

Establecimiento de Líneas Celulares de Leucemia Linfoblástica Aguda de Precursores B con  
Coexpresión Constitutiva e Inducible de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* Mediante Plásmidos

Recombinantes

Diego Fernando Rincón Reyes

Trabajo de Grado para Optar el Título de Magíster en Microbiología

Director

José Arturo Gutiérrez Triana  
Doctor en Ciencias Naturales

Codirectora

Nataly Cruz Rodríguez  
Doctora en Ciencias Biológicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2021

### **Agradecimientos**

Primero, quisiera agradecerle a Dios por permitirme estar aquí y lograr este sueño. A mis directores, quienes me formaron como investigador y como persona durante este tiempo. A mi familia, por su apoyo incondicional en los momentos buenos y malos. A Minciencias por el financiamiento de mis estudios por el programa Joven Investigador e Innovador. A la escuela de microbiología, laboratorio clínico y laboratorio de genética de la Universidad Industrial de Santander y la Fundación Cardiovascular de Colombia por permitirme llevar a cabo todos los experimentos en sus instalaciones. Muchas gracias a todas las personas que han formado parte de la línea de investigación en neoplasias hematológicas y biología molecular, en especial a Karen Lizeth Pachón Meza, José Luis Padilla Agudelo y Andrea Isabel Pinilla Da Silva. Finalmente, a todas las personas que contribuyeron de una u otra manera al cumplimiento de esta meta.

## Tabla de Contenido

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	12
1. Planteamiento del problema .....	14
2. Objetivos .....	17
2.1 <i>Objetivo General</i> .....	17
2.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	17
3. Marco Referencial .....	17
3.1 <i>LLA-B y las características genéticas de impacto pronóstico</i> .....	17
3.2 <i>Función biológica de los genes ID1, ID3 e IGJ en procesos tumorales</i> .....	20
3.3 <i>Líneas celulares y ADN recombinante en el estudio de la biología del cáncer</i> .....	25
3.4 <i>Composición y expresión de secuencias génicas</i> .....	26
3.5 <i>Herramientas de clonación de múltiples genes en un vector policistrónico</i> .....	28
3.6 <i>Vectores de Clonación</i> .....	30
3.7 <i>Modelo celular transitorio vs estable</i> .....	31
3.8 <i>Otras alternativas para la manipulación del genoma celular y expresión génica</i> .....	34
3.9 <i>Aplicación de los modelos celulares genéticamente modificados en LLA-B</i> .....	36
4. Materiales y Métodos .....	38
4.1 <i>Transformación Bacteriana</i> .....	38
4.2 <i>Manipulación de las bacterias experimentales</i> .....	38
4.3 <i>Diseño y construcción del cassette policistrónico de genes</i> .....	39
4.4 <i>Construcción del plásmido del sistema constitutivo (pSC)</i> .....	40
4.5 <i>Construcción del plásmido del sistema inducible (pSI)</i> .....	44

4.6 Diseño de integración genómica.....	46
4.7 Líneas Celulares.....	46
4.8 Transfección celular para la integración genómica eucariota.....	47
4.8.1 Lipofección de las líneas celulares .....	47
4.8.2 Electroporación de la línea NALM-6.....	48
4.9 Separación de las poblaciones celulares en suspensión por viabilidad.....	48
4.10 Análisis de la expresión de fluorescencia por microscopia y citometría de flujo.....	48
4.11 Evaluación de la expresión transcripcional.....	49
4.12 Evaluación de la expresión proteica.....	50
4.13 Análisis estadístico.....	51
5. Resultados .....	51
5.1 Lipofección en las líneas celulares .....	51
5.1.1 Línea 293T.....	51
5.1.2 Línea NALM-6.....	54
5.2 Electroporación de la línea NALM-6.....	54
5.2.1 Sistema de expresión constitutivo .....	54
5.2.2 Sistema de expresión inducible .....	56
5.3 Evaluación de la expresión génica mediante RT-qPCR .....	58
4.4.1 Sistema de expresión constitutivo .....	58
4.4.2 Sistema de expresión inducible .....	61
5.4 Evaluación de la expresión proteica.....	66
5.4.1 Sistema de expresión constitutivo .....	66
5.4.2 Sistema de expresión inducible .....	68

6. Discusión.....	69
7. Conclusiones .....	77
8. Recomendaciones.....	78
Referencias Bibliográficas .....	80

**Lista de Tablas**

	Pág.
Tabla 1. <i>Comparación entre los mecanismos de edición génica</i> .....	35
Tabla 2. <i>Primers utilizados para la construcción de los plásmidos recombinantes</i> .....	42

### Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1. <i>Mecanismo de funcionamiento del sistema inducible Tet-on.</i> .....	28
Figura 2. <i>Cassette de genes ID1/ID3/IGJ.</i> .....	40
Figura 3. <i>Estructura completa del plásmido pUC57 ID1/ID3/IGJ.</i> .....	40
Figura 4. <i>Estructura completa del plásmido pST CMV IFNk 3xpolyA EF1a GFP 2A Puro.</i> .....	41
Figura 5. <i>Comparación de los resultados esperados (A) y obtenidos (B) del análisis de restricción del plásmido kit F1 (pSC) con enzimas BamHI y XhoI junto a sus clones recombinantes.</i> .....	43
Figura 6. <i>Estructura completa del plásmido del sistema constitutivo (pSC).</i> .....	43
Figura 7. <i>Comparación de los resultados esperados (A) y obtenidos (B) del análisis de restricción del plásmido pSI con la enzima EcoRI junto a sus clones recombinantes.</i> .....	45
Figura 8. <i>Estructura completa del plásmido del sistema inducible (pSI).</i> .....	45
Figura 9. <i>Estructura completa del plásmido pCS2-Tol2 transposasa (Tol2).</i> .....	46
Figura 10. <i>Células 293T transfectadas con pSC (A) y cotransfectadas con pSC y Tol2 (pSC+Tol2) con expresión de GFP antes de la selección por resistencia a puromicina.</i> .....	52
Figura 11. <i>Células 293T cotransfectadas con pSC y Tol2 (pSC+Tol2) con expresión de GFP cultivadas con (A) y sin (B) 1 µg/mL puromicina después de una semana.</i> .....	53
Figura 12. <i>Células 293T cotransfectadas con pSI y Tol2 (pSI+Tol2) con expresión de GFP cultivadas antes (A) y después (B) de la selección con 1 µg/mL de puromicina después de una semana.</i> .....	54
Figura 13. <i>Células NALM-6 transfectadas con pSC (A) y pSC+Tol2 (B) con expresión variable de GFP con resistencia a 0,15 µg/mL de puromicina.</i> .....	55

- Figura 14. *Comparación de expresión de GFP en las células NALM-6 no transfectadas, transfectadas y cotransfectadas con el sistema constitutivo por citometría de flujo incubadas con 0,15 µg/mL de puromicina por una semana. .... 55*
- Figura 15. *Expresión de GFP en células NALM-6 pSI+Tol2+Puro sin (A) y con filtro 488 (B) (0,15 µg/mL de puromicina) antes de la adición de doxyciclina. .... 57*
- Figura 16. *Comparación de expresión de GFP en las células NALM-6 no transfectadas y cotransfectados con el sistema inducible sin y con la adición 1,0 µg/mL de doxyciclina por 48 horas por citometría de flujo (0,15 µg/mL de puromicina por una semana). .... 57*
- Figura 17. *Análisis de los cambios de expresión relativa de los genes ID1, ID3 e IGJ en las células no transfectadas, transfectadas y cotransfectadas con el sistema constitutivo incubadas con 1,0 µg/mL de puromicina después de 4 semanas (\*\*p < 0,001; ns: no significancia). .... 59*
- Figura 18. *Análisis de los cambios de expresión relativa de los genes ID1, ID3 e IGJ en las células no transfectadas, transfectadas y cotransfectadas con el sistema constitutivo incubadas con 1,0 µg/mL de puromicina después de 4 semanas (\*\*p < 0,001; \*p = 0,008; ns: no significancia). .... 61*
- Figura 19. *Análisis de los cambios de expresión relativa de los genes ID1, ID3 e IGJ en las líneas celulares con y sin la adición 1,0 µg/mL de doxyciclina por 48 horas. .... 62*
- Figura 20. *Análisis de los cambios de expresión relativa de los genes ID1, ID3 e IGJ para las células 293T no transfectadas y cotransfectadas con el sistema inducible incubadas con 1,0 µg/mL de puromicina después de 3-4 semanas con y sin la adición 1,0 µg/mL de doxyciclina por 48 horas (\*\*p < 0,001; ns: no significancia). .... 64*
- Figura 21. *Análisis de los cambios de expresión relativa de los genes ID1, ID3 e IGJ para las células NALM-6 no transfectadas y cotransfectadas con el sistema inducible incubadas con*

*1,0 µg/mL de puromicina después de 3 semanas con y sin la adición 1,0 µg/mL de doxiciclina por 48 horas (\*\*\*) $p < 0,001$ ; ns: no significancia)..... 66*

*Figura 17. Resultados de Western blot para las células no transfectadas, transfectadas y cotransfectadas con el sistema constitutivo incubadas con 1,0 µg/mL de puromicina para los modelos 293T y 0,15 µg/mL de puromicina para los modelos NALM-6 después de 6 semanas. . 68*

*Figura 18. Resultados de Western blot para las células no transfectadas y cotransfectadas con el sistema inducible incubadas con 1,0 µg/mL de puromicina para los modelos 293T y 0,15 µg/mL de puromicina para los modelos NALM-6 después de 3-4 semanas con y sin la adición 1,0 µg/mL de doxiciclina por 48 horas..... 69*

## Resumen

**Título:** Establecimiento de líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda de precursores b con coexpresión constitutiva e inducible de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* mediante plásmidos recombinantes \*

**Autor:** Diego Fernando Rincón Reyes, José Arturo Gutiérrez Triana, Nataly Cruz Rodríguez \*\*

**Palabras Clave:** LLA-B; Expresión génica; NALM-6; Tet-On; Tol2 transposasa

La leucemia linfoblástica aguda de precursores B (LLA-B) es una neoplasia hematológica con una alta incidencia en Colombia y unos bajos indicadores de supervivencia en comparación con otros países del mundo (Allemani et al., 2018). Actualmente, la información sobre los determinantes moleculares de la LLA-B en Colombia son muy limitados. Debido a esto, nuestro grupo identificó una firma de expresión génica que se correlaciona con el pronóstico de los pacientes adultos colombianos con LLA-B (Cruz-Rodriguez et al., 2016). Los pacientes que sobreexpresan simultáneamente los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* muestran una baja respuesta al tratamiento de inducción y una baja supervivencia, lo que sugiere que estos genes podrían ser parte de un mecanismo de resistencia de las células leucémicas hacia los agentes quimioterapéuticos.

Para probar esta hipótesis, integramos copias adicionales de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* en el genoma de la línea celular LLA-B NALM-6 con el fin de manipular simultáneamente su expresión. Esto se logró usando un policistrón compuesto de las secuencias codificantes de cada gen de interés marcado con péptidos etiqueta y separados por péptidos de autoclivaje virales tipo P2A. El policistrón fue regulado por un promotor constitutivo (CMV) o un promotor inducible dependiente de tetraciclina (TRE3G). La integración genómica fue realizada por la enzima Tol2 transposasa.

Analizamos la expresión de la firma y sus productos en modelos estables usando RT-qPCR y Western blot. Encontramos que, a diferencia de las células 293T, en los modelos constitutivos NALM-6 el policistrón está sujeto a un silenciamiento activo, mientras que el sistema inducible utilizado no logró sobreexpresar los genes de interés en ninguna línea. Sorpresivamente, se detectó una alteración en los niveles de expresión endógena del gen *IGJ* por la presencia de los transgenes en el genoma. Proponemos recomendaciones para ajustar los modelos y obtener los resultados esperados.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Maestría en Microbiología. Director: José Arturo Gutiérrez Triana. Doctor en Ciencias Naturales. Codirectora: Nataly Cruz Rodríguez. Doctora en Ciencias Biológicas

### Abstract

**Title:** Establishment of precursor B acute lymphoblastic leukemia cell lines with constitutive and inducible coexpression of *ID1*, *ID3* and *IGJ* Genes using recombinant plasmids \*

**Author:** Diego Fernando Rincón Reyes, José Arturo Gutiérrez Triana, Nataly Cruz Rodríguez \*\*

**Key Words:** B-ALL; Gene expression; NALM-6; Tet-On; Tol2 transposase enzyme

B Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) is a hematological neoplastic, with a high incidence in Colombia and lower survival rates compared to other countries in the world (Allemani et al., 2018). Currently, the information of the molecular determinants of B-ALL in Colombia is very limited. On this subject, our group identified previously a gene expression signature correlating with the prognosis of Colombian adult patients with B-ALL (Cruz-Rodríguez et al., 2016). Patients displaying simultaneous overexpression of the *ID1*, *ID3*, and *IGJ* genes exhibit poor response to induction therapy and poor survival, suggesting these genes as part of a resistance mechanism of the leukemic cells to chemotherapeutic agents.

