

Facultade de Ciencias  
UNIVERSIDADE DA CORUÑA

## Máster en Bioloxía Celular, Molecular e Xenética

### Memoria do Traballo de Fin de Máster

Aislamiento de un clon de doble-híbrido *SMP3-GAL4* para el estudio de su interacción con Ssu72

Illamento dun clon de dobre-híbrido *SMP3-GAL4* para o estudo da súa interacción con Ssu72

Isolation of a Two-Hybrid *SMP3-GAL4* clone to study its interaction with Ssu72

Alumno: Antonio López Fernández

Directora: María Ángeles Freire Picos

Julio de 2022

M<sup>a</sup> ANGELES FREIRE PICOS, PROFESORA TITULAR DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA EN LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMA

Que el presente trabajo fin de master presentado por el alumno Antonio López Fernández titulado:

Aislamiento de un clon de doble-híbrido *SMP3-GAL4* para el estudio de su interacción con Ssu72.

Illamento dun clon de dobre-híbrido *SMP3-GAL4* para o estudo da súa interacción con Ssu72.

Isolation of a Two-Hybrid *SMP3-GAL4* clone to study its interaction with Ssu72.

Ha sido realizado bajo mi dirección y autorizo su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que conste firmo la presente en A Coruña a 15 de Julio de 2022

FREIRE PICOS  
MARIA  
ANGELES -  
32760558W

Firmado digitalmente por FREIRE  
PICOS MARIA ANGELES - 32760558W  
Número de reconocimiento (DN):  
=ES,  
serialNumber=DICES-32760558W,  
givenName=MARIA ANGELES,  
sn=FREIRE PICOS, cn=FREIRE PICOS  
MARIA ANGELES - 32760558W  
Fecha: 2022.07.15 17:08:06 +02'00'

Fdo M<sup>a</sup> Angeles Freire Picos

Firmado por Antonio López Fernández

## Resumen / Abstract / Resumo

En el presente trabajo se describe la obtención de clones del gen *SMP3* a partir de una genoteca de doble híbrido de *Saccharomyces cerevisiae* mediante una nueva metodología que adapta el protocolo de *site directed mutagenesis* para aislar y caracterizar los nuevos candidatos. Se presentan los resultados obtenidos.

In the present work it is described the obtention of *SMP3* gene clones from a genomic library of *Saccharomyces cerevisiae* through a new methodology that adapts the *site directed mutagenesis* protocol to isolate and characterize the new candidates. The results obtained are presented.

No presente traballo descríbese a obtención de clons do xene *SMP3* a partir dunha biblioteca dobre híbrida de *Saccharomyces cerevisiae* mediante unha nova metodoloxía que adapta o protocolo de *site directed mutaxenese* para illar e caracterizar os novos candidatos. Preséntanse os resultados obtidos.

*Keywords:* Genoteca, mutagénesis, *SMP3*, *SSU72*, *Saccharomyces cerevisiae*.

## Abreviaturas:

AD: Activation Domain (Dominio de Activación)

BD, DBD: *DNA Binding Domain* (Dominio de Unión a DNA)

CM: Medio Completo

COPII: Complejo de proteínas de recubrimiento vesicular

CTD: Dominio Carboxilo Terminal de la RNA Polimerasa II

ERES: *RE Exit Site* (Sitio de salida del RE)

GPI: Glicosilfosfatidilinosítidos

LB: Luria Broth

LBA: LB con Ampicilina

LPG: Lipofosfoglicanos

MCS: *Multiple Cloning Site* (Sitio de Clonación Múltiple)

PCR: *Polymerase Chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

RE: Retículo endoplasmático

RNAPII: RNA polimerasa II

TAE: Tris acetato EDTA

TFIIB: Factor de transcripción II B

Tm: *Melting Temperature* (Temperatura de fusión)

Y2HL: *Yeast two-hybrid library* (genoteca del doble híbrido en levaduras).

YPD: *Yeast extract peptone dextrose*

# Índice

## 1. Introducción

- 1.1. El gen *SMP3* y los glicosilfosfatidilinosítidos (GPIs)
- 1.2. El gen *SSU72*
- 1.3. La genoteca Y2HL-c2 y el sistema de doble híbrido

## 2. Objetivos

## 3. Materiales y métodos

- 3.1. Líneas celulares
  - 3.1.1. Cepa de *Escherichia coli*
- 3.2. Medio de cultivo LB
- 3.3. Plásmidos de la genoteca de doble híbrido
  - 3.3.1. Con el dominio de activación (AD) de Gal4
- 3.4. Diseño de cebadores
- 3.5. Polimerasas y enzimas de restricción/modificación
- 3.6. Reacciones de amplificación por PCR
- 3.7. Técnicas electroforéticas
  - 3.7.1. Gel agarosa
  - 3.7.2. Extracción del DNA de un gel de agarosa
- 3.8. Transformación de bacterias
  - 3.8.1. Protocolo de transformación
  - 3.8.2. Obtención de DNA plasmídico en bacterias
- 3.9. Empleo del protocolo de mutagénesis dirigida para el aislamiento de clones de una genoteca
- 3.10. Análisis bioinformático

## 4. Resultados/Discusión

- 4.1. Obtención del *megaprimer* por PCR
  - 4.1.1. Diseño de cebadores
  - 4.1.2. Obtención del *megaprimer*
  - 4.1.3. Optimización de las condiciones de PCR para los nuevos cebadores
  - 4.1.4. Comprobación del *megaprimer*
- 4.2. Aislamiento de clones con *SMP3* de la genoteca
  - 4.2.1. Digestión con *DpnI*
  - 4.2.2. Transformación de células bacterianas ultracompetentes
  - 4.2.3. Comprobación de candidatos

## 5. Conclusiones

## 6. Bibliografía

# 1. Introducción

## 1.1. El gen *SMP3* y los glicosilfosfatidilinositol (GPI)

El gen *SMP3*, también llamado *LAS2*, se localiza en el cromosoma XV del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Codifica una proteína hidrofóbica de 59.9 kDa que desempeña un papel esencial para la viabilidad celular, ya que la disrupción del gen es letal<sup>[1]</sup> y su mutación genera diferentes fenotipos (pleiotropía) como son el crecimiento lento de las células o la sensibilidad a la temperatura (normalmente al crecimiento a 37°C)<sup>[2]</sup>.

Los glicosilfosfatidilinosítidos (GPIs) son glucolípidos creados en el lumen del retículo endoplasmático (RE) por todos los eucariotas. Constituyen una estructura para el anclaje de proteínas en la cara exterior de la membrana plasmática. En la figura 1 se aprecia su estructura y los elementos que lo forman. Las proteínas que se van a unir a GPI son modificadas postraduccionalmente por una reacción de transamidación<sup>[3,4,5]</sup>. Una vez unidas a GPI se agrupan en los sitios de salida del RE (ERES) desde donde son transportadas por varias rutas secretoras mediante vesículas que dependen de COPII para su formación. La ruta canónica las envía hacia el Golgi, que las redirige hacia la membrana plasmática donde están implicadas en roles como transducción de señales, interacciones celulares, defensa y síntesis de la pared celular<sup>[6,7]</sup>. La segregación de los anclajes GPI es por agrupaciones en dominios especiales de membrana conocidos como “balsas de membrana” o “lipid rafts” que actúan como plataformas selectivas de gemación<sup>[8]</sup>. Pese a que muchas de las proteínas se transportan y anclan gracias a estos compuestos, también existen GPI sin unir a proteínas, como es el caso de los GPI hiperglicosilados llamados lipofosfoglicanos (LPG) o GPI sin modificar llamados glicoinositol fosfolípidos encontrados en protozoos parásitos como *Leishmania spp.*<sup>[9]</sup>.

Todo este sistema parece seguir mecanismos conservados entre especies y es dependiente de la remodelación de los anclajes GPI en el RE. En levaduras se ha podido comprobar que los anclajes GPI desempeñan funciones como la señalización celular y la incorporación a la pared celular en zonas con gran cantidad de  $\beta$ -glucanos, a los que cede un residuo de manosa para esa unión<sup>[10,11]</sup>.

