

Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco Departamento
de sistemas biológicos

Protocolo de investigación para acreditación de servicio social

**“Generación de dos tipos de plásmidos reporteros: Mini genes reporteros para el
splicing alternativo del receptor D2R para dopamina y plásmidos reporteros de la
actividad del factor de transcripción de p53”**

Presenta

Gabino Castillo Castillo

Matricula: 2193029697

Asesor interno: Dr. Alejandro Azaola Espinosa

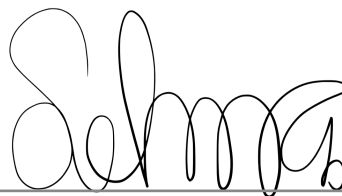
No. económico: 5616



Asesor externo: Dra. Selma Eréndira Avedaño

Vázquez

No. de cédula: 09165459



**Lugar y periodo de realización: Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN),
del 12 de febrero al 12 de agosto de 2024 (comprendiendo un periodo de 6 meses o el
equivalente a 480 horas).**

Índice

Introducción.....	3
Planteamiento del problema y Justificación.....	3
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
Antecedentes.....	5
Metodología.....	5
Extracción de DNA.....	6
PCR punto final.....	6
Diseño de primers.....	7
Integración PCR.....	7
Transformación.....	8
Purificación con Kit Miniprep.....	8
Digestión enzimática.....	9
Resultados y Discusión.....	9
Fig. 1 Minigen reportero del receptor D2R.....	10
Fig. 3 Plásmidos reporteros del factor de transcripción de p53.....	12
Conclusiones.....	13
Recomendaciones.....	14
Referencias.....	14

Introducción

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico circular, se encuentran en bacterias, son capaces de replicarse independientemente del cromosoma de la célula huésped (Malaka *et al.*, 2022). Son importantes herramientas genéticas que permiten la introducción, modificación o eliminación de genes diana facilitando su manipulación y análisis (Köbel *et al.*, 2022). En la actualidad se han desarrollado plásmidos reporteros, los cuales contienen un gen diana y una proteína reportera, permitiendo visualizar y cuantificar los niveles de expresión génica, actividad promotora y otros procesos celulares (Zou *et al.*, 2022).

Los minigenes son fragmentos genéticos que incluyen exones e intrones y las regiones de control necesarias para la expresión genética (Su *et al.*, 2023). Se utilizan como vectores informadores para visualizar los efectos del splicing en el RNA, proporcionando información sobre la regulación de la expresión genética y el impacto de las mutaciones en el empalme del pre-ARNm. (Reixachs & Eyra, 2022).

Planteamiento del problema y Justificación

La comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la expresión génica, es fundamental para elucidar la función de los genes en procesos fisiológicos. El uso de plásmidos reporteros permite visualizar la actividad de los promotores en los genes de interés, en tiempo real y de manera no invasiva, proporcionando información sobre enfermedades asociadas con la disfunción o mutación de genes. Así mismo los minigenes sirven para evaluar los efectos del splicing alternativo, un proceso que permite que un solo gen produzca múltiples isoformas de proteínas, se pueden construir minigenes para determinar los elementos reguladores cis y los elementos reguladores trans, por lo cual son herramientas útiles para determinar patrones en el splicing alternativo anómalo.

Objetivo general

- Generar un plásmido con una secuencia promotora responsiva para el factor de transcripción de p53.
- Generar un minigen reportero de splicing del receptor D2R.

Objetivos específicos

1. Amplificar la secuencia de los promotores (TLR3, MDM2 y p21) a partir de ADN genómico humano.
2. Clonar las secuencias promotoras (TLR3, MDM2 y p21).
3. Secuenciar la región del promotor clonado para verificar su exactitud.
4. Transfectar en un modelo celular humano que expresan p53 para confirmar la funcionalidad del plásmido.
5. Amplificar las secuencias del exón 5 a exón 7 para el receptor de dopamina D2R.
6. Clonar las secuencias del exón 5 al exón 7.
7. Secuenciar la región del promotor clonado para verificar su exactitud.
8. Transfectar el minigen construido en un modelo de célula humana para validar su funcionalidad como reportero de splicing del receptor D2R.