To test this hypothesis, we integrated additional copies of *ID1*, *ID3*, and *IGJ* genes into the genome of the B-ALL cell line NALM-6 to manipulate simultaneously their expression. We achieved this using a polycistron composed of the coding sequences of each of the genes of interest labeled with tag peptides and separated by P2A-type viral self-cleavage peptides. The polycistron was driven by either a constitutive (CMV) or a tetracycline inducible (TRE3G) promoter. Genome integration was conducted by means of the Tol2 transposase.

We analyzed the expression of the signature and their products of the stable lines using RT-qPCR and Western Blot. We found that, unlike 293T cells, in the constitutive NALM-6 models the polycistron is subject to active silencing, while the inducible system used did not accomplish to overexpress the genes of interest in any line. Surprisingly, an alteration in the levels of endogenous expression of the *IGJ* gene was detected due to the presence of transgenes in the genome. We propose recommendations to adjust the models and obtain the expected results.

---

\* Degree Work.

\*\* Faculty of Health. School of Microbiology. Master in Microbiology. Director: José Arturo Gutiérrez Triana. Doctor in Natural Sciences. Co-director: Nataly Cruz Rodríguez. Doctor in Biological Sciences

## Introducción

Las Leucemias Agudas (LA) son un grupo de patologías neoplásicas que comprometen la medula ósea y otros órganos (Arber et al., 2016). Su origen radica en una proliferación incontrolada de linfoblastos o mieloblastos que se caracterizan por una pérdida progresiva de la capacidad de diferenciación (Arber et al., 2016). En Colombia, aunque las Leucemias Agudas no corresponden a uno de los tipos de cáncer más comunes, constituyen un problema de salud pública que requiere de atención prioritaria ya que su incidencia y mortalidad asciende anualmente.

Actualmente, Colombia junto con Costa Rica y Ecuador tienen las tasas de incidencia de leucemia más altas a nivel mundial (Allemani et al., 2018; Katz et al., 2015). Así mismo, ha sido señalado por varios estudios que la población latina presenta porcentajes de supervivencia libre de evento (SLE) y tasas de remisión completa (RC) menores a lo reportado en otros grupos étnicos (Bhatia et al., 2002; Kahn et al., 2016; Pollock et al., 2000). Adicionalmente, se ha encontrado que la supervivencia global (SG) es 2 años menor en comparación con la población no latina (Kahn et al., 2016; Kirtane & Lee, 2017; Yang et al., 2011).

Uno de los principales obstáculos para el tratamiento exitoso de este tipo de cáncer es la enfermedad recurrente y el desarrollo de resistencia a los medicamentos durante la quimioterapia (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). Por lo cual, la identificación de los mecanismos de resistencia de las células tumorales es crítica tanto para la estratificación del riesgo al momento del diagnóstico como para la aplicación correcta de estrategias terapéuticas que permitan mejorar el desenlace clínico de los pacientes (Inaba et al., 2013).

El estudio de los procesos biológicos de esta patología se beneficia de modelos celulares que permiten analizar la tumorigénesis y evaluar preguntas experimentales que no se pueden abordar directamente en modelos animales o humanos. Lo anterior ha permitido avances significativos en la comprensión de la patogénesis, descubrimiento de nuevos fármacos e identificación de alteraciones moleculares (Malard & Mohty, 2020; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017).

Estudios previos realizados en nuestra línea de investigación han identificado un perfil de expresión génica compuesto por los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* que se correlaciona con la respuesta al tratamiento quimioterapéutico de inducción y con el desenlace clínico de la enfermedad de pacientes colombianos con LLA-B (Cruz-Rodriguez et al., 2016). Para estudiar en detalle el significado de esta asociación, es necesario establecer un modelo de estudio que nos permita evaluar las relaciones de causalidad de la firma de expresión génica identificada en nuestra población con los mecanismos involucrados en la resistencia al tratamiento quimioterapéutico.

Por lo anterior, el objetivo de la presente propuesta de investigación fue establecer líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda de precursores B (LLA-B) que permitieran manipular la expresión de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* mediante el uso de técnicas de ADN recombinante e ingeniería genética. De esta manera, se buscó obtener un modelo celular que permitiera el estudio de estos genes como marcadores moleculares para la estratificación de la enfermedad y su influencia en la quimioresistencia y supervivencia de las células leucémicas.

## 1. Planteamiento del problema

En Latinoamérica, la leucemia representa el tipo de cáncer con mayor mortalidad en la población de adultos jóvenes, y según estadísticas colombianas, la supervivencia observada a 5 años en niños es del 53,8% y para los adultos es del 20,1% (Allemani et al., 2015; Curado et al., 2011). Estos datos contrastan significativamente con lo reportado en países norteamericanos, europeos, del oeste asiático y de Oceanía quienes informan tasas de supervivencia a 5 años del 80 a 90% en niños y 50 a 60% en adultos (Allemani et al., 2015).

A pesar de usar esquemas quimioterapéuticos estandarizados mundialmente, solo el 61% de los pacientes adultos colombianos con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) logran RC, con una mediana de SG de 11,3 meses y una SLE de 7,3 meses (Combariza et al., 2007). Hasta el momento se desconoce la razón de la baja respuesta al tratamiento en nuestro país, pero se ha sugerido que podría deberse a cambios propios de la enfermedad, a un aumento en el contacto de la población con factores asociados al desarrollo de esta o incluso a modificaciones genéticas propiamente étnicas (Combariza et al., 2007; Curado et al., 2011). En consecuencia, es necesario identificar las características celulares asociadas con la resistencia que permitan el ajuste de los esquemas quimioterapéuticos en nuestro país según las características de la población.

El éxito de los tratamientos quimioterapéuticos depende en gran parte de una correcta estratificación del riesgo de la enfermedad, por lo cual los factores pronósticos juegan un papel vital en este proceso. Dentro de los factores pronóstico, los más convencionales son la edad, el

recuento de leucocitos, la detección de enfermedad mínima residual y los rearrreglos cromosómicos (Arber et al., 2016; Chiaretti et al., 2014). Aunque los rearrreglos cromosómicos son los factores que predicen con mayor precisión la respuesta al tratamiento y la duración de la remisión (Inaba et al., 2013), aproximadamente el 50% de los pacientes no presentan dichas alteraciones cromosómicas, razón por la cual esta variable no puede ser empleada para la estratificación del riesgo en toda la población (Mrózek et al., 2009).

Estudios recientes han encontrado que ciertas alteraciones moleculares podrían tener un valor pronóstico más alto que las variables empleadas regularmente, por ello el interés de identificar estos marcadores ha aumentado (Cruz-Rodriguez et al., 2016; Pullarkat et al., 2008). Adicionalmente se ha propuesto que estos marcadores puedan servir como posibles objetivos terapéuticos o, que mediante su estudio, se logren identificar nuevos procesos moleculares que permitan incluir fármacos complementarios a los esquemas de quimioterapia ya estandarizados (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). Actualmente nuestro país posee información escasa acerca del comportamiento molecular de la enfermedad, por lo que se desconocen los mecanismos propios de la población colombiana que podrían estar influyendo en la respuesta del tratamiento.

En estudios previos de nuestra línea de investigación, se identificó por primera vez un perfil de expresión génica diferencial entre pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento quimioterapéutico de inducción en pacientes adultos colombianos con LLA-B (Cruz-Rodriguez et al., 2016, 2017a). Este perfil se caracterizó por la elevada expresión simultánea de los genes *IDI* (DNA binding protein inhibitor 1), *ID3* (DNA binding protein inhibitor 3) e *IGJ* (Immunoglobulin J polypeptide) en los pacientes no respondedores. Estos genes han sido relacionados con procesos

reguladores de diferenciación, apoptosis, supervivencia y autorrenovación de células tumorales (Cruz-Rodriguez et al., 2016), así, el perfil de expresión génica podría ser usado como un marcador pronóstico para estratificar el riesgo. Lo cual permitiría personalizar el tratamiento basado en la severidad de la neoplasia y posiblemente disminuir la mortalidad relacionada con la toxicidad por el uso de esquemas de quimioterapia combinada (Cruz-Rodriguez et al., 2016). Es de resaltar que el papel específico de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* en la biología y quimiorresistencia de las células de LLA-B aún es desconocido.

En la actualidad, el estudio de los procesos biológicos neoplásicos se realiza en modelos celulares, ya que estos ofrecen la posibilidad de determinar la función biológica de genes específicos por medio de tecnologías de ADN recombinante (S. Khan et al., 2016). Dichas tecnologías hacen uso de herramientas de origen bacteriano como los plásmidos, que son moléculas de ADN circular caracterizados por su rápida autorreplicación y fácil manipulación (S. Khan et al., 2016). Esto ha permitido que la función de muchos genes relacionados con los procesos tumorales haya sido identificada (S. Khan et al., 2016).

En consecuencia, esta propuesta de investigación propuso establecer un modelo celular modificado mediante ingeniería genética, que a corto plazo nos permitiera evaluar la causalidad y los mecanismos moleculares asociados a la sobreexpresión de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* en la resistencia a la quimioterapia de la LLA-B. De esta manera se buscó contribuir al entendimiento de la biología de la enfermedad cuando se presentan niveles altos de expresión de estos genes de manera simultánea.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Establecer líneas celulares LLA-B de coexpresión constitutiva y líneas celulares LLA-B de coexpresión inducible para los genes *IDI1*, *ID3* e *IGJ* mediante plásmidos recombinantes.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Construir plásmidos recombinantes con promotores constitutivos e inducibles para la expresión de los genes *IDI1*, *ID3* e *IGJ* y con capacidad de integración al genoma celular eucariota
- Evaluar los cambios en la expresión de los genes *IDI1*, *ID3* e *IGJ* en los modelos celulares de LLA-B transfectados
- Verificar la expresión proteica constitutiva e inducible de los genes *IDI1*, *ID3* e *IGJ* en modelos celulares de LLA-B transfectados

## 3. Marco Referencial

### 3.1 LLA-B y las características genéticas de impacto pronóstico

La LLA-B es una neoplasia hematológica causada por una diferenciación anormal, elevada proliferación y acumulación de precursores linfoides de linaje B en medula ósea y sitios extramedulares (Arber et al., 2016; Chiaretti et al., 2014; Paul et al., 2016; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). Según la alteración en el proceso hematopoyético, la clasificación de la leucemia linfoblástica aguda está basada en criterios morfológicos, inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares (Arber et al., 2016). La estratificación del riesgo implementada actualmente incluye

variables de alto impacto pronóstico como: 1) características demográficas como la edad; 2) estudios básicos de laboratorio como el recuento de leucocitos al momento del diagnóstico de la enfermedad y la infiltración o no de las células tumorales en Sistema Nervioso Central (SNC); 3) características propias de las células tumorales como el inmunofenotipo, citogenética, translocaciones cromosómicas; y por último, 4) detección de Enfermedad Mínima Residual para evaluar la respuesta al tratamiento de inducción (Arber et al., 2016).

El análisis molecular de las lesiones ocasionadas por lo rearrreglos cromosómicos, ha dado lugar a la identificación de mecanismos genéticos que contribuyen con la transformación de las células malignas. Algunas de estas lesiones genéticas están asociados a la respuesta al tratamiento y permiten identificar a los pacientes que tendrán un desenlaces favorable, intermedio o desfavorable (Mrózek et al., 2009; Mullighan, 2012; Xiaohui Zhang et al., 2017). Estas lesiones incluyen t(1;19) (q23;p13), t(12;21) (p13;q22), t(4;11) (q21;q23), rearrreglos en el gen *MLL* (mixed lineage leukemia) en el cromosoma 11q23, cariotipo hipodiploide o hiperdiploide con más de 50 cromosomas y particularmente un peor pronóstico de la enfermedad se ha asociado con la t(9;22) (q34;q11) (Mullighan, 2012; Xiaohui Zhang et al., 2017). Sin embargo, a pesar de la frecuente presencia de translocaciones cromosómicas y reordenamientos de genes en LLA-B, aproximadamente el 50% de los pacientes adultos no presentan rearrreglos cromosómicos (Mrózek et al., 2009).

Los datos provenientes de nuevos análisis genómicos y transcriptómicos han permitido la búsqueda de nuevos marcadores pronóstico que indiquen la posibilidad de recaída posterior al tratamiento y resistencia a la acción de agentes quimioterapéuticos, lo que se traduce en una

estratificación más adecuada de los pacientes, específicamente aquellos que presentan un cariotipo normal (Bhatla et al., 2014; Cruz-Rodriguez et al., 2016; Mrózek et al., 2009).

En las últimas dos décadas, diferentes grupos de investigación han identificado firmas génicas pronósticas en la población con LLA-B. En 2008, se determinó una firma compuesta por los genes *GLUL* (glutamine synthetase), *AZIN* (ornithine decarboxylase antizyme inhibitor) e *IGJ* (immunoglobulin J chain) en población infantil australiana que permitió estratificar el riesgo de recaída en un 89% (Hoffmann et al., 2008). Posteriormente, en el 2010, se encontró una firma de 38 genes que permitía realizar una identificación más precisa de los pacientes infantiles y juveniles norteamericanos con alto riesgo de recaer, además este estudio también señaló que la expresión génica dependía de la procedencia étnica (Harvey et al., 2010; Kang et al., 2010). Recientemente, se propuso una firma de 59 genes para predecir la SLE (Jing & Li, 2019). Esta firma se obtuvo al realizar un análisis de los perfiles de expresión génica recolectados por dos ensayos clínicos en población infantil de Estados Unidos (Jing & Li, 2019). Los genes que se encontraron estaban involucrados en procesos biológicos como la migración, el tráfico membranal y funciones moleculares como receptores de citoquinas (Jing & Li, 2019).