El gen *SMP3* codifica para una alfa-1,2-manosiltransferasa, enzima necesaria para la síntesis de una variante de GPI. La caracterización de mutantes *SMP3* ha permitido comprobar que una de las funciones de Smp3 es la de añadir un cuarto residuo de manosa a los precursores de GPI (figura 1), función de gran importancia en levaduras aunque no tanto en células de mamíferos. Sin embargo, se encuentran homólogos en organismos eucariotas como *S. pombe*, *C. albicans*, *D. melanogaster* y *Homo sapiens* [12,13]. Dado que *SMP3* es un gen esencial, la incapacidad de Man3-GPIs para sostener el crecimiento sugiere que la cuarta manosa, presente en determinados anclajes GPI, cumple otra función esencial [14].

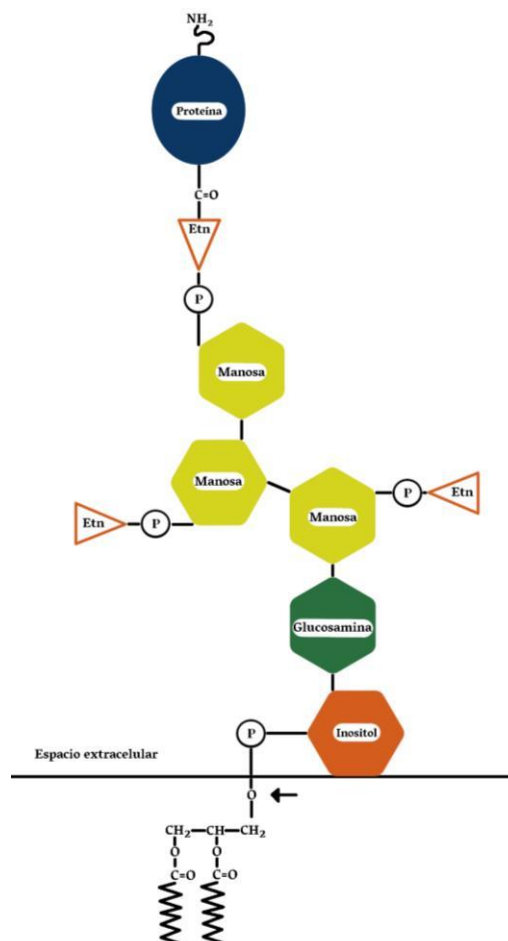


Figura 1. Estructura de un anclaje GPI formado por tres manosas. En azul la proteína unida al anclaje GPI, en amarillo la sucesión de manosas, en verde la glucosamina y en naranja el inositol. Etn: Etanolamina. La flecha indica el sitio de corte por esterasas.

En humanos la transferencia de la cuarta manosa está mediada por el homólogo de *SMP3*: hSmp3p (posteriormente llamado *PIGZ*) [15], que forma parte de un grupo de proteínas transmembrana con sitios catalíticos hacia el lumen del RE [16]. El estudio de Eisenhaber y colaboradores identificó la región de reconocimiento en los dominios transmembrana de esta familia de proteínas (BindGPILA) y afirmó que es la secuencia encargada del reconocimiento, unión y estabilización del anclaje lipídico de GPI [17, 18].

## 1.2. El gen *SSU72*

El gen *SSU72* codifica una proteína esencial para la viabilidad celular [19]. Entre las funciones de la proteína se encuentra la relación con el procesamiento 3' del mRNA [20,21], su implicación con procesos de elongación de la transcripción y la separación cromosómica en la anafase [21]. Esta proteína ha sido reconocida como una fosfatasa específica del CTD (Dominio Carboxilo Terminal) de la ARN polimerasa-II en las serinas 5 y 7 de sus múltiples repeticiones [22,23].

Los datos obtenidos por Mejuto [24] indican que otro proceso en el que se encuentra esta fosfatasa es la síntesis de quitina necesaria para la división por mitosis. El gen regulador de la síntesis de quitina *SKT5* (o *CHS4*) fue identificado por Freire-Picos (no publicado), quien comprobó que su sobreexpresión complementa parcialmente defectos en el mutante de *S. cerevisiae* expresando *KISSU72* (homólogo a *Ssu72* de *Kluyveromyces lactis*) y por tanto identificando funciones no conservadas entre estos dos factores. Los análisis de microscopía llevados a cabo apoyan estas nuevas funciones [25].

## 1.3. La genoteca Y2HL-c2 y el sistema de doble híbrido

Las genotecas son colecciones de plásmidos que contienen porciones de genomas fragmentados con enzimas de restricción. Estos vectores pueden utilizarse para el estudio de secuencias genómicas o para el aislamiento de genes por complementación de fenotipos o mediante PCR con primers específicos.

La genoteca de doble híbrido para *S. cerevisiae* generada por P. James et al. [26] basada en el sistema creado por Chien et al. [27], llamada Y2HL, está constituida por plásmidos que contienen fusiones de la región que codifica el dominio de activación del regulador transcripcional Gal4 fusionado a genes de *S. cerevisiae*. Potencialmente



podría contener cualquier gen de esta especie fusionado al dominio de activación de Gal4, y por tanto expresar proteínas de fusión en levaduras. La tecnología del doble híbrido permite identificar proteínas que interaccionan con otra proteína de interés si expresamos en la misma levadura un segundo plásmido que contenga la región codificadora del gen de interés, fusionado al dominio de unión a DNA de Gal4 (Gal4DBD) y es la empleada en el presente trabajo.

Este sistema de doble híbrido es una técnica clásica en estudios de interacciones físicas de proteínas. En levaduras, permite detectar interacciones entre proteínas gracias a la activación de un gen reportero por la unión de un factor de transcripción dimérico, que reconstruye al activador Gal4. Este factor tiene dos dominios: de activación (AD) y unión al DNA (BD). Para este sistema, se construyen plásmidos híbridos, de modo que, como veremos en nuestro caso, la secuencia codificante del BD se fusiona con la región codificante de una proteína de interés (X) y los plásmidos de la genoteca, creada por P. James, están fusionados al dominio de activación (Y) (figura 2). Al expresar estos plásmidos en la levadura, se consiguen las dos proteínas híbridas que, si interaccionan entre sí, harán expresar el gen reportero. El sistema más habitual, y el usado en esta genoteca, es con el factor Gal4.

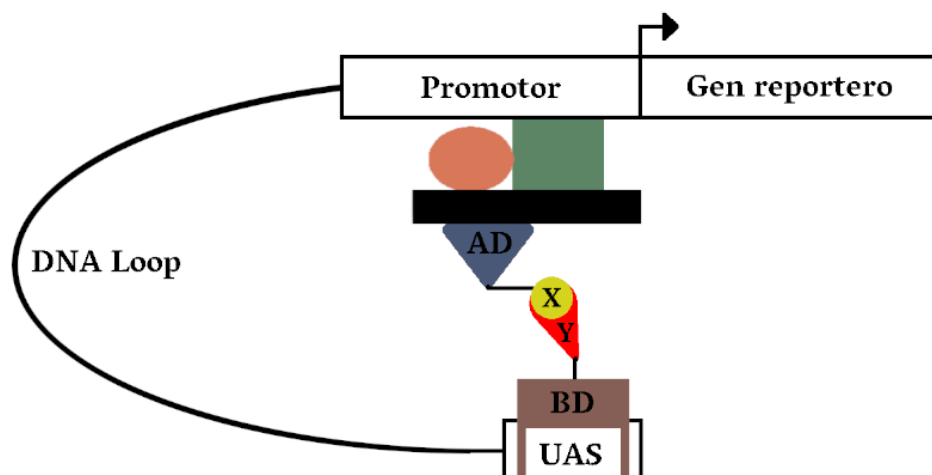


Figura 2: Sistema de doble híbrido. Modificado de Luban, 1995.

James y colaboradores <sup>[26]</sup> además de la genoteca, construyeron una cepa de levadura específica llamada PJ69-4A que contiene tres genes reporteros (*HIS3*, *ADE2* y *LacZ*) bajo diferentes promotores, todos ellos regulados por Gal4, con objeto de reducir falsos positivos y permitiendo reconocer a los interactuantes por su

crecimiento en medios sin histidina o adenina además del crecimiento de colonias azules por la expresión de beta-galactosidasa.