Antecedentes

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico comunes en muchas bacterias. Se replican independientemente del cromosoma (y de otras moléculas del DNA de la célula), pueden transmitirse verticalmente a las células hijas durante la división de la célula huésped y horizontalmente a otras bacterias, los genes ubicados en los plásmidos tienen efectos sobre los procesos metabólicos de sus huéspedes, sobre el fenotipo del huésped y sobre la aptitud del huésped, un ejemplo son los genes de resistencia a los antibióticos (Finks & Martini, 2023). Los plásmidos reporteros son constructos de DNA que contienen un gen de interés y un gen reportero, este reportero es una proteína que puede ser fácilmente detectada o medida, lo que permite a los investigadores monitorear la actividad de un promotor o gen específico,

un ejemplo es la proteína fluorescente verde (GFP) aislada de la medusa *Aequorea victoria* (Li *et al.*, 2018):

Los minigenes son fragmentos de genes que incluyen un exón y las regiones de control necesarias para que el gen se exprese, estos fragmentos se utilizan como vectores reporteros para estudiar el splicing alternativo (Martínez *et al.*, 2022). Los minigenes se crean mediante la amplificación por PCR de segmentos genómicos que incluyen las regiones de splicing, y luego se clonan en un plásmido que contiene un promotor y una secuencia donadora de

Splicing en posición 5' respecto al inserto y una secuencia aceptora de splicing con señales de terminación de la transcripción en 3' respecto del inserto. Estos segmentos se utilizan para analizar cómo los elementos cis (secuencias de RNA) y trans (proteínas reguladoras) interactúan para determinar el patrón de splicing alternativo (Jiang, & Chen, 2020). Los minigenes se utilizan para estudiar el splicing alternativo de manera controlada y reproducible, permitiendo la evaluación de cómo las mutaciones o variantes genéticas afectan el procesamiento del RNAm y cómo se regula este proceso en diferentes tejidos y células (Öther & Myant, 2022).

Metodología

Las líneas celulares fueron obtenidas del laboratorio de Consorcio de metabolismo de RNA largos y Vesículas Extracelulares del Instituto Nacional de Medicina Genómica, mismas que fueron immortalizadas a partir de tejido de próstata (HPrEC).

Extracción de DNA

Agregar 1 mL de buffer de lisis a la línea celular y mezclar bien. Incuba a 37°C durante 10 minutos para permitir la lisis de las células, agregar 10 µL de proteinasa K al buffer de lisis mezclar bien, incubar a 37°C durante 30 minutos para degradar las proteínas presentes, posteriormente agregar 100 µL de fenol al buffer de lisis e incubar a 65°C durante 10 minutos para permitir la separación del DNA de las proteínas y otros componentes celulares, centrifugar la mezcla a 12,000 rpm durante 10 minutos para separar las fases.

El DNA se encuentra en la fase acuosa superior, agregar 100 μ L de cloroformo al buffer de lisis y mezclar bien e incuba a 65°C durante 10 minutos para permitir la separación del ADN de las proteínas y otros componentes celulares, centrifugar la mezcla a 12,000 rpm durante 10 minutos para separar las fases, el DNA se encuentra en la fase acuosa superior, después agregar 100 μ L de isopropanol al buffer de lisis, incubar a -20°C durante 30 minutos para permitir la precipitación del DNA, centrifuga la mezcla a 12,000 rpm durante 10 minutos para separar las fases y agregar 10 μ L de TE buffer al DNA precipitado, mezclar bien e incubar a 65°C durante 10 minutos para permitir el lavado del DNA, agrega 1 μ L de DNAsa al DNA lavado, incubar a 37°C durante 30 minutos para permitir la resuspensión del DNA, finalmente se puede analizar mediante técnicas como la electroforesis en gel de agarosa o la PCR, cuantificar en nanodrop (Barbier *et al.*, 2019).

PCR punto final

Una vez obtenido el ADNc del material de origen, se debe asegurar que tenga una alta calidad y pureza, posteriormente se deben diluir las muestras de ADN en concentraciones definidas para su posterior amplificación por PCR. Los primers (F & R) específicos al sitio de interés amplifican una región precisa. Se añade 2.5 uL de ADN genómico (TLR3, MDM2 y p21) 2.5 uL para los primers F & R, 3 uL de buffer 5x y 1 uL de buffer 10x, igualmente 1 uL de taq polimerasa para finalmente aforar a 50 uL con agua Milli-Q®. Las condiciones se llevan a 95°C/1 min - 95 °C/15 seg (desnaturalización), 81.5°C/40 seg (annealing), 72°C/2.5 min - 72°C/6.5 min (extensión). Se debe visualizar los productos de la PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.7%

