

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

**UNIDAD IRAPUATO**

**UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA**

Análisis genético del factor de envejecimiento SWR1 en  
*Saccharomyces* y su conservación en *Drosophila*

**Tesis que presenta:**

**B.E. Teodora de Jesus Judith Ulloa Calzonzin**

**Para obtener el grado de:**

**Maestra en Ciencias**

En la especialidad de:

**Biología Integrativa**

**Directores de Tesis:**

Dr. Alexander De Luna Fors

Dra. Katarzyna Oktaba Sosin

El siguiente trabajo de Tesis de Maestría se desarrolló en dos grupos: el grupo de Sistemas Genéticos a cargo del **Dr. Alexander de Luna Fors** en la Unidad de Genómica Avanzada (Langebio) y el grupo de Regulación y Topología del genoma a cargo de la **Dra. Katarzyna Oktaba Sosin** en el Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del IPN, Irapuato, Guanajuato, México. Se contó con el apoyo del **Dr. Rafael Montiel Duarte** y el **Dr. Alfredo Herrera Estrella** como parte del comité de asesores y con el apoyo del CONACYT a través del programa de becas para estudios de posgrado (CVU):829231 y de los proyectos de CB-2015/164889 y PN-2016/2370.

## Agradecimientos

Comenzaré agradeciendo a mis directores de Tesis: el Dr. Alexander de Luna Fors y la Dra. Katarzyna Oktaba Sosin, que sin su dedicación y apoyo todo lo que logramos en este proyecto no hubiera sido posible, gracias sobre todo por el aprendizaje. Gracias a mis dos queridos laboratorios, principalmente a Mayra, Joanna y Susy por todo su apoyo durante el desarrollo del proyecto. Gracias a todos los compañeros de laboratorio: Michelle, Luisa, Sergio, Adriana, Daniel, Mariana, Porfirio, Mauricio, Amairani, Karencita, Diana, Mariela, Emiliano, Lalo, Carlos, Adrian, Leyma, Martin y Ximena. Todos de alguna forma aportaron al proyecto, tanto discusiones como pláticas de pasillo, gracias. A mis sinodales: el Dr. Alfredo Herrera Estrella y el Dr. Rafael Montiel Duarte, gracias a ellos que con sus comentarios enriquecían el proyecto.

En especial agradecer a mi familia, mis hermanas Lupita y Alicia, mi mamá Blanca Calzonzin, a mis tías: Ma. De la Luz, Alicia, Carmen, Consuelo, Martha, a mi tío Martin, a mis primos: Guadalupe, Karla, Diana, Martin, Sebastián y sobrino Angel por brindarme su apoyo siempre.

Y, por último, a los mejores, mis queridísimos compañeros de generación: Corina, Michelle, Luisa, Karina, Freddy, Alex, Raúl, Paquito, Josué, Paul, Juan Esteban y Javi. “¿Cuándo nos volvimos expertos en Biología Integrativa?... Anoche”. Muchas gracias por el apoyo, siempre haciendo lo mejor para la pequeña familia que formamos.

## Índice

Agradecimientos	3
Índice	4
Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
Genética del envejecimiento en organismos modelo	8
Las modificaciones en la cromatina tienen efecto sobre el envejecimiento	9
El complejo SWR1 de levadura como modificador de cromatina tiene función conservada en distintos organismos	13
Levadura como modelo para el estudio del envejecimiento	17
<i>Drosophila</i> como modelo para el estudio del envejecimiento	20
Objetivos	22
Materiales y métodos	23
Resultados	33
Tiempo de vida cronológica del complejo SWR1 y los homólogos de Tip60 en <i>S. cerevisiae</i> .	33
Interacciones genéticas del gen <i>SWR1</i> con factores de envejecimiento	42
Interacciones de letalidad sintética entre el complejo SWR1 y los homólogos de Tip60 con factores de envejecimiento.	54
Conservación de la relación SWR1-envejecimiento a nivel intraespecie en <i>S. cerevisiae</i>	57
Efecto de Tip60 en el tiempo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	61
Discusión	66
Los complejos modificadores de cromatina afectan de manera distinta el tiempo de vida cronológico de levadura	66
Interacciones genéticas que median la extensión del tiempo de vida por falta del complejo SWR1	68
Conservación del complejo SWR1 como factor de envejecimiento	70
Conclusiones	72
Perspectivas	73
Referencias bibliográficas	73
Apéndices	81
Apéndice A.- Lista de Primers	81

Apéndice B.- Lista de Genes (epistasis)	84
Apéndice C.-Cruzas <i>Drosophila melanogaster</i>	89
Apéndice D.- Resultados Cinética de crecimiento 2	95
Contribuciones a las que dio lugar el trabajo	99

## Resumen

La inactivación de algunas subunidades de SWR1, un complejo modificador de cromatina que realiza el intercambio de la variante de histona H2A.Z por su histona canónica H2A, incrementa la longevidad de *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, aún no está claro si todas las subunidades del complejo tienen el mismo efecto ni qué vías son necesarias para extender el tiempo de vida mediadas por la inactivación de SWR1. Tampoco se sabe si su efecto en el envejecimiento se mantiene en otras especies en las que este complejo está conservado. En mi trabajo de investigación de maestría confirmé la actividad pro-envejecimiento del complejo SWR1 y generé mutantes dobles de *SWR1*, el gen que codifica la subunidad principal del complejo con genes relacionados con envejecimiento y longevidad. Nuestros resultados sugieren que la inactivación del complejo SWR1 aumenta el tiempo de vida porque H2A.Z no se incorpora en los nucleosomas. Por otra parte, el complejo SWR1 tiene un complejo homólogo en metazoos, el complejo Tip60 (un complejo esencial), que corresponde a dos complejos de levadura, SWR1 y NuA4, que en todos los casos reportados hace el mismo tipo de modificación de la cromatina. En mi trabajo de tesis puse a prueba y estandaricé un método para investigar si la modificación de las subunidades del complejo Tip60 afecta el tiempo de vida en *Drosophila*, como sucede en levadura. Usando mutantes heterocigas, demostramos que la actividad de Tip60 es necesaria para prevenir el envejecimiento prematuro, sugiriendo que este complejo también está relacionado con el envejecimiento en moscas, pero con efecto opuesto al observado en levadura. En resumen, nuestra investigación contribuye al conocimiento sobre los mecanismos moleculares y procesos celulares conservados que determinan el envejecimiento desde levaduras hasta animales.

## Abstract

Inactivation of some subunits of SWR1, a chromatin remodeler complex that exchanges histone variant H2A.Z for the canonical histone H2A, increases longevity of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. However, it is still unclear whether all subunits of the complex have the same effect nor which regulatory pathways are needed to extend longevity mediated by SWR1 inactivation. It is also not known whether their effect in aging is maintained in other species in which this complex is conserved. During my master studies I confirmed the pro-aging activity of the SWR1 complex and generated double mutants of the *SWR1* gene, which encodes the main subunit of the complex, with other genes related to aging and longevity. Our results suggest that inactivation of the SWR1 complex increases lifespan because H2A.Z is not incorporated into nucleosomes. On the other hand, the essential Tip60 complex is the homolog of the SWR1 complex in Metazoa, corresponding to SWR1 and NuA4 in yeast, and in all reported cases it does the same type of chromatin modification. During my thesis I standardized a method to investigate whether alteration of Tip60 subunits affects lifespan in *Drosophila*, as it does in yeast. Using heterozygous mutants, we show that activity of Tip60 is needed to prevent premature aging, suggesting that this complex is also related to aging in flies, but with effects opposite to those observed in yeast. In conclusion, our investigation contributes to the body of knowledge about conserved molecular mechanisms and cellular processes that determine aging from yeast to metazoans.

## Introducción

### Genética del envejecimiento en organismos modelo

El envejecimiento es un fenómeno complejo que en términos generales se caracteriza por una disminución de la función biológica dependiente del tiempo (Lopez-Otin et al., 2013). A finales del siglo XX, ciertos experimentos que utilizaron organismos modelo de laboratorio establecieron que las alteraciones en la expresión o función de un solo gen son suficientes para retardar el envejecimiento y aumentar el tiempo de vida, incluso hasta 20 veces (Oliveira et al., 2003; Kenyon, 2005). Recientemente se demostró que determinados tipos de intervención en especies usadas en laboratorio, desde levaduras hasta ratones, son eficaces para establecer la existencia de mecanismos conservados de envejecimiento en una amplia gama de taxones (Partridge y Gems, 2002). El descubrimiento de que mutaciones de un solo gen pueden extender el tiempo de vida y mantener a los organismos sanos y jóvenes durante más tiempo y que sus efectos muestran conservación evolutiva, ha estimulado la investigación sobre los mecanismos del envejecimiento (Pletcher et al., 2007).

Actualmente sabemos que los procesos del envejecimiento, como muchos otros procesos biológicos, están sujetos a regulación por rutas clásicas de señalización y factores de transcripción. Muchas de estas rutas fueron descubiertas primero en organismos pequeños de vida corta, como levaduras, nematodos y moscas, y ahora se sabe que una considerable fracción de estas rutas regula también el tiempo de vida de mamíferos (Kenyon, 2010). Estos factores de longevidad están involucrados en rutas metabólicas (Kenyon et al., 1993; Tatar et al., 2001; Kaeberlein et al., 2005), de respuesta a estrés (Hsu et al., 2003; Morley y Morimoto, 2004; Tullet et al., 2008), de señalización inflamatoria (Zhang et al., 2013) y de regulación epigenética (Rogina et al., 2002), y se ha quedado claro que estos factores no actúan solos (Bouska et al., 2019).

Entre las intervenciones mejor entendidas para extender el tiempo de vida en organismos tan diversos se encuentra la reducción de la ruta de respuesta a nutrientes que incluye el blanco de rapamicina (TOR) y la serina proteína cinasa



(Sch9), cuya delección causa un aumento en el tiempo de vida, lo mismo que la delección de TOR1 (Kaeberlein et al., 2005; Fabrizio et al., 2001). El aumento en el tiempo de vida por la reducción de la ruta TOR depende del factor de transcripción Gis1 (Wei et al., 2009). Igualmente, la reducción en la actividad de la vía de señalización conservada de insulina/IGF de detección de nutrientes (IIS) resulta en la extensión del tiempo de vida (Piper et al., 2008); esta vía interactúa íntimamente con la ruta TOR (Johnson, 2008). Las mutantes de IIS en ratones, moscas y nematodos son resistentes a xenobióticos, y la regulación positiva de los factores de transcripción que regulan el metabolismo de los xenobióticos puede extender el tiempo de vida de estos organismos (Tullet et al., 2008; McElwee et al., 2007).

Otra ruta relacionada a la respuesta de nutrientes (glucosa) incluye tres proteínas: Ras, adenil ciclasa (AC) y la proteína cinasa (PKA) (Fabrizio et al., 2001). La activación de dos factores de transcripción (Msn2 y Msn4) que controlan los sistemas de protección celular, como proteínas de choque térmico, catalasa y genes inducibles de daño al DNA, son requeridos para mediar el efecto de una reducida señalización de Ras/AC/PKA en la extensión del tiempo de vida en levadura y en ratón (Medvedik et al., 2007; Fontana et al., 2010). Con el paso del tiempo se encuentran cada vez más rutas de envejecimiento conservadas en un mayor número de organismos, lo que apunta a que los mecanismos relevantes del envejecimiento en eucariontes multicelulares pueden estar conservados (Fontana et al., 2010).

### Las modificaciones en la cromatina tienen efecto sobre el envejecimiento

Un común denominador del envejecimiento es la acumulación de daño genético a lo largo de la vida (Lopez-Otin et al., 2013), el cual está asociado con un incremento en la incidencia de enfermedades crónicas que finalmente llevan a la muerte (Ucar y Benayoun, 2018). El proceso de envejecimiento puede estar afectado por factores genéticos, ambientales, epigenéticos y estocásticos (Wang et al., 2018). El envejecimiento está asociado también a elevados niveles de señalización de daño al DNA, lo que puede fomentar cambios locales en la estructura de la cromatina y modificaciones epigenéticas. La señalización de daño al DNA puede promover el

reclutamiento de enzimas modificadoras de la cromatina a sitios de reparación, sin embargo, también está acompañado por fracasos progresivos de las rutas de reparación del DNA (Ucar y Benayoun, 2018). Una evidencia experimental en aumento indica que los factores epigenéticos, incluyendo metilación al DNA, modificadores de histonas y expresión de microRNAs pueden jugar roles importantes en controlar la expresión de genes y la inestabilidad genómica durante el envejecimiento (Cao y Dang, 2017).

Una de las pruebas de la importancia de la cromatina en el envejecimiento ha venido de la manipulación genética de reguladores epigenéticos como histonas y DNA metiltransferasas, acetiltransferasas y modificadores de cromatina. Por ejemplo, la delección del gen que codifica la acetiltransferasa Sas2, la cual acetila la lisina 16 en la histona 4 (H4K16ac), retrasa el envejecimiento en el tiempo de vida replicativo de levadura (Dang et al., 2009). Además, la habilidad para mutar selectivamente residuos de histonas en levadura permite confirmar que Sas2 regula el envejecimiento vía H4K16, en lugar de otros blancos potenciales de su actividad acetiltransferasa. En *Caenorhabditis elegans*, la delección de genes que codifican alguno de los tres grupos de proteínas Trithorax que facilitan la trimetilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4) (WDR-5, SET-2 y ASH-2) resulta en un decremento global en los niveles de H3K4me3 e incrementa el tiempo de vida (Greer et al., 2010). Del mismo modo en moscas, la delección o *knockdown* de RNAs de interferencia (RNAi) de las demetilasas de histonas Lid resulta en un nivel incrementado de H3K4me3 y de un 15-24% de reducción en el tiempo de vida (Li et al., 2010; Song y Johnson, 2018).

Otro nivel de dinámica de la cromatina incluye el intercambio de las histonas canónicas con variantes de histonas. Un gran número de variantes de histonas pueden reemplazar las histonas canónicas en las fibras de cromatina teniendo distintos perfiles genómicos de incorporación y tienen impacto regulatorio y estructural (Ucar y Benayoun, 2018). Las variantes de histonas son isoformas de histonas canónicas que son generalmente expresadas durante el ciclo celular y pueden ser incorporadas dentro de la cromatina de manera independiente de la

replicación. La sustitución por histonas canónicas afecta la organización de la cromatina y, de esta manera, puede regular importantes procesos celulares.

La modulación experimental de complejos de proteínas que controlan el intercambio y la incorporación de histonas dentro de la cromatina pueden modular el tiempo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*. Un ejemplo es la chaperona de histonas ASF1, la cual promueve la deposición y estabilidad de la histona, y es requerida para el tiempo de vida replicativo normal, mientras que la delección del complejo HIR, el cual reprime la expresión de la histona, incrementa el tiempo de vida replicativo de levadura. Sin embargo, la sobreexpresión de las histonas H3 y H4, pero no de las histonas H2A y H2B, extienden el tiempo de vida replicativo de levadura (Feser et al., 2010). Un estudio de las familias de histonas H2A y H3 en cultivos humanos de fibroblastos mostró que la cantidad de las variantes de histonas y los niveles de biosíntesis cambia con el envejecimiento, con la regulación positiva de H2A.Z y H3.3, así como una regulación negativa de H2A.1 y H3.1 (Rogakou y Sekeri, 1999).

Consistentemente, la acumulación de H3.3 fue observada en el desarrollo y en el envejecimiento. Por ejemplo, la espectrometría de masas hecha en tejido somático de ratón a varias edades (3-24 meses) reveló una acumulación de H3.3, con un reemplazo casi total de la canónica H3.1/H3.2 por la variante H3.3 a la edad de 18 meses (Tvardovskiy et al., 2017). En la cromatina neural de ratón, H3.3 constituye solo una pequeña fracción del grupo de histonas H3 en estadios embrionarios, mientras que se acumuló hasta alcanzar cerca del 94% de H3.3 por la edad (2 años). Niveles similares de acumulación fueron encontrados en células de cerebro humano *postmortem*, comenzando con un 31% en cerebro fetal e incrementando gradualmente a un 93% durante la primera década de la vida (Maze et al., 2015; Song y Johnson, 2018).

La variante de histona H2A.J es una variante de la histona canónica H2A que ha sido relacionada con el envejecimiento. H2A.J difiere de la canónica en solo cinco aminoácidos y ha sido encontrada solo en mamíferos. Estudios recientes reportaron que H2A.J se acumula en fibroblastos humanos senescentes con

persistente daño en el DNA. También se ha encontrado acumulada en ratones dependiente de la edad. La sobreexpresión de H2A.J incrementa la expresión de genes de respuesta inflamatoria como IL1A, IL1B y varios genes inducibles de interferones que contribuyen a un fenotipo secretorio asociado a la senescencia (SASP), mientras que la *knockdown* de H2A.J inhibe la expresión de estos genes (Contrepois et al., 2017). Los factores SASP pueden afectar células circundantes a través de la alteración de microambientes celulares y promover la inflamación crónica y en algunos casos, enfermedades relacionadas a la edad y progresión del cáncer (Song y Johnson, 2018).

Un declive en los niveles globales de histonas podría contribuir a pérdidas de heterocromatina, lo cual podría llevar a la supresión de la represión de genes y por tanto a una expresión aberrante de genes. En *Drosophila*, los niveles reducidos de heterocromatina están correlacionados con tiempos de vida cortos (Larson et al., 2012). Una disminución en los niveles totales de histonas podría llevar a pérdidas preferenciales de regiones genómicas particulares y esto a un desequilibrio en la expresión de genes, el cual podría comprometer la habilidad de las células para actuar con funciones normales y responder al estrés (Song y Johnson, 2018). Si la pérdida de histonas en un loci particular contribuye al envejecimiento, es lógico que los modificadores de cromatina dependientes de ATP, los cuales reposicionan nucleosomas, podrían regular el envejecimiento.

De hecho, se han encontrado varias enzimas que reorganizan la cromatina asociadas a la edad como reguladoras del tiempo de vida. Hay al menos cinco familias de modificadores de cromatina que requieren ATP y están altamente conservadas: SWI/SNF, ISWI, CHD/NuRD, INO80, y SWR1 (Becker y Workman, 2013), y existen trabajos en los cuales se muestra la asociación de estos complejos con el envejecimiento. Un trabajo sobre la interrupción del complejo ISWI nos mostró que extiende el tiempo de vida replicativo de *S. cerevisiae* y observaron su conservación en la extensión de la longevidad en *C. elegans* (Dang et al., 2014). Otro acerca del complejo SWI/SNF que es requerido para promover la longevidad por la ruta Insulina-FOXO en *C. elegans* (Riedel et al., 2013). Dos más en donde observaron que la delección del complejo SWR1 (subunidades: Arp6, Swc3 y Swr1)

provoca un aumento en el tiempo de vida cronológico de *S. cerevisiae* (Garay et al., 2014; Campos et al., 2018).

Aún se sabe poco sobre la forma en que disminuyen los niveles de histonas y como estas disminuciones conducen al envejecimiento. Aunque se ha logrado una comprensión considerable acerca del papel de los modificadores de cromatina que requieren de ATP sobre el envejecimiento, la regulación de estos en el tiempo de vida aún es un campo poco explorado (Dang et al., 2014). Conocer el efecto en el tiempo de vida de las distintas subunidades de los complejos modificadores de cromatina podría ayudarnos a conocer el mecanismo por el cuál afectan el envejecimiento, al menos con información sobre los niveles tanto de las variantes de histonas como de las histonas canónicas. Otra cuestión abierta es encontrar las interacciones genéticas que median el papel de estas enzimas en la extensión del tiempo de vida. Además, saber si su efecto en el envejecimiento está conservado en distintos organismos, como es el caso del complejo ISWI.

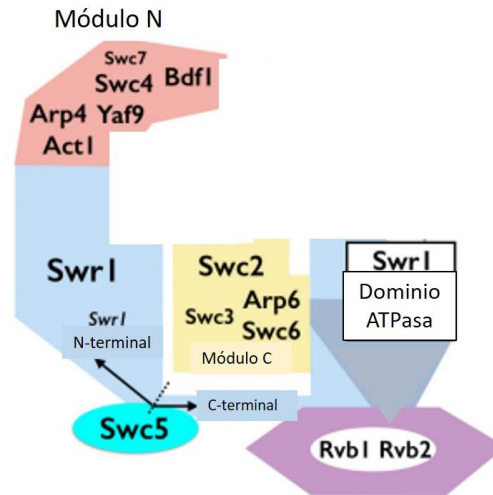
### El complejo SWR1 de levadura como modificador de cromatina tiene función conservada en distintos organismos

El complejo SWR1 media la incorporación de una variante de histona (H2A.Z) conservada a través de eucariontes. Específicamente cataliza el intercambio dependiente de ATP del dímero de histonas canónicas H2A/H2B por el dímero de las variantes de histonas H2A.Z/H2B (Luk et al., 2010; Kobor et al., 2004; Krogan et al., 2003). A diferencia de otros modificadores de cromatina, SWR1 no causa un intercambio neto en la posición de los octámeros de histonas *in vitro*; en lugar de eso, cataliza la reacción del intercambio de histonas con el reemplazamiento nucleosomal H2A-H2B con el dímero libre H2A.Z-H2B que es entregado al modificador por una de las chaperonas de histonas como Chz1, Nap1 o FACT (Mizuguchi et al., 2004; Luk et al., 2007; Ranjan et al., 2015).

El complejo SWR1 en levadura consta de 14 subunidades: Swr1, Vps72, Bdf1, Swc3, Arp6, Swc5, Yaf9, Vps71 y Swc7 que son subunidades codificadas por genes no esenciales para la viabilidad celular; y Rvb1, Rvb2, Arp4, Act1 y Swc4 que son codificadas por genes esenciales (Kobor et al., 2004; Krogan et al., 2003).

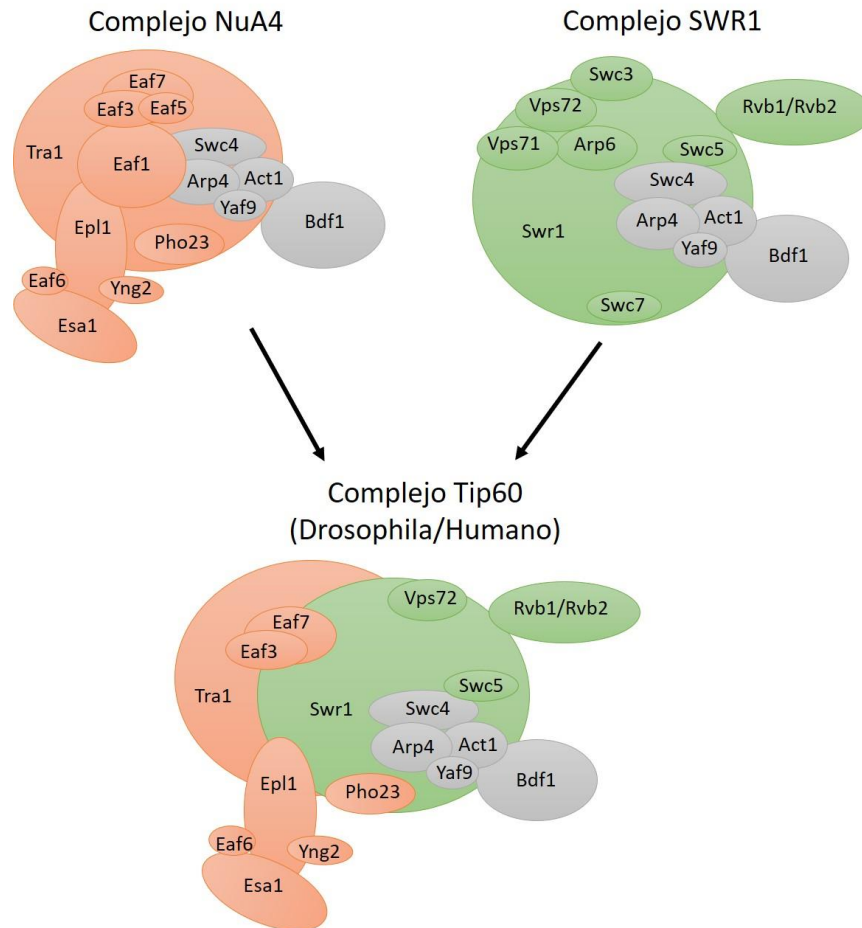
Algunas subunidades no son únicas del complejo SWR1 y tienen funciones independientes de SWR1. Por ejemplo, Rvb1, Rvb2, Act1 y Arp4 son subunidades compartidas con otro complejo modificador de cromatina dependiente de ATP, el complejo INO80 (Shen et al., 2000; Shen, 2004). Act1, Arp4, Swc4, Yaf9 Y Bdf1 son subunidades compartidas con el complejo acetiltransferasa NuA4 (Doyon y Coté, 2004; Wu et al., 2009).

El complejo SWR1 está compuesto por tres módulos que se ensamblan en la subunidad catalítica Swr1. La parte N-terminal de Swr1 interactúa con el módulo N compuesto de las subunidades Bdf1, Yaf9, Swc4, Swc7, Arp4 y Act1 (Wu et al., 2005). La pérdida de Bdf1 o Swc7 no afecta la asociación de ninguna subunidad con Swr1 y parece no perjudicar el intercambio de la histona, mientras que la pérdida de Arp4 lleva a la pérdida de Swc4, Act1, Bdf1 y Yaf9, resultando en pérdida de la actividad. Por su parte, la sola pérdida de Yaf9 también lleva a la pérdida de Bdf1, pero no afecta la actividad de intercambio de la histona (Lin et al., 2017). La parte C-terminal de Swr1 contiene el dominio ATPasa que está dividido por una larga inserción (característica de la familia 'split-ATPasa') que facilita la asociación del módulo C que consiste en las subunidades Swc3, Arp6, Vps72 (Swc2) y Vps71 (Swc6) (Wu et al., 2005; Flaus et al., 2006). SWR1 tiene además el módulo Rvb1/2, el cual es un anillo formado por Rvb1 y Rvb2 que interactúa con el módulo C, el módulo N y Swr1 (Figura 1) (Ewens et al., 2016). Vps72 requiere de Arp6 y Vps71 para establecer asociación con Swr1. Con la pérdida de Swc5, el complejo no pierde ninguna subunidad, pero se afecta la actividad de intercambio de la histona (Lin et al., 2017; Sun y Luk., 2017).



**Figura 1.- Arquitectura del complejo SWR1.** Subunidad catalítica en azul. Módulo N en rosa, conformado por cinco subunidades. Módulo C en amarillo, conformado por cuatro subunidades. Módulo Rvb1/2 en morado, conformado por 2 subunidades. Subunidad Swc5 en celeste. Modificado de Sun y Luk., 2017.

SWR1 está conservado evolutivamente y es esencial en metazoos. Diferentes estudios en eucariotas superiores identificaron a los complejos p400 y SRCAP como homólogos del complejo SWR1. La purificación de estos complejos mostró conservación funcional, ya que fueron capaces de catalizar la actividad de intercambio de H2A por H2A.Z, una actividad similar a la del complejo SWR1 de levadura (Ruhl et al., 2006; Gévry et al., 2007; Luk et al., 2010). En *D. melanogaster* el complejo Tip60 contiene a p400/dominio una subunidad homóloga a la subunidad Swr1 del complejo SWR1 de levadura (Eissenberg et al., 2005). Las Purificaciones bioquímicas del complejo p400 de humano permitieron demostrar que no está compuesto solamente de subunidades homólogas del complejo SWR1 en levadura, sino que también contiene subunidades del complejo NuA4; lo mismo resultó cierto para *D. melanogaster* (Kusch et al., 2004; Cai et al., 2005). Esto sugiere que el complejo de *Drosophila*/humano, conocido como el complejo p400/Tip60, representa una fusión física de los complejos de levadura SWR1 y NuA4 (Giaino et al., 2019; Billon y Coté, 2012).



**Figura 1.1.- Fusión física de los complejos NuA4 y SWR1, homólogos del complejo Tip60.** En el complejo Tip60 se muestra las subunidades compartidas entre los complejos SWR1 y NuA4 en gris, las subunidades del complejo NuA4 en naranja y las subunidades del complejo SWR1 en verde. Modificado de Billon and Coté, 2012.

A pesar de que el complejo SWR1 se ha encontrado en varios organismos, el mecanismo por el cual realiza el intercambio de las histonas aún no está muy claro (Willhoft et al., 2018). Un modelo para el intercambio de H2A por H2A.Z en células de levadura podría ser que las histonas canónicas H2A y H4 y, la variante de histona H2A.Z son acetiladas en la región N-terminal en promotores de genes por el complejo acetiltransferasa NuA4, lo cual estimula al complejo SWR1 para el intercambio de H2A.Z (Altaf et al., 2010). Luego SWR1 se enlaza al nucleosoma en un proceso conducido por la afinidad de la región de Vps72 a la región de DNA expuesta en una región libre de nucleosomas (NFR) (Ranjan et al., 2013). Por un lado, los dominios Vps72 y Swr1 se enlazan al dímero H2A.Z-H2B libre por medio



de las chaperonas de histonas (Hong et al., 2014) y por otro lado el motor de ATPasa Swr1 se enlaza al DNA en el nucleosoma a H2A aumentando la cinética de enrollamiento y/o desenrollamiento del DNA nucleosomal en una escala de tiempo de milisegundos (Singh et al., 2019). Como ambos sustratos de histonas están enlazados, se desencadena la activación de la ATPasa Swr1, un proceso que requiere de Swc5. La actividad de translocación del DNA nucleosomal por la ATPasa Swr1 en la cadena de DNA interrumpe la interacción DNA-histona de uno de los dos dímeros H2A-H2B, llevando a un desenrollamiento del DNA (golpe de energía de la reacción, Singh et al., 2019). Como el dímero H2A-H2B se disocia, el dominio no estructurado Swc5-A de Swc5 envuelve el dímero para ayudar en el proceso de intercambio, el dímero H2A.Z-H2B que está cercano en Vps72-Z o Swr1-Z es insertado a medida que H2A-H2B es removido (Luk et al., 2010). El complejo SWR1 permanece enganchado al nucleosoma heterotípico resultante AZ y cataliza un reemplazo más lento del dímero proximal H2A-H2B, para llevar a cabo la segunda vuelta de intercambio y finalmente tener un nucleosoma ZZ (Singh et al., 2019; Sun y Luk, 2017).

Se ha reportado que el complejo INO80 en levadura cataliza el intercambio de la reacción reversa reemplazando ahora la variante de histona H2A.Z por su histona canónica H2A (Papamichos et al., 2011; Wang et al., 2016; Watanabe y Peterson 2016; Brahma et al., 2017; Beckwith et al., 2018). Sin embargo, también se ha demostrado que la maquinaria de transcripción (RNA polimerasa II) tiene una mayor contribución en retirar la variante de histona H2A.Z (Tramantano et al., 2016).

### [Levadura como modelo para el estudio del envejecimiento](#)

La mayoría de los avances más recientes en la investigación del envejecimiento se han realizado en levaduras (Longo et al., 2012). La relativa facilidad y rapidez con la que se puede cuantificar la longevidad en levaduras ha permitido un progreso rápido, definiendo los mecanismos moleculares del envejecimiento en este organismo y la identificación de docenas de factores que modifican su longevidad. Estas identificaciones han sido esenciales en el descubrimiento de las principales

rutas estudiadas en el contexto del envejecimiento, como TOR Y Ras-CA-PKA (Longo et al., 2012). Aunque algunos aspectos del envejecimiento de levaduras son específicos de este organismo, la mayoría de las rutas y genes reguladores del tiempo de vida en levaduras están evolutivamente conservadas en nematodos, moscas y mamíferos (Longo et al., 2012; Kaeberlein, 2010).

Existen dos tipos de ensayos para estudiar el envejecimiento en levaduras, podemos medir el tiempo de vida replicativo y el tiempo de vida cronológico, ambos están fuertemente influenciados por la disponibilidad de nutrientes (Ashrafi et al., 1999). Midiendo el tiempo de vida replicativo contestamos a la pregunta de cuántas veces una célula puede dividirse (Mortimer y Johnston, 1959), este ensayo está asociado con el envejecimiento de las poblaciones de células madre o mitóticas de un organismo complejo (Smith et al., 2008). Estudiar el tiempo de vida replicativo de levaduras nos ha ayudado a identificar genes, rutas y mecanismos moleculares que modulan el tiempo de vida de células mitóticas y cuáles de estas se comparten con eucariotas multicelulares, incluyendo mamíferos (Longo et al., 2012).