Mediante el uso de esta genoteca Y2HL el estudio de Seoane (2001) <sup>[28]</sup> permitió identificar el clon que dio positivo para los tres reporteros de la cepa y que contenía la secuencia del gen *SMP3* (*LAS2*). En este estudio de 2001 se desconocían las múltiples funciones de *SSU72*, exceptuando su relación con el inicio de la transcripción. Los resultados de este trabajo unidos a conclusiones más recientes en las que se confirma el papel de este factor con la regulación de la síntesis de quitina y la morfología de la pared celular <sup>[25]</sup> promovieron el interés para realizar el siguiente estudio.

En el año 2021 Soledad Regueira <sup>[29]</sup> desarrolló en nuestro laboratorio una estrategia para conseguir las condiciones necesarias para la amplificación de los clones de interés a partir de la genoteca de doble híbrido (y otras genotecas). Sin embargo, surgieron problemas a la hora del aislamiento de un clon con *LAS2*; entre ellos destaca la cantidad de DNA usada para esta PCR, así como el ratio genoteca/*megaprimer* o el tiempo de digestión con *DpnI*. Es necesario mencionar que, pese a que se obtuvieron clones por PCR que concordaban con el tamaño esperado y las digestiones con *KpnI* también eran las esperadas en varios clones, finalmente tras secuenciar los candidatos estos fueron descartados porque no contenían la secuencia de *SMP3* fusionada a Gal4.

Dado que múltiples factores pueden afectar al resultado del experimento, en este trabajo decidimos perseverar en el uso de esta metodología, pero introduciendo cambios.

## 2. Objetivos

Nuestro principal objetivo es aislar un clon de la genoteca de doble híbrido (Y2HL-c2) que contenga al gen *SMP3* optimizando la metodología desarrollada por Regueira en 2021. Para ello nos proponemos:

- Obtener un nuevo *megaprimer* para *SMP3*
- Aislar y caracterizar nuevos clones de la genoteca.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Líneas celulares

#### 3.1.1. Cepa de *Escherichia coli*

La cepa NZYStar de *E.coli* se obtuvo de la casa comercial NZYTech. Se trata de células ultracompetentes que se almacenan a -80°C. Genotipo: *endA1 hsdR17(rk-, mk+)* *supE44 thi -1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proA+B+ lacIq ZΔM15 :Tn10(TcR)]*.

### 3.2. Medio de cultivo LB

Tanto para la resuspensión como para el cultivo de las células bacterianas a la hora de la transformación se usó medio “Luria Broth” (LB), desarrollado por Bertani en 1951 [30].

La composición usada para obtener 500 mL de medio sigue la siguiente tabla:

Bactotripton	5 g
NaCl	2,5 g
Extracto de levadura	2,5 g
Dextrosa	0,5 g
Agua destilada	500 mL
Agar (placa)	7,5 g
Ampicilina (placas LBA)	1 μL/mL de medio

Tabla 1: Composición para 500 mL de medio LB

Todos los medios deben esterilizarse antes de su uso para asegurar una ausencia de contaminación biológica. La esterilización se realiza en un autoclave a 121 °C y 1 atmósfera un mínimo de 20 minutos. En el caso del cultivo en placa es necesario añadir un 1.5% de agar al medio líquido preparado. El pH del medio debe ser neutro, en torno a 7. Las placas LBA contienen ampicilina, un antibiótico usado a la hora de crear una selección positiva de las células que contienen el plásmido en el cultivo gracias a que contienen el gen de resistencia a ampicilina (Amp).

### 3.3. Plásmidos de la genoteca de doble híbrido

#### 3.3.1.1. Con el Dominio de Activación (AD) de Gal4

##### pGAD-c2

Constituye el vector vacío que sirve como base para la generación de la genoteca Y2HL-c2 (Figura 3). Contiene el promotor constitutivo de *ADH1* seguido del dominio de activación de Gal4 y el sitio de clonación múltiple (MCS). Esta combinación nos permite clonar fragmentos de DNA y nos asegura que habiendo glucosa presente en el medio se sintetice la proteína del gen que hayamos insertado fusionado a Gal4-AD.

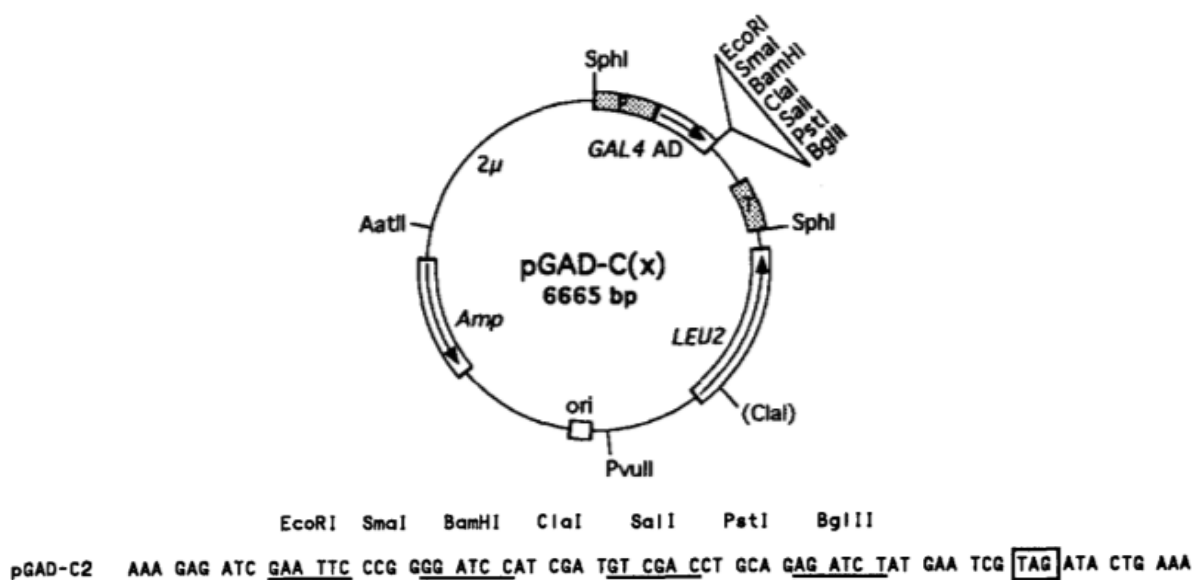


Figura 3: Esquema genérico de los vectores pGAD-C(x) donde la x se refiere a las tres posibles pautas de lectura. En nuestro caso trabajamos el c2. Obtenido de P. James et al., 1996.

### Genoteca Y2HL-c2 (derivados de pGAD-c2)

Los plásmidos pGAD-c2 anteriormente mencionados se emplearon para construir genotecas de doble híbrido con tres posiciones de pauta de lectura. Contienen inserciones de digestiones de 500-3000 pb de DNA genómico de la cepa de levadura YM706 [31]. En nuestro caso se emplea la genoteca Y2HL-c2 debido a que a partir de ella se aisló un clon con *SMP3* que interactuaba con el factor Ssu72.

### **3.4. Diseño de cebadores (*primers*)**

Los oligonucleótidos usados como cebadores para amplificar secuencias genómicas deben ser altamente específicos para evitar hibridaciones en regiones distintas del genoma. Además, debe presentar una  $T_m$  (*melting temperature*) mayor a 40°C y no generar estructuras secundarias que pudieran reducir o limitar el rendimiento del proceso de anillamiento en la PCR. Existen distintos consejos ofrecidos por distintas empresas (Takara, Thermofisher...) para el diseño de buenos cebadores. En general se debe considerar lo siguiente:

1. Diseñar cebadores de 18-30 nucleótidos.
2. Seleccionar el contenido G/C en un rango de 40-60%.
3. Mantener una distribución uniforme de G y C, evitando agrupaciones.
4. Evitar repeticiones largas del mismo nucleótido.
5. Procurar que el extremo 3' termine en C o G para promover la unión.
6. Mantener una  $T_m$  cercana (5°) entre ambos cebadores. Se puede usar la fórmula para calcular la  $T_m$ :  $TM = 4(G+C) + 2(A+T) \text{ } ^\circ\text{C}$
7. Tener una  $T_m$  entre 5 y 15 °C más alta que la temperatura de anillado
8. Evitar la formación de dímeros por complementariedad inter o intra cebadores

El portal Yeast Genome (<https://www.yeastgenome.org/>) ofrece un apartado en el que se puede usar el programa *Primer3* con los distintos genes en su servidor para la elaboración de cebadores con características elegidas (región dentro o fuera de un gen específico, longitud, GC%, complementariedad).

