dietética, podríamos tener nuevos blancos genéticos para diseñar intervenciones ambientales y farmacológicas para extender la esperanza de vida, en particular la esperanza de vida saludable en humanos. Una estrategia para identificar intervenciones que regulen la longevidad independientemente de la restricción dietética es evaluar el efecto de la intervención en combinación con la restricción dietética [3]. Si la nueva intervención extiende la longevidad mediante la misma vía que la restricción dietética se podrá observar que no existe un aumento aún mayor de la longevidad en condiciones de restricción dietética. Si la nueva intervención inhibe un proceso esencial para la extensión de esperanza de vida por restricción dietética no observaremos aumento en la longevidad en condiciones de restricción dietética. En cambio, si la nueva intervención afecta la longevidad de manera independiente a la restricción dietética,

entonces veremos que su efecto sobre la longevidad será el mismo ya sea en condiciones de restricción y de no restricción.

Existen indicios de que la vía de la restricción dietética no es la única vía capaz de modular la longevidad. En un estudio realizado recientemente en nuestro grupo se llevó a cabo la caracterización de la esperanza de vida de 3,718 mutantes *knock-out* de levadura bajo condiciones de restricción dietética y no restricción dietética [1]. Esto se hizo con la intención inicial de identificar aquellos genes necesarios para el efecto sobre la longevidad de la restricción dietética. Sin embargo, los datos de este experimento también revelaron que existía cierta proporción de mutaciones de genes (~100) que extendían la longevidad tanto en condiciones de restricción dietética como en condiciones de no restricción (Figura 2).



**Figura 2. Existen genes que incrementan la longevidad en condiciones de restricción dietética y no restricción.**

a) Distribución de los efectos sobre la esperanza de vida cronológica ( $s$ ) de mutantes *knock-out* de levadura en condiciones de no restricción dietética (NR). b) Distribución de los efectos sobre la longevidad ( $s$ ) de mutantes *knock-out* de levadura en condiciones de restricción dietética (DR). Dentro de ambas distribuciones se muestra el porcentaje de mutantes progénicas y longevas. c) Diagrama de Venn del número de cepas mutantes que extienden la longevidad bajo restricción dietética y no restricción. Figura tomada de Campos *et al* (2017).

Estos genes que incrementan la esperanza de vida independientemente de las condiciones nutricionales de la célula son fuertes candidatos a regular vías extensoras de la longevidad diferentes a las de la vía de restricción dietética. Sin embargo, para realmente determinar si su efecto es o no independiente de la vía de la restricción dietética hacen falta más pruebas. Es necesario corroborar los efectos de estas mutantes con una técnica más sensible para distinguir sus efectos sobre

la longevidad, además de verificar que estas mutantes no interactúen con los genes que componen la vía de la restricción dietética. Con base en lo anterior, en este proyecto nos enfocamos en averiguar si alguno de estos genes realmente actúa independientemente de la vía de la restricción dietética.

## **5. Hipótesis**

La longevidad cronológica de la levadura puede aumentarse de manera independiente a la respuesta a restricción dietética mediante la eliminación de genes. Por lo tanto existen vías que al perturbarse aumentan la esperanza de vida.

## **6. Objetivo general**

Encontrar intervenciones genéticas y ambientales que extiendan la longevidad cronológica, adicionalmente de las vías activadas por restricción dietética en *Saccharomyces cerevisiae*.

### **6.1 Objetivos específicos**

- 1) Identificar deleciones genéticas que extiendan la longevidad de *S.cerevisiae* en condiciones de restricción dietética.
- 2) Identificar intervenciones farmacológicas que aumenten la esperanza de vida independientemente de la restricción dietética y verificar sus efectos en algunas mutantes de deleción genética.
- 3) Describir los procesos que extienden la esperanza de vida en alguna de las mutantes identificadas previamente.

## 7. Materiales y métodos

### Cepas

Las mutantes *knock-out* sencillas utilizadas en este proyecto son mutantes derivadas de la colección de cepas *knock-out* del proyecto de deleción de levadura (Open Biosystems) y producidas de la cruce de estas cepas con la colección SGA inicial de levadura MAT $\alpha$  YEG01-RFP y YEG01-CFP [66]. Las mutantes sencillas tienen el siguiente genotipo: *MAT $\alpha$  xxx $\Delta$ ::kanMX4 PDC1-XFP-CaURA3MX4 can1 $\Delta$ :STE2prSpHIS5 lyp1 $\Delta$  his3 $\Delta$ 1 ura3 $\Delta$ 0 LEU2*, donde XFP se refiere a una proteína fluorescente roja (mcherry) o cian (Cerulean).

Las dobles mutantes se obtuvieron del proyecto de Campos *et al* (2017) [1]. Se realizaron de la siguiente manera: Las mutantes sencillas previamente mencionadas se cruzaron con una cepa derivada de YEG01-RFP (*MAT $\alpha$  PDC1-mcherry-CaURA3MX4 can1 $\Delta$ :STE2pr-SpHIS5 lyp1 $\Delta$  his3 $\Delta$ 1 ura3 $\Delta$ 0 LEU2*) a la cual se le realizaron las mutaciones sencillas por reemplazo génico con el cassette de resistencia para higromicina hphMX4. Las dobles mutantes se seleccionaron por su resistencia a los antibióticos geneticina e higromicina.

### Medios de cultivo

#### YPAD, 1L

Bacto yeast extract (Difco 0127-17) (1%), Bacto peptone (Difco 0118-17) (2%), Glucosa (2%), Bacto agar (Difco 0140-01) (2%), Adenina sulfato (.004%).

#### Synthetic Complete (SC) 2% Glucosa, 1L

Yeast Nitrogen base w/o aminoacids (Sigma-Aldrich Y0626) 6.7 g/L, Glucosa (2%), Aminoácidos CSM 2 g/L.

#### Synthetic Complete (SC) 0.5% Glucosa,1L

Yeast Nitrogen base w/o aminoacids (Sigma-Aldrich Y0626) 6.7 g/L, Glucosa (0.5%), Aminoácidos CSM 2 g/L.

### **YNB baja fluorescencia, 1L**

1X sales YNB, 1000 X Stock de vitaminas 1mL, 1000X Elementos traza 1 mL, 20% Glucosa 100 mL, Aminoácidos CSM 0.79g.

Sales YNB 1X: sulfato de amonio 5g/L, fosfato monopotásico 1g/L, sulfato de manganeso 0.5g/L, Cloruro de Sodio 0.1g/L, Cloruro de Calcio 0.1g/L.

### **Concentración de Antibióticos**

Amplicilina:

Stock: 100 mg/mL (1000X), 1mL por litro de medio.

Geneticina:

Stock: 200mg/mL (1000X), 1mL por litro de medio.

Higromicina B:

Stock: 50 mg/mL (250 X), 4 mL por litro de medio.

### **Ensayo de CLS basado en cinéticas de crecimiento**

Este es un ensayo de esperanza de vida cronológica basado en el descrito por Murakami *et al* (2009) [67]. Los cultivos iniciales se realizaron en 5 mL de medio YPAD. Estos cultivos se dejaron crecer a 30°C con agitación (750 rpm) por dos días. Después estos cultivos fueron traspasados a cajas de 96 pozos para realizar los arreglos de mutantes. Cada pozo se llenó con 150 µL de cultivo. Estos arreglos fueron copiados por medio de un pinner a cajas de 96 pozos profundos las cuales en cada pozo contenían 800 µL de medio SC 2% ó 0.5% glucosa dependiendo de si se trataba de un experimento con o sin restricción dietética. Estas placas de pozo profundo se dejaron saturar por tres días a una temperatura de 30°C sin agitación. A partir de este momento se monitoreó la humedad de los cultivos para evitar evaporación y mantenerla a un nivel de 70%-90% humedad relativa. Una vez que se saturó el cultivo en placas de pozo profundo se tomó una pequeña alícuota (12 µL) de cada pozo y se inoculó en placas de 96 pozos con 150 µL de medio fresco

YNB baja fluorescencia. A estas nuevas placas se las incubó a 30°C sin agitación por 16-20 hrs para realizar una cinética de crecimiento. A esas cajas se les midió la densidad óptica (OD600) aproximadamente cada hora.

La toma de muestras de las cajas de pozo profundo y cinéticas de crecimiento se realizó cada día los primeros tres días del experimento y cada dos días los días subsecuentes. Se utilizó un sistema robotizado para realizar la inoculación y curvas de crecimiento de las placas (Freedom Evoware 2000) el cual tenía integrado un lector de placas (Tecan M1000).

A los datos de las cinéticas de crecimiento se les restó cada día la medición de la densidad óptica de la primera lectura del día para normalizarlos. Para cada pozo se obtuvo una curva de decaimiento describiendo el decaimiento en el porcentaje de células sobrevivientes. El porcentaje de células sobrevivientes de cada día se obtuvo a partir de la diferencia en tiempo que le tomaba al cultivo alcanzar una densidad óptica fija (0.35) utilizando la fórmula  $\%Supervivencia = \left(\frac{1}{2}\right)^{\Delta t/T}$ , donde  $\Delta t$  es la diferencia en tiempo para alcanzar la OD fija y T es el tiempo de duplicación. De la pendiente de las curvas de decaimiento se obtuvo la tasa de decaimiento para cada pozo, ajustando un modelo lineal a la fase exponencial de la curva de decaimiento.

El análisis estadístico que se utilizó para comparar las tasas de decaimiento de las poblaciones de dos mutantes fue una prueba *t* de Student con  $\alpha < 0.05$ .

## **Concentraciones de los fármacos imitadores de la restricción dietética.**

### **Soluciones stock**

Espermidina stock 0.1 M

De una solución 3.25M de espermidina se diluyeron 185  $\mu$ L en 5.815  $\mu$ L de agua destilada. La solución se esterilizó por filtración con un filtro de 0.2  $\mu$ m.

### Metformina stock 0.1M

La metformina se obtuvo de una pastilla comercial de 500mg de clorhidrato de metformina (GoldPharma). La pastilla se trituró en mortero y se tomaron 0.265g para diluirlos en 16 ml de agua destilada. El stock se esterilizó por filtro 0.2  $\mu$ m.

### Rapamicina stock 0.01M

4.7 mg de rapamicina se diluyeron en 480  $\mu$ L y se esterizaron por filtro de 0.2  $\mu$ m.

Las soluciones stock se guardaron a -20 °C hasta el día de uso

### Medio SC 2% Glucosa con tratamientos farmacológicos

Espermidina 10mM Stock Espermidina - 2.66 mL SC 2% Glucosa - 23.94 mL	Metformina 20 mM Stock metformina – 5.32 mL SC 2% Glucosa – 21.28 mL	Rapamicina 1 $\mu$ M Stock Rapamicina – 2.66 $\mu$ L SC 2% Glucosa – 26.6 mL
Espermidina 5mM Stock Espermidina - 1.33 mL SC 2% Glucosa - 25.27 mL	Metformina 15 mM Stock metformina – 3.99 mL SC 2% Glucosa – 22.6 mL	Rapamicina 0.5 $\mu$ M Stock Rapamicina – 1.33 $\mu$ L SC 2% Glucosa – 26.6 mL
Espermidina 1mM Stock Espermidina - 0.266 mL SC 2% Glucosa - 26.334 mL	Metformina 10 mM Stock metformina – 2.66 mL SC 2% Glucosa – 23.94 mL	Rapamicina 0.1 $\mu$ M Stock Rapamicina – 0.266 $\mu$ L SC 2% Glucosa – 26.6 mL
Espermidina 0.5mM Stock Espermidina - 0.133 mL SC 2% Glucosa - 26.467 mL	Metformina 5 mM Stock metformina – 1.33mL SC 2% Glucosa – 25.27 mL	

### Medio SC 0.5% Glucosa con tratamientos farmacológicos

Espermidina 10mM Stock Espermidina – 0.5mL SC 5% Glucosa – 4.5 mL	Metformina 20mM Stock metformina – 1 mL SC 5% Glucosa – 4 mL	Rapamicina 1 $\mu$ M Stock rapamicina – 0.5 $\mu$ L SC 5% Glucosa – 5 mL
Espermidina 5mM Stock Espermidina – 0.25mL SC 5% Glucosa – 4.75 mL	Metformina 15mM Stock metformina – 0.75 mL SC 5% Glucosa – 4.25 mL	Rapamicina 0.5 $\mu$ M Stock rapamicina – 0.25 $\mu$ L SC 5% Glucosa – 5 mL
Espermidina 1mM Stock Espermidina – 0.05mL SC 5% Glucosa – 4.95 mL	Metformina 10mM Stock metformina – 0.5 mL SC 5% Glucosa – 4.5 mL	Rapamicina 0.1 $\mu$ M Stock rapamicina – 0.05 $\mu$ L SC 5% Glucosa – 5 mL
Espermidina 0.5mM Stock Espermidina – 0.025mL SC 5% Glucosa – 4.975 mL	Metformina 5mM Stock metformina – 0.25 mL SC 5% Glucosa – 4.75 mL	

### Ensayo de CLS basado en competencia de cepas.

El protocolo del ensayo se tomó de Garay *et al* (2014) [66]. Los cultivos iniciales de las cepas individuales se realizaron en tubos con 5mL de medio YPAD, los cuales se dejaron saturar por dos días a 30°C con agitación. En placas de 96 pozos profundos con 780  $\mu$ L de medio SC 2% Glucosa se inocularon 10 $\mu$ L de cepas marcadas con YFP y 10  $\mu$ L de levadura marcada con RFP para que ambas cepas estuvieran en igual proporción. Este nuevo cultivo se dejó saturar por tres días a 30°C sin agitación y será el cultivo en envejecimiento que se dejará creciendo en esos parámetros por aprox. 20 días.

Una vez saturado el cultivo de envejecimiento en pozo profundo se tomó una muestra de 12 $\mu$ L la cual se inoculó en 150 $\mu$ L de medio fresco YNB de baja fluorescencia en cajas de 96 pozos. Este nuevo cultivo se dejó incubar a 30°C sin agitación entre 18-22 hrs. Cada hora se agitó el cultivo para tomar la lectura de la densidad óptica (OD600) y la señal de fluorescencia en rojo y amarillo (YFP: Ex 515 nm/5 nm and Em 528 nm/5 nm; RFP: Ex 587 nm/5 nm and Em 610 nm/5 nm). Esta toma de muestra del cultivo en envejecimiento se repitió cada día los primeros tres días del experimento y después cada dos días hasta el término.

La señal de fluorescencia de fondo para cada mutante se obtuvo de cultivos de control en los que sólo hay levaduras marcadas con YFP (Señal de fondo para RFP) o con RFP (Señal de fondo para YFP). La señal verdadera de fluorescencia de cada pozo se definió como la señal de fluorescencia de ese pozo menos la señal de fluorescencia de fondo.

Se definió un estimado de la cantidad de células viables de una cepa relativa a la de una cepa referencia, el cual se llamará coeficiente de supervivencia,  $s$ . Para obtener el coeficiente de supervivencia de cada competencia, se generó una curva del logaritmo de la señal de fluorescencia de RFP entre la señal de fluorescencia de YFP ( $\ln R/Y$ ) en relación al tiempo. En cada día se interpoló un punto en esta curva  $\ln R/Y$  para el tiempo en el que la  $OD_{600}=0.35$ . Se elaboró una nueva curva  $\ln R/Y^*$  con las interpolaciones para cada día. El coeficiente de supervivencia corresponde a la pendiente de la regresión lineal de la curva  $\ln R/Y^*$ . Un estimado de la esperanza de vida de las cepas respecto a una cepa referencia ( $Lx$ ) se definió como  $1+s$ . El error estándar de la esperanza de vida se calculó como  $\sigma E = \frac{\sigma x}{\sqrt{n}}$ , donde  $\sigma x$  es la desviación estándar de la mutante y  $n$  el número de réplicas.

Los coeficientes de supervivencia de cada placa se normalizaron al restar a todos los pozos la mediana de los coeficientes de supervivencia de las competencias control presentes en esa placa. Las competencias control son aquellas competencias de una mutante marcada en YFP contra la misma mutante marcada con RFP. De esta manera el coeficiente de supervivencia de las competencias control  $\approx 0$ .

### **Cálculo de la epistasis**

Para el cálculo de la epistasis se usaron los datos de la esperanza de vida de las mutantes sencillas ( $Lx$  ó  $Ly$ ) y la mutante doble ( $Lxy$ ). Los datos de las mutantes sencillas se obtuvieron de Garay *et al* (2014). Los datos de las mutantes dobles se obtuvieron del ensayo de CLS por competencia realizado en este proyecto (Anexo 5). Se utilizó la fórmula de la epistasis multiplicativa,  $\varepsilon xy = Lxy - (Lx * Ly)$ . El

error de la epistasis se calculó como  $\sigma\varepsilon = \sqrt{\sigma Lx^2 + \sigma Ly^2 + \sigma Lxy^2}$ . Definimos arbitrariamente que existía interacción entre dos genes si su epistasis era mayor que 0.02 o menor que -0.02; estos valores se basaron en las observaciones de las distribuciones de esperanza de vida reportadas en este trabajo y en Garay *et al* (2014) [66].

### **Análisis de enriquecimiento de términos GO**

Se llevó a cabo utilizando el paquete de R topGO, versión 2.28.0 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/topGO.html>). Se utilizó el mapa de términos GO org.Sc.sgd.db versión 3.4.0 (<http://bioconductor.org/packages/release/data/annotation/html/org.Sc.sgd.db.html>) la cual contiene el mapeo de ORFs, nombres de genes y términos GO de *S.cerevisiae* obtenidos de la base de datos SGD.

Como universo de genes se utilizó el conjunto de factores de transcripción y genes modificadores de la longevidad que se utilizó para generar las dobles mutantes (Anexo 5). El análisis de enriquecimiento se evaluó por separado para aquellos genes que tienen epistasis positiva y para aquellos que tienen epistasis negativa. El algoritmo utilizado para evaluar los términos GO en topGO fue el predeterminado “*weight*” el cuál es un algoritmo basado en el conteo de genes que utiliza la prueba estadística exacta de Fisher para determinar la significancia de los términos GO y toma en cuenta la estructura de los términos GOs para minimizar la aparición de términos GOs muy generales dentro de los términos significativos.

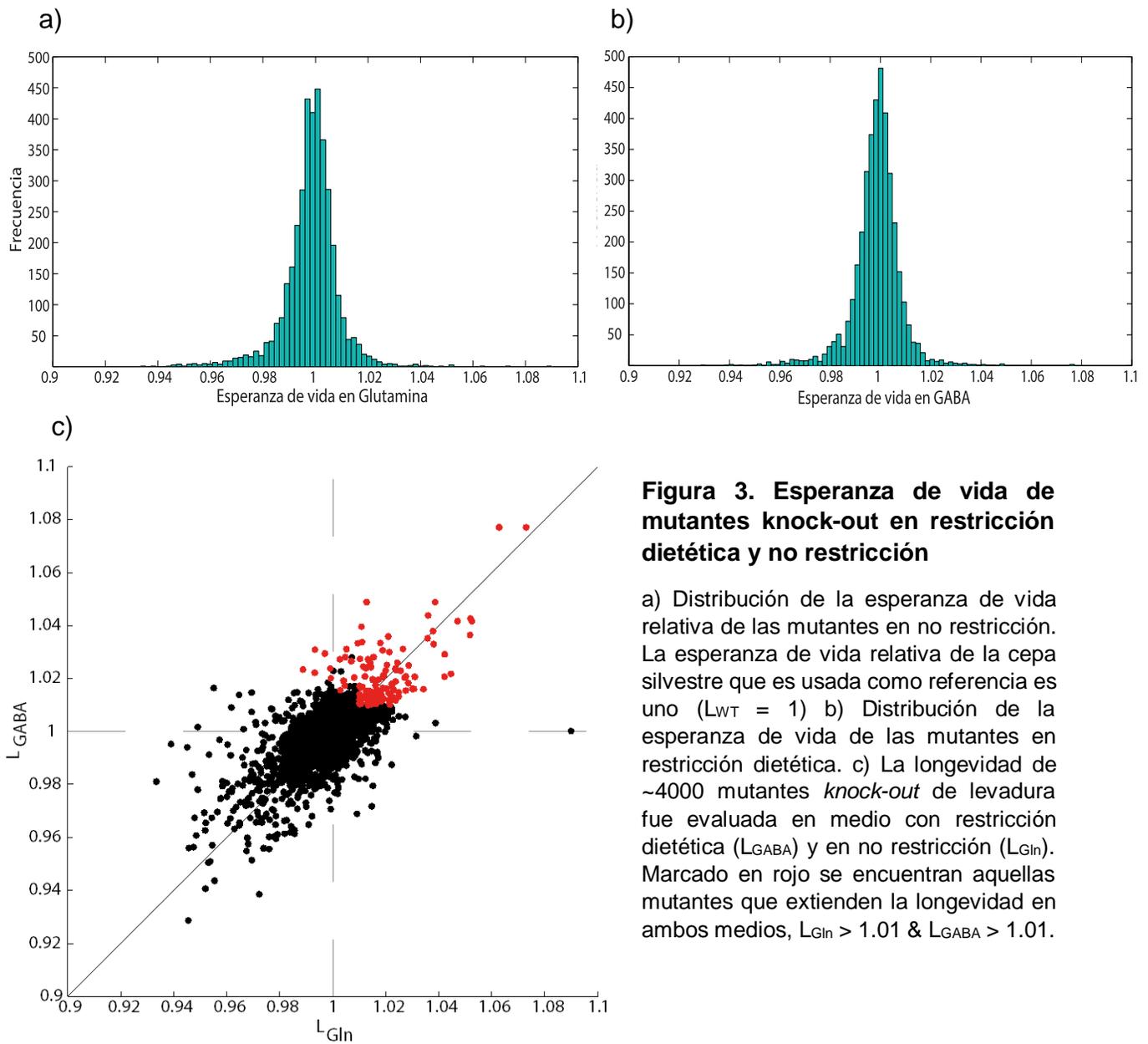
Una vez obtenido el *p-value* de los términos GOs, se eligieron como términos GO significativos aquellos términos que tuvieran un *p-value* menor que 0.05. Después, estos *p-values* fueron corregidos mediante un método basado en la tasa de falsos positivos (FDR por sus siglas en inglés) implementado en la función de R *p.adjust*. La corrección se realizó por separado para los *p-values* de los términos GO con epistasis positiva y negativa.

## 8. Resultados

### 8.1 Elección de las mutantes candidatas a regular la longevidad independientemente de la restricción dietética

Del trabajo de Campos *et al* (2017) utilizamos los datos de medición de esperanza de vida cronológica de una colección de ~4,000 mutantes sencillas *knock-out* bajo condiciones de restricción dietética y no restricción dietética [1]. Estas mutantes corresponden a una colección de mutantes derivada del proyecto de deleción de levadura y fueron medidas utilizando un método basado en fluorescencia [1, 66, 68]. Las condiciones de restricción dietética usadas en este *screening* se basaron en la calidad de la fuente de nitrógeno; la fuente de nitrógeno fue cambiada de glutamina (fuente de nitrógeno preferida, sin restricción dietética) a GABA (fuente de nitrógeno secundaria, restricción dietética).

Buscamos aquellas mutantes *knock-out* que extendieran la longevidad tanto en condiciones de restricción dietética como en no restricción. En este conjunto de datos una esperanza de vida relativa igual a 1 ( $L=1$ ) significa que la mutante tiene una esperanza de vida igual que la cepa tipo silvestre. Determinamos que una mutante tenía efecto sobre la longevidad si su esperanza de vida relativa era mayor que 1.01 o menor que 0.99 basados en las distribuciones de longevidad de las mutantes (Figura 3 a,b). Escogimos aquellas mutantes que extendieran la longevidad tanto en condiciones de restricción como de no restricción ( $L_{Gln} > 1.01$  &  $L_{GABA} > 1.01$ ). Además, seleccionamos algunas mutantes que, aunque no extendían la longevidad en condiciones de no restricción, sí extendían la longevidad en condiciones de restricción. En total obtuvimos aproximadamente 100 mutantes *knock-out* que extendían la longevidad en condiciones de restricción dietética (Figura 3 c, Anexo 1).



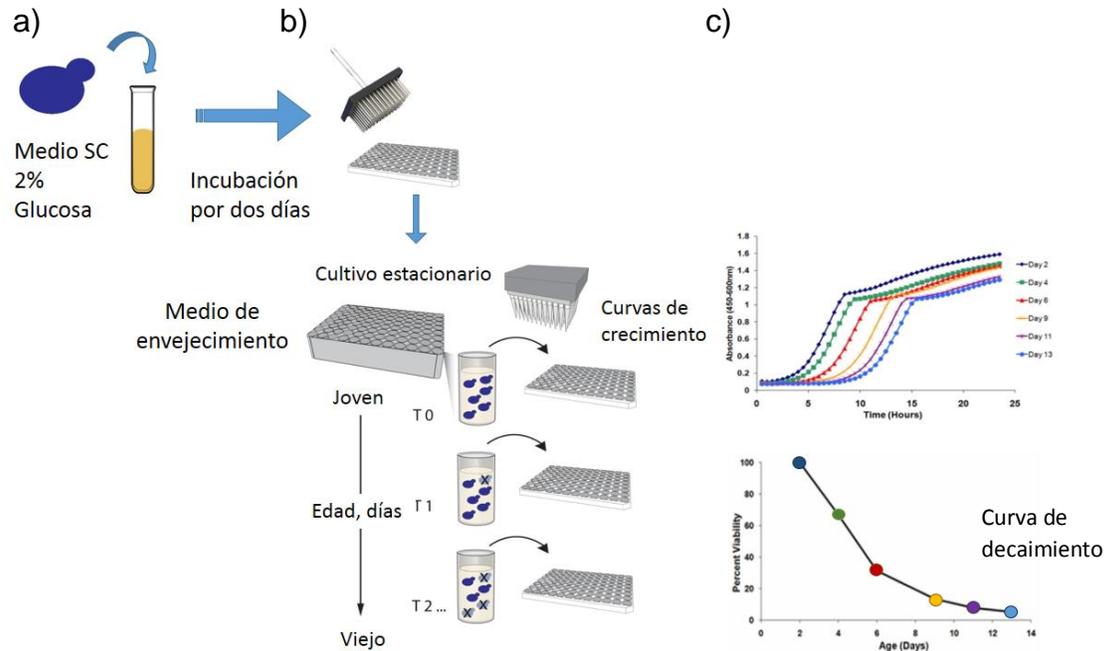
**Figura 3. Esperanza de vida de mutantes knock-out en restricción dietética y no restricción**

a) Distribución de la esperanza de vida relativa de las mutantes en no restricción. La esperanza de vida relativa de la cepa silvestre que es usada como referencia es uno ( $L_{WT} = 1$ ) b) Distribución de la esperanza de vida de las mutantes en restricción dietética. c) La longevidad de ~4000 mutantes *knock-out* de levadura fue evaluada en medio con restricción dietética ( $L_{GABA}$ ) y en no restricción ( $L_{Gln}$ ). Marcado en rojo se encuentran aquellas mutantes que extienden la longevidad en ambos medios,  $L_{Gln} > 1.01$  &  $L_{GABA} > 1.01$ .

## 8.2 Ensayo piloto de CLS para verificar los efectos de las mutantes candidatas

Los efectos de las mutantes fueron verificados por medio de otro ensayo para medir la esperanza de vida cronológica el cual se basa en la medición de cinéticas de crecimiento (Figura 4) [69]. En este ensayo se inicia con un cultivo saturado el cual se traspasa a medio fresco en platos de pozo profundo, en este medio es en donde las células se dejarán envejecer. Este nuevo cultivo se deja saturar de nuevo durante aproximadamente dos días y a partir de entonces y cada día se toma una pequeña muestra del cultivo en envejecimiento. La muestra es utilizada para hacer una cinética de crecimiento cada día. Conforme el paso del tiempo, cada vez habrá

menos células en el medio y la curva de crecimiento tardará más en saturarse. La diferencia en tiempo de saturación entre dos curvas de crecimiento nos da una idea de la proporción de células vivas presentes en el medio al momento del inóculo inicial.



**Figura 4. Ensayo de CLS basado en cinéticas de crecimiento.**

a) Las cepas a envejecer se dejan saturar en medio sintético completo. b) El cultivo saturado se trasfiere a platos de pozo profundo en los cuales se encuentra el medio de envejecimiento (Restricción o no restricción dietética), donde se satura hasta obtener un cultivo en fase estacionaria. c) Cada día del cultivo estacionario se toma una muestra y se realiza una curva de crecimiento. Estas curvas sirven para determinar el porcentaje de supervivencia, basado en la diferencia de tiempo entre curvas para alcanzar la fase estacionaria. Con los porcentajes de supervivencia se obtiene una curva de decaimiento

A partir de este punto se decidió usar otro tipo de restricción dietética para determinar la esperanza de vida de las mutantes seleccionadas. En particular, se cambió de restricción por fuente de nitrógeno (Glutamato/GABA) a restricción por fuente de carbono (2% Glucosa/0.5% Glucosa), ya que este tipo de restricción es considerado más estándar.

Para probar el ensayo de CLS por cinéticas de crecimiento decidimos medir la longevidad de sólo 15 mutantes (Tabla 1). Utilizamos como cepa silvestre a *his3Δ*, ya que todas las cepas de nuestra colección cuentan con esta mutación. Además utilizamos como cepas control a *tor1Δ*, el cuál sabemos que es un gen participante

en la vía de restricción dietética y esperamos que esta mutación extienda la longevidad en DR pero no en no DR, y a *gln3Δ* el cual es un factor de transcripción sensible a la condición nutricional. Cada mutante/control tuvo 15 réplicas técnicas. Por el momento solo corroboramos los efectos de las mutantes en medio con restricción dietética (0.5% Glucosa).