Midiendo el tiempo de vida cronológico tenemos la capacidad de modular el envejecimiento en células que no se dividen, células post-mitóticas (Fabrizio y Longo, 2007) y compararlo con lo que sucede en organismos superiores. La mayoría de los genes regulados por el tiempo de vida cronológico de levadura muestran marcadas similitudes a las encontradas en nematodos, moscas y mamíferos (Longo et al., 2012). Dado que el envejecimiento cronológico culmina en una forma de muerte celular con características de apoptosis en mamíferos el sistema también ha sido fundamental para conocer los mecanismos de las vías apoptóticas y necróticas (Gutiérrez et al., 2011; Büttner et al., 2011). Los estudios del tiempo de vida cronológico fueron los primeros en revelar el rol de la espermidina en la longevidad (Eisenberg et al., 2009), el cual también extiende el tiempo de vida en moscas y nematodos. También fueron de los primeros en mostrar que la inhibición de TOR por rapamicina extiende el tiempo de vida del organismo, lo cual ya se ha demostrado en ratón (Harrison et al., 2009; Powers et al., 2006). En levaduras la fase donde no ocurre división celular es caracterizada por un incremento gradual de la tasa de mortalidad y puede tomar algunas semanas

dependiendo de la cepa (Fabrizio y Longo, 2003). El tiempo de vida cronológico está monitoreado ya sea durante una fase hipometabólica (fase estacionaria) o durante un estado metabólico alto (fase post-diáuxica, después del cual muchas células salen del ciclo celular) (Fabrizio et al., 2001).

Para monitorear el tiempo de vida cronológico de levadura, se crece en medio con glucosa, después de aproximadamente 10 horas de crecimiento exponencial, la concentración de glucosa en el medio alcanza niveles muy bajos y la levadura cambia de fermentación a un metabolismo respiratorio. Después de este cambio, llamado cambio diáuxico, las levaduras catabolizan el etanol acumulado durante la fase fermentativa y obtienen mucha de la energía de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Cuando las levaduras son incubadas en SC (medio sintético completo), el cambio diáuxico es seguido por una fase post-diáuxica, en donde el crecimiento continúa lentamente hasta aproximadamente 48h, y después se detiene. En la fase post-diáuxica la tasa metabólica permanece alta durante cinco a seis días, día cero de medición (dilución-supervivencia al 100%). La fase estacionaria comienza al final de la fase post-diáuxica entre los días dos y siete, dependiendo del medio utilizado y se caracteriza por menores tasas metabólicas y regulación positiva de rutas de resistencia a estrés. Se ha observado que una subpoblación mejor adaptada es capaz de crecer de nuevo utilizando los nutrientes liberados por las células muertas (Fabrizio y Longo, 2003). Este es el artefacto más común en la medición del tiempo de vida cronológico, que ocurre cuando una pequeña fracción de la población escapa del estado de quiescencia y vuelve a entrar al ciclo celular (Fabrizio et al., 2004). La alternativa para eliminar este artefacto es transferir el cultivo a agua (Longo et al., 2012).

Otra de las razones por las que muchos de los avances recientes en investigación del envejecimiento se pueden remontar a un organismo modelo simple como la levadura (Longo et al., 2012) es que la mayoría de las eucariotas tienen numerosas copias (10-400) de cada gen de las histonas canónicas, por lo que resulta muy difícil mutar todas ellas para probar fenotipos debido a la pérdida de histonas particulares. La levadura, sin embargo, tiene dos copias de cada gen del core de histonas y solamente una es necesaria para su supervivencia, por esto ha sido una

herramienta esencial en el estudio de las funciones de las modificaciones de las histonas (Cao y Dang, 2017). Aunado a que el grado de diversidad y complejidad asociado con esta clase de enzimas también incrementa significativamente, tal que las investigaciones en genética y longevidad en organismos más complejos son difíciles (Dang et al., 2014).

Cabe considerar que el fondo genético en el cual se evalúan los genes de extensión de vida puede estar modulando la forma en la que el gen o la falta del gen actúa, así como las historias de vida de cada cepa probada, pues la media de la supervivencia de las cepas silvestres depende de su fondo genético (Fabrizio y Longo, 2003; Longo et al., 2012). Los estudios de pérdida de función deberían realizarse y comprobarse en distintos fondos genéticos, para asegurarnos de que no es solo un artefacto de las mutaciones acumuladas en la cepa que siempre se mantuvo en el laboratorio. Los análisis del proceso de envejecimiento en *S. cerevisiae* se han realizado principalmente en un pequeño número de cepas adaptadas al laboratorio, pero se desconoce si los mecanismos identificados pueden explicar la variación en el tiempo de vida también en cepas naturales. Cada aislado ocupa diversos nichos ecológicos y enfrenta diversas presiones evolutivas, por lo que su variación natural podría estar codificada en su genoma (Kaya et al., 2015; Barre et al., 2019).

### *Drosophila* como modelo para el estudio del envejecimiento

Un enfoque que se ha usado para diferenciar los mecanismos conservados del envejecimiento de los mecanismos específicos del envejecimiento de las levaduras ha sido utilizar especies de invertebrados como sistemas modelo intermediarios (Kaeberlein, 2010). En este sentido, podemos hacer uso de *Drosophila*, que ha sido usado como organismo modelo para investigaciones de envejecimiento por más de 100 años. Probablemente los primeros estudios cuantitativos del tiempo de vida de *Drosophila* bajo condiciones de laboratorio fueron reportadas por Roscoe Hyde en 1913 (Hyde, 1913; revisado en Piper y Partridge, 2018). Sabemos que algunos de los aspectos de las bases genéticas del envejecimiento están evolutivamente conservados, lo cual hace que los invertebrados de vida corta, como *Drosophila*,

sean una herramienta poderosa para examinar los mecanismos moleculares del envejecimiento (Helfand y Rogina, 2003a).

En *Drosophila*, el envejecimiento lo podemos estudiar a un nivel más detallado de declive fisiológico, ya que se pueden observar numerosas marcas de pérdida de función relacionadas a la edad, las cuales incluyen, cambios en el metabolismo, conducta, resistencia reducida a estrés, capacidad reproductiva reducida, función neuronal alterada, actividad física modificada, capacidad inmune reducida, displasia progresiva y función de barrera reducida en el intestino (Iliadi et al., 2012). Las moscas adultas consisten casi en su totalidad en células post-mitóticas totalmente diferenciadas, excepto por las células en las gónadas y algunas en el intestino (Bozcuk, 1972; Ito y Hotta, 1991). Los tejidos de mosca son equivalentes a muchos de los encontrados en mamíferos y una gran proporción de los genes asociados con enfermedades relacionadas al envejecimiento en humanos se expresan en los tejidos equivalentes de mosca (Piper y Partridge, 2018; Helfand y Rogina, 2003b). Además, los distintos tejidos de *Drosophila* pueden ser disectados y manipulados genéticamente y existe una gran colección de herramientas genéticas, disponibilidad de stocks genéticamente alterados y el genoma está secuenciado (Helfand y Rogina, 2003a).

Las investigaciones de envejecimiento en *Drosophila* se han llevado a cabo en diferentes cepas genéticas (Ziehm et al., 2013) y los enfoques genéticos usualmente requieren de fondos genéticos uniformes, lo cual hace que se deban de tomar en cuenta la endogamia y la acumulación de mutaciones perjudiciales. Una consecuencia potencial de la creación y mantenimiento de homogeneidad genética en poblaciones consanguíneas es que un stock particular de moscas puede acumular mutaciones deletéreas, llevando al stock a un tiempo de vida acortado de manera artificial. Hay diferentes maneras de evitar esta posibilidad, tales como probar la intervención genética de interés en otro fondo genético, incluyendo otras poblaciones consanguíneas separadas por décadas, así como stocks exogámicos (Clancy et al., 2001; Tatar et al., 2001).

Una fortaleza particular de las moscas es la capacidad de caracterizar cómo los genes que tienen un papel demostrado en la modulación del tiempo de vida del organismo influyen específicamente en la función de las células y los tejidos, cómo interactúan y cómo podrían estar vinculadas sus funciones específicas del tejido (Demontis y Perrimon, 2010; He y Jasper, 2014). Las rutas de percepción de nutrientes que están relacionadas con el envejecimiento, como la reducción de IIS o TOR, se encontraron conservadas en *Drosophila*, además, el estudio en este organismo permitió conocer que también producen una mejora notable en la salud de las moscas a una edad media y avanzada (Tatar et al., 2001; Hwangbo et al., 2004).

Las moscas y los humanos frecuentemente muestran un fenotipo fisiológico similar relacionado a la edad donde al menos algunas de las propiedades biológicas básicas y mecanismos que regulan la longevidad están conservados entre especies (Iliadi et al., 2012). Existe un gran número de reportes en los que se utiliza a *Drosophila melanogaster* para probar enfoques de alteraciones de genes relacionados con la hipótesis de estrés oxidativo, el papel de los mecanismos de reparación de proteínas, el papel de las chaperonas y proteínas de choque térmico y la contribución de la estructura de la cromatina. Algunas de las deacetilasas de histonas, incluyendo RPD3 y SIR2, están involucradas en la determinación del tiempo de vida de *S. cerevisiae*, *C. elegans* y *D. melanogaster* (Guarente, 2000; Kim et al., 1999; Tissenbaum y Guarente, 2001; Rogina et al., 2002).

## Objetivos

### Objetivo General

Describir el efecto del complejo SWR1 en el envejecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* mediante deleciones de genes e interacciones genéticas, y determinar su conservación como factor de envejecimiento a nivel intraespecie en levadura y en otros organismos como *Drosophila melanogaster*.

## Objetivos Particulares

1. Caracterizar el efecto en la longevidad cronológica del complejo SWR1 y el equivalente de Tip60 mediante mutantes *knock-out* en *S. cerevisiae*.
2. Describir las interacciones genéticas del gen *SWR1* con otros factores de envejecimiento y las interacciones entre los complejos en *S. cerevisiae*.
3. Evaluar la conservación de la relación SWR1-envejecimiento a nivel intraespecie en *S. cerevisiae*.
4. Estandarizar un método para medir el efecto de Tip60 en el envejecimiento de *D. melanogaster*.

## Materiales y métodos

### Cepas de levadura

Nombre	Genotipo
YEG-01-RFP	<i>MAT<math>\alpha</math> PDC1-mcherry-CaURA3MX4 can1<math>\Delta</math>::STE2pr-SpHIS5 lyp1<math>\Delta</math> his3<math>\Delta</math>1 ura3<math>\Delta</math>0 LEU2</i>
S288c	<i>Mat <math>\alpha</math> ura3::KanMX4</i>
YJM981	<i>Mat <math>\alpha</math> ho::HygMX ura3::KanMX4</i>
L-1374	<i>Mat <math>\alpha</math> ho::HygMX ura3::KanMX4</i>
Y12	<i>Mat <math>\alpha</math> ho::HygMX ura3::KanMX4</i>
Y55	<i>Mat <math>\alpha</math> ho::HygMX ura3::KanMX4</i>
YJM978	<i>Mat <math>\alpha</math> ho::HygMX ura3::KanMX4</i>
BY4741	<i>Mat <math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 ura3<math>\Delta</math>0 leu<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 <math>\Delta</math>xxx::KanMX4</i>
YEG-01-CFP	<i>Mat <math>\alpha</math> PDC1-CFP-CaURA3MX4 can1<math>\Delta</math>::STE2pr-SpHIS5 lyp1<math>\Delta</math> his3<math>\Delta</math>1 ura3<math>\Delta</math>0 his<math>\Delta</math>::NatMX6</i>

### Medios de cultivo para levadura

Todos los medios de cultivo para levadura se hicieron siguiendo las recetas de CSHL Protocols. La preparación de 1 L de medio YPAD se llevó a cabo con 20 g de peptona, 10 g de extracto de levadura, 20 g de glucosa, 40 mg de sulfato de adenina y 20 g de agar.

Para el medio de esporulación usamos 20 g de agar, 10 g de acetato de potasio, 1 g de extracto de levadura, 0.5 g de glucosa y 0.1 g de suplemento de aminoácidos (que contiene histidina, leucina, lisina y metionina) para 1 L.

Se preparó medio sintético completo (SC) con 20 g de glucosa, 20 g de agar, 1 g de glutamato monosódico, 1.7 g de YNB (base nitrogenada para levadura) sin aminoácidos y sin sulfato de amonio para 1 L cuando se le adicionaba geneticina o clonNat (nourseothricin) al medio, mientras que el medio sin antibióticos se preparó usando 6.7 g de YNB sin aminoácidos, y suplemento de aminoácidos que se adicionaba según la cantidad que cumpliera con los requerimientos de aminoácidos necesarios en cada selección.

Para 1 L de medio YNB-If (levadura base nitrógeno de baja fluorescencia) se usaron 50 mL de sales para YNB al 20X (0.1 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g NaCl, 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 1 mL de elementos traza 1000x (50 mg  $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 4 mg  $\text{CuSO}_4$ , 10 mg KI, 20 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 20 mg  $\text{FeCl}_3$ , 40 mg  $\text{MnSO}_4$ , 40 mg  $\text{ZnSO}_4$ ), 1 mL de vitaminas 1000x (40 mg biotina, 40 mg vitamina B5, 200 mg inositol, 40 mg de niacina, 20 mg de ácido paraaminobenzoico, 40 mg de piridoxina hidrocloreuro, 40 mg de tiamina hidrocloreuro) más 48 mL de agua, a esto se le adicionaron 0.79 g CSM (suplemento de aminoácidos) y 20 g de glucosa.

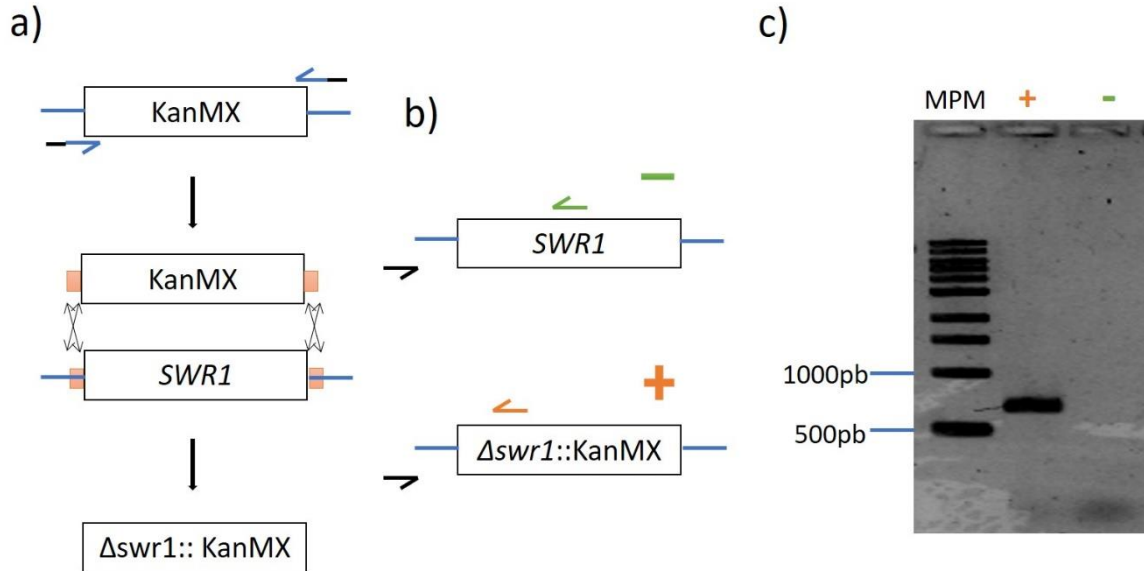
#### Generación de mutantes *knock-out* sencillas

Todas las mutantes de levadura se generaron siguiendo el protocolo de transformación con LiAc/SS carrier DNA/PEG (Gietz et al., 2014). Para la obtención de cinco transformantes de las mutantes *knock-out* sencillas *swr1Δ*, *arp6Δ*, *swc5Δ*, *swc7Δ*, *vps71Δ*, *vps72Δ*, *bdf1Δ*, *bdf2Δ*, *yaf9Δ*, *pho23Δ*, *eaf3Δ*, *eaf7Δ*, *eaf6Δ*, *htz1Δ* y *his3Δ* se usó como parental la cepa YEG-01-RFP. Las knock-outs fueron hechas por remplazo directo con el gen de interés (Lista de Primers-Apéndice A) con el módulo NatMX6 que confiere resistencia a clonNat, dicho módulo se amplificó del plásmido pAG25 por PCR (Figura 1a).

Esta misma cepa parental (YEG-01-RFP) se usó para generar tres transformantes de mutantes sencillas de *swr1Δ*, *arp6Δ*, *swc5Δ*, *swc7Δ*, *vps71Δ*, *vps72Δ*, *bdf1Δ*, *bdf2Δ*, *yaf9Δ*, *pho23Δ*, *eaf3Δ*, *eaf7Δ*, *eaf6Δ* y *his3Δ* por remplazo directo con el gen de interés con el módulo KanMX4 que confiere resistencia a G418 (geneticina), dicho módulo se amplificó del plásmido pFA6 por PCR.



Todas las *knock-outs* sencillas generadas se comprobaron con PCR por ausencia de un segmento del gen blanco y por amplificación del módulo de resistencia en el locus usado en cada caso (Figura 1b, c).



**Figura 2.- Delección de gen blanco e inserción de módulo de resistencia.** a) Representa la amplificación del módulo de resistencia, las flechas son los primers que se usaron para la amplificación, la parte negra es la secuencia del gen de interés, la parte azul es la secuencia del módulo de resistencia. Una vez que se obtuvo la amplificación del módulo junto con la secuencia del gen de interés (cuadro naranja), se realizó el intercambio del gen blanco por reemplazo directo con el producto obtenido de la PCR. b) Se realizaron dos comprobaciones por PCR, una negativa (verde) para comprobar la delección del gen blanco, usando un primer (flecha negra) que amplifica río arriba del gen blanco con otro (flecha verde) que amplifica dentro del gen blanco, otra positiva (naranja) usando un primer que amplifica río arriba del gen blanco y otro (flecha naranja) que amplifica dentro del módulo de resistencia. c) Gel de agarosa usado para comprobación de amplificación por PCR, se observan: un marcador de peso molecular de 1Kb (primer carril), la comprobación positiva (segundo carril), la comprobación negativa (tercer carril).

Se generaron cepas *swr1*Δ por cuadruplicado en los fondos genéticos YJM981, L-1374, Y12, Y55, YJM978 y S288c. Las cepas que se tomaron de la colección “*National Culture Yeast Collection*” del programa “*Saccharomyces Genome Resequencing Project*”. Su generación fue por recombinación con el

producto de amplificación por PCR de *swr1Δ::NatMX6* ~170pb río arriba y río abajo, el cual se amplificó de la cepa BY4741 (*swr1Δ::KanMX4*) con previo intercambio del módulo KanMX4 por CaURA3MX4.

Para generar las referencias de las cepas haploides YJM981, L-1374, Y12, Y55 y YJM978 se cambió el módulo de HygMX por CaURA3MX4, quedando ahora con genotipo *Mat α ho::CaURA3MX4 ura3::KanMX4*, por cuadruplicado.

#### Generación de mutantes dobles

Para obtener las mutantes dobles, se llevó a cabo un SGA (Synthetic Genetic Array, Boone et al., 2010) entre las mutantes *knock-out* sencillas *Mat α* YEG-01-RFP *hoΔ* (locus neutral) y YEG-01-RFP *swr1Δ* con 307 mutantes *knock-out* sencillas (Lista de genes-Apéndice B) *Mat a* BY4741 quedando 307 dobles mutantes con genotipo *Mat a PDC1-mcherry-CaURA3MX4 can1Δ::STE2pr-SpHIS5 lyp1Δ his3Δ1 ura3Δ0 LEU2 xxxΔ::NatMX6 xxxΔ::KanMX4*. Posteriormente, se realizó un segundo SGA entre 16 mutantes sencillas *MATα* y 39 mutantes sencillas *Mat a* por cuadruplicado. Las 15 *MATα* fueron:

- |                  |                  |                   |
|------------------|------------------|-------------------|
| 1. <i>swr1Δ</i>  | 6. <i>bdf2Δ</i>  | 11. <i>pho23Δ</i> |
| 2. <i>arp6Δ</i>  | 7. <i>swc5Δ</i>  | 12. <i>eaf7Δ</i>  |
| 3. <i>vps71Δ</i> | 8. <i>swc7Δ</i>  | 13. <i>eaf6Δ</i>  |
| 4. <i>bdf1Δ</i>  | 9. <i>yaf9Δ</i>  | 14. <i>htz1Δ</i>  |
| 5. <i>vps72Δ</i> | 10. <i>eaf3Δ</i> | 15. <i>his3Δ</i>  |

con genotipo *PDC1-mcherry-CaURA3MX4 can1Δ::STE2pr-SpHIS5 lyp1Δ his3Δ1 ura3Δ0 LEU2 xxxΔ::NatMX6*, y una cepa *MATα PDC1-CFP-CaURA3MX4 can1Δ::STE2pr-SpHIS5 lyp1Δ his3Δ1 ura3Δ0 his3Δ::NatMX6* como inserción neutral de referencia, las *Mat a* fueron:

- |                 |                  |                   |
|-----------------|------------------|-------------------|
| 1. <i>swr1Δ</i> | 5. <i>vps71Δ</i> | 9. <i>yaf9Δ</i>   |
| 2. <i>arp6Δ</i> | 6. <i>vps72Δ</i> | 10. <i>pho23Δ</i> |
| 3. <i>swc5Δ</i> | 7. <i>bdf1Δ</i>  | 11. <i>eaf3Δ</i>  |
| 4. <i>swc7Δ</i> | 8. <i>bdf2Δ</i>  | 12. <i>eaf7Δ</i>  |

13. <i>eaf6</i> Δ	23. <i>oxr1</i> Δ	33. <i>hap3</i> Δ
14. <i>htz1</i> Δ	24. <i>bre2</i> Δ	34. <i>yak1</i> Δ
15. <i>swc3</i> Δ	25. <i>pmt2</i> Δ	35. <i>ufd4</i> Δ
16. <i>izh4</i> Δ	26. <i>pdp3</i> Δ	36. <i>fkh2</i> Δ
17. <i>glc3</i> Δ	27. <i>kdx1</i> Δ	37. <i>ynr064c</i> Δ
18. <i>pda1</i> Δ	28. <i>sip18</i> Δ	38. <i>snf6</i> Δ
19. <i>rgt1</i> Δ	29. <i>mrx2</i> Δ	39. <i>smf3</i> Δ
20. <i>ptc6</i> Δ	30. <i>cla4</i> Δ	40. <i>swc3</i> Δ
21. <i>tpk1</i> Δ	31. <i>skp2</i> Δ	
22. <i>vta1</i> Δ	32. <i>hda2</i> Δ	

con genotipo *his3*Δ1 *ura3*Δ0 *leu*Δ0 *met15*Δ0 Δxxx::KanMX4, en el que obtuvimos ~2000 dobles mutantes con genotipo Mat a *PDC1-mcherry-CaURA3MX4 can1*Δ::STE2pr-SpHIS5 *lyp1*Δ *his3*Δ1 *ura3*Δ0 LEU2 xxxΔ::NatMX6 xxxΔ::KanMX4 y *PDC1-CFP-CaURA3MX4 can1*Δ::STE2pr-SpHIS5 *lyp1*Δ *his3*Δ1 *ura3*Δ0 *his*Δ::NatMX6 xxxΔ::KanMX4.

Medición de tiempo de vida cronológico por cinética de crecimiento

El siguiente protocolo se realizó basándonos en el descrito por Murakami *et al.*, 2009.

**Pre-inóculos.** En placas Elisa con 150 μl de medio SC líquido se inoculó la cepa de interés, la cual se dejó hasta saturación (48 horas) a 30°C. Luego, se replicó con pinner a placas de pozo profundo con 700 μl de SC líquido y se dejó hasta saturación (72 horas) a 30°C con ~70% de humedad relativa. Todos los pasos anteriores se realizaron en placas de 96 pozos.

**Mantenimiento de experimento de longevidad.** En una estación robótica (Tecan Freedom EVO200), pasadas las 72 horas del cultivo en las placas de pozo profundo (cultivo en envejecimiento), durante los primeros cinco días se inocularon 15 μl del cultivo en envejecimiento, con previa agitación, a placas Elisa con 150 μl de YNB-If. Pasados los cinco días, las inoculaciones se realizaron cada tercer día durante ~24 días.

**Medición de OD.** EL cultivo se midió en placas Elisa en el lector Tecan Infinite M1000 integrado a la estación robótica, las lecturas se realizaron a una densidad óptica (OD) de 600nm cada hora hasta que el cultivo llegara a saturación.

**Análisis de datos.** Todos los datos obtenidos se procesaron en MATLAB. Los valores de OD se normalizaron restando la primera lectura de OD a todas las subsecuentes. Se obtuvieron las cinéticas de crecimiento de cada cultivo, a partir de ellas el tiempo de duplicación ( $\delta$ ) a mitad de la fase exponencial (inicial OD<sub>600</sub>=0.2, final OD<sub>600</sub>=0.5) y la tasa de cambio ( $\Delta T$ ) (OD<sub>600</sub>=0.3) cada día de medición. A partir de los datos anteriores se calculó la viabilidad celular relativa ( $V$ ) con la fórmula:

$$V = \frac{1}{2^{\frac{\Delta T}{\delta}}}$$

de cada mutante y sus réplicas se graficó su supervivencia relativa en porcentaje junto con su error estándar.

Los datos de supervivencia relativa se ajustaron a un modelo de decaimiento exponencial para calcular su tasa de muerte ( $r$ ), donde se tomó en cuenta el porcentaje de viabilidad ( $N_0$ ) en el tiempo inicial y el tiempo ( $T$ ) en días, la fórmula fue:

$$N(T) = N_0 e^{-rT}$$

La tasa de muerte (o tasa de supervivencia relativa, con cambio de signo) que se obtuvo de cada mutante se comparó con la tasa de muerte de las referencias. Los datos significativos se tomaron con un p-value<0.05 en una prueba Welch o  $t$ -de varianzas desiguales.

Medición de tiempo de vida cronológico por competencia de cocultivos

EL siguiente protocolo se realizó siguiendo lo reportado por Garay *et al.*, 2014.

**Preinóculos.** Las cepas mcherry (RFP) (mutante) y CFP (WT) se inocularon en placas Elisa con 150  $\mu$ l de medio SC líquido y se dejaron hasta saturación

(48 horas) a 30°C. Se mezclaron los cultivos en proporción 2 a 1 (mutante:WT) nuevamente en placas Elisa, dos veces la mutante para incrementar su rango dinámico. Los cocultivos se replicaron con un pinner a placas de pozo profundo con 700 µl de medio SC líquido y se dejaron hasta saturación (72 horas) a 30°C con ~70% de humedad relativa. Todos los cultivos se realizaron en placas de 96 pozos.

**Mantenimiento de experimento de longevidad.** En una estación robótica, pasadas las 72 horas del cultivo en las placas de pozo profundo (cultivo en envejecimiento), se inocularon 15 µl del cultivo en envejecimiento, con previa agitación, a placas Elisa de 96 pozos con 150 µl de YNB-If. Pasados los cinco días, las inoculaciones se realizaron cada tercer día durante ~19 días.

**Medición de fluorescencia y OD.** Los cultivos se midieron en el lector Tecan Infinite M1000 tomando lecturas cada 85 minutos de OD<sub>600</sub> y fluorescencias roja (RFP-Mcherry) y azul (CFP-Cerulean) hasta que el cultivo llegara a saturación (OD=0.7).

**Análisis de datos.** Todos los datos obtenidos se procesaron en MATLAB. A los pozos con señales de fluorescencia obtenidas de cocultivos se les restó el valor de la señal de fluorescencia obtenida de pozos con cultivos solos de CFP y de RFP, para quitar así la señal de fluorescencia de fondo. Cada día de medición por cocultivo se realizó una interpolación a un punto fijo en el tiempo (8 horas) cuando éstos se encontraban en fase exponencial (9 horas para interacciones genéticas), obteniendo así un punto de medición para cada día. Los datos anteriores se ajustaron a un modelo lineal y a partir de su pendiente obtuvimos un coeficiente relativo de supervivencia ( $s$ ) y su error estándar dependiendo del número de réplicas.

Para las *knock-out* sencillas (14 genes), el  $s$  que se obtuvo de cada mutante se comparó con el  $s$  de la WT. Los datos significativos se tomaron con un  $p\text{-value}<0.05$  en una prueba Welch o  $t$ -de varianzas desiguales. Para los datos de interacciones genéticas se comparó el  $s$  de la  $x\Delta::\text{KanR } ho\Delta::\text{NatR}$  (esperada) con el  $s$  de la  $x\Delta::\text{KanR } swr1\Delta::\text{NatR}$  (observada). Se

usó un corte arbitrario para considerar el 15% de los datos con fenotipos más extremos.

Cepas de *D. melanogaster*

**Tabla 1.1.-** Relación y descripción de cepas usadas de *Drosophila*.

BDSC <sup>a</sup> ID	Homólogo	Genotipo	Descripción
10767	<i>Swr1</i>	$y^1w^{67c23}; P(lacW)dom^{k08108}/CyO$	letal recesivo, transposón insertado en el primer exón de <i>dom</i> , tiempo extendido de desarrollo de la larva, letalidad en estadio de pupa temprano
9260	<i>Swr1</i>	$y^1w^*; dom^3/SM6a$	derivado de <i>dom</i> <sup>k08108</sup> , letal recesivo, tiempo extendido de desarrollo de la larva, letalidad en estadio de pupa temprano, fenotipo menos severo que <i>dom</i> <sup>k08108</sup>
9261	<i>Swr1</i>	$y^1w^*; dom^9/CyO, y^+$	derivado de <i>dom</i> <sup>k08108</sup> , semi-letal, hipomórfico, letalidad en cualquier etapa de estadio de pupa, supervivencia de algunos adultos
19244	<i>Eaf6</i>	$w^{1118}; P(XP)Eaf6^{d06605}/TM6B, Tb^1$	no caracterizado
62059	<i>Sw5</i>	$y^1w^{67c23}; P(SUPor-P)Yet^{kv00363}/SM6a$	no caracterizado
29503	<i>YL-1</i>	$w^*; P(lacW)YL-1^{SH1685}P(neoFRT)40A, I(2)SH1685^{SH1685}/CyO$	no caracterizado
27901		$w^{1118}; P(lacW)Indy^{206}$	dominante, transposón insertado en el primer intrón de <i>Indy</i> , tiempo de vida extendido
1495		$y^1w^1$	usado para retrocruzadas
---		$w^{1118}$	usado para retrocruzadas
---		<i>Sp/CyO</i>	usado para retrocruzadas
---		Oregon-R	cepa silvestre ( <i>wt</i> )

**a) Bloomington *Drosophila* Stock Center.**

Medios para cultivos de moscas adultas

Las moscas adultas se cultivaron en medios a base de levadura-azúcar (SY) y medio de plátano. Para preparar 1 L de SY al 10% se usaron 20 g de agar, 100 g de sacarosa, 100 g de levadura fresca, 3 mL de ácido propiónico, tetraciclina 15 mg/L y ampicilina 50 mg/L (Food recipes, Protocols, Pletcher-lab).

El medio de plátano se preparó con 10 g de agar, 48 mL de jarabe de maíz, 46 g de levadura fresca, 48 mL de malta, 6 mL de ácido propiónico y una pieza de plátano (modificado de Markow-recipes, Biodiversification Genomics).

Homogeneización de fondo genético

Las siete cepas mutantes (Tabla 1.1), que fueron adquiridas en el *Bloomington Drosophila Stock Center* (BDSC) de la Universidad de Indiana en Estados Unidos, se retrocruzaron para homogeneizar su fondo genético (detalles de cruza-Apéndice C, Figuras 8.1-8.7). Los stocks 10767 (*dom*<sup>k08108</sup>), 62059 (*Yet*<sup>kv00363</sup>), 29503 (*YL-1*<sup>sh1685</sup>), 27901 (*Indy*<sup>206</sup>) y 19244 (*Eaf6*<sup>d06605</sup>) y la cepa

silvestre Oregon-R se retrocruzaron seis veces con los stocks 1495 ( $y^1w^1$ ) y  $w^{1118}$ . El stock  $w^{1118}$  lo proporcionó el Dr. Fanis Missirlis (Drosophila Metal Biology Lab, Cinvestav-Zacatenco), resultando los siguientes fenotipos finales:

1.  $y^1w^{67c23};P\{lacW\}dom^{k08108}/+$
2.  $y^1w^{67c23};P\{SUPor-P\}Yeti^{KV00363}/+$
3.  $w^*;P\{lacW\}YL-1^{SH1685}P\{neoFRT\}40A,I(2)SH1685^{SH1685}/+$
4.  $w^{1118};P\{lacW\}Indy^{206}/+$
5.  $w^{1118};P\{XP\}Eaf6^{d06605}/+$
6. Oregon-R

Los stocks 9260 ( $dom^3$ ), 9261 ( $dom^9$ ) y Oregon-R se retrocruzaron seis veces con el stock  $Sp/CyO$ , resultando los siguientes fenotipos:

1.  $y^1w^*;dom^3/+$
2.  $y^1w^*;dom^9/+$
3. Oregon-R

Estandarización de método para medir longevidad en *Drosophila*

Los experimentos de longevidad en *Drosophila* se realizaron basándonos en el protocolo de Linford *et al.*, 2013.

**Medios para colectar embriones.** Los embriones se colectaron en cajas Petri con medio Uva-Agar preparado con sobres Grape Agar (Genesee Scientific), obteniendo por cada sobre 500 mL. Una pasta elaborada con levadura y agua (1.5 cm) se le adicionó al centro de la caja Petri, para complementar el alimento de los adultos (Grape Agar Powder Premix, 2011).