La pareja de cebadores diseñada se seleccionó dentro de la región codificante de *SMP3*, ya que el objetivo es obtener un *megaprimer* (gen-específico) con el que realizar la búsqueda en la genoteca.

### **3.5. Polimerasas y enzimas de restricción/modificación**

Para la realización de este trabajo se han empleado dos DNA polimerasas diferentes: NZYProof DNA polymerase (NZYTech) y Phusion (Thermo Fisher), ambas polimerasas recombinantes de alta fidelidad.

Las digestiones con las enzimas de restricción *DraI*, *BglII* etc., se efectuaron siguiendo las recomendaciones del proveedor (Takara y NZYTech).

La enzima *DpnI* reconoce el DNA metilado y lo degrada, con lo que se consigue que sólo el DNA plasmídico nuevo permanezca en la solución. Es empleada en la fase final tras la PCR del protocolo de mutagénesis.

### **3.6. Reacciones de amplificación por PCR**

Las reacciones para amplificar ácidos nucleicos por PCR se efectuaron en un termociclador en gradiente (BioRad T100).

Los oligonucleótidos usados como cebadores para este trabajo se encargaron a la empresa STABVida. Se resuspendió el material en agua destilada estéril hasta obtener una concentración de 50 mM. A partir de este stock se usaron alícuotas a 20 mM para los diversos experimentos.

### **3.7. Técnicas electroforéticas**

#### **3.7.1. Gel de agarosa**

La agarosa es un polisacárido empleado habitualmente como soporte para la separación de DNA en electroforesis debido a que su polimerización genera una red tridimensional de poros con un diámetro variable dependiente de la concentración de agarosa usada. Es por esto que la limitación en la movilidad de las moléculas cargadas en el gel depende del peso molecular (las moléculas más grandes migran más lentamente debido a que tienen más resistencia al interior del gel) y la concentración de agarosa, entre otros factores <sup>[32]</sup>.

En esta tesis se elaboran geles de agarosa al 0,8% al 1% peso/volumen en tampón TAE siendo las menores concentraciones utilizadas para resolver bandas de mayor peso molecular y las mayores para bandas de pequeño peso molecular. En general se usan geles al 1%, comentándose en la figura en caso de modificación.

### **3.7.2. Extracción del DNA de un gel de agarosa**

Para purificar fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa, empleamos el kit de extracción de la casa ThermoFisher (*GeneJet Gel Extraction and DNA cleanup Micro Kit*).

## **3.8. Transformación de bacterias**

### **3.8.1. Protocolo de transformación**

Las transformaciones se realizaron siguiendo el protocolo básico de transformación de bacterias mediante choque térmico descrito por Pope y Kent <sup>[33]</sup>.

### **3.8.2. Obtención de DNA plasmídico en bacterias**

Para el análisis de los candidatos se extrajo el DNA plasmídico siguiendo el protocolo de lisis alcalina empleando el kit *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher). Este procedimiento permite obtener un volumen final de 50  $\mu$ L en el que se encuentran los plásmidos presentes en las células. Su concentración se analiza con el espectrofotómetro para calcular la concentración en función de la absorbancia a 260 nm.

## **3.9. Empleo del protocolo de mutagénesis dirigida para el aislamiento de clones de una genoteca**

El empleo habitual de esta técnica usa dos cebadores de aproximadamente 50 nucleótidos complementarios entre sí y al DNA diana, pero introduciendo el cambio de uno o unos pocos nucleótidos con el objetivo de introducir la mutación deseada. En la reacción de PCR tras la desnaturalización del DNA plasmídico se produce el anillamiento del cebador con la región complementaria. Después de una cantidad determinada de ciclos de amplificaciones se obtiene DNA mixto: el recién sintetizado

con la mutación y el uso como molde, que es más antiguo. Para obtener únicamente el DNA con la mutación escogida se digiere con la enzima *DpnI*, la cual degrada el DNA antiguo que se encuentra metilado (Figura 4A).

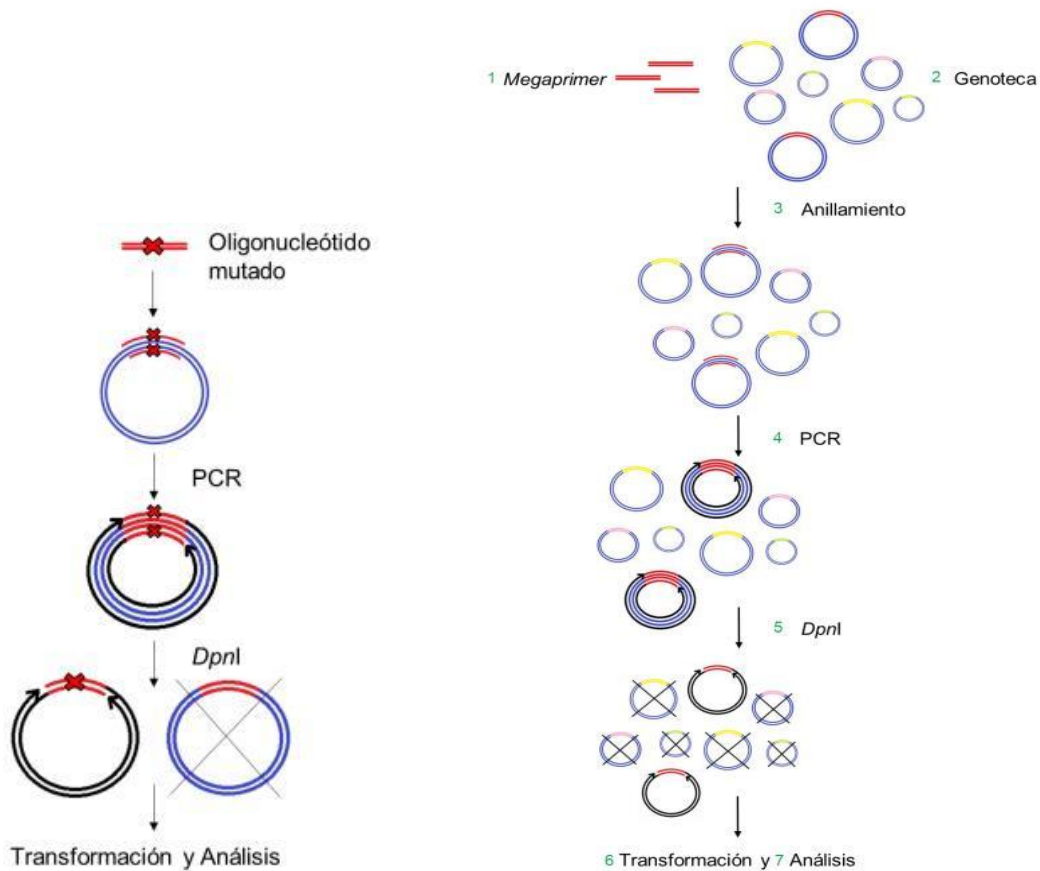


Figura 4. A: Esquema de un protocolo de mutagénesis dirigida. B: Estrategia para aislar genes de una genoteca. Obtenido de Regueira Amara, 2021.

En el caso del presente trabajo se realiza una variación de la técnica de amplificación de mutagénesis mediante la generación de un *megaprimer* en la cual se usan cebadores sin mutaciones y como molde una genoteca en lugar de un único plásmido (figura 4B). Para realizar la amplificación a partir del *megaprimer* se usó el kit comercial *NZYSupreme Mutagenesis Kit*. En el caso de este trabajo se modifica según se detalla en el apartado 4.2.1.

### 3.10. Análisis bioinformático

Mediante el programa BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se realiza un alineamiento de los datos obtenidos en el proceso de secuenciación con otras secuencias nucleotídicas que se hallan en la base de datos.



## 4. Resultados-discusión

### 4.1. Obtención del *megaprimer* por PCR

Tal y como se comentó en la introducción, partimos del trabajo realizado por María Soledad Regueira Amara <sup>[29]</sup> en el que se habían realizado optimizaciones para encontrar una temperatura y concentración (de cebadores y DNA de la genoteca) adecuadas para la obtención de un *megaprimer*.