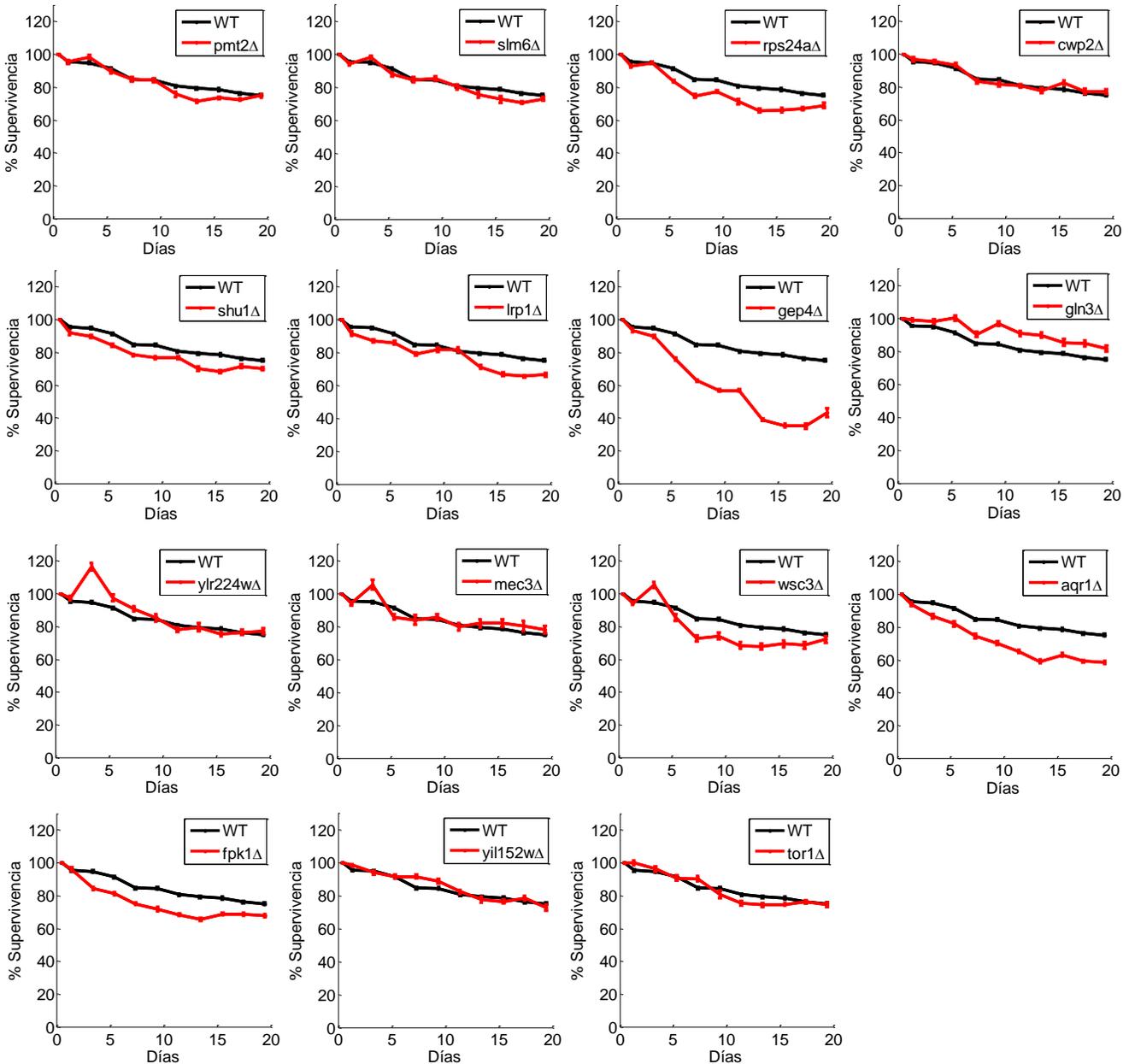
### Tabla 1. Mutantes utilizadas en ensayo piloto de longevidad

Las mutantes se seleccionaron en base a que todas tuvieran efectos fuertes sobre la longevidad en GABA y participaran en distintos procesos celulares. a,b) Datos de longevidad relativa obtenidos de Campos *et al* (2017) en medios con restricción dietética de GABA y sin restricción dietética, respectivamente [1]

	Gen	ORF	Longevidad GABA <sup>a</sup>	Longevidad Gln <sup>b</sup>
1	<i>pmt2Δ</i>	YAL023C	1.028	1.015
2	<i>slm6Δ</i>	YBR266C	1.034	1.011
3	<i>rps24aΔ</i>	YER074W	1.038	1.038
4	<i>shu1Δ</i>	YHL006C	1.044	1.036
5	<i>lrp1Δ</i>	YHR081W	1.042	1.052
6	<i>gep4Δ</i>	YHR100C	1.028	1.005
7	<i>ylr224wΔ</i>	YLR224W	1.029	0.997
8	<i>mec3Δ</i>	YLR288C	1.049	1.013
9	<i>wsc3Δ</i>	YOL105C	1.031	1.005
10	<i>fpk1Δ</i>	YNR047W	1.035	1.036
11	<i>yil152wΔ</i>	YIL152W	1.036	1.052
12	<i>aqr1Δ</i>	YNL065W	1.042	1.047
13	<i>cwp2Δ</i>	YKL096W-A	1.036	1.021
14	<i>set4Δ</i>	YJL105W	1.030	1.021
15	<i>rpl40bΔ</i>	YKR094C	1.040	1.011
<b>Controles</b>				
16	<i>gln3Δ</i>	YER040W	NA	NA
17	<i>tor1Δ</i>	YJR066W	1.008	1.016
18	<i>his3Δ</i>	YOR202W	0.993	0.995

La mayoría de las mutantes de las cuales buscamos corroborar sus efectos no volvieron a presentar la extensión en longevidad observada en los datos de Campos *et al* (2017) (Figura 5). Esto se lo adjudicamos al cambio de tipo de restricción dietética que realizamos, ya sea que los efectos de las mutantes sean específicos a la restricción por fuente de nitrógeno o que estas mutantes aparentan tener más longevidad debido a que la restricción por fuente de nitrógeno no es tan fuerte como

la restricción por fuente de carbono. Sabemos que la falta de mutantes que muestren extender la longevidad en DR no se debe a una falla en el ensayo de CLS, puesto que nuestro control *tor1Δ* se comportó de acuerdo a lo esperado. Inesperadamente, nuestra mutante de control *gln3Δ* mostró extensión de la longevidad en condiciones de DR, cuando esperábamos que su comportamiento fuera parecido al de *tor1Δ*.



**Figura 5. Curvas de decaimiento del ensayo piloto**

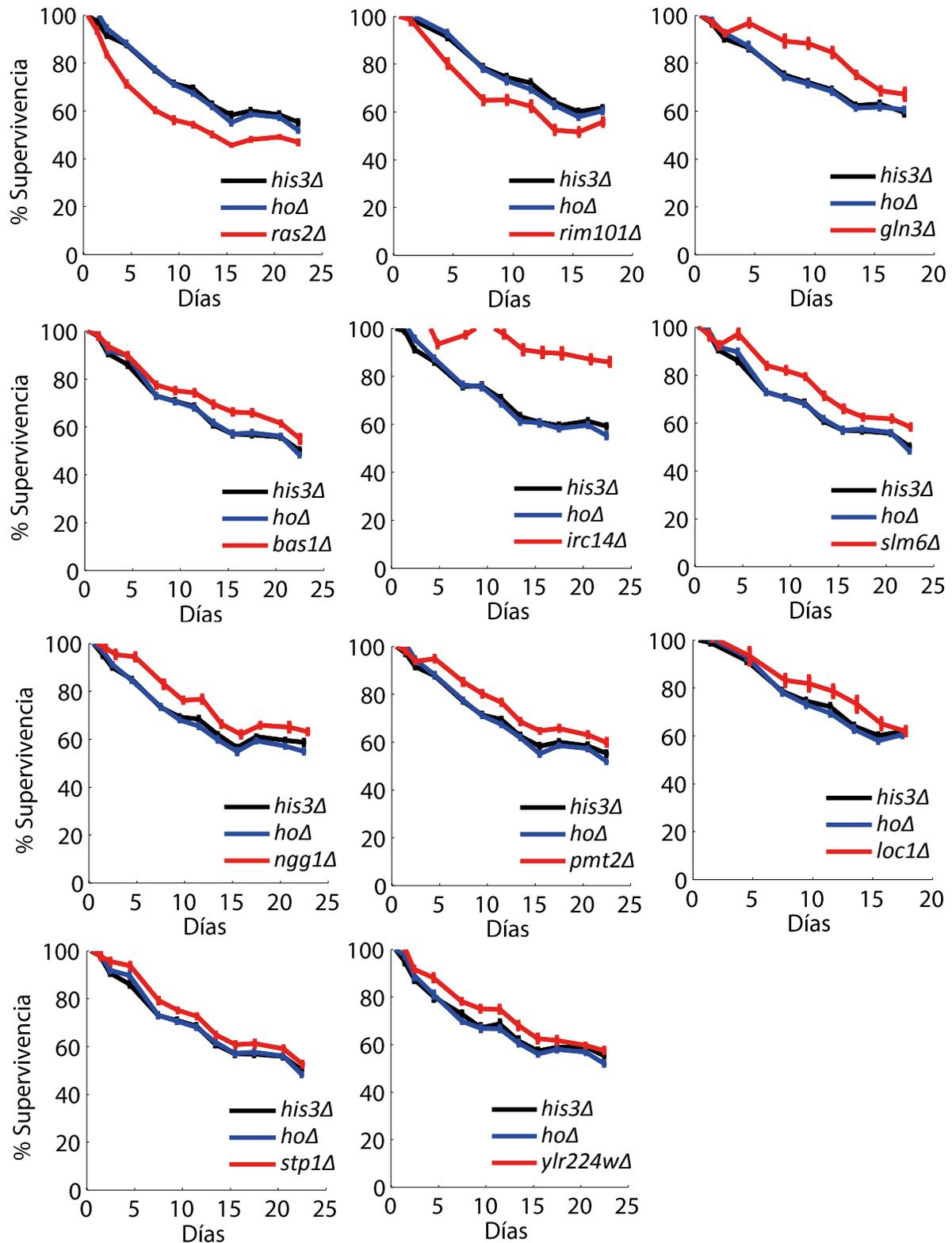
El ensayo de CLS por cinéticas de crecimiento fue realizado bajo condiciones de restricción dietética (0.5% Glucosa) y tuvo una duración de 20 días. En negro se muestran las curvas de decaimiento de la tipo silvestre (*his3Δ*), en rojo cada una de las mutantes. Para cada una de las curvas se realizaron 15 réplicas (n=15). Las barras representan el error estándar.

### **8.3 Ensayo de CLS por cinética de crecimiento a gran escala para corroborar los efectos de las mutantes candidatas**

Proseguimos a evaluar con el ensayo de CLS por cinética de crecimiento a las siguientes 40 mutantes candidatas a extender la longevidad independientemente de la restricción dietética. Para esta ronda de envejecimiento decidimos incluir a *rim101Δ* como control en lugar de *tor1Δ*, el cual es otro gen que se conoce es parte de la vía de DR, con un mayor efecto sobre la longevidad y es necesario para la extensión de longevidad bajo estas condiciones. También se añadió otra cepa como tipo silvestre de referencia *hoΔ*, la cual es una mutante neutral para el fenotipo de longevidad. Nuevamente las mutantes se evaluaron bajo condiciones de restricción dietética. De estas 40 mutantes candidatas, obtuvimos nueve mutantes que continuaban extendiendo la longevidad en condiciones de DR (Figura 6). El resto de las mutantes no extendió la esperanza de vida y tiene un comportamiento similar a la tipo silvestre o disminuyó la esperanza de vida (Anexo 2). Suponemos que las mutantes que incrementaron la esperanza de vida en este ensayo son buenas candidatas para pertenecer a vías que regulan la longevidad independientemente de la restricción dietética.

Para probar que estas mutantes candidatas actúan independientemente de los efectos de la restricción dietética propusimos dos experimentos:

- 1) Verificar que las mutantes también extiendan la longevidad en condiciones de no restricción dietética. Se espera que si el efecto de las mutantes es independientemente de la DR, la mutante extienda la longevidad en restricción y no restricción.
- 2) Utilizar fármacos que imitan los efectos de la restricción dietética. Estos fármacos activan la vía de restricción dietética, así que esperamos que las mutantes puedan seguir extendiendo la longevidad en combinación a estos fármacos. Si los fármacos no extienden aún más la longevidad en combinación con las mutantes podría deberse a que ambas intervenciones utilizan la misma vía para extender la longevidad.



**Figura 6. Curvas de decaimiento en restricción dietética**

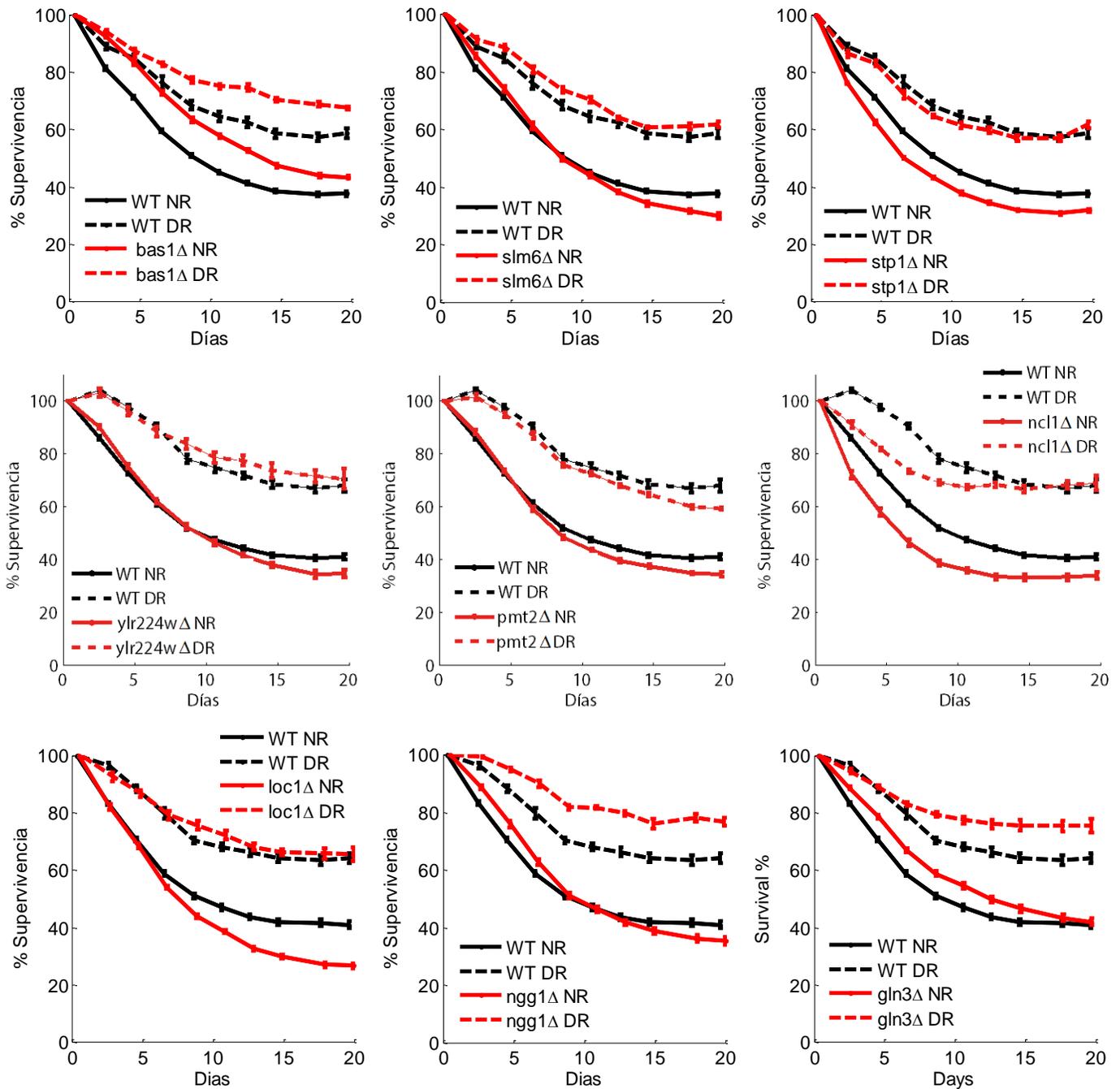
40 mutantes fueron evaluadas en condiciones de restricción dietética (0.5% Glucosa), aquí se muestran aquellas que extendían la longevidad en estas condiciones. El ensayo de CLS por cinéticas de crecimiento tuvo una duración de 15-20 días. Las mutantes *hoΔ* (azul) e *his3Δ* (negro) se utilizaron como tipo silvestre. En rojo cada una de las mutantes. Para cada una de las curvas se realizaron 8 réplicas ( $n=8$ ). Las barras representan el error estándar.

#### 8.4 Mutantes que extienden la longevidad tanto en condiciones de DR como NR

Decidimos probar en condiciones de DR y NR los efectos de las nueve mutantes que previamente habían demostrado extender la longevidad en restricción dietética por medio de un ensayo de CLS por cinéticas de crecimiento (Figura 7).

A partir de las curvas de decaimiento calculamos la tasa de decaimiento ( $T_c$ ) de cada mutante en cada medio (Tabla 2). Brevemente, para obtener las tasas de decaimiento suponemos que las curvas de decaimiento se pueden modelar como una curva exponencial de la forma  $y = a \cdot e^{-bx}$ , donde el índice  $b$  corresponde a la tasa de decaimiento. Ajustamos todas las curvas de decaimiento a la curva exponencial y promediamos todas las tasas de decaimiento. Para determinar aquellas mutantes que tenían una mayor longevidad, y por ende una menor tasa de decaimiento, que la WT utilizamos la prueba  $t$  de Student para comparar la población de mutantes contra la población WT en cada medio. Esta prueba estadística es la recomendada por Murakami *et al* (2009) para comparar los resultados de las curvas de decaimiento [67]. Establecimos que la hipótesis alternativa para nuestra prueba era que el promedio de la tasa de decaimiento de las mutantes era menor que el de la WT ( $T_{cMut} < T_{cWT}$ ,  $\alpha=0.05$ ).

Por medio de inspección visual de las curvas de decaimiento y con base en la prueba estadística aplicada a las tasas de decaimiento de cada mutante en ambos medios, proponemos que las mutantes *bas1Δ* y *gln3Δ* son candidatos fuertes a extender la longevidad por vías independientes a la restricción dietética.



**Figura 7. Confirmación de los efectos de las mutantes candidatas en DR/NR**

Las nueve mutantes candidatas a tener efectos independientes de la DR fueron evaluadas en condiciones de restricción dietética (DR, 0.5% Glucosa) y no restricción (NR, 2 % Glucosa). Como referencia WT se utilizó la mutante *hoΔ*. El ensayo de CLS por cinéticas de crecimiento tuvo una duración de 20 días. Para cada una de las curvas se realizaron 15 réplicas (n=15), excepto para la WT que tiene n=24. Las barras representan el error estándar.

Mutante	Restricción dietética	Tasa de decaimiento <sup>a</sup>	p-value <sup>b</sup>
<i>bas1Δ</i>	NR	0.054	1.75E-11**
	DR	0.026	7.99E-05**
<i>gln3Δ</i>	NR	0.060	0.00079**
	DR	0.024	1.80E-05**
<i>loc1Δ</i>	NR	0.094	0.999
	DR	0.032	0.009**
<i>ncl1Δ</i>	NR	0.103	1
	DR	0.036	0.965
<i>ngg1Δ</i>	NR	0.075	0.580
	DR	0.021	4.92E-07**
<i>pmt2Δ</i>	NR	0.082	0.994
	DR	0.035	0.944
<i>slm6Δ</i>	NR	0.080	0.957
	DR	0.035	0.025*
<i>stp1Δ</i>	NR	0.095	0.999
	DR	0.045	0.936
<i>ylr224wΔ</i>	NR	0.076	0.838
	DR	0.025	0.009**
WT	NR	0.075	-
	DR	0.037	-

**Tabla 2. Tasas de decaimiento de las mutantes candidatas**

Tasas de decaimiento promedio (Td) de las nueve mutantes candidatas las cuales fueron evaluadas en condiciones de restricción dietética (DR, 0.5% Glucosa) y no restricción (NR, 2 % Glucosa). a) La tasa de decaimiento fue obtenida del modelamiento de una curva exponencial b) p-value de una prueba t de Student bajo la hipótesis alternativa que la mutante tiene una Td promedio menor que la Td de la tipo silvestre.

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01. n=15 para cada mutante, n=24 para WT.

## 8.5 La metformina es un tratamiento farmacológico que extiende la longevidad aún en condiciones de restricción dietética.

Para fines de este proyecto también buscábamos intervenciones farmacológicas que pudieran extender la longevidad en condiciones de restricción dietética. Elegimos como tratamientos farmacológicos candidatos a aquellos fármacos que se han reportado previamente como imitadores de la restricción dietética [48]. Para este experimento escogimos tres fármacos que imitan parte de la respuesta de la restricción dietética: Rapamicina, Espermidina y Metformina. Nos interesamos en estos tratamientos ya que reportan efectos sobre la longevidad y la prevención de enfermedades características del envejecimiento similares a la restricción dietética, sin embargo se desconoce si estos fármacos actúan solamente mediante la vía de la restricción dietética. Además, nos interesamos en estos fármacos debido a que los tres están siendo evaluados en pruebas clínicas para su uso en humanos. Para determinar si estos fármacos modulan la longevidad utilizando la vía de la restricción dietética probamos los efectos de los fármacos en combinación con la restricción

dietética. Si no actúan mediante esta vía, la combinación de fármacos y DR dará como resultado una esperanza de vida aún mayor. Como el efecto de la mayoría de los fármacos es dependiente de la dosis, decidimos utilizar cuatro concentraciones diferentes para cada fármaco (Tabla 3). Las concentraciones elegidas se basaron en las concentraciones utilizadas en Salazar (2016) [70], poniendo especial atención en seleccionar aquellas concentraciones que no modificaban el crecimiento y la tasa de duplicación de la levadura, ya que estos factores podrían complicar o impedir la medición de la esperanza de vida.

**Tabla 3. Concentraciones de fármacos extensores de la longevidad utilizados**

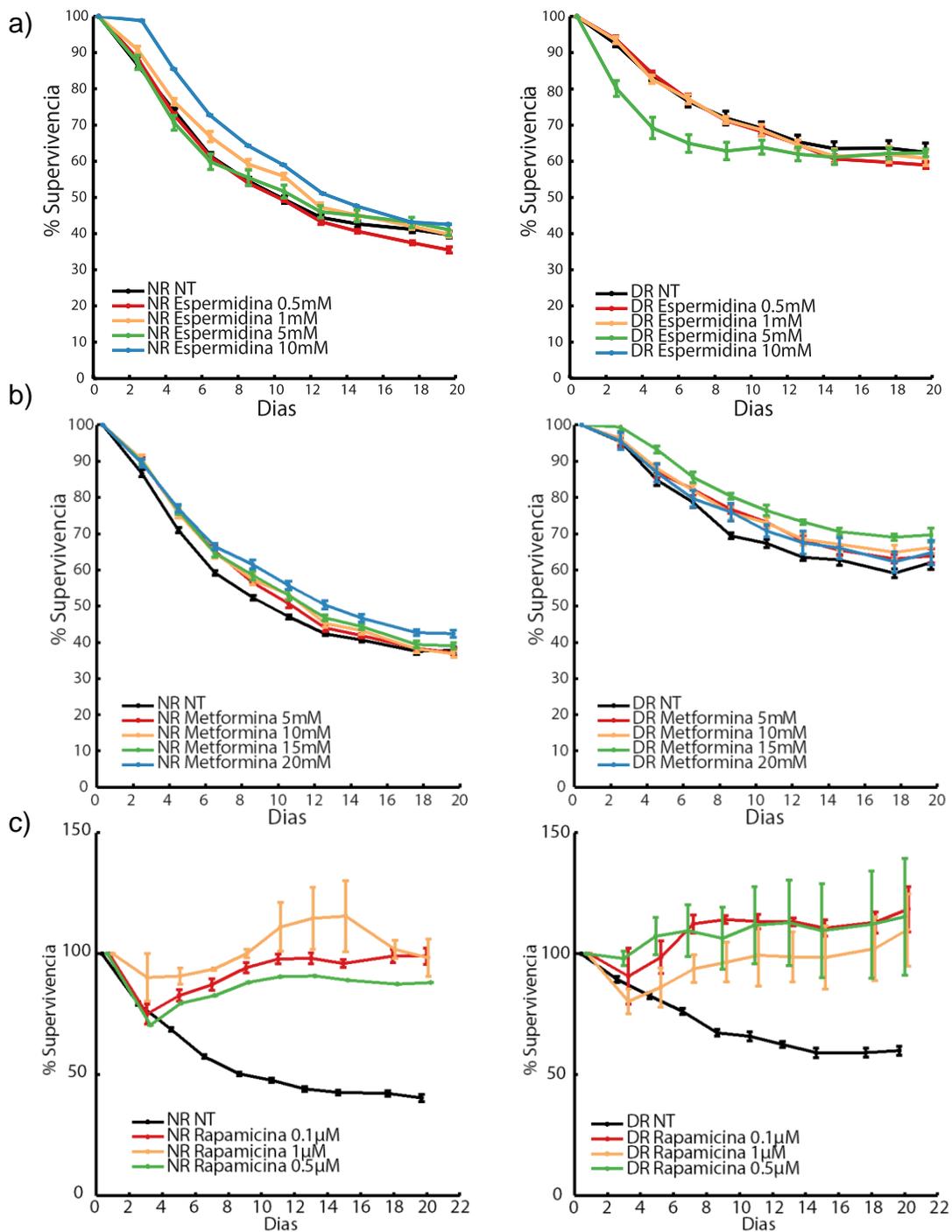
Tratamiento Farmacológico	Concentración			
	0.5mM	1mM	5mM	10mM
Espermidina	0.5mM	1mM	5mM	10mM
Metformina	5mM	10mM	15mM	20mM
Rapamicina	0.1nM	1nM	0.5nM	

La espermidina extendió la longevidad de la levadura en todas las concentraciones probadas bajo condiciones de no restricción, excepto a la concentración 0.5 mM (Figura 8a). Esta concentración resultó inesperadamente en una tasa de crecimiento lenta que dificultó la lectura de la longevidad de esta muestra, por lo cual no se muestra la curva correspondiente. Bajo condiciones de restricción dietética, la espermidina no prolongó más la longevidad en ninguna de sus concentraciones y a partir de la concentración 5mM empezó a disminuir la esperanza de vida de la levadura. Como la espermidina no continua extendiendo la longevidad en condiciones de restricción dietética confirmamos que la espermidina sí actúa mediante la vía de la restricción dietética.

La metformina en condiciones de no restricción logró extender la longevidad en todas sus concentraciones, siendo la extensión de la longevidad proporcional a la concentración utilizada (Figura 8b). Sorprendentemente, la metformina continuó extendiendo la longevidad en condiciones de restricción dietética, lo que nos sugiere que aunque ha sido clasificado como un imitador de la restricción dietética, probablemente utilice otras vías para extender la longevidad. También pudimos observar que a concentraciones más altas, como la concentración de 20 mM, la

metformina empezó a disminuir la longevidad, haría falta una concentración más alta de metformina para confirmar si este efecto se mantiene o si se debe a un error de medición.

Finalmente, la rapamicina aparenta extender la longevidad en todas las concentraciones utilizadas y bajo condiciones de restricción y no restricción (Figura 8c). Sin embargo, dudamos de este resultado debido a que todas las curvas realizadas tienen un error standard muy alto y algunas exceden el 100% de supervivencia. Esta variabilidad en los datos se lo podemos atribuir en parte a que la rapamicina no es soluble en agua y no se diluye bien en los medios utilizados, por lo que algunas concentraciones podrían tener más/menos rapamicina de lo que se supone que tienen. Hace falta encontrar un mejor método para hacer las diluciones de rapamicina.



**Figura 7. Efectos de los tratamientos farmacológicos en DR/NR**

Los fármacos a) espermidina, b) metformina y c) rapamicina se administraron a una levadura WT bajo condiciones de restricción dietética (DR, 0.5% Glucosa) y no restricción (NR, 2 % Glucosa). Como referencia WT se utilizó la mutante *hoΔ* y como control una WT sin tratamiento (NT). Para cada uno de los fármacos se utilizaron cuatro concentraciones (excepto rapamicina con tres concentraciones). Para cada una de las curvas se realizaron 6 réplicas (n=6). Las barras representan el error estándar.

## 8.6 Los tratamientos farmacológicos imitadores de la DR continúan extendiendo la longevidad en algunas mutantes candidatas

En paralelo, revisamos el efecto de los diferentes fármacos que simulan la restricción dietética sobre cuatro de las nueve mutantes candidatas: *bas1Δ*, *slm6Δ*, *pmt2Δ* y *gln3Δ*. Esperamos que si alguna de las mutantes candidatas extiende la longevidad de la levadura por medio de las vías activadas por los fármacos, el efecto de ambos no sea aditivo. En cambio, si el fármaco y la mutación extienden la longevidad por vías independientes, sus efectos serán aditivos. Para este experimento sólo utilizamos los fármacos metformina y espermidina ya que en el experimento anterior la rapamicina no dio resultados replicables. Para cada combinación de tratamiento y mutante se utilizó como control una curva de supervivencia utilizando la misma concentración de tratamiento aplicada a una cepa *hoΔ* la cual denominamos WT. A todas las curvas de supervivencia se les calculó su tasa de decaimiento y se realizó un promedio para cada combinación cepa/tratamiento (Anexo 3).

Para la mutante *bas1Δ* se observó que ambos tratamientos farmacológicos, espermidina y metformina continuaban extendiendo la longevidad, por lo que suponemos que la mutante *bas1Δ* no extiende la longevidad por las mismas vías que la espermidina y la metformina (Figura 9). Sin embargo, la metformina sólo logró aumentar la esperanza de vida en su concentración más alta (Figura 9c), por lo que podrían compartir algunos mecanismos en común. También observamos de nuevo que el tratamiento de espermidina en su concentración más alta (10mM) impedía el crecimiento tanto de la mutante como de la tipo silvestre, por lo que no es posible obtener una curva de decaimiento (Figura 9a, b).

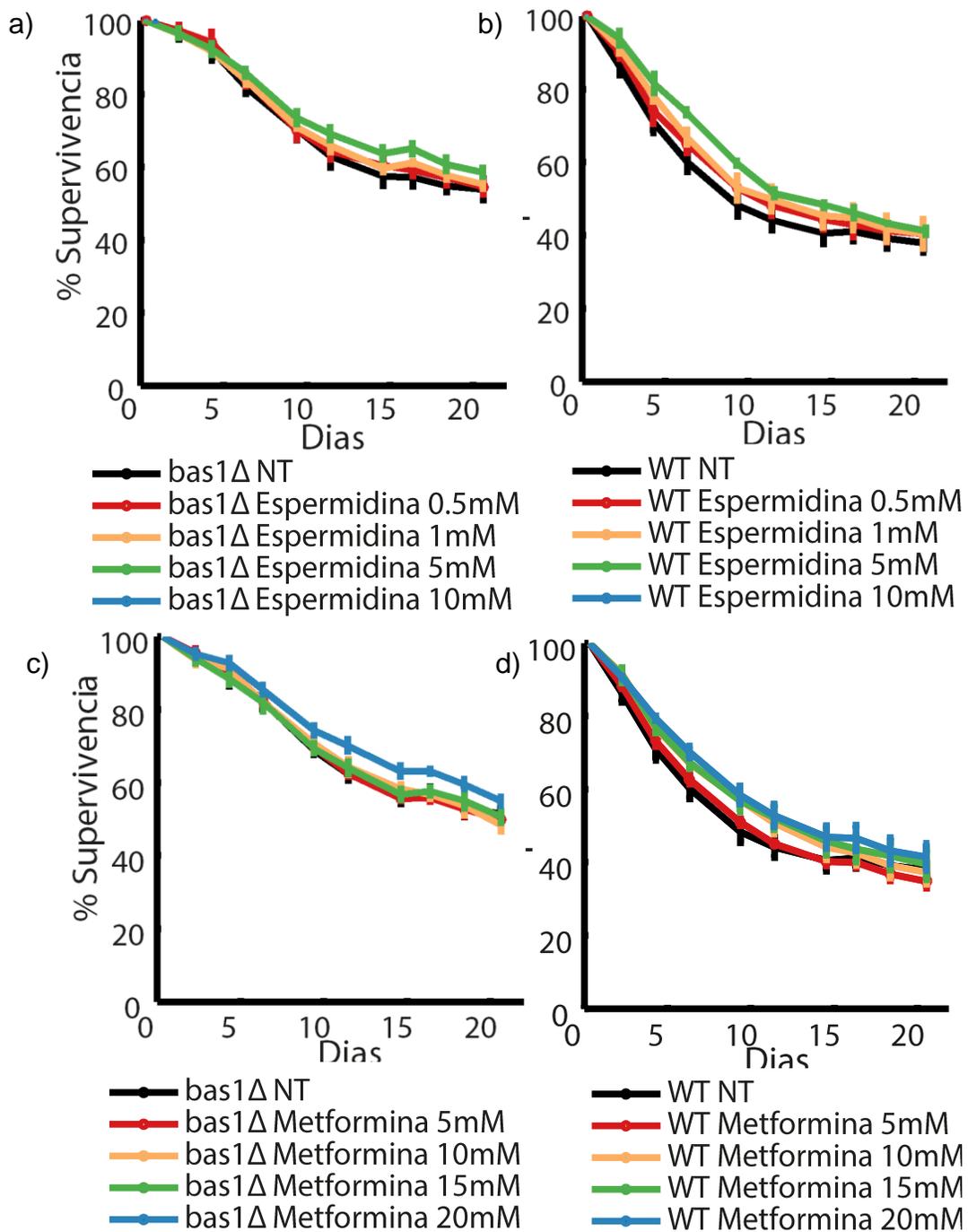
En la mutante *slm6Δ* podemos observar que el tratamiento de espermidina no logró extender aún más la longevidad en ninguna de sus concentraciones (Figura 10a), a pesar de que el tratamiento sí fue efectivo en la cepa silvestre (Figura 10b). Esto nos sugiere que *slm6Δ* podría estar extendiendo la longevidad por medio de las mismas vías que la espermidina. En cambio, la metformina sí continuó extendiendo

la longevidad en la mutante *slm6Δ* en todas las concentraciones utilizadas (Figura 10c), lo que sugiere la mutante y el tratamiento no utilizan los mismos procesos celulares para aumentar la longevidad.

Mientras tanto, la espermidina siguió extendiendo la longevidad de la mutante *pmt2Δ* a las concentraciones de 5mM y 10 mM, por lo que suponemos que no extiende la longevidad utilizando los mismos procesos celulares que la espermidina (Figura 11a,b). En cambio, la metformina no fue capaz de extender aún más la longevidad de la mutante *pmt2Δ* en ninguna de sus concentraciones, lo que nos sugiere que la mutación extiende la longevidad por las mismas vías que la metformina (Figura 11c,d).