**Sincronización de embriones.** Por cada línea mutante, se colocaron 200-300 adultos en trampas para recolección de embriones tapadas con cajas Petri con medio Uva-Agar y levadura, y se dejaron toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se descartó la caja Petri e inmediatamente se colocó una nueva con medio Uva-Agar que se dejó por 16-22 horas a temperatura ambiente. Durante este tiempo las hembras depositaron los embriones que se recolectaron con ayuda de un cotonete y PBS 1X en un tubo Falcon de 25 mL.

Los embriones recolectados se lavaron con el mismo PBS 1X hasta que el líquido fuera transparente, dejando de 2-3 mL de líquido. Se dispensaron 50 µl de embriones con una micropipeta de 50 µl - 200 µl y punta cortada de la parte inferior, en botellas de fondo cuadrado de 6 oz con 50 mL de medio de plátano (tres botellas por línea mutante). La recolección de embriones se realizó dos veces con cada línea mutante. Las botellas con embriones fueron incubadas durante nueve días a 25°C, tiempo suficiente para que emergieran los adultos.

**Recolección sincronizada de moscas adultas.** Una vez que los adultos emergieron, se descartaron y las botellas se incubaron toda la noche a 25°C. Al siguiente día, se colectaron los adultos en una botella de fondo cuadrado de 6 oz con 7 mL de medio SY 10 % y se dejaron copulando durante dos días. Después de este tiempo, se separaron hembras de machos por grupos de 30 individuos y se colocaron en viales de 25 mm con SY 10 % esperando obtener idealmente ocho viales por sexo por línea mutante.

**Experimento de longevidad en moscas.** Usando el programa DLife (Linford *et al.*, 2013) se asignaron números para etiquetar de manera aleatoria cada uno de los viales con adultos. Todos los viales se mantuvieron en incubadora a 25°C, con periodos de luz-oscuridad de 12:12 horas y con humedad entre 50-70%.

Durante el primer mes los adultos se cambiaron a nuevos viales con medio fresco cada dos días, pues durante este periodo las hembras seguían depositando huevos en los viales. El tiempo restante del experimento, hasta que todos los individuos murieron, se pasaron a un nuevo vial cada cuatro días. Cada vez que los individuos se pasaron a un nuevo vial se registró la cantidad de muertos tanto en el vial viejo como en el vial nuevo.

**Análisis de datos.** Se obtuvo el porcentaje de supervivencia en MATLAB usando un enfoque Kaplan-Meier, con la siguiente fórmula:

$$S_x = \frac{N_x}{N_0}$$



en donde la supervivencia a una edad específica  $x$  ( $S_x$ ) es determinada por el número de individuos vivos al comienzo del muestreo a la edad  $x$  ( $N_x$ ) entre el número total de moscas en el experimento ( $N_0$ ). Los valores obtenidos se graficaron en porcentaje de supervivencia, las gráficas se realizaron con datos de las réplicas para cada línea mutante, incluyendo el error estándar.

La prueba de *Log-Rank* (*p-value*) fue usada para determinar la significancia de las diferencias entre las curvas de supervivencia de las líneas mutantes con respecto a la referencia.

## Resultados

### Tiempo de vida cronológica del complejo SWR1 y los homólogos de Tip60 en *S. cerevisiae*.

Para evaluar el efecto en el tiempo de vida cronológico de la delección de genes del complejo SWR1 y los homólogos del complejo Tip60, se generaron 14 mutantes knock-out sencillas. Cada una se caracterizó por dos métodos: cinética de crecimiento y competencia de cocultivos, ambos en medio SC. Las mediciones fueron con al menos cinco réplicas biológicas y cuatro réplicas técnicas. En el método de cinética de crecimiento se calculó la tasa de supervivencia relativa a partir de un decaimiento exponencial en el porcentaje de supervivencia (Figura 3.1). Esta caracterización se realizó por duplicado (Resultados Cinética de crecimiento 2 - Apéndice D, Figuras 9.1 y 9.2). Se midió el porcentaje de células viables durante 24 días (Figura 3.3). En la competencia de cocultivos el coeficiente relativo de supervivencia 's' se tomó a partir de la pendiente producto del ajuste a un modelo lineal, la pendiente puede ser negativa (mutantes de vida corta) o puede ser positiva (mutantes de vida larga) (Figura 3.2). Se midió el porcentaje de células viables durante 12 días (Figura 3.4).

Los valores de cada mutante se compararon con la cepa silvestre correspondiente para conocer aquellas que afectan significativamente el tiempo de vida cronológico (Tabla 2.1). Se observó una tendencia a aumentar

el tiempo de vida cronológico en aquellas mutantes *knock-out* de genes que pertenecen únicamente al complejo SWR1 tanto por cinética de crecimiento (Figura 3.5 a,  $p\text{-value}<0.05$ ), consistente en los dos ensayos (Figura 9.2 a y Tabla 6.1), como por competencia de cocultivo (Figura 3.5 b,  $p\text{-value}<0.005$ ). Lo mismo se observó cuando se eliminó la variante de histona (Htz1). Solamente la mutante *knock-out* del gen *SWC7* no muestra el mismo comportamiento, observándose por ambos métodos que no hay ningún cambio en relación a la cepa silvestre.

Los homólogos de Tip60 que se evaluaron forman parte de distintos complejos modificadores de cromatina en levadura. Las subunidades Yaf9 y Bdf1 que se asocian al complejo SWR1, NuA4 e INO80, las subunidades Eaf6 y Eaf7 que pertenecen únicamente al complejo NuA4, la subunidad Eaf3 que se asocia al complejo NuA4 y RPD3 y, la subunidad Pho23 que se asocia al complejo RPD3. La delección de las subunidades anteriores no provocó efectos similares a los que provocó el complejo SWR1 en el tiempo de vida de la levadura. La delección de Yaf9, Bdf2 (parálogo de Bdf1) y Eaf6 no afectó el tiempo de vida por cinética de crecimiento (Figura 3.6 a), sin embargo, por competencia de cocultivos su delección provocó un aumento en el tiempo de vida de la levadura (Figura 3.6 b). La delección de Bdf1 provocó una disminución en el tiempo de vida cronológico por cinética de crecimiento y no fue posible medirlo por competencia de cocultivos. La delección de Eaf7 provocó una disminución en el tiempo de vida cronológico por cinética de crecimiento (Figura 3.6 a) mientras que por competencia de cocultivos provocó un aumento en el tiempo de vida cronológico (Figura 3.6 b). Finalmente, la delección de Eaf3 y Pho23 provocó una disminución en el tiempo de vida cronológico (Figura 3.6) en ambos métodos.

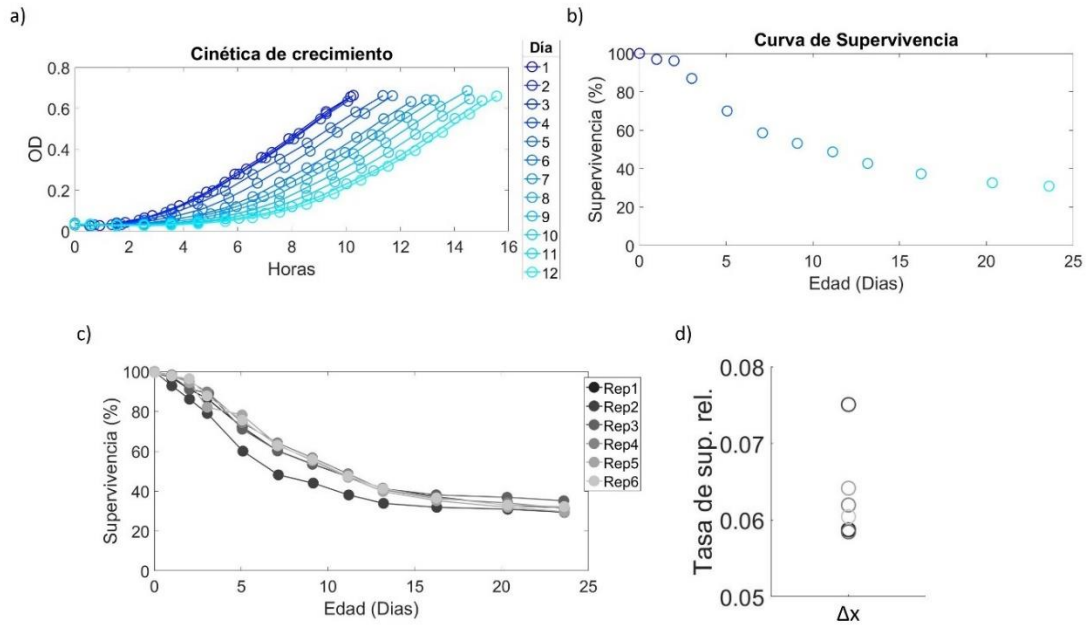
Los datos obtenidos hasta ahora nos sugieren que la delección de genes que pertenecen únicamente al complejo SWR1 causa aumento en el tiempo de vida cronológico de la levadura, con la excepción de *SWC7*, y que la ausencia de subunidades propias del complejo RPD3 causa una disminución

en el tiempo de vida cronológico de la levadura. La delección de las subunidades Eaf6, Eaf7, Yaf9 y Bdf2 no tiene un efecto consistente en el tiempo de vida cronológico de la levadura entre ambos métodos utilizados.

**Tabla 2.1.** Efecto en el tiempo de vida cronológico por ausencia de genes modificadores de cromatina.

<b>Mutantes <i>knock-out</i></b>	<b>Tasa de muerte<sup>a</sup></b>	<b><i>p-value</i><sup>b</sup></b>	<b>Coefficiente relativo de supervivencia (s)<sup>c</sup></b>	<b><i>p-value</i><sup>b</sup></b>
<i>SWR1</i>	0.1252	0.1018	0.0460	2.0250e-06
<i>VPS71</i>	0.2531	0.0390	0.0491	9.8122e-07
<i>VPS72</i>	0.1989	0.0548	0.0435	6.7642e-04
<i>SWC5</i>	0.1881	0.0152	0.0469	2.3135e-04
<i>SWC7</i>	-0.1390	0.0686	-0.0073	0.4246
<i>ARP6</i>	0.1785	0.0276	0.0490	5.1696e-08
<i>HTZ1</i>	0.1293	0.1558	0.0492	9.9039e-06
<i>YAF9</i>	-0.0804	0.1602	0.0252	0.0437
<i>BDF1</i>	-0.2263	0.0234	---	---
<i>BDF2</i>	-0.0416	0.2434	0.0147	9.6446e-07
<i>EAF3</i>	-0.3632	4.4494e-05	-0.0337	8.1493e-05
<i>EAF6</i>	-0.0163	0.6338	0.0170	0.0157
<i>EAF7</i>	-0.1578	0.0057	0.0103	0.0171
<i>PHO23</i>	-0.2197	0.0154	-0.0807	7.2937e-05

Los valores obtenidos corresponden a cinco réplicas biológicas. **a)** La tasa de muerte se obtuvo del ajuste de las curvas de supervivencia a un modelo de decaimiento exponencial. **b)** Valor obtenido con la prueba de Welch comparando la media de cada tratamiento con su correspondiente control. **c)** Obtenido a partir del cambio en las señales de fluorescencia de las mutantes en cocultivo.

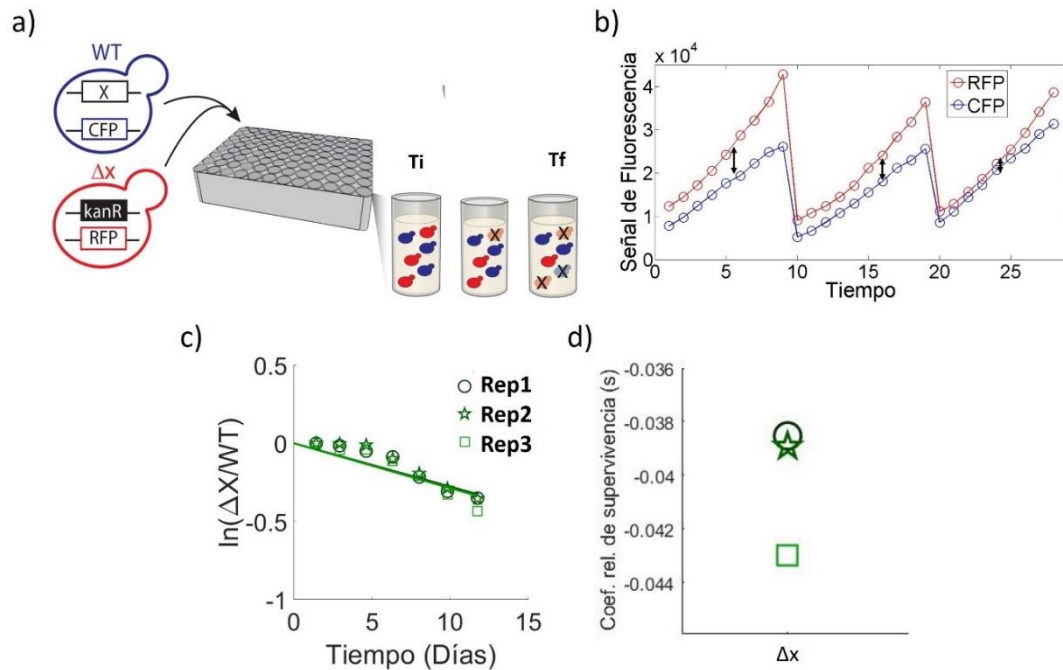


**Figura 3.1.- Medición de tiempo de vida cronológico por cinética de crecimiento.**

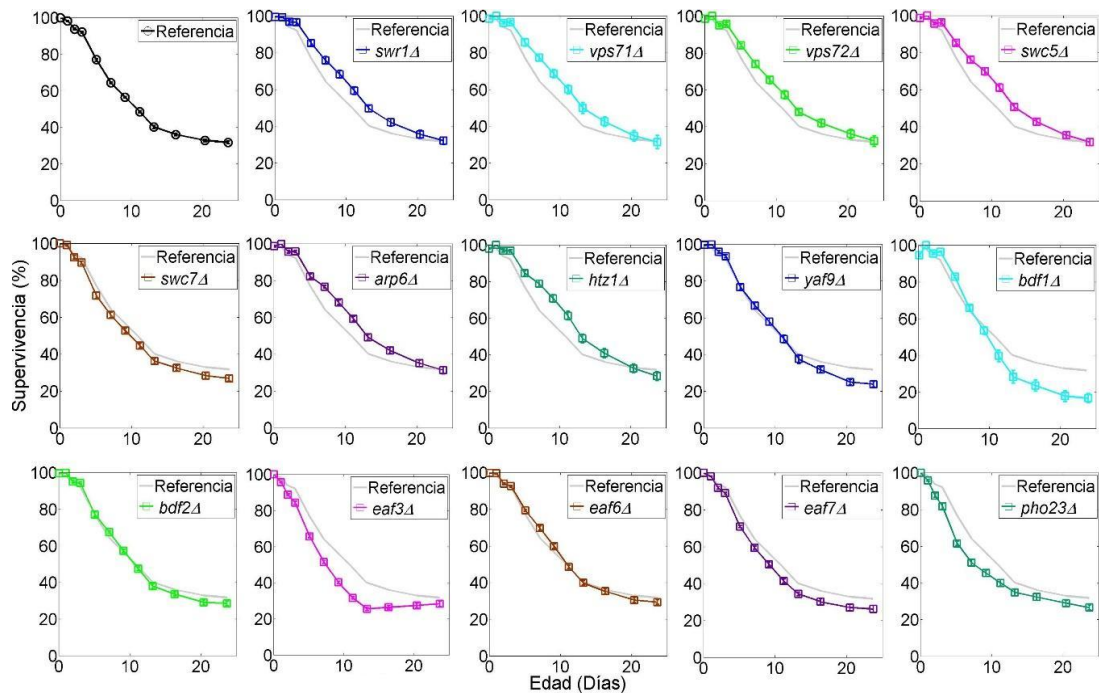
Tiempo de vida cronológico de cultivos en fase estacionaria. **a)** Cada línea representa un día de medición y los puntos las lecturas de OD a 600nm tomadas cada hora. El tono azul de las líneas va disminuyendo conforme avanzan los días de muestreo. Se obtuvieron 12 cinéticas de crecimiento de los cultivos durante 24 días muestreados.

**b)** Para cada cinética de crecimiento se calculó la viabilidad celular relativa (cada punto en la gráfica, 12 puntos en total). Azul más intenso corresponde al primer día muestreado donde el cultivo tiene 100% de viabilidad (porcentaje de supervivencia), el punto azul más claro corresponde al último día muestreado donde el cultivo tiene ~30% de viabilidad.

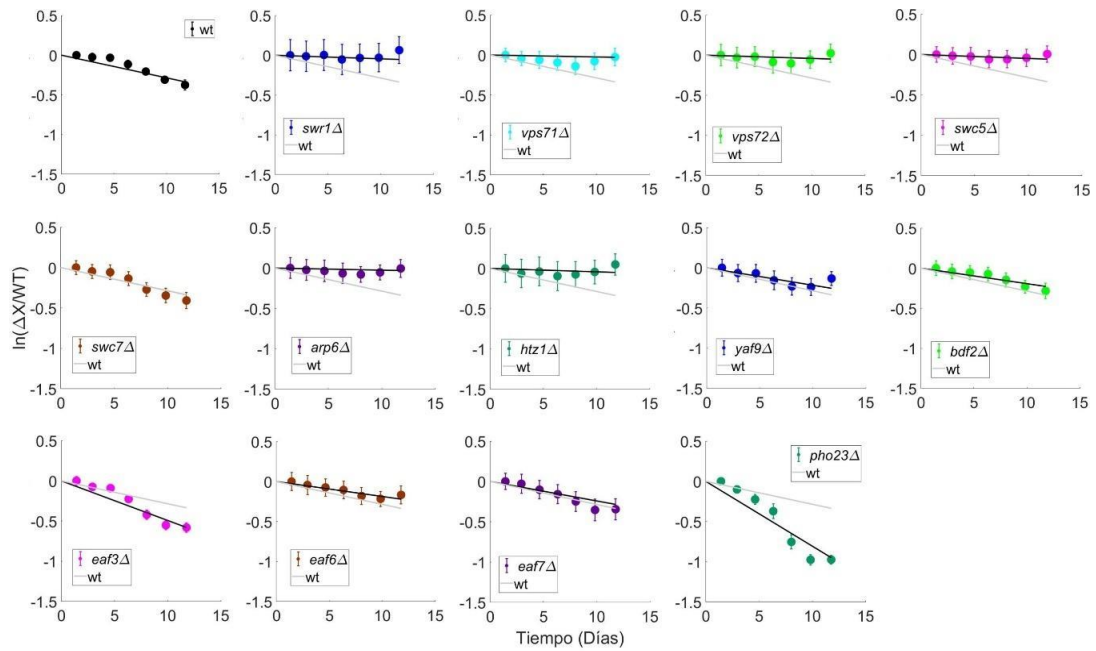
**c)** Curvas de supervivencia de seis réplicas biológicas. **d)** Cada curva se ajustó a un modelo de decaimiento exponencial para calcular la tasa de supervivencia relativa. Cada punto corresponde a la tasa de supervivencia relativa de una réplica biológica.



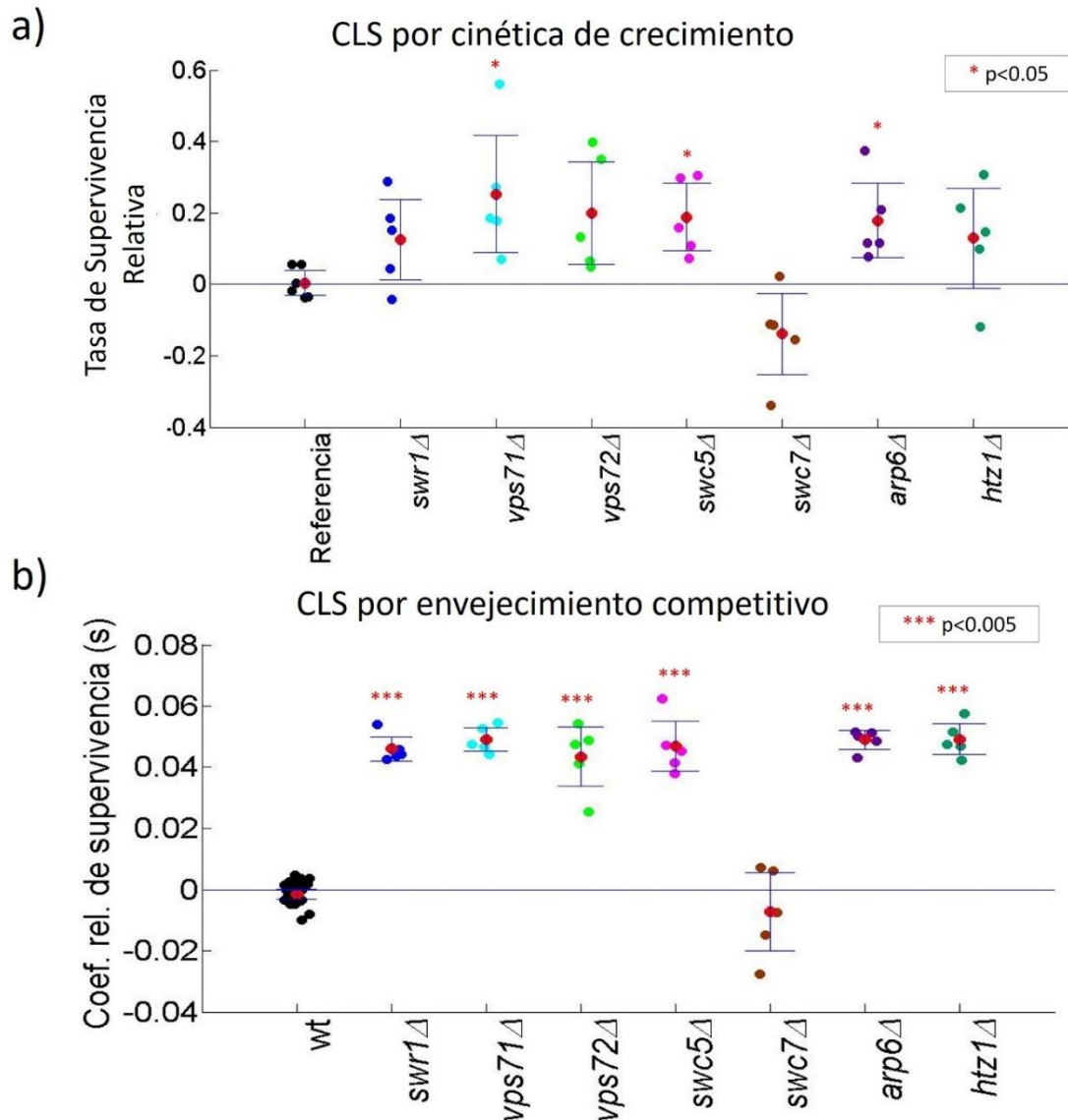
**Figura 3.2.- Medición de tiempo de vida cronológico por competencia de cocultivos.** Tiempo de vida cronológico de cocultivos en fase estacionaria. **a)** Modificado de Garay *et al.*, 2014., cepa silvestre (wt) marcada con fluorescencia CFP y cepa mutante marcada con fluorescencia RFP. Ambas se colocaron en un mismo pozo y se midieron las fluorescencias. Conforme avanzan los días, cambiaron las proporciones en las señales de fluorescencia (proporciones de células viables en cada cocultivo (pozo)). **b)** Tres mediciones de las señales de fluorescencia de un mismo cocultivo. La línea roja corresponde a la cepa RFP, la línea azul a la cepa CFP, los puntos corresponden a las lecturas que se tomaron cada 85 minutos. Las flechas negras indican el cambio en la relación entre las fluorescencias ( $\ln(RFP/CFP)$ ) a un tiempo específico (horas) que cambió conforme el cultivo fue envejeciendo. **c)** Cada punto representa la relación de cambio de las fluorescencias de cada medición. Se muestran tres réplicas biológicas de un cocultivo y las líneas representan la pendiente de ajuste a un modelo lineal. **d)** Cada punto representa el coeficiente relativo de supervivencia (s), que se obtuvo a partir de la pendiente de cada réplica biológica mostrada en c).



**Figura 3.3.- Curvas de supervivencia de mutantes *knock-out* del complejo SWR1 y de homólogos del complejo Tip60.** Mediciones de tiempo de vida cronológico por cinética de crecimiento durante 24 días. Cada punto es la mediana y las barras de error la desviación estándar del porcentaje de supervivencia de 5 réplicas biológicas. La primera gráfica corresponde a la supervivencia de la cepa control (referencia). Las siguientes representan la supervivencia de las mutantes *knock-out* en color y la referencia en gris. Las mutantes *knock-out* de los genes *swr1*, *vps71*, *vps72*, *swc5*, *arp6* y *htz1* muestran un aumento en el tiempo de vida cronológico. Las mutantes *knock-out* de los genes *bdf1*, *eaf3*, *eaf7* y *pho23* muestran una disminución en el tiempo de vida cronológico. Las mutantes *knock-out* de los genes *swc7*, *yaf9*, *bdf2* y *eaf6* no muestran un cambio en el tiempo de vida cronológico.

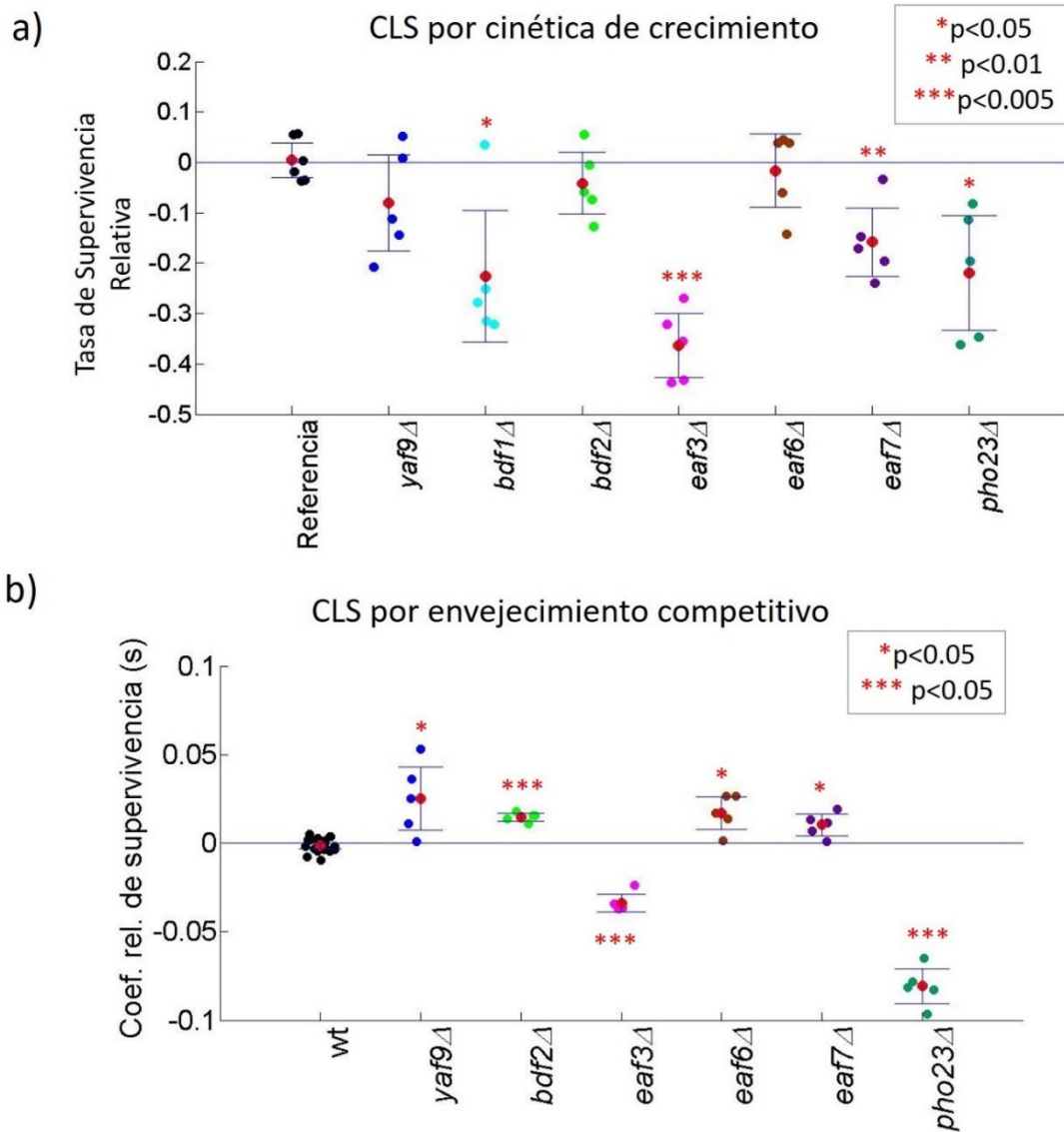


**Figura 3.4.- Coeficiente de supervivencia relativo de mutantes *knock-out* del complejo SWR1 y los homólogos del complejo Tip60.** Se caracterizaron 22 réplicas biológicas de cepas silvestres (wt) y cinco de cepas mutantes. El experimento tuvo una duración de 12 días. Cada punto representa el valor de interpolación obtenido de cada día de medición a las 8h junto con el error estándar. La primera gráfica representa los datos de la cepa silvestre (wt) donde la línea negra es la pendiente del ajuste lineal de los datos. Las siguientes gráficas muestran las cepas mutantes *knock-out* y la pendiente de la cepa silvestre (wt) en gris. La pendiente producto del cocultivo en competencia de la mutante *knock-out swc7* con la cepa silvestre (wt) es igual a la pendiente producto de la competencia de cepa silvestre (wt) con cepa silvestre (wt), por tanto no hay cambio en el tiempo de vida cronológico. Se observa un aumento en el tiempo de vida cronológico en todas las mutantes, menos en *eaf3Δ* y *pho23Δ* donde el tiempo de vida cronológico disminuye.



**Figura 3.5.- La ausencia de la variante de histona HTZ1 y de genes que sólo pertenecen al complejo SWR1 aumenta el tiempo de vida cronológico de levadura.** Todos los datos se normalizaron a la cepa de referencia (wt). Cada punto representa el valor obtenido de una réplica biológica (cinco en total), en rojo la media. **a)** Tasa de supervivencia relativa. Las mutantes *vps71*Δ, *vps72*Δ, *swc5*Δ y *arp6*Δ son significativamente longevas (Prueba de Welch, \* $p$ -value<0.05), y se observó también una tendencia de *swr1*Δ y *htz1*Δ a ser longevas. **b)** Coeficiente relativo de supervivencia (s). Todas las mutantes son significativamente longevas, menos *swc7*Δ (Prueba de Welch, \*\*\* $p$ -value<0.005).





**Figura 3.6.- La ausencia de genes pertenecientes a los complejos NuA4 y RPD3 afecta el tiempo de vida cronológico de la levadura.** Todos los datos se normalizaron a la cepa de referencia (wt). Cada punto representa el valor obtenido de una réplica biológica (cinco en total), en rojo la media. **a)** Tasa de supervivencia relativa. Las mutantes *bdf1Δ*, *eaf3Δ*, *eaf7Δ* y *pho23Δ* tienen un tiempo de vida cronológico significativamente más corto que la cepa de referencia (wt) (Prueba de Welch, \*  $p$ -value < 0.05, \*\*  $p$ -value < 0.01, \*\*\*  $p$ -value < 0.005). No se observa efecto significativo en las mutantes *yaf9Δ*, *bdf2Δ* y *eaf6Δ*. **b)** Coeficiente relativo de supervivencia (s). Las mutantes *yaf9Δ*, *bdf2Δ*, *eaf6Δ* y *eaf7Δ* son significativamente longevas y *eaf3Δ* y *pho23Δ* son de vida corta (Prueba de Welch, \*  $p$ -value < 0.05, \*\*\*  $p$ -value < 0.005).

## Interacciones genéticas del gen *SWR1* con factores de envejecimiento

Para analizar las interacciones genéticas entre *SWR1* y genes que afectan el tiempo de vida cronológico de la levadura se utilizó el método de competencia de cocultivos (Figura 4.1). Se comparó el fenotipo de mutantes de 307 genes conocidos por su efecto en el tiempo de vida cronológico (algunos longevos y otros de vida corta), que llamaremos efecto esperado, (Figura 4.1 a) con el fenotipo de dobles mutantes de cada uno de estos 307 genes con la mutante *swr1Δ* (subunidad principal del complejo), que llamaremos efecto observado (Figura 4.1 b). El experimento incluyó tres réplicas técnicas, cultivadas en medio SC durante 19 días.