Estudios previos de nuestra línea de investigación llevaron a cabo un análisis transcriptómico en 43 pacientes adultos colombianos respondedores y no respondedores al esquema quimioterapéutico luego de completar la fase de inducción (Cruz-Rodriguez et al., 2016). Se encontraron 442 genes diferencialmente expresados entre los dos grupos de pacientes. Entre ellos, el perfil de expresión génica compuesto por los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* mostró ser una variable independiente capaz de predecir el desenlace clínico en términos de RC, SLE y SG (Cruz-

Rodriguez et al., 2016), lo que sugeriría que estos genes pueden estar involucrados en los procesos de resistencia al tratamiento. Además, estudios posteriores demostraron una correlación de esta firma génica con los marcadores inmunofenotípicos CD10 y CD20, por lo que se propone la identificación de dicha firma para una mejor estratificación de los pacientes colombianos (Cruz-Rodriguez et al., 2017b). Adicionalmente, con la identificación y el entendimiento de la función biológica de estos genes en LLA-B, se podrían determinar procesos o vías de señalización celular que se encuentren directa o indirectamente relacionados con los procesos de resistencia tumoral para proponerlos como posibles blancos terapéuticos y desarrollar nuevos agentes quimioterapéuticos (Lu & Abdel-Wahab, 2016; Oshima et al., 2016).

### **3.2 Función biológica de los genes *IDI*, *ID3* e *IGJ* en procesos tumorales**

Los genes *IDI* e *ID3* pertenecen a la familia de genes que codifican proteínas ID, estas proteínas son factores de transcripción tipo hélice-bucle-hélice que inhiben la unión de factores de transcripción tipo bHLH (hélice-bucle-hélice básica) al ADN, además de participar en la regulación de la diferenciación celular y la estabilidad cromosómica (Roschger & Cabrele, 2017). La sobreexpresión de los genes *IDI* e *ID3* han sido reportados en otros modelos de cáncer como seno, próstata, tiroides, linfomas y otras leucemias como leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia linfocítica crónica (LLC) (May et al., 2014; Roschger & Cabrele, 2017; L. Wang et al., 2015). En estos modelos, la sobreexpresión de los genes *ID* ha sido asociada principalmente con pronósticos desfavorables (Roschger & Cabrele, 2017), en los que se presenta una inhibición de la diferenciación durante la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, promoción de la migración tumoral, la angiogénesis y la quimiorresistencia (Roschger & Cabrele, 2017).

Específicamente en el proceso de maduración linfoide, la familia ID restringe el desarrollo y diferenciación de las células B por una formación de heterodímeros con los factores de transcripción producidos por los genes *E2A*, *HEB* y *E2-2* (Cochrane et al., 2011; Kee et al., 2001). Por una parte, ID1 bloquea la diferenciación linfoide B en la etapa celular de pro-B mientras que ID3 inhibe la apoptosis y detiene el crecimiento en respuesta al factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Cochrane et al., 2011; Kee et al., 2001). Incluso se ha encontrado que ID3 puede apoyar la acción de ID1 en el desarrollo de LMA en modelos murinos de laboratorio (L. Wang et al., 2015).

Se ha descrito una correlación de la sobreexpresión de los genes de la familia ID con la baja respuesta al tratamiento quimioterapéutico en varios procesos tumorales (Ke et al., 2018; Lasorella et al., 2014). Específicamente, angiogénesis, regulación del ciclo celular, apoptosis, transición epitelio-mesenquimal, señalización celular mediada por factores de crecimiento y autorrenovación, son procesos en los cuales estos genes han sido implicados (Ke et al., 2018; Lasorella et al., 2014).

La sobreexpresión del gen *IDI* ha sido un fenómeno comúnmente asociado a mecanismos de quimiorresistencia en células tumorales. El aumento de los niveles de expresión de este gen ha sido evidenciado en células del carcinoma escamoso esofágico, donde se ha observado una protección a la apoptosis inducida por TNF $\alpha$  debido a la activación de Bcl-2, además de un aumento de MDM2 e inhibición de p21 (Hui et al., 2006). En cáncer de seno, se ha reportado que el aumento de la expresión de *IDI* causa una protección de la apoptosis inducida por taxol debido a la represión de Bax y la activación de Bcl-2 causado por una disminución de p53 e I $\kappa$ B junto con un aumento

de la expresión de NF $\kappa$ B (H. Kim et al., 2008). Esta misma resistencia a taxol ha sido observada en cáncer de próstata mediante la vía JNK (Xiaomeng Zhang et al., 2006), siendo esta junto con ERK, esenciales para la adquisición de la resistencia a apoptosis inducida por dióxido de titanio en las células cáncer de pulmón (Y. S. Lee et al., 2009). Por otra parte, en cáncer de próstata, se ha demostrado la interacción de ID1 con la proteína caveolina-1, que conlleva a la transición epitelio-mesenquimal y la resistencia a la apoptosis inducida por taxol debido a una activación de la vía Akt (Xiaomeng Zhang et al., 2007). Adicionalmente, se ha establecido que la unión competitiva entre ID1 y E2F1 a la proteína 20 del ciclo de división celular (Cdc20) protege a la proteína E2F1 de la degradación mediada por Cdc20 y aumenta la quimiorresistencia a 5-fluorouracilo a través de la inducción de IGF2 dependiente de E2F1 y la expresión de timidilato sintasa en el cáncer de esófago (Li et al., 2016). También se ha encontrado que la expresión de ID1 inducida por Stat3 regula el efecto inhibitor del factor inhibitor de leucemia (LIF) sobre la apoptosis mediada por p53 y aumenta la expresión de MDM2, lo cual promueve quimiorresistencia en células de cáncer colorrectal (H. Yu et al., 2014). En carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello, se ha reportado que ID1 induce la fosforilación de Akt a través de PI3K y aumenta la expresión de supervivencia a través de NF- $\kappa$ B (Lin et al., 2010). En carcinoma hepatocelular, el aumento de la expresión del gen *ID1* se correlaciona con la resistencia a oxaliplatino por un aumento de expresión de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) y la activación de la vía de las pentosas fosfato a través de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina/c-Myc (Yin et al., 2017). En cáncer de colon, la sobreexpresión de *ID1* promueve la expresión de genes de enzimas metabolizadoras de 5-fluorouracilo como la fosfatasa de timidina, quinasa 2 uridinacitidina y deshidrogenasa dihidropirimidina (Przybyła et al., 2017). Finalmente, en carcinoma celular escamoso de esófago se ha reportado una activación de *ID1* por c-Jun/c-Fos, los cuales se unen directamente a la región promotora *ID1*, e inducen

quimiorresistencia de etopósido a través de la inhibición de la actividad de caspasa-3 y la escisión de PARP (*poly(ADP-ribose) polymerase*) (Y. Zhao et al., 2016).

Por otra parte, la sobreexpresión de *ID3* se ha encontrado involucrada en procesos de resistencia de la leucemia linfocítica crónica. En esta entidad se ha determinado que las células endoteliales vasculares rescatan a las células tumorales de la muerte celular espontánea y citotóxica inducida por fármacos a través de un mecanismo dependiente de redox acoplado a proteínas ID (Weiler et al., 2015). Se ha establecido que en colangiocarcinoma intrahepático, *ID3* inhibe a *E47*, el cual es el represor transcripcional de  $\beta$ -catenina, lo que resulta en un aumento de las características de células madre por medio de la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (L. Huang et al., 2019). Recientemente, se encontró que *ID3* aumenta la expresión de los genes *SOX10* y *MITF* que están asociados a la resistencia los inhibidores BRAF (Como el vemurafenib) que se utiliza para el tratamiento de melanoma (Sachindra et al., 2017). Incluso se ha observado que la expresión de *ID3* por señales mediadas por el TCR inducen la activación de la vía MAPK y evita la unión del complejo E2A/HEB sobre el promotor SRG3 lo que con lleva a la resistencia de timocitos a glucocorticoides (Ko et al., 2004). Así mismo, se ha reportado que la sobreexpresión de *ID1* e *ID3* disminuye la expresión de CDKN1A (p21) y CDKN1B (p27) respectivamente, lo que aumenta la agresividad del cáncer de próstata (Sharma et al., 2012). De igual manera, se ha visto que esta sobreexpresión simultanea aumenta la autorrenovación de las células iniciadoras de cáncer de colon (CC-IC) a través de la restricción del ciclo celular impulsada por el inhibidor del ciclo celular p21 y aumentan la resistencia a oxaliplatino (O'Brien et al., 2012).

Por otra parte, el gen *IGJ* codifica la cadena J de inmunoglobulina, que funciona como proteína de unión de monómeros IgM a pentámeros y de monómeros de IgA a dímeros, dando como resultado su ensamblaje y la secreción del anticuerpo pentamérico IgM (Castro & Flajnik, 2014). Aunque la función de este gen en la LLA aún no ha sido definida y la información disponible sobre su función biológica en procesos tumorales es limitada, varios estudios han encontrado que la sobreexpresión de este gen está relacionada con el mal pronóstico de pacientes con LLA en diferentes poblaciones (Cruz-Rodriguez et al., 2016; Harvey et al., 2010; Hoffmann et al., 2008; Jing & Li, 2019; Kang et al., 2010). Por lo anterior, en la última clasificación de neoplasias hematológicas definida por la OMS, se incluye una nueva categoría denominada Ph-like, que corresponde a la firma de expresión de varios genes con relevancia pronóstica, entre ellos el gen *IGJ* (Arber et al., 2016; Harvey et al., 2010). Adicionalmente, en 2009 la sobreexpresión del gen *IGJ* fue propuesto como un indicador pronóstico de metástasis en cáncer colorrectal y en 2018 fue incluido en un perfil de expresión génica con capacidad diagnóstica para el cáncer de pulmón no microcítico (Jorissen et al., 2009; Kuo et al., 2018).

Varios estudios han reportado sobreexpresión del gen *IGJ* en firmas de expresión relacionadas con el desenlace clínico de diferentes poblaciones con LLA (Cruz-Rodriguez et al., 2016; Harvey et al., 2010; Hoffmann et al., 2008; Jing & Li, 2019; Kang et al., 2010). Adicionalmente, en 2009 el gen *IGJ* fue propuesto como un indicador pronóstico de metástasis en cáncer colorrectal (Jorissen et al., 2009). En 2018 fue incluido en un perfil de expresión génica con capacidad diagnóstica para el cáncer de pulmón no microcítico (Kuo et al., 2018), mientras que en 2019 fue reportado en perfiles de resistencia de cáncer de ovario (Z. Zhang et al., 2019). Sin

embargo, ninguno de los estudios revisados sugiere un mecanismo funcional de *IGJ* en los procesos tumorales.

### **3.3 Líneas celulares y ADN recombinante en el estudio de la biología del cáncer**

Las líneas celulares son un modelo valioso para el entendimiento de la biología del cáncer (Ferreira et al., 2013; Matsuo & Drexler, 2004). Estos modelos celulares ofrecen ventajas de manipulación, accesibilidad e isogenicidad que no poseen los modelos animales (Ferreira et al., 2013). Así mismo, conllevan un menor control de las variables que puedan afectar los resultados, menores implicaciones éticas para su uso y ofrecen la posibilidad de servir como plataforma para la manipulación génica (Wilding & Bodmer, 2014).

La aplicación de las técnicas del ADN recombinante en líneas celulares ha permitido la comprensión de la biología celular por medio del análisis y la manipulación genética (S. Khan et al., 2016). La capacidad de controlar la expresión de casi cualquier gen a partir de secuencias promotoras en modelos celulares ha establecido la base del conocimiento genético actual del cáncer (Gillet et al., 2013). No obstante, el método para realizar esta manipulación genética depende del objetivo de la investigación (Kaufman, 2000). Los pasos generales para llevar a cabo la manipulación de la expresión de un gen exógeno en un modelo celular son: diseñar las secuencias del gen de interés, seleccionar el vector de clonación y método de transfección adecuado, elegir el tipo de expresión para el modelo y realizar una verificación de funcionamiento ya sea por adquirir resistencia a antibióticos o expresión de genes reporteros (Adachi et al., 2008; Kaufman, 2000).

### 3.4 Composición y expresión de secuencias génicas

La composición mínima de las secuencias necesarias para la expresión en el modelo celular comprende regiones reguladoras y regiones codificantes (Hayat Khan, 2013). Los promotores se componen de secuencias promotoras mínimas o basales, secuencias donde se ensambla el complejo de la ARN polimerasa II y secuencias reguladoras donde se activa la polimerasa. Estas región reguladora tiene como función modular la expresión de los genes que controlan y servir como plataforma para la unión de factores de transcripción (Hayat Khan, 2013). Se han empleado una gran variedad de regiones promotoras y su uso depende de las necesidades de la investigación, ya sea para una expresión constitutiva o inducible (Kaufman, 2000). Los promotores constitutivos se utilizan cuando se requiere que el gen de interés se exprese de manera constante y en niveles altos, es decir, buscando una sobreexpresión (Kaufman, 2000). Mientras que los promotores inducibles permiten aumentar la expresión de los genes en respuesta a un efector (Kaufman, 2000).