Diseño de primers

Para este proceso primero se seleccionó la región de los promotores (TLR3, P21 y MDM2) en el visualizador UCSC Genome Browser Human, Se detectó un pico significativo correspondiente al promotor del gen, lo que llevó a la selección de la secuencia de (TLR3, p21 y MDM2) que se une a p53 utilizando la plataforma Ensembl (Hafner *et al.*, 2020). Para ello, se exportan los datos de la secuencia seleccionada, confirmando que el promotor se encuentra en la cadena codificante al asignar el valor "1" en la opción "Select location". Además, se incorporaron 50 pares de bases de secuencias flanqueantes tanto en la región 5'

como en la región 3' de la secuencia promotora seleccionada. Posteriormente una vez teniendo la secuencia del polilinker (EGFP) y de los promotores se sigue la metodología de diseño quick change de tal manera que la técnica de PCR de integración nos permite amplificar esa secuencia de interés (TLR3, p21 y MDM2) y amplificar una secuencia del MCS de un vector (pEGFP-1) con la finalidad de integrar la secuencia de interés en el vector. Los primers deben tener una longitud de entre 25 y 45 bases y una temperatura de fusión (T_m) de ≥ 78 °C, un contenido mínimo de GC del 40% y terminar en una o más bases C o G en el extremo 3'. Se utilizó Oligo Calculator para comprobar si las secuencias de los primers forman dímeros o una posible estructura secundaria (horquilla) a una temperatura de hibridación de 55 °C o superior y para determinar la T_m se utilizó la fórmula: $T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - (675/N)$ donde N es el número de bases.

Integración PCR

Se toman los genes de interés y el vector seleccionado, se utiliza la enzima verifi y como componentes 2.5 µL del fragmento del gen (TLR3, P21 y MDM2), 5 uL del templado vector (pEGFP-n1), 5 µL 5X verifi buffer, 1 µL de 10x verifi Mx enhancer, 1 µL polimerasa verifi. Los primers deben amplificar una región que incluya la unión del genoma de integración y del vector para una detección precisa. La desnaturalización inicial de 95 °C por 30 segundos y una desnaturalización de 95 °C por 30 segundos, alineamiento de 55 °C durante 1 minuto, 68 °C por 8 minutos, se añade 1 µL de Dpn1 (enzima de restricción) Se hace una digestión con Dpn1 por 1 hora a 37 °C. Secuenciar los productos de PCR y analizar los datos para identificar sitios de integración y evaluar la abundancia relativa (Schmitt *et al.*, 2023).

Transformación

Las alícuotas de bacterias competentes de E.coli DH5 alfa (50-100 uL) se descongelan en hielo, se agrega 1 mL de plásmido previamente integrado y se incuban por 45 minutos . Se da un shock térmico en baño húmedo a 42 °C por 1 minuto y nuevamente se coloca en hielo por 2 minutos. Se agrega 1 ml de medio sin antibiótico y se incuba por una hora en agitación a 37 °C. Se centrifuga a 3000 rpm durante 1 minuto, se retiran 900 uL del sobrenadante. Los 100 uL restantes se plaquean en cajas con medio LB con 100 ng/mL de antibiótico de selección,

cada alícuota de bacterias sirve para una caja y se dejan crecer de 12 a 18 horas en incubación a 37 °C (Kostylev *et al.*, 2015).

Purificación con Kit Miniprep

Transferir el cultivo bacteriano con 6 ml de medio LB + Marcador de resistencia a tubos eppendorf de 2 mL y centrifugar a 2000 rpm durante 3 minutos, posteriormente se retira el sobrenadante y se agrega 250 uL de buffer p1 (Contiene RNasa y lisado azul) y se agita en un vortex levemente, en cada tubo y agite para resuspender completamente el sedimento celular. Transferir el sedimento bacteriano resuspendido a tubos Eppendorf de 1,5 ml utilizando una pipeta, agregar 250 µL el buffer p2 (solución de lisis) y mezclar invirtiendo suavemente los tubos 5 a 6 veces. La solución rápidamente se vuelve azul y viscosa, lo que indica lisis bacteriana. Agregar 350 µL del buffer N3 (solución neutralizante) y mezclar invirtiendo los tubos 5 a 6 veces. La solución azul se vuelve blanca y el ADN cromosómico bacteriano aparece como un precipitado blanco. Se centrifuga a 13 mil rpm por 10 minutos, el sobrenadante se pasa a una columna QiAprep 2.0 con tubo colector y se centrifuga a 30-60 segundos a 13 mil rpm, se decanta el filtrado y se lava la columna con 300 µL de buffer PB consecutivamente se centrifuga a 13 mil rpm y se vuelve a lavar la columna con 750 uL de buffer PE, se centrifuga a 13 mil rpm durante 30 a 60 segundos y se decanta el filtrado. Se centrifuga 1 minuto a máxima velocidad, se coloca la columna en un microtubo de 1.5mL y se eluye el DNA con agua caliente y se deja reposar durante 1 minuto, después se centrifuga de 13 mil rpm durante 2 minutos, finalmente se cuantifica en el nanodrop y se determina la pureza (Kodackattumannil *et al.*, 2023).