#### 4.1.1. Diseño de cebadores

A fin de conseguir el clon con *SMP3* de la genoteca del doble híbrido, nos propusimos mejorar las condiciones de partida. Por ello, y pensando en la posibilidad de que el *megaprimer* anterior pudiese anillar en otras regiones de la genoteca de modo inespecífico, por lo que comenzamos un proceso de generación de un nuevo *megaprimer* diseñando nuevos cebadores (tabla 2). Para ello se empleó el programa específicos de SGD, y posteriormente se comprobó que los primers no tuviesen homología con otras regiones del genoma de *S. cerevisiae* haciendo un BLASTn también desde SGD (<https://www.yeastgenome.org/blast-sgd>).

	Inicio	Longitud	Tm (°C)	%GC	Secuencia 5'->3'
Primer forward (SMP3U)	76	24	59.29	37.50	ATCCAGATGAACATTTCCAATGCA
Primer reverse (SMP3R)	850	23	59.30	43.48	AGCAATACTGGGCCCACTATTTG

Tabla 2. Características de los cebadores diseñados

#### 4.1.2. Obtención del *megaprimer*

Para amplificar el nuevo fragmento de *SMP3* que emplearemos como *megaprimer* se probaron varias condiciones (tabla 2 A y B).

La concentración de DNA de la genoteca es de 3.9 ng/ $\mu$ L <sup>[28]</sup>. La amplificación de DNA por PCR para nuestras muestras se realizó introduciendo 1, 2 ó 4  $\mu$ L de genoteca y añadiendo los reactivos hasta un volumen final de 50  $\mu$ L.

### 4.1.3. Optimización de las condiciones de PCR para los nuevos cebadores

A	Molde	Y2H				DNA genómico	
		47	51	47	51	50	50
Tª °C							
Volumen (µL)							
DNA	4	4	4	4	1	2	
Buffer 10x	5	5	5	5	5	5	
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1	1	1	1	1	1	
dNTP 2.5 mM	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	
Las2IntU 20mM	2	2	-	-	-	-	
Las2IntR 20mM	-	-	2	2	-	-	
SMP3U 20mM	-	-	2	2	2	2	
SMP3R 20mM	2	2	-	-	2	2	
NZYProof Polymerase	1	1	1	1	1	1	
H <sub>2</sub> O	32.5	32.5	32.5	32.5	35.5	34.5	
Volumen final	50	50	50	50	50	50	

B	Etapa	Nº ciclos	Temperatura °C	Tiempo (minutos)
	1	1	95	3
	2	34	95	30 s
			47-51	1
			72	1
	3	1	72	5
	4	1	4	∞

Tabla 3. A: Variaciones en la temperatura y las concentraciones de DNA molde en las PCRs para la obtención del nuevo *megaprimer*. Y2H = genoteca Y2HL-c2. B: Ciclos empleados en el termociclador para la amplificación.

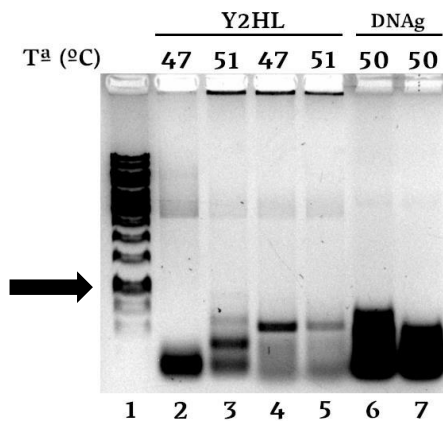


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% como comprobación de las PCRs de la tabla 6. La flecha indica la banda de 1Kb. 1: Marcador 1Kb. 2-5 Y2HL = genoteca doble híbrido. 6 y 7 DNA genómico (DNAg) correspondiente a 1 y 2 µL de DNA molde.

Los resultados se muestran en la figura 5. Como se puede apreciar, ninguna de las condiciones del ensayo mostró ninguna banda del tamaño esperado. Por ello fue necesario corregir las condiciones de la PCR. También cabía la posibilidad de que la NZYProof disponible estuviese afectada por una descongelación del congelador. Todo esto nos llevó a realizar pruebas con la polimerasa Phusion™ (Thermofisher)

disponible en el laboratorio y recomendada por la casa comercial para mejorar las amplificaciones en secuencias problemáticas en la amplificación.

Por tanto, se diseñaron nuevas reacciones con DNA genómico como molde en un termociclador en gradiente de temperatura con 5 condiciones diferentes (50°C, 53.5°C, 56.8°C, 64.3°C, 66.6°C) como se muestra en la tabla 4.

A		B			
Molde	DNA genómico	Etapa	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
DNA	1	1	1	98	30 s
Buffer 5x	10	2	34	98	10 s
dNTP 2.5 mM	2.5			50-67	30 s
SMP3U 20 mM	1			72	1
SMP3R 20 mM	1	3	1	72	7
Phusion Polymerase	0.5	4	1	4	∞
H <sub>2</sub> O	34				
Volumen final	50				

Tabla 4. A: Reactivos para la PCR en gradiente con la enzima Phusion. B: Ciclos empleados en el termociclador para la amplificación.

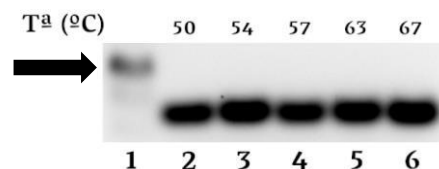


Figura 6: Bandas <1Kb obtenidas tras la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de la tabla. La flecha indica la banda de 1Kb. 1: Marcador 1Kb. 2-6: Productos amplificados con las reacciones cargados de forma correlativa

Como se aprecia en la figura 7, en todas las condiciones de temperatura se distingue una banda amplificada, aunque con este marcador el tamaño parece menor de lo esperado. Por otro lado, las bandas que aparecen tienen una intensidad similar. Por tanto, el rango de temperatura ensayado no es relevante para esta amplificación de *SMP3* con Phusion y a diferencia del experimento anterior obtenemos una sola banda.

Decidimos purificar las bandas obtenidas del mismo tamaño empleando el kit comercial Gene Jet Gel Extraction and DNA Cleanup MicroKit.

#### 4.1.4. Comprobación del *megaprimer*

##### Digestión con *Dra*I

Como primera comprobación de la validez del *megaprimer* se procedió a realizar una digestión de 2 horas con la enzima *Dra*I, que corta en uno de los extremos a cierta distancia (56 pb) del sitio de unión del cebador SMP3U empleado en la amplificación. Para comprobar el resultado se realizó una electroforesis añadiendo 5  $\mu$ L de muestra.

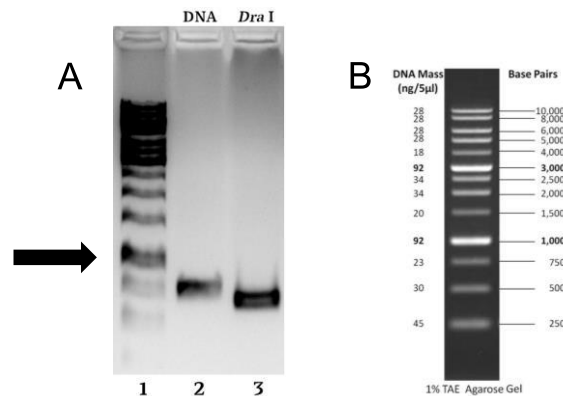


Figura 7: Comprobación de la digestión del *megaprimer*. A : Marcador con las bandas encontradas por tamaño de molécula y su equivalencia con la masa por volumen para realizar el cálculo de concentraciones. B: El resultado de la electroforesis. La flecha indica la banda de 1Kb. 1: Marcador 1Kb. 2: DNA purificado. 3: DNA digerido con *Dra* I.

Tras apreciar la banda deseada de 750 y comprobar la disminución del tamaño en la banda con DNA digerido, figura 7 comparar carriles 2 y 3, se procedió a analizar la imagen con el programa ImageLab (Bio-Rad) y apuntar la intensidad ajustada al fondo:

Banda 1Kb	Megaprimer
251886	1796544
23 ng/5 $\mu$ L	164 ng/ $\mu$ l

Tabla 5: Mediciones medias de intensidades de la banda correspondiente a 750 pb.