Una sobreexpresión génica de manera constitutiva es el objetivo de muchas investigaciones con modelos celulares modificados (Xia et al., 2006). Para este propósito, son utilizados promotores virales como CMV, SV40, MSCV, entre otros o promotores eucariotas como EF-1 $\alpha$ , UBC, CAGG, entre otros (Qin et al., 2010). Entre los anteriores, el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV) de 985 pb es la opción más utilizada debido a su versatilidad y fuerza para expresar genes transfectados (Xia et al., 2006; X. Yu et al., 2017). A pesar de que su actividad puede ser inhibida completa o parcialmente en algunas líneas celulares debido a un silenciamiento mediado por metilación, los modelos celulares transitorios derivados de LLA-B no han mostrado esta limitación (Ono et al., 2009; Xia et al., 2006).

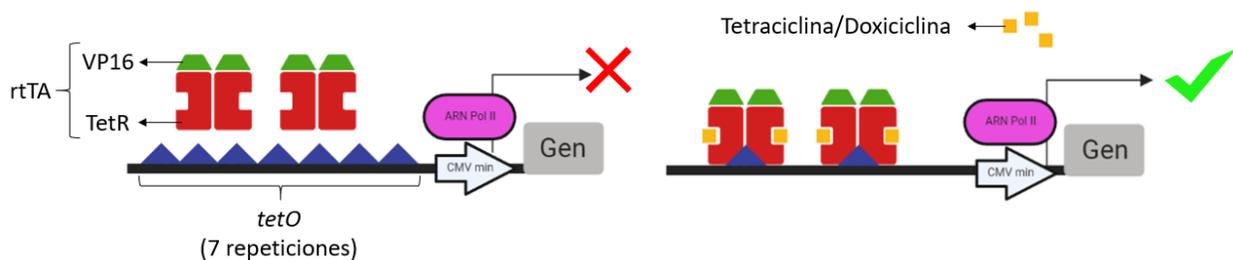
Por otra parte, los modelos celulares con promotores inducibles también han permitido grandes avances en la determinación de la función de genes de interés gracias a la capacidad de ser modulados en tiempo y espacio mediante el control del efector por parte del investigador (Wilding & Bodmer, 2014). Se han identificado y adaptado varias secuencias promotoras que responden a diferentes estímulos, pero no todas pueden ser utilizadas en modelos celulares, ya que algunos estímulos pueden ser tan drásticos que pueden llegar a afectar por si mismos el comportamiento del modelo celular (Kallunki et al., 2019; Kaufman, 2000). Por esta razón, se prefiere utilizar aquellos sistemas que responden a moléculas clínicamente aceptadas como los antibióticos, por ejemplo, macrólidos, estreptogramina, tetraciclina, entre otros (Kallunki et al., 2019). El sistema de silenciamiento o activación por tetraciclina (Tet-off y Tet-on, respectivamente) se ha convertido en el sistema más utilizado para el estudio de expresión génica inducida (Das, Tenenbaum, et al., 2016; Ono et al., 2009). A pesar de que ambos sistemas han mostrado ser suficientemente eficientes en la inducción génica, el sistema Tet-on se prefiere ya que ofrece la posibilidad de mantener las líneas celulares en medios suplementados sin tetraciclina (Das, Tenenbaum, et al., 2016; Das, Zhou, et al., 2016). Además, se ha reportado que el sistema Tet-on puede inducir una transcripción génica en niveles comparables a los obtenidos con promotores constitutivos (Qin et al., 2010).

El sistema Tet-on está basado en el mecanismo de resistencia de la bacteria *Escherichia coli* a la tetraciclina mediada por el transposón Tn10 y se compone de un elemento regulado por la tetraciclina (TRE), un promotor basal CMV, un transactivador reverso (rtTA) y un análogo de la tetraciclina (Fig. 1). El promotor Tet-on es una secuencia artificial compuesta por siete repeticiones de la secuencia del operador de tetraciclina (*tetO*) unido a una secuencia mínima del promotor de CMV. El transactivador reverso es una modificación del represor de tetraciclina (TetR) que tiene

fusionado un dominio de activación transcripcional VP16 o variantes de este, proveniente del virus *Herpes simplex*. El agente inductor puede ser tetraciclina o su derivado, doxiciclina (Zhou et al., 2006). Una vez agregado el agente inductor al medio, éste se unirá al rtTA provocando un cambio conformacional que le permitirá unirse a las secuencias operadoras de la región TRE, y se de esta manera activará la expresión del gen de interés (Das, Tenenbaum, et al., 2016; Das, Zhou, et al., 2016; Zhou et al., 2006).

### Figura 1.

*Mecanismo de funcionamiento del sistema inducible Tet-on.*



**rtTA:** transactivador reverso dependiente de tetraciclina. **VP16:** Dominio de activación transcripcional. **TetR:** represor de tetraciclina. **tetO:** operador de tetraciclina. **CMV min:** secuencia mínima del promotor de CMV. **ARN Pol II:** ARN polimerasa II. **Gen:** gen de interés.

### 3.5 Herramientas de clonación de múltiples genes en un vector policistrónico

Una vez generado el componente regulatorio, es necesario definir el (los) genes que se desean regular. La región codificante puede ser monicistrónica o policistrónica y es seguida de una secuencia de poliadenilación. Aunque en eucariotas los ARN mensajeros policistrónicos no son comunes, estos se pueden generar mediante ingeniería genética incluyendo secuencias virales o secuencias interna de unión a ribosomas (Karginov et al., 2017; Szymczak et al., 2004). El uso de

estas secuencias permite obtener una expresión simultánea de múltiples genes porque las proteínas codificadas se generan en un mismo evento traduccional, ya que se encuentran en el mismo ARN mensajero. De esta manera se ha logrado realizar una disminución de la variabilidad que podría presentarse al realizar una transfección individual de cada gen utilizando vectores independientes (Karginov et al., 2017). Hasta el momento, se han implementado dos tipos de secuencias para generar vectores policistronicos en el laboratorio, los Sitios Internos de Entrada al Ribosoma (IRES) y las secuencias de péptidos 2A (Komar & Hatzoglou, 2011; Szymczak et al., 2004).

Las secuencias IRES han sido descritas en las familias *Picornaviridae*, *Retroviridae*, *Flaviviridae* y algunos genes eucariotas relacionados con la protección a estrés y muerte celular (Komar & Hatzoglou, 2011; Mailliot & Martin, 2018). Los IRES poseen una longitud de aproximadamente 600pb y funcionan como plataforma independiente para el complejo proteico iniciador del proceso de traducción sin requerir el reconocimiento de la estructura cap-5' (Komar & Hatzoglou, 2011). Hasta el momento, se han encontrado cuatro clases de IRES virales que pueden o no requerir los factores de iniciación eucariota (eIF) para el ensamblaje del complejo, mientras que los IRES humanos aún continúan en proceso de estudio (Komar & Hatzoglou, 2011; Mailliot & Martin, 2018).

Por otra parte, los péptidos de clivaje 2A son secuencias de aproximadamente 80pb descubiertas en las familias *Picornaviridae* y *Tetraviridae* (Szymczak-Workman et al., 2012; Szymczak et al., 2004). Se ha determinado que cuando el ribosoma reconoce esta secuencia, se produce un “salto ribosomal” que interrumpe la formación del enlace peptídico, liberando el polipéptido amino terminal y permitiendo la continuación de la síntesis del polipéptido

carboxiterminal. (Szymczak-Workman et al., 2012; Szymczak et al., 2004). Este clivaje se da específicamente entre productos altamente conservados de la región carboxilo terminal entre los residuos de glicina y prolina (Szymczak-Workman et al., 2012). Actualmente, se han identificado cuatro secuencias de péptidos: tres de la familia *Picornaviridae* (F2A, E2A y P2A) y uno de la familia *Tetraviridae* (T2A), todos con capacidad de clivaje similar (Szymczak-Workman et al., 2012). Si bien las secuencias IRES y 2A han mostrado una correlación significativa en su función (S. Lee et al., 2019), algunos investigadores han expresado que la menor longitud de las secuencias 2A es una gran ventaja para su empleo en vectores de transfección, por lo cual su uso en esas áreas ha aumentado en los últimos años (Hofacre et al., 2017).

### 3.6 Vectores de Clonación

Posterior a la elección de las secuencias génicas, es necesario elegir el tipo de vector más adecuado para entregar el ADN recombinante y modificar la línea celular. Existen dos métodos para la internalización de material genético a células eucariotas: la transducción con vectores virales y la transfección de vectores no virales (Hayat Khan, 2013). *Adenovirus*, *Retrovirus*, *Vaccinia* y *Baculovirus* son las especies y familias virales más utilizadas como vectores (Hayat Khan, 2013). Mientras que, en los vectores no virales, encontramos ADN desnudo, oligonucleótidos, plásmidos y sus subsecuentes minimizaciones de tamaño a elementos como los pCOR (plásmidos con origen de replicación condicional) (Hardee et al., 2017).

Si bien los vectores de clonación viral han mostrado ser los más utilizados y más eficientes en la transfección de células de mamíferos, recientemente se ha evidenciado un reemplazo paulatino hacia los vectores no virales (Hardee et al., 2017; Kaufman, 2000). Lo anterior se debe

a que los vectores no virales no requieren niveles de bioseguridad especial para su manipulación además de inducir baja mutagénesis y toxicidad celular (Hardee et al., 2017). Hasta el momento, los plásmidos modificados de origen bacteriano son los más empleados para el estudio de cáncer debido a su bajo costo y relativa facilidad de producción, transporte, almacenamiento y manipulación (Hardee et al., 2017; Kaufman, 2000; Maeder & Gersbach, 2016). Sin embargo, un aspecto importante de todos los vectores no virales es la necesidad de utilizar mecanismos de entrega al interior de la célula, ya sea agentes físicos como electroporación o agentes químicos como liposomas, entre muchos otros (Kaufman, 2000; K. Khan, 2010).

La transfección por electroporación implica inducir un pulso eléctrico que produce poros transitorios en la membrana celular para la entrada del material genético (K. Khan, 2010). Mientras que, los liposomas son pequeñas vesículas lipídicas artificiales que albergan en su interior el material genético a transfectar que cuando entran en contacto con la membrana celular se fusionan y liberan su contenido dentro de la célula (K. Khan, 2010). Si bien cada uno de estos medios tiene ventajas y desventajas, la lipofección han mostrado que, a pesar de lograr un menor porcentaje de transfección, producen menor toxicidad celular que los otros medios (K. Khan, 2010; T. K. Kim & Eberwine, 2010). Aunque se ha reportado que este método puede ser ineficiente en células en suspensión (Basiouni et al., 2012).

### **3.7 Modelo celular transitorio vs estable**

Una vez transfectado el material genético, la expresión resultante puede ser transitoria o estable y depende del tipo de vector empleado (Kaufman, 2000). El primero se utiliza para investigaciones donde se requiera evaluar la expresión de los genes en un periodo de tiempo corto,

mientras que un modelo estable o “integrado” al genoma, es necesario cuando se requiere un seguimiento a largo plazo (Kaufman, 2000).

En los últimos años, el uso de transposones o “genes saltarines” ha surgido como una opción viable para la integración de material genético exógeno en células eucariotas (X. Huang et al., 2010). De manera general, estos sistemas de integración se basan en el principio de “cortar y pegar”. En esencia, se componen de una enzima transposasa y de un fragmento de ADN flanqueado por secuencias reconocidas por la transposasa. Al reconocer estas secuencias, la transposasa genera cortes de doble cadena en el ADN, libera el fragmento y lo integra de manera aleatoria en el genoma celular (X. Huang et al., 2010). Hasta el momento, los tres sistemas transposasa más empleados son *Sleeping Beauty*, *PiggyBac* y *Tol2*.

El sistema *Sleeping beauty* (SB) es un sistema reconstruido con base en secuencias de transposones inactivos de la superfamilia *Tc1/mariner* (K. Khan, 2010). Recibió el nombre de uno de los famosos cuentos de los hermanos Grimm debido a su largo “sueño” antes de su descubrimiento y activación (Hudecek et al., 2017). Con el paso de los años se han hecho varias modificaciones de los aminoácidos de su transposasa con el fin de aumentar su actividad y eficiencia. Actualmente, la variante más activa es la SB100X, la cual consta de dos secuencias terminales invertidas repetidas (TIRs) de longitud variable a cada lado del gen móvil y una transposasa con modificaciones en sus sitios de reconocimiento hacia 5' y 3' que integra en secuencias TA (Hudecek et al., 2017).

Por otra parte, el sistema *Piggybac* (PB) fue aislado de la oruga de la col (*Trichoplusia ni*) aunque fue identificado por primera vez en el *baculovirus*, por lo cual recibió ese nombre (S. Zhao et al., 2016). De manera similar al SB, este sistema se compone de secuencias de reconocimiento TIRs y una transposasa que integrará los genes en regiones con secuencias TTAA (S. Zhao et al., 2016).