Digestión enzimática

Para los plásmidos Addgene/pcDNA-D2s-L-Venus y NECIIA se utilizan las siguientes concentraciones 6 uL y 9 uL respectivamente. Se usa 1 µL de XbaI en ambos plásmidos y 1 uL de SmaI únicamente en NECIIA. De igual manera se agregan 5 uL de buffer cut smart en los 2 vectores. Posteriormente los tubos se incuban a 37 grados por 1 hora y después a 65 °C por 20 minutos, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % consecutivamente se agrega 5 µL de bromuro de etidio.

Resultados y Discusión

Los primers diseñados mediante la metodología mencionada fueron específicos para cada promotor por lo cual mostraron una alta eficiencia en la amplificación por PCR, lo que permitió evaluar con precisión la integración de los promotores en los plásmidos reporteros.

CTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCATGCAGAACGAGTGCATC	FW
GGTGGATCCCGGGCCCGCGGTACCAGAACAATGGCGAGC	RV

Tabla 1. Primers D2 mini gen

CTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGGAGGAACTGTATCTTCACTTTAGAGAAAGG	FW
GTGGATCCCGGGCCCGCGGTACCTCATCAGGGAAGTGTGTGGCAAATAG	RV

Tabla 2. Primers promotor TLR3

AAGCTTCGAATTCTGCAGGGTACCGTTGCTTGAACCTGGGAGGCGGAG	FW
GAATGTCGTGGTGGTGGTGAGCTAGAAGGATCCACCGGTCGCCACCATGGT	RV

Tabla 3. Primers promotor p21

AAGCTTCGAATTCTGCAGGGTACCGCGACACCCCCACTCCATCATCCC	FW
CATTACATTGTTAAGCGTGGTTGAAGTTACGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGT	RV