##### Secuenciación

La segunda comprobación se realizó por secuenciación. El fragmento de 750 pb se llevó a los servicios centrales de investigación (SAI) pudiendo confirmar que, como esperábamos, se correspondía con un fragmento de *SMP3*.

## 4.2. Aislamiento de clones con *SMP3* de la genoteca

Una vez obtenido el cebador específico, se puede hacer uso de este fragmento de 750 pb para, del mismo modo descrito por Regueira en 2021, emplear el protocolo de mutagénesis dirigida (sin la introducción de mutaciones) con el objetivo de aislar clones con *SMP3* fusionado a Gal4 de dentro de la genoteca de doble híbrido. Para ello se diseñó un experimento variando las condiciones como: el ratio genoteca/megaprimer, tiempos, temperatura de anillado).

Realizamos tres ensayos (nombrados PCR 1-3) en los que “PCR 1” y “PCR 3” se diferencian de “PCR 2” en el ratio genoteca/*megaprimer* y a su vez “PCR 1” y “PCR 2” se diferencian de “PCR 3” en los ciclos programados en el termociclador. Las diferentes condiciones se resumen en las tablas 6 y 7:

	PCR 1 y 3	PCR 2
DNA genoteca	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L
Megaprimer	2 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Ratio G/M	2	4

Tabla 6: Ratios genoteca/megaprimer en las distintas PCR.

PCR 1 y 2				PCR 3					
A	Etapa	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	B	Etapa	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
	1	1	95	2		1	1	95	2
	2	21	95	1		2	21	95	1
			55	1				55	1
			68	14				70	14
	3	1	68	15		3	1	70	15
	4	1	4	$\infty$		4	1	4	$\infty$

Tabla 7. A: Ciclos empleados en las PCR 1 y 2. B: Ciclos empleados en la PCR 3.

### 4.2.1. Digestión con *DpnI*

Tras la digestión con *DpnI* eliminamos los restos de DNA de genoteca que posee metilaciones y así nos quedamos con el DNA recién sintetizado (sin metilaciones).

Para la digestión empleamos 5  $\mu$ L de *DpnI* (para una reacción de 50  $\mu$ L) incubando durante 20 ó 30 minutos a 37°C para lo cual los productos de las PCR 1 y 2 se subdividieron como indica la tabla 8:

Nombre inicial	Nombre para digestión	μL usados	μL <i>DpnI</i>	Tiempo en digestión
PCR 1	PCR 1	25-30	2.5	30
	PCR 4	20	2.5	20
PCR 2	PCR 2	25-30	2.5	30
	PCR 5	20	2.5	20
PCR 3	PCR 3	45-50	5	20

Tabla 8: Comparación de los volúmenes de las distintas reacciones de digestión, el volumen de enzima *DpnI* y el tiempo de digestión con *DpnI*.

#### 4.2.2. Transformación de células bacterianas ultracompetentes

Se usaron células ultracompetentes proporcionadas por el kit de mutagénesis para la transformación con el DNA de las PCR obtenidas. La siembra se realizó en placas de LBA y se incubó a 37°C durante 24h. Tras el crecimiento en placa se procedió al conteo de colonias por placa:

Muestra	UFC	R. G/m	T <sup>a</sup> extensión	μL muestra amplificada	μL <i>DpnI</i>	Tiempo <i>DpnI</i>
CC 1	1342	1/1	68	25-30	2.5	30
CC 2	414	1/0.5	68	25-30	2.5	30
CC 3	62	1/1	70	45-50	5	20
CC 4	21	1/1	68	20	2.5	20
CC 5	26	1/0.5	68	20	2.5	20
CC 6	0	-	-	-	-	-

Tabla 9: Comparación del número de colonias (UFC) crecidas por placa según las distintas transformaciones y el ratio genoteca/megaprimero. R. G/m= Ratio genoteca/megaprimero.

Las condiciones CC1 y CC2 consiguieron un número demasiado elevado de colonias, es por ello que se descartaron para las siguientes etapas. Eliminando la condición control (CC6) se continuó con el análisis de los 3 *pooles* restantes que denominamos: 1 (CC3), 2 (CC4) y 3 (CC5).

De las colonias crecidas en CC4 se sembraron 10 candidatos en placas de medio LBA para su posterior análisis. En una primera etapa se analizaron mediante PCR todas las resiembras de cada placa en una única miniprep que por tanto constituía un *pool* de 10 candidatos. El objetivo era analizarlos por PCR conjuntamente, y sólo si aparece producto de PCR del tamaño esperado realizar minipreps individuales de los candidatos.

### 4.2.3. Comprobación de candidatos

Dado que previamente obtuvimos diferentes resultados, además de los distintos pools se realizan comprobaciones con dos DNA polimerasas: NZYProof y Phusion

A		B			
	x1 (µL)	Etapa	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Buffer Nzytech 10x	5	1	1	95	3
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1	2	34	95	30"
dNTP 2.5mM	2.5			56	45"
Primer Foward 20 mM	1			72	1
Primer Reverse 20 mM	1	3	1	72	7
DNA miniprep	1	4	1	4	∞
DNAProof polimerasa	0.7				
H <sub>2</sub> O	37.8				
Volumen final	50.2				

Tabla 9. A: Volúmenes de reactivos en las reacciones para la PCR de comprobación. B: Ciclos empleados en la PCR con Nzyproof.

A		B			
	x1 (µL)	Etapa	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Buffer HF 5x	10	1	1	98	30"
dNTP 2.5 mM	2.5	2	34	98	10"
Primer Foward 20 mM	1			60	30"
Primer Reverse 20 mM	1			72	1
DNAPProof polimerasa	0.5	3	1	72	7
H <sub>2</sub> O	34	4	1	4	∞
Volumen final	50				

Tabla 10. A: Volúmenes de reactivo empleados en las reacciones de PCR. B: Ciclos empleados en la PCR con Phusion.

En total por tanto, se analizaron cinco amplificaciones (Figura 8):

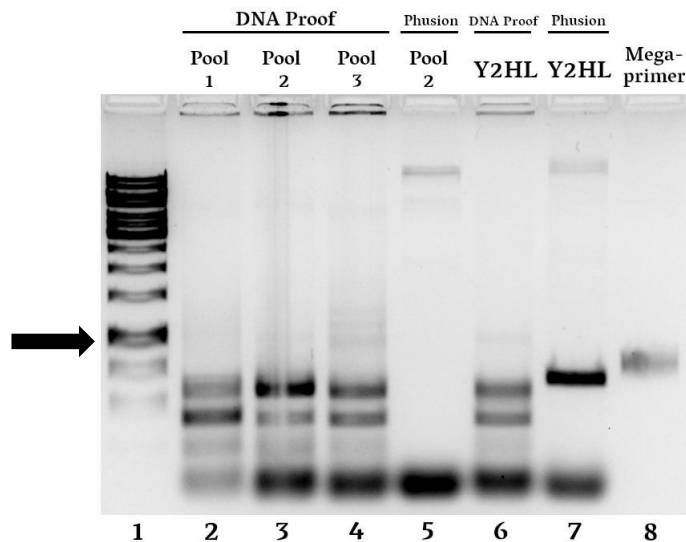


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa de los distintos *pool*es candidatos. La flecha indica la banda de 1Kb. 1: Marcador. 2, 3 y 4: Los distintos *pool*es amplificados con NZY DNAProof. 5: *Pool* 2 (CC4) amplificado con Phusion. 6 y 7: Genoteca Y2HL amplificada con ambas polimerasas. 8: Control (*megaprimer*) con el tamaño de banda esperado.

Este resultado permitió comparar el efecto de las dos polimerasas (figura 8). Tras estos resultados se decidió continuar caracterizando la muestra de la calle 3 (*pool* 2 - CC4). Se realizaron 10 extracciones de DNA plasmídico de candidatos individuales dentro del *pool* 2 y una PCR posterior de la cual se obtuvieron cinco posibles candidatos: A, E, F, I, J (Figura 9). Las características de la PCR siguen el mismo esquema de la tabla 9.