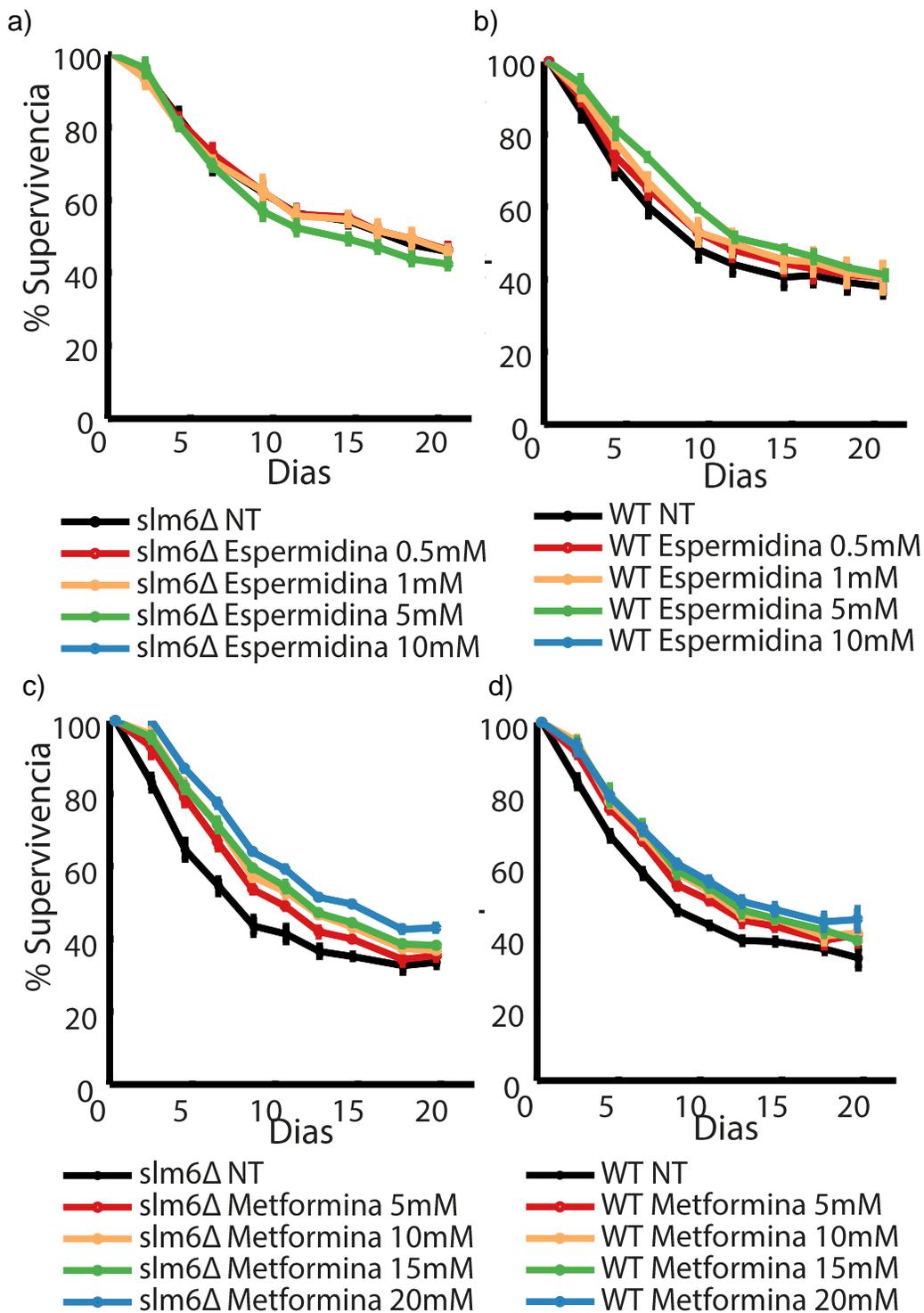
Por último, la mutante *gln3Δ* no mostró respuesta con el tratamiento de espermidina, ninguna de las concentraciones fue capaz de incrementar aún más la longevidad de la mutante, por lo que tal vez la espermidina y la mutante *gln3Δ* compartan vías similares para aumentar la longevidad (Figura 12a,b). Por otra parte, la metformina sí logró extender aún más la longevidad de la mutante; solamente en su concentración más baja (5mM) no observamos extensión adicional de la esperanza de vida (Figura 12c,d). Entonces, podemos suponer que la metformina y la mutación no utilizan los mismos mecanismos para extender la esperanza de vida.

Dados los resultados anteriores con los tratamientos farmacológicos podemos proponer que las mutantes *bas1Δ* y *pmt2Δ* podrían extender la longevidad de manera independiente a la restricción dietética. *pmt2Δ* podría parecer que no es independiente de la restricción dietética debido a que la metformina no extiende aún más su longevidad, pero recordemos que la metformina aparenta actuar independientemente de la restricción dietética (Figura 8b), por lo que si comparten mecanismos de extensión de la longevidad podría tratarse de los mecanismos que extienden la longevidad independientemente de la restricción.



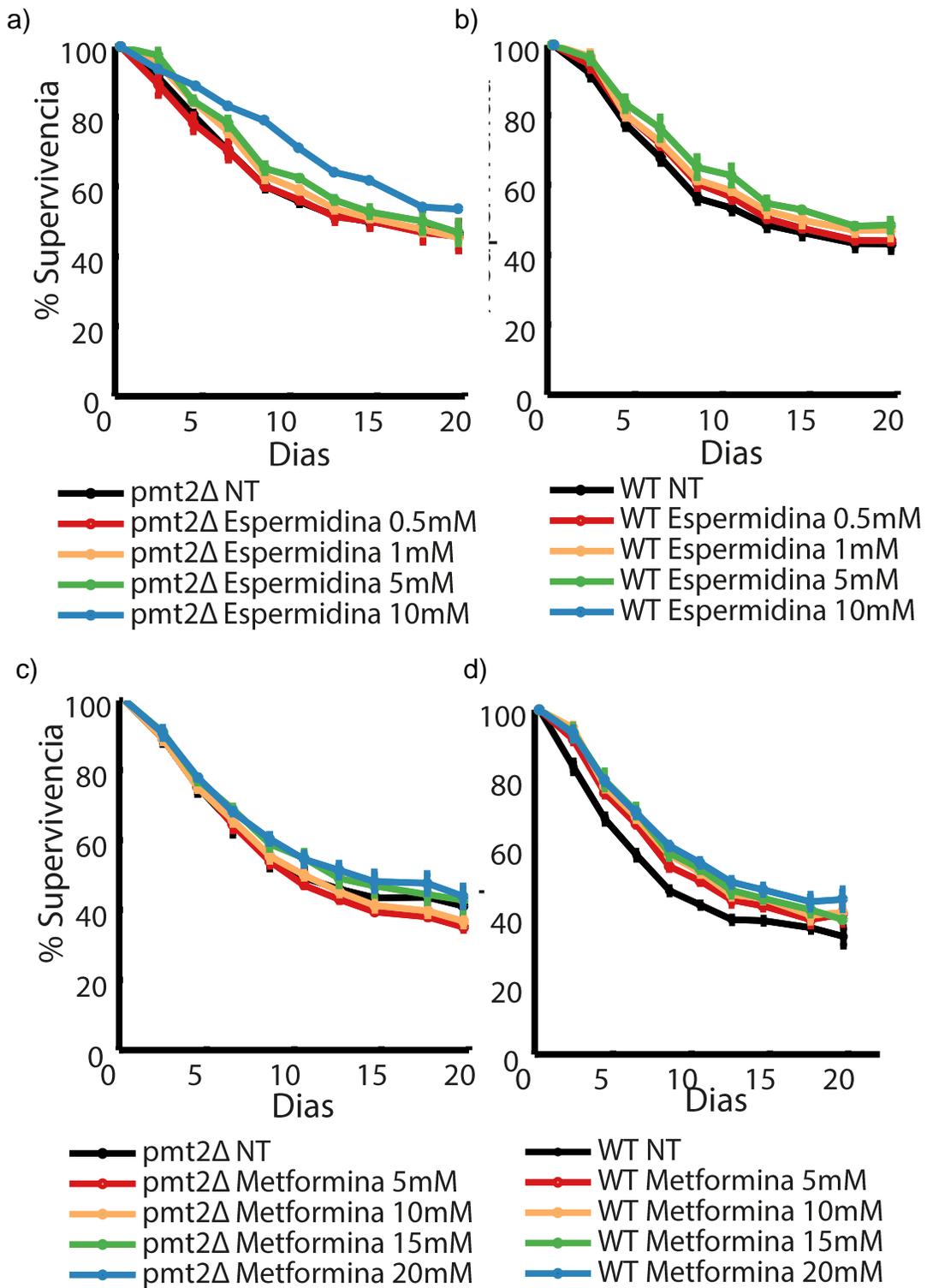
**Figura 9. Efectos de los tratamientos farmacológicos en *bas1Δ***

Los fármacos espermidina (a,b) y metformina (c,d) se administraron a una mutante *bas1Δ* (a,c) y a levadura WT (b,d) como referencia WT. Para cada uno de los fármacos se utilizaron cuatro concentraciones. Cada una de las curvas representa el promedio de cuatro réplicas (n=4). Las barras representan el error estándar.



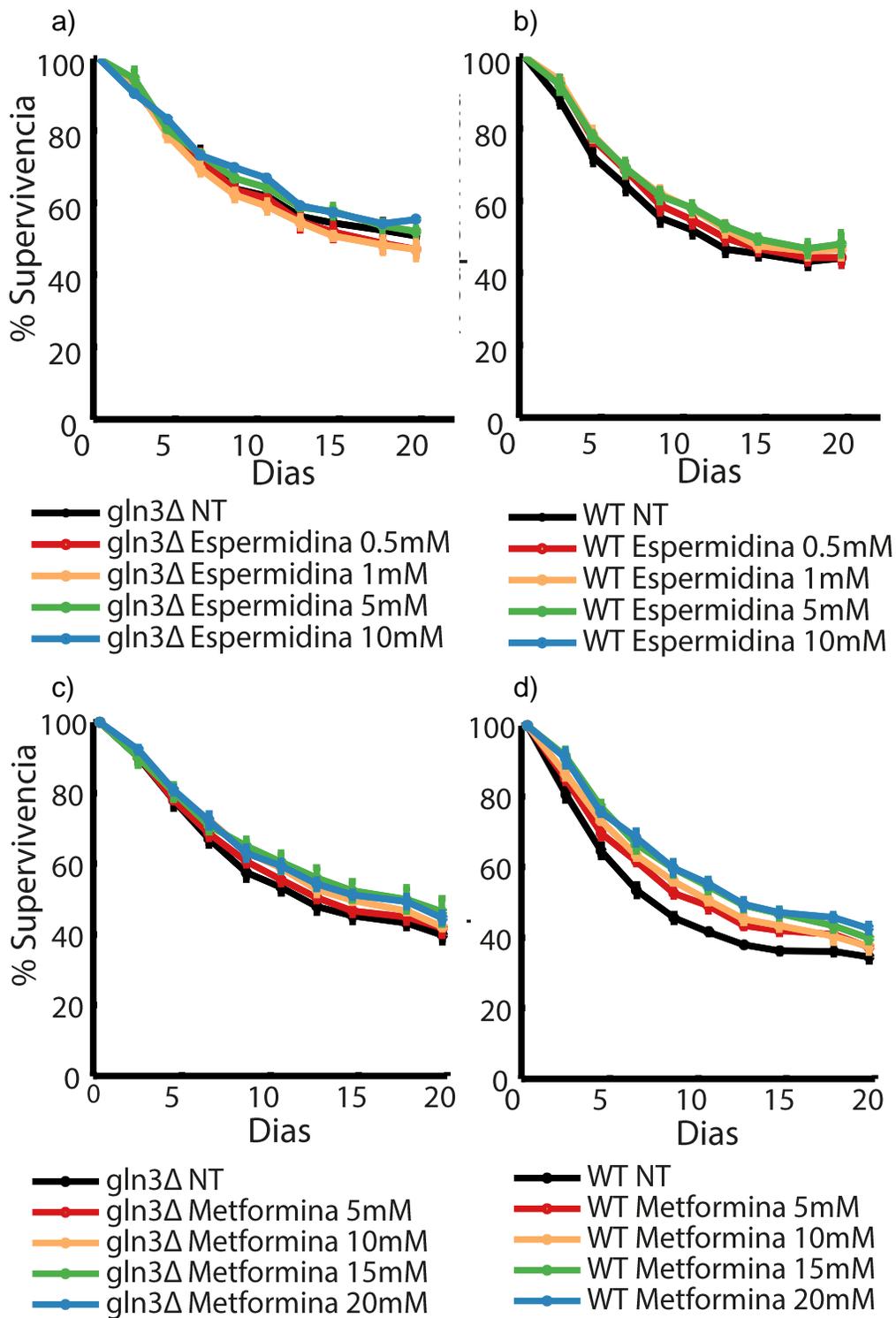
**Figura 10. Efectos de los tratamientos farmacológicos en *slm6Δ***

Los fármacos espermidina (a,b) y metformina (c,d) se administraron a una mutante *slm6Δ* (a,c) y a levadura WT (b,d) como referencia WT. Para cada uno de los fármacos se utilizaron cuatro concentraciones. Cada una de las curvas representa el promedio de cuatro réplicas (n=4). Las barras representan el error estándar.



**Figura 11. Efectos de los tratamientos farmacológicos en *pmt2Δ***

Los fármacos espermidina (a,b) y metformina (c,d) se administraron a una mutante *pmt2Δ* (a,c) y a levadura WT (b,d) como referencia WT. Para cada uno de los fármacos se utilizaron cuatro concentraciones. Cada una de las curvas representa el promedio de cuatro réplicas (n=4). Las barras representan el error estándar.



**Figura 12. Efectos de los tratamientos farmacológicos en *gln3Δ***

Los fármacos espermidina (a,b) y metformina (c,d) se administraron a una mutante *gln3Δ* (a,c) y a levadura WT (b,d) como referencia WT. Para cada uno de los fármacos se utilizaron cuatro concentraciones. Cada una de las curvas representa el promedio de cuatro réplicas (n=4). Las barras representan el error estándar.

Si combinamos los resultados de ambos experimentos tenemos como mutantes candidatas a ser independientes de la restricción dietética a *bas1Δ*, *gln3Δ* y *pmt2Δ*. Sin embargo en las pruebas anteriores con mutantes en condiciones de restricción dietética y no restricción, *pmt2Δ* no mostró resultados muy constantes, a veces apareciendo como independiente de la restricción (Figura 6) y otras veces como progérica en condiciones de restricción (Figura 5,7) por lo cual no la consideraremos para futuros experimentos. Entonces nos quedamos con dos mutantes candidatas para regular la longevidad independientemente de la restricción dietética: *bas1Δ* y *gln3Δ*.

## 8.7 Búsqueda de genes que interactúan con Gln3 para modular la longevidad

Como parte de nuestros objetivos quisimos averiguar los procesos celulares que extienden la longevidad en nuestras mutantes candidatas. Propusimos completar este objetivo mediante un análisis de dobles mutantes, en el cual generamos dobles mutantes y vimos el efecto de la segunda mutación sobre las mutantes candidatas. El fenotipo de la doble mutante se comparó al fenotipo de las mutantes sencillas para determinar si existía interacción genética entre las mutantes. Para que este análisis de dobles mutantes nos diera información útil acerca de las interacciones genéticas que tienen las mutantes candidatas, y por lo tanto de los procesos celulares por los que extienden la longevidad, fue necesaria una gran cantidad de dobles mutantes. Por lo tanto, sólo realizamos este ensayo para una de las mutantes candidatas.

Decidimos realizar el análisis de dobles mutantes para la mutante *gln3Δ* debido a que nos pareció un caso más interesante. Gln3 es un factor de transcripción responsivo a la condición nutricional [71]. Bajo condiciones de no restricción dietética, Gln3 se encuentra secuestrado en el citosol. En cambio, en condiciones de restricción dietética por fuente de nitrógeno, Gln3 se activa, se traslada al núcleo y propicia la transcripción del grupo de genes necesarios para procesar fuentes alternativas de nitrógeno como Gln1 y Dal7. Resulta interesante y contraintuitivo

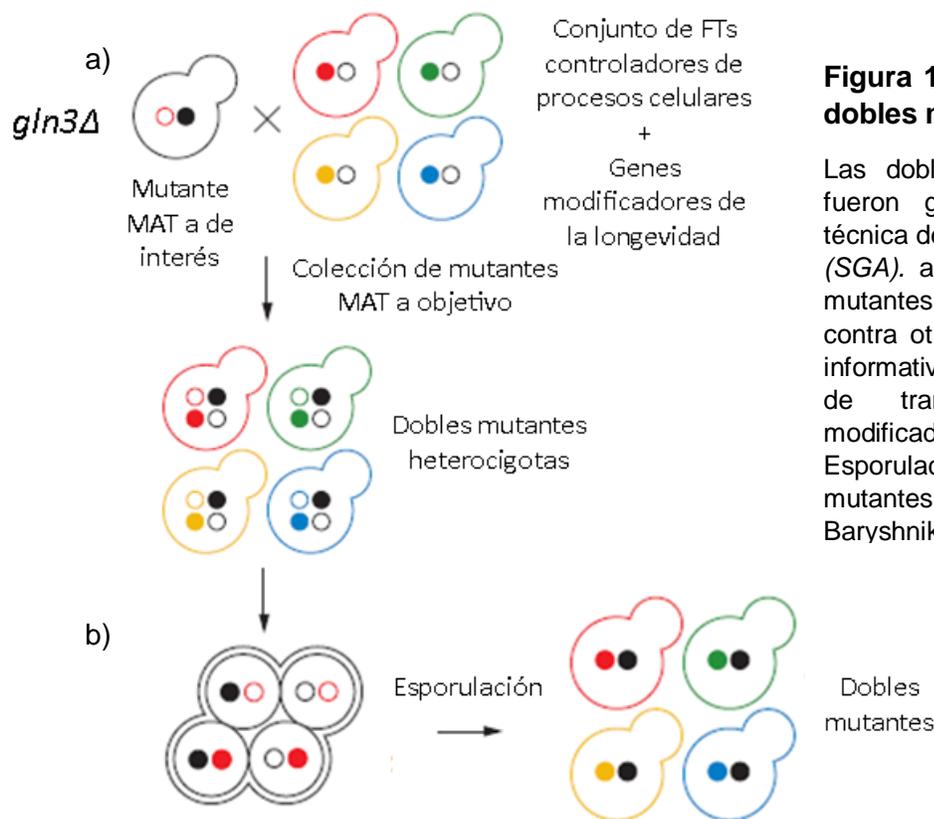
que la delección de este factor de transcripción aumenta la longevidad bajo condiciones de restricción, ya que supuestamente este factor de transcripción se activa en estas condiciones y es necesario para que la levadura pueda procesar otras fuentes de nitrógeno y así sobrevivir [71]. Adicionalmente, se observa que el aumento de la longevidad en la mutante *gln3Δ* también ocurre bajo condiciones de no restricción. Entonces, debe de existir otro conjunto de interacciones para este factor de transcripción no relacionadas con la asimilación de fuentes de nitrógeno que pueden regular la esperanza de vida independiente de la condición nutricional de la levadura.

Para descubrir estas nuevas interacciones genéticas por medio de un análisis de dobles mutantes decidimos cruzar la mutante *gln3Δ* contra un grupo de mutantes *knock-out* compuesto por todos los factores de transcripción de levadura más algunos genes que forman parte de la vía de restricción dietética y otros genes que modifican la longevidad (Anexo 4). Este conjunto de mutantes lo consideramos un conjunto informativo. Las mutantes *knock-out* de factores de transcripción nos dan un panorama general de todos los procesos celulares. Las mutantes de la vía de restricción dietética nos indican si el factor de transcripción Gln3 interactúa de alguna manera con esta vía, y las demás mutantes de genes que modifican la longevidad nos indicarán si Gln3 podría formar parte de otra vía.

Las dobles mutantes necesarias se obtuvieron de una colección realizada previamente en el laboratorio [1]. Las mutantes se realizaron como se describe a continuación: un conjunto de mutantes *knock-out* sencillas de interés (entre las que se encontraba *gln3Δ*) se cruzaron con el conjunto de mutantes *knock-out* sencillas de los factores de transcripción de levadura y otros genes previamente reportados como modificadores de la esperanza de vida (Figura 13a). Después se esporularon las dobles mutantes heterocigotas y se seleccionaron por medio de antibióticos aquellas levaduras que tuvieran ambas mutaciones (Figura 13b).

Decidimos que para el ensayo que medirá la esperanza de vida de las dobles mutantes utilizaríamos un ensayo de CLS basado en competencias (Figura 14) [66]. Brevemente el ensayo consiste en lo siguiente: Dos cepas marcadas con diferentes

proteínas fluorescentes son mezcladas en igual proporción en un mismo cultivo, el cual se deja crecer hasta alcanzar la fase estacionaria, este será el cultivo de envejecimiento (Figura 14a). Para este experimento, la cepa *gln3Δ* marcada con CFP servirá como cepa de referencia, mientras que las dobles mutantes de *gln3Δ* marcadas con RFP serán la “cepa mutante”. Una vez que el co-cultivo de envejecimiento alcanza fase estacionaria se toma una pequeña muestra, se re-siembró en medio fresco y se realiza una curva de crecimiento midiendo la señal de fluorescencia RFP/CFP (Figura 14b).

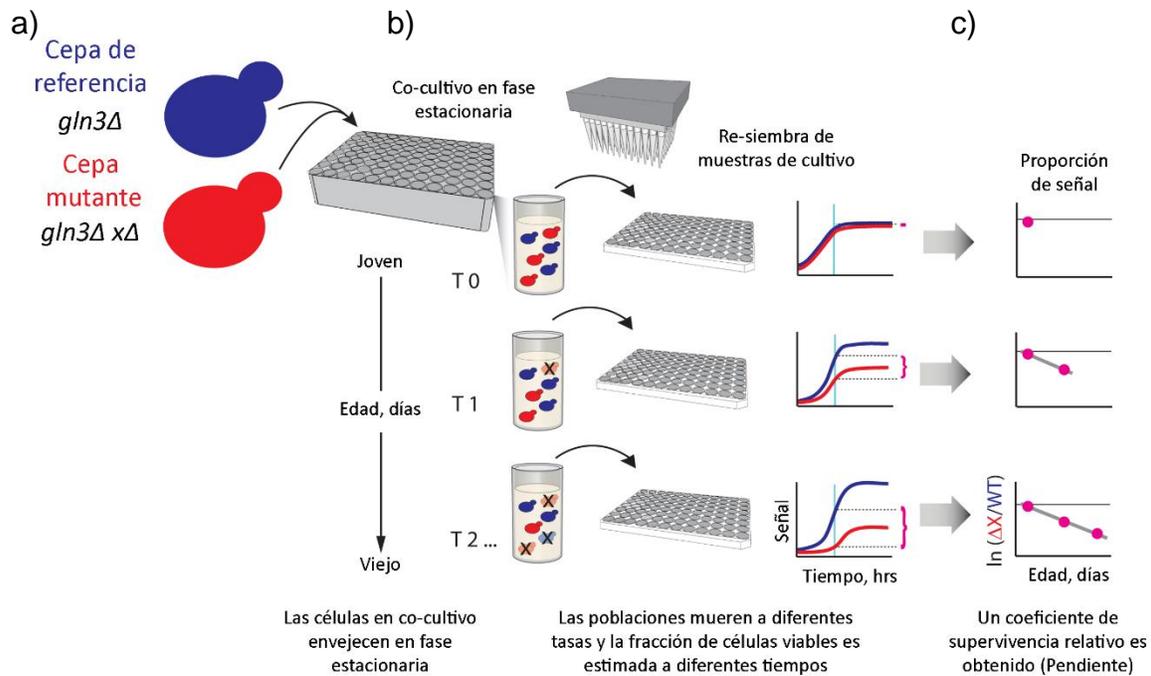


**Figura 13. Generación de las dobles mutantes de *gln3Δ***

Las dobles mutantes de *gln3Δ* fueron generadas utilizando la técnica de *Synthetic Genetic Array* (SGA). a) Un conjunto de cepas mutantes de interés se cruza contra otro conjunto de mutantes informativos, en este caso factores de transcripción y genes modificadores de la longevidad. b) Esporulación y selección de dobles mutantes. Modificado de Baryshnikova *et al* (2013) [2].

Se obtiene la fracción de células viables de cada tipo de cepa a partir de la señal RFP/CFP. Cada día se repite el muestreo del cultivo de envejecimiento y se obtiene una medida de señal RFP/CFP. Esperamos que conforme pasa el tiempo, la proporción de células viables de una cepa en comparación a la otra vaya cambiando y la señal RFP/CFP cambiará acorde. Al final del experimento obtenemos una curva que describa el cambio en la señal de RFP/CFP (Figura 14c). La pendiente

de esta curva nos da lo que se conoce como coeficiente de supervivencia ( $s$ ), y representa la esperanza de vida de la "cepa mutante" en comparación a la cepa de referencia. Un coeficiente de supervivencia igual a cero, indica que la cepa mutante tiene una esperanza de vida igual que la cepa de referencia. Un coeficiente de supervivencia menor que cero significa que la cepa mutante vive menos que la cepa de referencia, mientras que un coeficiente mayor que cero indica que la cepa mutante tiene mayor longevidad que la cepa de referencia.



**Figura 14. Ensayo de CLS basado en competencias**

a) Cepas a comparar su envejecimiento. Marcado con CFP está la mutante *gln3Δ* y marcadas con RFP están las dobles mutantes de *gln3Δ*. b) Del co-cultivo en fase estacionaria se toma cada cierto intervalo una muestra para realizar curvas de crecimiento y determinar la cantidad de células viables de cada cepa de acuerdo a su señal de fluorescencia. c) Se calcula la tasa de cambio de células viables de cada cepa en función del tiempo para obtener el coeficiente de supervivencia. Modificado de Garay *et al* (2014) *PLOS Genetics*.

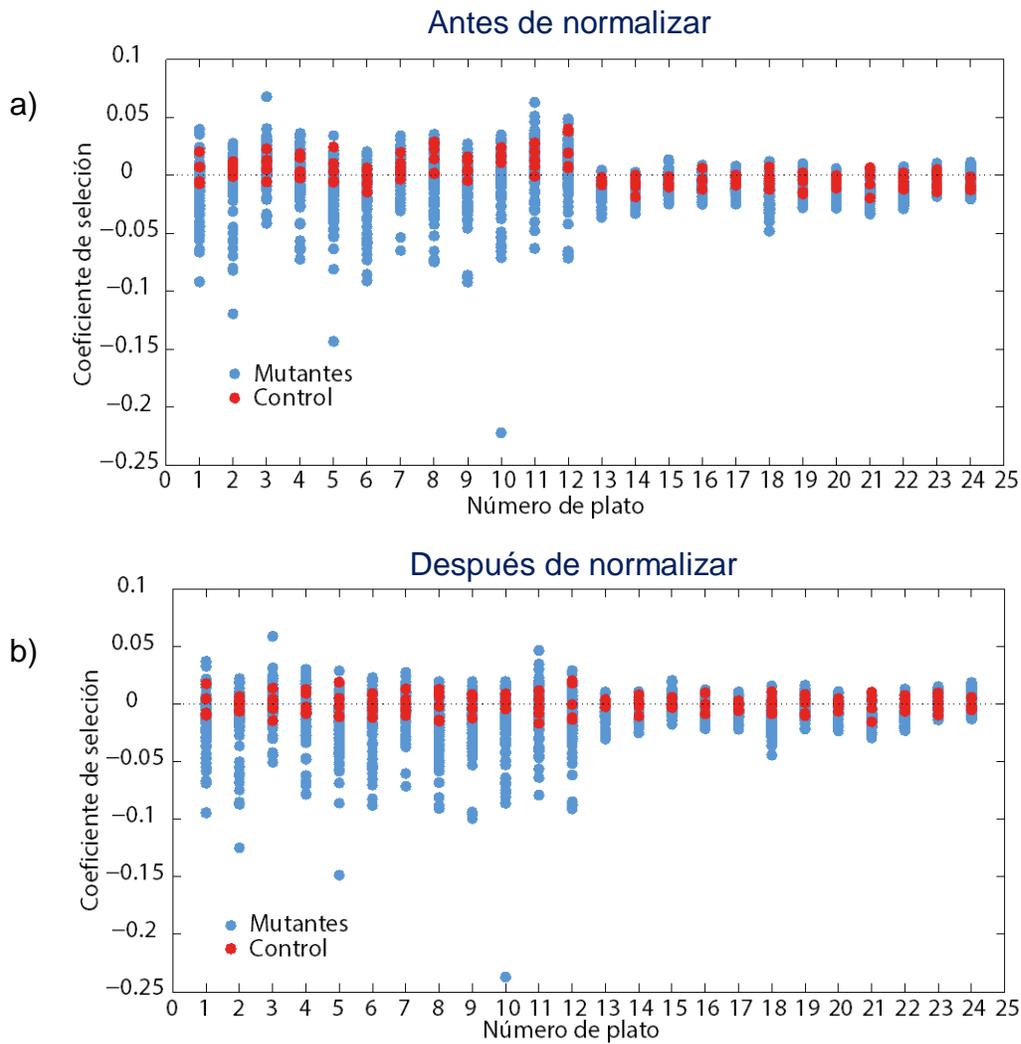
Dentro del experimento de longevidad también incluimos las competencias de las mutantes sencillas de la colección de factores de transcripción y genes modificadores de la longevidad. Necesitamos el dato de la esperanza de vida de las mutantes sencillas y dobles para poder obtener una medida de interacción genética entre los dos genes. Para este conjunto de competencias utilizamos como cepa de referencia a nuestra cepa silvestre (*hoΔ*).

Como control para las competencias de las mutantes dobles se realizó una competencia entre una mutante *gln3Δ* marcada con CFP y la misma mutante marcada con RFP. Dado que se trata de la competencia de una cepa contra sí misma y la esperanza de vida de las dos cepas debería ser la misma, esperamos que el coeficiente de supervivencia de esta competencia sea cero o muy cercano a cero. En el caso de las competencias de las mutantes sencillas se utilizó como control la competencia entre *hoΔ*-CFP y *hoΔ*-RFP.

Una vez obtenidos los coeficientes de supervivencia de las mutantes dobles y sencillas proseguimos a normalizar estos datos tomando en cuenta la variación sistemática de cada bache experimental. Esto es necesario ya que las dobles mutantes se encuentran repartidas entre varios platos de lectura. Para normalizar los datos, a cada plato se le restó la mediana de los coeficientes de supervivencia de la competencia control; para las competencias de mutantes dobles se utilizó la competencia *gln3Δ* vs *gln3Δ* y para las mutantes sencillas se utilizó la competencia *hoΔ* vs *hoΔ* (Figura 15). Con esto podemos comparar entre valores de esperanza de vida de todas las mutantes.