Tabla 4. Primers promotor MDM2

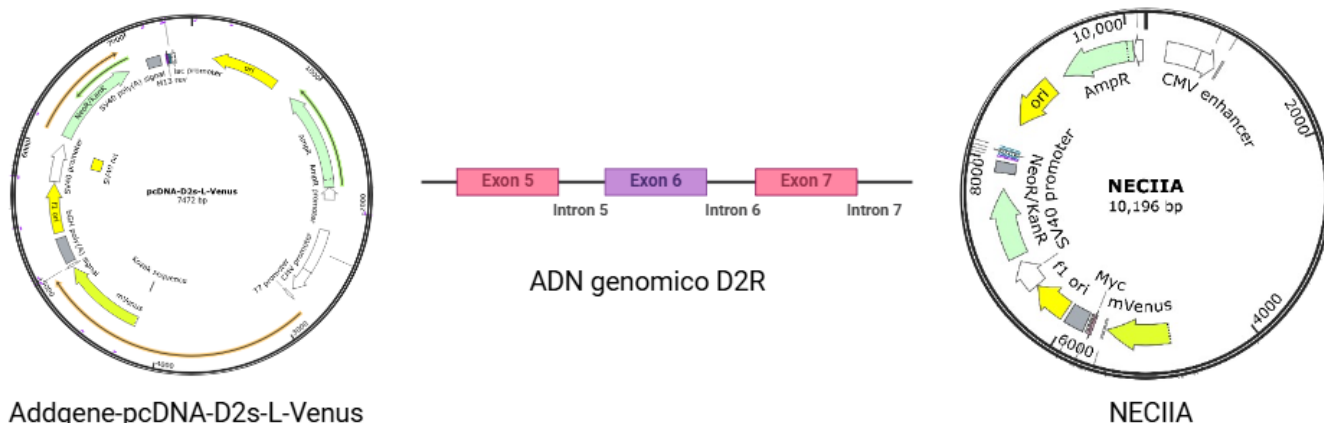


Fig. 1 Minigen reportero del receptor D2R

El plásmido de Addgene-pcDNA-D2s-L-Venus se seleccionó para insertar el minigen D2R debido a sus características ya que proporciona un sistema eficiente para la transcripción y traducción del minigen, también incluye una reportero fluorescente Venus, que permite monitorear la expresión del gen. Para lograr la construcción del plásmido NECIIA, se utilizó una estrategia de clonación molecular basada en técnicas estándar de digestión enzimática y ligación. El minigen fue diseñado previamente por el laboratorio Consorcio de metabolismo de RNA largos y Vesículas Extracelulares del Instituto Nacional de Medicina Genómica con el objetivo de analizar el splicing alternativo del exón 6 en el receptor D2R de dopamina, una región clave para comprender la regulación post-transcripcional de este receptor y su implicación en diversos procesos fisiológicos y patológicos, ya que contiene la secuencia codificante D2R, que incluye modificaciones para resistir la acción de siRNAs, así como las secuencias completas de los intrones 5 e intrón 6, permitiendo un análisis detallado del proceso de splicing en un contexto genómico más cercano a las condiciones naturales.

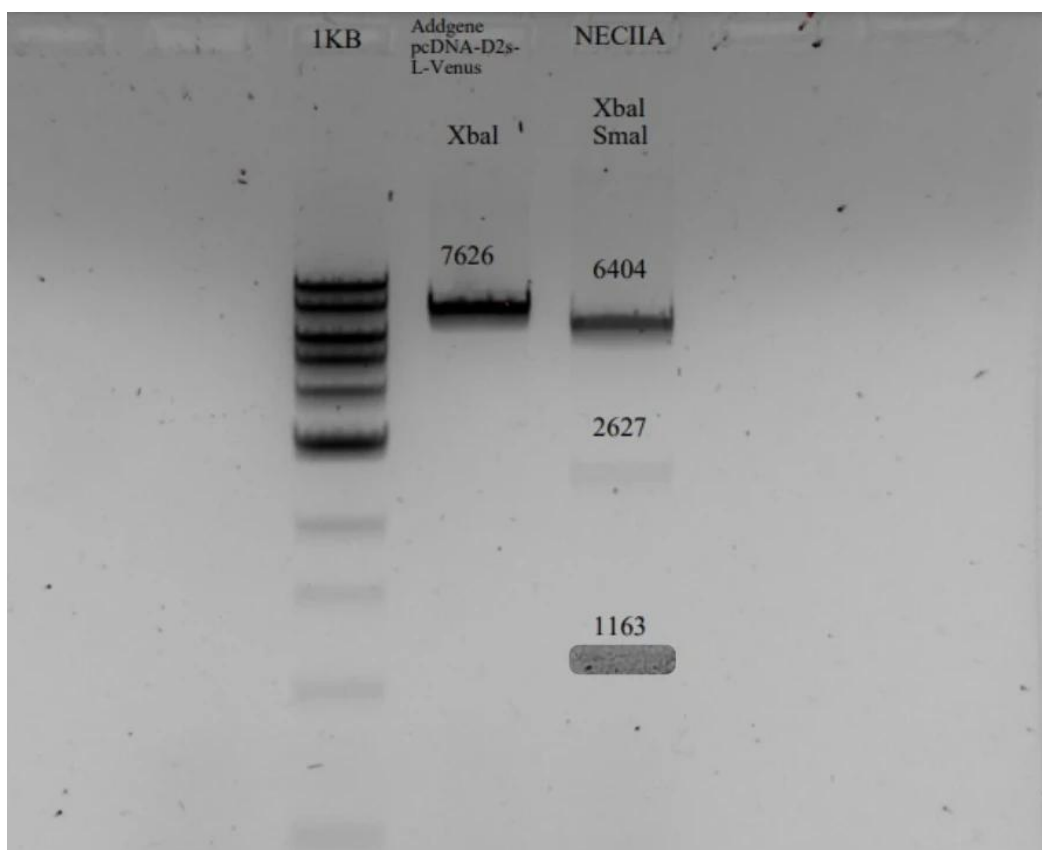


Fig 2. Digestión enzimática del minigen reportero D2R

La correcta construcción del plásmido NECIIA fue validada a través de digestión enzimática y análisis mediante electroforesis en gel de agarosa. Este procedimiento permitió confirmar la presencia del minigen dentro del plásmido, evidenciado por la observación de una única banda en el vector Addgene-pcDNA-D2s-L-Venus, que corresponde aproximadamente a 7626 pares de bases, tal como se indica en el marcador de 1 kb. En contraste, el análisis de la secuencia del plásmido NECIIA reveló un tamaño aproximado de 10190 pares de bases. Además, las enzimas de restricción empleadas generaron tres bandas que coinciden con el peso esperado del vector, lo que demuestra la correcta inserción del minigen en el plásmido final.