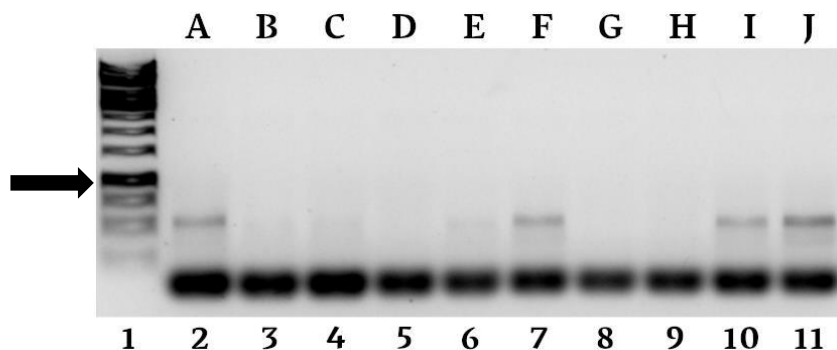


Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa. La flecha indica la banda de 1Kb. Los distintos candidatos del *pool* 2 se nombran A-J y se disponen en los carriles 2-11.

En la figura 9 se aprecian cinco posibles candidatos a contener *SMP3*. Se enviaron a secuenciar las muestras de los carriles 2 y 11. El resultado obtenido fue una lectura pobre en el candidato A y una doble lectura en el candidato J, por lo que este último podría haber un segundo plásmido interfiriendo en la reacción. La figura 10 muestra



el alineamiento mediante BLAST de la secuenciación obtenida con uno de los candidatos seleccionados tras las pruebas electroforéticas y de digestión. Se puede observar su alta homología con 20 nucleótidos próximos a uno de los extremos.

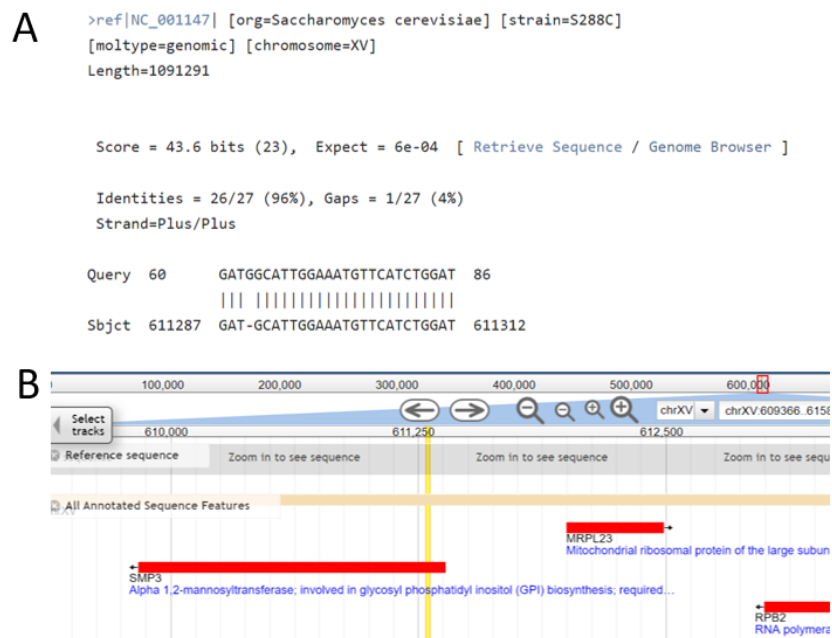
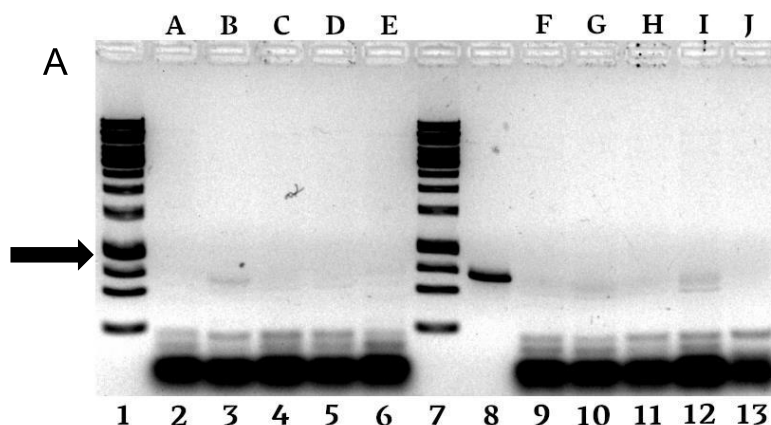


Figura 10: La parte superior (A) muestra el alineamiento encontrado tras un BLASTn mientras que en la parte inferior (B) se marca gráficamente la zona del alineamiento en el gen *SMP3*.

### Análisis de otros pools y comparación de resultados

En paralelo al análisis descrito para CC4, se realizó una comprobación de la eficiencia del procedimiento inicial usando otras dos condiciones: CC3 (*Pool 1*) y CC5 (*Pool 3*). Figuras 11 A y B.



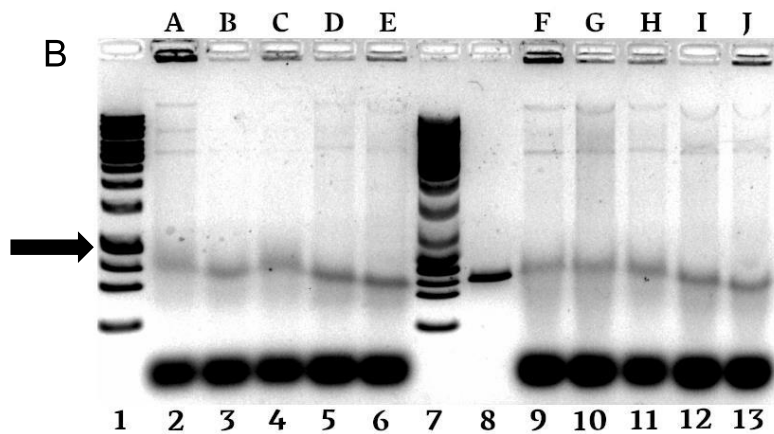


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa en la que se muestran las bandas de 10 candidatos del pool 1 (A) y pool 3 (B). La flecha indica la banda de 1Kb. 1 y 7: Marcador. 2-6: Candidatos A-E. 8: *Megaprimer* purificado. 9-13: Candidatos F-J.

Este gel pone en evidencia la diferencia que puede haber al tratar con distintos carriles dentro de un mismo gel de agarosa. Teniendo como referencia los marcadores podemos observar que bandas amplificadas del mismo tamaño han migrado de manera distinta. El efecto curvo en este caso podría deberse al calentamiento del gel.

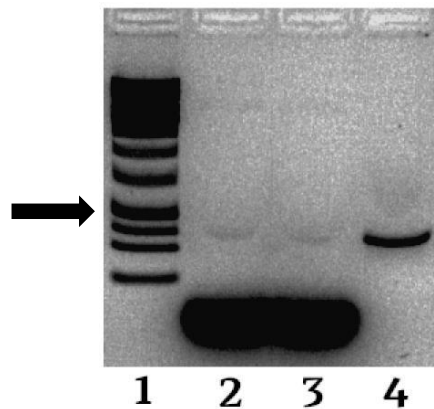


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa. La flecha indica la banda de 1Kb. 1: Marcador 1Kb. 2 y 3: PCRs de candidatos CC5-D y CC5-E. 4: *Megaprimer* purificado.

Al realizar una electroforesis con la amplificación de los candidatos para comprobar que se obtiene una banda del tamaño del *megaprimer* vemos que efectivamente la podemos encontrar, aunque muy débil. Los candidatos se comprobaron por secuenciación, y en este caso, ninguno contenía *SMP3*.

Existen diversos motivos que pueden, por tanto, ser la raíz del problema o contribuir a este resultado negativo tras la confirmación por secuenciación del *megaprimer*.

A la hora de aislar los clones de *SMP3* de la genoteca, de las condiciones usadas para las PCR (en base al crecimiento de colonias en placa) el tiempo de digestión con *DpnI* parece ser un factor más influyente que las variaciones la relación genoteca/megaprimer estudiadas.