La comparación de las pendientes generadas para el efecto esperado y el efecto observado arrojó tres escenarios: i) cuando el efecto en la longevidad de la cepa mutante del gen *X* es independiente de la mutación *swr1Δ* (Figura 4.1 e), ii) cuando al eliminar *SWR1* el efecto en la longevidad de la cepa mutante del gen *X* aumenta (interacción positiva) (Figura 4.1 d) y iii) cuando al eliminar *SWR1* el efecto en la longevidad del gen *X* disminuye (interacción negativa) (Figura 4.1 c). Se calculó la diferencia del coeficiente relativo de supervivencia (*ds*) entre lo esperado y lo observado ('s' observado menos 's' esperado) para los controles (competencia de cepa wt en esperado y competencia de mutante *swr1Δ* en observado) y las mutantes probadas (Figura 4.2 a, Apéndice B-Lista de genes (epistasia)). Se consideraron como atípicos el 15% de las mutantes cuyo efecto observado respecto al esperado fue mayor. De tal forma se identificaron 17 genes que interactúan de manera positiva con *SWR1* y 29 genes que interactúan de manera negativa con *SWR1*. También identificamos el 15% típico de las mutantes donde hubo el menor cambio en el efecto en la longevidad de la mutante sencilla (Figura 4.2 b).

Se realizó una clasificación de la función biológica de los genes que interactúan con el gen *SWR1* tanto de manera positiva como negativa según lo reportado en la *Saccharomyces* Genome Database (SGD) y se anotaron las

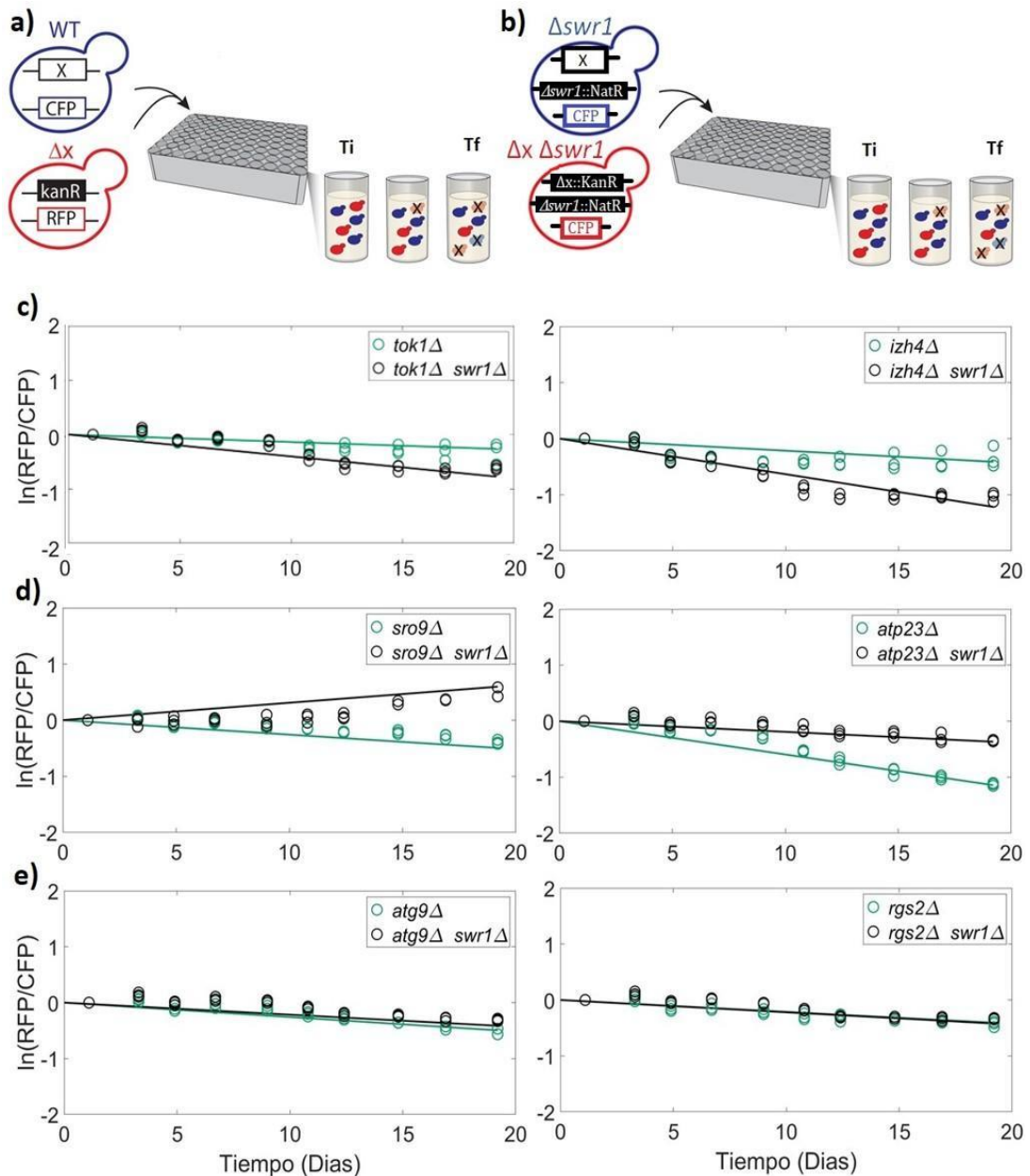
funciones moleculares según asociaciones realizadas con PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) y GeneMANIA (Figura 4.3). Las funciones moleculares de los genes que interactúan de manera positiva con *SWR1* (Figura 4.4 a, Tabla 3.1) son: actividad catalítica (*UTH1*, *SDH2*, *QRI7*, *ATP23*, *BNA6*, *MAK3*, *MAK31*, *NNK1*), enlaces a compuestos orgánicos cíclicos (*FKH1*, *UBA3*, *SRO9*), tráfico intracelular (*COG6* y *DSK2*) y metabolismo respiratorio y función mitocondrial (*FCJ1*). Los tres genes restantes tienen función molecular desconocida. Las funciones moleculares de los genes que interactúan de manera negativa con *SWR1* (Figura 4.4 b, Tabla 3.2) son: enlace a compuestos orgánicos cíclicos (*SNF6*, *HDA2*, *BRE2*, *YAK1*, *CLA4* y *KDX1*), actividad catalítica (*GLC3*, *YNR064C*, *UFD4*, *SKP2* y *PTC6*), factor de transcripción enlazado a DNA (*RGT1*, *FKH2*, *HAP3*, *YJL206C*), enlace iónico (*SMF3*, *SIP18*, *MXR2*), tráfico intracelular (*PMT2*, *VTA1*), metabolismo respiratorio y función mitocondrial (*PDA1*), modificación de cromatina (*SWC3*), regulación de la transcripción (*PDP3*), metabolismo de iones (*TOK1*) y respuesta celular a estrés oxidativo (*OXR1*). Los cinco genes restantes tienen función molecular desconocida. Finalmente, los genes independientes de *SWR1* se anotaron también según lo reportado en la *Saccharomyces* Genome Database (SGD) y las funciones moleculares según asociaciones realizadas con PANTHER y GeneMANIA (Figura 4.5), las funciones moleculares (Figura 4.6, Tabla 3.3) son: actividad catalítica (*ATG12*, *RSR1*, *RIM15*, *TRM7*, *REX2*, *CRD1*, *NCL1*, *PPH3*, *UNG1*, *MNT4*, *PNC1* y *EGT2*), unión a proteínas (*GAL83*, *STF1*, *ATG16*, *RDI1*, *MAF1* y *PAC10*), activador de la transcripción (*CUP9*, *WTM2*, *RSF2*, *MSN4* y *MSN2*), constituyente estructural de ribosomas (*RPL40A*, *RPS14A*, *RPS6B* y *SWS2*), enlace iónico (*PCK1*, *RMD5*, *VID22* y *PEX10*), organización de membrana (*INA22* y *MBA1*), transporte de proteínas (*SEC66* y *ATG9*), respuesta a drogas (*TDA5*), actividad celulasa (*RAV1*), proceso biosintético de hexosas (*GID7*), actividad fosfatasa (*RGS2*) y organización mitocondrial (*DCK1*). Los siete genes restantes tienen función molecular desconocida.

Resaltaron varias interacciones interesantes del complejo SWR1 con los factores de envejecimiento probados, por ejemplo, la interacción negativa de *SWR1* con *SWC3* que funcionó como un control positivo, ya que Swc3 es una subunidad del complejo SWR1 y es la única subunidad del complejo que se probó en el estudio. En este tipo de interacciones genéticas se espera que los demás miembros del complejo SWR1 tengan interacción negativa con la subunidad catalítica Swr1 pues al eliminar alguna subunidad que participe en el intercambio de la histona probocamos un aumento en el tiempo de vida, y combinándolo con la delección de *SWR1* el efecto en el envejecimiento será el equivalente a eliminar sólo la subunidad. En el mismo sentido tenemos la interacción de *SWR1* con algunos genes relacionados con modificación de la cromatina (*HDA2*, *FKH2*, *VTA1*, y *PDP3*) (Tabla 3.2). En particular, tenemos a *SWR1* interactuando de manera negativa con *FKH2* y de manera positiva con *FKH1*, su parálogo, ambos regulan la elongación de la transcripción, lo que nos sugiere que *SWR1* actúan en la misma vía que *FKH2* y cuando eliminamos *SWR1* activamos a *FKH1* como una vía alterna a *FKH2*. Otra interacción positiva interesante es con *SRO9*, un regulador de la traducción, cuyo efecto es neutral y al eliminar a *SWR1* aumenta su tiempo de vida, sugiriendo que *SWR1* actúa como un represor de la actividad de *SRO9*. Finalmente, las interacciones independientes de *SWR1* nos sugieren que la delección de *SWR1* aumenta el tiempo de vida en una vía alterna a la más descrita en levadura, la vía Ras/CA/PKA, encontrando genes como *MSN2*, *MSN4* (ambos factores de transcripción de respuesta a estrés) y *RIM15* (proteína cinasa), que forman parte de esta vía, dentro del 15 % más típico de interacciones con *SWR1*. Dentro del mismo tipo de interacciones tenemos genes que regulan la autofagia (*ATG12*, *ATG16* y *ATG9*) y la síntesis de proteínas (*RPS14A* y *RPS6B*).

Hacer las clasificaciones y poner figuras de acuerdo a categorías

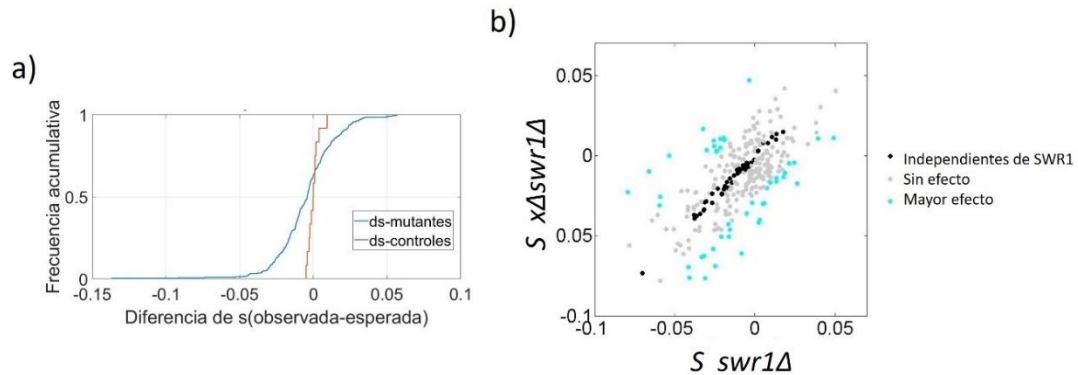
Estos resultados de análisis de interacciones genéticas sugieren que *SWR1* actúa junto con otros complejos remodeladores de cromatina para

extender el tiempo de vida cronológico de levadura, que es necesaria la presencia de ciertos reguladores de la transcripción para poder ver un efecto en la extensión del tiempo de vida por falta de *SWR1* y que *SWR1* aumenta el tiempo de vida de la levadura en una vía alterna a la más descrita en levadura.

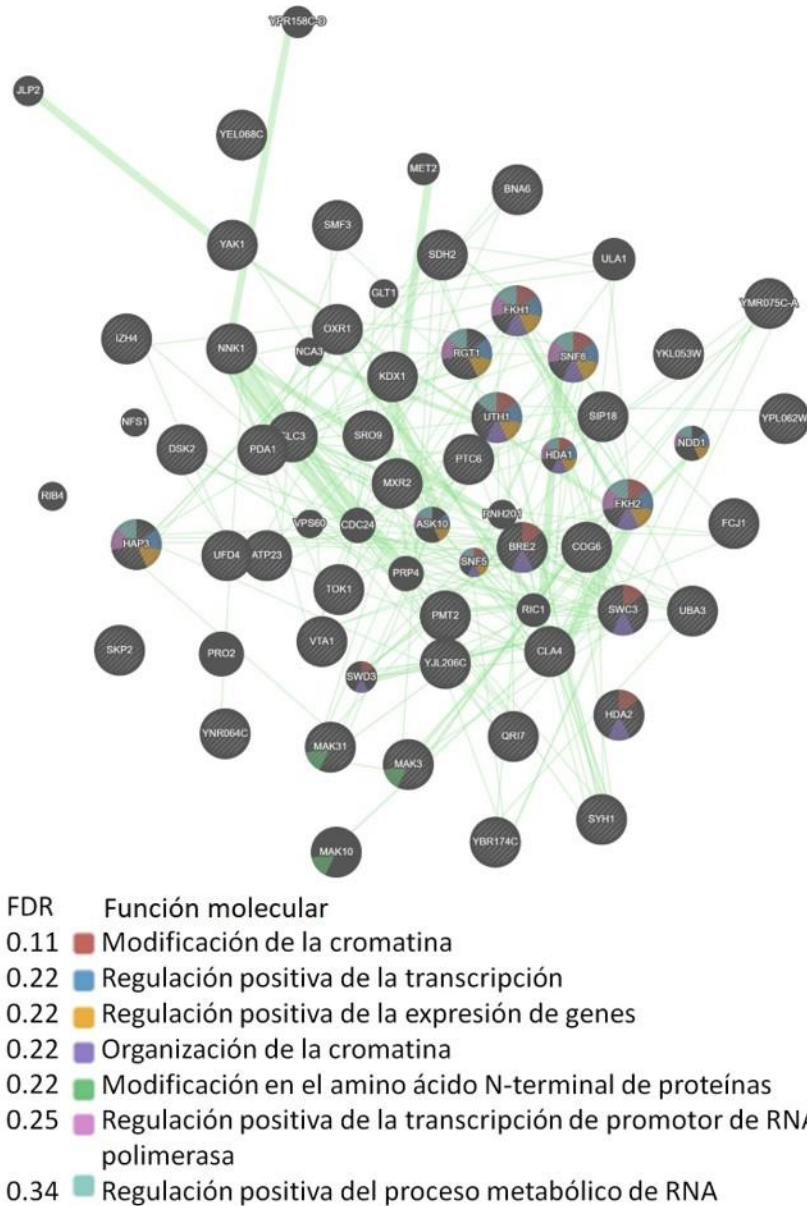


**Figura 4.1.- Estrategia para caracterizar interacciones genéticas entre *SWR1* y factores de envejecimiento. a)** Esperado. Medición de tiempo de vida cronológico de 307 mutantes *knock-out* sencillas por competencia de cocultivos (Garay *et al.*, 2014, Figura 1.2). **b)** Observado. Medición de tiempo de vida cronológico de dobles

mutantes *knock-out* de cada uno de los 307 genes y de *SWR1* por competencia de cocultivos. La metodología es la misma que en a) pero cambia la estrategia: se pone a competir la mutante *knock-out* sencilla *swr1Δ* (marcada con fluorescencia CFP) con la doble mutante  $xΔswr1Δ$  (marcada con fluorescencia RFP). Se obtiene la relación entre las fluorescencias de cada experimento por separado (a y b), se comparan las pendientes para analizar si el efecto en el tiempo de vida cronológico de la delección del gen *X* se mantiene cuando se elimina al gen *SWR1*. Como resultado se obtienen tres escenarios: **c)** La pendiente de la doble mutante (negro) se mueve en sentido negativo respecto a la pendiente de la mutante sencilla (verde), lo que interpretamos como una disminución en el tiempo de vida cronológico en ausencia de *SWR1*. **d)** La pendiente de la doble mutante (negro) se mueve en sentido positivo respecto a la pendiente de la mutante sencilla (verde), lo que interpretamos como un aumento en el tiempo de vida cronológico en ausencia de *SWR1*. **e)** La pendiente de la doble mutante (negro) no cambia respecto a la de la mutante sencilla (verde). Cada medición se realizó por triplicado.



**Figura 4.2.- Identificación de interacciones genéticas entre *swr1* y factores de envejecimiento.** **a)** Para cada gen se calculó el *ds* (diferencia del coeficiente relativo de supervivencia), el 's' observado menos el 's' esperado. La distribución de frecuencia acumulativa de la *ds* de controles (naranja) se comparó con la distribución de frecuencia acumulativa de la *ds* de mutantes (azul). **b)** Coeficientes relativos de supervivencia (*s*) observados ( $xΔswr1Δ$ ) en *eje y*, y coeficientes relativos de supervivencia (*s*) esperados ( $xΔ$ ) en *eje x*. Cada punto azul representa un gen considerado como el 15% atípico con mayor efecto, cada punto gris representa un gen que se consideró con efecto independiente de *SWR1* y cada punto negro representa un gen cuyo efecto se consideró como sin efecto.



**Figura 4.3.- Clasificación de funciones moleculares de genes que interactúan con *SWR1* encontradas en GeneMANIA.** Se tomó el genoma de *S. cerevisiae* como *background*. Las líneas verdes representan las redes de interacciones genéticas reportadas para los genes analizados (círculos negros con líneas blancas). Se muestran siete categorías de funciones moleculares y su FDR. Cada función molecular corresponde a un color. Las funciones moleculares fueron: modificación de la cromatina (rojo), regulación positiva de la transcripción (azul), regulación positiva de la expresión de genes (amarillo), organización de la cromatina (morado), modificación en el aminoácido N-terminal de proteínas (verde), regulación positiva de

la transcripción de promotor de RNA polimerasa (rosa) y regulación positiva del proceso metabólico de DNA (celeste).

**Tabla 3.1.-** Procesos biológicos y funciones moleculares de genes que interactúan de manera positiva con *SWR1*.

<b>Gen</b>	<b>Proceso Biológico</b>	<b>Función Molecular</b>	<b>ds<sup>a</sup></b>
<i>UTH1</i>	Desconocido	Actividad catalítica	0.0266
<i>SDH2</i>	Respiración celular	Actividad catalítica	0.0288
<i>QRI7</i>	Actividad sintasa N (6)-L-treonilcarbamoiladenin	Actividad catalítica	0.0351
<i>ATP23</i>	Desconocido	Actividad catalítica	0.0563
<i>BNA6</i>	Proceso biosintético NAD de triptófano	Actividad catalítica	0.0265
<i>MAK3</i>	Actividad peptídica alfa-N-acetiltransferasa	Actividad catalítica	0.0535
<i>MAK31</i>	Actividad peptídica alfa-N-acetiltransferasa	Actividad catalítica	0.0336
<i>NNK1</i>	Actividad proteína cinasa	Actividad catalítica	0.0322
<i>FKH1</i>	Enlazado a cromatina	Enlace a compuestos orgánicos cíclicos	0.0312
<i>UBA3</i>	Activadora de enzima NEDD8	Enlace a compuestos orgánicos cíclicos	0.0335
<i>SRO9</i>	Regulación de la traducción	Enlace a compuestos orgánicos cíclicos	0.0509
<i>COG6</i>	Desconocido	Tráfico intracelular	0.0489
<i>DSK2</i>	Enlazado a proteína	Tráfico intracelular	0.0313
<i>FCJ1</i>	Importe de proteínas dentro de la mitocondria	Metabolismo respiratorio y función mitocondrial	0.0568
<i>YEL068C</i>	Desconocido	Desconocido	0.0288
<i>SYH1</i>	Distribución en poro nuclear	Desconocido	0.0306
<i>YKL053W</i>	Desconocido	Desconocido	0.0267

El proceso biológico corresponde a lo reportado en SGD y la función molecular se obtuvo de asociaciones realizadas por PANTHER y GeneMANIA. Los colores de la función molecular corresponden a la Figura 2.1.3. a. **a)** El valor de la diferencia del



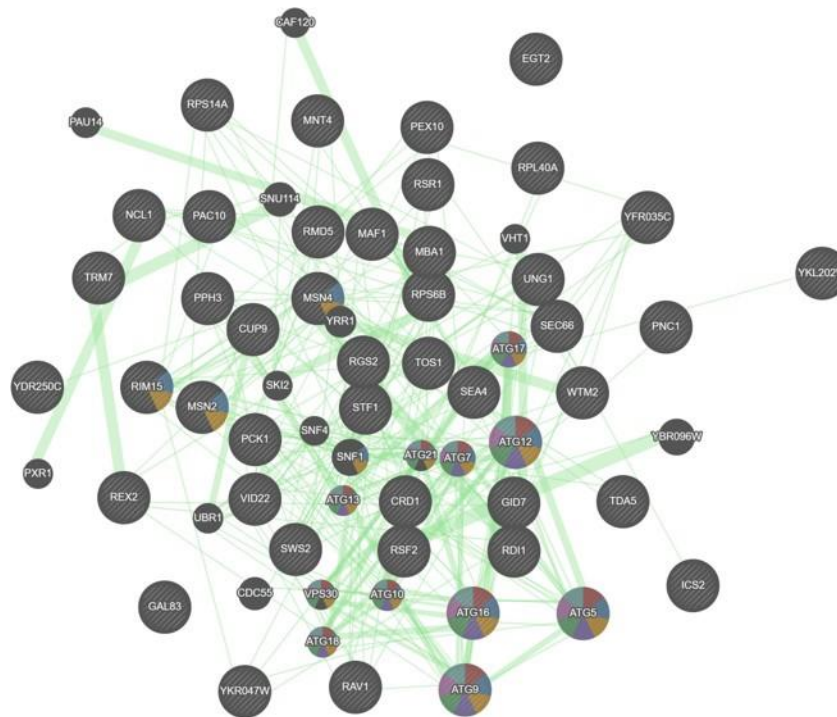
coeficiente relativo de supervivencia ( $ds$ ) es obtenido de la diferencia entre el coeficiente de supervivencia esperado y el observado.

**Tabla 3.2.-** Procesos biológicos y funciones moleculares de genes que interactúan de manera negativa con *SWR1*.

<b>Gen</b>	<b>Proceso Biológico</b>	<b>Función Molecular</b>	<b>ds<sup>a</sup></b>
<i>SNF6</i>	Enlazado a DNAr	Enlace a compuestos orgánicos cíclicos	-0.0261
<i>HDA2</i>	Enlazado a cromatina	Enlace a compuestos orgánicos cíclicos	-0.0289
<i>BRE2</i>	Actividad metiltransferasa de histona	Enlace a compuestos orgánicos cíclicos	-0.0323
<i>YAK1</i>	Actividad proteína cinasa	Enlace a compuestos orgánicos cíclicos	-0.0278
<i>CLA4</i>	Actividad proteína cinasa	Enlace a compuestos orgánicos cíclicos	-0.0296
<i>KDX1</i>	MAP cinasa	Enlace a compuestos orgánicos cíclicos	-0.0310
<i>GLC3</i>	Actividad de enzima 1,4-alfa-glucano	Actividad catalítica	-0.0452
<i>YNR064 C</i>	Actividad epóxido hidrolasa	Actividad catalítica	-0.0264
<i>UFD4</i>	Actividad de proteína ubiquitina transferasa	Actividad catalítica	-0.0276
<i>SKP2</i>	Enlazado a proteína	Actividad catalítica	-0.0294
<i>PTC6</i>	Actividad fosfatasa	Actividad catalítica	-0.0436
<i>RGT1</i>	Regulación positiva de la transcripción	Factor de transcripción enlazado a DNA	-0.0439
<i>FKH2</i>	Enlazado a cromatina	Factor de transcripción enlazado a DNA	-0.0273
<i>HAP3</i>	Activador de la transcripción enlazado a DNA	Factor de transcripción enlazado a DNA	-0.0279
<i>YJL206C</i>	Desconocido	Factor de transcripción enlazado a DNA	-0.0295
<i>SMF3</i>	Homeostasis celular de hierro	Enlace iónico	-0.0261
<i>SIP18</i>	Enlazado a fosfolípidos	Enlace iónico	-0.0307
<i>MXR2</i>	Actividad reductasa de óxido de péptido-metionina	Enlace iónico	-0.0300
<i>PMT2</i>	Actividad de proteína manosiltransferasa	Tráfico intracelular	-0.0310
<i>VTA1</i>	Actividad de activador ATPasa	Tráfico intracelular	-0.0355
<i>PDA1</i>	Proceso biosintético de piruvato a acetyl-CoA	Metabolismo respiratorio y función mitocondrial	-0.0441
<i>SWC3</i>	Intercambio de histonas	Modificación de cromatina	-0.0381
<i>PDP3</i>	Enlazado a cromatina	Regulación de la transcripción	-0.0347

<i>TOK1</i>	Actividad de canal de potasio	Metabolismo de iones	-0.0430
<i>OXR1</i>	Desconocido	Respuesta celular a estrés oxidativo	-0.0351
<i>YMR075 C-A</i>	Desconocido	Desconocido	-0.0341
<i>YJL206C</i>	Desconocido	Desconocido	-0.0295
<i>IZH4</i>	Homeostasis celular de zinc	Desconocido	-0.0527
<i>YBR174 C</i>	Desconocido	Desconocido	-0.0308
<i>YPL062 W</i>	Desconocido	Desconocido	-0.0285

El proceso biológico corresponde a lo reportado en SGD y la función molecular se obtuvo de asociaciones realizadas por PANTHER y GeneMANIA. Los colores de la función molecular corresponden con la Figura 2.1.3. b. **a)** El valor de la diferencia del coeficiente de supervivencia ( $ds$ ) es obtenido de la diferencia entre el coeficiente de supervivencia observado y el esperado.



FDR	Función Molecular
1.79e-11	<span style="color: red;">■</span> Nucleofagia
1.79e-11	<span style="color: blue;">■</span> Respuesta celular a inanición
1.79e-11	<span style="color: yellow;">■</span> Respuesta a inanición
1.79e-11	<span style="color: purple;">■</span> Nucleofagia tardía
1.79e-11	<span style="color: green;">■</span> Microautofagia de núcleo
1.59e-11	<span style="color: pink;">■</span> Invaginación de membrana de un solo organismo
1.59e-11	<span style="color: cyan;">■</span> Invaginación de membrana

**Figura 4.5.- Clasificación de funciones moleculares de genes independientes de *SWR1* encontradas en GeneMANIA.** Se tomó el genoma de *S. cerevisiae* como background. Las líneas verdes representan las redes de interacciones genéticas reportadas para los genes analizados (círculos negros con líneas blancas). Se muestran siete categorías de funciones moleculares y su FDR. Cada función molecular corresponde a un color. Las funciones moleculares fueron: nucleofagia (rojo), respuesta celular a inanición (azul), respuesta a inanición (amarillo), nucleofagia tardía (morado), microautofagia de núcleo (verde), invaginación de membrana de un solo organismo (rosa) e invaginación de membrana (celest).

**Tabla 3.3.-** Procesos biológicos y funciones moleculares de genes independientes de *SWR1*.

<b>Gen</b>	<b>Proceso Biológico</b>	<b>Función Molecular</b>	<b>ds<sup>a</sup></b>
<i>ATG12</i>	Ensamble de autofagosomas	Actividad catalítica	0.0031
<i>RSR1</i>	Citogamia	Actividad catalítica	0.0001
<i>RIM15</i>	Fosforilación de proteínas	Actividad catalítica	0.0028
<i>TRM7</i>	Traducción citoplásmica	Actividad catalítica	0.0016
<i>REX2</i>	Mantenimiento de genoma mitocondrial	Actividad catalítica	-0.0023
<i>CRD1</i>	Homeostasis celular de iones	Actividad catalítica	0.0014
<i>NCL1</i>	Respuesta celular a peróxido de hidrógeno	Actividad catalítica	-0.0008
<i>PPH3</i>	Respuesta celular a compuestos que contienen oxígeno	Actividad catalítica	-0.0021
<i>UNG1</i>	Reparación del DNA	Actividad catalítica	-0.001
<i>MNT4</i>	Glicosilación de proteínas enlazadas a oxígeno	Actividad catalítica	0.0025
<i>PNC1</i>	Modificador de cromatina	Actividad catalítica	0.0028
<i>EGT2</i>	Actividad celulasa	Actividad catalítica	0.0023
<i>GAL83</i>	Adhesión celular	Unión a proteínas	0.0028
<i>STF1</i>	Regulación negativa de la actividad ATPasa	Unión a proteínas	-0.0029
<i>ATG16</i>	Organización de autofagosomas	Unión a proteínas	0.0002
<i>RDI1</i>	Organización de filamentos de actina	Unión a proteínas	0.0004
<i>MAF1</i>	Regulación negativa de la transcripción	Unión a proteínas	0.002
<i>PAC10</i>	Ensamble de complejo de tubulina	Unión a proteínas	-0.0031
<i>CUP9</i>	Regulación negativa de la transcripción	Activador de la transcripción	-0.0015
<i>WTM2</i>	Respuesta a estímulos de	Activador de la	0.0022

	daño	transcripción	
<i>RSF2</i>	Regulación de la transcripción	Activador de la transcripción	-0.0024
<i>MSN4</i>	Modificador de cromatina	Activador de la transcripción	-0.0002
<i>MSN2</i>	Modificador de cromatina	Activador de la transcripción	-0.0011
<i>RPL40A</i>	Traducción citoplásmica	Constituyente estructural de ribosomas	-0.003
<i>RPS14A</i>	Traducción citoplásmica	Constituyente estructural de ribosomas	-0.0001
<i>RPS6B</i>	Traducción citoplásmica	Constituyente estructural de ribosomas	0.0028
<i>SWS2</i>	Traducción mitocondrial	Constituyente estructural de ribosomas	0.0021
<i>PCK1</i>	Gluconeogénesis	Enlace iónico	0.0029
<i>RMD5</i>	Regulación negativa de la gluconeogénesis	Enlace iónico	0.0031
<i>VID22</i>	Proteína de proceso catabólico en la vacuola	Enlace iónico	-0.0013
<i>PEX10</i>	Ubiquitinación de proteínas	Enlace iónico	-0.0011
<i>DCK1</i>	Autofagia de la mitocondria	Organización mitocondrial	0.0026
<i>INA22</i>	Complejo INA	Organización de membrana	0.0021
<i>MBA1</i>	Regulación positiva de la traducción mitocondrial	Organización de membrana	-0.001
<i>SEC66</i>	Crecimiento filamentoso	Transporte de proteínas	-0.0028
<i>ATG9</i>	Ensamble de autofagosomas	Transporte de proteínas	-0.0008
<i>TDA5</i>	Respuesta a drogas	Respuesta a drogas	0.0003
<i>RAV1</i>	Transporte de endosoma temprano a endosoma tardío	Actividad celulasa	0.0023
<i>GID7</i>	Regulación negativa de la gluconeogénesis	Proceso biosintético de hexosas	0.0003

<i>RGS2</i>	Receptor de señales de proteínas	Actividad fosfatasa	-0.0001
<i>YKL202W</i>	Desconocido	Desconocido	0.0007
<i>ICS2</i>	Desconocido	Desconocido	-0.0012
<i>YKR047W</i>	Desconocido	Desconocido	0.0012
<i>TOS1</i>	Desconocido	Desconocido	0.0014
<i>YDR250C</i>	Desconocido	Desconocido	0.0019
<i>YFR035C</i>	Desconocido	Desconocido	0.0031
<i>SEA4</i>	Regulador positivo de TORC1	Desconocido	0.0026

El proceso biológico corresponde a lo reportado en SGD y la función molecular se obtuvo de asociaciones realizadas por PANTHER y GeneMANIA. Los colores de la función molecular corresponden con la Figura 2.1.4. **a)** El valor de la diferencia del coeficiente relativo de supervivencia ( $ds$ ) es obtenido de la diferencia entre el coeficiente de supervivencia esperado y el observado.