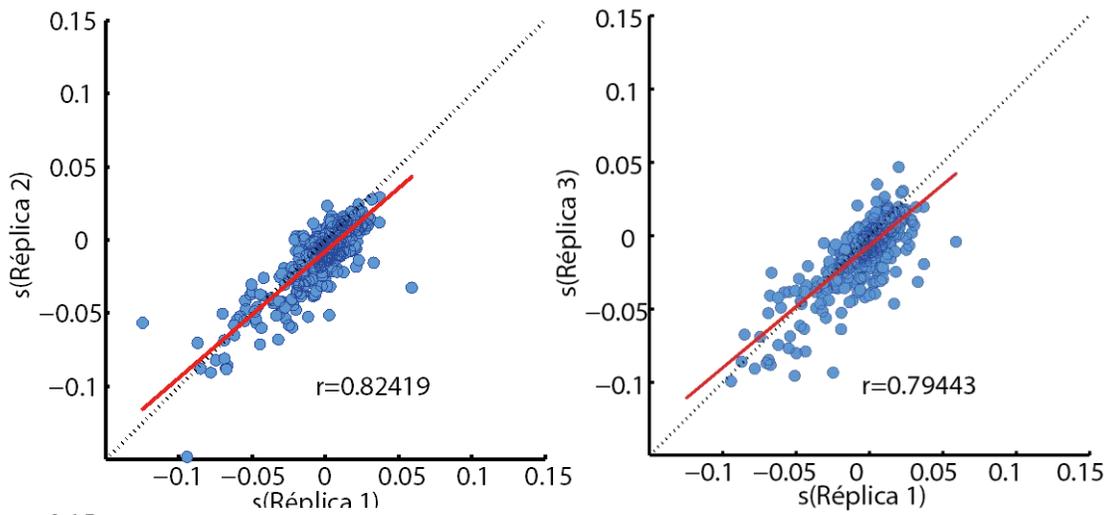
Una vez normalizados los datos, revisamos la correlación entre las tres réplicas técnicas que realizamos. Podemos observar que nuestras competencias de las mutantes dobles tienen una replicabilidad aceptable, con un coeficiente de correlación entre 0.7 y 0.8 (Figura 16) siendo aquellas mutantes con valores de coeficiente de supervivencia extremos aquellos que fallan en replicar. En las competencias de las mutantes sencillas observamos que no hay buena correlación entre las réplicas (Figura 17). Esto se lo atribuimos a la baja fluorescencia que tienen las mutantes sencillas (Anexo 5). Esto dificulta la medición de la proporción de células vivas de ese color y por lo tanto la medición de su longevidad. Como no pudimos obtener medidas confiables de la longevidad de las mutantes sencillas decidimos utilizar datos previos obtenidos de otra publicación del laboratorio de la esperanza de vida del mismo conjunto de mutantes sencillas (Anexo 4). Estos datos son los obtenidos en el proyecto de Garay *et al* (2014) [66]. Proseguimos a promediar los valores de coeficiente de supervivencia para cada una de las

mutantes dobles y sencillas (Anexo 4). Estos valores los convertimos a esperanza de vida promedio (L), para esto simplemente se le suma uno al coeficiente de supervivencia,  $L=s+1$ ; esta conversión de valores nos ayuda a tener una interpretación de los datos más intuitiva: una esperanza de vida relativa con valor de uno nos indica que la mutante tiene la misma esperanza de vida que la cepa de referencia. Luego, verificamos la distribución de los efectos de las mutantes sencillas (Figura 18a). Vemos que en concordancia con nuestro criterio de elección de las mutantes sencillas, la distribución de los efectos de estas se encuentra sesgada hacia los extremos, con muy pocas mutantes sin efecto sobre la longevidad. En cuanto a las mutantes dobles, observamos que en su distribución de esperanza de vida una buena proporción de las dobles mutantes tiene una menor longevidad que la mutante de referencia *gln3Δ* (Figura 18b). Esto sugiere que la mayoría de las segundas mutaciones realizadas a *gln3Δ* interactúan negativamente con el factor de transcripción y disminuyen su efecto sobre la longevidad.



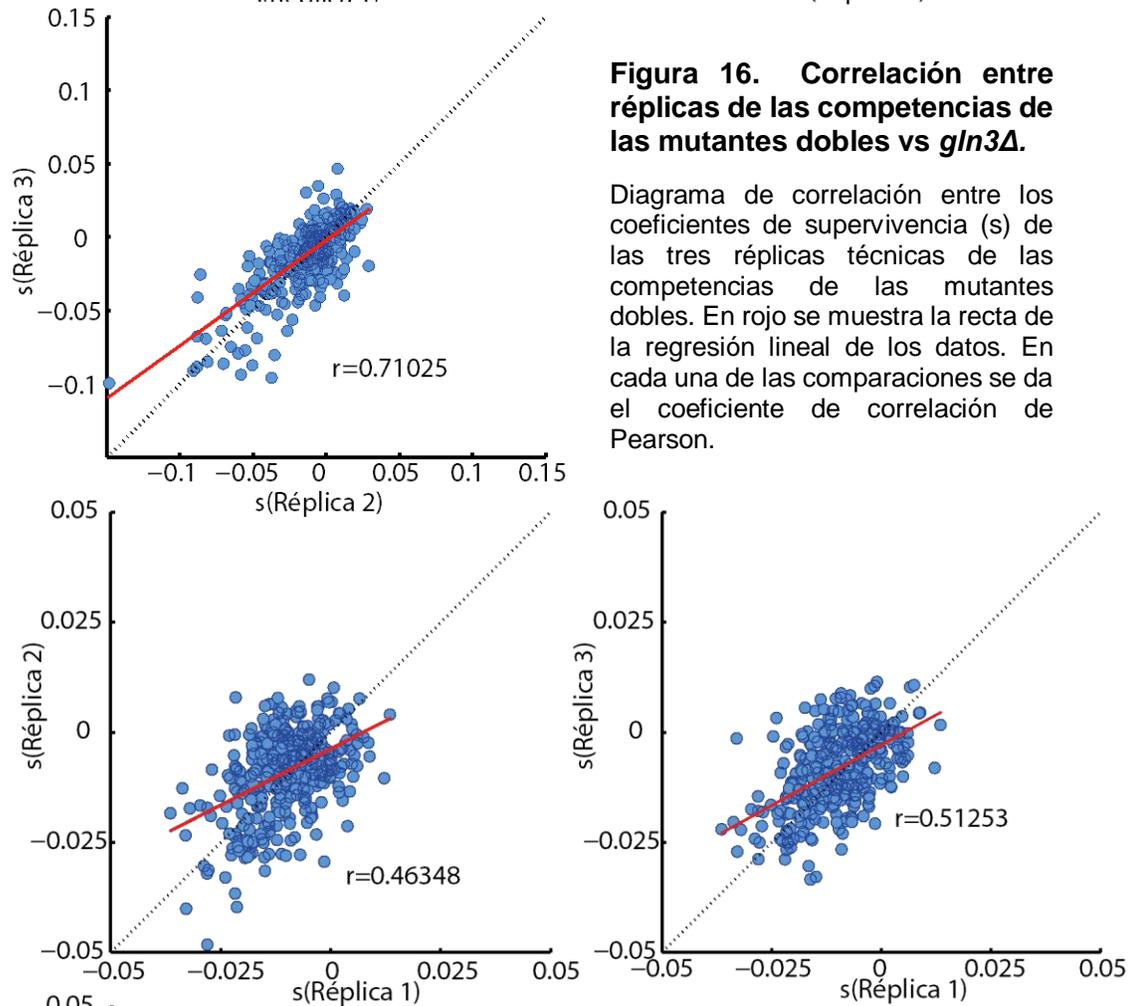
**Figura 15. Normalización de los coeficientes de selección**

Normalización de los coeficientes de selección de las competencias. a) Datos antes de la normalización. Las placas 1-12 corresponden a las competencias de las mutantes dobles. Las placas 13-24 corresponden a las competencias de las mutantes sencillas. En rojo se muestran las competencias control, *gln3Δ* vs *gln3Δ* para las mutantes dobles y *hoΔ* vs *hoΔ* para las mutantes sencillas. b) Datos después de la normalización, a cada plato se le resta la mediana de las respectivas competencias control.



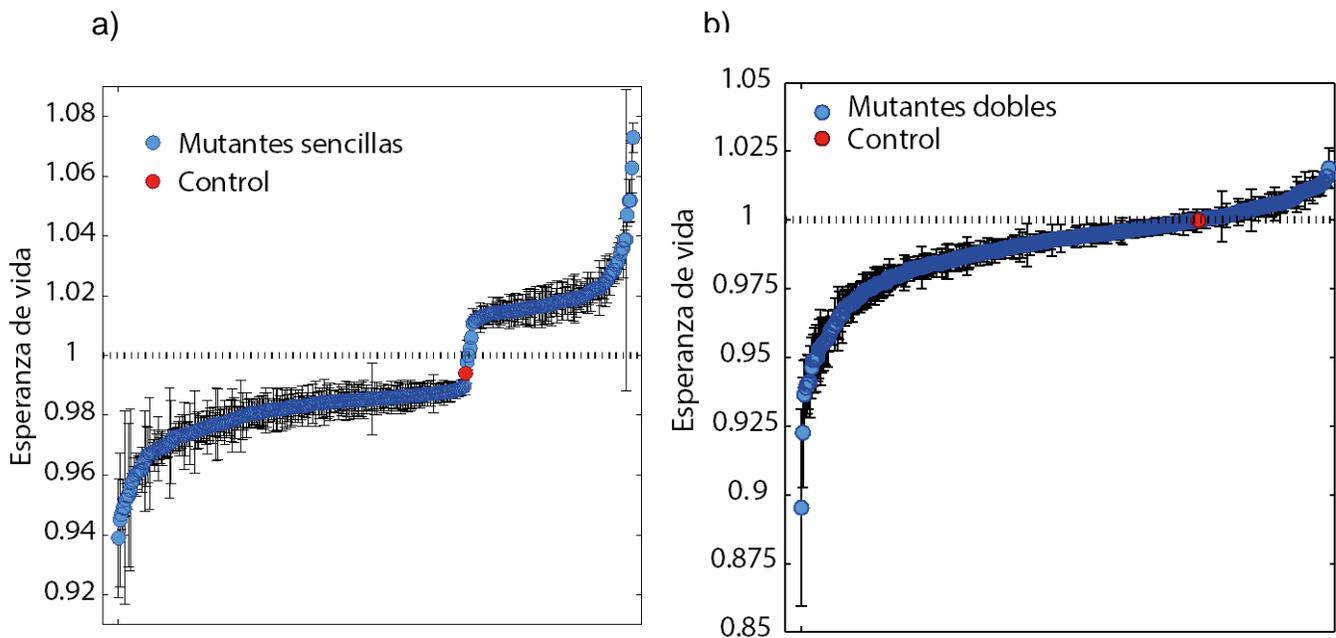
**Figura 16. Correlación entre réplicas de las competencias de las mutantes dobles vs *gln3Δ*.**

Diagrama de correlación entre los coeficientes de supervivencia (s) de las tres réplicas técnicas de las competencias de las mutantes dobles. En rojo se muestra la recta de la regresión lineal de los datos. En cada una de las comparaciones se da el coeficiente de correlación de Pearson.



**Figura 17. Correlación entre réplicas de las competencias de las mutantes sencillas vs *hoΔ*.**

Diagrama de correlación entre los coeficientes de supervivencia (s) de las tres réplicas técnicas de las competencias de las mutantes sencillas. En rojo se muestra la recta de la regresión lineal de los datos. En cada una de las comparaciones se da el coeficiente de correlación de Pearson.



**Figura 18. Distribución de la esperanza de vida relativa de las mutantes sencillas y dobles.**

Esperanza de vida promedio de las competencias de las mutantes sencillas a) y dobles b). Para cada distribución se muestran en azul la esperanza de vida promedio de las mutantes y en rojo la esperanza de vida relativa de la mutante de referencia. En el caso de las mutantes sencillas el control es *hoΔ* y para las mutantes dobles es *gln3Δ*. Las barras muestran el error estándar de tres muestras.

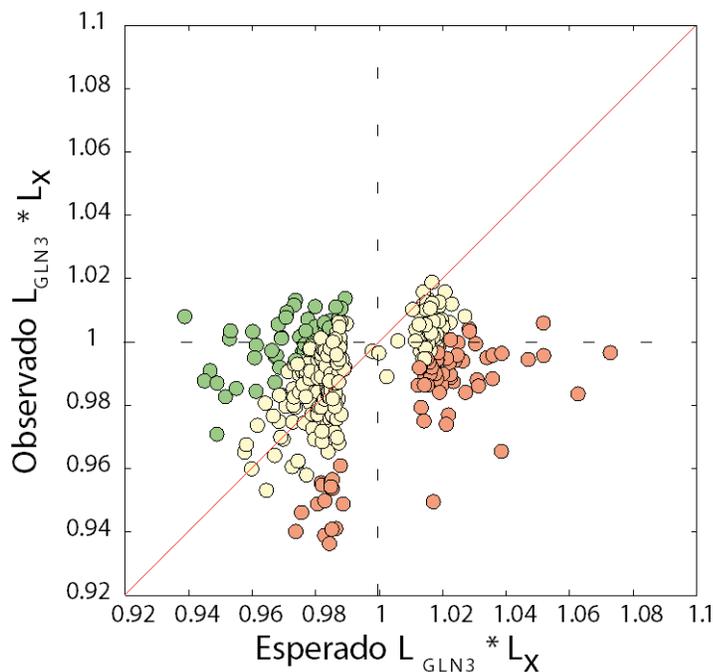
### 8.8 Cálculo de la epistasis y búsqueda de términos GO sobrerrepresentados en los genes que interactúan con *GLN3*

Con los datos de la esperanza de vida promedio de las mutantes sencillas y dobles podemos obtener una medida de la interacción entre *GLN3* y nuestro grupo representativo de mutantes. Una manera de obtener el grado de interacción genética entre dos mutantes es la epistasis, la cual se basa en medir cual es la desviación del fenotipo esperado de una mutante doble. Si los efectos de dos mutaciones son independientes entre sí, se espera que el fenotipo de la doble mutante sea el mismo que la suma de los efectos de las mutantes sencillas. Entonces, si el fenotipo de la doble mutante es menor o mayor que el fenotipo esperado se dice que hay interacción entre los genes muestreados. Existen varios modelos para determinar cuál será el fenotipo esperado en la mutante doble, como el aditivo, el multiplicativo y el logarítmico. Para analizar los datos de este experimento elegimos el modelo multiplicativo de epistasis, ya que es el estándar para utilizar en fenotipos de adecuación. En este modelo, el fenotipo esperado de

la mutante doble ( $L_{xy}$ ) se estima como la multiplicación del fenotipo de las dos mutantes sencillas,  $L_{xy} = L_x * L_y$ .

Realizamos el cálculo de la esperanza de vida esperada para las mutantes dobles y lo comparamos con la esperanza de vida que se observó en el experimento (Figura 19). Observamos que la gran mayoría de las mutantes sencillas que extienden la longevidad en un fondo silvestre pierden su efecto en un fondo  $gln3\Delta$ : no logran extender aún más la longevidad y a veces incluso disminuyen la esperanza de vida de  $gln3\Delta$ . En cuanto a las mutantes sencillas que acortan la longevidad en el fondo silvestre, parece haber igual proporción de dobles mutantes cuya esperanza de vida se ve aún más disminuida y de casos en los que los efectos de la segunda mutación se ven aliviados.

Una vez obtenida la esperanza de vida esperada para las mutantes dobles podemos calcular la epistasis entre  $GLN3$  y cada uno de los genes muestreados (Anexo 5). Para calcular la epistasis ( $\epsilon$ ) bajo el modelo multiplicativo seguimos la fórmula  $\epsilon_{xy} = L_{xy} - L_x * L_y$ , o parafraseando,  $\epsilon_{xy} = L_{observada} - L_{esperada}$ . Al analizar la distribución de la epistasis obtenida observamos que a pesar de que la distribución contaba con muchos genes que interactúan de forma ligeramente positiva, esta distribución contaba con una cola larga hacía los valores negativos de epistasis. Esto sugiere que la mayoría de los genes cuya delección afecta fuertemente el fenotipo de  $gln3\Delta$  interactúan negativamente con la mutación de este factor de transcripción.

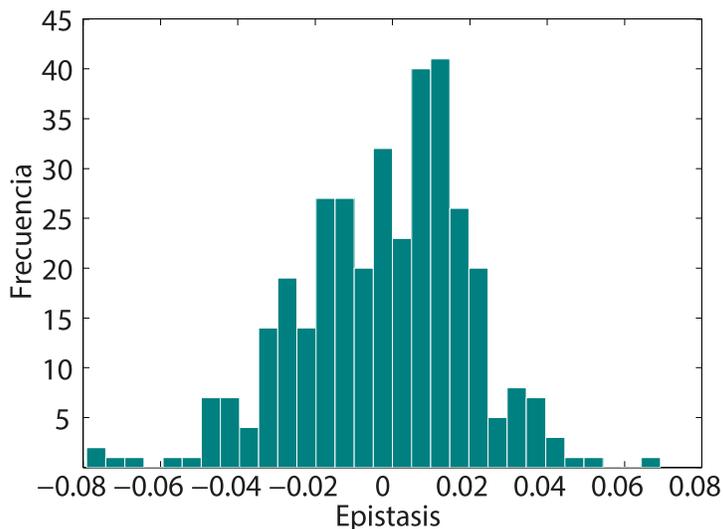


**Figura 19. Esperanza de vida esperada contra observada.**

Esperanza de vida relativa observada contra la esperada de las dobles mutantes. La esperanza de vida esperada se obtuvo con la fórmula  $L_{gln3\Delta x \Delta} = L_{gln3\Delta} * L_{x\Delta}$ .

Los datos de la esperanza de vida de las mutantes sencillas se obtuvieron de Garay *et al* (2014). La esperanza de vida observada de las mutantes dobles es relativa a la mutante sencilla  $gln3\Delta$ .

Los genes con epistasis negativa se muestran en rojo, mientras que los genes con epistasis positiva se muestran en verde.



**Figura 20. Distribución de la epistasis**

Distribución de la epistasis entre el gen *GLN3* y la colección de factores de transcripción de levadura. La epistasis se obtuvo a partir de la fórmula  $\epsilon_{gln3\Delta x\Delta} = L_{gln3\Delta x\Delta} - L_{gln3\Delta} * L_{x\Delta}$ .

El promedio de la distribución es -0.0020

Para seleccionar aquellos genes que interactúan significativamente con *GLN3* decidimos arbitrariamente el punto de corte de 0.02 en la epistasis, seleccionando aquellos genes que tienen una epistasis mayor a 0.02 y menor a -0.02. Con este punto de corte obtuvimos 46 genes que interactúan positivamente con *GLN3* y 71 genes que interactúan negativamente; el resto de los genes muestreados no mostraron interacción significativa con *GLN3* (Anexo 4).

Enseguida, quisimos averiguar si entre aquellos genes que interactúan significativamente con *GLN3* existen procesos sobrerrepresentados, para lo cual decidimos hacer un análisis de enriquecimiento de términos de ontología génica (GO, por sus siglas en inglés). El análisis de enriquecimiento se realizó con el paquete de R TopGO, utilizando un algoritmo basado en el estadístico exacto de Fisher para determinar cuáles términos están estadísticamente sobrerrepresentados. Una característica que nos inclinó a usar el paquete TopGO es que este paquete toma en cuenta la jerarquía de los términos GOs para calcular el enriquecimiento. Esto es útil para evitar que términos muy generales tengan una significancia alta derivada de la alta significancia de sus términos hijos, disminuyendo así los falsos positivos. También TopGO tiene la opción de realizar el análisis de enriquecimiento utilizando un universo de genes definido por el usuario. Aprovechamos esta opción para poder definir nuestro universo de genes como todo el conjunto de genes modificadores de la longevidad y factores de transcripción utilizados para generar las dobles mutantes. De manera el universo de términos GOs se limita a los términos GOs de los genes utilizados en este trabajo y podemos

evaluar la significancia de los términos GOs considerando la proporción de cada término GO en nuestro conjunto.

Decidimos realizar el análisis de enriquecimiento buscando solamente en la categoría de términos GO de procesos biológicos ya que solo nos interesa conocer las vías que interactúan con *GLN3*. El análisis de enriquecimiento se corrió independientemente para los genes con epistasis positiva y aquellos con epistasis negativa. Para el grupo de genes que interactúan positivamente con *GLN3* encontramos ocho términos GOs significativos (Tabla 4a), mientras que para los genes que interactúan negativamente encontramos 10 términos sobrerrepresentados (Tabla 4b). Un resumen visual de los grupos funcionales que interactúan con *GLN3* puede verse en la Figura 21. Decidimos ignorar dos de los términos GOs encontrados en los genes con epistasis negativa: GO:0051252 y GO:0010468. Estos términos corresponden a los procesos relacionados con la regulación de expresión de otros genes, los cuales son característicos de genes que codifican para factores de transcripción. No nos sorprende que estos términos estén enriquecidos en nuestro análisis ya que una parte de nuestro conjunto de genes blanco son factores de transcripción.

**Tabla 4: Términos GOs sobrerrepresentados en genes epistáticos a *GLN3***

Términos GO sobrerrepresentados en el conjunto de genes que interactúan positiva y negativamente con *GLN3*. a) Número de genes con ese término GO en el universo de trabajo. b) Número de genes de interés (genes con epistasis) que forman parte del término GO. c) Número de genes de interés esperados para el término GO. d) p-value de la prueba exacta de Fisher. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$

**Términos GOs sobrerrepresentados en genes con epistasis positiva**

GO.ID	Término GO	Anotados <sup>a</sup>	Significativos <sup>b</sup>	Esperados <sup>c</sup>	p-val <sup>d</sup>
GO:0007114	Cell budding	3	3	0.39	0.0021**
GO:0007021	Tubulin complex assembly	2	2	0.26	0.0166*
GO:0034497	Protein localization to pre-autophagosomal structure	2	2	0.26	0.0166*
GO:0016237	Microautophagy	11	4	1.43	0.0414*
GO:0032258	CVT pathway	11	4	1.43	0.0414*
GO:0000045	Autophagosome assembly	3	2	0.39	0.0456*
GO:0032527	Protein exit from endoplasmic reticulum	3	2	0.39	0.0456*
GO:0046916	Cellular transition metal ion homeostasis	7	3	0.91	0.0494*

Tabla 4 (Continuación)

Términos GO sobrerrepresentados en genes con epistasis negativa

GO.ID	Término GO	Anotados <sup>a</sup>	Significativos <sup>b</sup>	Esperados <sup>c</sup>	p-val <sup>d</sup>
GO:0016579	Protein deubiquitination	3	3	0.62	0.0085**
GO:0097034	Mitochondrial respiratory chain complex IV biogenesis	3	3	0.62	0.0085**
GO:0051252	Regulation of RNA metabolic process	53	13	10.94	0.0143*
GO:0043486	Histone Exchange	4	3	0.83	0.0288*
GO:0010468	Regulation of gene expression	58	18	11.97	0.033*
GO:0000730	DNA recombinase assembly	2	2	0.41	0.0421*
GO:0007007	Inner mitochondrial membrane organization	2	2	0.41	0.0421*
GO:0043007	Maintenance of rDNA	2	2	0.41	0.0421*
GO:0045324	Late endosome to vacuole transport	2	2	0.41	0.0421*
GO:0071940	Fungal-type cell wall assembly	2	2	0.41	0.0421*

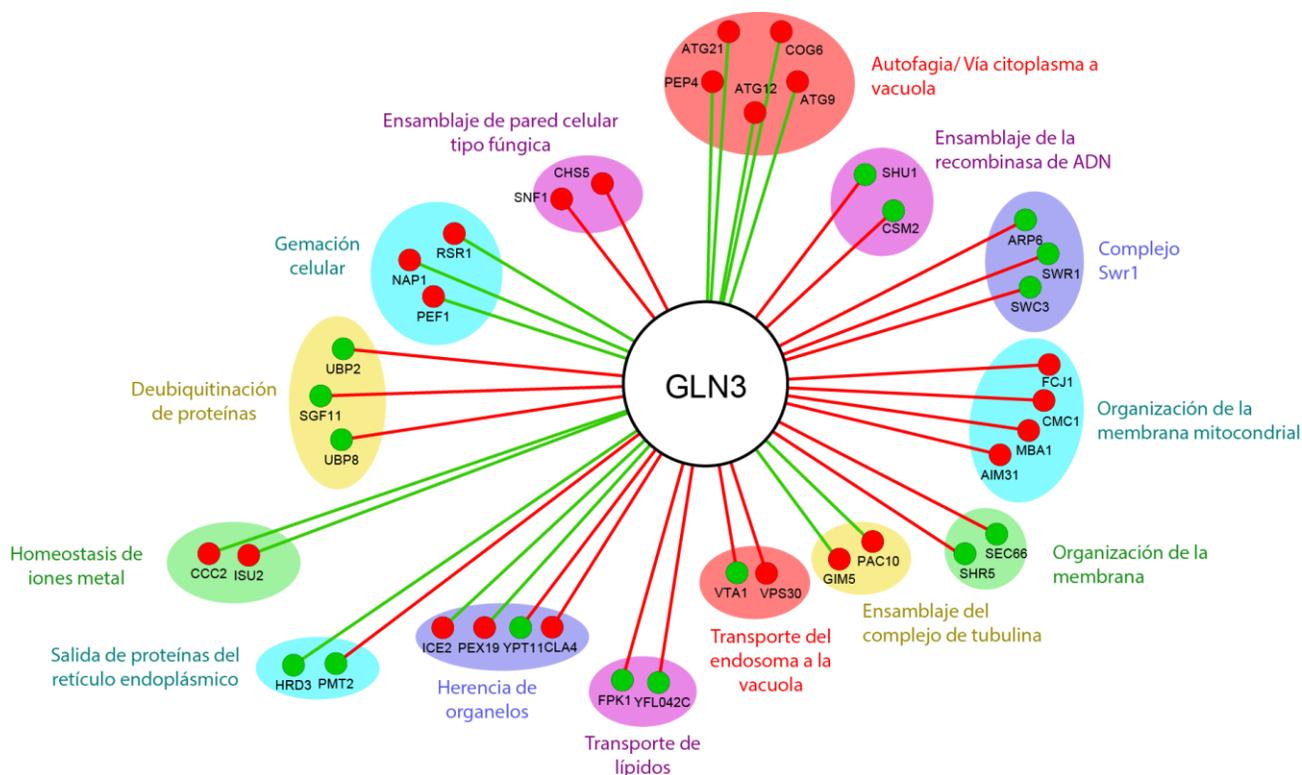


Figura 21. Grupos funcionales que interactúan con *GLN3*

Grupos funcionales sobrerrepresentados en genes que interactúan con *GLN3*. Los genes se encuentran representados por círculos y las interacciones por líneas. El color dentro de cada círculo representa su efecto sobre la longevidad en mutante sencilla. Verde, la mutante sencilla extiende la longevidad. Rojo, la mutante reduce la esperanza de vida. Las interacciones entre los genes pueden ser negativas (línea rojo) o positivas (línea verde).

Para minimizar el número de falsos positivos, ajustamos los p-values obtenidos del análisis de enriquecimiento de términos GO mediante un método basado en la tasa de falsos descubrimientos (Tabla 5). Después de aplicar la corrección podemos observar que no hay términos GOs significativos en los genes con epistasis negativa y positiva a *GLN3*. Esto probablemente se deba a que el grupo de genes que utilizamos para buscar procesos celulares es un grupo pequeño y cada término GO tiene muy pocos miembros dentro de sí mismo. Será necesario llevar a cabo un análisis similar al realizado aquí, pero incluyendo más genes de cada término GO, para poder determinar si los términos aquí encontrados son significativos. A pesar de esto, consideramos que los resultados obtenidos del análisis de epistasis y de enriquecimiento de términos GO contienen información valiosa acerca de los genes que interactúan con *GLN3* son un buen inicio para averiguar acerca de los procesos que extienden la longevidad en *gln3Δ*.

#### Tabla 5: Corrección por FDR para los términos GOs significativos

Corrección por FDR de los p-values de los términos GO sobrerrepresentados de los genes que interactúan con *GLN3* a) p-values sin corrección. b) p-values corregidos por FDR.

##### Términos GOs sobrerrepresentados en genes con epistasis negativa

GOID	Término GO	P-value <sup>a</sup>	FDR <sup>b</sup>
GO:0007114	Cell budding	0.0021	0.1995
GO:0007021	Tubulin complex assembly	0.0166	0.2945
GO:0034497	Protein localization to pre-autophagosomal structure	0.0166	0.2945
GO:0016237	Microautophagy	0.0414	0.2945
GO:0032258	CVT pathway	0.0414	0.2945
GO:0000045	Autophagosome assembly	0.0456	0.2945
GO:0032527	Protein exit from endoplasmic reticulum	0.0456	0.2945
GO:0046916	Cellular transition metal ion homeostasis	0.0494	0.2945

##### Términos GOs sobrerrepresentados en genes con epistasis positiva

GO.ID	Término GO	P-value <sup>a</sup>	FDR <sup>b</sup>
GO:0016579	Protein deubiquitination	0.0085	0.5278
GO:0097034	Mitochondrial respiratory chain complex IV biogenesis	0.0085	0.5278
GO:0051252	Regulation of RNA metabolic process	0.0143	0.5278
GO:0043486	Histone Exchange	0.0288	0.5278
GO:0010468	Regulation of gene expression	0.033	0.5278
GO:0000730	DNA recombinase assembly	0.0421	0.5278
GO:0007007	Inner mitochondrial membrane organization	0.0421	0.5278

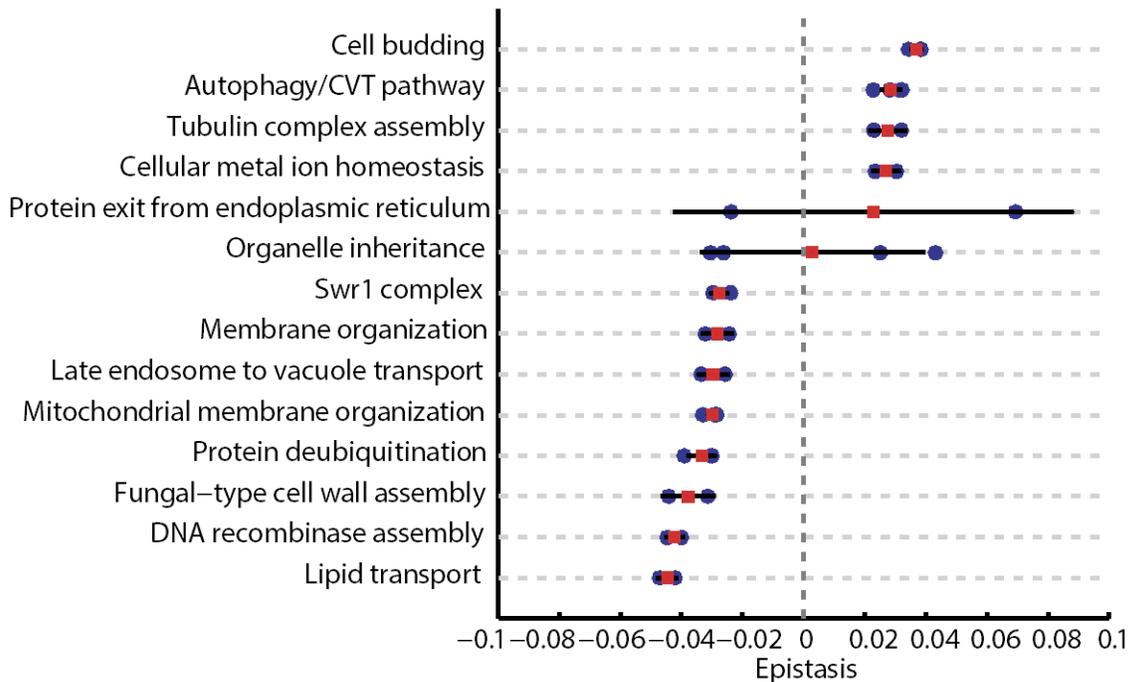
Tabla 5 (Continuación)

**Términos GO sobrerrepresentados en genes con epistasis negativa**

GO.ID	Término GO	P-value <sup>a</sup>	FDR <sup>b</sup>
GO:0043007	Maintenance of rDNA	0.0421	0.5278
GO:0045324	Late endosome to vacuole transport	0.0421	0.5278
GO:0071940	Fungal-type cell wall assembly	0.0421	0.5278

Decidimos averiguar la magnitud con la que cada grupo funcional interactuaba con *GLN3*. Descubrimos que el grupo funcional que interactúa positivamente con mayor fuerza con *GLN3* es el de gemación celular, mientras que negativamente el que mayor fuerza de interacción es el de transporte de lípidos (Figura 22). Los genes de estos grupos funcionales deben de pertenecer a vías que ayudan a Gln3 a modular la longevidad.

También observamos que la mayoría de los genes que conforman un grupo funcional tienen una medida de epistasis similar a la de otros miembros del grupo, sin embargo los genes de los grupos funcionales de herencia de organelos y salida de proteínas del retículo endoplásmico muestran poca coherencia entre sí. En el grupo de herencia de organelos este comportamiento tal vez se deba a que todos los genes de este grupo regulan a distintos organelos.