El haber conseguido un clon con una pequeña porción de *SMP3*, pero alejada de *GAL4* en uno de los candidatos, nos hace pensar que o bien en la genoteca existen clones en que derivan de procesos de recombinación, o bien el *megaprimer* empleado, al tener un tamaño de 750 pb, bastante grande, favorezca estos eventos.

## 5. Conclusiones

A partir del diseño de dos nuevos cebadores se consiguió obtener un nuevo *megaprimer* específico con el que realizar el aislamiento de clones de *SMP3* de la genoteca de doble híbrido. La calidad de este *megaprimer* se validó mediante la digestión con la enzima de restricción *DraI* y posterior secuenciación.

Con el nuevo *megaprimer* se realizaron distintos ensayos (PCR 1-3) en los que se variaba el ratio genoteca/megaprimer (PCR 1 y 3 vs PCR 2) y se sometieron a distintos tiempos de digestión con *DpnI*. Los resultados muestran la importancia de ambas condiciones en base al crecimiento de colonias posterior.

La comprobación por PCR de los plásmidos obtenidos permitió identificar candidatos que presentaban el tamaño de banda esperado para *SMP3*. Sin embargo, tras la comprobación por secuenciación de dos candidatos de cada condición testada, se mostró que ninguno de los candidatos era bueno.

Los resultados presentados muestran las dificultades encontradas en este trabajo a la hora de conseguir buenos candidatos, lo que ratifica la necesidad de diseñar nuevas estrategias que nos permitan aislar clones de genotecas por PCR.

## 6. Bibliografía

1. Irie, K.; Araki, H.; Oshima, Y. Mutations in a *Saccharomyces cerevisiae* host showing increased holding stability of the heterologous plasmid pSRI. *Molec. Gen. Genet.* 1991. 225(2): 257–265.
2. Irie, K.; Araki, H.; Oshima, Y. A new protein kinase, SSP31, modulating the *SMP3* gene-product involved in plasmid maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1991. 108 (1): 139-144.
3. Conzelmann, A.; Riezman, H.; Desponds, C.; Bron, C. A major 125-kd membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid. *EMBO Journal*. 1988. 7 (7): 2233-2240.
4. Udenfriend, S.; Kodukula, K. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem.* 1995. 64: 563-591.
5. Flury, I. Glycosylphosphatidylinositol Membrane Anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: Characterization of Proteins Involved in Side Chain Modifications. Doctoral thesis. 2001. Freiburg university.
6. Orlean, P.; Menon, A.K. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids. *J. Lipid Res.* 2007. 48: 993-1011.
7. Muñiz, M.; Zurzolo, C. Sorting of GPI-anchored proteins from yeast to mammals – common pathways at different sites? *Journal of Cell Science.* 2014. 127: 2793–2801
8. Surma, M.A.; Klose, C.; Simons, K. Lipid-dependent protein sorting at the trans-Golgi network. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. 1821: 1059-1067.
9. Ilgoutz, S.C.; Zawadzki, J.L.; Ralton, J.E.; McConville, M.J. Evidence that free GPI glycolipids are essential for growth of *Leishmania mexicana*. 1999. *The EMBO Journal*. 18:2746-2755.
10. McConville, M.J.; Menon, A.K. Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids (review). *Mol Membr Biol.* 2000; 17(1):1-16.
11. Fujii, T.; Shimoi, H.; Imura, Y. Structure of the glucan-binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. 1427: 133-144.
12. Newman, H.; Romeo, M.; Lewis, S.; Yan, B.; Orlean, P.; Levin, D. Gpi19, the *Saccharomyces cerevisiae* Homologue of Mammalian PIG-P, Is a Subunit of the Initial Enzyme for Glycosylphosphatidylinositol Anchor Biosynthesis. *Eukaryotic Cell.* 2005. 4(11):1801-1807.
13. Fankhauser C.; Homans S.W.; Thomas-Oates J.E.; McConville M.J.; Desponds C.; Conzelmann A.; Ferguson M.A.J. Structures of Glycosylphosphatidylinositol Membrane Anchors from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 1993. 268: 26365-26374.

14. Grimme, S.J.; Westfall, B.A.; Wiedman, J.M.; Taron, C.H.; Orlean, P. The Essential Smp3 Protein Is Required for Addition of the Side-branching Fourth Mannose during Assembly of Yeast Glycosylphosphatidylinositols. *J Biol Chem*. 2001. 276(29):27731-9
15. Taron, B.; Colussi, P.; Wiedman, J.; Orlean, P.; Taron, C. Human Smp3p Adds a Fourth Mannose to Yeast and Human Glycosylphosphatidylinositol Precursors in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 2004. 279(34):36083-36092.
16. Kang, J.Y.; Hong, Y.; Ashida, H.; Shishioh, N.; Murakami, Y.; Morita, Y.; Maeda, Y.; Kinoshita, T. PIG-V Involved in Transferring the Second Mannose in Glycosylphosphatidylinositol. *Journal of Biological Chemistry*. 2005. 280(10): 9489-9497.
17. Eisenhaber, B.; Sinha, S.; Wong, W.C.; Eisenhaber, F. Function of a membrane-embedded domain evolutionarily multiplied in the GPI lipid anchor pathway proteins PIG-B, PIG-M, PIG-U, PIG-W, PIG-V, and PIG-Z. *Cell Cycle*. 2018, 17(7):874-880.
18. Kinoshita, T. Biosynthesis and biology of mammalian GPI-anchored proteins. *Royal Society Open Science*. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsob.190290>
19. Sun, ZW.; Hampsey, M. Synthetic enhancement of a TFIIB defect by a mutation in SSU72, an essential yeast gene encoding a novel protein that affects transcription start site selection in vivo. *Molecular and Cellular Biology*. 1996. 16(4):1557-1566.
20. Dichtl, B.; Blank, D.; Ohnacker, M.; Friedlein, A.; Roeder, D.; Langen, H.; Keller, W. A role for SSU72 in balancing RNA polymerase II transcription elongation and termination. *Molecular Cell*. 2002. 10(5):1139–1150.
21. Xiang, K.; Nagaike, T.; Xiang, S.; Kilic, T.; Beh, M. M.; James, L.; Tong, L. Crystal structure of the human symplekin-Ssu72-CTD phosphopeptide complex. *Nature*. 2011. 467(7316):729–733.
22. Krishnamurthy, S.; He, X.; Reyes-Reyes, M.; Moore, C.; Hampsey, M. Ssu72 is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Molecular Cell*. 2004. 14(3):387–394.
23. Zhang, D. W.; Mosley, A.L.; Ramisetty, S.R.; Rodríguez-Molina, J.B.; Washburn, M. P.; Ansari, A. Z. Ssu72 phosphatase-dependent erasure of phospho-Ser7 marks on the RNA polymerase II C-terminal domain is essential for viability and transcription termination. *Journal of Biological Chemistry*. 2012. 287(11):8541–8551.
24. Mejuto, G. M. Number copy effects on SKT5 gene's ability to suppress yeast SSU72 mutations. 2017. Master thesis. Universidade da Coruña.
25. Rodríguez-Lorenzo, M. Ultrastructural study of the SKT5 effects on the production of chitin in *Saccharomyces cerevisiae*. 2019. Master thesis. Universidade da Coruña.
26. James, P.; Halladay, J.; Craig, E.A. Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics Society of America*. 1996. 144(4):1425-1436.
27. Chien, C.T.; Bartel, P.L.; Sternglanz, R.; Fields, S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. 1991. 88(21):9578-9582.

28. Seoane, S. Utilización del sistema del doble híbrido para la caracterización de factores transcripcionales que interaccionan con el producto del gen *SSU72*. 2001. Tesis de licenciatura. Universidade da Coruña.
29. Regueira-Amara, M.S. Isolation of specific genes from a genomic library. 2021. Degree thesis. Universidade da Coruña.
30. Bertani, G. Studies on lysogenesis. *Journal of Bacteriology*. 1951. 62(3):293-300.
31. Johnston, M.; Andrews, S.; Brinkman, R.; Cooper, J.; Ding, H. *et al.*, Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VIII. *Science*. 1994. 265:2077-2082.
32. Sambrook, J.F.; Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
33. Pope, B.; Kent, H.M. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. 1996. 24(3):536-537.