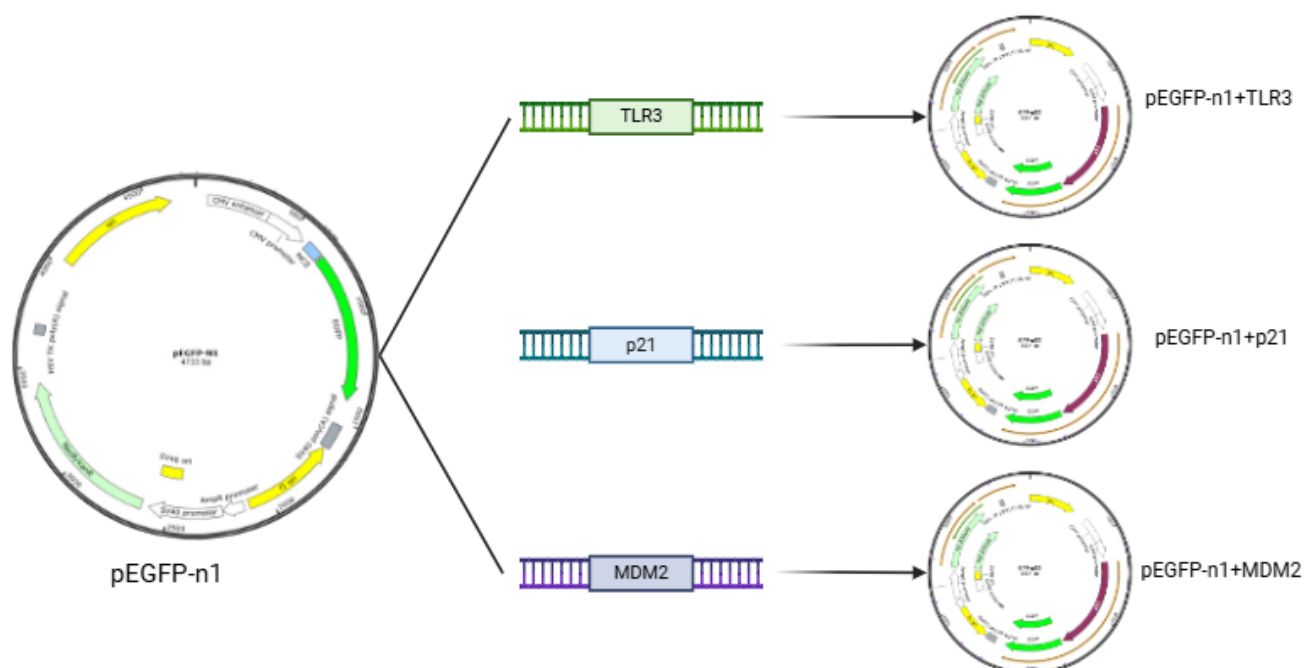


Fig. 3 Plásmidos reporteros del factor de transcripción de p53

Se empleó el plásmido reportero pEGFP-n1 para evaluar la actividad promotora de genes mediante la proteína verde fluorescente mejorada, la inserción de los promotores de p53 (TLR3, p21 y MDM2) en el vector se llevó a cabo mediante una PCR de integración, donde se diseñaron los primers específicos previamente (Tabla 2. 3. 4.) para amplificar las regiones del promotor deseadas.