**Figura 22. Epistasis promedio de los grupos funcionales**

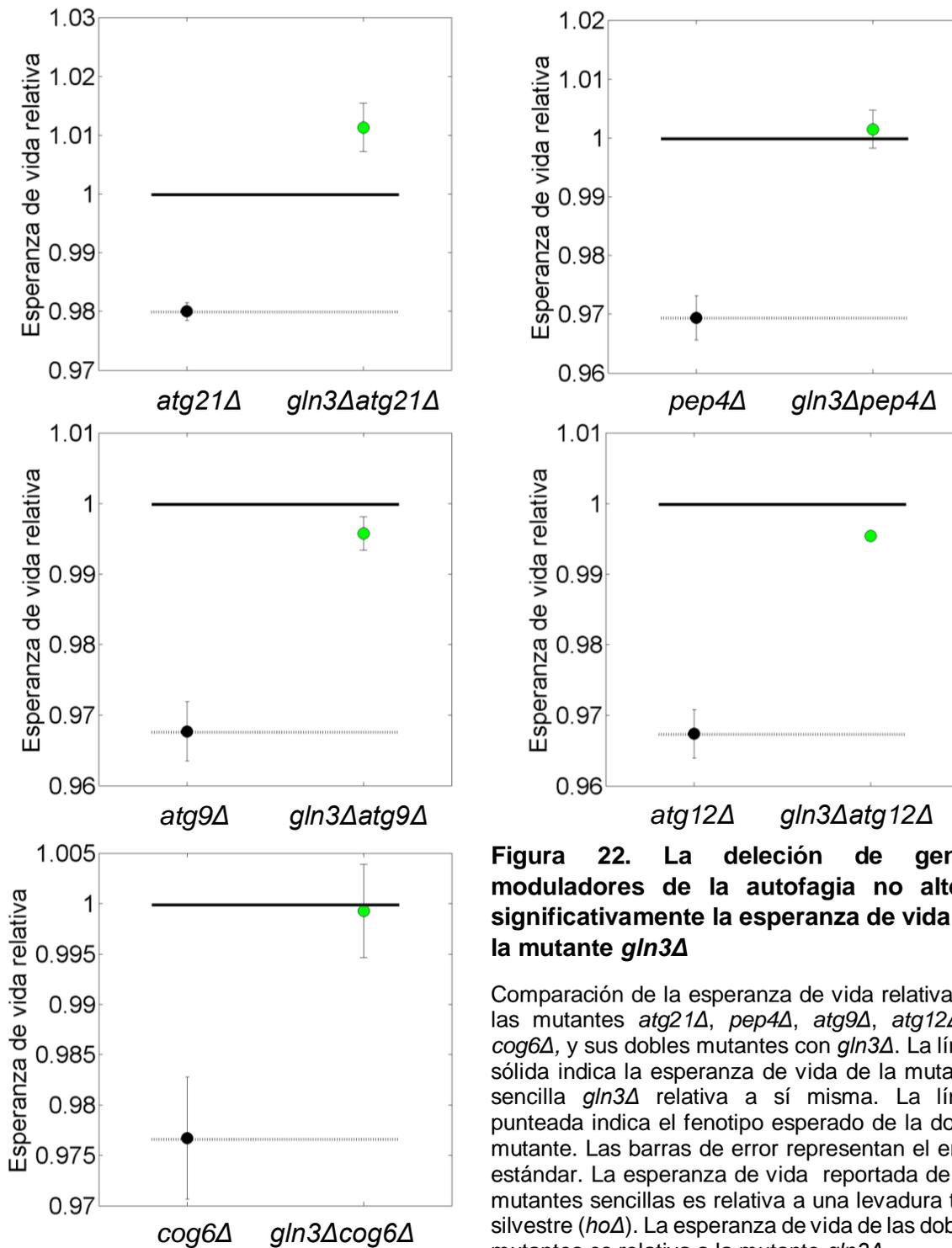
La epistasis de los genes que interactúan significativamente con *GLN3* agrupada por términos GO. Cada gen se muestra como un punto azul. En rojo se muestra la epistasis promedio de cada grupo funcional. Las barras de error representan el error estándar.

## 8.9 Probables mecanismos mediante los cuales la mutante *gln3Δ* aumenta la longevidad.

Dentro de los genes que interactúan con *GLN3* encontramos grupos funcionales de genes que interactúan positivamente (Figura 21). Este comportamiento nos habla de genes que se encuentran dentro de la misma vía lineal que *GLN3* o que interactúan directamente con éste formando un complejo. Curiosamente observamos que la mayor parte del conjunto de genes que interactúan positivamente con *GLN3* acorta la longevidad en su forma de mutante sencilla. Prácticamente ninguno de los genes que interactúan de manera positiva con *GLN3* extiende la longevidad en su forma de mutante sencilla.

Encontramos como grupos funcionales interesantes que interactúan con *GLN3* a los genes que regulan la autofagia (Figura 21). Todos estos genes que regulan la longevidad son necesarios para la activación de la autofagia y su delección causa una disminución de la actividad autofágica y la esperanza de vida. Sin embargo, observamos que la doble mutante con *gln3Δ* de estos genes responsables de activar la autofagia, presenta una ligera, más no significativa, modificación en su esperanza de vida (Figura 22). El hecho de que la esperanza de vida de las dobles mutantes tenga casi el mismo fenotipo que la mutante sencilla *gln3Δ* nos sugiere que en esta mutante sencilla la autofagia se encuentra desactivada.

Otro grupo interesante de genes es el que conforma el grupo funcional de gemación celular. Al igual que con la autofagia, la inhibición de este proceso tiene poco efecto sobre la doble mutante con *gln3Δ*, lo que sugiere que este proceso se encuentra inhibido en la mutante *gln3Δ* (Figura 23). También podría ser que estas mutaciones estén regulando indirectamente otro proceso, como el crecimiento filamentoso. Los genes *NAP1*, *RSR1* y *PEF1* regulan el sitio de elección de la gemación y su mutación altera los patrones de gemación e impide la formación de las estructuras necesarias para el crecimiento filamentoso [72-74].

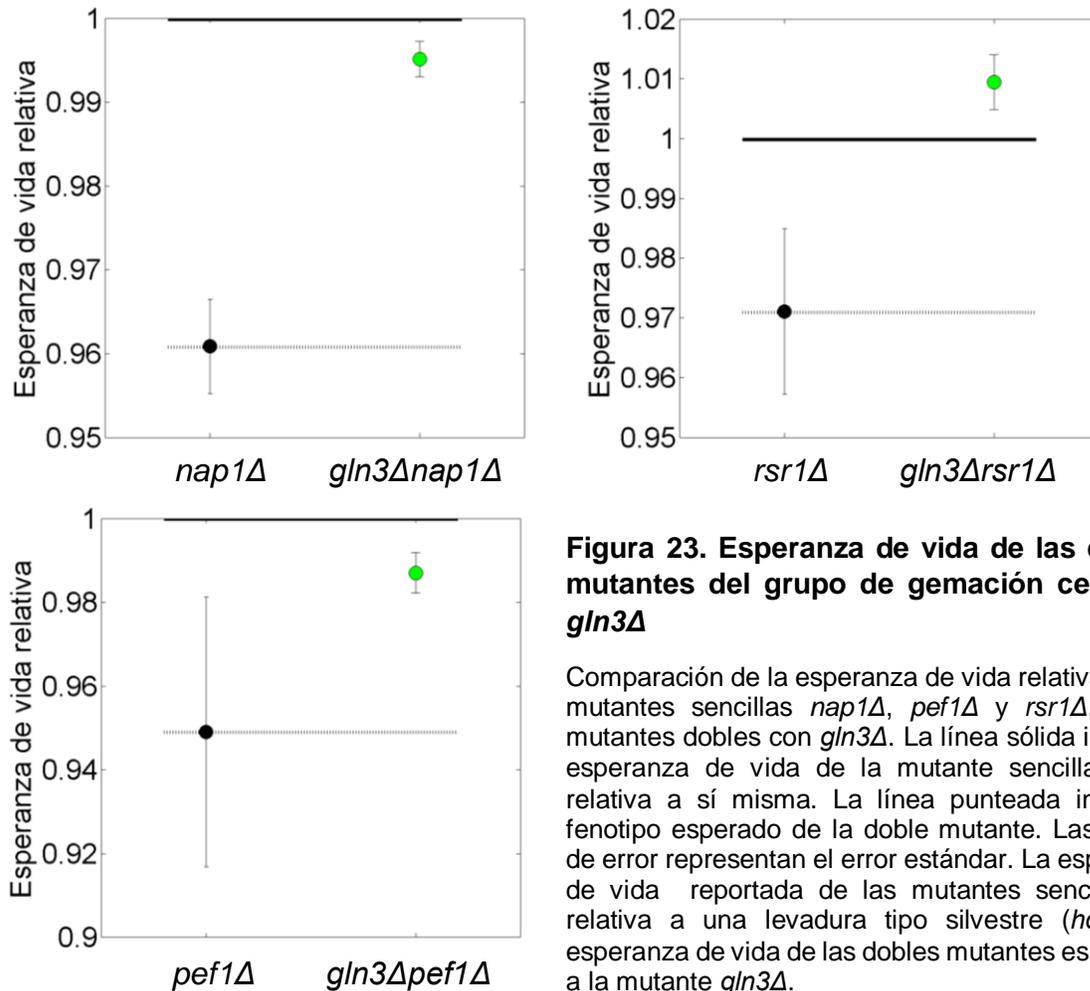


**Figura 22. La delección de genes moduladores de la autofagia no altera significativamente la esperanza de vida de la mutante *gln3Δ***

Comparación de la esperanza de vida relativa de las mutantes *atg21Δ*, *pep4Δ*, *atg9Δ*, *atg12Δ* y *cog6Δ*, y sus dobles mutantes con *gln3Δ*. La línea sólida indica la esperanza de vida de la mutante sencilla *gln3Δ* relativa a sí misma. La línea punteada indica el fenotipo esperado de la doble mutante. Las barras de error representan el error estándar. La esperanza de vida reportada de las mutantes sencillas es relativa a una levadura tipo silvestre (*hoΔ*). La esperanza de vida de las dobles mutantes es relativa a la mutante *gln3Δ*.

También observamos que *GLN3* interactúa negativamente con los genes pertenecientes a los grupos funcionales de organización de la membrana de mitocondria y ensamblaje de la pared celular. Las mutantes sencillas *knock-out* de los genes pertenecientes a estos grupos disminuyen la longevidad, mientras que las dobles mutantes con *gln3Δ* disminuyen aún más de lo esperado la esperanza de

vida de la levadura (Figura 24,25). Esto nos habla de que estos genes actúan en una vía compensatoria a la que actúa *gln3*, regulando un proceso esencial para la extensión de la longevidad en la mutante *gln3Δ*.

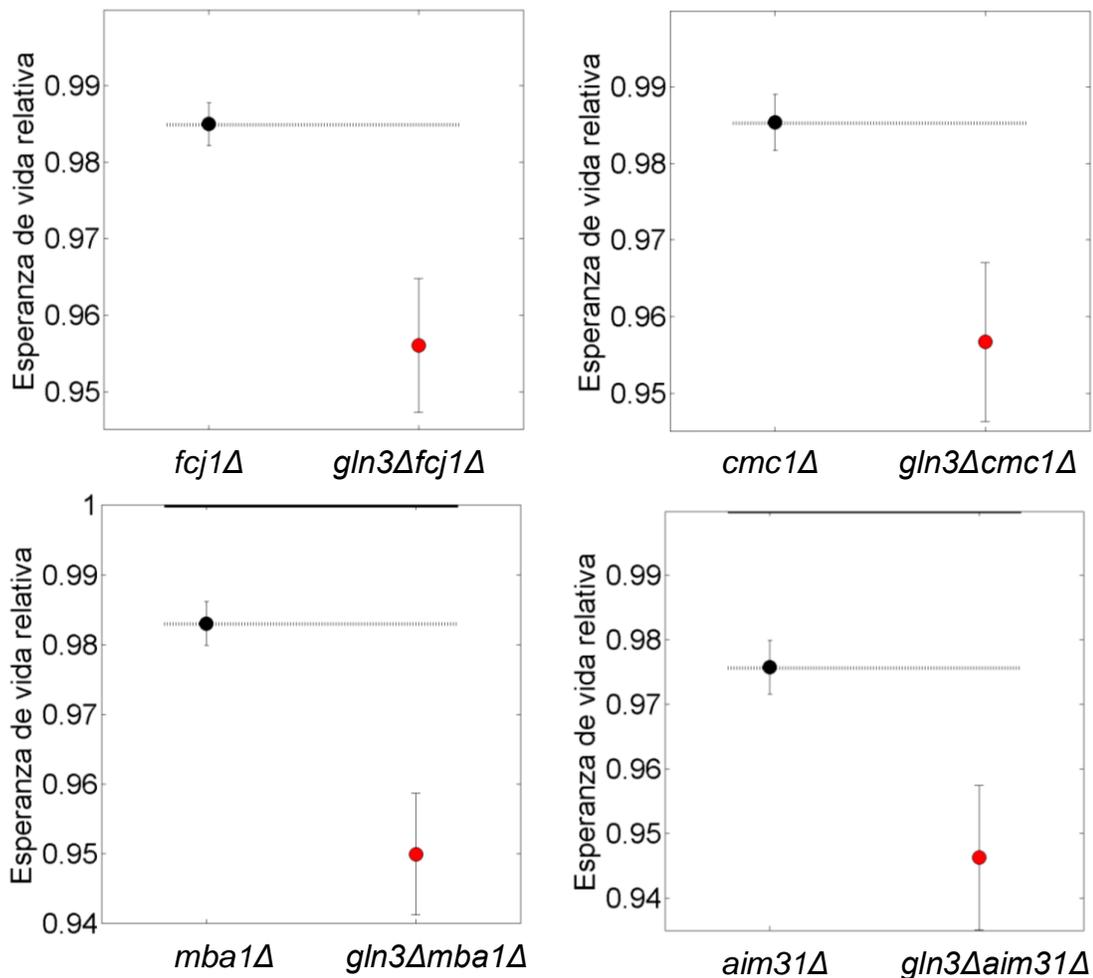


**Figura 23. Esperanza de vida de las dobles mutantes del grupo de gemación celular y *gln3Δ***

Comparación de la esperanza de vida relativa de las mutantes sencillas *nap1Δ*, *pef1Δ* y *rsr1Δ*, y sus mutantes dobles con *gln3Δ*. La línea sólida indica la esperanza de vida de la mutante sencilla *gln3Δ* relativa a sí misma. La línea punteada indica el fenotipo esperado de la doble mutante. Las barras de error representan el error estándar. La esperanza de vida reportada de las mutantes sencillas es relativa a una levadura tipo silvestre (*hoΔ*). La esperanza de vida de las dobles mutantes es relativa a la mutante *gln3Δ*.

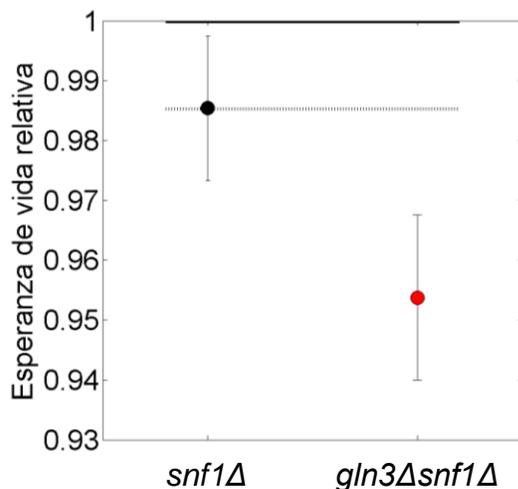
En el caso del grupo funcional de organización de la membrana interna de mitocondria, el proceso que probablemente se regula es el de la respiración celular. Dentro de este grupo encontramos dos genes encargados del ensamblaje del complejo citocromo c oxidasa (*AIM31*, *CMC1*). También se encuentran *MBA1* y *FCJ1* los cuales son necesarios para el ensamblaje de proteínas en la membrana interna de la mitocondria. La mutación de cualquiera de estos genes resulta en la disrupción de la cadena de transferencia de electrones y en una tasa de crecimiento respiratorio disminuida [75-78]. Previamente se ha reportado que el aumento de la

respiración celular es uno de los procesos por los cuales es posible aumentar la esperanza de vida; el hecho de que la pérdida de este proceso afecte aún más de lo esperado a *gln3Δ* indica que la vía regulada por *GLN3* compensa la pérdida de genes reguladores de la respiración y que la extensión de la esperanza de vida de la mutante *gln3Δ* probablemente depende del correcto funcionamiento de la respiración celular (Figura 24).



**Figura 24. Esperanza de vida de las dobles mutantes del grupo de organización de la membrana mitocondrial y *gln3Δ***

Comparación de la esperanza de vida relativa de las mutantes sencillas *fcj1Δ*, *cmc1Δ*, *mba1Δ* y *aim31Δ*, y sus mutantes dobles con *gln3Δ*. La línea sólida indica la esperanza de vida de la mutante sencilla *gln3Δ* relativa a sí misma. La línea punteada indica el fenotipo esperado de la doble mutante. Las barras de error representan el error estándar. La esperanza de vida reportada de las mutantes sencillas es relativa a una levadura tipo silvestre (*hoΔ*). La esperanza de vida de las dobles mutantes es relativa a la mutante *gln3Δ*.



**Figura 25. Snf1 es necesario para la extensión de longevidad en *gln3Δ***

Comparación de la esperanza de vida relativa de las mutantes sencillas y dobles de *snf1Δ*. La línea sólida indica la esperanza de vida de la mutante sencilla *gln3Δ*. La línea punteada indica el fenotipo esperado de la doble mutante. Las barras de error representan el error estándar. La esperanza de vida reportada de *snf1Δ* es relativa a una levadura tipo silvestre (*hoΔ*). La esperanza de vida de la doble mutante es relativa a la mutante *gln3Δ*.

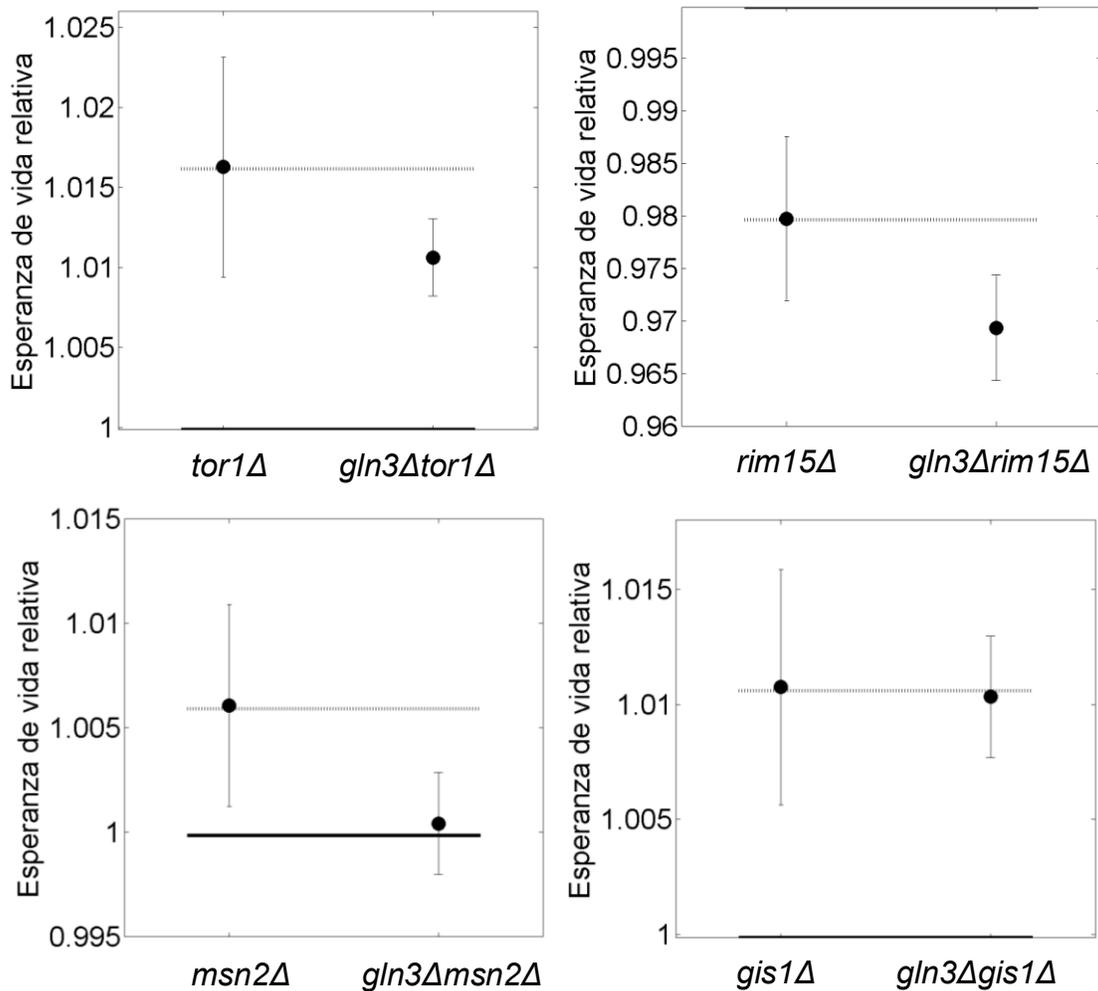
Dentro del grupo funcional de ensamblaje de la pared celular encontramos a Snf1, una cinasa que previamente se ha reportado regula la actividad de Gln3. Esta cinasa fosforila a Gln3 bajo condiciones de baja glucosa y propicia la acumulación de Gln3 en el núcleo [63]. La mutante sencilla de *SNF1* no presenta alteración en la esperanza de vida comparado con la tipo silvestre (Figura 25). En cambio, la doble mutante de *GLN3* y *SNF1* tiene una esperanza de vida peor de la esperada. Esto nos sugiere que los procesos activados por Snf1 son necesarios para la extensión de longevidad en *gln3Δ*.

Existen otros procesos y genes que interactúan con *GLN3* para modular la longevidad (Figura 21, Anexo 4); se necesitan estudios adicionales para determinar el papel de cada uno de ellos en la extensión de la esperanza de vida de *gln3Δ*. Este análisis de dobles mutantes es un primer acercamiento a descubrir los mecanismos mediante los cuales *GLN3* modula la longevidad.

### **8.10 La mutante *gln3Δ* no interactúa directamente con la vía de Tor para incrementar la longevidad.**

Dentro del grupo de genes que se utilizó para realizar el ensayo de dobles mutantes se encontraban varios genes pertenecientes a la vía de Tor/Sch9/Rim15. Descubrimos que no existe una interacción genética significativa entre esta vía y *GLN3*. Las dobles mutantes de *GLN3* y los genes *TOR1*, *RIM15*, *MSN2* y *GIS1* no

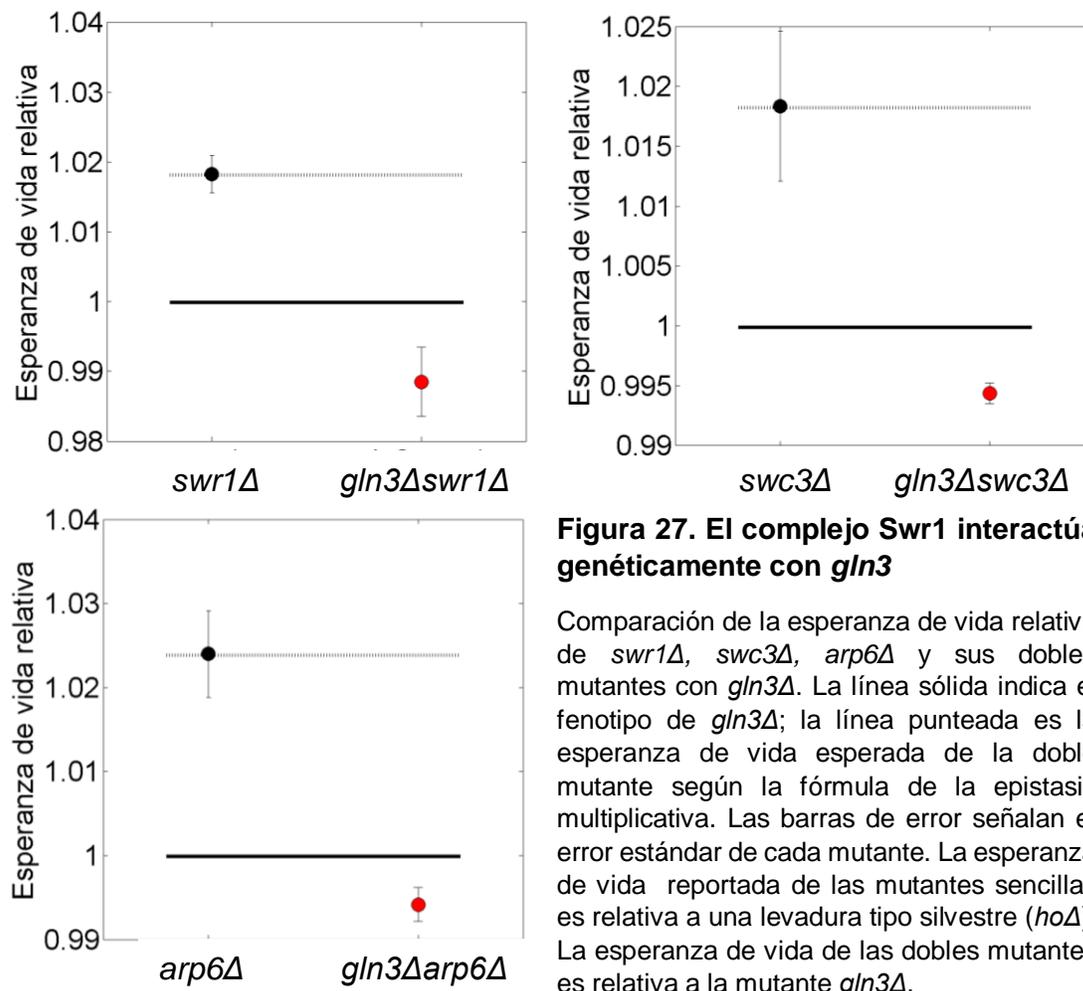
tenían una esperanza de vida distinta a la esperada de acuerdo con la fórmula de la epistasis negativa (Figura 26). Esto nos lleva a pensar que la regulación de la vía Tor no es uno de los mecanismos mediante los cuales la mutante *gln3Δ* extiende la longevidad y que su efecto no depende del sensado de nutrientes realizado por Tor1. También explica por qué *gln3Δ* actúa aparentemente de manera independiente a la condición nutricional de la célula.



**Figura 26. Los genes que componen la vía *tor1* no interactúan significativamente con Gln3**

Comparación de la esperanza de vida relativa de *tor1Δ*, *rim15Δ*, *msn2Δ*, *gis1Δ* y sus dobles mutantes con *gln3Δ*. La línea sólida indica el fenotipo de *gln3Δ*, la línea punteada es la esperanza de vida esperada de la doble mutante según la fórmula de la epistasis multiplicativa. Las barras de error señalan el error estándar de cada mutante. La esperanza de vida reportada de las mutantes sencillas es relativa a una levadura tipo silvestre (*hoΔ*). La esperanza de vida de las dobles mutantes es relativa a la mutante *gln3Δ*.

Sin embargo, *GLN3* interactúa con otros genes reconocidos como mediadores de la extensión de la longevidad por restricción dietética, los cuales son los elementos del complejo Swr1; *ARP6*, *SWR1* Y *SWC3* (Figura 27). El complejo Swr1 se encarga de la remodelación de cromatina y específicamente es necesario para la incorporación de la variante de histona H2A.Z [79]. Recientemente se descubrió que el complejo Swr1 forma parte de la vía de la restricción dietética ya que, al igual que *tor1Δ*, su delección bajo condiciones de no restricción dietética aumenta la longevidad pero bajo condiciones de restricción dietética no se aprecia extensión de la esperanza de vida [66]. Sin embargo, aún se desconoce la manera en la que el complejo Swr1 interactúa con Tor. Debido a que las dobles mutantes del complejo Swr1 y *GLN3* tienen una esperanza de vida cercana a la esperanza de vida de la mutante sencilla *gln3Δ* suponemos que *gln3Δ* extiende la longevidad mediante mecanismos compartidos con la mutante *swr1Δ*. Entonces podemos suponer que *GLN3* interactúa al menos parcialmente con la vía de la restricción dietética y regula algunos procesos similares a los de la restricción dietética para aumentar la esperanza de vida.



**Figura 27. El complejo Swr1 interactúa genéticamente con *gln3***

Comparación de la esperanza de vida relativa de *swr1Δ*, *swc3Δ*, *arp6Δ* y sus dobles mutantes con *gln3Δ*. La línea sólida indica el fenotipo de *gln3Δ*; la línea punteada es la esperanza de vida esperada de la doble mutante según la fórmula de la epistasis multiplicativa. Las barras de error señalan el error estándar de cada mutante. La esperanza de vida reportada de las mutantes sencillas es relativa a una levadura tipo silvestre (*hoΔ*). La esperanza de vida de las dobles mutantes es relativa a la mutante *gln3Δ*.

## 9. Discusión

Muchos trabajos que buscan genes cuya actividad modifica la longevidad han descubierto que la gran mayoría de estos responden a cambios en los nutrientes asimilados por el organismo. Esto ha llevado a plantear que la vía de respuesta a la restricción dietética es la única capaz de extender la longevidad. Sin embargo, en este trabajo reportamos la existencia de dos genes en levadura, *GLN3* y *BAS1*, cuyo efecto sobre el envejecimiento aparenta ser independiente del estado nutricional de la célula.

Dentro de este proyecto probamos los efectos de las mutantes *knock-out* de estos genes en combinación con una restricción dietética basada en disminución de la fuente tanto de nitrógeno como de carbono. Las mutantes *knock-out* de *GLN3* y *BAS1* bajo estas condiciones extienden aún más la longevidad de la levadura, lo que sugiere que efectivamente utilizan mecanismos distintos a los activados por la restricción dietética (Figura 7). No obstante, existen diferentes tipos de restricción dietética dependiendo de la cantidad de nutrientes disminuidos y del tipo de nutriente reducido en la dieta [3]. Aunque todos los diferentes tipos de restricción dietética modulan los componentes básicos de la restricción dietética (por ejemplo, *TOR1*, *RAS2* y *RIM15*), cada tipo de restricción activa partes específicas de la vía de la restricción dietética. Para demostrar que las mutantes *gln3Δ* y *bas1Δ* no actúan como parte de la vía de la restricción dietética sería necesario probar las mutantes en combinación con todos los tipos de restricción dietética en varios grados de intensidad, lo cual es técnicamente difícil.

Otro factor a considerar para determinar si *gln3Δ* y *bas1Δ* actúan mediante la vía de la restricción dietética es medir el grado de interacción entre estos genes y aquellos que conforman la vía de la restricción dietética. Esto lo hicimos para la mutante *gln3Δ* mediante un análisis de dobles mutantes y encontramos que algunos genes que conforman la base de la vía de la restricción dietética como *TOR1*, *RIM15*, *MSN2* y *GIS1* no interactúan con *GLN3* (Figura 26). No obstante *GLN3* si interactúa con otros miembros menos conocidos de la vía de la restricción dietética, como los componentes del complejo Swr1 (Figura 27). Aquí reportamos que la doble mutante

*swr1Δgln3Δ* no muestra un fenotipo diferente al de la mutante sencilla *gln3Δ*, lo cual sugiere que *swr1Δ* y *gln3Δ* utilizan los mismos mecanismos para extender la longevidad. Entonces todo parece apuntar a que *GLN3* actúa de manera parcialmente independiente a la vía de la restricción dietética, es decir, que algunos de los procesos celulares que participan en el incremento de la longevidad por restricción dietética y por la eliminación de *GLN3* están compartidos.

Una prueba de que *Gln3* actúa de manera parcialmente independiente a la vía de restricción dietética es que ciertos genes que interactúan con *GLN3* regulan los mismos procesos que extienden la longevidad bajo condiciones de restricción dietética, como aquellos que regulan la organización de la membrana mitocondrial (Figura 24). La respiración celular es necesaria para incrementar la longevidad bajo condiciones de restricción dietética [80]. Los resultados obtenidos del análisis de dobles mutantes sugieren que la presencia funcional de los genes que regulan la organización de la membrana mitocondrial y muy probablemente la activación de la respiración celular es necesaria para la extensión de la longevidad observada en *gln3Δ*.

Por otra parte, existen genes en la mutante *gln3Δ* que podrían estar actuando de manera contraria a lo que se ha reportado en condiciones de restricción dietética. Un grupo de genes que actúa así son los pertenecientes a la regulación de la autofagia. Estos genes son necesarios para la extensión de la esperanza de vida bajo condiciones de restricción dietética [81]. En cambio, en la mutante *gln3Δ* la delección de los genes activadores de la autofagia no tiene efecto sobre el aumento en la esperanza de vida (Figura 22). Esto sugiere que la extensión de la esperanza de vida en la mutante de *gln3Δ* no depende de la autofagia y que este proceso no se encuentra activo en esta mutante. Existen indicios de que la autofagia es un proceso inhibido por la delección de *GLN3*. Estudios recientes indican que la mutante *gln3Δ* inhibe la expresión de *Atg14* en condiciones sin restricción dietética y en restricción dietética simulada por tratamiento con rapamicina [82]. Esto podría inhibir indirectamente la autofagia ya que la proteína *Atg14* es una subunidad del complejo I fosfoinositol 3-cinasa necesaria para la localización del complejo I al sitio dónde se

iniciará el ensamblaje del autofagosoma [83, 84]. Queda por comprobar si una sobreexpresión de los genes encargados de activar la autofagia disminuye el efecto sobre la longevidad de *gln3Δ*, indicando que la reducción de la autofagia es vital para el aumento en esperanza de vida observado en *gln3Δ*. Por otra parte, existe la posibilidad que otro proceso, activado por la falta de Gln3, compense la pérdida de la autofagia y tenga un papel similar en la eliminación de componentes celulares deteriorados y reciclaje de recursos.