### Interacciones de letalidad sintética entre el complejo SWR1 y los homólogos de Tip60 con factores de envejecimiento.

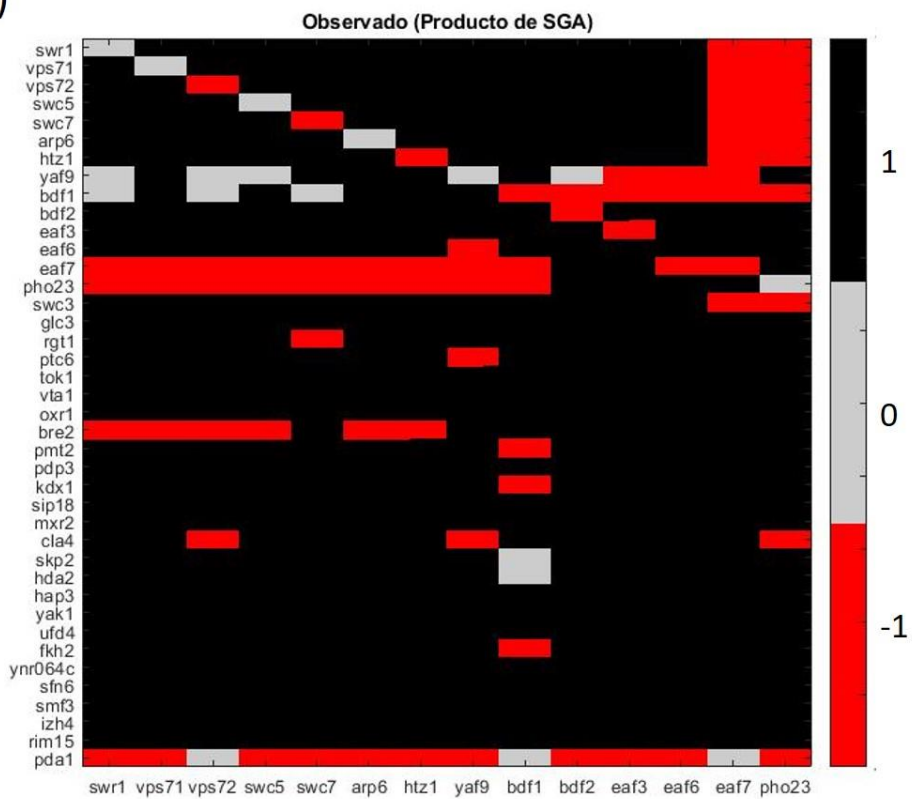
Para analizar las interacciones genéticas entre los genes que forman parte del complejo SWR1, los homólogos de Tip60 e interacciones negativas de *SWR1* se generó una matriz de dobles mutantes *knock-out* mediante SGA (Métodos-Generación de dobles mutantes). Las dobles mutantes se generaron por cuadruplicado (cuatro réplicas biológicas). Los resultados se clasificaron en i) al menos en tres réplicas biológicas hubo crecimiento de la doble mutante (mismas que se tomarán para caracterización de fenotipo en envejecimiento cronológico), ii) en una o dos réplicas biológicas hubo crecimiento de la doble mutante (probablemente falsos negativos debido a una reversión de la mutación o error en la identidad de las mutantes) y iii) en ninguna de las réplicas biológicas hubo crecimiento de la doble mutante (letalidad sintética, la combinación de ambas mutaciones es letal para la célula). Se realizó una búsqueda en SGD de las dobles mutantes que se generarían para conocer i)

aquellas con letalidad sintética o defecto en crecimiento y ii) aquellas con interacciones no negativas o no reportadas, (Figura 5.1 b). Con respecto a los interactores negativos del gen *SWR1*, generamos dobles mutantes *knock-out* con 25 (*SMF3*, *SNF6*, *YNR064C*, *FKH2*, *UFD4*, *YAK1*, *HAP3*, *HDA2*, *SKP2*, *CLA4*, *MXR2*, *SIP18*, *KDX1*, *PMT2*, *BRE2*, *PDP3*, *OXR1*, *VTA1*, *SWC3*, *TOK1*, *PTC6*, *RGT1*, *PDA1*, *IZH4* Y *GLC3*) de los 29 genes y de uno cuyo efecto fue independiente de *SWR1* (*RIM15*) y además forma parte de la vía RAS/PKA.

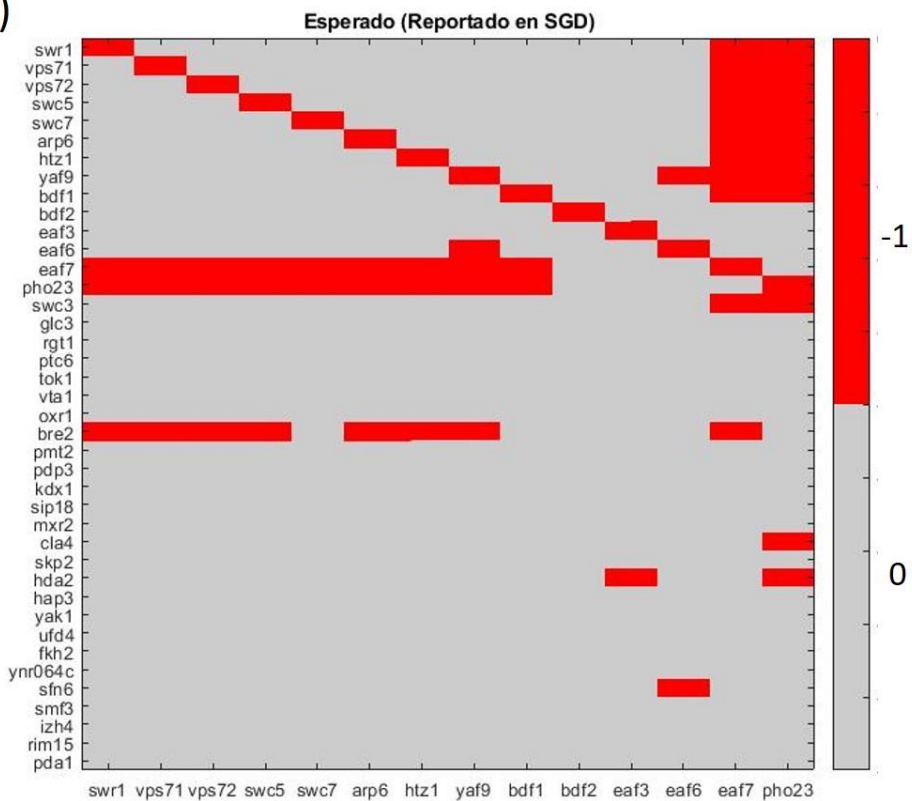
Una letalidad sintética esperada en un SGA es la cruce de la mutante *knock-out* del mismo gen en la cepa *Mat a* con una resistencia diferente a la que tendrá en la cepa *Mat  $\alpha$* , en este ensayo se obtuvo letalidad sintética en todas las cruces esperadas excepto en *eaf6 $\Delta$*  (Figura 2.2.1 a). No se observó crecimiento en las dobles mutantes *knock-out* de *EAF7* y *PHO23* con *SWR1*, *VPS71*, *VPS72*, *SWC5*, *SWC7*, *ARP6*, *HTZ1*, *YAF9* y *BDF1*, tampoco en las dobles mutantes *eaf6 $\Delta$ yaf9 $\Delta$* , *swc3 $\Delta$ eaf7 $\Delta$* , *swc3 $\Delta$ pho23 $\Delta$* , *cla4 $\Delta$ pho23 $\Delta$* , ni en las dobles mutantes *knock-out* de *BRE2* con *SWR1*, *VPS71*, *VPS72*, *SWC5*, *ARP6* y *HTZ1*, confirmando lo reportado. También se observó que en algunas dobles mutantes *knock-out* no reportadas como interacciones negativas, de crecimiento lento o letales, no se obtuvo crecimiento, tales como: *cla4 $\Delta$ vps72 $\Delta$*  y *cla4 $\Delta$ yaf9 $\Delta$* , la mutante *knock-out* *pda1 $\Delta$*  con todas las mutantes *knock-out* y las dobles mutantes *knock-out* de *BDF1* con *PMT2*, *KDX1*, *SKP2*, *HDA2* y *FKH2*.

En total, estos experimentos identificaron 1317 interacciones entre genes que forman parte del complejo *SWR1*, los homólogos de Tip60 e interactores negativos de *SWR1*. El fenotipo relacionado con el tiempo de vida cronológico de estos 1317 dobles mutantes de levadura será caracterizado en un futuro.

a)



b)





**Figura 5.1.- Interacciones genéticas entre dobles mutantes de genes del complejo SWR1, homólogos de Tip60 e interactores negativos de SWR1.** Las gráficas muestran el arreglo de las dobles mutantes entre 14 genes (complejo SWR1 y homólogos de Tip60) en el eje x y 40 genes (complejo SWR1, homólogos de Tip60 e interactores negativos de SWR1) en el eje y. **a)** Resultados observados de crecimiento de las dobles mutantes en el SGA realizado por cuadruplicado: crecimiento de al menos tres réplicas biológicas (1 negro), crecimiento de una o dos réplicas biológicas (0 gris), sin crecimiento (-1 rojo). **b)** Interacciones de dobles mutantes reportadas en SGD: interacción negativa (-1 rojo), interacción no negativa o no reportada (0 gris).

### Conservación de la relación SWR1-envejecimiento a nivel intraespecie en *S. cerevisiae*

Para evaluar la conservación de la relación SWR1-envejecimiento se generaron mutantes *knock-out* sencillas del gen *SWR1* en cinco cepas representativas de *S. cerevisiae* aisladas de diferentes partes del mundo (Liti *et al.*, 2009; Cubillos *et al.*, 2009; Peter *et al.*, 2018), además de la cepa de referencia S288c usada como modelo en el laboratorio. Las cinco cepas que se usaron fueron YJM981 y YJM978 aisladas de vagina de humano en una clínica, L-1374 aislada de suelo en los Países Bajos en Europa, Y12 aislada de vino de palma en la Costa de Marfil y Y55 aislada de vino en Francia (Figura 6.1, Tabla 4.1).

Se caracterizó el efecto de la delección de *SWR1* en el tiempo de vida cronológico de cada una de las cepas por cinética de crecimiento, realizándose cuatro réplicas biológicas en medio SC (Figura 6.2 a-f). Las curvas de supervivencia obtenidas con cada cepa se ajustaron a un modelo de decaimiento exponencial (Figura 6.2 g), a partir del cual se obtuvo la tasa relativa de supervivencia que se comparó a la tasa relativa de supervivencia de la referencia mediante una prueba de Welch (Tabla 4.1) para identificar aquellas cepas en las que la delección de *SWR1* tiene efecto en el tiempo de vida cronológico. En tres de las seis cepas probadas, la delección de *SWR1* resultó en un aumento significativo en el tiempo de vida de la cepa (Figura 6.2 h). Estas cepas, L-1374, Y12 y YJM978, provienen de distintos lugares

geográficos y solo coinciden en que filogenéticamente pertenecen a clados que tienen que ver con procesos de fermentación.

Es importante señalar que no se observó un efecto significativo en la longevidad de la cepa de referencia S288c, probablemente debido a la presencia de auxotrofías en la cepa BY4741, cepa que se usó como parental para generar las mutantes *knock-out* del complejo SWR1 y los homólogos de Tip60. Sin embargo, en las seis cepas se puede observar consistentemente una tendencia al aumento en el tiempo de vida cronológico (Figura 6.2 h), sugiriendo que la delección de *SWR1* tiene un efecto en la extensión del tiempo de vida cronológico a nivel intraespecie en *S. cerevisiae*.

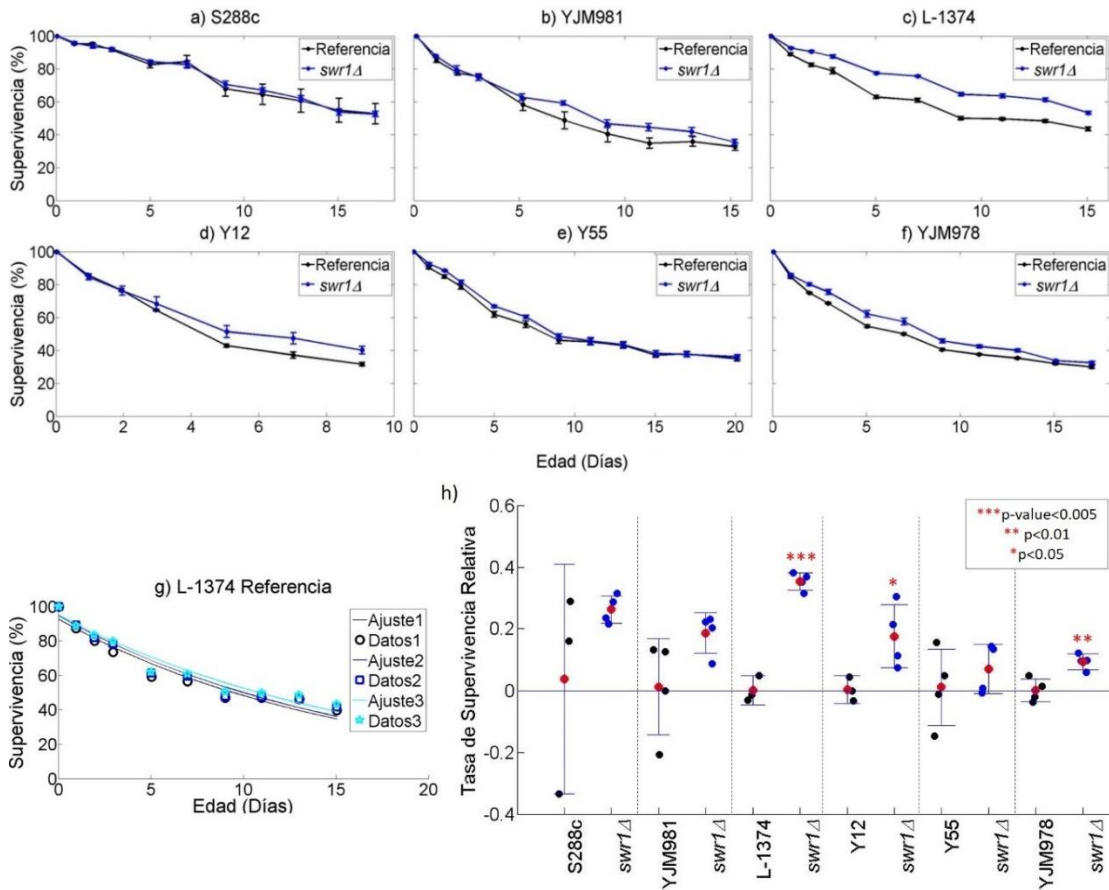
**Tabla 4.1.** Tiempo de vida cronológico de *swr1Δ* en distintas cepas de *S. cerevisiae*.

Nombre	Origen Geográfico	Aislado	Origen ecológico	Clado	Tasa de muerte <sup>a</sup>	<i>P-value</i> (Prueba de Welch) <sup>b</sup>
S288c	Americana	---	Laboratorio	---	0.0380	0.3571
YJM981	Italiana	Vagina	Humano, Clínico	Vino/Europeo (subclado 2)	0.0128	0.1145
L-1374	Países bajos	Suelo	Suelo	Vino/Europeo	0.0007	0.00005
Y12	Costa de Marfil	Vino de palma	Vino de palma	Fermentación asiática	0.0032	0.0370
Y55	Francesa	Vino	Vino	Mosaico, región 3	0.0109	0.4722
YJM978	Italiana	Vagina	Humana, Clínica	Vino/Europeo (subclado 2)	0.0008	0.0087

Los valores obtenidos corresponden al promedio de 4 réplicas biológicas. **a)** La tasa de muerte se obtuvo del ajuste de las curvas de supervivencia a un modelo de decaimiento exponencial. **b)** Valor P (de significancia) obtenido con la prueba de



gráficos circulares representan los orígenes ecológicos del clado: domesticado (rojo), silvestre (verde) y humano (azul). El color del nombre del clado representa la asignación: domesticado (rojo) y silvestre (verde). Las cinco cepas analizadas pertenecen a subclados del clado vino/europeo: una al subclado 0.1W, dos al subclado 01.W2, una al subclado M3.M y una al subclado 26.A (señaladas con asteriscos azules). Misma relación que en la Tabla 3.1. Modificado de Peter *et al.* (2018).



**Figura 6.2.- Efecto de *swr1Δ* en el tiempo de vida cronológico de seis cepas de *S. cerevisiae*.** Las barras de error representan la desviación estándar de las tres réplicas biológicas. **a)-f)** Mediana del porcentaje de supervivencia de las cepas de referencia (negro) y de *swr1Δ* (azul). El número de días de medición depende de la rapidez con que el porcentaje de supervivencia de la cepa de referencia llega a la fase estacionaria. **g)** Representación del ajuste al modelo de decaimiento exponencial del porcentaje de supervivencia de cada una de las tres réplicas biológicas para la cepa de referencia L-1374. **h)** Tasa de supervivencia relativa de cada replica biológica

(círculo; media en rojo) de la referencia (negro) y de *swr1Δ* (azul) para cada una de las seis cepas. El tiempo de vida de las mutantes *knock-out* del gen *SWR1* en las cepas L-1374, Y12 y YJM978 aumenta significativamente (Prueba de Welch, \*\*\**p-value*<0.05, \*\**p-value*<0.01, \**p-value*<0.05).

### Efecto de Tip60 en el tiempo de vida de *Drosophila melanogaster*

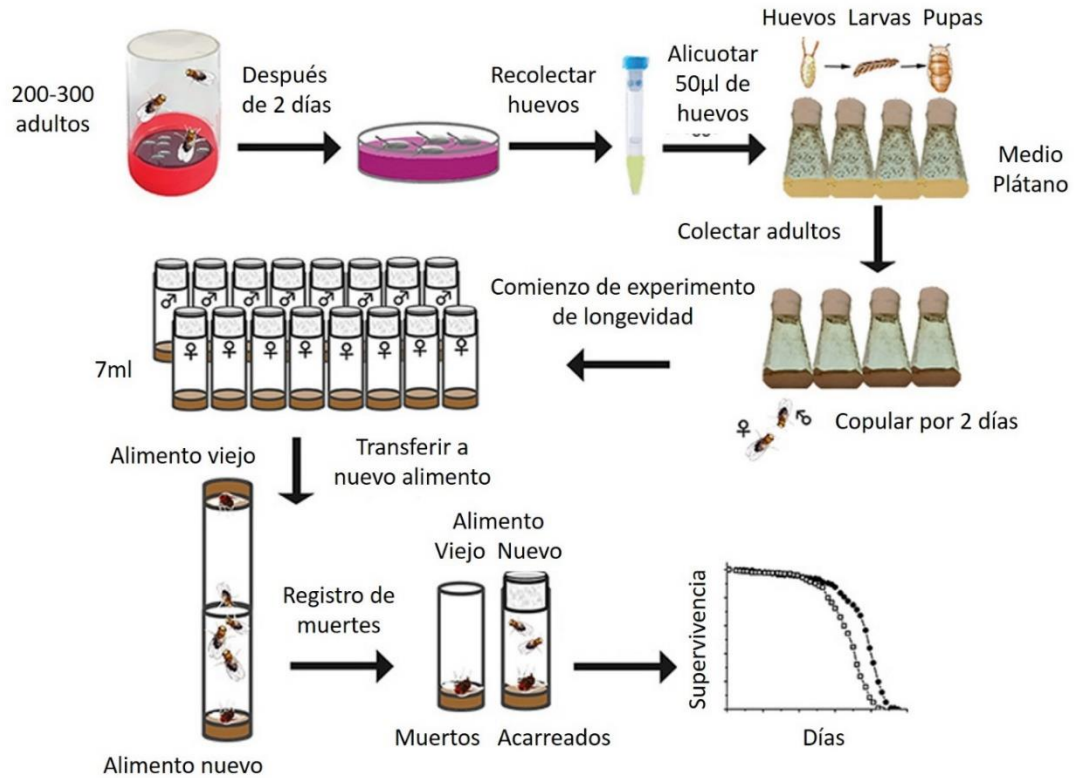
Para analizar si el efecto que tiene el complejo SWR1 (Tip60) en el tiempo de vida *S. cerevisiae* está conservado en *D. melanogaster*, se implementó un método para medir la longevidad en la mosca de la fruta (Métodos-Estandarización de método de longevidad en *Drosophila*, Figura 7.1). Se analizaron cuatro mutantes de genes del complejo Tip60: *Yeti*<sup>KV00363</sup>/*SWC5*, *YL-1*<sup>SH1685</sup>/*VPS72*, *Eaf6*<sup>d06605</sup>/*EAF6*, y tres alelos mutantes del gen domino (*SWR1*): *dom*<sup>k08108</sup>, *dom*<sup>3</sup>, *dom*<sup>6</sup>, además de la mutante longeva *Indy*<sup>206</sup> como control. Se establecieron seis retrocruzas de cada mutante con tres fondos genéticos distintos (Apéndice C-Cruzas *Drosophila melanogaster*). Se midió el tiempo de vida de las réplicas biológicas de cada mutante (Tabla 5.1) durante 109 días, manteniendo las moscas en viales con medio SY al 10 %. Se calculó la mediana del porcentaje de supervivencia de cada una de las mutantes (Figura 7.2) y en base a una prueba de *log-rank* se identificó a las mutantes cuya supervivencia fue significativamente diferente a la de la referencia.

Se observó que el efecto de las distintas mutantes en el tiempo de vida depende del fondo genético, y que no hay diferencias entre los sexos (Figura 7.3). Las mutantes *dom*<sup>k08108</sup>, *Eaf6*<sup>d06605</sup> e *Indy*<sup>206</sup>, en el fondo genético *y*<sup>1</sup>*w*<sup>1</sup>, tienen un tiempo de vida significativamente más corto que el control independientemente del sexo que se trate (Figura 7.3 c y d). Sin embargo, el tiempo de vida de estas tres mutantes en el fondo genético *w*<sup>1118</sup> es el mismo que el del control (Figura 7.3 a y b). Las otras dos mutantes del gen domino (*dom*<sup>3</sup>, *dom*<sup>9</sup>) tampoco muestran diferencias en el tiempo de vida en el fondo genético *Sp/CyO* (Figura 7.3 e y f). No se observó un efecto significativo en la longevidad de las mutantes *Yeti*<sup>KV00363</sup> y *YL-1*<sup>SH1685</sup>. No obstante, podemos observar que tanto las hembras como los machos mutantes de *Yeti*<sup>KV00363</sup> en

el fondo genético  $y^1w^1$  muestran una tendencia a un tiempo de vida corto, contrario a lo que sucede en el fondo genético  $w^{1118}$  donde tienden a ser longevas. Así mismo, la mutante  $YL-1^{SH1685}$  en ambos fondos genéticos tiende a ser de vida corta.

Reportes previos (Wang *et al.*, 2009; Rogina *et al.*, 2013; Rogina *et al.*, 2000) señalan que  $Indy^{206}$  --la mutante control longeva en nuestros experimentos-- tiende a mostrar tiempos de vida extendidos en distinta medida dependiendo del fondo genético de la mutante y también de si es homociga o heterociga. Nosotros analizamos mutantes homocigas y observamos que en ambos fondos genéticos ( $y^1w^1$  y  $w^{1118}$ ) se reduce su tiempo de vida (Figura 7.3 c, d, a y b).

Las mutantes *knock-out* sencillas de los homólogos de *Yeti*,  $YL-1$ ,  $Eaf6$ ,  $dom$  e  $Indy$  en *S. cerevisiae* presentan un tiempo de vida extendido, mientras que en *D. melanogaster* las mutantes no solo no son longevas, sino de vida corta al menos en uno de los fondos genéticos probados (Figura 7.3 c y d). Estos resultados sugieren que, aunque el complejo Tip60 no tiene el mismo efecto a lo que se encontró en levadura, sí está involucrado en la modificación del tiempo de vida.



**Figura 7.1.- Estandarización de método para medir longevidad en moscas de la fruta.** Modificado de Linford *et al.* (2013). De 200 a 300 moscas adultas fueron puestas en trampas para colección de embriones. Después de dos días se colectaron embriones y se transfirieron a botellas de fondo cuadrado con medio de plátano. A los nueve días se transfirieron los adultos que emergieron a botellas nuevas y se dejó que copularan durante dos días. Posteriormente los adultos se separaron por sexo y se transfirieron en grupos de 30 individuos a viales con 7 mL de alimento (cada vial es una réplica biológica). Cada dos días, las moscas se transfirieron a viales con alimento nuevo y se registraron los individuos muertos tanto en el vial viejo como en el nuevo. Finalmente se realizó el análisis de supervivencia.

**Tabla 5.1.** Número de réplicas biológicas por mutante y significancia en supervivencia.

Mutante	Sexo	Fondo genético	Replicas Biológicas	<i>P</i> -value ( <i>log-rank</i> ) <sup>a</sup>
<i>Yeti</i> <sup>KV00363</sup>	Hembras	<i>w</i> <sup>1118</sup>	3	>0.5
		<i>y</i> <sup>1</sup> <i>w</i> <sup>1</sup>	7	0.1
	Machos	<i>w</i> <sup>1118</sup>	3	>0.5

		$y^1 w^1$	6	0.3
<i>YL-1</i> <sup>SH1685</sup>	Hembras	$w^{1118}$	2	>0.5
		$y^1 w^1$	8	>0.5
	Machos	$w^{1118}$	3	>0.5
		$y^1 w^1$	7	0.4
<i>dom</i> <sup>k08108</sup>	Hembras	$w^{1118}$	5	>0.5
		$y^1 w^1$	7	0.02
	Machos	$w^{1118}$	4	>0.5
		$y^1 w^1$	3	0.08
<i>Eaf6</i> <sup>d06605</sup>	Hembras	$w^{1118}$	8	>0.5
		$y^1 w^1$	8	0.01
	Machos	$w^{1118}$	8	>0.5
		$y^1 w^1$	8	0.03
<i>Indy</i> <sup>206</sup>	Hembras	$w^{1118}$	8	>0.5
		$y^1 w^1$	8	0.03
	Machos	$w^{1118}$	8	>0.5
		$y^1 w^1$	8	0.05
<i>dom</i> <sup>3</sup>	Hembras	<i>Sp/CyO</i>	9	>0.5
	Machos	<i>Sp/CyO</i>	7	>0.5
<i>dom</i> <sup>9</sup>	Hembras	<i>Sp/CyO</i>	3	0.3
	Machos	<i>Sp/CyO</i>	3	>0.5

a) Valor obtenido con la prueba log-rank comparando cada mutante con el control correspondiente.

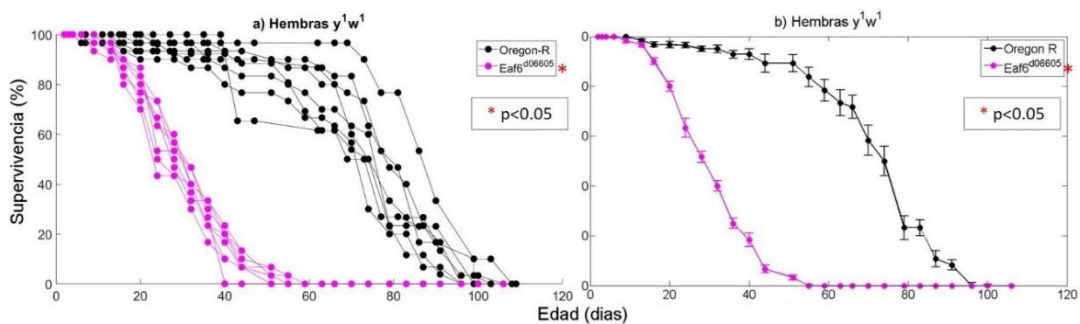
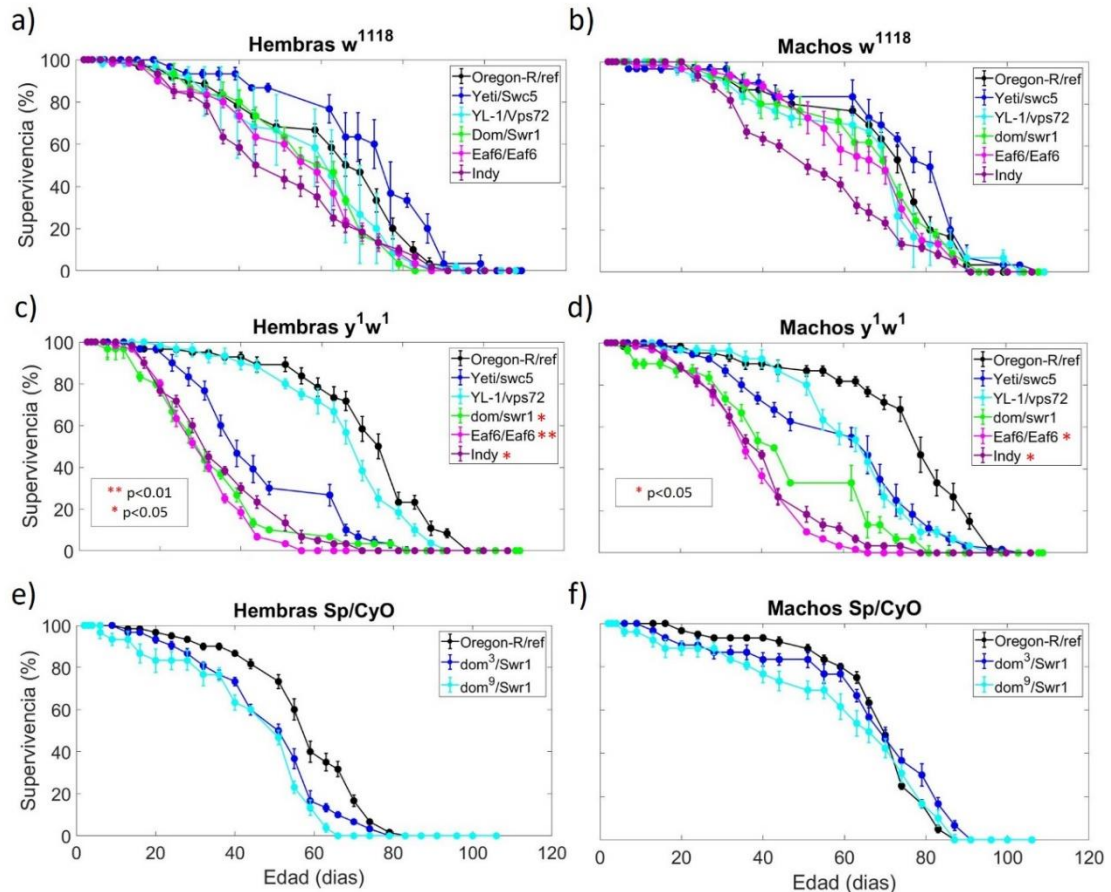


Figura 7.2.- Supervivencia de hembras mutantes *Eaf6* en el fondo genético  $y^1 w^1$ .

a) Curvas de supervivencia de las réplicas biológicas. *Eaf6*<sup>d06605</sup> (rosa) y cepa silvestre



Oregon-R como control o referencia (negro). **b)** Curvas de supervivencia con la mediana obtenida a partir de las réplicas biológicas. Las barras de error representan la desviación estándar de seis réplicas biológicas de *Eaf6<sup>d06605</sup>* y ocho de Oregon-R. Las mutantes *Eaf6<sup>d06605</sup>* tienen un tiempo de vida significativamente más corto que la referencia (*Log-Rank*, \**p-value*<0.05).



**Figura 7.3.- Efecto de mutaciones en subunidades del complejo Tip60 en el tiempo de vida de *D. melanogaster* en tres fondos genéticos (*w<sup>1118</sup>*, *y<sup>1</sup>w<sup>1</sup>*, *Sp/CyO*).** Curvas de supervivencia de las réplicas biológicas de cada mutante en diferentes fondos genéticos, las barras de error representan la desviación estándar de las réplicas biológicas. Mutantes de *D. melanogaster* (color) cepa silvestre Oregon-R como control o referencia (negro). Para cada mutante se menciona el gen homólogo en *S. cerevisiae* en la leyenda. **a)** y **b)** hembras y machos en el fondo genético *w<sup>1118</sup>*, respectivamente. No hay diferencia significativa entre los tiempos de vida de las mutantes respecto a la referencia. **c)** y **d)** hembras y machos en el fondo genético *y<sup>1</sup>w<sup>1</sup>* respectivamente. Las mutantes *dom<sup>k08108</sup>*, *Eaf6<sup>d06605</sup>* e *Indy<sup>206</sup>* viven

significativamente menos que la referencia **e)** y **f)** hembras y machos en el fondo genético *Sp/CyO* respectivamente. No hay diferencias significativas entre los tiempos de vida de las mutantes respecto a la referencia. (*Log-Rank*, **\*\****p-value*<0.01, **\****p-value*<0.05).

## Discusión

### Los complejos modificadores de cromatina afectan de manera distinta el tiempo de vida cronológico de levadura

La evaluación del efecto en el tiempo de vida cronológico de la delección de las subunidades del complejo SWR1 y los equivalentes homólogos del complejo Tip60 fue realizada por dos métodos masivos (Murakami et al., 2009; Garay et al., 2014). Los resultados de este trabajo sugieren que, tal como fue observado por Garay et al., 2014, la delección de *SWR1*, el gen que codifica para la subunidad principal del complejo SWR1, aumenta el tiempo de vida cronológico de levadura. Más aún, los resultados muestran que no sólo la delección de *SWR1* sino la delección de cualquier subunidad que pertenece al complejo SWR1 tiene el mismo efecto.

Conocemos por estudios previos de caracterización de la función del complejo que la delección de ciertas subunidades (*Swr1*, *Arp6*, *Vps71*, *Vps72*, *Swc5*) no permite que se lleve a cabo el intercambio de la histona canónica H2A por la variante histónica H2A.Z (Kobor et al., 2004; Krogan et al., 2003; Lin et al., 2017; Sun y Luk, 2017). Consistente con dichos estudios, nuestros resultados sugieren que el tiempo de vida cronológico de la levadura aumenta cuando no se lleva a cabo el intercambio de la histona canónica por la variante. Cuando eliminamos el gen *HTZ1* que codifica para la variante histónica H2A.Z, observamos el mismo efecto, una extensión de vida de la levadura. Es importante señalar que la magnitud del efecto medido con alta resolución por el método de envejecimiento competitivo resulta similar en todos estos casos.