Finalmente, el sistema *Tol2* transposasa, aislado del pez medaka (*Oryzias latipes*) en 1996 (Kawakami, 2007), fue el primer transposón activo aislado de un organismo vertebrado y de manera particular, comparte características estructurales con las transposasas *hAT* (Ni et al., 2016). El sistema *Tol2* se compone de una enzima transposasa que reconoce secuencias TIRs y realiza integraciones en sitios de inicio de la transcripción, islas CpG y sitios sensibles a la DNaseI, además de una crear una duplicación de 8pb adyacentes al elemento génico integrado (X. Huang et al., 2010; Kawakami, 2007).

En todos estos sistemas la eficiencia de transposición es inversamente proporcional al tamaño del inserto a movilizar (X. Huang et al., 2010). Se ha reportado que el sistema *Tol2* tiene una capacidad límite de carga de 200kb, aunque después de 11kb su actividad disminuye considerablemente (Kawakami, 2007; Tsukahara et al., 2015). El sistema PB cuenta con un límite de 150kb y presenta disminución de actividad en aproximadamente en 14kb y para SB no se ha establecido su capacidad máxima pero su actividad es afectada con secuencias mayores a 5kb, además de tener una inhibición por altas concentraciones de su enzima transposasa (X. Huang et al., 2010; Tsukahara et al., 2015; S. Zhao et al., 2016). Cada sistema ha sido evaluado en investigaciones de modificación de linfocitos T con receptores de antígenos quiméricos y los

resultados han sido satisfactorios (Chicaybam et al., 2013; Morita et al., 2018; Tsukahara et al., 2015). No obstante, se ha propuesto al sistema *Tol2* transposasa para estudios de terapia génica gracias a su gran capacidad de almacenamiento y por no presentar inhibición a altas concentraciones de la enzima transposasa (X. Huang et al., 2010; Kawakami, 2007; Tsukahara et al., 2015).

### **3.8 Otras alternativas para la manipulación del genoma celular y expresión génica**

Como es de amplio conocimiento, las transposasas no son consideradas como herramientas para la edición génica debido a que únicamente se centran en la integración de transposones semialeatoria en el genoma. Con los años se han desarrollado herramientas, entre las cuales el sistema de endonucleasas de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas (CRISPR-Cas, por sus siglas en inglés) han mostrado los mejores resultados en esta área (L. Chen et al., 2014; Maeder & Gersbach, 2016; Moon et al., 2019; Osborn et al., 2016). Precisamente, el sistema CRISPR-Cas ha sido preferido sobre las otras opciones debido a sus características de alta eficiencia y especificidad, insensibilidad a sitios de metilación, baja complejidad para su construcción, entre otras (Tabla 1) (L. Chen et al., 2014; Maeder & Gersbach, 2016; Moon et al., 2019; Osborn et al., 2016).

**Tabla 1.***Comparación entre los mecanismos de edición génica*

<b>Mecanismos de edición génica</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Dedos de Zinc (DZ)</b>	Permeables a membrana celular	Alta complejidad para su construcción, baja especificidad y capacidad de direccionamiento
<b>TALEN</b>	Alta especificidad, mayor que los dedos de zinc	Mayor tamaño que los DZ y dificultad para almacenamiento en vectores virales
<b>Meganucleasas</b>	Tamaño pequeño	Superposición en forma y función, baja especificidad y construcción compleja
<b>CRISPR-Cas</b>	Construcción relativamente sencilla, alta especificidad y no es sensible a sitios de metilación	Requerimiento de secuencia PAM para su función

Se han desarrollado algunas variaciones del sistema CRISPR-Cas. Dos de ellas, se presentan como opciones viables para establecer los modelos celulares requeridos para el desarrollo de esta propuesta. La primera es el sistema de activación o CRISPRa, esta variación se compone de una enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes* con una alteración en su capacidad

endonucleasa (Conocida como Cas9 “muerta” o dCas9), manteniendo su especificidad al usar el ARN guía (gRNA) y adicionándole módulos de activación (Xu & Qi, 2019). Entre estos módulos, podemos encontrar la proteína VP16 del virus del *Herpes simplex*, múltiples copias de la proteína VP16 (VP64 o VP160) o el dominio transactivador del factor nuclear kappa B (p65), los cuales han sido exitosamente utilizados con este sistema (Xu & Qi, 2019). Esta estrategia es una opción viable que permite activación múltiple y simultánea de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* endógenos con una menor modificación del genoma celular en comparación con otras metodologías.

La segunda opción, es el uso del sistema de CRISPR-Cas convencional dirigido a un punto específico del genoma celular. En 2015, Ocegüera-Yanez y colaboradores reportaron la inserción exitosa de materia genética exógena sin alteraciones de la función celular normal, en el sitio de integración 1 de los virus adeno-asociados (AAVS1) en el gen *PPP1R12C*, ubicado en el cromosoma 19 (Ocegüera-Yanez et al., 2016). Esta investigación propuso la región AAVS1 como un sitio seguro en el genoma para la inserción de transgenes o ADN recombinante. Y desde entonces, ha sido utilizado en varios estudios de manera exitosa (Castano et al., 2017; Keller et al., 2019; Lyu et al., 2018).

### **3.9 Aplicación de los modelos celulares genéticamente modificados en LLA-B**

En los últimos años, la modificación genética de modelos celulares ha permitido grandes avances en el estudio de la función de los genes asociados a los procesos tumorales de la LLA-B. Esto se debe a que las investigaciones ya no se limitan a realizar un reporte de asociación sino intentan encontrar el papel que cumplen estos genes en el proceso leucémico. Por ejemplo, gracias a estos modelos celulares, actualmente se sabe que la quinasa ZAP70 induce la migración de las

células de LLA-B al SNC por medio de la modulación de la expresión de moléculas de adherencia y receptores de quimioquinas (Alsadeq et al., 2017). Así mismo, se ha visto que la proteína A20 promueve la proliferación celular e induce quimioresistencia por la inhibición de la apoptosis mediada por Bcl-2 (S. Chen et al., 2015). De igual manera, estos modelos han permitido conocer nuevos procesos celulares relacionados con genes reportados desde hace años, por ejemplo, un aumento de la proliferación celular influenciada por *RUNXI* y *FUBP1* sobre el oncogén c-Kit (Debaize et al., 2018) o la inducción del remodelamiento estructural de la cromatina por parte del factor de transcripción IKAROS junto con el complejo HDAC1 (Song et al., 2016).

Por otra parte, los modelos celulares también han permitido estudiar procesos que en pacientes o modelos animales sería muy complicado evaluar. Como la posibilidad de que la fusión *MLL-AF4* se origine en un progenitor hemato-endotelial durante la fase embrionaria humana (Bueno et al., 2019), así como la protección que podría ofrecer el microambiente hematopoyético a las células leucémicas por medio de la vía de señalización BCL6 (Slone et al., 2016), o un aumento en la acetilación H3K27 de las histonas dada por la sobreexpresión del gen *HMGNI* en pacientes con Síndrome de Down (Mowery et al., 2018).

Como punto final, es preciso mencionar que la modificación genética de modelos celulares ha facilitado el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento o revisión de los esquemas de quimioterapia. Por ejemplo, se ha restaurado la diferenciación inmunofenotípica, morfológica y se ha reducido el potencial replicativo de las células de LLA-B con mutaciones en *PAX5* mediante la sobreexpresión de los genes *PAX2* y *PAX8* (Hart et al., 2018). Adicionalmente, la inclusión de agentes quimioterapéuticos dirigidos hacia el receptor tipo tirosina quinasa Mer, cuyas alteraciones

no habían sido reportadas en la LLA-B (Linger et al., 2013), o el cambio de los esquemas de quimioterapia a los pacientes que presentan modificaciones epigenéticas producidas por la pérdida del gen *TBLIXR1*, las cuales otorgan resistencia a los glucocorticoides (Jones et al., 2014).

## **4. Materiales y Métodos**

### **4.1 Transformación Bacteriana**

Las transformaciones plasmídicas se realizaron en la cepa bacteriana *E. coli* NEB 5-alpha (New England Biolabs) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante para el método de choque térmico. Las bacterias fueron crecidas en cajas de medio LB agar suplementados con 100 µg/mL de ampicilina. Una vez verificada la transformación del plásmido en las bacterias, se realizó la extracción del material genético de una Unidad Formadora de Colonia (UFC) utilizando kits comerciales de Mini, Midi o Maxiprep dependiendo de los requerimientos. La cantidad y calidad del material genético aislado se determinó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% y mediciones en el equipo Nanodrop One (Thermo scientific). Adicionalmente, se hicieron digestiones con enzimas de restricción con el fin de verificar el patrón de corte de los plásmidos obtenidos.

### **4.2 Manipulación de las bacterias experimentales**

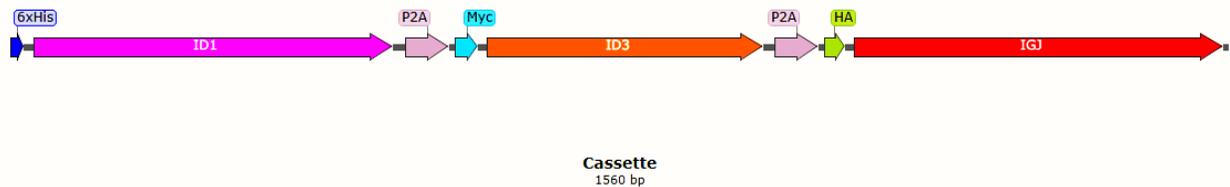
Las bacterias transformadas y no transformadas a emplear se catalogan como riesgo biológico nivel I, por lo tanto, se manejaron en los mesones de trabajo del laboratorio bajo condiciones de esterilidad. El crecimiento de las bacterias se realizó en incubadoras a una temperatura de 37°C en atmósfera seca, mientras que el almacenamiento se realizó en neveras a 4°C destinadas para este propósito. Los desechos líquidos fueron tratados con una solución de

hipoclorito de sodio (5.000 ppm) y descartados de acuerdo con los protocolos estandarizados por la Universidad. El material desechable utilizado para los procesos fue descartado en bolsa roja y entregado al personal de manejo de residuos peligrosos de la facultad de salud según las recomendaciones del Plan de Gestión Integral de Residuos (PGIR). Finalmente, el material reutilizable fue autoclavado por presión térmica dentro de las instalaciones del laboratorio central de investigaciones.

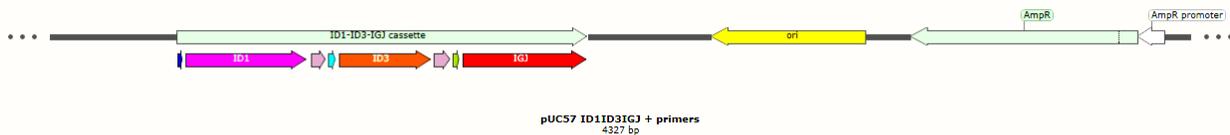
#### 4.3 Diseño y construcción del cassette policistrónico de genes

El cassette policistrónico fue diseñado de tal manera que cada uno de los genes de interés, (*ID1*, *ID3* e *IGJ*) estaba precedido por los péptidos etiqueta His, Myc y HA, respectivamente, para facilitar la detección proteica usando anticuerpos comerciales (Young et al., 2012). Los genes *ID1-ID3* e *ID3-IGJ* fueron separados por las secuencias codificadoras del péptido P2A. El diseño se realizó utilizando el software de licencia libre Snapgene® Viewer versión 4.3.9 (GSL Biotech; Disponible en: [snapgene.com](http://snapgene.com)). Además, este software permitió la visualización de las secuencias necesarias para cumplir con las especificaciones del modelo celular y los sitios de restricción que se requerían para el mismo. La síntesis del cassette se realizó por servicios comerciales de síntesis de ADN con la empresa CIDEPRO (Medellín, Colombia).

El plásmido sintetizado posee un tamaño de 4327 pb y se denominó pUC57 ID1/ID3/IGJ. Consta del cassette de genes sin promotor (**Fig. 2**) y los elementos necesarios para su transformación en bacterias quimiocompetentes (**Fig. 3**).

**Figura 2.***Cassette de genes ID1/ID3/IGJ.*

**6xHis (Azul):** péptido etiqueta His (18 pb). **ID1 (Rosado):** Inhibidor de unión al ADN 1 (461 pb). **P2A (Lila):** péptido de autoclivaje P2A (57 pb). **Myc (Azul):** péptido etiqueta Myc (30 pb). **ID3 (Naranja):** Inhibidor de unión al ADN 3 (354 pb). **HA (Verde):** péptido etiqueta HA (27 pb). **IGJ (Rojo):** gen de la cadena J de inmunoglobulina (475 pb).

**Figura 3.***Estructura completa del plásmido pUC57 ID1/ID3/IGJ.*

**6xHis (Azul):** péptido etiqueta His. **ID1 (Rosado):** Inhibidor de unión al ADN 1. **P2A (Lila):** péptido de autoclivaje P2A. **Myc (Azul):** péptido etiqueta Myc. **ID3 (Naranja):** Inhibidor de unión al ADN 3. **HA (Verde):** péptido etiqueta HA. **IGJ (Rojo):** gen de la cadena J de inmunoglobulina. **Ori (Amarillo):** origen bacteriano. **AmpR (Verde):** gen de resistencia a ampicilina. **AmpR promoter (Blanco):** promotor del gen de resistencia a ampicilina.