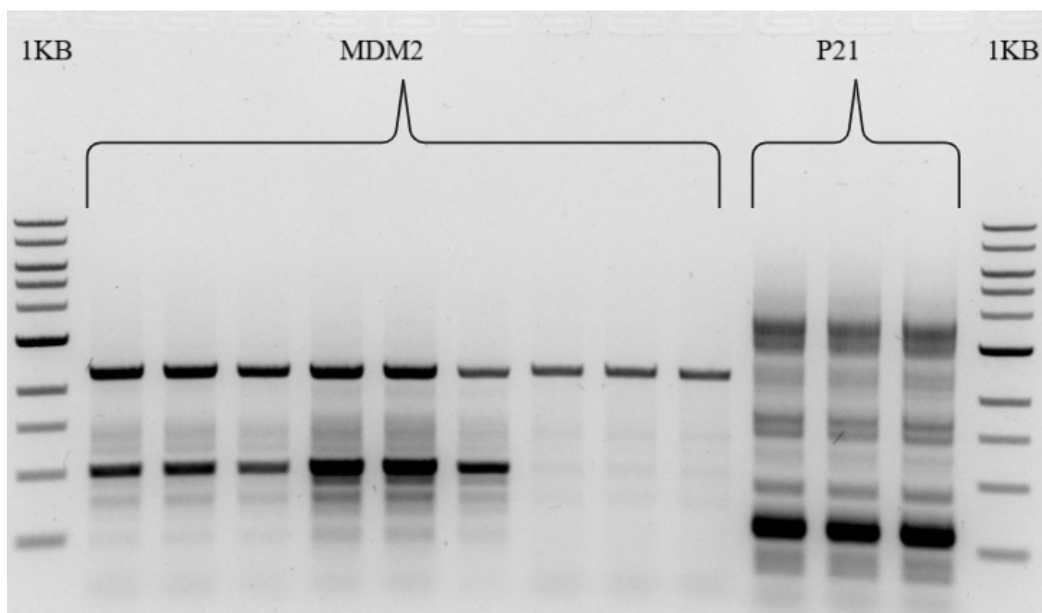


Fig.4 Electroforesis de promotores MDM2 y p21

La validación de la correcta inserción de los promotores de p53, p21 y MDM2 en el vector pEGFP-n1 fue realizada a través de PCR y un análisis posterior por electroforesis en gel de agarosa. Los resultados obtenidos revelaron la presencia de bandas con los tamaños esperados, lo que sugiere una integración exitosa de estos promotores en el plásmido. Sin embargo, la inserción del promotor TLR3 no pudo ser confirmada mediante esta metodología, esto después de verificar y reintentar contemplando la longitud, la temperatura de t_m y la ausencia de estructuras secundarias. Por lo tanto, se propone un rediseño de los primers para el promotor TLR3, seguido de una nueva ronda de PCR y electroforesis, con el fin de verificar su correcta inserción en el plásmido pEGFP-n1 y confirmar su funcionalidad en los ensayos posteriores.

Conclusiones

Se mostró una integración precisa de los genes de interés en ambos plásmidos, la cual fue confirmada mediante un análisis de digestión enzimática que permitió verificar la presencia del inserto dentro del vector, esto correspondiente al tamaño teórico del vector más el inserto. La concordancia entre los tamaños observados en los fragmentos digeridos y los valores calculados previamente proporcionó evidencia concluyente de que la inserción fue exitosa y que no hubo errores en la clonación, como inserciones incompletas o ausencia del gen de interés. No fue posible realizar la secuenciación para verificar que no hubiera mutaciones ni reordenamientos indeseados durante el proceso de clonación y por lo tanto tampoco se realizó la transfección de los plásmidos a un modelo celular para validar su funcionalidad como se había planteado debido a la complejidad del modelo de estudio. Por otro lado, la inserción y clonación de los promotores es crucial para entender la regulación génica en diferentes condiciones celulares, así mismo los minigenes pueden incluir solo las partes necesarias para la expresión y regulación de un gen, permitiendo en futuras investigaciones estudiar el efecto de estas mutaciones.

Recomendaciones

La implementación del Programa de Participación Estudiantil del INMEGEN es fundamental para la formación de estudiantes interesados en la investigación en el país, ya que potencia y diversifica las competencias necesarias. Este programa no solo proporciona experiencia práctica en la aplicación de técnicas moleculares avanzadas, sino que también fomenta el desarrollo de habilidades de pensamiento crítico y analítico. Al participar en este programa, se tiene la oportunidad de integrarse a proyectos de investigación relevantes, lo que permite adquirir conocimientos y destrezas que son esenciales para una futura carrera en el ámbito científico.