Tvardovskiy et al. (2017) y Maze et al. (2015) observaron que la variante de histona H3.3 se acumula durante el envejecimiento. Pensamos que lo

mismo podría estar pasando con la variante de histona H2A.Z y que esto pudiera explicar los efectos observados. Esto no solamente en levadura, dado que las variantes histónicas H2A.Z y H2A.X están conservadas en humano (Rogakou et al., 2002). Algunas observaciones que nos llevan a nuestra hipótesis anterior son que se ha demostrado que H2A.Z reprime la transcripción de genes, ya que los nucleosomas que contienen H2A.Z están enriquecidos con la marca epigenética H3K27me3 (trimetilación de la lisina 27 de la cola de la histona 3) que se asocia a la represión transcripcional (Subramanian et al., 2015; Wang et al., 2018). Por otro lado, la sobreexpresión de H2A.Z ha sido asociada a distintos tipos de cáncer, incluyendo melanoma metastático, cáncer de mama, cáncer de vejiga y cáncer de próstata (Baptista et al., 2013; Hua et al., 2008; Kim et al., 2013; Svtelis et al., 2010; Vardabasso et al., 2015), lo que podría deberse a una inactivación de genes que regulen el ciclo celular provocado por un aumento en la expresión de H2A.Z. Será necesario analizar la acumulación de H2A.Z durante el envejecimiento de la levadura para corroborar si efectivamente pasa lo mismo que en el caso de la histona H3.3.

Es interesante señalar que la delección de la subunidad Swc7 que hasta el momento se ha reportado como una subunidad perteneciente sólo al complejo SWR1, no aumenta el tiempo de vida cronológico de levadura. Cabe mencionar que el tiempo de vida no tendría por qué extenderse si la causa es el intercambio de H2A.Z por H2A, dado que se observó que la ausencia de SWC7 no afecta el intercambio de histonas, ni es necesaria para que alguna otra subunidad se ensamble para formar el complejo (Lin et al., 2017). Sin embargo, hay estudios genéticos que señalan que SWC7 se comporta como un 'outlier', debido a que su perfil genético no correlaciona con el de las demás subunidades de SWR1 y forma un módulo distinto en un análisis de componentes principales (PCA). Dicho perfil genético se asocia más con el gen *IES6* que forma parte del complejo INO80, sugiriendo que Swc7 podría tener una función similar a *les6* independiente del complejo SWR1 (Beckwith et al., 2018).

Siguiendo con la idea de que la incapacidad de intercambio de la variante de histona H2A.Z por la histona canónica H2A aumenta el tiempo de vida cronológico de levadura, podríamos pensar que la eliminación del complejo NuA4, que acetila la histona H2A previo a que el complejo SWR1 haga el intercambio, también resultaría en una extensión en el tiempo de vida. Nuestros resultados por el método de competencia de cocultivos sugieren que esto podría ser cierto, sin embargo, no vemos un aumento significativo usando el método de cinética de crecimiento. Lo anterior podría probarse con la caracterización del tiempo de vida cronológico de la mutante *knock-out* de *Esa1*, que es la subunidad catalítica del complejo NuA4 que realiza la acetilación de H2A en levadura.

Nuestro análisis de las mutantes *knock-out* de dos subunidades del complejo RPD3, *Eaf3* y *Pho23*, mostró que ambas tienen un tiempo de vida significativamente más corto. Asimismo, especulamos que la ausencia del complejo RPD3, responsable de remover las marcas de acetilación de las colas de histona que son colocadas por las acetiltransferasas SAGA y NuA4 (Saha et al., 2006; Chen et al., 2013) podría resultar en una disminución en el tiempo de vida cronológico. Lo anterior solo si RPD3 remueve las mismas acetilaciones que cataliza NuA4. La delección de miembros del complejo RPD3 resultaría en una mayor acetilación por parte de NuA4 y, por tanto, una mayor tasa de intercambio de la histona H2A.Z por H2A

Los resultados anteriores sugieren que tanto el complejo SWR1 como los homólogos del complejo Tip60 afectan el tiempo de vida cronológico de levadura de diferente manera dependiendo de la modificación en la cromatina que realice el complejo al cuál pertenecen.

### Interacciones genéticas que median la extensión del tiempo de vida por falta del complejo SWR1

La evaluación de las interacciones genéticas entre *SWR1* y factores de envejecimiento se hizo con una colección pequeña de 307 genes, en

comparación con el genoma que tiene 6604 genes, pues solo nos interesaba incluir aquellos factores que han sido reportados por tener un efecto en el tiempo de vida cronológico de la levadura. Además, sólo se incluyeron algunos genes representativos de distintos complejos. Como producto de este análisis podemos seguir de una manera más precisa aquellos interactores negativos que son quienes actúan directamente con *SWR1* (las que son longevas y con la falta de *SWR1* pierden su longevidad) y quienes son necesarios para la extensión de longevidad por la falta de *SWR1* (las que son de vida corta o neutrales y al eliminar *SWR1* agravan su efecto).

En el caso de los que actúan directamente con *SWR1* para la extensión de longevidad tenemos principalmente genes que forman parte de complejos modificadores de cromatina. En particular tenemos el caso de *SWC3* quien resultó estar dentro del corte del 15% más atípico y es un miembro del complejo *SWR1*, lo que sugirió que el método efectivamente está recuperando asociaciones funcionales conocidas. También tenemos el caso de *FKH2* y *FKH1*, quienes parecen tener roles parcialmente redundantes en la activación y regulación periódica de genes (Zhu et al., 2000), evidencia de lo que encontramos en interacción con *SWR1* quien parece actuar en la misma vía que *FKH2*, y que al faltar *SWR1* (como si faltara *FKH2*) se activa la vía de *FKH1*. En el caso de las que son necesarias para la extensión de longevidad por falta de *SWR1* encontramos también subunidades que forman parte de complejos modificadores de cromatina que requieren de ATP (*Snf6*) como el complejo *SWR1*, así como reguladores de la transcripción. Otro resultado interesante y que requiere de investigación con más detalle es la extensión de longevidad por la falta de *SWR1* en una vía independiente de Ras/CA/PKA, la mejor descrita en levadura.

Agregar discusión de lo nuevo

Hasta el momento conocemos la letalidad existente entre los interactores negativos de la subunidad *Swr1* con el complejo *SWR1* y los homólogos de *Tip60*, pero es necesario caracterizar el fenotipo en el tiempo

de vida cronológico de las dobles mutantes generadas para probar el efecto que se observó. Recuperamos el fenotipo de letalidad reportado entre dos subunidades de complejos modificadores de la cromatina con el complejo SWR1, la subunidad Eaf7 del complejo NuA4 y la subunidad Pho23 del complejo RPD3, quienes tienen interacción letal con el complejo SWR1. También recuperamos el fenotipo de letalidad reportado con BRE2, una subunidad que forma parte del complejo COMPASS, quien interesantemente es letal con todas las subunidades del complejo SWR1 excepto con Swc7 y Bdf1.

Para validar y conocer de forma más precisa la vía por la cual el complejo SWR1 está provocando un aumento en el tiempo de vida deberán realizarse interacciones puntuales entre los genes que resulten más relevantes. Así como realizar ensayos transcriptómicos tanto de *swr1Δ* como de *htz1Δ* en distintos periodos de tiempo conforme va envejeciendo la célula para elucidar de forma más precisa los cambios provocados por el intercambio de la histona H2A por H2A.Z en el envejecimiento, y finalmente, evaluar si los niveles de H2A.Z cambian conforme envejece la célula y si este cambio es la causa de un aumento en la extensión del tiempo de vida.

### Conservación del complejo SWR1 como factor de envejecimiento

Los estudios previos sobre el envejecimiento en aislados naturales de levadura se han enfocado al análisis de los mecanismos subyacentes que modulan el envejecimiento y la longevidad, usando datos transcriptómicos, proteómicos, metabolómicos y morfológicos, para identificar mecanismos, rutas y genes asociados con la variación natural en el tiempo de vida (Stumpferl et al., 2012; Jung et al., 2018; Kaya et al., 2015; Barre et al., 2019). Sin embargo, hasta la fecha no se había realizado un análisis del efecto de deleciones de genes involucrados en la extensión del tiempo de vida en aislados naturales, previamente identificados en cepas de laboratorio.

Nosotros evaluamos el efecto de la delección de *SWR1* en el tiempo de vida cronológico en cinco aislados naturales (Y12, YJM978, YJM981, Y55, L-1374) de *S. cerevisiae* provenientes de diferentes partes del mundo y observamos una tendencia hacia la extensión del tiempo de vida. Primeramente, demostramos que el efecto observado en la cepa de laboratorio no es un artefacto debido a las mutaciones acumuladas en su genoma. Así mismo, encontramos que el hallazgo previo de la función de *SWR1* como factor de envejecimiento identificado en un ambiente de laboratorio puede trasladarse al entorno natural, implicando conservación a nivel intraespecie. Cabe resaltar, que no en todos los casos se observó un aumento significativo en la extensión del tiempo de vida por la falta de *Swr1*, tal efecto puede deberse a mutaciones propias de cada fondo genético probado, tales mutaciones podrían estar causando el mismo efecto que el encontrado con los interactores negativos de *Swr1* que son necesarios para la extensión del tiempo de vida por la ausencia de *SWR1*.

Siguiendo con la idea de analizar la conservación del complejo *SWR1* como factor de envejecimiento, caracterizamos su efecto en el tiempo de vida de un metazoario como *Drosophila*, donde se ha reportado que el complejo es necesario para la supervivencia (Kusch et al., 2004; Cai et al., 2005). Para ello fue necesario implementar el método para medir la longevidad en la mosca de la fruta. Así mismo, se homogeneizó el fondo genético de las mutantes analizadas, evaluando el envejecimiento en tres fondos genéticos distintos. Se sabe que los genes de *Drosophila Yeti*, *YL1* y *domino*, homólogos de *SWC5*, *VPS72* y *SWR1* respectivamente, son necesarios para llevar a cabo el intercambio de la histona H2A.Z por H2A, teniendo por tanto las mismas funciones que las reportadas en levadura (Messina et al., 2014; Liang et al., 2016; Wu et al., 2005). A pesar de estas consideraciones, los resultados sugieren que estos factores participan también en el envejecimiento, aunque con efecto contrario. Lo cual confirma que estos complejos están involucrados en envejecimiento también en animales. Otra observación digna de resaltar es que en *Drosophila* al igual que en *Saccharomyces*, se observó que el efecto

en el tiempo de vida debido al complejo SWR1 depende del fondo genético en el cuál se estén evaluando las mutantes.

El hecho de que en *Drosophila* el complejo Tip60 también estar de alguna manera modificando el tiempo de vida, da lugar para continuar investigando la relación del complejo con los cambios provocados por éste en animales, tales como funciones que involucren modificaciones específicas en algunos tejidos y si provoca cambios en el estado de salud de las moscas adultas.

## Conclusiones

El complejo SWR1 como factor de envejecimiento provoca un aumento en el tiempo de vida cronológico de levadura debido a su delección. En este estudio encontramos que el aumento en el tiempo de vida por la delección de SWR1 es consecuencia de que no se intercambie la histona H2A por la variante de histona H2A.Z, pues únicamente en la delección de aquellas subunidades del complejo que participan de una manera activa en el intercambio observamos un aumento en longevidad. Por un lado, el aumento en la longevidad se mantiene cuando cambiamos el fondo genético en el cuál probamos la delección de la subunidad catalítica del complejo (Swr1) y por otro el homólogo del complejo SWR1 en animales, el complejo Tip60, resultó también estar involucrado en el envejecimiento de *Drosophila*. Sugiriendo que el efecto del complejo SWR1, un modificador de cromatina que requiere ATP, en el envejecimiento está conservado en levaduras y animales. Además, el aumento en el tiempo de vida debido a la delección de SWR1 parece no estar en la misma vía que Ras/AC/PKA y sí estar relacionado con otros modificadores de cromatina y con algunos reguladores de la transcripción.

Modelo esquemático



## Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos, las perspectivas de trabajos en un futuro inmediato se pueden dividir en tres partes:

- 1) Analizar si la acumulación de H2A.Z aumenta con el envejecimiento y si es la causa por la cual la delección del complejo SWR1 aumenta el tiempo de vida cronológico en levadura. Así como probar el efecto en el envejecimiento de la delección de los complejos involucrados en el posicionamiento de la variante histónica H2A.Z, tales como NuA4, INO80 y RPD3.
- 2) Caracterizar el tiempo de vida cronológico de las dobles mutantes generadas (~1,300) para analizar en principio, las interacciones entre los complejos y si los interactores encontrados con Swr1 actúan directamente con el complejo SWR1 para la extensión de longevidad. Así como elucidar las funciones que regula *SWR1* dentro de la célula.
- 3) Finalmente, relacionados con la conservación del efecto del complejo SWR1 en el envejecimiento introduciendo más replicas biológicas para reducir la variación en las mediciones, lo cual fue un problema para el análisis del efecto tanto en aislados naturales de levadura como en *Drosophila*. Así como probar el efecto en el envejecimiento de las subunidades principales de los complejos: INO80, NuA4 y de la variante histónica H2A.Z, tanto en aislados naturales como en distintos fondos genéticos de *Drosophila*.

## Referencias bibliográficas

**Altaf**, M., Auger, A., Monnet-Saksouk, J., Brodeur, J., Piquet, S., Cramet, M., Bouchard, N., Lacoste, N., Utley, R., Gaudreau, L. and Côté, J. (2010). NuA4-dependent Acetylation of Nucleosomal Histones H4 and H2A Directly Stimulates Incorporation of H2A.Z by the SWR1 Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 285(21), pp.15966-15977.

- Ashrafi**, K., Sinclair, D., Gordon, J. and Guarente, L. (1999). Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16), pp.9100-9105.
- Baptista**, T., Graça, I., Sousa, E., Oliveira, A., Costa, N., Costa-Pinheiro, P., Amado, F., Henrique, R. and Jeronimo, C. (2013). Regulation of histone H2A.Z expression is mediated by sirtuin 1 in prostate cancer. *Oncotarget*, 4(10).
- Barré**, B., Hallin, J., Yue, J., Persson, K., Mikhalev, E., Irizar, A., Thompson, D., Molin, M., Warringer, J. and Liti, G. (2019). Intragenic repeat expansions control yeast chronological aging. *bioRxiv*.
- Becker**, P. and Workman, J. (2013). Nucleosome Remodeling and Epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), pp.a017905-a017905.
- Beckwith**, S., Schwartz, E., García-Nieto, P., King, D., Gowans, G., Wong, K., Eckley, T., Paraschuk, A., Peltan, E., Lee, L., Yao, W. and Morrison, A. (2018). The INO80 chromatin remodeler sustains metabolic stability by promoting TOR signaling and regulating histone acetylation. *PLoS Genetics*, 14(2), p.e1007216.
- Billon**, P. and Côté, J. (2012). Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(3-4), pp.290-302.
- Bouska**, M., Huang, K., Kang, P. and Bai, H. (2019). Organelle aging: Lessons from model organisms. *Journal of Genetics and Genomics*, 46(4), pp.171-185.
- Bozcuk**, A. N. (1972). DNA synthesis in the absence of somatic cell division associated with ageing in *Drosophila subobscura*. *Exp, Geront. Vol 7*, pp. 147-156.
- Brahma**, S., Udugama, M., Kim, J., Hada, A., Bhardwaj, S., Hailu, S., Lee, T. and Bartholomew, B. (2017). INO80 exchanges H2A.Z for H2A by translocating on DNA proximal to histone dimers. *Nature Communications*, 8(1).
- Büttner**, S., Ruli, D., Vögtle, F., Galluzzi, L., Moitzi, B., Eisenberg, T., Kepp, O., Habernig, L., Carmona-Gutiérrez, D., Rockenfeller, P., Laun, P., Breitenbach, M., Khoury, C., Fröhlich, K., Rechberger, G., Meisinger, C., Kroemer, G. and Madeo, F. (2011). A yeast BH3-only protein mediates the mitochondrial pathway of apoptosis. *The EMBO Journal*, 30(14), pp.2779-2792.
- Cai**, Y., Jin, J., Florens, L., Swanson, S., Kusch, T., Li, B., Workman, J., Washburn, M., Conaway, R. and Conaway, J. (2005). The Mammalian YL1 Protein Is a Shared Subunit of the TRRAP/TIP60 Histone Acetyltransferase and SRCAP Complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), pp.13665-13670.
- Campos**, S., Avelar-Rivas, J., Garay, E., Juárez-Reyes, A. and DeLuna, A. (2018). Genomewide mechanisms of chronological longevity by dietary restriction in budding yeast. *Aging Cell*, 17(3), p.e12749.
- Cao**, X. and Dang, W. (2018). Histone Modification Changes During Aging. *Epigenetics of Aging and Longevity*, pp.309-328.
- Carmona-Gutiérrez**, D., Bauer, M., Ring, J., Knauer, H., Eisenberg, T., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Reisenbichler, A., Magnes, C., Rechberger, G., Birner-Gruenberger, R., Jungwirth, H., Fröhlich, K., Sinner, F., Kroemer, G. and Madeo, F. (2011). The propeptide of yeast cathepsin D inhibits programmed necrosis. *Cell Death & Disease*, 2(5), pp.e161-e161.
- Chen**, X., Kuryan, B., Kitada, T., Tran, N., Li, J., Kurdistani, S., Grunstein, M., Li, B. and Carey, M. (2012). The Rpd3 Core Complex Is a Chromatin Stabilization Module. *Current Biology*, 22(1), pp.56-63.

**Clancy, D.** (2001). Extension of Life-Span by Loss of CHICO, a Drosophila Insulin Receptor Substrate Protein. *Science*, 292(5514), pp.104-106.

**Contrepois, K., Coudereau, C., Benayoun, B., Schuler, N., Roux, P., Bischof, O., Courbeyrette, R., Carvalho, C., Thuret, J., Ma, Z., Derbois, C., Nevers, M., Volland, H., Redon, C., Bonner, W., Deleuze, J., Wiel, C., Bernard, D., Snyder, M., Rübe, C., Olasso, R., Fenaille, F. and Mann, C.** (2017). Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. *Nature Communications*, 8(1).

**Cubillos, F., Louis, E. and Liti, G.** (2009). Generation of a large set of genetically tractable haploid and diploid *Saccharomyces* strains. *FEMS Yeast Research*, 9(8), pp.1217-1225.

**Dang, W., Steffen, K., Perry, R., Dorsey, J., Johnson, F., Shilatifard, A., Kaeberlein, M., Kennedy, B. and Berger, S.** (2009). Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature*, 459(7248), pp.802-807.

**Dang, W., Sutphin, G., Dorsey, J., Otte, G., Cao, K., Perry, R., Wanat, J., Saviolaki, D., Murakami, C., Tsuchiyama, S., Robison, B., Gregory, B., Vermeulen, M., Shiekhattar, R., Johnson, F., Kennedy, B., Kaeberlein, M. and Berger, S.** (2014). Inactivation of Yeast Isw2 Chromatin Remodeling Enzyme Mimics Longevity Effect of Calorie Restriction via Induction of Genotoxic Stress Response. *Cell Metabolism*, 19(6), pp.952-966.

**Demontis, F. and Perrimon, N.** (2010). FOXO/4E-BP Signaling in Drosophila Muscles Regulates Organism-wide Proteostasis during Aging. *Cell*, 143(5), pp.813-825.

**Doyon, Y. and Côté, J.** (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14(2), pp.147-154.

**Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., Fussi, H., Deszcz, L., Hartl, R., Schraml, E., Criollo, A., Megalou, E., Weiskopf, D., Laun, P., Heeren, G., Breitenbach, M., Grubeck-Loebenstien, B., Herker, E., Fahrenkrog, B., Fröhlich, K., Sinner, F., Tavernarakis, N., Minois, N., Kroemer, G. and Madeo, F.** (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell Biology*, 11(11), pp.1305-1314.

**Eissenberg, J., Wong, M. and Chrivia, J.** (2005). Human SRCAP and Drosophila melanogaster DOM Are Homologs That Function in the Notch Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 25(15), pp.6559-6569.

**Ewens, C., Su, M., Zhao, L., Nano, N., Houry, W. and Southworth, D.** (2016). Architecture and Nucleotide-Dependent Conformational Changes of the Rvb1-Rvb2 AAA+ Complex Revealed by Cryoelectron Microscopy. *Structure*, 24(5), pp.657-666.

**Fabrizio, P.** (2001). Regulation of Longevity and Stress Resistance by Sch9 in Yeast. *Science*, 292(5515), pp.288-290.

**Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L., Diaspro, A., Dossen, J., Gralla, E. and Longo, V.** (2004). Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 166(7), pp.1055-1067.

**Fabrizio, P. and Longo, V.** (2007). The Chronological Life Span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology*, pp.89-95.

**Fabrizio, P. and Longo, V.** (2003). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*, 2(2), pp.73-81.

**Flaus, A.** (2006). Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Research*, 34(10), pp.2887-2905.

**Fontana, L., Partridge, L. and Longo, V.** (2010). Extending Healthy Life Span--From Yeast to Humans. *Science*, 328(5976), pp.321-326.

- Garay**, E., Campos, S., González de la Cruz, J., Gaspar, A., Jinich, A. and DeLuna, A. (2014). High-Resolution Profiling of Stationary-Phase Survival Reveals Yeast Longevity Factors and Their Genetic Interactions. *PLoS Genetics*, 10(2), p.e1004168.
- Gevry**, N., Chan, H., Laflamme, L., Livingston, D. and Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes & Development*, 21(15), pp.1869-1881.
- Giaino**, B., Ferrante, F., Herchenröther, A., Hake, S. and Borggrefe, T. (2019). The histone variant H2A.Z in gene regulation. *Epigenetics & Chromatin*, 12(1).
- Gietz**, R. and Woods, R. (n.d.). Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. *Yeast Protocols*, pp.107-120.
- Greer**, E., Maures, T., Hauswirth, A., Green, E., Leeman, D., Maro, G., Han, S., Banko, M., Gozani, O. and Brunet, A. (2010). Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature*, 466(7304), pp.383-387.
- Guarente**, Leonard. (2000). Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes and Development*. 14:1021-1026.
- Harrison**, D., Strong, R., Sharp, Z., Nelson, J., Astle, C., Flurkey, K., Nadon, N., Wilkinson, J., Frenkel, K., Carter, C., Pahor, M., Javors, M., Fernandez, E. and Miller, R. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460(7253), pp.392-395.
- He**, Y. and Jasper, H. (2014). Studying aging in *Drosophila*. *Methods*, 68(1), pp.129-133.
- Helfand**, S. and Rogina, B. (2003). Genetics of Aging in the Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Genetics*, 37(1), pp.329-348.
- Helfand**, S. and Rogina, B. (2003). Molecular genetics of aging in the fly: Is this the end of the beginning?. *BioEssays*, 25(2), pp.134-141.
- Hong**, J., Feng, H., Wang, F., Ranjan, A., Chen, J., Jiang, J., Ghirlando, R., Xiao, T., Wu, C. and Bai, Y. (2014). The Catalytic Subunit of the SWR1 Remodeler Is a Histone Chaperone for the H2A.Z-H2B Dimer. *Molecular Cell*, 53(3), pp.498-505.
- Hsu**, A. (2003). Regulation of Aging and Age-Related Disease by DAF-16 and Heat-Shock Factor. *Science*, 300(5622), pp.1142-1145.
- Hua**, S., Kallen, C., Dhar, R., Baquero, M., Mason, C., Russell, B., Shah, P., Liu, J., Khramtsov, A., Tretiakova, M., Krausz, T., Olopade, O., Rimm, D. and White, K. (2008). Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Molecular Systems Biology*, 4.
- Hwangbo**, D., Gersham, B., Tu, M., Palmer, M. and Tatar, M. (2004). *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature*, 429(6991), pp.562-566.
- Iliadi**, K., Knight, D. and Boulianne, G. (2012). Healthy Aging – Insights from *Drosophila*. *Frontiers in Physiology*, 3.
- Ito**, K. and Hotta, Y. (1992). Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 149(1), pp.134-148.
- Johnson**, T. (2007). *Caenorhabditis elegans* 2007: The premier model for the study of aging. *Experimental Gerontology*.

- Jung**, P., Zhang, Z., Paczia, N., Jaeger, C., Ignac, T., May, P. and Linster, C. (2018). Natural variation of chronological aging in the *Saccharomyces cerevisiae* species reveals diet-dependent mechanisms of life span control. *npj Aging and Mechanisms of Disease*, 4(1).
- Kaeberlein**, M. (2005). Regulation of Yeast Replicative Life Span by TOR and Sch9 in Response to Nutrients. *Science*, 310(5751), pp.1193-1196.
- Kaya**, A., Ma, S., Wasko, B., Lee, M., Kaeberlein, M. and Gladyshev, V. (2015). Defining molecular basis for longevity traits in natural yeast isolates. *npj Aging and Mechanisms of Disease*, 1(1).
- Kenyon**, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A. and Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366(6454), pp.461-464.
- Kenyon**, C. (2005). The Plasticity of Aging: Insights from Long-Lived Mutants. *Cell*, 120(4), pp.449-460.
- Kenyon**, C. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, 464(7288), pp.504-512.
- Kim**, S., Benguria, A., Lai, C. and Jazwinski, S. (1999). Modulation of Life-span by Histone Deacetylase Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 10(10), pp.3125-3136.
- Kim**, K., Punj, V., Choi, J., Heo, K., Kim, J., Laird, P. and An, W. (2013). Gene dysregulation by histone variant H2A.Z in bladder cancer. *Epigenetics & Chromatin*, 6(1), p.34.
- Kobor**, M., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M., Gin, J., Jennings, J., Link, A., Madhani, H. and Rine, J. (2004). A Protein Complex Containing the Conserved Swi2/Snf2-Related ATPase Swr1p Deposits Histone Variant H2A.Z into Euchromatin. *PLoS Biology*, 2(5), p.e131.
- Krogan**, N., Keogh, M., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O., Ding, H., Haw, R., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., Richards, D., Wu, X., Emili, A., Hughes, T., Buratowski, S. and Greenblatt, J. (2003). A Snf2 Family ATPase Complex Required for Recruitment of the Histone H2A Variant Htz1. *Molecular Cell*, 12(6), pp.1565-1576.
- Kusch**, T. (2004). Acetylation by Tip60 Is Required for Selective Histone Variant Exchange at DNA Lesions. *Science*, 306(5704), pp.2084-2087.
- Larson**, K., Yan, S., Tsurumi, A., Liu, J., Zhou, J., Gaur, K., Guo, D., Eickbush, T. and Li, W. (2012). Heterochromatin Formation Promotes Longevity and Represses Ribosomal RNA Synthesis. *PLoS Genetics*, 8(1), p.e1002473.
- Li**, L., Greer, C., Eisenman, R. and Secombe, J. (2010). Essential Functions of the Histone Demethylase Lid. *PLoS Genetics*, 6(11), p.e1001221.
- Liang**, X., Shan, S., Pan, L., Zhao, J., Ranjan, A., Wang, F., Zhang, Z., Huang, Y., Feng, H., Wei, D., Huang, L., Liu, X., Zhong, Q., Lou, J., Li, G., Wu, C. and Zhou, Z. (2016). Structural basis of H2A.Z recognition by SRCAP chromatin-remodeling subunit YL1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(4), pp.317-323.
- Lin**, C., Chaban, Y., Rees, D., McCormack, E., Ocloo, L. and Wigley, D. (2017). Functional characterization and architecture of recombinant yeast SWR1 histone exchange complex. *Nucleic Acids Research*, 45(12), pp.7249-7260.
- Linford**, N., Bilgic, C., Ro, J. and Pletcher, S. (2013). Measurement of Lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Visualized Experiments*, (71).
- Liti**, G., Carter, D., Moses, A., Warringer, J., Parts, L., James, S., Davey, R., Roberts, I., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I., Bergman, C., Bensasson, D., O'Kelly, M., van Oudenaarden, A., Barton, D., Bailes, E., Nguyen, A., Jones, M., Quail, M., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R. and Louis, E. (2009). Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*, 458(7236), pp.337-341.

**Longo, V., Shadel, G., Kaeberlein, M. and Kennedy, B. (2012).** Replicative and Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metabolism*, 16(1), pp.18-31.

**Longo, V. and Fabrizio, P. (2011).** Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Research in Yeast*, pp.101-121.

**López-Otín, C., Blasco, M., Partridge, L., Serrano, M. and Kroemer, G. (2013).** The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), pp.1194-1217.

**Luk, E., Ranjan, A., FitzGerald, P., Mizuguchi, G., Huang, Y., Wei, D. and Wu, C. (2010).** Stepwise Histone Replacement by SWR1 Requires Dual Activation with Histone H2A.Z and Canonical Nucleosome. *Cell*, 143(5), pp.725-736.

**Luk, E., Vu, N., Patteson, K., Mizuguchi, G., Wu, W., Ranjan, A., Backus, J., Sen, S., Lewis, M., Bai, Y. and Wu, C. (2007).** Chz1, a Nuclear Chaperone for Histone H2A.Z. *Molecular Cell*, 25(3), pp.357-368.

**Mortimer, R. and Johnston, J. (1959).** Life Span of Individual Yeast Cells. *Nature*, 183(4677), pp.1751-1752.

**Maze, I., Wenderski, W., Noh, K., Bagot, R., Tzavaras, N., Purushothaman, I., Elsässer, S., Guo, Y., Ionete, C., Hurd, Y., Tammimga, C., Halene, T., Farrelly, L., Soshnev, A., Wen, D., Rafii, S., Birtwistle, M., Akbarian, S., Buchholz, B., Blitzler, R., Nestler, E., Yuan, Z., Garcia, B., Shen, L., **Molina, H.** and Allis, C. (2015). Critical Role of Histone Turnover in Neuronal Transcription and Plasticity. *Neuron*, 87(1), pp.77-94.**

**McElwee, J., Schuster, E., Blanc, E., Piper, M., Thomas, J., Patel, D., Selman, C., Withers, D., Thornton, J., Partridge, L. and Gems, D. (2007).** Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. *Genome Biology*, 8(7), p.R132.

**Medvedik, O., Lamming, D., Kim, K. and Sinclair, D. (2007).** MSN2 and MSN4 Link Calorie Restriction and TOR to Sirtuin-Mediated Lifespan Extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biology*, 5(10), p.e261.

**Messina, G., Damia, E., Fanti, L., Atterato, M., Celauro, E., Mariotti, F., Accardo, M., Walther, M., Verni, F., Picchioni, D., Moschetti, R., Caizzi, R., Piacentini, L., Cenci, G., Giordano, E. and Dimitri, P. (2014).** Yeti, an essential *Drosophila melanogaster* gene, encodes a protein required for chromatin organization. *Journal of Cell Science*, 127(11), pp.2577-2588.

**Mizuguchi, G. (2004).** ATP-Driven Exchange of Histone H2A.Z Variant Catalyzed by SWR1 Chromatin Remodeling Complex. *Science*, 303(5656), pp.343-348.

**Morley, J. and Morimoto, R. (2004).** Regulation of Longevity in *Caenorhabditis elegans* by Heat Shock Factor and Molecular Chaperones. *Molecular Biology of the Cell*, 15(2), pp.657-664.

**Murakami, C. and Kaeberlein, M. (2009).** Quantifying Yeast Chronological Life Span by Outgrowth of Aged Cells. *Journal of Visualized Experiments*, (27).

**Oliveira-Arantes, N. (2003).** Healthy Animals with Extreme Longevity. *Science*, 302(5645), pp.611-611.

**Papamichos-Chronakis, M., Watanabe, S., Rando, O. and Peterson, C. (2011).** Global Regulation of H2A.Z Localization by the INO80 Chromatin-Remodeling Enzyme Is Essential for Genome Integrity. *Cell*, 144(2), pp.200-213.

**Partridge, L. and Gems, D. (2002).** Mechanisms of aging: public or private?. *Nature Reviews Genetics*, 3(3), pp.165-175.

**Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J., Pflieger, D., Bergström, A., Sigwalt, A., Barre, B., Freel, K., Llored, A., Cruaud, C., Labadie, K., Aury, J., Istance, B., Lebrigand, K., Barbry, P.,**

Engelen, S., Lemainque, A., Wincker, P., Liti, G. and Schacherer, J. (2018). Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*, 556(7701), pp.339-344.

**Piper**, M., Selman, C., McElwee, J. and Partridge, L. (2008). Separating cause from effect: how does insulin/IGF signalling control lifespan in worms, flies and mice?. *Journal of Internal Medicine*, 263(2), pp.179-191.

**Piper**, M. and Partridge, L. (2018). *Drosophila* as a model for ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864(9), pp.2707-2717.

**Pletcher**, S., Kabil, H. and Partridge, L. (2007). Chemical Complexity and the Genetics of Aging. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38(1), pp.299-326.

**Powers**, R. (2006). Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes & Development*, 20(2), pp.174-184.

**Ranjan**, A., Mizuguchi, G., FitzGerald, P., Wei, D., Wang, F., Huang, Y., Luk, E., Woodcock, C. and Wu, C. (2013). Nucleosome-free Region Dominates Histone Acetylation in Targeting SWR1 to Promoters for H2A.Z Replacement. *Cell*, 154(6), pp.1232-1245.