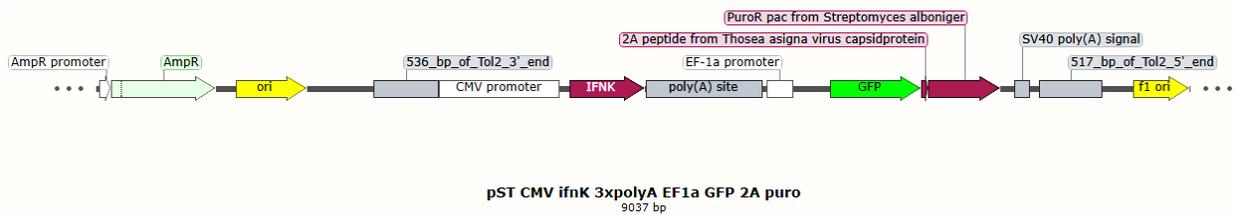
**4.4 Construcción del plásmido del sistema constitutivo (pSC)**

El plásmido de expresión constitutivo se basó en plásmido vector pST CMV IFNk 3xpolyA EF1a GFP 2A Puro, previamente adquirido por el grupo de investigación (**Fig. 4**). Este plásmido está constituido por el promotor de los genes tempranos-intermedios del Citomegalovirus Humano (pCMV), las secuencias de reconocimiento Tol2 y un cassette reportero que consiste en el promotor constitutivo EF-1 $\alpha$  (Xiaoyin Wang et al., 2017), un policistrón que porta el gen de resistencia a

puromicina y el gen de la proteína GFP, separados por la secuencia codificante del péptido T2A y una secuencia de poliadenilación.

#### Figura 4.

*Estructura completa del plásmido pST CMV IFNk 3xpolyA EF1a GFP 2A Puro.*



**AmpR promoter (Blanco):** promotor del gen de resistencia a ampicilina. **AmpR (Verde):** gen de resistencia a ampicilina. **Ori (Amarillo):** origen bacteriano. **536\_bp\_of\_Tol2\_3'\_end (Gris):** Sitio de reconocimiento para enzima Tol2. **CMV promoter (Blanco):** promotor de los genes tempranos-intermedios del Citomegalovirus Humano. **IFNk (Fucsia):** gen de interferón kappa. **Poly(A) site (Gris):** secuencia de poliadenilación. **EF-1 $\alpha$  promoter (Blanco):** promotor constitutivo EF-1 $\alpha$ . **GFP (Verde):** proteína verde fluorescente. **2A peptide (Lila):** péptido de autoclívaje T2A. **PuroR (Fucsia):** Gen de resistencia a puromicina. **SV40 poly(A) signal (Gris):** secuencia de poliadenilación. **517\_bp\_of\_Tol2\_5'\_end (Gris):** Sitio de reconocimiento para enzima Tol2. **F1 ori (Amarillo):** origen bacteriano

El cassette de genes (*ID1-ID3-IGJ*) fue amplificado con los primers NC fwd y rev (**Tabla 2**) que permitieron por una parte crear el sitio *BamHI* en 5' y por otro lado utilizar el sitio *XhoI* en 3' situado antes del terminador que se encontraba en la secuencia del plásmido. Posteriormente, se realizó su clonación al vector intermedio pMiniT utilizando el NEB® PCR Cloning Kit (New England Biolabs). Esta ligación se transformó en bacterias *E. coli* NEB 5-alpha quimiocompetentes, se realizó la extracción y digestión con las enzimas *XhoI* y *BamHI* de manera secuencial. Paralelamente, el plásmido vector pST CMV IFNk también fue digerido con las enzimas *BamHI* y *XhoI* para eliminar el gen de IFNk, se purificó la banda con tamaño de 9000pb

aproximadamente usando kits comerciales y finalmente se realizó la ligación del cassette con el vector por medio de la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs). La ligación de fragmentos fue transformada en bacterias *E. coli* NEB 5-alpha quimiocompetentes y las colonias resistentes fueron lisadas para la extracción plasmídica con el fin de verificar la identidad del plásmido.

**Tabla 2.**

*Primers utilizados para la construcción de los plásmidos recombinantes*

<b>Nombre</b>	<b>Sentido</b>	<b>Secuencia</b>
<b>NC</b>	Fwd	5'-AATTTggatccgatatcggtaccATGCATCACCATCACCATCACG-3'
<b>NC</b>	Rev	5'-CACAGGAAACAGCTATGACCATG-3'
<b>TRE</b>	Fwd	5'-CATGGTCATAGCTGTgtcgacCAGACATGATAAGATACATTGATGAG-3'
<b>TRE</b>	Rev	5'-ACAATAGGCGAGTGTTggatccgagctcTTTACGAGGGTAGGAAGTGGTACG-3'

La identidad del plásmido fue confirmada por secuenciación y por los análisis de restricción con las mismas enzimas usadas para la clonación inicial. En la **figura 5**, panel 5A se presenta el plásmido esperado y la digestión *in silico* usando las enzimas *BamHI* y *XhoI*. En el panel 5B se observan los resultados obtenidos de la digestión de los plásmidos aislados de diversas colonias provenientes de la ligación, confirmando el patrón esperado. El esquema del plásmido del sistema constitutivo se muestra en la **figura 6** (ver descripción completa en el epígrafe de la figura). Así mismo, la secuenciación indicó valores superiores a 90% de identidad al compararse con la secuencia esperada. El plásmido resultante se denominó *plásmido del sistema constitutivo (pSC)*.



#### 4.5 Construcción del plásmido del sistema inducible (pSI)

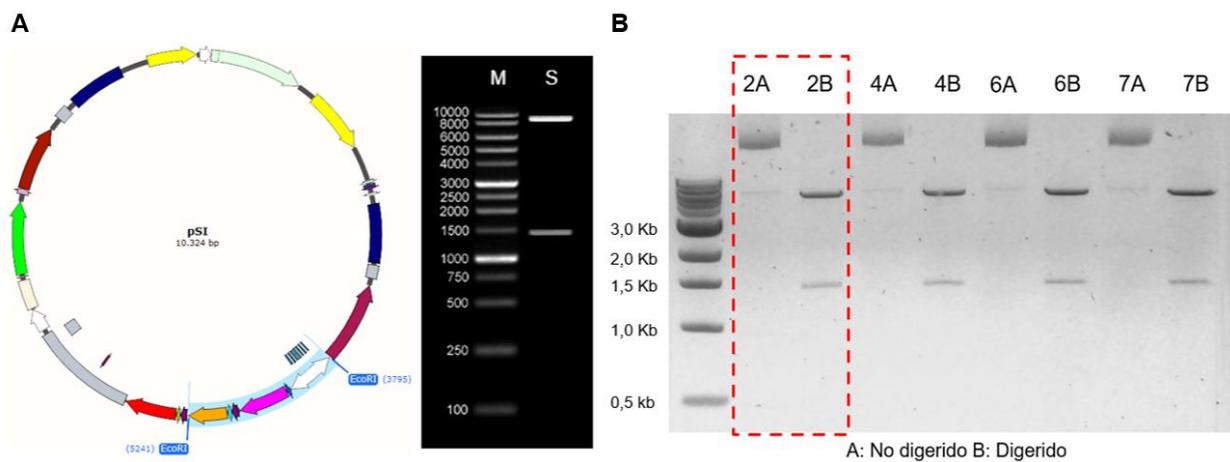
El plásmido del modelo de sobreexpresión inducible también se realizó a partir del vector pST CMV IFNk 3xplyA EF1a GFP 2A Puro. Usando como molde el plásmido AAV1 Puro tet3G 3xFLAG Twin Strep (Addgene, 92099), se amplificó una región de ADN que comprende la secuencia polyA SV40, la secuencia codificante de la proteína transactivadora reversa Tet-On 3G y el promotor bidireccional TRE3G del plásmido. Los primers TRE diseñados (**Tabla 2**) usados en la PCR incluían sitios de corte para las enzimas de restricción *Sall* y *BamHI* necesarios para insertar este fragmento y reemplazar el pCMV del plásmido pST CMV IFNk. Este plásmido intermedio se denominó *pDR2*. Posteriormente, se reemplazó el gen *IFNk* del *pDR2* por el cassette del policistrón ID1/ID3/IGJ más la región poliadenilación extraídos del pSC usando las enzimas *BamHI* y *NotI*. La ligación de fragmentos fue transformada en bacterias *E. coli* NEB 5-alpha quimiocompetentes y las colonias resistentes fueron lisadas para la extracción plasmídica con el fin de verificar la identidad del plásmido.

De manera similar al sistema constitutivo, la identidad del plásmido fue confirmada por secuenciación y por los análisis de restricción, esta vez con la enzima de restricción *EcoRI*. En la **figura 7**, panel 7A se presenta el plásmido esperado y la digestión *in silico* usando *EcoRI*, que corta en un sitio interno en el cassette de genes y un sitio entre el promotor bidireccional y la proteína rtTA y libera un fragmento de aproximadamente 1500 pb. En el panel 7B se observan los resultados obtenidos de la digestión de diversos plásmidos aislados, confirmando el patrón esperado. El esquema del plásmido del sistema inducible se muestra en la **figura 8** (ver descripción completa en el epígrafe de la figura). Así mismo, la secuenciación indicó valores superiores a 90%

de identidad al compararse con la secuencia esperada. El plásmido resultante fue denominado *plásmido del sistema inducible (pSI)*.

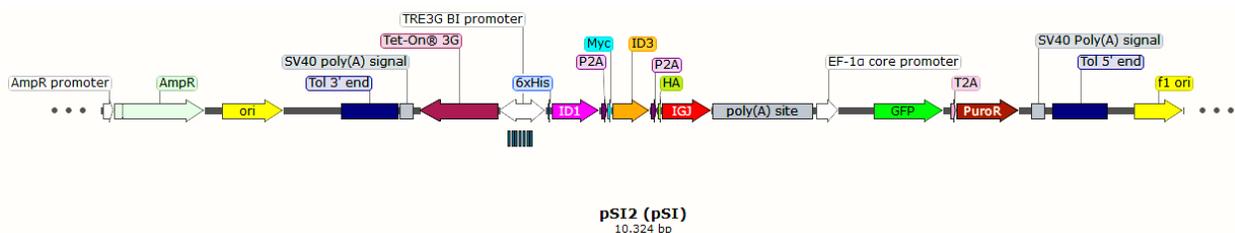
### Figura 7.

*Comparación de los resultados esperados (A) y obtenidos (B) del análisis de restricción del plásmido pSI con la enzima EcoRI junto a sus clones recombinantes*



### Figura 8.

*Estructura completa del plásmido del sistema inducible (pSI).*



**AmpR promoter (Blanco):** promotor del gen de resistencia a ampicilina. **AmpR (Verde):** gen de resistencia a ampicilina. **Ori (Amarillo):** origen bacteriano. **Tol2 3' end (Azul):** Sitio de reconocimiento para enzima Tol2. **SV40 poly(A) signal (Gris):** secuencia de poliadenilación. **Tet-On @ 3G (Purpura):** proteína transactivadora reversa dependiente de tetraciclina de tercera generación. **TRE3G BI promoter (Blanco):** promotor bidireccional TRE3G. **6xHis (Azul):** péptido etiqueta His. **ID1 (Rosado):** Inhibidor de unión al ADN 1. **P2A (Lila):** péptido de autoclivaje P2A. **Myc (Azul):** péptido etiqueta Myc. **ID3 (Naranja):** Inhibidor

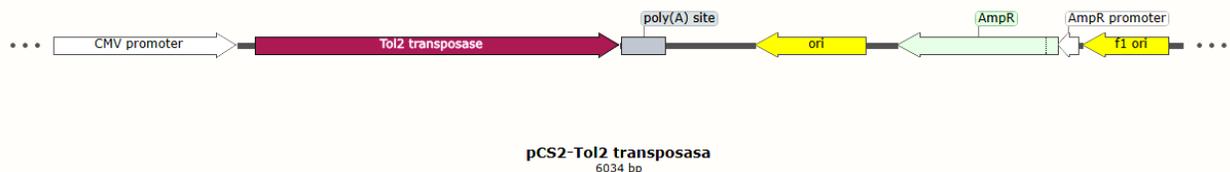
de unión al ADN 3. **HA (Verde)**: péptido etiqueta HA. **IGJ (Rojo)**: gen de la cadena J de inmunoglobulina. **Poly(A) site (Gris)**: secuencia de poliadenilación. **EF-1a core promoter (Blanco)**: promotor constitutivo EF-1a. **GFP (Verde)**: proteína verde fluorescente. **T2A (Lila)**: péptido de autoclivaje T2A. **PuroR (Marrón)**: Gen de resistencia a puromicina. **Tol2 5' end (Azul)**: Sitio de reconocimiento para enzima Tol2. **F1 ori (Amarillo)**: origen bacteriano.

#### 4.6 Diseño de integración genómica

Para la obtener modelos celulares integrados se realizó la cotransfección con el plásmido pCS2-Tol2 transposasa (Tol2), previamente adquirido por el grupo de investigación (**Fig. 9**).