Referencias

1. Barbier, F. F., Chabikwa, T. G., Ahsan, M. U., Cook, S. E., Powell, R., Tanurdzic, M., & Beveridge, C. A. (2019). A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing. *Plant methods*, 15, 62.
2. Bueno-Martínez, E., Sanoguera-Miralles, L., Valenzuela-Palomo, A., Esteban-Sánchez, A., Lorca, V., Llinares-Burguet, I., Allen, J., García-Álvarez, A., Pérez-Segura, P., Durán, M., Easton, D. F., Devilee, P., Vreeswijk, M. P., de la Hoya, M., & Velasco-Sampedro, E. A. (2022). Minigene-based splicing analysis and ACMG/AMP-based tentative classification of 56 ATM variants. *The Journal of pathology*, 258(1), 83–101.
3. Finks, S. S., & Martiny, J. B. H. (2023). Plasmid-Encoded Traits Vary across Environments. *mBio*, 14(1), e0319122.
4. Hafner, A., Kublo, L., Tsabar, M., Lahav, G., & Stewart-Ornstein, J. (2020). Identification of universal and cell-type specific p53 DNA binding. *BMC molecular and cell biology*, 21(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12860-020-00251-8>
5. Hossain, M. W., Hossain, M., Arafath, K., Ety, S. S., Shetu, M. M. H., Kabir, M., Noor, F. A., & Mannoor, K. (2022). Real-Time fast PCR amplification using designated and conventional real time thermal cycler systems: COVID-19 perspective. *PloS one*, 17(10), e0276464.
6. Jiang, P., Ren, L., Zhi, L., Hu, X., & Xiao, R. P. (2021). Protocol for cell preparation and gene delivery in HEK293T and C2C12 cells. *STAR protocols*, 2(3), 100497.
7. Jiang, W., & Chen, L. (2020). Alternative splicing: Human disease and quantitative analysis from high-throughput sequencing. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 183–195.
8. Köbel, T. S., Melo Palhares, R., Fromm, C., Szymanski, W., Angelidou, G., Glatzer, T., Georg, J., Berghoff, B. A., & Schindler, D. (2022). An Easy-to-Use Plasmid Toolset for Efficient Generation and Benchmarking of Synthetic Small RNAs in Bacteria. *ACS synthetic biology*, 11(9), 2989–3003.

9. Kodackattumannil, P., Sasi, S., Krishnan, S., Lekshmi, G., Kottackal, M., & Amiri, K. M. A. (2023). Protocol for the High-quality Plasmid Isolation from Different Recalcitrant Bacterial Species: *Agrobacterium* spp., *Rhizobium* sp., and *Bacillus thuringiensis*. *Bio-protocol*, 13(15), e4788.
10. Kostylev, M., Otwell, A. E., Richardson, R. E., & Suzuki, Y. (2015). Cloning Should Be Simple: *Escherichia coli* DH5 α -Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. *PloS one*, 10(9), e0137466.
11. Li, M., Wang, Y., Liu, M., & Lan, X. (2018). Multimodality reporter gene imaging: Construction strategies and application. *Theranostics*, 8(11), 2954–2973.
12. Malaka De Silva, P., Stenhouse, G. E., Blackwell, G. A., Bengtsson, R. J., Jenkins, C., Hall, J. P. J., & Baker, K. S. (2022). A tale of two plasmids: contributions of plasmid associated phenotypes to epidemiological success among *Shigella*. *Proceedings. Biological sciences*, 289(1980), 20220581.
13. Mei, H., Shi, W., Pang, Z., Wang, H., Lu, W., Jiang, X., ... & Hu, Y. (2010). EGFP-EGF1 protein-conjugated PEG-PLA nanoparticles for tissue factor targeted drug delivery. *Biomaterials*, 31(21), 5619-5626.
14. Öther-Gee Pohl, S., & Myant, K. B. (2022). Alternative RNA splicing in tumour heterogeneity, plasticity and therapy. *Disease models & mechanisms*, 15(1), dmm049233.
15. Reixachs-Solé, M., & Eyras, E. (2022). Uncovering the impacts of alternative splicing on the proteome with current omics techniques. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 13(4), e1707.
16. Schmitt, LT, Schneider, A., Posorski, J., Lansing, F., Jelicic, M., Jain, M., ... y Sürün, D. (2023). Cuantificación de enzimas de edición de ADN evolucionadas a escala con DEQSeq. *Biología del genoma*, 24 (1), 254.
17. Su, T., Hollas, M. A. R., Fellers, R. T., & Kelleher, N. L. (2023). Identification of Splice Variants and Isoforms in Transcriptomics and Proteomics. *Annual review of biomedical data science*, 6, 357–376.
18. Zou, X., Nguyen, M., Overbeek, J., Cao, B., & Davis, J. J. (2022). Classification of bacterial plasmid and chromosome derived sequences using machine learning. *PloS one*, 17(12), e0279280.