**Ranjan**, A., Wang, F., Mizuguchi, G., Wei, D., Huang, Y. and Wu, C. (2015). H2A histone-fold and DNA elements in nucleosome activate SWR1-mediated H2A.Z replacement in budding yeast. *eLife*, 4.

**Redon**, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(2), pp.162-169.

**Riedel**, C., Downen, R., Lourenco, G., Kirienko, N., Heimbucher, T., West, J., Bowman, S., Kingston, R., Dillin, A., Asara, J. and Ruvkun, G. (2013). DAF-16 employs the chromatin remodeller SWI/SNF to promote stress resistance and longevity. *Nature Cell Biology*, 15(5), pp.491-501.

**Rogakou**, E. and Sekeri-Pataryas, K. (1999). Histone variants of H2A and H3 families are regulated during in vitro aging in the same manner as during differentiation. *Experimental Gerontology*, 34(6), pp.741-754.

**Rogina**, B., Reenan, R., Nilsen, S. and Helfand, S. (2000). Extended Life-Span Conferred by Cotransporter Gene Mutations in *Drosophila*. *Science*, 290(5499), pp.2137-2140.

**Rogina**, B. and Helfand, S. (2013). Indy Mutations and *Drosophila* Longevity. *Frontiers in Genetics*, 4.

**Ruhl**, D., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M., Conaway, R., Conaway, J. and Chrivia, J. (2006). Purification of a Human SRCAP Complex That Remodels Chromatin by Incorporating the Histone Variant H2A.Z into Nucleosomes†. *Biochemistry*, 45(17), pp.5671-5677.

**Saha**, A., Wittmeyer, J. and Cairns, B. (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(6), pp.437-447.

**Shen**, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A. and Wu, C. (2000). A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature*, 406(6795), pp.541-544.

**Shen**, X. (2003). Preparation and Analysis of the INO80 Complex. *Chromatin and Chromatin Remodeling Enzymes, Part C*, pp.401-412.

**Singh**, R., Fan, J., Gioacchini, N., Watanabe, S., Bilsel, O. and Peterson, C. (2019). Transient Kinetic Analysis of SWR1C-Catalyzed H2A.Z Deposition Unravels the Impact of Nucleosome Dynamics and the Asymmetry of Histone Exchange. *Cell Reports*, 27(2), pp.374-386.e4.

- Smith, E., Tsuchiya, M., Fox, L., Dang, N., Hu, D., Kerr, E., Johnston, E., Tchao, B., Pak, D., Welton, K., Promislow, D., Thomas, J., Kaeberlein, M. and Kennedy, B. (2008).** Quantitative evidence for conserved longevity pathways between divergent eukaryotic species. *Genome Research*, 18(4), pp.564-570.
- Song, S. and Johnson, F. (2018).** Epigenetic Mechanisms Impacting Aging: A Focus on Histone Levels and Telomeres. *Genes*, 9(4), p.201.
- Stumpferl, S., Brand, S., Jiang, J., Korona, B., Tiwari, A., Dai, J., Seo, J. and Jazwinski, S. (2012).** Natural genetic variation in yeast longevity. *Genome Research*, 22(10), pp.1963-1973.
- Subramanian, V., Fields, P. and Boyer, L. (2015).** H2A.Z: a molecular rheostat for transcriptional control. *F1000Prime Reports*, 7.
- Sun, L. and Luk, E. (2017).** Dual function of Swc5 in SWR remodeling ATPase activation and histone H2A eviction. *Nucleic Acids Research*, 45(17), pp.9931-9946.
- Svotelis, A., Gévry, N., Grondin, G. and Gaudreau, L. (2010).** H2A.Z overexpression promotes cellular proliferation of breast cancer cells. *Cell Cycle*, 9(2), pp.364-370.
- Tatar, M. (2001).** A Mutant Drosophila Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function. *Science*, 292(5514), pp.107-110.
- Tissenbaum, H. and Guarente, L. (2001).** Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 410(6825), pp.227-230.
- Tramantano, M., Sun, L., Au, C., Labuz, D., Liu, Z., Chou, M., Shen, C. and Luk, E. (2016).** Constitutive turnover of histone H2A.Z at yeast promoters requires the preinitiation complex. *eLife*, 5.
- Tullet, J., Hertweck, M., An, J., Baker, J., Hwang, J., Liu, S., Oliveira, R., Baumeister, R. and Blackwell, T. (2008).** Direct Inhibition of the Longevity-Promoting Factor SKN-1 by Insulin-like Signaling in *C. elegans*. *Cell*, 132(6), pp.1025-1038.
- Tvardovskiy, A., Schwämmle, V., Kempf, S., Rogowska-Wrzesinska, A. and Jensen, O. (2017).** Accumulation of histone variant H3.3 with age is associated with profound changes in the histone methylation landscape. *Nucleic Acids Research*, 45(16), pp.9272-9289.
- Ucar, D. and Benayoun, B. (2018).** Aging Epigenetics. *Epigenetics of Aging and Longevity*, pp.3-32.
- Vardabasso, C., Gaspar-Maia, A., Hasson, D., Pünzeler, S., Valle-Garcia, D., Straub, T., Keilhauer, E., Strub, T., Dong, J., Panda, T., Chung, C., Yao, J., Singh, R., Segura, M., Fontanals-Cirera, B., Verma, A., Mann, M., Hernando, E., Hake, S. and Bernstein, E. (2015).** Histone Variant H2A.Z.2 Mediates Proliferation and Drug Sensitivity of Malignant Melanoma. *Molecular Cell*, 59(1), pp.75-88.
- Wang, P., Neretti, N., Whitaker, R., Hosier, S., Chang, C., Lu, D., Rogina, B. and Helfand, S. (2009).** Long-lived Indy and calorie restriction interact to extend life span. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(23), pp.9262-9267.
- Wang, F., Ranjan, A., Wei, D. and Wu, C. (2016).** Comment on "A histone acetylation switch regulates H2A.Z deposition by the SWR-C remodeling enzyme." *Science*, 353(6297), pp.358-358.
- Wang, Y., Long, H., Yu, J., Dong, L., Wassef, M., Zhuo, B., Li, X., Zhao, J., Wang, M., Liu, C., Wen, Z., Chang, L., Chen, P., Wang, Q., Xu, X., Margueron, R. and Li, G. (2018).** Histone variants H2A.Z and H3.3 coordinately regulate PRC2-dependent H3K27me3 deposition and gene expression regulation in mES cells. *BMC Biology*, 16(1).



**Wang, Y., Yuan, Q. and Xie, L. (2018).** Histone Modifications in Aging: The Underlying Mechanisms and Implications. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 13(2).

**Watanabe, S. and Peterson, C. (2016).** Response to Comment on "A histone acetylation switch regulates H2A.Z deposition by the SWR-C remodeling enzyme." *Science*, 353(6297), pp.358-358.

**Wei, M., Fabrizio, P., Madia, F., Hu, J., Ge, H., Li, L. and Longo, V. (2009).** Tor1/Sch9-Regulated Carbon Source Substitution Is as Effective as Calorie Restriction in Life Span Extension. *PLoS Genetics*, 5(5), p.e1000467.

**Willhoft, O., Ghoneim, M., Lin, C., Chua, E., Wilkinson, M., Chaban, Y., Ayala, R., McCormack, E., Ocloo, L., Rueda, D. and Wigley, D. (2018).** Structure and dynamics of the yeast SWR1-nucleosome complex. *Science*, 362(6411), p.p.7716.

**Wu, W., Alami, S., Luk, E., Wu, C., Sen, S., Mizuguchi, G., Wei, D. and Wu, C. (2005).** Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(12), pp.1064-1071.

**Wu, W., Wu, C., Ladurner, A., Mizuguchi, G., Wei, D., Xiao, H., Luk, E., Ranjan, A. and Wu, C. (2008).** N Terminus of Swr1 Binds to Histone H2AZ and Provides a Platform for Subunit Assembly in the Chromatin Remodeling Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 284(10), pp.6200-6207.

**Zhang, G., Li, J., Purkayastha, S., Tang, Y., Zhang, H., Yin, Y., Li, B., Liu, G. and Cai, D. (2013).** Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- $\beta$ , NF- $\kappa$ B and GnRH. *Nature*, 497(7448), pp.211-216.

**Zhu, G., Spellman, P., Volpe, T., Brown, P., Botstein, D., Davis, T. and Futcher, B. (2000).** Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature*, 406(6791), pp.90-94.

**Ziehm, M., Piper, M. and Thornton, J. (2013).** Analysing variation in Drosophila ageing across independent experimental studies: a meta-analysis of survival data. *Aging Cell*, 12(5), pp.917-922.

## Apéndices

### Apéndice A.- Lista de Primers

Nombre	Secuencia
YAF9_MXF1	TGTGACCACCTATTTACGGCATCACAAAGAAAGCGAGATGccagctgaagcttcgtacgc
VPS72_MXF1	TGGAAAAAACAGTAAGCAGAAAGCACCATGTAGTCTAATGccagctgaagcttcgtacgc
SWC3_MXF1	ATTATAGTGCAGAAGTAGTATACATAAAGGCATATGCATGGATGTCCACGAGCTCTCTccagctgaagcttcgtacgc
VPS71_MXF1	GAAGAAAAAGAACGGATCGCTTACTCATAACAGCGAAATGccagctgaagcttcgtacgc

SWC7_MXF1	CTTCGTTAGCTGCTGATAGGACTTCAAGATTCGTACGATGccagctgaagcttcgtacg c
HTZ1_MXF1	TTCGCACTATAGCCGCACGTAAAAATAACTTAACATAATGccagctgaagcttcgtacg c
EAF3_MXF1	GTGAGGCCTCGTCACTGGATTTACCCTATTGAAGAACGTATAATGccagctgaagc ttcgtacgc
EAF7_MXF1	GCTAGCTGCTAGTGAAGAAAAGGGAATCGTGGATGTGATGccagctgaagcttcgtac gc
PHO23_MXF1	AAACAGCAACCACGTTCCATAGTCTGAAATACGTACAAATGccagctgaagcttcgtacg c
EAF6_MXF1	ATCTTTCCGTTTGTACCAACCTACGCCTAGAAGAAAATGccagctgaagcttcgtacg c
BDF1_MXF1	TAAAAGGCGGTCAATCTCAACGGCTCTGATAAACGTACGTAATGccagctgaag cttcgtacgc
BDF2_MXF1	AAACTGAAACAAACAGATTGAGCGAAATAAACCTCGGCGGCTATGccagctgaag cttcgtacgc
YAF9_MXR2	CTGTTATGAAAATACCGTTGTTCCGGGTGCAGTGATCCTAtcogatgaattcgagctcggt
VPS72_MXR2	AATGTTTAACGACCTACCATTATATAGTCTGTCTCAATTAtcogatgaattcgagctcggt
SWC3_MXR2	ATAATGGCGTTAAAGCAGAATAAAGTAACCGAACACCTTAATCGATGAATTCCG AGCTCGtcogatgaattcgagctcggt
VPS71_MXR2	GGAGAAAAAAGGGCTTACGAATACATACTGATCATTACTAtcogatgaattcgagctcggt
SWC7_MXR2	GGAAAGAAAAAAAAAATTTGATCATCGTGTATACGTATTAtcogatgaattcgagctcggt
HTZ1_MXR2	GAGAATTACGGGAAATGGGAAAGAAAAACTATTCTTCTTAtcogatgaattcgagctcggt
EAF3_MXR2	AACTAAATACTAGAAATAATCCCAAGCTAGAATATAAACGTCTCAtcogatgaattcga gctcggt
EAF7_MXR2	TGAGCGTTTATTATCGCGATCTATATATGAGCAGTGATTAtcogatgaattcgagctcggt
PHO23_MXR2	GATATTTCTTAAGGCGATATTCGCCGAGAGCTATTTCAtcogatgaattcgagctcggt
EAF6_MXR2	CGGTCAAGCAACGTAAATACCAACGTGTGCTATCGCATTAtcogatgaattcgagctcggt
BDF1_MXR2	CATTCTTCTCAGTCGTTGAAGATAATCAAATTCAAAATTCAGTCAtcogatgaattcga gctcggt

BDF2_MXR2	TTCTTTTTTCCTTAATTAGGGCATGAAGCCCATTTTCGATTGTTAtcgatgaattcgag ctcgtt
YAF9_A	TGAACGTCTTACATATTGAACGAAA
VPS72_A	CATTAGGTAACGATATGCCCAGTTA
SWC3_A	TTCGACCGGACCTTTTTAAGTACGA
VPS71_A	TTGGAGTATTACAAAAACGACCATT
SWC7_A	TTTCGTATAGTTTGTGCTTAAACC
HTZ1_A	TCCATGCTAGATTAGCACACAGTAA
EAF3_A	TTTAAGCTGTGCTTGCTTTTTACTT
EAF7_A	ATTAGCCTTTCTTGGCATTATCTCT
PHO23_A	ATACTTGAAATAATTGAGGCACGTC
EAF6_A	GGTGACATACCCGTTCAITTTATTTA
BDF1_A	TTGGATTTACACTTTTGGCATATTT
BDF2_A	TTTAATAATAAAGCGGCAGAGAATG
YAF9_B	AACCTTTTCTATGCCGATCTCTATT
VPS72_B	AATCTTCATCATCTTCATCTTCCTG
SWC3_B	CTCCACACTAGCAGGCAGTCCC
VPS71_B	AATGGGAATTCTTACTATTTTCGGTC
SWC7_B	TATAATTGCACCAACTTGTGTGTCT
HTZ1_B	TATTCCAACACAGCAGTCAAATAAA
EAF3_B	CATTAATGATCTCTTCTGGAATGCT
EAF7_B	AAGTTTCTTCATGAATTTCTGCATC
PHO23_B	CACATTTTGCATCTATTTTCGTGTAG
EAF6_B	TGTCAAAGGTATCTTCTTGCTCTCT
BDF1_B	GGTATTGGATTCTGAGGGAGATTAT
BDF2_B	GGTATTTACTTTGGTGTGGTGGTAG
KanB	TTACGGCTCCTCGCTGCAGACC

SWC5_MXF1	GGAATAATATTGTTTCAAGAAAGAAAACCCACTAGCCTATAAATGccagctgaagct tcgtacgc
SWC5_MXR2	TTTGAGCAGAAAAGCATGTTATTTAATACATGTAATATTTGTCTAtcgtgaattcgag ctcggt
SWC5_A	TTACAGAAAGATTATTTAATGCCGC
SWC5_B	TTCTACCCTTATCTCTGTTACACC
ARP6_F1	GAAGAAGCGCAGAATCGTGGACAAGATAATTTAAACTATGccagctgaagcttcgtac gc
ARP6_R2	TCGGATTTTCATTGTTGCTATGTAATCTATAGTTAATTAtcgtgaattcgagctcgtt
ARP6_A	GCTTAGGTTAACTCGGTTTTCTACC
ARP6_B	AAAGACTGCTACAGGAGACTTGAAA
SWR1a_AA150	TAGCGGGATTCTAAAGTGTTTACG
SWR1rv_AA151	CACCAATTTCTATTTACCGGGT
206-B	TGAGTTTCTGCTCTCTCACTATAGGTC
His3_MXF1	AATATACTAAAAAATGAGCAGGCAAGATAAACGAAGGCAAAGATGccagctgaagc ttcgtacgc
His3_MXR2	TGTATATATATCGTATGCTGCAGCTTTAAATAATCGGTGTCACTAtcgtgaattcga gctcgtt
His3_A	TGACGACTTTTTCTTAATTCTCGTT
His3_B	CTATGTGTAAGTCACCAATGCCTC

## Apéndice B.- Lista de Genes (epistasis)

Mutante	s Ho	s SWR1	ds <sup>a</sup>
<b>Knock-out</b>			
<i>RPL34B</i>	0.0780	-0.0588	-0.1367
<i>COX10</i>	0.0709	-0.0211	-0.0920
<i>SSD1</i>	-0.0235	-0.0975	-0.0740
<i>IZH4</i>	-0.0082	-0.0609	-0.0527
<i>ICE2</i>	0.0332	-0.0146	-0.0478
<i>GLC3</i>	-0.0312	-0.0764	-0.0452
<i>PDA1</i>	0.0024	-0.0418	-0.0441
<i>RGT1</i>	-0.0249	-0.0688	-0.0439
<i>PTC6</i>	0.0263	-0.0173	-0.0436
<i>TOK1</i>	0.0029	-0.0401	-0.0430
<i>SWC3</i>	0.0491	0.0110	-0.0381
<i>VTA1</i>	0.0059	-0.0296	-0.0355
<i>OXR1</i>	-0.0410	-0.0762	-0.0351
<i>YLR455W</i>	0.0048	-0.0299	-0.0347
<i>YMR075C-</i>			
<i>A</i>	-0.0164	-0.0505	-0.0341
<i>BRE2</i>	-0.0260	-0.0583	-0.0323
<i>PMT2</i>	-0.0051	-0.0361	-0.0310
<i>KDX1</i>	0.0178	-0.0132	-0.0310
<i>YBR174C</i>	-0.0318	-0.0626	-0.0308
<i>SIP18</i>	-0.0156	-0.0462	-0.0307
<i>MXR2</i>	-0.0333	-0.0632	-0.0300

DOA1	-0.1051	-0.1349	-0.0298
CLA4	-0.0210	-0.0507	-0.0296
YJL206C	0.0134	-0.0161	-0.0295
SKP2	0.0188	-0.0106	-0.0294
HDA2	0.0244	-0.0045	-0.0289
YPL062W	0.0393	0.0108	-0.0285
HAP3	-0.0415	-0.0694	-0.0279
YAK1	0.0074	-0.0203	-0.0278
UFD4	-0.0018	-0.0294	-0.0276
FKH2	0.0134	-0.0139	-0.0273
YNR064C	0.0096	-0.0168	-0.0264
SNF6	-0.0166	-0.0427	-0.0261
SMF3	0.0215	-0.0046	-0.0261
OCA1	0.0171	-0.0089	-0.0261
TRP1	-0.0144	-0.0403	-0.0259
VPS71	0.0330	0.0073	-0.0257
DSE2	-0.0209	-0.0463	-0.0254
TSL1	0.0056	-0.0196	-0.0252
MNN4	0.0088	-0.0161	-0.0248
YMR310C	0.0148	-0.0099	-0.0247
SWM2	0.0383	0.0145	-0.0238
PET20	0.0008	-0.0229	-0.0237
GLO1	0.0099	-0.0136	-0.0235
YTA7	0.0033	-0.0202	-0.0235
YPL225W	-0.0020	-0.0250	-0.0230
KKQ8	-0.0115	-0.0343	-0.0228
MDH1	-0.0228	-0.0451	-0.0223
ISU2	0.0152	-0.0067	-0.0219
SPP1	-0.0241	-0.0457	-0.0216
UBP8	-0.0255	-0.0464	-0.0209
YDR269C	-0.0031	-0.0238	-0.0207
UBX7	0.0083	-0.0122	-0.0205
APP1	-0.0159	-0.0363	-0.0204
VAC7	0.0203	0.0000	-0.0202
CHS7	0.0164	-0.0034	-0.0198
PRR1	0.0005	-0.0192	-0.0197
RCN1	0.0052	-0.0144	-0.0197
ERP5	0.0094	-0.0102	-0.0197
SIP1	-0.0021	-0.0209	-0.0188
SAC1	-0.0593	-0.0780	-0.0186

MRPL1	0.0049	-0.0136	-0.0186
YPR172W	0.0051	-0.0132	-0.0183
YMR135W-A	-0.0183	-0.0365	-0.0183
MTC2	-0.0017	-0.0199	-0.0182
OPI1	-0.0249	-0.0427	-0.0178
TPC1	0.0092	-0.0083	-0.0175
RPS29B	0.0104	-0.0071	-0.0175
GLN3	0.0380	0.0207	-0.0173
YMR007W	0.0081	-0.0092	-0.0173
HST1	0.0065	-0.0104	-0.0169
CWP2	-0.0078	-0.0247	-0.0169
UBP2	-0.0411	-0.0579	-0.0169
RPE1	0.0168	-0.0001	-0.0169
MAK32	-0.0447	-0.0613	-0.0167
WSS1	0.0033	-0.0132	-0.0165
SNF1	-0.0156	-0.0317	-0.0161
PDX1	-0.0114	-0.0274	-0.0160
HRD3	0.0181	0.0022	-0.0159
MRPL39	-0.0186	-0.0345	-0.0159
YIL092W	0.0084	-0.0073	-0.0157
RTT10	0.0084	-0.0072	-0.0156
AIM43	0.0033	-0.0123	-0.0156
YGR237C	-0.0056	-0.0212	-0.0155
SHU1	0.0093	-0.0062	-0.0154
ECM30	0.0240	0.0090	-0.0149
YCR025C	-0.0076	-0.0224	-0.0149
YBL096C	-0.0009	-0.0159	-0.0149
YMR317W	0.0026	-0.0120	-0.0146
YER084W	0.0006	-0.0138	-0.0144
YML010C-B	-0.0004	-0.0147	-0.0143
PIG2	-0.0056	-0.0190	-0.0134
PYC2	-0.0041	-0.0166	-0.0126
MPH1	0.0023	-0.0102	-0.0125
MET6	-0.0051	-0.0176	-0.0125
YMR057C	-0.0105	-0.0228	-0.0124
PEX12	0.0230	0.0109	-0.0121
TRX3	0.0015	-0.0106	-0.0121
MHP1	-0.0037	-0.0157	-0.0120

TRF5	0.0076	-0.0044	-0.0120
YCR022C	0.0063	-0.0057	-0.0120
YPR096C	-0.0056	-0.0176	-0.0120
NAP1	-0.0349	-0.0466	-0.0117
YOR062C	0.0035	-0.0082	-0.0116
RPP2A	0.0140	0.0025	-0.0115
FRE1	-0.0031	-0.0145	-0.0114
LSC1	-0.0415	-0.0529	-0.0114
UBP14	-0.0133	-0.0245	-0.0112
YCK1	-0.0171	-0.0283	-0.0112
SOK2	0.0082	-0.0026	-0.0108
IRC14	0.0410	0.0302	-0.0108
YLR255C	-0.0030	-0.0138	-0.0108
YOR223W	0.0015	-0.0090	-0.0105
SNA2	-0.0169	-0.0274	-0.0105
NMD4	0.0024	-0.0081	-0.0104
YMR210W	-0.0242	-0.0344	-0.0103
LSC2	-0.0347	-0.0447	-0.0100
COQ2	0.0100	0.0001	-0.0100
PMT3	-0.0000	-0.0099	-0.0098
ALD6	0.0503	0.0405	-0.0098
STV1	-0.0231	-0.0329	-0.0097
YBR226C	0.0175	0.0078	-0.0096
ACH1	-0.0494	-0.0589	-0.0096
STB6	-0.0022	-0.0115	-0.0094
FPK1	-0.0213	-0.0306	-0.0093
YDL026W	0.0010	-0.0081	-0.0092
IZH3	0.0202	0.0110	-0.0092
YDL012C	-0.0032	-0.0122	-0.0091
AIM31	-0.0467	-0.0558	-0.0090
ELF1	-0.0376	-0.0464	-0.0088
CIS1	-0.0014	-0.0101	-0.0088
EPT1	-0.0029	-0.0115	-0.0086
YPL182C	-0.0014	-0.0093	-0.0080
CSM2	0.0030	-0.0049	-0.0079
YOR111W	-0.0024	-0.0100	-0.0076
AIM39	-0.0172	-0.0246	-0.0075
TOR1	0.0245	0.0174	-0.0071
YHL005C	-0.0482	-0.0551	-0.0069
LSM12	0.0046	-0.0018	-0.0064

APL6	-0.0111	-0.0176	-0.0064
AIM11	-0.0240	-0.0302	-0.0062
YPR114W	0.0077	0.0018	-0.0060
ATG10	-0.0153	-0.0212	-0.0059
PEP4	-0.0157	-0.0213	-0.0056
BUD14	-0.0155	-0.0211	-0.0056
YPL247C	0.0108	0.0054	-0.0054
YDR048C	0.0008	-0.0044	-0.0052
QCR6	-0.0148	-0.0199	-0.0051
CCC2	-0.0187	-0.0233	-0.0046
SET4	0.0053	0.0010	-0.0043
ADE17	0.0048	0.0005	-0.0043
ATG21	-0.0048	-0.0090	-0.0042
YBR219C	-0.0035	-0.0077	-0.0042
CUE4	0.0027	-0.0015	-0.0042
PET130	-0.0049	-0.0092	-0.0042
AQR1	-0.0046	-0.0086	-0.0040
DAS1	-0.0153	-0.0192	-0.0039
YBR206W	-0.0024	-0.0063	-0.0039
NUP100	0.0070	0.0032	-0.0038
SNO4	-0.0053	-0.0091	-0.0038
UBX4	0.0009	-0.0028	-0.0037
RAD10	-0.0126	-0.0163	-0.0037
YDR391C	-0.0176	-0.0210	-0.0034
PEF1	-0.0055	-0.0089	-0.0033
MPD2	-0.0071	-0.0105	-0.0033
RMD5	-0.0206	-0.0237	-0.0031
YFR035C	-0.0036	-0.0067	-0.0031
ATG12	-0.0208	-0.0239	-0.0031
PCK1	-0.0171	-0.0200	-0.0029
GAL83	-0.0208	-0.0236	-0.0028
RPS6B	0.0130	0.0103	-0.0028
RIM15	-0.0704	-0.0733	-0.0028
PNC1	-0.0267	-0.0295	-0.0028
YBL104C	0.0175	0.0149	-0.0026
YLR422W	-0.0045	-0.0071	-0.0026
MNT4	-0.0059	-0.0084	-0.0025
RAV1	-0.0063	-0.0086	-0.0023
EGT2	-0.0144	-0.0167	-0.0023
VTM2	-0.0023	-0.0046	-0.0022

<i>SWS2</i>	-0.0003	-0.0025	-0.0021
<i>YIR024C</i>	-0.0320	-0.0341	-0.0021
<i>MAF1</i>	-0.0342	-0.0362	-0.0020
<i>YDR250C</i>	-0.0028	-0.0047	-0.0019
<i>TRM7</i>	-0.0317	-0.0333	-0.0016
<i>CRD1</i>	-0.0376	-0.0390	-0.0014
<i>TOS1</i>	-0.0195	-0.0209	-0.0014
<i>YKR047W</i>	-0.0365	-0.0377	-0.0012
<i>YKL202W</i>	-0.0060	-0.0066	-0.0007
<i>RDI1</i>	0.0081	0.0078	-0.0004
<i>YLR426W</i>	-0.0094	-0.0097	-0.0003
<i>GID7</i>	-0.0053	-0.0057	-0.0003
<i>ATG16</i>	-0.0110	-0.0111	-0.0002
<i>RSR1</i>	-0.0189	-0.0190	-0.0001
<i>FCJ1</i>	-0.0794	-0.0226	0.0568
<i>ATP23</i>	-0.0661	-0.0098	0.0563
<i>MAK3</i>	-0.0534	0.0001	0.0535
<i>SRO9</i>	-0.0037	0.0472	0.0509
<i>COG6</i>	-0.0322	0.0166	0.0489
<i>QRI7</i>	-0.0257	0.0095	0.0351
<i>MAK31</i>	-0.0301	0.0035	0.0336
<i>UBA3</i>	-0.0591	-0.0256	0.0335
<i>NNK1</i>	-0.0218	0.0104	0.0322
<i>DSK2</i>	-0.0254	0.0059	0.0313
<i>FKH1</i>	-0.0142	0.0170	0.0312
<i>SYH1</i>	-0.0195	0.0111	0.0306
<i>SDH2</i>	-0.0597	-0.0309	0.0288
<i>YEL068C</i>	-0.0190	0.0098	0.0288
<i>YKL053W</i>	-0.0217	0.0050	0.0267
<i>UTH1</i>	-0.0241	0.0026	0.0266
<i>BNA6</i>	-0.0235	0.0030	0.0265
<i>FIS1</i>	-0.0507	-0.0250	0.0257
<i>SCS7</i>	0.0026	0.0280	0.0253
<i>YOR055W</i>	-0.0010	0.0237	0.0248
<i>YPR050C</i>	-0.0461	-0.0221	0.0241
<i>DLT1</i>	-0.0307	-0.0067	0.0240
<i>YGL235W</i>	-0.0644	-0.0406	0.0239
<i>YDR149C</i>	-0.0607	-0.0369	0.0237
<i>LST4</i>	0.0186	0.0421	0.0235
<i>SXM1</i>	-0.0157	0.0076	0.0233

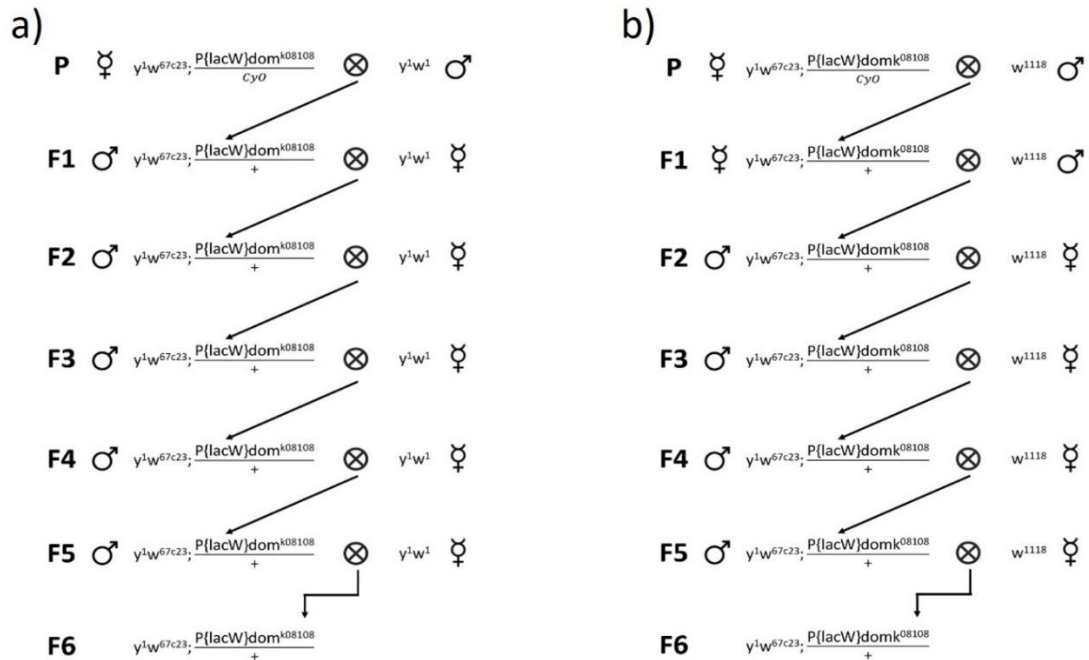
<i>CYB15</i>	0.0128	0.0355	0.0228
<i>VPS30</i>	-0.0786	-0.0559	0.0227
<i>SHM2</i>	-0.0060	0.0151	0.0210
<i>RRM3</i>	-0.0153	0.0056	0.0209
<i>NIP100</i>	-0.0422	-0.0217	0.0205
<i>RPL42A</i>	-0.0210	-0.0008	0.0203
<i>PAN3</i>	-0.0008	0.0186	0.0194
<i>PEX19</i>	0.0013	0.0204	0.0191
<i>YJL150W</i>	-0.0033	0.0157	0.0190
<i>ATG5</i>	-0.0248	-0.0059	0.0189
<i>PEX2</i>	0.0094	0.0278	0.0184
<i>EAF6</i>	-0.0069	0.0113	0.0182
<i>EMI5</i>	-0.0273	-0.0095	0.0178
<i>ALG9</i>	-0.0003	0.0171	0.0174
<i>MEC3</i>	-0.0133	0.0032	0.0165
<i>SUN4</i>	-0.0222	-0.0063	0.0159
<i>YDR008C</i>	-0.0152	0.0007	0.0158
<i>CCW12</i>	0.0141	0.0289	0.0148
<i>PTC4</i>	-0.0455	-0.0312	0.0143
<i>ATP10</i>	-0.0368	-0.0226	0.0142
<i>DBR1</i>	-0.0101	0.0040	0.0141
<i>ARP1</i>	-0.0371	-0.0232	0.0140
<i>YIL152W</i>	-0.0055	0.0073	0.0128
<i>CYC2</i>	-0.0131	-0.0005	0.0127
<i>GIS1</i>	-0.0127	-0.0003	0.0124
<i>BMH1</i>	-0.0056	0.0068	0.0124
<i>SER3</i>	0.0096	0.0215	0.0119
<i>YPT11</i>	-0.0022	0.0095	0.0117
<i>YNR040W</i>	-0.0176	-0.0060	0.0117
<i>NPR1</i>	0.0023	0.0139	0.0116
<i>IRC8</i>	-0.0043	0.0072	0.0115
<i>YFL042C</i>	-0.0032	0.0080	0.0112
<i>DUS3</i>	-0.0054	0.0057	0.0111
<i>JNM1</i>	-0.0250	-0.0145	0.0105
<i>CMC1</i>	-0.0418	-0.0318	0.0100
<i>YPR170C</i>	-0.0019	0.0079	0.0098
<i>VPS35</i>	-0.0553	-0.0459	0.0094
<i>YGR205W</i>	-0.0188	-0.0096	0.0093
<i>GIM5</i>	0.0010	0.0102	0.0092
<i>ERV41</i>	-0.0140	-0.0054	0.0086