La exploración de los genes que interactúan con *gln3Δ* para extender la longevidad arrojó nuevos procesos celulares que modulan el envejecimiento. Encontramos como nuevo proceso para modular la longevidad la regulación de la gemación celular. Previamente este proceso sólo había sido reportado como modulador de la esperanza de vida replicativa [85]. Observamos que en la mutante *gln3Δ* la represión de estos genes es necesaria para la extensión de la esperanza de vida cronológica esperada (Figura 23). La represión de estos genes podría estar indirectamente regulando otros procesos que ayudan a aumentar la longevidad, específicamente la regulación del crecimiento invasivo y el ciclo celular. Las deleciones de *NAP1*, *RSR1* y *PEF1* alteran el patrón de gemación e impiden la formación de las estructuras necesarias para el crecimiento invasivo [72-74]. El crecimiento invasivo se caracteriza por la elongación de la célula y un patrón de gemación unipolar [86]. Este cambio morfológico se observa en células sometidas a bajos niveles de glucosa y/o nitrógeno y es una estrategia de crecimiento para buscar nuevas fuentes de nutrientes [86, 87]. Que la célula siga encontrando nutrientes suficientes para su desarrollo es un impedimento para la entrada a un estado celular quiescente, un estado celular en el cual la célula deja de dividirse y activa programas de protección celular que ayudan a la célula a aumentar su longevidad [88]. Entonces, proponemos que en la mutante *gln3Δ* el crecimiento invasivo se encuentra inhibido, lo cual impide la búsqueda de nutrientes en el medio, apresurando el agotamiento de los recursos de la célula y a su vez causando la inhibición del ciclo celular y la entrada a estado quiescente. De esta manera, la longevidad del cultivo aumenta al disminuir la proporción de células que continúan

dividiéndose en el medio y aumentar la proporción de células preparadas para sobrevivir un mayor tiempo en el medio.

La mutante *gln3Δ* ofrece entonces una nueva alternativa de regulación de procesos modificadores de la longevidad así como materia de descubrimiento de nuevos procesos que posiblemente aumenten la longevidad al menos parcialmente independiente al estado nutricional de la célula.

También es importante corroborar la conservación de homólogos de *GLN3* en otros organismos y su efecto sobre la longevidad, para averiguar si *GLN3* forma parte de un mecanismo de modulación de la longevidad conservado. Se ha encontrado que *GLN3* es homólogo a los genes *NIT2* de *Neurospora crassa*, *AREA* de *Aspergillus nidulans* y *GATA-1* de humanos [89]. Sin embargo, no se ha reportado si la modificación de estos genes en específico tiene un efecto sobre el fenotipo de envejecimiento. No obstante, *GLN3* tiene similitud con otros factores de transcripción de la familia GATA conservados en hongos, plantas, nemátodos y ratones, entre otros [90]. Estos factores de transcripción se encargan de regular procesos ligados a la supervivencia celular, proliferación y diferenciación de linaje celular. Algunos de estos factores de transcripción han sido vinculados a la regulación de la esperanza de vida. Por ejemplo, en *C. elegans* se ha descubierto un circuito formado por los factores de transcripción *ELT-5*, *ELT-6* y *ELT-3* regula el envejecimiento; la delección de los dos primeros genes incrementa la esperanza de vida del nematodo, mientras que la mutación *elt-3Δ* posee menor esperanza de vida [91]. Esto da pie a seguir investigando los efectos sobre la longevidad de estos factores de transcripción en varios organismos.

Por otra parte, queda pendiente averiguar las posibles vías por las que el otro gen candidato a actuar independientemente de las vías activadas por la restricción dietética, *BAS1*, modula la longevidad. Existen otros trabajos que respaldan el efecto de la delección de *BAS1* sobre la longevidad, sin embargo aún no se conocen los medios por los cuales extiende la longevidad [92, 93]. Bas1 es un factor de transcripción que regula la expresión de los genes necesarios para la síntesis de histidina y purina, aunque es probable que otro proceso regulado por este factor de

transcripción sea el encargado de modular la longevidad, ya que la regulación de síntesis de aminoácidos está relacionada a la activación de la vía de la restricción dietética [94, 95]. Se podría empezar a indagar los mecanismos que extienden la longevidad en *bas1Δ* mediante un análisis de dobles mutantes similar al realizado en este trabajo y así tener procesos celulares candidatos a ser responsables de la extensión en longevidad.

## 10. Conclusiones

En este trabajo descubrimos dos genes candidatos cuya mutación nula podría regular la longevidad de manera al menos parcialmente independiente de las vías activadas por la restricción dietética: *GLN3* y *BAS1*. La eliminación de cualquiera de estos dos genes demostró ser capaz de extender la longevidad bajo condiciones de no restricción y de restricción dietética por fuente de carbono y nitrógeno, una posible indicación de que estos genes utilizan mecanismos para extender la longevidad diferentes a los de la vía de respuesta a la restricción dietética.

Estas mutaciones también demostraron ser capaces de extender la longevidad en combinación con los tratamientos farmacológicos espermidina y metformina. Estos tratamientos son considerados como imitadores de la restricción dietética debido a que activan los mismos mecanismos que la restricción dietética. El que las mutaciones de *GLN3* y *BAS1* extiendan aún más la longevidad bajo los tratamientos farmacológicos es otra evidencia a favor de que *GLN3* y *BAS1* actúan de manera independiente a la restricción dietética.

Al evaluar los tratamientos farmacológicos en combinación con la restricción dietética encontramos que, de acuerdo a lo reportado, el tratamiento con espermidina es un imitador de la restricción dietética, ya que no logra extender aún más la longevidad. En cambio, observamos que la metformina podría actuar mediante algunos mecanismos diferentes a los de la restricción dietética ya que

consigue aumentar aún más la esperanza de vida de levaduras sometidas a restricción dietética.

Por otra parte, decidimos averiguar más sobre los procesos mediante los cuales la mutante *gln3Δ* podría estar extendiendo la longevidad. A partir de un análisis de dobles mutantes encontramos que la extensión de vida en esta mutante se deba probablemente a cambios en la regulación de la autofagia, la respiración celular y el crecimiento invasivo, entre otros procesos. Cabe mencionar que la regulación de estos procesos celulares también se encuentra asociada a la extensión de la longevidad por restricción dietética por lo que es sorprendente que el efecto de *gln3Δ* sea genéticamente independiente al de la restricción dietética, lo cual da pie a la búsqueda de nuevas vías para regular procesos modificadores de la longevidad conocidos. Sugerimos que la mutante *gln3Δ* presenta represión de los procesos de autofagia y crecimiento invasivo, mientras que la respiración celular se encuentra activada en una respuesta similar a la causada por la restricción dietética.

## 11. Perspectivas

Este trabajo abre la puerta a futuros estudios para averiguar los procesos mediante los cuales las mutantes candidatas a actuar independientemente de la restricción dietética *gln3Δ* y *bas1Δ* podrían extender la longevidad. Aquí empezamos a identificar algunos procesos que probablemente son responsables del incremento en la esperanza de vida en la mutante *gln3Δ*, tales como la autofagia, la respiración celular y el control del ciclo celular. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para determinar si estos procesos realmente se encuentran involucrados en la extensión de la longevidad. Proponemos los siguientes experimentos para corroborar el papel de estos procesos en la longevidad de la mutante *gln3Δ*.

Primero, una de nuestras propuestas es que a diferencia de la restricción dietética, la mutante *gln3Δ* no presenta activación de la autofagia en condiciones experimentales de envejecimiento. Por lo tanto sugerimos que se debe de revisar la actividad autofágica en diferentes edades del cultivo estacionario. Esto se puede

realizar mediante la evaluación por microscopia de fluorescencia de una fusión de GFP y la proteína Atg8 [96]. Esta proteína se asocia al sitio de ensamblado del fagosoma, por lo que es un indicador de actividad autofágica. También se podría corroborar la represión de la actividad autofágica en la mutante *gln3Δ* mediante un análisis de la expresión de los transcritos de los genes *ATG8*, *ATG14* y *ATG9*, ya que el aumento de mRNA de cualquiera de estos genes es un indicador de inducción de autofagia.

Otro aspecto a corroborar es el papel de la respiración en el aumento de la esperanza de vida de *gln3Δ*. Proponemos que Gln3 reprime la respiración y que este proceso es necesario para el aumento en la longevidad. Para comprobar esto se podría inicialmente medir la tasa de respiración de *gln3Δ* en comparación a una cepa WT, esto se puede realizar indirectamente mediante la medición de la tasa de consumo de oxígeno; si el cultivo está creciendo utilizando la respiración como principal fuente de energía, tendrá una tasa alta de consumo de oxígeno [97]. Otra prueba necesaria es inhibir la respiración en *gln3Δ* y verificar si la esperanza de vida se ve afectada. Hay dos opciones de cómo inhibir la respiración; la primera es mediante intervenciones genéticas, como la mutación de genes esenciales para la respiración tales como *COX5A* y *CYC1/3* [98]. La segunda manera es mediante la aplicación de compuestos inhibidores de la respiración, como la antimicina A o la oligomicina [99].

Por último, propusimos que *gln3Δ* también podría extender la longevidad mediante la regulación indirecta del ciclo celular al impedir la búsqueda de nuevos nutrientes para continuar dividiéndose. Para comprobar esta hipótesis es necesario comprobar que la mutante *gln3Δ* no es capaz de llevar a cabo crecimiento invasivo y que esta mutante también altera la progresión del ciclo celular. Podemos revisar que *gln3Δ* no presente crecimiento invasivo mediante un análisis de la morfología de colonias de levadura sometidas a bajos niveles de nutrientes [87]. Estas condiciones incitan el crecimiento invasivo, el cual puede ser observado mediante examinación microscópica. Parte de nuestra hipótesis se mantendría si *gln3Δ* no presenta los cambios morfológicos típicos del crecimiento invasivo. Por otra parte, para averiguar

si *gln3Δ* modifica el progreso del ciclo celular, podemos monitorear el cambio en la proporción de células en un estado del ciclo celular mediante citometría de flujo [100]. Esperamos que *gln3Δ* arreste el ciclo celular en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> más rápido que una cepa silvestre, lo cual confirmaría que uno de los mecanismos por los cuales *gln3* regula longevidad es el control del ciclo celular.

El gen *GLN3* aparece como un candidato para evaluar nuevas vías reguladoras de la esperanza de vida y otros procesos que extiendan el envejecimiento además de los controlados por la restricción dietética. El descubrimiento del efecto independiente a la restricción dietética de este gen nos urge a seguir investigando las vías por las cuáles *gln3Δ* extiende la longevidad. Proponemos realizar en el futuro un análisis más extenso de las interacciones genéticas de *GLN3* para el fenotipo de envejecimiento; esta vez bajo distintas dietas. Esto nos proporcionará información adicional acerca de los procesos regulados por *GLN3* que afectan el envejecimiento, de manera que podremos averiguar si además de los procesos sugeridos en este trabajo, existen otros importantes para su efecto sobre la longevidad.

## 12. Referencias

1. Campos, S.E., et al., *Genome-Wide Mechanisms of Lifespan Extension by Dietary Restriction in Yeast*. bioRxiv, 2017: p. 126797.
2. Baryshnikova, A., et al., *Genetic interaction networks: toward an understanding of heritability*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2013. **14**: p. 111-33.
3. Mair, W. and A. Dillin, *Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 727-54.
4. Piper, M.D., W. Mair, and L. Partridge, *Counting the calories: the role of specific nutrients in extension of life span by food restriction*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2005. **60**(5): p. 549-55.
5. Powers, R.W., 3rd, et al., *Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling*. Genes Dev, 2006. **20**(2): p. 174-84.
6. Jiang, J.C., et al., *An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast*. FASEB J, 2000. **14**(14): p. 2135-7.
7. Zimmerman, J.A., et al., *Nutritional control of aging*. Exp Gerontol, 2003. **38**(1-2): p. 47-52.
8. Masoro, E.J., *Overview of caloric restriction and ageing*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(9): p. 913-22.
9. Colman, R.J., et al., *Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys*. Science, 2009. **325**(5937): p. 201-4.
10. Yu, B.P., E.J. Masoro, and C.A. McMahan, *Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics*. J Gerontol, 1985. **40**(6): p. 657-70.
11. Weindruch, R. and R.L. Walford, *Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence*. Science, 1982. **215**(4538): p. 1415-1418.
12. Bertrand, H.A., et al., *Changes in adipose mass and cellularity through the adult life of rats fed ad libitum or a life-prolonging restricted diet*. J Gerontol, 1980. **35**(6): p. 827-35.
13. Lane, M.A., et al., *Calorie restriction lowers body temperature in rhesus monkeys, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4159-64.
14. Ramsey, J., et al., *Thermooenesis of adult male rhesus monkeys: results through 66 months of dietary restriction*. Faseb Journal, 1996. **10**(3).
15. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
16. Yu, B.P., *Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction*. Free Radic Biol Med, 1996. **21**(5): p. 651-68.
17. Zainal, T.A., et al., *Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle*. FASEB J, 2000. **14**(12): p. 1825-36.
18. Richardson, A., *Changes in the expression of genes involved in protecting cells against stress and free radicals*. Aging (Milano), 1991. **3**(4): p. 403-5.
19. Luhtala, T.A., et al., *Dietary restriction attenuates age-related increases in rat skeletal muscle antioxidant enzyme activities*. J Gerontol, 1994. **49**(5): p. B231-8.
20. Miwa, S., et al., *Lack of correlation between mitochondrial reactive oxygen species production and life span in Drosophila*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2004. **1019**(1): p. 388-391.
21. Vina, J., et al., *The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(8): p. 779-87.

22. Masoro, E.J., *Hormesis and the antiaging action of dietary restriction*. Exp Gerontol, 1998. **33**(1-2): p. 61-6.
23. Holliday, R., *Food, reproduction and longevity: is the extended lifespan of calorie-restricted animals an evolutionary adaptation?* Bioessays, 1989. **10**(4): p. 125-7.
24. Hansen, M., et al., *Lifespan extension by conditions that inhibit translation in Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2007. **6**(1): p. 95-110.
25. Houthoofd, K., et al., *Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol, 2002. **37**(12): p. 1371-8.
26. McCormick, M.A., S.Y. Tsai, and B.K. Kennedy, *TOR and ageing: a complex pathway for a complex process*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011. **366**(1561): p. 17-27.
27. Zid, B.M., et al., *4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in Drosophila*. Cell, 2009. **139**(1): p. 149-60.
28. Pan, Y. and G.S. Shadel, *Extension of chronological life span by reduced TOR signaling requires down-regulation of Sch9p and involves increased mitochondrial OXPHOS complex density*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(1): p. 131-45.
29. Hansen, M., et al., *A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in C. elegans*. PLoS Genet, 2008. **4**(2): p. e24.
30. Kaeberlein, M., C.R. Burtner, and B.K. Kennedy, *Recent developments in yeast aging*. PLoS Genet, 2007. **3**(5): p. e84.
31. Wei, M., et al., *Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9*. PLoS Genet, 2008. **4**(1): p. e13.
32. Fabrizio, P., et al., *SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast*. Genetics, 2003. **163**(1): p. 35-46.
33. Cameroni, E., et al., *The novel yeast PAS kinase Rim 15 orchestrates G0-associated antioxidant defense mechanisms*. Cell Cycle, 2004. **3**(4): p. 462-8.
34. Pedruzzi, I., et al., *Saccharomyces cerevisiae Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1*. EMBO J, 2000. **19**(11): p. 2569-79.
35. Fabrizio, P., et al., *Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 2004. **557**(1-3): p. 136-42.
36. Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall, *TOR signaling in growth and metabolism*. Cell, 2006. **124**(3): p. 471-84.
37. Bergsma, J.C., J.M. Thevelein, and S. Wera, *Expression of mammalian PKB partially complements deletion of the yeast protein kinase Sch9*. Molecular Mechanisms of Signal Transduction, 2000. **316**: p. 117.
38. Case, M.E., et al., *The aging biological clock in Neurospora crassa*. Ecol Evol, 2014. **4**(17): p. 3494-507.
39. Slack, C., et al., *The Ras-Erk-ETS-signaling pathway is a drug target for longevity*. Cell, 2015. **162**(1): p. 72-83.
40. Nanji, M., N.A. Hopper, and D. Gems, *LET-60 RAS modulates effects of insulin/IGF-1 signaling on development and aging in Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2005. **4**(5): p. 235-45.
41. Slack, C., *Ras signalling in aging and metabolic regulation*. Nutrition and Healthy Aging, (Preprint): p. 1-11.
42. Lowy, D.R. and B.M. Willumsen, *The ras gene family*. Cancer Surv, 1986. **5**(2): p. 275-89.

43. Tullet, J.M., et al., *Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in C. elegans*. Cell, 2008. **132**(6): p. 1025-38.
44. Gershon, H. and D. Gershon, *The budding yeast, Saccharomyces cerevisiae, as a model for aging research: a critical review*. Mech Ageing Dev, 2000. **120**(1-3): p. 1-22.
45. Bessenyei, B., et al., *Single nucleotide polymorphisms: aging and diseases*. Biogerontology, 2004. **5**(5): p. 291-303.
46. Rattan, S.I. and R. Singh, *Progress & prospects: gene therapy in aging*. Gene Ther, 2009. **16**(1): p. 3-9.
47. Kimmelman, J., *Recent developments in gene transfer: risk and ethics*. BMJ, 2005. **330**(7482): p. 79-82.
48. Argyropoulou, A., et al., *Natural compounds with anti-ageing activity*. Nat Prod Rep, 2013. **30**(11): p. 1412-37.
49. Harrison, D.E., et al., *Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice*. Nature, 2009. **460**(7253): p. 392-5.
50. Robida-Stubbs, S., et al., *TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO*. Cell Metab, 2012. **15**(5): p. 713-24.
51. Bjedov, I., et al., *Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly Drosophila melanogaster*. Cell Metab, 2010. **11**(1): p. 35-46.
52. Anisimov, V.N., et al., *Rapamycin extends maximal lifespan in cancer-prone mice*. Am J Pathol, 2010. **176**(5): p. 2092-7.
53. Pierce, A., et al., *Over-expression of heat shock factor 1 phenocopies the effect of chronic inhibition of TOR by rapamycin and is sufficient to ameliorate Alzheimer's-like deficits in mice modeling the disease*. J Neurochem, 2013. **124**(6): p. 880-93.
54. Nishimura, K., et al., *Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink*. J Biochem, 2006. **139**(1): p. 81-90.
55. Eisenberg, T., et al., *Induction of autophagy by spermidine promotes longevity*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(11): p. 1305-14.
56. Morselli, E., et al., *Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(12): p. 961-70.
57. Hundal, R.S., et al., *Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes*. Diabetes, 2000. **49**(12): p. 2063-2069.
58. Onken, B. and M. Driscoll, *Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend C. elegans Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8758.
59. Anisimov, V.N., et al., *Metformin slows down aging and extends life span of female SHR mice*. Cell Cycle, 2008. **7**(17): p. 2769-73.
60. El-Mir, M.Y., et al., *Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I*. J Biol Chem, 2000. **275**(1): p. 223-8.
61. Magasanik, B. and C.A. Kaiser, *Nitrogen regulation in Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 2002. **290**(1-2): p. 1-18.
62. Rai, R., et al., *Identification of sequences responsible for transcriptional activation of the allantoin permease gene in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(2): p. 602-8.
63. Bertram, P.G., et al., *Convergence of TOR-nitrogen and Snf1-glucose signaling pathways onto Gln3*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(4): p. 1246-52.
64. Beck, T. and M.N. Hall, *The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 689-92.

65. Gillespie, Z.E., J. Pickering, and C.H. Eskiw, *Better Living through Chemistry: Caloric Restriction (CR) and CR Mimetics Alter Genome Function to Promote Increased Health and Lifespan*. *Front Genet*, 2016. **7**: p. 142.
66. Garay, E., et al., *High-Resolution Profiling of Stationary-Phase Survival Reveals Yeast Longevity Factors and Their Genetic Interactions*. *Plos Genetics*, 2014. **10**(2).
67. Murakami, C. and M. Kaeberlein, *Quantifying yeast chronological life span by outgrowth of aged cells*. *J Vis Exp*, 2009(27).
68. Giaever, G. and C. Nislow, *The yeast deletion collection: a decade of functional genomics*. *Genetics*, 2014. **197**(2): p. 451-65.
69. Murakami, C.J., et al., *A method for high-throughput quantitative analysis of yeast chronological life span*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2008. **63**(2): p. 113-21.
70. Salazar-Martínez, S.L., *Identificación de extractos de plantas con efecto en la longevidad de Saccharomyces cerevisiae*, in *Biotecnología de plantas*. 2016, CINVESTAV-Unidad Irapuato: Mexico.
71. Crespo, J.L., et al., *The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(10): p. 6784-9.
72. Kellogg, D.R. and A.W. Murray, *NAP1 acts with Clb1 to perform mitotic functions and to suppress polar bud growth in budding yeast*. *J Cell Biol*, 1995. **130**(3): p. 675-85.
73. Chant, J. and I. Herskowitz, *Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway*. *Cell*, 1991. **65**(7): p. 1203-1212.
74. Vernarecci, S., et al., *The yeast penta-EF protein Pef1p is involved in cation-dependent budding and cell polarization*. *Molecular microbiology*, 2007. **65**(4): p. 1122-1138.
75. Harner, M., et al., *The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture*. *EMBO J*, 2011. **30**(21): p. 4356-70.
76. Vukotic, M., et al., *Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex*. *Cell Metab*, 2012. **15**(3): p. 336-47.
77. Schlecht, U., et al., *A functional screen for copper homeostasis genes identifies a pharmacologically tractable cellular system*. *BMC Genomics*, 2014. **15**: p. 263.
78. Zerbes, R.M., et al., *Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture: cristae morphology and outer membrane interactions differentially depend on mitofilin domains*. *J Mol Biol*, 2012. **422**(2): p. 183-91.
79. Krogan, N.J., et al., *A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1*. *Mol Cell*, 2003. **12**(6): p. 1565-76.
80. Koubova, J. and L. Guarente, *How does calorie restriction work?* *Genes & development*, 2003. **17**(3): p. 313-321.
81. Lionaki, E., M. Markaki, and N. Tavernarakis, *Autophagy and ageing: insights from invertebrate model organisms*. *Ageing Res Rev*, 2013. **12**(1): p. 413-28.
82. Chan, T.F., et al., *Regulation of APG14 expression by the GATA-type transcription factor Gln3p*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(9): p. 6463-7.
83. Obara, K., T. Sekito, and Y. Ohsumi, *Assortment of phosphatidylinositol 3-kinase complexes--Atg14p directs association of complex I to the pre-autophagosomal structure in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(4): p. 1527-39.
84. Obara, K. and Y. Ohsumi, *Atg14: a key player in orchestrating autophagy*. *Int J Cell Biol*, 2011. **2011**: p. 713435.
85. Higuchi-Sanabria, R., et al., *Role of asymmetric cell division in lifespan control in Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2014. **14**(8): p. 1133-46.

86. Cullen, P.J. and G.F. Sprague, Jr., *The regulation of filamentous growth in yeast*. Genetics, 2012. **190**(1): p. 23-49.
87. Cullen, P.J. and G.F. Sprague, Jr., *Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13619-24.
88. Busti, S., et al., *Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in Saccharomyces cerevisiae*. Sensors (Basel), 2010. **10**(6): p. 6195-240.
89. Minehart, P.L. and B. Magasanik, *Sequence and expression of GLN3, a positive nitrogen regulatory gene of Saccharomyces cerevisiae encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(12): p. 6216-28.
90. Nemer, G. and M. Nemer, *Chapter 9.2 - GATA4 in Heart Development and Disease*, in *Heart Development and Regeneration*. 2010, Academic Press: Boston. p. 599-616.
91. Budovskaya, Y.V., et al., *An elt-3/elt-5/elt-6 GATA transcription circuit guides aging in C. elegans*. Cell, 2008. **134**(2): p. 291-303.
92. Maticic, M., et al., *A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors*. PLoS Genet, 2010. **6**(4): p. e1000921.
93. Kaeberlein, M., et al., *Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients*. Science, 2005. **310**(5751): p. 1193-6.
94. Daignan-Fornier, B. and G.R. Fink, *Coregulation of purine and histidine biosynthesis by the transcriptional activators BAS1 and BAS2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 6746-50.
95. Mirzaei, H., J.A. Suarez, and V.D. Longo, *Protein and amino acid restriction, aging and disease: from yeast to humans*. Trends Endocrinol Metab, 2014. **25**(11): p. 558-66.
96. Delorme-Axford, E., et al., *The yeast Saccharomyces cerevisiae: an overview of methods to study autophagy progression*. Methods, 2015. **75**: p. 3-12.
97. Longo, V.D., et al., *Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase*. Arch Biochem Biophys, 1999. **365**(1): p. 131-42.
98. Ocampo, A., et al., *Mitochondrial respiratory thresholds regulate yeast chronological life span and its extension by caloric restriction*. Cell Metab, 2012. **16**(1): p. 55-67.
99. Kalbacova, M., et al., *Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry*. Cytometry A, 2003. **52**(2): p. 110-6.
100. Herzenberg, L.A., et al., *The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford*. Clin Chem, 2002. **48**(10): p. 1819-27.

## 13. Anexo

### Anexo 1. Esperanza de vida de mutantes *knock-out* bajo condiciones de restricción dietética y no restricción.

Datos de la esperanza de vida promedio de las mutantes sencillas bajo condiciones de DR y no DR, obtenidas de Campos *et al.*(2017) [1]. La restricción dietética se realizó mediante reemplazo de la fuente de nitrógeno. En la condición de restricción dietética se reemplazó glutamina por ácido  $\gamma$ -aminobutírico.

	Mutante	ORF	Esperanza de vida GLN	Esperanza de vida GABA
1	<i>ald6Δ</i>	YPL061W	1.06279763	1.0771608
2	<i>ypl062wΔ</i>	YPL062W	1.07300456	1.07709865
3	<i>mec3Δ</i>	YLR288C	1.01276613	1.04886407
4	<i>irc14Δ</i>	YOR135C	1.03862437	1.04884518
5	<i>lst7Δ</i>	YGR057C	-	1.04801503
6	<i>shu1Δ</i>	YHL006C	1.03599053	1.04385535
7	<i>yak1Δ</i>	YJL141C	1.0519533	1.04267647
8	<i>lrp1Δ</i>	YHR081W	1.05248865	1.04167222
9	<i>aqr1Δ</i>	YNL065W	1.04711419	1.04162299
10	<i>rpl40bΔ</i>	YKR094C	1.0108516	1.03965041
11	<i>rps24aΔ</i>	YER074W	1.03785109	1.03795663
12	<i>yil152wΔ</i>	YIL152W	1.05182807	1.03645222
13	<i>cwp2Δ</i>	YKL096W-A	1.0209535	1.03585246
14	<i>fpk1Δ</i>	YNR047W	1.03583253	1.0352901
15	<i>slm6Δ</i>	YBR266C	1.01101387	1.03377334
16	<i>rpl40aΔ</i>	YIL148W	1.01793713	1.03342514
17	<i>bas1Δ</i>	YKR099W	1.00942698	1.03335617
18	<i>rps19bΔ</i>	YNL302C	1.03803633	1.03295499
19	<i>shr5Δ</i>	YOL110W	1.02644442	1.03115135
20	<i>wsc3Δ</i>	YOL105C	1.00518471	1.03112402
21	<i>stp1Δ</i>	YDR463W	0.99318744	1.03093501
22	<i>ypr130cΔ</i>	YPR130C	1.01879664	1.03073342
23	<i>set4Δ</i>	YJL105W	1.02134512	1.0299688
24	<i>ylr224wΔ</i>	YLR224W	0.99693468	1.02947466
25	<i>ngg1Δ</i>	YDR176W	1.04225107	1.02922834
26	<i>gep4Δ</i>	YHR100C	1.00472285	1.02811319
27	<i>pmt2Δ</i>	YAL023C	1.01535717	1.0281
28	<i>arv1Δ</i>	YLR242C	1.01025181	1.02745915
29	<i>sac6Δ</i>	YDR129C	1.01331408	1.0273532
30	<i>kre1Δ</i>	YNL322C	1.00265641	1.02728304
31	<i>mig1Δ</i>	YGL035C	1.006938	1.02655659

Anexo 1 (Continuación)

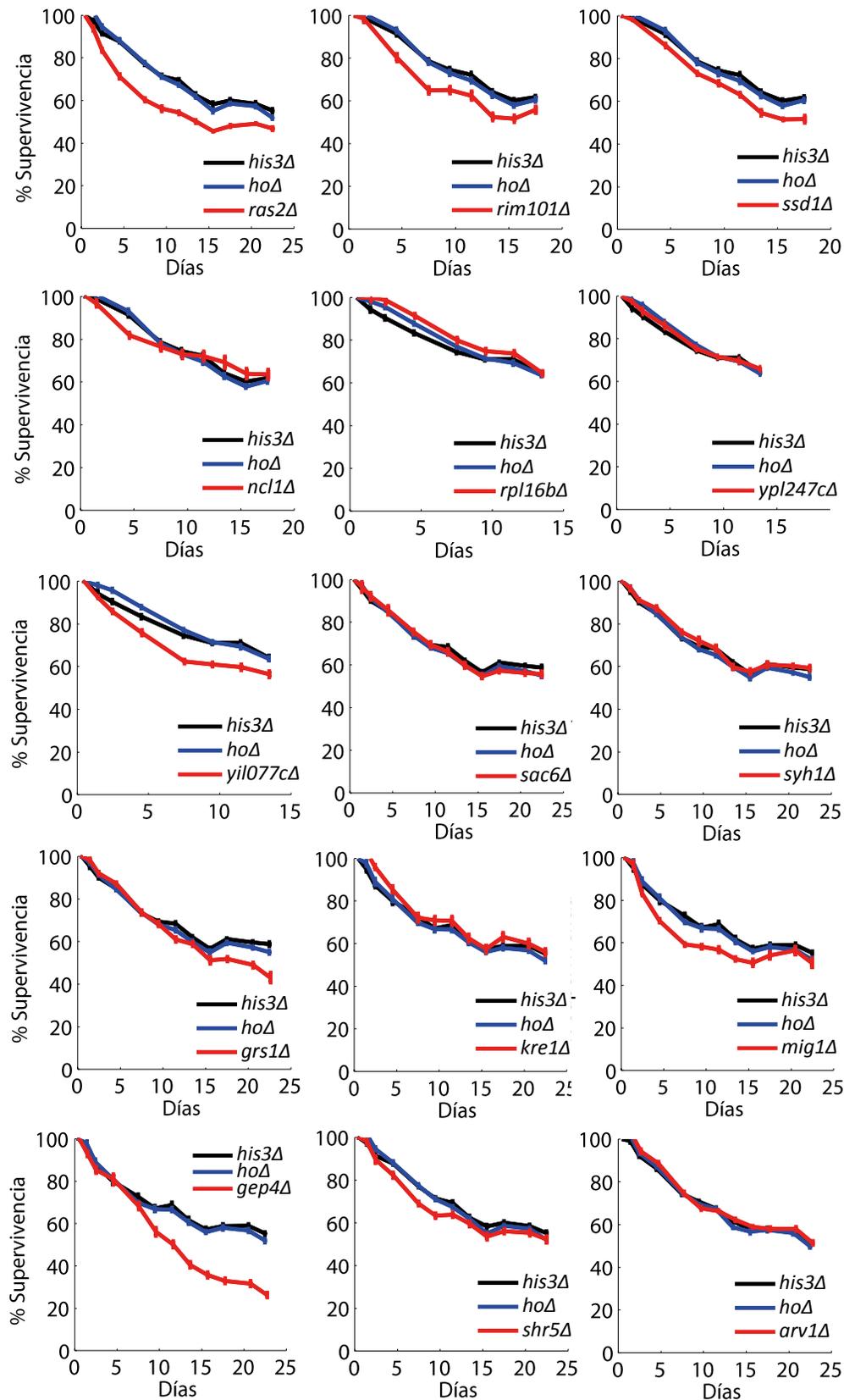
	<b>Mutante</b>	<b>ORF</b>	<b>Esperanza de vida GLN</b>	<b>Esperanza de vida GABA</b>
32	<i>yil077cΔ</i>	YIL077C	1.01410755	1.02615452
33	<i>loc1Δ</i>	YFR001W	1.02433634	1.02602929
34	<i>new1Δ</i>	YPL226W	1.02045534	1.0251213
35	<i>ypl247cΔ</i>	YPL247C	1.02860579	1.02495386
36	<i>tef4Δ</i>	YKL081W	1.01154793	1.02452117
37	<i>hda2Δ</i>	YDR295C	1.01436318	1.02429896
38	<i>aah1Δ</i>	YNL141W	1.01245388	1.02386741
39	<i>grs1Δ</i>	YBR121C	0.99899691	1.02378331
40	<i>syh1Δ</i>	YPL105C	1.02360564	1.02376114
41	<i>rim101Δ</i>	YHL027W	0.9887116	1.02340474
42	<i>arp6Δ</i>	YLR085C	1.02397754	1.02319466
43	<i>ncl1Δ</i>	YBL024W	1.01995736	1.0230857
44	<i>rpl16bΔ</i>	YNL069C	1.02555125	1.02294985
45	<i>ssf1Δ</i>	YHR066W	0.99316487	1.02218609
46	<i>ssn8Δ</i>	YNL025C	1.04458243	1.02178792
47	<i>ssd1Δ</i>	YDR293C	1.01918077	1.02133455
48	<i>fyv1Δ</i>	YDR024W	1.0275198	1.02082982
49	<i>bgl2Δ</i>	YGR282C	1.01219662	1.02082502
50	<i>rrp8Δ</i>	YDR083W	1.0421061	1.02070139
51	<i>rps6bΔ</i>	YBR181C	1.03091328	1.02068439
52	<i>lst4Δ</i>	YKL176C	1.02713303	1.02050259
53	<i>dal81Δ</i>	YIR023W	1.00805298	1.02050213
54	<i>gdh2Δ</i>	YDL215C	0.99927133	1.02017104
55	<i>pmt3Δ</i>	YOR321W	1.01729973	1.01960374
56	<i>ics2Δ</i>	YBR157C	1.015188	1.01943436
57	<i>pho2Δ</i>	YDL106C	1.00405393	1.01918239
58	<i>bul2Δ</i>	YML111W	1.02369126	1.01889187
59	<i>chd1Δ</i>	YER164W	-	1.01864279
60	<i>ptc6Δ</i>	YCR079W	1.02854669	1.01830871
61	<i>rps29aΔ</i>	YLR388W	1.02223063	1.01791665
62	<i>tom5Δ</i>	YPR133W-A	1.00458786	1.01745085
63	<i>das1Δ</i>	YJL149W	1.02231022	1.01709123
64	<i>smf3Δ</i>	YLR034C	1.02238197	1.01701596
65	<i>las21Δ</i>	YJL062W	1.01112874	1.0168849
66	<i>yke2Δ</i>	YLR200W	1.01884751	1.01649442
67	<i>rps18bΔ</i>	YML026C	1.03006294	1.01628595
68	<i>ubp8Δ</i>	YMR223W	1.02019826	1.01626983
69	<i>sgf11Δ</i>	YPL047W	1.03052972	1.01608591
70	<i>drs2Δ</i>	YAL026C	1.03006384	1.01603445
71	<i>ylr374cΔ</i>	YLR374C	1.03412138	1.01598651