#### Figura 9.

*Estructura completa del plásmido pCS2-Tol2 transposasa (Tol2).*



**CMV promoter (Blanco)**: promotor de los genes tempranos-intermedios del Citomegalovirus Humano. **Tol2 transposase (Fucsia)**: gen de la enzima Tol2 transposasa. **Poly(A) site (Gris)**: secuencia de poliadenilación. **Ori (Amarillo)**: origen bacteriano. **AmpR (Verde)**: gen de resistencia a ampicilina. **AmpR promoter (Blanco)**: promotor del gen de resistencia a ampicilina. **F1 ori (Amarillo)**: origen bacteriano

#### 4.7 Líneas Celulares

Los modelos de expresión se establecieron en la línea celular comercial NALM-6 (LLA-B) (DSMZ, ACC 128), pero los protocolos de transfección fueron estandarizados previamente en la línea celular adherente 293T (Donación del Dr. Bladimiro Rincón). Ambas líneas celulares se incubaron a una temperatura de 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y atmosfera húmeda. Para su cultivo se utilizó el medio RPMI-1640 (LONZA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO) y 1% de

Solución de Penicilina, Estreptomocina y Anfotericina B (LONZA). El mantenimiento de las líneas se realizó cada 2 días haciendo pases a nuevas cajas o congelando alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , según se requería. Diariamente se evaluó el porcentaje de confluencia celular para la línea celular 293T, mientras que para la línea NALM-6 se determinó el porcentaje de viabilidad y recuento celular utilizando el colorante azul de tripán (GIBCO).

#### **4.8 Transfección celular para la integración genómica eucariota**

##### ***4.8.1 Lipofección de las líneas celulares***

La transfección de los plásmidos recombinantes pSC y pSI en las líneas celulares 293T y NALM-6 se realizó, en primera medida, por el método de lipofección usando el kit Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Invitrogen). 300.000 células 293T/pozo o 500.000 células NALM-6/pozo en placa de 24 pozos fueron cotransfectadas con 500 ng del plásmido del modelo de expresión (pSC o pSI) y 500 ng del plásmido pCS2-Tol2 transposasa (Tol2), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, las células fueron cultivadas en medio suplementado con puromicina para seleccionar las células transfectadas. Para identificar la dosis óptima de antibiótico de selección, se realizó una curva de toxicidad para cada línea celular con concentraciones crecientes de diclorhidrato de puromicina (TOCRIS) (0,05 – 5,00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) adicionadas al medio de cultivo. La dosis óptima de puromicina fue la concentración mínima de antibiótico en la cual el 100% de las células no transfectadas mueren tras una semana de incubación con el fármaco y no presenta una toxicidad visual en los primeros 2-3 días de incubación. Para la línea celular 293T se determinó la concentración de 1 ng/mL de puromicina y para la línea celular NALM-6 se utilizó la concentración de 0,15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de puromicina.

#### **4.8.2 Electroporación de la línea NALM-6**

La electroporación de la línea NALM-6 se realizó en el equipo Gene Pulser Xcell electroporation system (Biorad). En una cubeta de 0,4 cm (Biorad), se resuspendieron  $10^6$  células NALM-6 con 10  $\mu$ g del plásmido de sistema de expresión (pSC o pSI) y 10  $\mu$ g del plásmido pCS2-Tol2 transposasa (Tol2), para un volumen final de 500  $\mu$ l de medio RPMI-1640 (GIBCO) sin suero fetal bovino. Se usó un protocolo manual basado en capacitancia 950 uF, 320 V y resistencia  $\infty$  en el equipo de electroporación. Se determinó la viabilidad por tinción con azul de tripán, antes y 1 hora después del proceso.

#### **4.9 Separación de las poblaciones celulares en suspensión por viabilidad**

Se prepararon 2 mL de una solución B compuesta por una relación 0,45:0,55 de Optiprep (SIGMA) con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB sin antibiótico respectivamente. Luego se dispensaron 5 mL de cultivo celular y se centrifugó a 2.000 rpm por 20 min a 20°C (Aceleración 7 y desaceleración 3). Se retiró la capa de células y se resuspendió en medio de cultivo suplementado para continuar su incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y atmosfera húmeda. Se determinó la viabilidad celular antes y después de realizar el protocolo utilizando el colorante azul de tripán (GIBCO).

#### **4.10 Análisis de la expresión de fluorescencia por microscopia y citometría de flujo**

La expresión de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) permitió identificar a las células viables transfectadas con los plásmidos recombinantes utilizando el filtro 488 del microscopio de fluorescencia Zeiss Axiolab inkl. Fototubus (Zeiss). Con el fin de confirmar la expresión de fluorescencia y evitar sesgos por detritos celulares, los modelos celulares

NALM-6 fueron analizadas por el canal FITC del citómetro de flujo BD FACSCanto™ II Cell Analyzer (BD). 20 µL de los modelos celulares NALM-6 se diluyeron en 200 µL de buffer PBS 1X y se procesaron por el citómetro de flujo. Los resultados fueron analizados con el programa Flowing Software 2.5.1 (Turku Bioscience).

#### 4.11 Evaluación de la expresión transcripcional

Para este análisis se empleó la técnica de PCR cuantitativa acoplada a transcriptasa reversa (RT-qPCR). El ARN total de todas las líneas celulares se aisló usando el kit ADN/ARN AllPrep Mini (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se determinó la integridad y la cantidad del ARN mediante el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific) y se almacenó a una temperatura de -80°C. Luego, a 1 µg de ARN cada muestra se le realizó un tratamiento con DNAsa I (Invitrogen) para eliminar el ADN genómico o plásmido contaminante según las indicaciones de la casa comercial. Las muestras se convirtieron en ADN complementario (ADNc) utilizando el kit Super-Script III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) de acuerdo con los procedimientos del fabricante. Se realizó una PCR cuantitativa de 20 µL con 4 µL de ADNc, 1 µL de sondas TaqMan comerciales (Applied Biosystems) marcadas con FAM dirigidas contra el cuerpo de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* endógenos y transgenes, 1 µL de sonda marcada con VIC para el cuerpo del gen *GAPDH* endógeno como control de expresión, 10 µL de TaqMan 2X Universal PCR Máster Mix (Applied Biosystems) y agua libre de nucleasas. La reacción de 95°C por 10 minutos y 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto se realizó para todos los genes en el equipo CFX96 Real-Time System (Biorad). Se usó el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para determinar la expresión relativa de cada gen utilizando *GAPDH* como gen de referencia. Como control negativo se empleó tubos con agua libre de nucleasas y todos los ensayos se realizaron por triplicados.

Se analizó la expresión génica relativa de ambas líneas celulares sin transfectar y de los modelos celulares transfectados con los sistemas de expresión (pSC y pSI). Para el sistema constitutivo se determinaron los niveles de expresión de las células con y sin la transfección de los plásmidos pSC y/o Tol2. Mientras que, para el sistema inducible, el análisis se realizó en líneas celulares transfectadas con pSI y Tol2 además de la inducción sin o con 1 µg/mL del inductor doxiciclina en el medio de cultivo y los resultados fueron comparados con las células no transfectadas con y sin la adición de 1 µg/mL de doxiciclina al medio de cultivo. La determinación de la sobreexpresión se basó en un aumento de los niveles de expresión génica relativa en comparación con la línea no transfectada y/o sin la adición de la doxiciclina.

Es importante resaltar que los primers y sondas utilizadas en la RT-qPCR no permiten discriminar entre los genes endógenos y los provenientes del transgén. En cambio, en la evaluación de la expresión proteica los resultados provienen exclusivamente de los genes expresados del transgén, debido al uso de anticuerpos específicos contra los péptidos etiqueta.

#### **4.12 Evaluación de la expresión proteica**

Se suspendieron  $8 \times 10^6$  células en 400 µl de buffer Laemmli (Laemmli, 1970) para obtener la misma concentración de células en cada muestra. Los extractos se incubaron a 100°C por 3 minutos, seguido de una incubación en hielo por 3 minutos y se centrifugaron a 14000 rpm por 1 minuto. Con el fin de asegurar la cantidad de proteínas suficiente para los análisis se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) 20 µL (NALM-6) o 7 µL (293T) de la fase soluble de los extractos. Todas las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando el sistema Mini Trans-Blot Cell (Biorad). Las membranas se bloquearon

por una hora con una solución de TBST (Tris HCl 1M pH 7,4; NaCl; Tween 20 y Agua ultrapura) + 0,5% de leche en polvo y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios de conejo (Cell Signaling Technology), dirigidos contra los péptidos etiqueta o las proteínas de interés a una dilución de 1:1000. Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Peroxidasa Recombinante de Rábano, por sus siglas en inglés) se usaron a una dilución de 1:10000. El revelado de las proteínas en la membrana se realizó por quimioluminiscencia usando el reactivo SignalFire ECL (Cell Signaling Technology) y se visualizó usando el equipo ChemiDoc MP Imaging System (Biorad).

#### **4.13 Análisis estadístico**

Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron utilizando el software GraphPad Prism 8 para Windows. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos al emplear la prueba ANOVA de dos vías en el promedio del triplicado de los niveles de expresión génica relativa de cada gen en los modelos celulares al emplear el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Se empleó el mismo software para graficar los datos.

## **5. Resultados**

### **5.1 Lipofección en las líneas celulares**

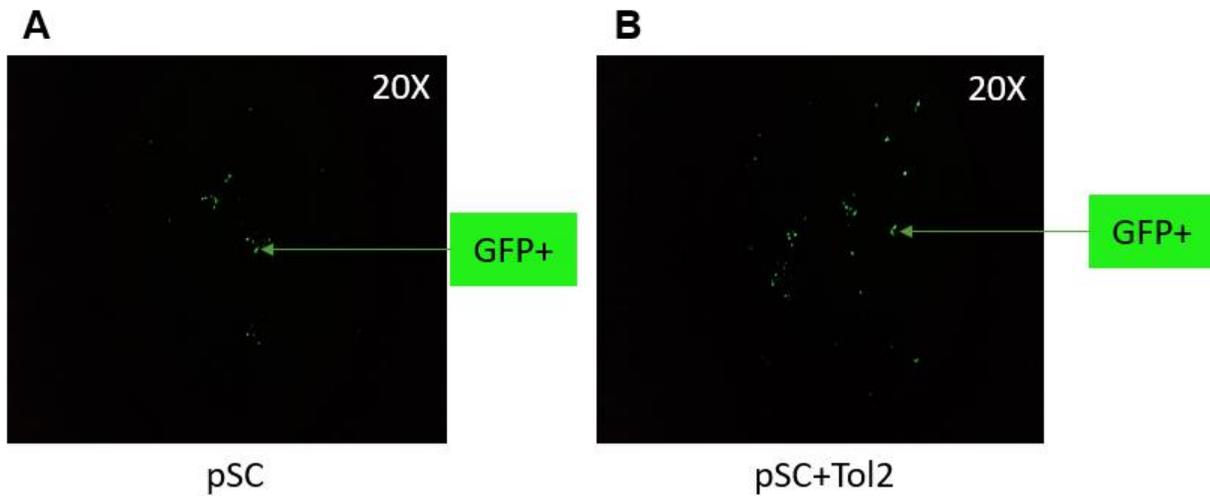
#### **5.1.1 Línea 293T**

El protocolo de lipofección para la transfección de la línea 293T fue exitoso. Posterior a 4 días de incubación con los liposomas que contenían pSC y/o Tol2 se realizó un cambio de medio de cultivo suplementado con y sin puromicina sin observarse diferencias de expresión de GFP entre las condiciones (**Fig. 10**). Una vez finalizada la semana de incubación con y sin puromicina, se

evaluó la expresión de GFP por microscopía de fluorescencia. Se observó que el número de células con expresión de GFP fue mayor en aquellas cultivadas en el medio con puromicina (**Fig. 11A**) en comparación con aquellas cultivadas sin puromicina (**Fig. 11B**). Por otra parte, las células no transfectadas no mostraron expresión de GFP ni resistencia a puromicina en ningún momento.