<i>UTR1</i>	-0.0099	-0.0014	0.0085
<i>PBP4</i>	0.0160	0.0243	0.0083
<i>SHR5</i>	-0.0417	-0.0342	0.0075
<i>KIN3</i>	0.0025	0.0099	0.0074
<i>YGL109W</i>	0.0019	0.0092	0.0073
<i>TRM11</i>	-0.0060	0.0011	0.0071
<i>RAV2</i>	-0.0254	-0.0183	0.0071
<i>CPR5</i>	0.0055	0.0125	0.0069
<i>NMA1</i>	-0.0046	0.0019	0.0065
<i>YCL026C</i>	-0.0201	-0.0136	0.0064
<i>MBB1</i>	-0.0084	-0.0021	0.0063
<i>MRP49</i>	-0.0383	-0.0321	0.0061
<i>UBR1</i>	-0.0157	-0.0097	0.0061
<i>ATG14</i>	-0.0257	-0.0201	0.0057
<i>KNS1</i>	-0.0125	-0.0070	0.0055
<i>MRS2</i>	-0.0361	-0.0306	0.0055
<i>SUR2</i>	-0.0110	-0.0057	0.0053
<i>ERV29</i>	-0.0072	-0.0021	0.0052
<i>YPR092W</i>	0.0001	0.0052	0.0051
<i>MDM35</i>	-0.0335	-0.0286	0.0049
<i>UFD2</i>	-0.0281	-0.0233	0.0048
<i>YCR076C</i>	-0.0506	-0.0458	0.0048
<i>ICY2</i>	-0.0379	-0.0333	0.0047
<i>UME1</i>	-0.0424	-0.0378	0.0046
<i>LRE1</i>	0.0102	0.0145	0.0043
<i>YOR277C</i>	0.0052	0.0091	0.0038
<i>THP2</i>	0.0053	0.0089	0.0036
<i>GAL7</i>	0.0030	0.0066	0.0035
<i>RAS2</i>	-0.0005	0.0027	0.0032
<i>PAC10</i>	0.0048	0.0078	0.0031
<i>RPL40A</i>	-0.0104	-0.0075	0.0030
<i>STF1</i>	-0.0267	-0.0238	0.0029
<i>SEC66</i>	-0.0233	-0.0205	0.0028
<i>RSF2</i>	-0.0314	-0.0290	0.0024
<i>REX2</i>	-0.0113	-0.0090	0.0023
<i>PPH3</i>	-0.0306	-0.0285	0.0021
<i>CUP9</i>	-0.0156	-0.0142	0.0015
<i>VID22</i>	-0.0074	-0.0061	0.0013
<i>ICS2</i>	0.0017	0.0029	0.0012
<i>MSN2</i>	0.0106	0.0117	0.0011
<i>PEX10</i>	-0.0176	-0.0164	0.0011
<i>UNG1</i>	0.0020	0.0031	0.0010
<i>MBA1</i>	-0.0379	-0.0370	0.0010
<i>NCL1</i>	-0.0051	-0.0043	0.0008
<i>ATG9</i>	-0.0131	-0.0123	0.0008
<i>MSN4</i>	-0.0084	-0.0082	0.0002
<i>RPS14A</i>	0.0133	0.0135	0.0001
<i>RGS2</i>	-0.0106	-0.0104	0.0001

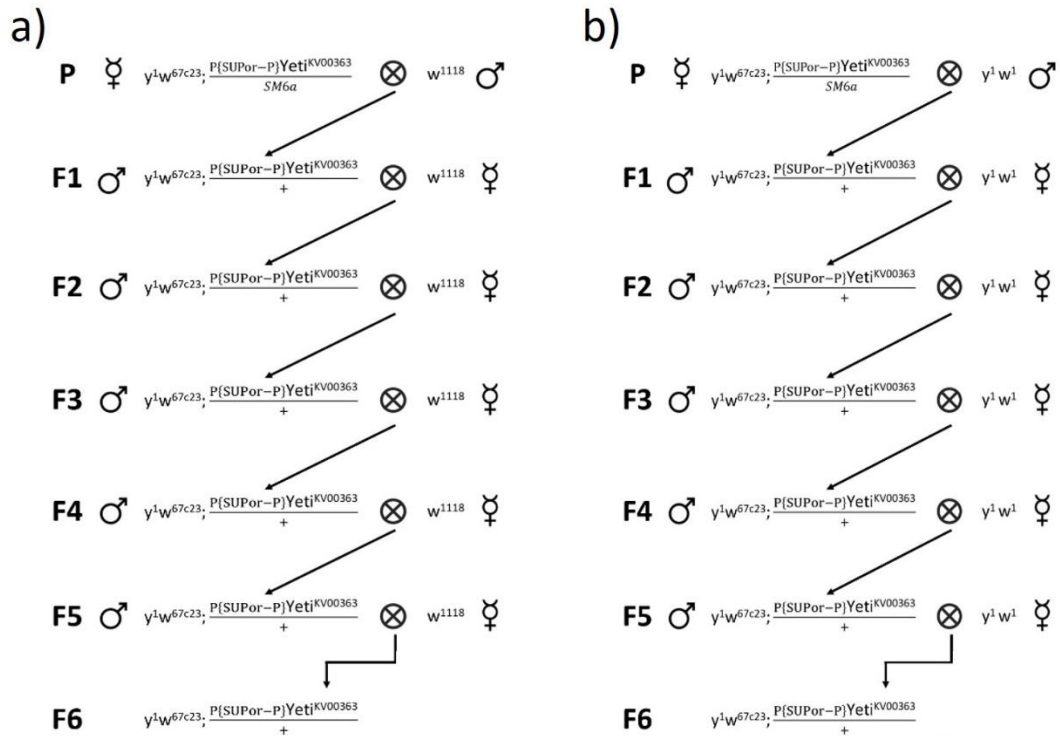
a) El valor de  $d_s$  se calculó a partir de la diferencia de la  $s$  observada y la  $s$  esperada.



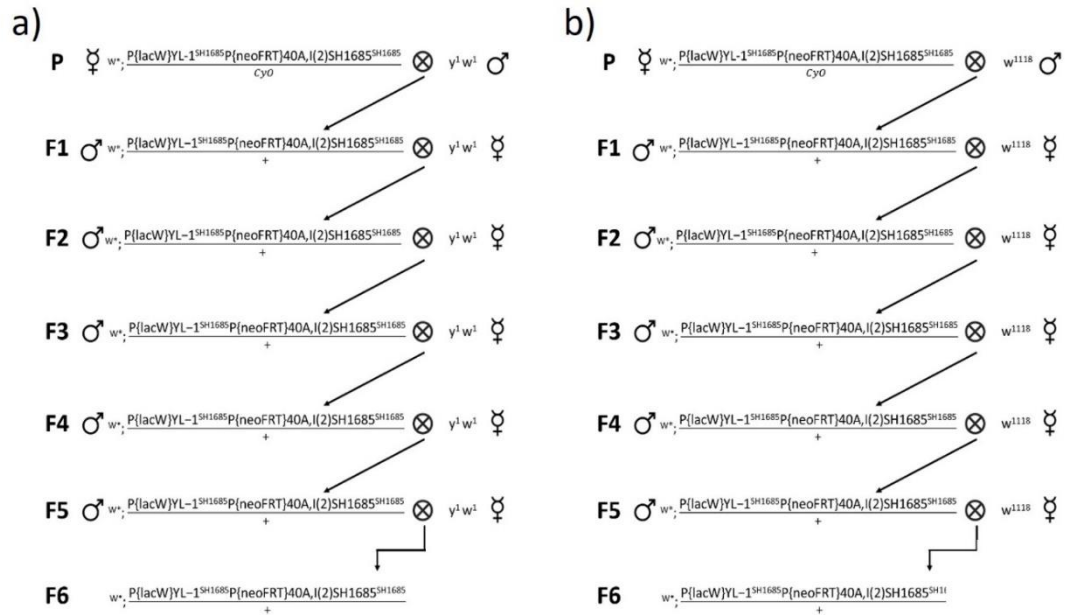
Apéndice C.-Cruzas *Drosophila melanogaster*



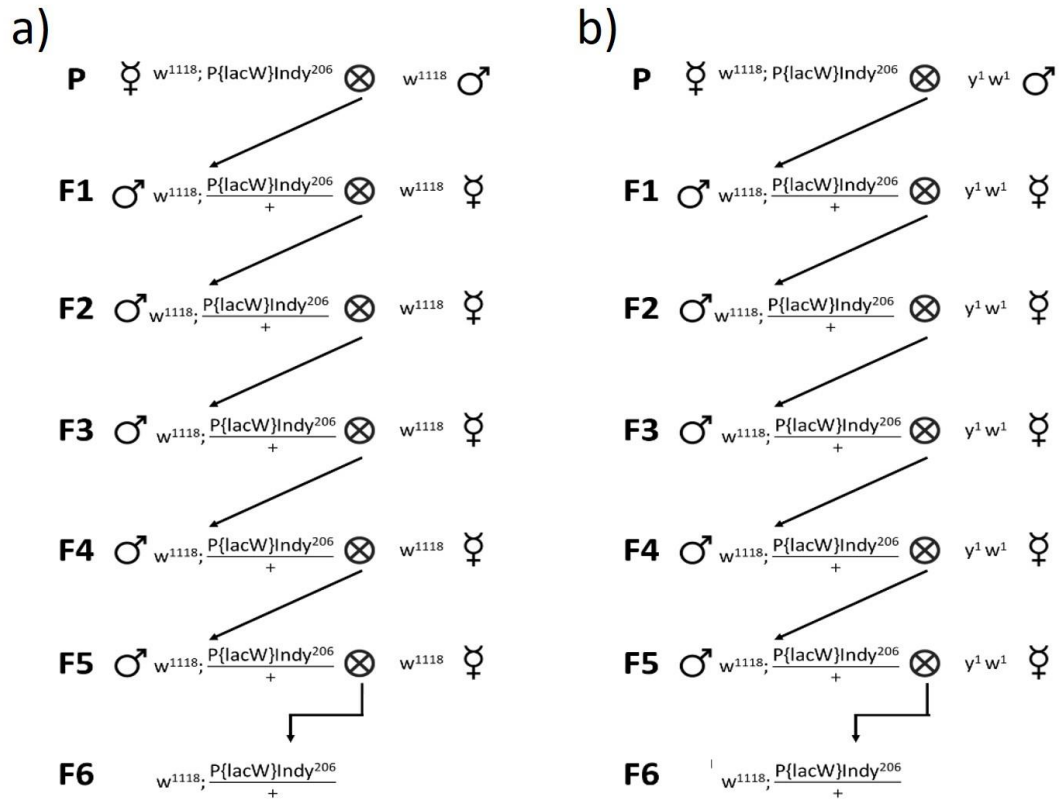
**Figura 8.1.- Cruzas de  $y^1w^{67c23};P\{lacW\}dom^{k08108}/CyO$  con  $y^1w^1$  y  $w^{1118}$ .** Se muestra la parental (P), el círculo con la x representa la cruce, la flecha el producto de la cruce con el que se siguió de la generación 1 a la 6 (F1-F6). **a)** Partiendo de la cruce entre la hembra virgen  $dom^{k08108}$  con el macho  $y^1w^1$  se tomó el macho con ojos rojos (heteróciga) que se cruzó con una hembra virgen  $y^1w^1$ , repitiendo hasta la F6. **b)** Partiendo de la cruce entre la hembra virgen  $dom^{k08108}$  con el macho  $w^{1118}$  se tomó a la hembra con ojos rojos (heteróciga) que se cruzó con un macho  $y^1w^1$ , producto de la F2 se tomó al macho heterócigo y se cruzó con una hembra virgen  $w^{1118}$ , repitiendo hasta la F6.



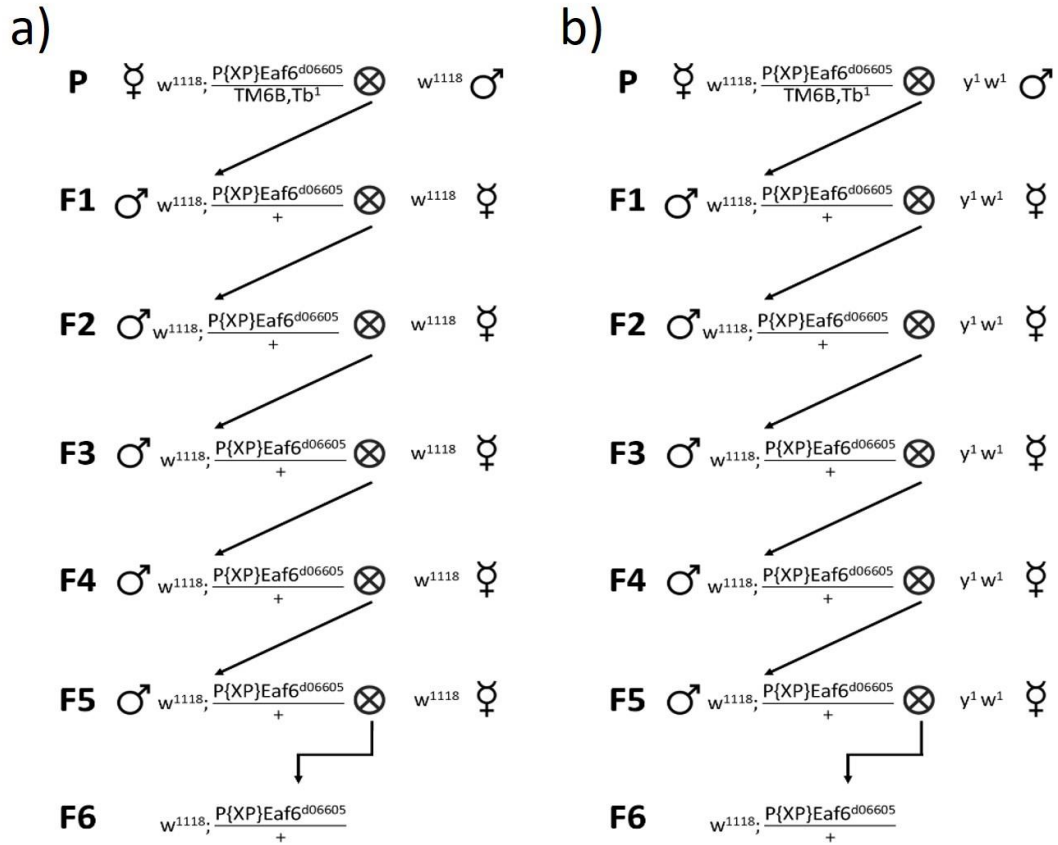
**Figura 8.2.- Cruzas de  $y^1w^{67c23}; P\{SUPor-P\}Yeti^{KV00363}/SM6a$  con  $y^1w^1$  y  $w^{1118}$ . Se muestra la parental (P), el círculo con la x representa la cruce, la flecha el producto de la cruce con el que se siguió y, mostramos de la generación 1 a la 6 (F1-F6). **a)** Partiendo de la cruce entre la hembra virgen  $Yeti^{KV00363}$  con el macho  $w^{1118}$  se tomó el macho con ojos rojos (heteróciga) que se cruzó con una hembra virgen  $w^{1118}$ , repitiendo hasta la F6. **b)** Partiendo de la cruce entre la hembra virgen  $Yeti^{KV00363}$  con el macho  $y^1w^1$  se tomó al macho con ojos rojos (heteróciga) que se cruzó con una hembra virgen  $y^1w^1$ , repitiendo hasta la F6.**



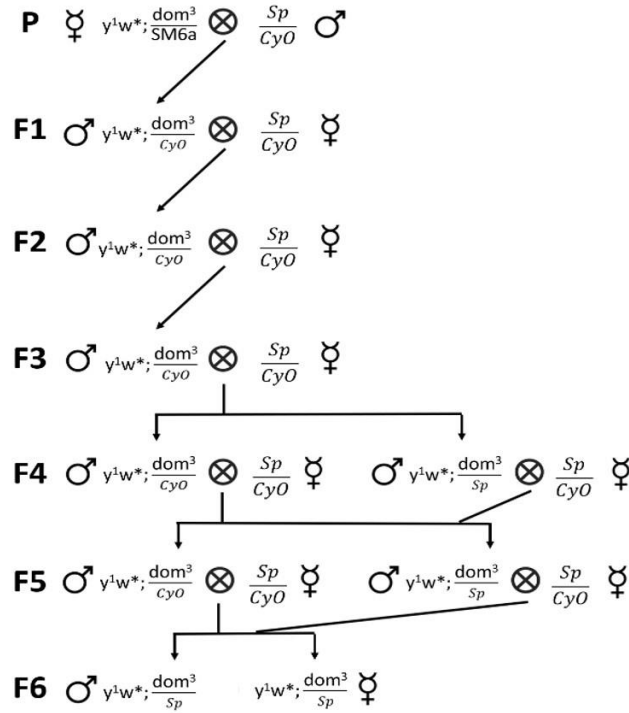
**Figura 8.3.- Cruzas de  $w^*$ ;  $P\{lacW\}YL-1^{SH1685}P\{neoFRT\}40A, I(2)SH1685^{SH1685}/CyO$  con  $y^1 w^1$  y  $w^{1118}$ .** Se muestra la parental (P), el círculo con la x representa la cruce, la flecha el producto de la cruce con el que se siguió de la generación 1 a la 6 (F1-F6). **a)** Partiendo de la cruce entre la hembra virgen  $YL-1^{SH1685}$  con el macho  $y^1 w^1$  se tomó el macho con ojos rojos (heteróciga) que se cruzó con una hembra virgen  $y^1 w^1$ , repitiendo hasta la F6. **b)** Partiendo de la cruce entre la hembra virgen  $YL-1^{SH1685}$  con el macho  $w^{1118}$  se tomó al macho con ojos rojos (heteróciga) que se cruzó con una hembra virgen  $w^{1118}$ , repitiendo hasta la F6.



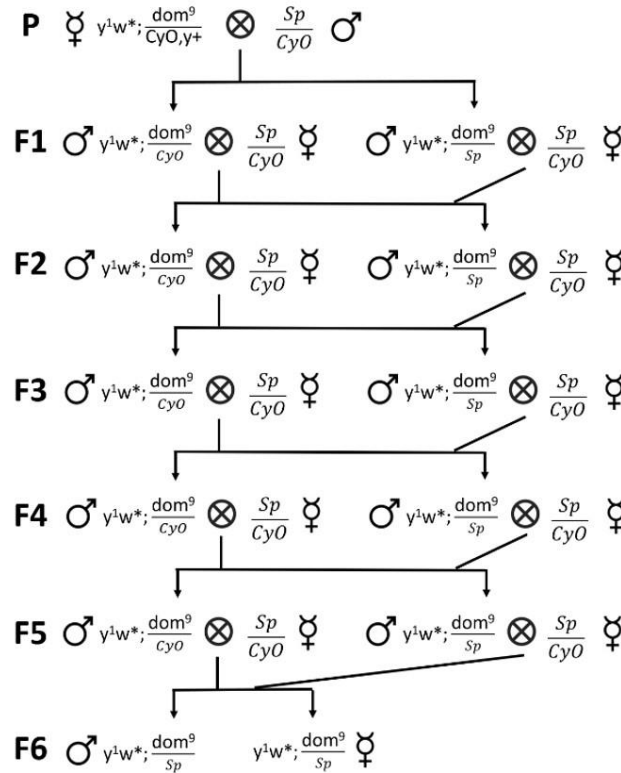
**Figura 8.4.- Cruzas de  $w^{1118}; P\{\text{lacW}\}Indy^{206}$  con  $y^1 w^1$  y  $w^{1118}$ .** Se muestra la parental (P), el círculo con la x representa la cruce, la flecha el producto de la cruce con el que se siguió y se muestra de la generación 1 a la 6 (F1-F6). **a)** Partiendo de la cruce entre la hembra virgen  $Indy^{206}$  con el macho  $w^{1118}$  se tomó el macho con ojos rojos (heteróciga) que se cruzó con una hembra virgen  $w^{1118}$ , repitiendo hasta la F6. **b)** Partiendo de la cruce entre la hembra virgen  $Indy^{206}$  con el macho  $y^1 w^1$  se tomó al macho con ojos rojos (heteróciga) que se cruzó con una hembra virgen  $y^1 w^1$ , repitiendo hasta la F6.



**Figura 8.5.- Cruzas de  $w^{1118}; P\{XP\}Eaf6^{d06605}/TM6B, Tb^1$  con  $y^1 w^1$  y  $w^{1118}$ . Se muestra la parental (P), el círculo con la x representa la cruce, la flecha el producto de la cruce con el que se siguió y, se muestra de la generación 1 a la 6 (F1-F6). **a)** Partiendo de la cruce entre la hembra virgen  $Eaf6^{d06605}$  con el macho  $w^{1118}$  se tomó el macho con ojos rojos (heteróciga) que se cruzó con una hembra virgen  $w^{1118}$ , repitiendo hasta la F6. **b)** Partiendo de la cruce entre la hembra virgen  $Eaf6^{d06605}$  con el macho  $y^1 w^1$  se tomó al macho con ojos rojos (heteróciga) que se cruzó con una hembra virgen  $y^1 w^1$ , repitiendo hasta la F6.**



**Figura 8.6.- Cruza de  $y^1w^*;dom^3/SM6a$  con  $Sp/CyO$ .** Se muestra la parental (P), el círculo con la x representa la cruce, la flecha el producto de la cruce con el que se siguió y, se muestra la generación 1 a la 6 (F1-F6). Partiendo de la cruce entre la hembra virgen  $dom^3$  con el macho  $Sp/CyO$  se tomó el macho con alas curvadas (heteróciga) que se cruzó con una hembra virgen  $Sp/CyO$ , repitiendo hasta la F4, donde se tomaron machos con alas curvadas y machos con incremento en el número de pelos esternopleurales, ambos se cruzaron con hembras vírgenes  $Sp/CyO$  hasta la F6.



**Figura 8.7.- Cruza de  $y^1w^*;dom^9/CyO,y^+$  con  $Sp/CyO$ .** Se muestra la parental (P), el círculo con la x representa la cruce, la flecha el producto de la cruce con el que se siguió y, se muestra de la generación 1 a la 6 (F1-F6). Partiendo de la cruce entre la hembra virgen  $dom^9$  con el macho  $Sp/CyO$  se tomaron machos con alas curvadas (heteróciga) y machos con incremento en el número de pelos esternopleurales, ambos se cruzaron con hembras vírgenes  $Sp/CyO$  hasta la F6.

## Apéndice D.- Resultados Cinética de crecimiento 2

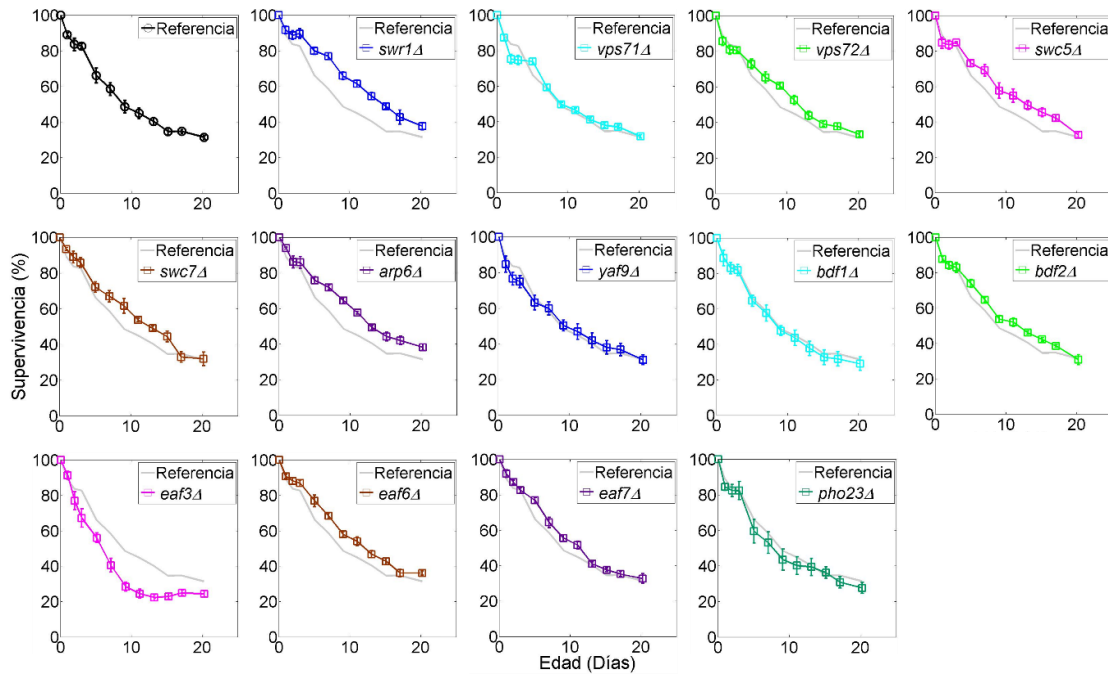
**Tabla 6.1.- Efecto en el tiempo de vida cronológico por ausencia de genes modificadores de cromatina 2.**

Mutantes <i>knock-out</i>	Tasa de muerte (NatR) <sup>a</sup>	<i>P-value</i> (NatR) <sup>b</sup>	Tasa de muerte (KanR) <sup>a</sup>	<i>P-value</i> (KanR) <sup>b</sup>	Coefficiente relativo de supervivencia (s) (NatR) <sup>c</sup>	<i>P-value</i> (NatR) <sup>b</sup>
<i>SWR1</i>	0.1252	0.1018	0.3824	0.0066	0.0460	2.0250e-06
<i>VPS71</i>	0.2531	0.0390	0.1233	0.0578	0.0491	9.8122e-07
<i>VPS72</i>	0.1989	0.0548	0.2487	0.0448	0.0435	6.7642e-04

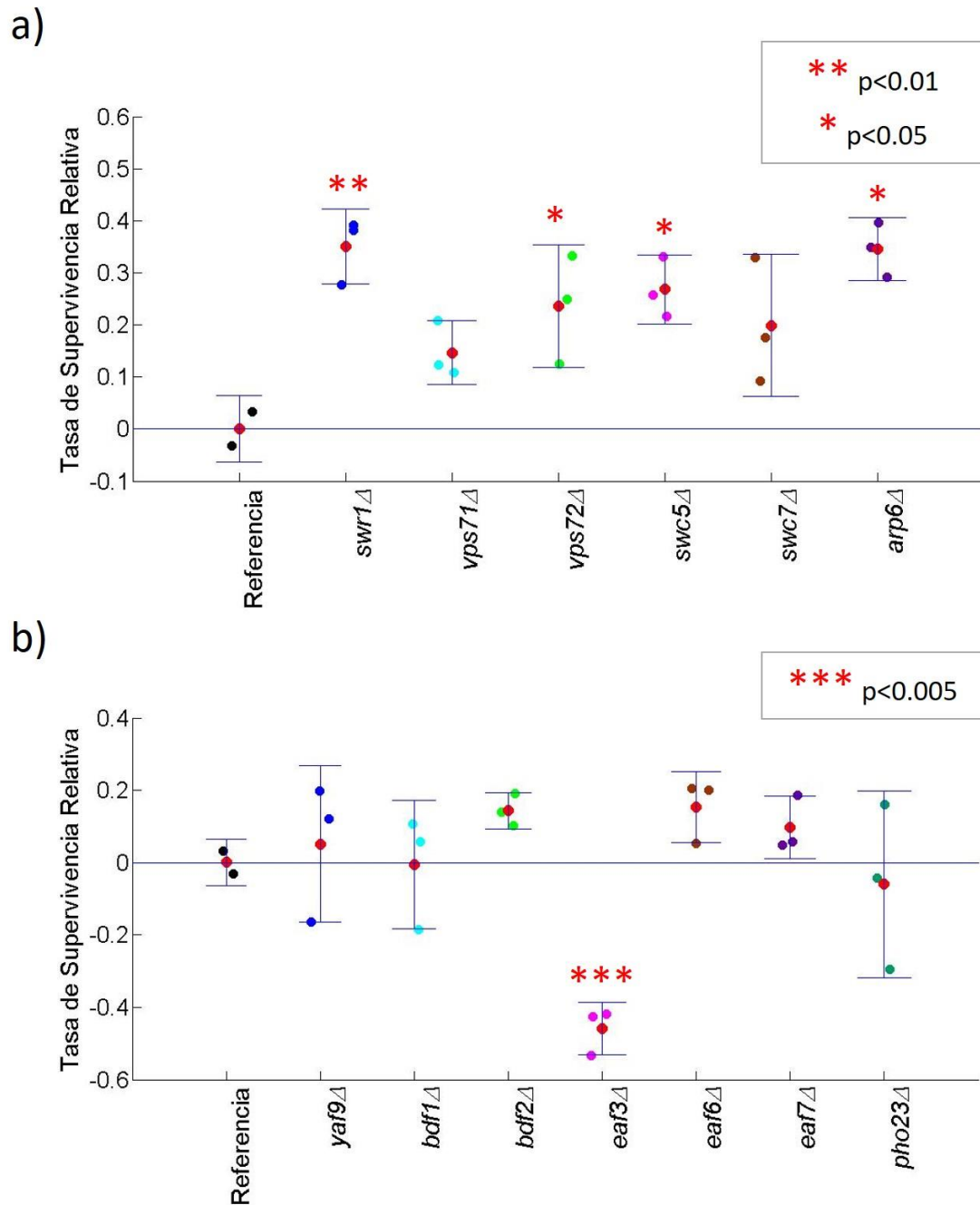
<i>SWC5</i>	0.1881	0.0152	0.2579	0.0134	0.0469	2.3135e-04
<i>SWC7</i>	-0.1390	0.0686	0.1749	0.0897	-0.0073	0.4246
<i>ARP6</i>	0.1785	0.0276	0.3487	0.0076	0.0490	5.1696e-08
<i>HTZ1</i>	0.1293	0.1558	---	---	0.0492	9.9039e-06
<i>YAF9</i>	-0.0804	0.1602	0.1211	0.6937	0.0252	0.0437
<i>BDF1</i>	-0.2263	0.0234	0.0589	0.9510	---	---
<i>BDF2</i>	-0.0416	0.2434	0.1384	0.0642	0.0147	9.6446e-07
<i>EAF3</i>	-0.3632	4.4494e-05	-0.4248	0.0031	-0.0337	8.1493e-05
<i>EAF6</i>	-0.0163	0.6338	0.2012	0.0841	0.0170	0.0157
<i>EAF7</i>	-0.1578	0.0057	0.0580	0.1761	0.0103	0.0171
<i>PHO23</i>	-0.2197	0.0154	-0.0422	0.6971	-0.0807	7.2937e-05

Los valores obtenidos con NatR corresponden a cinco réplicas biológicas, los obtenidos con KanR corresponden a tres réplicas biológicas. **a)** La tasa de muerte se obtuvo del ajuste de las curvas de supervivencia a un modelo de decaimiento exponencial. **b)** Valor obtenido con la prueba de Welch comparando la media de cada tratamiento con su correspondiente control. **c)** Obtenido a partir del cambio en las señales de fluorescencia de las mutantes en cocultivo.





**Figura 9.1.- Curvas de supervivencia de mutantes *knock-out* del complejo SWR1 y homólogos del complejo Tip60.** Mediciones de tiempo de vida cronológico por cinética de crecimiento durante 20 días. Cada punto es la mediana y las barras de error la desviación estándar del porcentaje de supervivencia de cinco réplicas biológicas. La primera gráfica corresponde a la supervivencia de la cepa control (referencia). Las siguientes representan la supervivencia de las mutantes *knock-out* en color y la referencia en gris. Las mutantes *knock-out* de los genes *SWR1*, *VPS72*, *SWC5*, *SWC7*, *ARP6*, *BDF2*, Y *EAF6* muestran un aumento en el tiempo de vida cronológico. La mutante *knock-out* del gen *EAF3* presenta una disminución en el tiempo de vida cronológico. Las mutantes *knock-out* de los genes *VPS71*, *YAF9*, *BDF1*, *EAF7* y *PHO23* no muestran efecto.



**Figura 9.2.- La ausencia de genes pertenecientes a los complejos modificadores de cromatina afecta el tiempo de vida cronológico de levadura.** Todos los datos están normalizados a la cepa wt (referencia). Cada punto representa la tasa de supervivencia relativa de una réplica biológica (3 en total), en rojo la media. **a)** Todas las mutantes probadas son significativamente longevas (Prueba de Welch, \*\* $p$ -value<0.01, \* $p$ -value<0.05). **b)** Significativamente longevas son *bdf2*Δ y *eaf6*Δ, significativamente progérica *eaf3*Δ (Prueba de Welch, \*\*\* $p$ -value<0.005).

## Contribuciones a las que dio lugar el trabajo

Con resultados preliminares del trabajo se realizó una ponencia en el XXXII Congreso Nacional de Bioquímica, con el título “Genetic analysis of aging factor SWR1 in *Saccharomyces* and *Drosophila*”. Avalado por la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. Ixtapa Zihuatanejo, Gro. 2018.