Anexo 1 (Continuación)

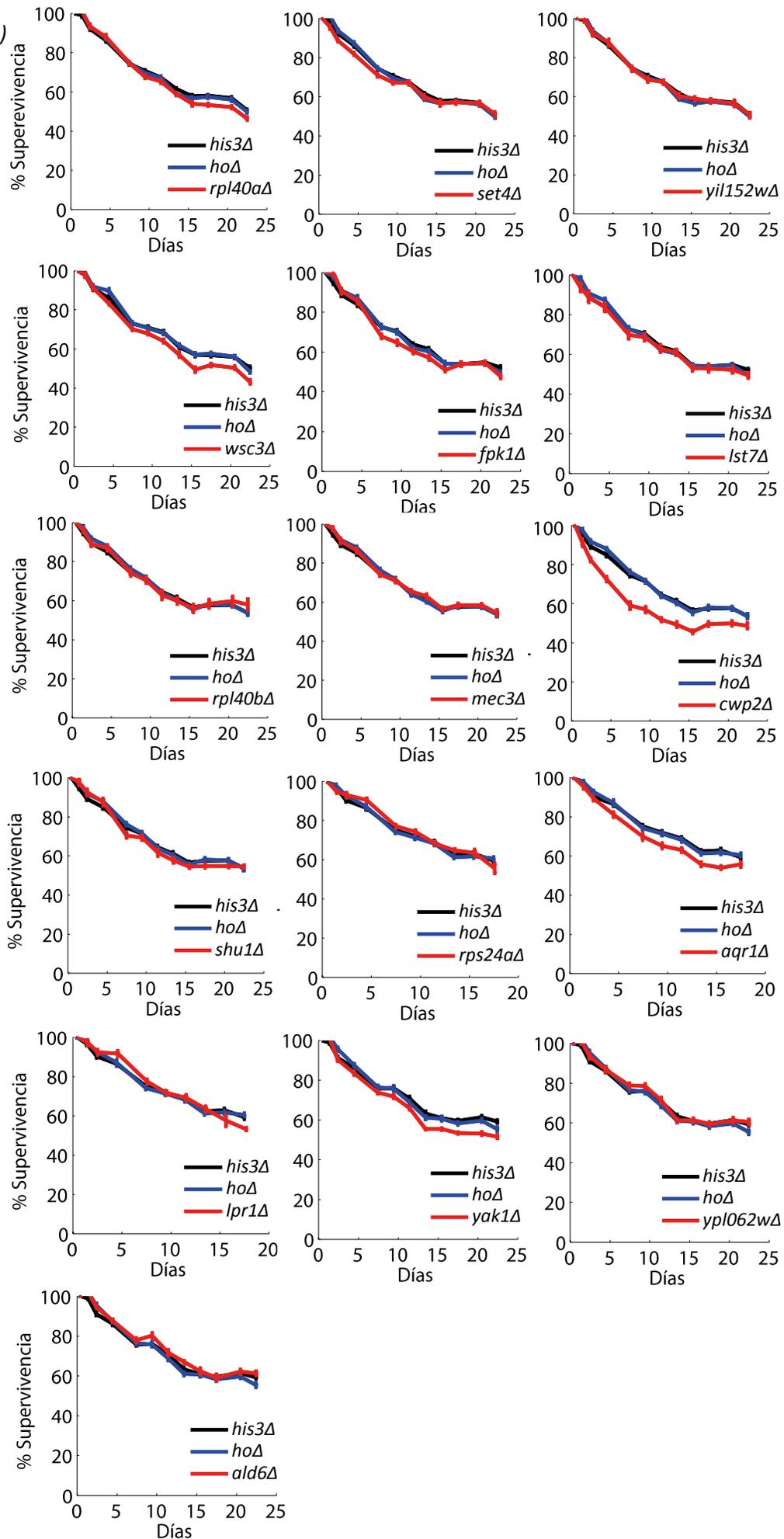
	<b>Mutante</b>	<b>ORF</b>	<b>Esperanza de vida GLN</b>	<b>Esperanza de vida GABA</b>
72	<i>ung1Δ</i>	YML021C	1.023012	1.01577626
73	<i>rpl41bΔ</i>	YDL133C-A	1.00290859	1.01568034
74	<i>mtc5Δ</i>	YDR128W	1.01295233	1.01520071
75	<i>med1Δ</i>	YPR070W	1.02487765	1.01474253
76	<i>pbp4Δ</i>	YDL053C	1.01824495	1.01408787
77	<i>hst1Δ</i>	YOL068C	1.02248619	1.01311831
78	<i>swm2Δ</i>	YNR004W	1.01629812	1.01311164
79	<i>kkq8Δ</i>	YKL168C	1.02259279	1.01198829
80	<i>ylr287-aΔ</i>	YLR287-A	1.02123796	1.01194993
81	<i>rps21aΔ</i>	YKR057W	1.02377284	1.01177169
82	<i>rps4bΔ</i>	YHR203C	1.0171818	1.01160465
83	<i>ede1Δ</i>	YBL047C	1.01644723	1.01056432
84	<i>lre1Δ</i>	YCL051W	1.01403995	1.00999856
85	<i>vid22Δ</i>	YLR373C	1.02130189	1.0096474
86	<i>yor055wΔ</i>	YOR055W	1.01465927	1.00949417
87	<i>fre1Δ</i>	YLR214W	1.01807258	1.00934967
88	<i>csm2Δ</i>	YIL132C	1.02193736	1.00892644
89	<i>slg1Δ</i>	YOR008C	1.02224616	1.00887449
90	<i>swr1Δ</i>	YDR334W	1.01824124	1.0061
91	<i>gon7Δ</i>	YJL184W	1.02072832	1.00609377
92	<i>bmh1Δ</i>	YER177W	1.02495703	1.0057566
93	<i>rpl16aΔ</i>	YIL133C	1.02734805	1.00555675
94	<i>lsm7Δ</i>	YNL147W	1.01989852	1.00536659
95	<i>bud27Δ</i>	YFL023W	1.02088742	1.00503442
96	<i>sur2Δ</i>	YDR297W	1.01944445	1.00376023
97	<i>ybr226cΔ</i>	YBR226C	1.01411944	1.00366546
98	<i>ypt11Δ</i>	YNL304W	1.01735277	1.00072424
99	<i>tuf1Δ</i>	YOR187W	1.08995013	1.00019308
100	<i>npr1Δ</i>	YNL183C	1.01976968	0.99999857
101	<i>fis1Δ</i>	YIL065C	1.03147674	0.99834291
102	<i>slx9Δ</i>	YGR081C	1.02222008	0.98740912
103	<i>ada2Δ</i>	YDR448W	1.03962614	-
104	<i>sdh1Δ</i>	YKL148C	1.01293013	-

## Anexo 2. Curvas de decaimiento en restricción dietética

40 mutantes fueron evaluadas en condiciones de restricción dietética (0.5% Glucosa), aquí se muestran aquellas que no extendían más la longevidad en estas condiciones. El ensayo de CLS por cinéticas de crecimiento tuvo una duración de 15-20 días. Las mutantes *hoΔ* (azul) e *his3Δ* (negro) se utilizaron como tipo silvestre. En rojo cada una de las mutantes. Para cada una de las curvas se realizaron 8 réplicas (n=8). Las barras representan el error estándar.



Anexo 2 (Continuación)



Mutante	Tratamiento farmacológico	Concentración	Tasa de decaimiento	p-value <sup>a</sup>
<i>bas1Δ</i>	NT	0 mM	0.041613583	-
	Espermidina	0.5mM	0.03956889	0.32343473
		1mM	0.03831172	0.20389955
		5mM	0.03387868	0.04151539*
		10mM	NaN	NaN
	NT	0 mM	0.04196067	-
	Metformina	5mM	0.0423405	0.56831312
		10mM	0.0392471	0.16499572
		15mM	0.04050903	0.29844694
		20mM	0.03310409	0.00981448**
<i>slm6Δ</i>	NT	0 mM	0.04983284	-
	Espermidina	0.5mM	0.04910397	0.41303067
		1mM	0.04889469	0.42150856
		5mM	0.05789376	0.96928227
		10mM	NaN	NaN
	NT	0 mM	0.085180386	-
	Metformina	5mM	0.07271933	0.01285618*
		10mM	0.0654146	0.00397965**
		15mM	0.06289367	0.00291162**
		20mM	0.05592568	0.00118344**
<i>pmt2Δ</i>	NT	0 mM	0.057823806	-
	Espermidina	0.5mM	0.05689769	0.37750073
		1mM	0.0537023	0.06633875
		5mM	0.04980165	0.02710054*
		10mM	0.0341286	0.00552961**
	NT	0 mM	0.069405773	-
	Metformina	5mM	0.07300406	0.69196635
		10mM	0.0682281	0.43452135
		15mM	0.06085161	0.12327146
		20mM	0.05877239	0.07132096
<i>gln3Δ</i>	NT	0 mM	0.046541112	-
	Espermidina	0.5mM	0.05135964	0.66308863
		1mM	0.05374008	0.83432872
		5mM	0.0459573	0.25759758
		10mM	0.04202372	0.20048193
	NT	0 mM	0.063437263	-
	Metformina	5mM	0.05853152	0.14337521
		10mM	0.05321889	0.0373933*
		15mM	0.04982246	0.02030481*
		20mM	0.05271254	0.03824895*

### Anexo 3. Tabla de las tasas de decaimiento de las mutantes candidatas en combinación con los fármacos

Las tasas de decaimiento (Td) promedio de las mutantes candidatas bajo diferentes tratamientos farmacológicos. Cada dato es el promedio de cuatro réplicas técnicas (n=4). a) p-value de la prueba t de student en la hipótesis alternativa es que la mutante con el tratamiento mencionado tiene una Td promedio menor que la Td de la mutante sin tratamiento. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, NT: No tratamiento, NaN: No disponible

#### Anexo 4. Datos de la esperanza de vida y epistasis del análisis de dobles mutantes.

a) Coeficiente de supervivencia promedio de la mutante sencilla  $x\Delta$ , datos obtenidos de Garay *et al* (2014).  
 b) Esperanza de vida promedio (L) de la mutante sencilla  $x\Delta$ ,  $L = s + 1$ . c) Error estándar del coeficiente de supervivencia de la mutante sencilla. d) Coeficiente de supervivencia promedio de la mutante doble  $x\Delta gln3\Delta$ .  
 e) Esperanza de vida promedio de la mutante doble  $x\Delta gln3\Delta$ . f) Error estándar del coeficiente de supervivencia de la mutante doble g) Epistasis entre el gen *GLN3* y los genes mencionados. En rojo se muestran los genes con interacción negativa. En verde aquellos genes con interacción positiva. h) Error estándar de la epistasis. NaN: No disponible

Nombre	ORF	s sencilla <sup>a</sup>	Esperanza de vida sencilla <sup>b</sup>	s sencilla error <sup>c</sup>	s doble <sup>d</sup>	Esperanza de vida doble <sup>e</sup>	s doble error <sup>f</sup>	Epistasis <sup>g</sup>	Epistasis error <sup>h</sup>
ALD6	YPL061W	1.0628	0.0628	0.0085	-0.0164	0.9836	0.0042	<b>-0.0791</b>	0.0095
YPL062W	YPL062W	1.0730	0.0730	0.0050	-0.0033	0.9967	0.0020	<b>-0.0762</b>	0.0054
IRC14	YOR135C	1.0386	0.0386	0.0032	-0.0345	0.9655	0.0103	<b>-0.0731</b>	0.0108
SAC1	YKL212W	1.0172	0.0172	0.0065	-0.0504	0.9496	0.0122	<b>-0.0674</b>	0.0139
YAK1	YJL141C	1.0520	0.0520	0.0069	-0.0042	0.9958	0.0027	<b>-0.0561</b>	0.0074
AQR1	YNL065W	1.0471	0.0471	0.0039	-0.0055	0.9945	0.0013	<b>-0.0525</b>	0.0041
HAP3	YBL021C	0.9844	-0.0156	0.0055	-0.0636	0.9364	0.0127	<b>-0.0480</b>	0.0139
FPK1	YNR047W	1.0358	0.0358	0.0041	-0.0116	0.9884	0.0024	<b>-0.0474</b>	0.0048
VID22	YLR373C	1.0213	0.0213	0.0043	-0.0259	0.9741	0.0061	<b>-0.0472</b>	0.0075
YIL152W	YIL152W	1.0518	0.0518	0.0072	0.0060	1.0060	0.0041	<b>-0.0458</b>	0.0083
NIP100	YPL174C	0.9865	-0.0135	0.0054	-0.0589	0.9411	0.0132	<b>-0.0454</b>	0.0143
FIS1	YIL065C	1.0315	0.0315	0.0063	-0.0138	0.9862	0.0048	<b>-0.0453</b>	0.0079
CSM2	YIL132C	1.0219	0.0219	0.0041	-0.0229	0.9771	0.0055	<b>-0.0448</b>	0.0069
CHS5	YLR330W	0.9853	-0.0147	0.0040	-0.0591	0.9409	0.0096	<b>-0.0443</b>	0.0104
ATP10	YLR393W	0.9830	-0.0170	0.0018	-0.0610	0.9390	0.0105	<b>-0.0440</b>	0.0107
RPL16A	YIL133C	1.0273	0.0273	0.0043	-0.0158	0.9842	0.0012	<b>-0.0431</b>	0.0045
RPS6B	YBR181C	1.0309	0.0309	0.0054	-0.0119	0.9881	0.0022	<b>-0.0428</b>	0.0059
YFL042C	YFL042C	1.0387	0.0387	0.0504	-0.0036	0.9964	0.0028	<b>-0.0422</b>	0.0505
SHU1	YHL006C	1.0360	0.0360	0.0098	-0.0041	0.9959	0.0024	<b>-0.0400</b>	0.0101
CYT2	YKL087C	0.9887	-0.0113	0.0023	-0.0511	0.9489	0.0094	<b>-0.0398</b>	0.0097
UBP2	YOR124C	1.0143	0.0143	0.0051	-0.0249	0.9751	0.0059	<b>-0.0391</b>	0.0079
YLR374C	YLR374C	1.0341	0.0341	0.0052	-0.0049	0.9951	0.0036	<b>-0.0389</b>	0.0064
SYH1	YPL105C	1.0236	0.0236	0.0043	-0.0125	0.9875	0.0029	<b>-0.0360</b>	0.0052
SSD1	YDR293C	1.0192	0.0192	0.0032	-0.0158	0.9842	0.0034	<b>-0.0350</b>	0.0047
EMI5	YOL071W	1.0134	0.0134	0.0029	-0.0206	0.9794	0.0040	<b>-0.0339</b>	0.0049
KKQ8	YKL168C	1.0226	0.0226	0.0035	-0.0112	0.9888	0.0029	<b>-0.0337</b>	0.0046
VPS30	YPL120W	0.9739	-0.0261	0.0014	-0.0598	0.9402	0.0108	<b>-0.0336</b>	0.0109
NCL1	YBL024W	1.0200	0.0200	0.0034	-0.0135	0.9865	0.0047	<b>-0.0334</b>	0.0058
MBA1	YBR185C	0.9830	-0.0170	0.0032	-0.0500	0.9500	0.0087	<b>-0.0330</b>	0.0093
HST1	YOL068C	1.0225	0.0225	0.0034	-0.0102	0.9898	0.0034	<b>-0.0326</b>	0.0049
SHR5	YOL110W	1.0264	0.0264	0.0060	-0.0059	0.9941	0.0019	<b>-0.0323</b>	0.0063
COX5A	YNL052W	0.9808	-0.0192	0.0039	-0.0510	0.9490	0.0119	<b>-0.0317</b>	0.0125
SNF1	YDR477W	0.9854	-0.0146	0.0121	-0.0462	0.9538	0.0138	<b>-0.0316</b>	0.0184
SGF11	YPL047W	1.0305	0.0305	0.0019	-0.0005	0.9995	0.0009	<b>-0.0310</b>	0.0022

Anexo 4 (Continuación)

Nombre	ORF	s sencilla <sup>a</sup>	Esperanza de vida sencilla <sup>b</sup>	s sencilla error <sup>c</sup>	s doble <sup>d</sup>	Esperanza de vida doble <sup>e</sup>	s doble error <sup>f</sup>	Epistasis <sup>g</sup>	Epistasis error <sup>h</sup>
CLA4	YNL298W	0.9850	-0.0150	0.0044	-0.0456	0.9544	0.0100	<b>-0.0305</b>	0.0109
UBP8	YMR223W	1.0202	0.0202	0.0039	-0.0100	0.9900	0.0023	<b>-0.0301</b>	0.0045
ARP6	YLR085C	1.0240	0.0240	0.0051	-0.0059	0.9941	0.0020	<b>-0.0298</b>	0.0055
SWR1	YDR334W	1.0182	0.0182	0.0027	-0.0115	0.9885	0.0049	<b>-0.0297</b>	0.0057
AIM31	YML030W	0.9757	-0.0243	0.0042	-0.0538	0.9462	0.0112	<b>-0.0294</b>	0.0120
HOP1	YIL072W	1.0248	0.0248	0.0084	-0.0042	0.9958	0.0049	<b>-0.0289</b>	0.0098
FCJ1	YKR016W	0.9850	-0.0150	0.0028	-0.0440	0.9560	0.0087	<b>-0.0289</b>	0.0092
RPP2A	YOL039W	1.0153	0.0153	0.0050	-0.0136	0.9864	0.0017	<b>-0.0288</b>	0.0053
DAS1	YJL149W	1.0223	0.0223	0.0038	-0.0065	0.9935	0.0011	<b>-0.0288</b>	0.0040
CMC1	YKL137W	0.9854	-0.0146	0.0037	-0.0433	0.9567	0.0104	<b>-0.0286</b>	0.0110
RPL40A	YIL148W	1.0179	0.0179	0.0071	-0.0100	0.9900	0.0029	<b>-0.0279</b>	0.0077
PUB1	YNL016W	1.0144	0.0144	0.0050	-0.0134	0.9866	0.0042	<b>-0.0277</b>	0.0066
YHL005C	YHL005C	0.9822	-0.0178	0.0032	-0.0451	0.9549	0.0097	<b>-0.0272</b>	0.0103
STV1	YMR054W	0.9880	-0.0120	0.0034	-0.0390	0.9610	0.0064	<b>-0.0269</b>	0.0073
SET4	YJL105W	1.0213	0.0213	0.0067	-0.0051	0.9949	0.0020	<b>-0.0264</b>	0.0070
YPT11	YNL304W	1.0174	0.0174	0.0033	-0.0090	0.9910	0.0078	<b>-0.0263</b>	0.0085
YGL235W	YGL235W	0.9818	-0.0182	0.0032	-0.0445	0.9555	0.0080	<b>-0.0262</b>	0.0086
DBR1	YKL149C	1.0125	0.0125	0.0024	-0.0137	0.9863	0.0039	<b>-0.0261</b>	0.0046
HNT2	YDR305C	1.0162	0.0162	0.0059	-0.0099	0.9901	0.0039	<b>-0.0261</b>	0.0071
KGD2	YDR148C	1.0146	0.0146	0.0037	-0.0115	0.9885	0.0019	<b>-0.0260</b>	0.0042
VTA1	YLR181C	1.0146	0.0146	0.0038	-0.0113	0.9887	0.0022	<b>-0.0259</b>	0.0044
BMH1	YER177W	1.0250	0.0250	0.0074	-0.0002	0.9998	0.0041	<b>-0.0251</b>	0.0085
YPL247C	YPL247C	1.0286	0.0286	0.0045	0.0035	1.0035	0.0010	<b>-0.0251</b>	0.0047
SEC66	YBR171W	1.0167	0.0167	0.0064	-0.0079	0.9921	0.0039	<b>-0.0245</b>	0.0075
PTC6	YCR079W	1.0285	0.0285	0.0037	0.0042	1.0042	0.0044	<b>-0.0243</b>	0.0058
YPR170C	YPR170C	1.0184	0.0184	0.0048	-0.0056	0.9944	0.0027	<b>-0.0240</b>	0.0055
SWC3	YAL011W	1.0183	0.0183	0.0063	-0.0056	0.9944	0.0009	<b>-0.0239</b>	0.0064
PMT2	YAL023C	1.0154	0.0154	0.0017	-0.0085	0.9915	0.0023	<b>-0.0238</b>	0.0029
THP2	YHR167W	1.0159	0.0159	0.0061	-0.0064	0.9936	0.0021	<b>-0.0222</b>	0.0065
TRP1	YDR007W	1.0187	0.0187	0.0068	-0.0033	0.9967	0.0017	<b>-0.0219</b>	0.0070
EAF6	YJR082C	1.0227	0.0227	0.0092	0.0008	1.0008	0.0019	<b>-0.0218</b>	0.0094
YDR269C	YDR269C	1.0149	0.0149	0.0034	-0.0065	0.9935	0.0028	<b>-0.0213</b>	0.0045
PAU2	YEL049W	1.0131	0.0131	0.0036	-0.0082	0.9918	0.0030	<b>-0.0212</b>	0.0047
SXM1	YDR395W	1.0129	0.0129	0.0037	-0.0081	0.9919	0.0026	<b>-0.0208</b>	0.0045
LSM12	YHR121W	1.0189	0.0189	0.0050	-0.0016	0.9984	0.0017	<b>-0.0204</b>	0.0053
ICS2	YBR157C	1.0152	0.0152	0.0056	-0.0052	0.9948	0.0024	<b>-0.0203</b>	0.0061
WTM2	YOR229W	1.0154	0.0154	0.0031	-0.0048	0.9952	0.0021	<b>-0.0202</b>	0.0038
YJL150W	YJL150W	1.0172	0.0172	0.0043	-0.0026	0.9974	0.0021	-0.0198	0.0048
YMR075C-A	YMR075C-A	1.0183	0.0183	0.0045	-0.0015	0.9985	0.0022	-0.0198	0.0050

Anexo 4 (Continuación)

Nombre	ORF	s sencilla <sup>a</sup>	Esperanza de vida sencilla <sup>b</sup>	s sencilla error <sup>c</sup>	s doble <sup>d</sup>	Esperanza de vida doble <sup>e</sup>	s doble error <sup>f</sup>	Epistasis <sup>g</sup>	Epistasis error <sup>h</sup>
YKL202W	YKL202W	1.0145	0.0145	0.0050	-0.0052	0.9948	0.0017	-0.0196	0.0053
POC4	YPL144W	0.9874	-0.0126	0.0029	-0.0319	0.9681	0.0066	-0.0193	0.0072
CRD1	YDL142C	0.9773	-0.0227	0.0027	-0.0419	0.9581	0.0059	-0.0191	0.0065
RGS2	YOR107W	1.0139	0.0139	0.0034	-0.0052	0.9948	0.0022	-0.0189	0.0041
LST4	YKL176C	1.0271	0.0271	0.0067	0.0082	1.0082	0.0037	-0.0189	0.0077
IZH3	YLR023C	1.0163	0.0163	0.0045	-0.0025	0.9975	0.0022	-0.0188	0.0050
SNU66	YOR308C	1.0195	0.0195	0.0051	0.0007	1.0007	0.0025	-0.0188	0.0058
PMT3	YOR321W	1.0173	0.0173	0.0031	-0.0013	0.9987	0.0017	-0.0186	0.0036
MSN5	YDR335W	0.9840	-0.0160	0.0023	-0.0346	0.9654	0.0060	-0.0185	0.0065
YIL092W	YIL092W	1.0189	0.0189	0.0028	0.0008	1.0008	0.0027	-0.0181	0.0039
YLR426W	YLR426W	1.0161	0.0161	0.0030	-0.0017	0.9983	0.0023	-0.0177	0.0039
UTR1	YJR049C	1.0190	0.0190	0.0046	0.0016	1.0016	0.0019	-0.0173	0.0051
FRE1	YLR214W	1.0181	0.0181	0.0021	0.0009	1.0009	0.0022	-0.0171	0.0031
MDM35	YKL053C-A	0.9869	-0.0131	0.0039	-0.0301	0.9699	0.0070	-0.0169	0.0080
TSL1	YML100W	1.0179	0.0179	0.0048	0.0011	1.0011	0.0035	-0.0167	0.0059
YOR055W	YOR055W	1.0147	0.0147	0.0020	-0.0021	0.9979	0.0020	-0.0167	0.0029
YMR057C	YMR057C	1.0148	0.0148	0.0052	-0.0019	0.9981	0.0028	-0.0166	0.0059
SMF3	YLR034C	1.0224	0.0224	0.0038	0.0062	1.0062	0.0023	-0.0162	0.0045
PIB2	YGL023C	1.0145	0.0145	0.0040	-0.0016	0.9984	0.0014	-0.0160	0.0043
RPS14A	YCR031C	1.0157	0.0157	0.0050	-0.0004	0.9996	0.0006	-0.0160	0.0051
YJL206C	YJL206C	1.0131	0.0131	0.0022	-0.0029	0.9971	0.0029	-0.0160	0.0037
PBP4	YDL053C	1.0182	0.0182	0.0062	0.0024	1.0024	0.0017	-0.0158	0.0065
CCW12	YLR110C	1.0203	0.0203	0.0057	0.0048	1.0048	0.0018	-0.0154	0.0060
RPS17B	YDR447C	1.0172	0.0172	0.0055	0.0017	1.0017	0.0019	-0.0154	0.0059
PAN3	YKL025C	1.0148	0.0148	0.0032	-0.0006	0.9994	0.0031	-0.0153	0.0045
YKL053W	YKL053W	1.0142	0.0142	0.0031	-0.0006	0.9994	0.0012	-0.0147	0.0034
RGT1	YKL038W	0.9861	-0.0139	0.0020	-0.0283	0.9717	0.0050	-0.0144	0.0054
COG8	YML071C	0.9822	-0.0178	0.0061	-0.0315	0.9685	0.0062	-0.0136	0.0087
SUR2	YDR297W	1.0194	0.0194	0.0040	0.0058	1.0058	0.0018	-0.0136	0.0045
MUD2	YKL074C	1.0165	0.0165	0.0071	0.0029	1.0029	0.0050	-0.0135	0.0087
SCS7	YMR272C	1.0143	0.0143	0.0027	0.0008	1.0008	0.0014	-0.0134	0.0031
MSN4	YKL062W	1.0025	0.0025	0.0030	-0.0109	0.9891	0.0035	-0.0133	0.0046
HDA2	YDR295C	1.0144	0.0144	0.0037	0.0011	1.0011	0.0021	-0.0132	0.0043
PIN4	YBL051C	1.0161	0.0161	0.0063	0.0031	1.0031	0.0036	-0.0129	0.0073
SDH2	YLL041C	0.9847	-0.0153	0.0032	-0.0281	0.9719	0.0056	-0.0127	0.0065
MNT4	YNR059W	1.0161	0.0161	0.0034	0.0035	1.0035	0.0012	-0.0126	0.0036
QCR6	YFR033C	0.9820	-0.0180	0.0030	-0.0306	0.9694	0.0067	-0.0126	0.0073
OCA1	YNL099C	1.0159	0.0159	0.0056	0.0033	1.0033	0.0032	-0.0125	0.0065
NPR1	YNL183C	1.0198	0.0198	0.0029	0.0072	1.0072	0.0028	-0.0125	0.0041

Anexo 4 (Continuación)

Nombre	ORF	s sencilla <sup>a</sup>	Esperanza de vida sencilla <sup>b</sup>	s sencilla error <sup>c</sup>	s doble <sup>d</sup>	Esperanza de vida doble <sup>e</sup>	s doble error <sup>f</sup>	Epistasis <sup>g</sup>	Epistasis error <sup>h</sup>
CYB5	YNL111C	1.0191	0.0191	0.0063	0.0067	1.0067	0.0014	-0.0124	0.0065
DEP1	YAL013W	0.9744	-0.0256	0.0027	-0.0380	0.9620	0.0095	-0.0124	0.0099
OXR1	YPL196W	0.9746	-0.0254	0.0058	-0.0375	0.9625	0.0051	-0.0120	0.0078
MAF1	YDR005C	0.9727	-0.0273	0.0048	-0.0394	0.9606	0.0037	-0.0120	0.0061
VPS35	YJL154C	0.9647	-0.0353	0.0168	-0.0468	0.9532	0.0108	-0.0114	0.0199
PCL1	YNL289W	1.0155	0.0155	0.0052	0.0041	1.0041	0.0031	-0.0113	0.0060
YPR172W	YPR172W	1.0116	0.0116	0.0024	0.0004	1.0004	0.0016	-0.0111	0.0029
YPL225W	YPL225W	0.9882	-0.0118	0.0024	-0.0229	0.9771	0.0051	-0.0110	0.0057
UNG1	YML021C	1.0230	0.0230	0.0064	0.0121	1.0121	0.0036	-0.0109	0.0074
JNM1	YMR294W	0.9867	-0.0133	0.0036	-0.0242	0.9758	0.0049	-0.0109	0.0061
RDI1	YDL135C	1.0172	0.0172	0.0073	0.0065	1.0065	0.0031	-0.0107	0.0079
RIM15	YFL033C	0.9797	-0.0203	0.0078	-0.0307	0.9693	0.0050	-0.0103	0.0093
TOS1	YBR162C	0.9821	-0.0179	0.0072	-0.0282	0.9718	0.0039	-0.0102	0.0082
RPE1	YJL121C	0.9839	-0.0161	0.0076	-0.0255	0.9745	0.0059	-0.0094	0.0097
RRM3	YHR031C	0.9857	-0.0143	0.0042	-0.0236	0.9764	0.0057	-0.0092	0.0071
TRM11	YOL124C	1.0148	0.0148	0.0057	0.0055	1.0055	0.0024	-0.0092	0.0063
MBB1	YJL199C	1.0147	0.0147	0.0028	0.0056	1.0056	0.0005	-0.0090	0.0029
MRP49	YKL167C	0.9846	-0.0154	0.0018	-0.0241	0.9759	0.0068	-0.0086	0.0070
RCN1	YKL159C	0.9853	-0.0147	0.0047	-0.0232	0.9768	0.0062	-0.0085	0.0078
CUP9	YPL177C	1.0191	0.0191	0.0076	0.0114	1.0114	0.0023	-0.0076	0.0080
AIM43	YPL099C	1.0116	0.0116	0.0013	0.0041	1.0041	0.0004	-0.0075	0.0014
MEC3	YLR288C	1.0128	0.0128	0.0051	0.0056	1.0056	0.0038	-0.0071	0.0064
YPR114W	YPR114W	1.0164	0.0164	0.0050	0.0093	1.0093	0.0064	-0.0070	0.0082
MTC2	YKL098W	0.9862	-0.0138	0.0046	-0.0204	0.9796	0.0033	-0.0065	0.0057
RAV1	YJR033C	0.9792	-0.0208	0.0041	-0.0273	0.9727	0.0051	-0.0064	0.0065
YDL026W	YDL026W	1.0191	0.0191	0.0082	0.0127	1.0127	0.0032	-0.0064	0.0088
YCR025C	YCR025C	0.9865	-0.0135	0.0040	-0.0197	0.9803	0.0033	-0.0062	0.0052
MPD2	YOL088C	0.9852	-0.0148	0.0058	-0.0208	0.9792	0.0044	-0.0059	0.0073
TOR1	YJR066W	1.0163	0.0163	0.0069	0.0106	1.0106	0.0024	-0.0056	0.0073
MSN2	YMR037C	1.0061	0.0061	0.0048	0.0004	1.0004	0.0024	-0.0056	0.0054
SWM2	YNR004W	1.0163	0.0163	0.0016	0.0109	1.0109	0.0024	-0.0053	0.0029
PET20	YPL159C	0.9873	-0.0127	0.0010	-0.0178	0.9822	0.0031	-0.0051	0.0033
CWP2	YKL096W-A	1.0210	0.0210	0.0068	0.0159	1.0159	0.0037	-0.0050	0.0078
VPS71	YML041C	1.0150	0.0150	0.0054	0.0102	1.0102	0.0031	-0.0047	0.0063
YBL104C	YBL104C	1.0167	0.0167	0.0060	0.0123	1.0123	0.0036	-0.0044	0.0070
RXT2	YBR095C	0.9848	-0.0152	0.0065	-0.0193	0.9807	0.0064	-0.0041	0.0091
ARP1	YHR129C	0.9859	-0.0141	0.0043	-0.0179	0.9821	0.0031	-0.0037	0.0054
PIG2	YIL045W	0.9807	-0.0193	0.0050	-0.0229	0.9771	0.0055	-0.0035	0.0074
ADR1	YDR216W	1.0001	0.0001	0.0048	-0.0034	0.9966	0.0020	-0.0035	0.0053

Anexo 4 (Continuación)

Nombre	ORF	s sencilla <sup>a</sup>	Esperanza de vida sencilla <sup>b</sup>	s sencilla error <sup>c</sup>	s doble <sup>d</sup>	Esperanza de vida doble <sup>e</sup>	s doble error <sup>f</sup>	Epistasis <sup>g</sup>	Epistasis error <sup>h</sup>
SNF6	YHL025W	0.9855	-0.0145	0.0054	-0.0179	0.9821	0.0043	-0.0034	0.0069
QCR9	YGR183C	0.9807	-0.0193	0.0046	-0.0227	0.9773	0.0035	-0.0033	0.0058
DOA1	YKL213C	0.9672	-0.0328	0.0187	-0.0357	0.9643	0.0117	-0.0028	0.0220
EPT1	YHR123W	1.0126	0.0126	0.0027	0.0097	1.0097	0.0015	-0.0028	0.0031
APL6	YGR261C	0.9864	-0.0136	0.0041	-0.0161	0.9839	0.0025	-0.0024	0.0049
YGR205W	YGR205W	1.0152	0.0152	0.0038	0.0128	1.0128	0.0024	-0.0024	0.0046
KIN3	YAR018C	0.9819	-0.0181	0.0039	-0.0205	0.9795	0.0026	-0.0023	0.0047
YBR226C	YBR226C	1.0141	0.0141	0.0015	0.0119	1.0119	0.0014	-0.0022	0.0021
SNA2	YDR525W-A	0.9847	-0.0153	0.0048	-0.0174	0.9826	0.0027	-0.0021	0.0056
MXR2	YCL033C	0.9765	-0.0235	0.0060	-0.0255	0.9745	0.0065	-0.0019	0.0088
YJR011C	YJR011C	0.9808	-0.0192	0.0048	-0.0212	0.9788	0.0049	-0.0019	0.0069
TRF5	YNL299W	0.9862	-0.0138	0.0049	-0.0157	0.9843	0.0027	-0.0018	0.0056
OPI1	YHL020C	0.9810	-0.0190	0.0046	-0.0208	0.9792	0.0064	-0.0017	0.0079
ALG9	YNL219C	1.0155	0.0155	0.0031	0.0137	1.0137	0.0025	-0.0017	0.0041
AIM11	YER093C-A	0.9789	-0.0211	0.0037	-0.0228	0.9772	0.0036	-0.0016	0.0052
HAP4	YKL109W	0.9812	-0.0188	0.0046	-0.0204	0.9796	0.0012	-0.0016	0.0048
YDR149C	YDR149C	0.9842	-0.0158	0.0039	-0.0173	0.9827	0.0042	-0.0015	0.0058
CKA1	YIL035C	0.9850	-0.0150	0.0034	-0.0162	0.9838	0.0037	-0.0011	0.0050
PCK1	YKR097W	0.9841	-0.0159	0.0039	-0.0168	0.9832	0.0045	-0.0009	0.0060
DSE2	YHR143W	0.9829	-0.0171	0.0043	-0.0180	0.9820	0.0016	-0.0009	0.0047
FKH1	YIL131C	0.9979	-0.0021	0.0072	-0.0030	0.9970	0.0020	-0.0008	0.0075
MRPL39	YML009C	0.9860	-0.0140	0.0054	-0.0147	0.9853	0.0016	-0.0006	0.0057
RSF2	YJR127C	0.9832	-0.0168	0.0035	-0.0175	0.9825	0.0030	-0.0006	0.0046
AIM39	YOL053W	0.9699	-0.0301	0.0041	-0.0307	0.9693	0.0065	-0.0006	0.0077
GIS1	YDR096W	1.0107	0.0107	0.0051	0.0103	1.0103	0.0026	-0.0004	0.0058
YCR076C	YCR076C	0.9600	-0.0400	0.0058	-0.0401	0.9599	0.0051	0.0000	0.0077
YDR008C	YDR008C	0.9850	-0.0150	0.0052	-0.0150	0.9850	0.0066	0.0000	0.0085
GLN3	YER040W	0.9874	-0.0126	0.0064	-0.0002	0.9998	0.0006	0.0002	NaN
FKH2	YNL068C	0.9842	-0.0158	0.0052	-0.0155	0.9845	0.0037	0.0004	0.0064
SUN4	YNL066W	0.9867	-0.0133	0.0041	-0.0129	0.9871	0.0046	0.0005	0.0062
ACH1	YBL015W	0.9692	-0.0308	0.0051	-0.0300	0.9700	0.0042	0.0009	0.0067
SPP1	YPL138C	0.9842	-0.0158	0.0050	-0.0148	0.9852	0.0039	0.0010	0.0064
YDR391C	YDR391C	0.9858	-0.0142	0.0048	-0.0130	0.9870	0.0071	0.0012	0.0086
LRE1	YCL051W	1.0140	0.0140	0.0018	0.0158	1.0158	0.0017	0.0019	0.0026
CYC2	YOR037W	0.9837	-0.0163	0.0029	-0.0144	0.9856	0.0023	0.0019	0.0038
UME1	YPL139C	0.9729	-0.0271	0.0033	-0.0252	0.9748	0.0042	0.0019	0.0054
RPS29B	YDL061C	1.0168	0.0168	0.0061	0.0188	1.0188	0.0074	0.0021	0.0097
CUE4	YML101C	0.9890	-0.0110	0.0019	-0.0087	0.9913	0.0026	0.0024	0.0032
YDL012C	YDL012C	0.9862	-0.0138	0.0041	-0.0113	0.9887	0.0044	0.0027	0.0060

Anexo 4 (Continuación)

Nombre	ORF	s sencilla <sup>a</sup>	Esperanza de vida sencilla <sup>b</sup>	s sencilla error <sup>c</sup>	s doble <sup>d</sup>	Esperanza de vida doble <sup>e</sup>	s doble error <sup>f</sup>	Epistasis <sup>g</sup>	Epistasis error <sup>h</sup>
LSC2	YGR244C	0.9782	-0.0218	0.0039	-0.0191	0.9809	0.0029	0.0029	0.0049
YMR317W	YMR317W	0.9874	-0.0126	0.0032	-0.0098	0.9902	0.0045	0.0029	0.0055
YBR292C	YBR292C	0.9851	-0.0149	0.0053	-0.0120	0.9880	0.0045	0.0030	0.0070
NUP100	YKL068W	0.9892	-0.0108	0.0027	-0.0077	0.9923	0.0032	0.0031	0.0043
APP1	YNL094W	0.9845	-0.0155	0.0063	-0.0123	0.9877	0.0020	0.0033	0.0067
KNS1	YLL019C	0.9858	-0.0142	0.0032	-0.0108	0.9892	NaN	0.0035	NaN
EMI1	YDR512C	0.9808	-0.0192	0.0040	-0.0156	0.9844	0.0021	0.0037	0.0045
YFR017C	YFR017C	0.9818	-0.0182	0.0023	-0.0137	0.9863	0.0023	0.0046	0.0033
MAK32	YCR019W	0.9797	-0.0203	0.0121	-0.0158	0.9842	0.0029	0.0046	0.0125
PEX12	YMR026C	0.9863	-0.0137	0.0027	-0.0090	0.9910	0.0026	0.0047	0.0038
ERV29	YGR284C	0.9849	-0.0151	0.0055	-0.0099	0.9901	0.0021	0.0052	0.0059
YFR035C	YFR035C	0.9876	-0.0124	0.0042	-0.0067	0.9933	0.0022	0.0058	0.0048
YCL026C	YCL026C	0.9771	-0.0229	0.0123	-0.0172	0.9828	0.0077	0.0058	0.0145
PNC1	YGL037C	0.9736	-0.0264	0.0039	-0.0206	0.9794	0.0037	0.0059	0.0054
ATG16	YMR159C	0.9825	-0.0175	0.0046	-0.0116	0.9884	0.0012	0.0059	0.0048
YLR422W	YLR422W	0.9863	-0.0137	0.0056	-0.0078	0.9922	0.0015	0.0060	0.0059
YCR022C	YCR022C	0.9886	-0.0114	0.0017	-0.0054	0.9946	0.0023	0.0061	0.0029
PTC4	YBR125C	0.9870	-0.0130	0.0039	-0.0066	0.9934	0.0022	0.0065	0.0045
MAK31	YCR020C-A	0.9686	-0.0314	0.0052	-0.0250	0.9750	0.0055	0.0065	0.0076
YNR064C	YNR064C	0.9861	-0.0139	0.0040	-0.0074	0.9926	0.0057	0.0066	0.0070
YPL182C	YPL182C	0.9845	-0.0155	0.0038	-0.0089	0.9911	0.0021	0.0067	0.0044
REX2	YLR059C	0.9852	-0.0148	0.0027	-0.0082	0.9918	0.0030	0.0067	0.0040
RAD10	YML095C	0.9868	-0.0132	0.0037	-0.0064	0.9936	0.0019	0.0068	0.0042
MRS2	YOR334W	0.9731	-0.0269	0.0049	-0.0199	0.9801	0.0030	0.0071	0.0057
YMR310C	YMR310C	0.9876	-0.0124	0.0034	-0.0054	0.9946	0.0041	0.0071	0.0053
VHS2	YIL135C	0.9820	-0.0180	0.0074	-0.0109	0.9891	0.0032	0.0072	0.0081
YTA7	YGR270W	0.9834	-0.0166	0.0033	-0.0092	0.9908	0.0060	0.0074	0.0069
YOL035C	YOL035C	0.9849	-0.0151	0.0062	-0.0076	0.9924	0.0015	0.0075	0.0064
VTS1	YOR359W	0.9872	-0.0128	0.0042	-0.0053	0.9947	0.0011	0.0075	0.0044
DSK2	YMR276W	0.9857	-0.0143	0.0034	-0.0068	0.9932	0.0012	0.0076	0.0036
RAD6	YGL058W	0.9577	-0.0423	0.0029	-0.0347	0.9653	0.0086	0.0077	0.0091
RPL34B	YIL052C	0.9809	-0.0191	0.0052	-0.0113	0.9887	0.0028	0.0078	0.0060
YER084W	YER084W	0.9856	-0.0144	0.0019	-0.0064	0.9936	0.0036	0.0080	0.0041
SOK2	YMR016C	0.9866	-0.0134	0.0027	-0.0053	0.9947	0.0032	0.0081	0.0043
YCK1	YHR135C	0.9850	-0.0150	0.0061	-0.0067	0.9933	0.0017	0.0084	0.0064
RPS8A	YBL072C	0.9847	-0.0153	0.0042	-0.0067	0.9933	0.0051	0.0086	0.0066
PIB1	YDR313C	0.9875	-0.0125	0.0025	-0.0038	0.9962	0.0025	0.0088	0.0035
YLR455W	YLR455W	0.9843	-0.0157	0.0076	-0.0067	0.9933	0.0013	0.0090	0.0077
YBR174C	YBR174C	0.9707	-0.0293	0.0046	-0.0202	0.9798	NaN	0.0091	NaN

Anexo 4 (Continuación)

Nombre	ORF	s sencilla <sup>a</sup>	Esperanza de vida sencilla <sup>b</sup>	s sencilla error <sup>c</sup>	s doble <sup>d</sup>	Esperanza de vida doble <sup>e</sup>	s doble error <sup>f</sup>	Epistasis <sup>g</sup>	Epistasis error <sup>h</sup>
UBP14	YBR058C	0.9751	-0.0249	0.0061	-0.0158	0.9842	0.0051	0.0092	0.0080
YKR047W	YKR047W	0.9833	-0.0167	0.0069	-0.0075	0.9925	0.0031	0.0093	0.0076
UBR1	YGR184C	0.9820	-0.0180	0.0046	-0.0087	0.9913	0.0021	0.0094	0.0050
SIP1	YDR422C	0.9868	-0.0132	0.0042	-0.0039	0.9961	0.0007	0.0094	0.0043
STF1	YDL130W-A	0.9583	-0.0417	0.0047	-0.0323	0.9677	0.0052	0.0094	0.0071
NNK1	YKL171W	0.9861	-0.0139	0.0037	-0.0044	0.9956	0.0024	0.0095	0.0044
GID7	YCL039W	0.9860	-0.0140	0.0025	-0.0046	0.9954	0.0025	0.0095	0.0036
ATG3	YNR007C	0.9732	-0.0268	0.0068	-0.0173	0.9827	0.0042	0.0095	0.0080
YMR007W	YMR007W	0.9846	-0.0154	0.0025	-0.0058	0.9942	0.0024	0.0097	0.0035
ADE17	YMR120C	0.9873	-0.0127	0.0043	-0.0030	0.9970	0.0030	0.0098	0.0053
MPH1	YIR002C	0.9826	-0.0174	0.0031	-0.0076	0.9924	0.0012	0.0099	0.0034
MET6	YER091C	0.9858	-0.0142	0.0034	-0.0042	0.9958	0.0011	0.0100	0.0036
KIN1	YDR122W	0.9830	-0.0170	0.0053	-0.0070	0.9930	0.0026	0.0100	0.0060
ELF1	YKL160W	0.9668	-0.0332	0.0094	-0.0233	0.9767	0.0063	0.0100	0.0113
ATG14	YBR128C	0.9783	-0.0217	0.0071	-0.0116	0.9884	0.0038	0.0101	0.0081
YLR255C	YLR255C	0.9846	-0.0154	0.0035	-0.0051	0.9949	0.0034	0.0104	0.0050
NMA1	YLR328W	0.9878	-0.0122	0.0031	-0.0017	0.9983	0.0024	0.0105	0.0039
GLC3	YEL011W	0.9761	-0.0239	0.0089	-0.0133	0.9867	0.0027	0.0107	0.0093
TOK1	YJL093C	0.9839	-0.0161	0.0038	-0.0051	0.9949	0.0030	0.0111	0.0049
RTT10	YPL183C	0.9845	-0.0155	0.0048	-0.0045	0.9955	0.0023	0.0111	0.0054
UBA3	YPR066W	0.9794	-0.0206	0.0032	-0.0094	0.9906	0.0019	0.0113	0.0038
EGT2	YNL327W	0.9771	-0.0229	0.0046	-0.0113	0.9887	0.0042	0.0116	0.0063
UBC8	YEL012W	0.9731	-0.0269	0.0041	-0.0152	0.9848	0.0029	0.0117	0.0050
MDH1	YKL085W	0.9727	-0.0273	0.0031	-0.0157	0.9843	0.0018	0.0117	0.0037
OYE2	YHR179W	0.9878	-0.0122	0.0034	-0.0005	0.9995	0.0024	0.0117	0.0042
RPL42A	YNL162W	0.9850	-0.0150	0.0053	-0.0033	0.9967	0.0033	0.0118	0.0063
ERV41	YML067C	0.9839	-0.0161	0.0065	-0.0042	0.9958	0.0039	0.0120	0.0076
BRE2	YLR015W	0.9618	-0.0382	0.0074	-0.0262	0.9738	0.0064	0.0121	0.0098
ATG10	YLL042C	0.9731	-0.0269	0.0065	-0.0148	0.9852	0.0036	0.0122	0.0074
CIS1	YDR022C	0.9785	-0.0215	0.0075	-0.0092	0.9908	0.0002	0.0124	0.0075
CHS7	YHR142W	0.9871	-0.0129	0.0027	-0.0004	0.9996	0.0032	0.0126	0.0042
VAC14	YLR386W	0.9769	-0.0231	0.0039	-0.0104	0.9896	0.0033	0.0128	0.0051
GLO1	YML004C	0.9854	-0.0146	0.0038	-0.0017	0.9983	0.0030	0.0130	0.0049
MHP1	YJL042W	0.9820	-0.0180	0.0070	-0.0050	0.9950	0.0022	0.0130	0.0073
PDX1	YGR193C	0.9866	-0.0134	0.0052	-0.0002	0.9998	0.0023	0.0133	0.0058
YGL109W	YGL109W	0.9847	-0.0153	0.0060	-0.0020	0.9980	0.0017	0.0134	0.0063
SKP2	YNL311C	0.9868	-0.0132	0.0044	0.0002	1.0002	0.0023	0.0135	0.0050
ICY2	YPL250C	0.9854	-0.0146	0.0018	-0.0012	0.9988	0.0017	0.0135	0.0025
SWD1	YAR003W	0.9808	-0.0192	0.0032	-0.0057	0.9943	0.0041	0.0136	0.0052

Anexo 4 (Continuación)

Nombre	ORF	s sencilla <sup>a</sup>	Esperanza de vida sencilla <sup>b</sup>	s sencilla error <sup>c</sup>	s doble <sup>d</sup>	Esperanza de vida doble <sup>e</sup>	s doble error <sup>f</sup>	Epistasig	Epistasig error <sup>h</sup>
CPR5	YDR304C	0.9878	-0.0122	0.0022	0.0015	1.0015	0.0006	0.0138	0.0024
YNR040W	YNR040W	0.9772	-0.0228	0.0057	-0.0091	0.9909	0.0048	0.0138	0.0075
PRR1	YKL116C	0.9848	-0.0152	0.0028	-0.0014	0.9986	0.0036	0.0139	0.0046
YOR062C	YOR062C	0.9833	-0.0167	0.0041	-0.0028	0.9972	0.0019	0.0140	0.0045
PDA1	YER178W	0.9693	-0.0307	0.0028	-0.0167	0.9833	0.0048	0.0140	0.0056
SRO9	YCL037C	0.9831	-0.0169	0.0068	-0.0028	0.9972	0.0022	0.0141	0.0071
ERP5	YHR110W	0.9819	-0.0181	0.0072	-0.0038	0.9962	0.0023	0.0144	0.0076
YBR219C	YBR219C	0.9856	-0.0144	0.0053	0.0001	1.0001	0.0029	0.0145	0.0061
RAS2	YNL098C	0.9687	-0.0313	0.0107	-0.0168	0.9832	0.0040	0.0145	0.0115
UBX4	YMR067C	0.9814	-0.0186	0.0061	-0.0040	0.9960	0.0010	0.0147	0.0062
TPC1	YGR096W	0.9863	-0.0137	0.0046	0.0010	1.0010	0.0023	0.0148	0.0052
SIP18	YMR175W	0.9827	-0.0173	0.0065	-0.0025	0.9975	0.0028	0.0148	0.0071
ATG5	YPL149W	0.9760	-0.0240	0.0055	-0.0093	0.9907	0.0029	0.0148	0.0063
RAV2	YDR202C	0.9750	-0.0250	0.0063	-0.0101	0.9899	0.0026	0.0150	0.0068
VAC7	YNL054W	0.9817	-0.0183	0.0040	-0.0028	0.9972	0.0029	0.0156	0.0050
SHM2	YLR058C	0.9823	-0.0177	0.0069	-0.0022	0.9978	0.0010	0.0156	0.0070
PEX10	YDR265W	0.9778	-0.0222	0.0051	-0.0066	0.9934	0.0015	0.0156	0.0053
PEX2	YJL210W	0.9776	-0.0224	0.0044	-0.0068	0.9932	0.0015	0.0156	0.0047
UFD2	YDL190C	0.9833	-0.0167	0.0026	-0.0011	0.9989	0.0021	0.0157	0.0034
IRC8	YJL051W	0.9765	-0.0235	0.0050	-0.0075	0.9925	0.0026	0.0161	0.0057
PPH3	YDR075W	0.9898	-0.0102	0.0019	0.0059	1.0059	0.0060	0.0161	0.0064
DUS3	YLR401C	0.9857	-0.0143	0.0031	0.0020	1.0020	0.0024	0.0163	0.0040
YMR210W	YMR210W	0.9867	-0.0133	0.0027	0.0031	1.0031	0.0022	0.0164	0.0035
YOR277C	YOR277C	0.9855	-0.0145	0.0035	0.0019	1.0019	0.0021	0.0165	0.0041
BUD14	YAR014C	0.9642	-0.0358	0.0024	-0.0193	0.9807	0.0050	0.0166	0.0056
YBL096C	YBL096C	0.9853	-0.0147	0.0064	0.0019	1.0019	0.0024	0.0167	0.0069
PET130	YJL023C	0.9806	-0.0194	0.0046	-0.0024	0.9976	0.0017	0.0171	0.0049
YDR340W	YDR340W	0.9876	-0.0124	0.0032	0.0047	1.0047	0.0036	0.0172	0.0048
UBX7	YBR273C	0.9879	-0.0121	0.0035	0.0052	1.0052	0.0011	0.0173	0.0037
YBR206W	YBR206W	0.9881	-0.0119	0.0023	0.0064	1.0064	0.0039	0.0183	0.0046
QRI7	YDL104C	0.9756	-0.0244	0.0043	-0.0061	0.9939	0.0040	0.0184	0.0059
YDR250C	YDR250C	0.9744	-0.0256	0.0139	-0.0070	0.9930	0.0014	0.0187	0.0139
STB6	YKL072W	0.9874	-0.0126	0.0033	0.0063	1.0063	0.0030	0.0189	0.0045
HAP2	YGL237C	0.9714	-0.0286	0.0040	-0.0093	0.9907	0.0026	0.0194	0.0048
UTH1	YKR042W	0.9782	-0.0218	0.0049	-0.0023	0.9977	0.0031	0.0195	0.0058
IME2	YJL106W	0.9784	-0.0216	0.0106	-0.0021	0.9979	0.0022	0.0196	0.0109
SER3	YER081W	0.9734	-0.0266	0.0069	-0.0071	0.9929	0.0026	0.0196	0.0074
IZH4	YOL101C	0.9817	-0.0183	0.0076	0.0013	1.0013	0.0091	0.0197	0.0119
GAL83	YER027C	0.9831	-0.0169	0.0043	0.0027	1.0027	0.0023	0.0197	0.0049

Anexo 4 (Continuación)

Nombre	ORF	s sencilla <sup>a</sup>	Esperanza de vida sencilla <sup>b</sup>	s sencilla error <sup>c</sup>	s doble <sup>d</sup>	Esperanza de vida doble <sup>e</sup>	s doble error <sup>f</sup>	Epistasia <sup>g</sup>	Epistasia error <sup>h</sup>
YOR223W	YOR223W	0.9874	-0.0126	0.0015	0.0074	1.0074	0.0024	<b>0.0201</b>	0.0029
LSC1	YOR142W	0.9673	-0.0327	0.0018	-0.0126	0.9874	0.0032	<b>0.0201</b>	0.0037
PYC2	YBR218C	0.9844	-0.0156	0.0049	0.0046	1.0046	0.0015	<b>0.0202</b>	0.0051
SNO4	YMR322C	0.9786	-0.0214	0.0065	-0.0012	0.9988	0.0017	<b>0.0203</b>	0.0067
MNN4	YKL201C	0.9739	-0.0261	0.0103	-0.0058	0.9942	0.0015	<b>0.0204</b>	0.0105
YIR024C	YIR024C	0.9765	-0.0235	0.0033	-0.0031	0.9969	0.0020	<b>0.0205</b>	0.0039
UFD4	YKL010C	0.9799	-0.0201	0.0046	0.0005	1.0005	0.0034	<b>0.0206</b>	0.0057
YPR092W	YPR092W	0.9759	-0.0241	0.0037	-0.0032	0.9968	0.0022	<b>0.0210</b>	0.0043
YML010C-B	YML010C-B	0.9830	-0.0170	0.0054	0.0049	1.0049	0.0027	<b>0.0219</b>	0.0061
YPR050C	YPR050C	0.9490	-0.0510	0.0094	-0.0291	0.9709	0.0045	<b>0.0219</b>	0.0104
YMR135W-A	YMR135W-A	0.9810	-0.0190	0.0055	0.0032	1.0032	0.0017	<b>0.0222</b>	0.0058
BNA6	YFR047C	0.9846	-0.0154	0.0038	0.0068	1.0068	0.0016	<b>0.0222</b>	0.0041
TIR3	YIL011W	0.9882	-0.0118	0.0026	0.0107	1.0107	0.0069	<b>0.0226</b>	0.0074
COG6	YNL041C	0.9767	-0.0233	0.0061	-0.0007	0.9993	0.0046	<b>0.0226</b>	0.0077
GIM5	YML094W	0.9817	-0.0183	0.0057	0.0047	1.0047	0.0013	<b>0.0230</b>	0.0059
RMD5	YDR255C	0.9613	-0.0387	0.0030	-0.0156	0.9844	0.0052	<b>0.0232</b>	0.0060
GAL7	YBR018C	0.9829	-0.0171	0.0061	0.0062	1.0062	0.0009	<b>0.0233</b>	0.0062
ISU2	YOR226C	0.9688	-0.0312	0.0038	-0.0079	0.9921	0.0012	<b>0.0234</b>	0.0040
ECM30	YLR436C	0.9894	-0.0106	0.0026	0.0139	1.0139	0.0021	<b>0.0246</b>	0.0034
YOR111W	YOR111W	0.9866	-0.0134	0.0044	0.0112	1.0112	0.0028	<b>0.0246</b>	0.0052
PEX19	YDL065C	0.9801	-0.0199	0.0077	0.0050	1.0050	0.0033	<b>0.0250</b>	0.0083
YDR048C	YDR048C	0.9751	-0.0249	0.0042	0.0016	1.0016	0.0042	<b>0.0266</b>	0.0060
YPR096C	YPR096C	0.9771	-0.0229	0.0118	0.0036	1.0036	0.0076	<b>0.0266</b>	0.0140
ATG12	YBR217W	0.9674	-0.0326	0.0034	-0.0046	0.9954	0.0006	<b>0.0281</b>	0.0035
ATG9	YDL149W	0.9677	-0.0323	0.0042	-0.0042	0.9958	0.0024	<b>0.0281</b>	0.0049
DLT1	YMR126C	0.9777	-0.0223	0.0073	0.0073	1.0073	0.0031	<b>0.0297</b>	0.0079
CCC2	YDR270W	0.9551	-0.0449	0.0272	-0.0146	0.9854	0.0013	<b>0.0304</b>	0.0272
MAK3	YPR051W	0.9517	-0.0483	0.0054	-0.0172	0.9828	0.0029	<b>0.0311</b>	0.0062
YGR237C	YGR237C	0.9663	-0.0337	0.0101	-0.0026	0.9974	0.0025	<b>0.0311</b>	0.0104
ATG21	YPL100W	0.9800	-0.0200	0.0015	0.0113	1.0113	0.0041	<b>0.0314</b>	0.0044
PAC10	YGR078C	0.9693	-0.0307	0.0060	0.0012	1.0012	0.0016	<b>0.0319</b>	0.0062
PEP4	YPL154C	0.9694	-0.0306	0.0038	0.0015	1.0015	0.0032	<b>0.0322</b>	0.0050
NAP1	YKR048C	0.9609	-0.0391	0.0056	-0.0049	0.9951	0.0021	<b>0.0343</b>	0.0060
YEL068C	YEL068C	0.9708	-0.0292	0.0185	0.0078	1.0078	0.0015	<b>0.0371</b>	0.0186
ATP23	YNR020C	0.9683	-0.0317	0.0070	0.0057	1.0057	0.0046	<b>0.0374</b>	0.0084
COQ2	YNR041C	0.9615	-0.0385	0.0047	-0.0010	0.9990	0.0020	<b>0.0376</b>	0.0052
PEF1	YGR058W	0.9491	-0.0509	0.0322	-0.0130	0.9870	0.0049	<b>0.0380</b>	0.0326
NMD4	YLR363C	0.9733	-0.0267	0.0112	0.0117	1.0117	0.0059	<b>0.0385</b>	0.0127
RSR1	YGR152C	0.9710	-0.0290	0.0138	0.0094	1.0094	0.0046	<b>0.0385</b>	0.0146

Nombre	ORF	s sencilla <sup>a</sup>	Esperanza de vida sencilla <sup>b</sup>	s sencilla error <sup>c</sup>	s doble <sup>d</sup>	Esperanza de vida doble <sup>e</sup>	s doble error <sup>f</sup>	Epistasia <sup>g</sup>	Epistasia error <sup>h</sup>
MRPL1	YDR116C	0.9737	-0.0263	0.0041	0.0132	1.0132	0.0043	0.0395	0.0060
KDX1	YKL161C	0.9451	-0.0549	0.0224	-0.0122	0.9878	0.0028	0.0428	0.0226
ICE2	YIL090W	0.9603	-0.0397	0.0073	0.0033	1.0033	0.0028	0.0431	0.0078
TRM7	YBR061C	0.9469	-0.0531	0.0051	-0.0090	0.9910	0.0029	0.0442	0.0059
TRX3	YCR083W	0.9530	-0.0470	0.0044	0.0011	1.0011	0.0016	0.0482	0.0047
WSS1	YHR134W	0.9533	-0.0467	0.0239	0.0036	1.0036	0.0037	0.0504	0.0242
HRD3	YLR207W	0.9389	-0.0611	0.0198	0.0081	1.0081	0.0026	0.0692	0.0200

**Anexo 5. Ejemplo de curvas de crecimiento y fluorescencia RFP/CFP de las mutantes sencillas y dobles utilizadas en el ensayo de dobles mutantes.**

a) Curvas de crecimiento de las mutantes sencillas y dobles de una placa de 96 pozos utilizada en el experimento de análisis de dobles mutantes. b) Curvas de la señal de fluorescencia CFP de las mutantes sencillas y dobles. c) Señal de fluorescencia RFP de las mutantes sencillas y dobles. Se aprecia una fuerte señal de fluorescencia CFP tanto en la mutante sencillas como en la mutante dobles. En cambio, la señal de fluorescencia RFP solo se aprecia en las dobles mutantes.