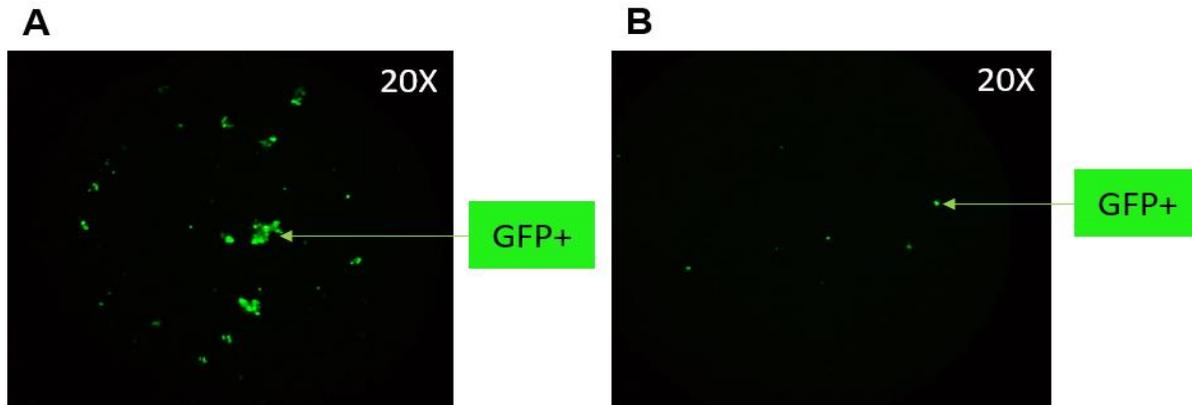
**Figura 10.**

*Células 293T transfectadas con pSC (A) y cotransfectadas con pSC y Tol2 (pSC+Tol2) con expresión de GFP antes de la selección por resistencia a puromicina.*



**Figura 11.**

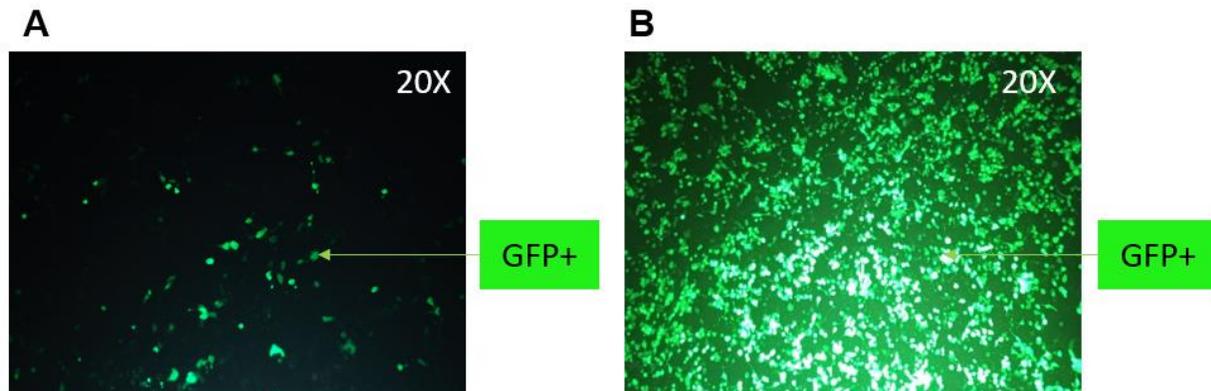
*Células 293T cotransfectadas con pSC y Tol2 (pSC+Tol2) con expresión de GFP cultivadas con (A) y sin (B) 1  $\mu$ g/mL puromicina después de una semana.*



La lipofección de las células con pSI+Tol2 se realizó aplicando el mismo protocolo descrito previamente, ya que la adición de doxyciclina no debería afectar la expresión de la proteína GFP. Se analizó la expresión de GFP antes (**Fig. 12A**) y después de la selección con puromicina (**Fig. 12B**). De igual manera, las células no transfectadas no mostraron expresión de GFP ni resistencia a puromicina en ningún momento. No se realizó modelo con solo pSI, ya que el objetivo del trabajo era obtener modelos integrados inducibles.

**Figura 12.**

*Células 293T cotransfectadas con pSI y Tol2 (pSI+Tol2) con expresión de GFP cultivadas antes (A) y después (B) de la selección con 1 µg/mL de puromicina después de una semana.*

**5.1.2 Línea NALM-6**

A pesar de utilizar el protocolo de lipofección previamente estandarizado, no se obtuvieron células NALM-6 viables GFP-positivas antes o después de la purificación celular con 0,15 µg/mL de puromicina tanto para el modelo transitorio como el estable. En consecuencia, se realizó la transfección utilizando el protocolo de electroporación.

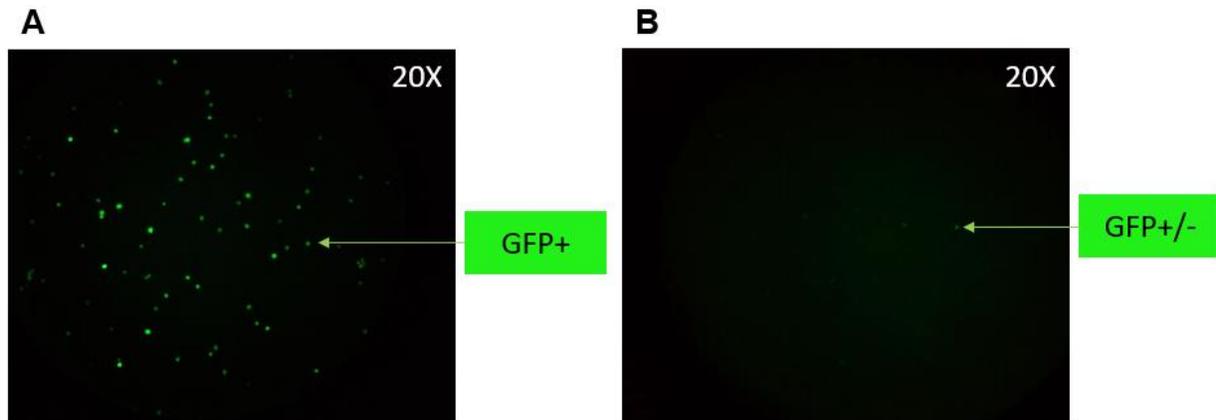
**5.2 Electroporación de la línea NALM-6****5.2.1 Sistema de expresión constitutivo**

Para este protocolo se revisó la expresión de GFP luego de la selección con puromicina y la purificación de células viables. Las células transfectadas con pSC tuvieron expresión transitoria de GFP (**Fig. 13A**), mientras que las cotransfectadas con pSC+Tol2 mostraron una leve expresión de GFP (**Fig. 13B**). A pesar de que ambas líneas celulares eran resistentes a puromicina, la expresión de GFP varió significativamente al revisarlas en microscopio de fluorescencia y

citometría de flujo (**Fig. 14**). Además, al hacer recuentos con la coloración de azul de tripán se observó que las células NALM-6 cotransfectadas con pSC+Tol2 presentaban un aumento del tiempo de duplicación a 48 horas. Siendo el tiempo de duplicación de la línea celular base de 24 horas, es posible que la integración al genoma celular por la enzima Tol2 transposasa haya afectado algún proceso celular y dificulte el crecimiento celular de esta línea. Por otra parte, las células no transfectadas o “línea base” no mostraron expresión de GFP ni resistencia a puromicina en ningún momento.

### Figura 13.

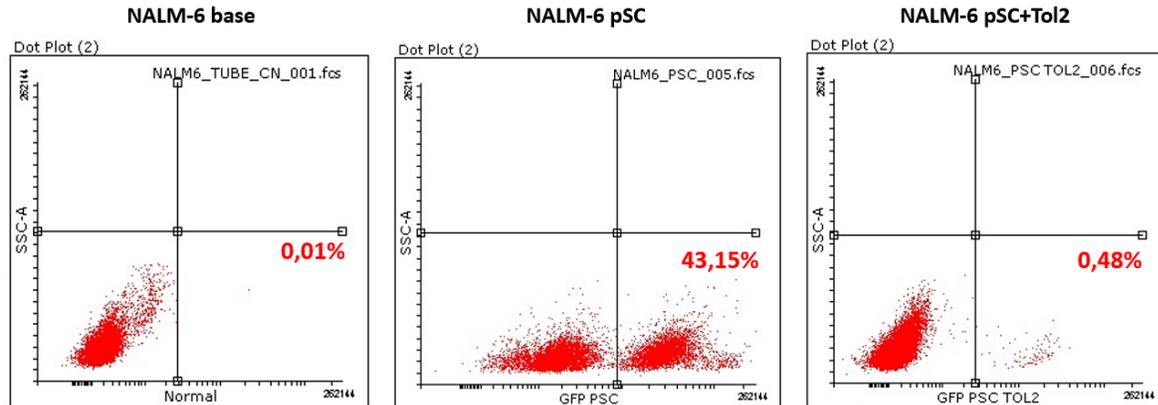
*Células NALM-6 transfectadas con pSC (A) y pSC+Tol2 (B) con expresión variable de GFP con resistencia a 0,15  $\mu\text{g/mL}$  de puromicina.*



### Figura 14.

*Comparación de expresión de GFP en las células NALM-6 no transfectadas, transfectadas y*

*cotransfectadas con el sistema constitutivo por citometría de flujo incubadas con 0,15 µg/mL de puromicina por una semana.*

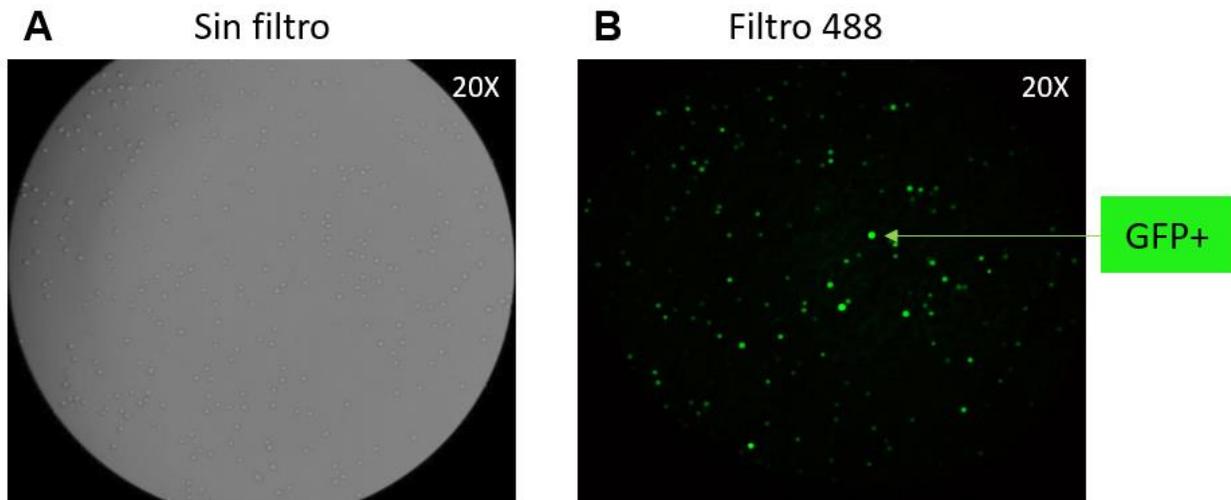


### 5.2.2 Sistema de expresión inducible

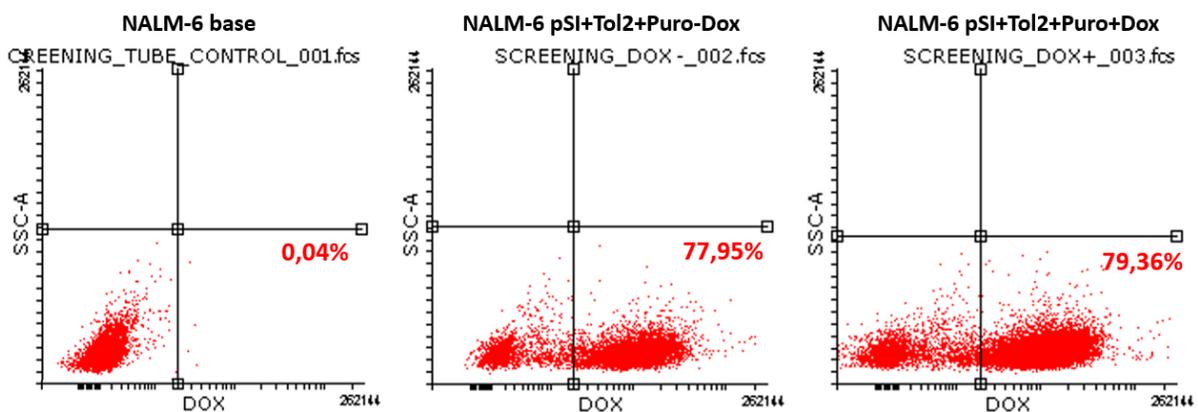
Para este sistema se decidió no incluir la forma transitoria de expresión debido a que objetivo del trabajo es obtener modelos integrados. Se empleó el protocolo de electroporación estandarizado previamente, seleccionando las células resistentes a 0,15 µg/mL de puromicina y analizando la expresión de GFP, encontrándose un nivel de expresión alto (**Fig. 15**). Este resultado fue verificado por citometría de flujo, en donde se incluyó en las condiciones de estudio aquellas células incubadas con 1 µg/mL de doxiciclina por 48 horas (**Fig. 16**). De igual manera, las células no transfectadas no mostraron expresión de GFP ni resistencia a puromicina en ningún momento.

**Figura 15.**

*Expresión de GFP en células NALM-6 pSI+Tol2+Puro sin (A) y con filtro 488 (B) (0,15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de puromicina) antes de la adición de doxiciclina.*

**Figura 16.**

*Comparación de expresión de GFP en las células NALM-6 no transfectadas y cotransfectados con el sistema inducible sin y con la adición 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de doxiciclina por 48 horas por citometría de flujo (0,15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de puromicina por una semana).*



### 5.3 Evaluación de la expresión génica mediante RT-qPCR

Los niveles de los transcritos de los diferentes genes de la firma fueron evaluados mediante RT-qPCR usando primers y sondas TaqMan que amplifican tanto los transcritos endógenos como los transcritos del transgén (el policistrón). Se determinó los niveles de expresión génica relativa con base en el gen de referencia *GAPDH* por medio del método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  y el análisis de los datos se realizó en el software GraphPad Prism 8. Es importante aclarar que, teniendo en cuenta que los genes del transgén se expresan en un solo transcrito, se espera que los niveles de expresión de cada uno de los genes de la firma proveniente del transgén sean similares. Sin embargo, los niveles de los genes endógenos pueden variar dependiendo de la línea celular. A continuación, se presentan los resultados por sistema de expresión (pSC o pSI) y por línea celular (293T y NALM-6).

#### 4.4.1 Sistema de expresión constitutivo

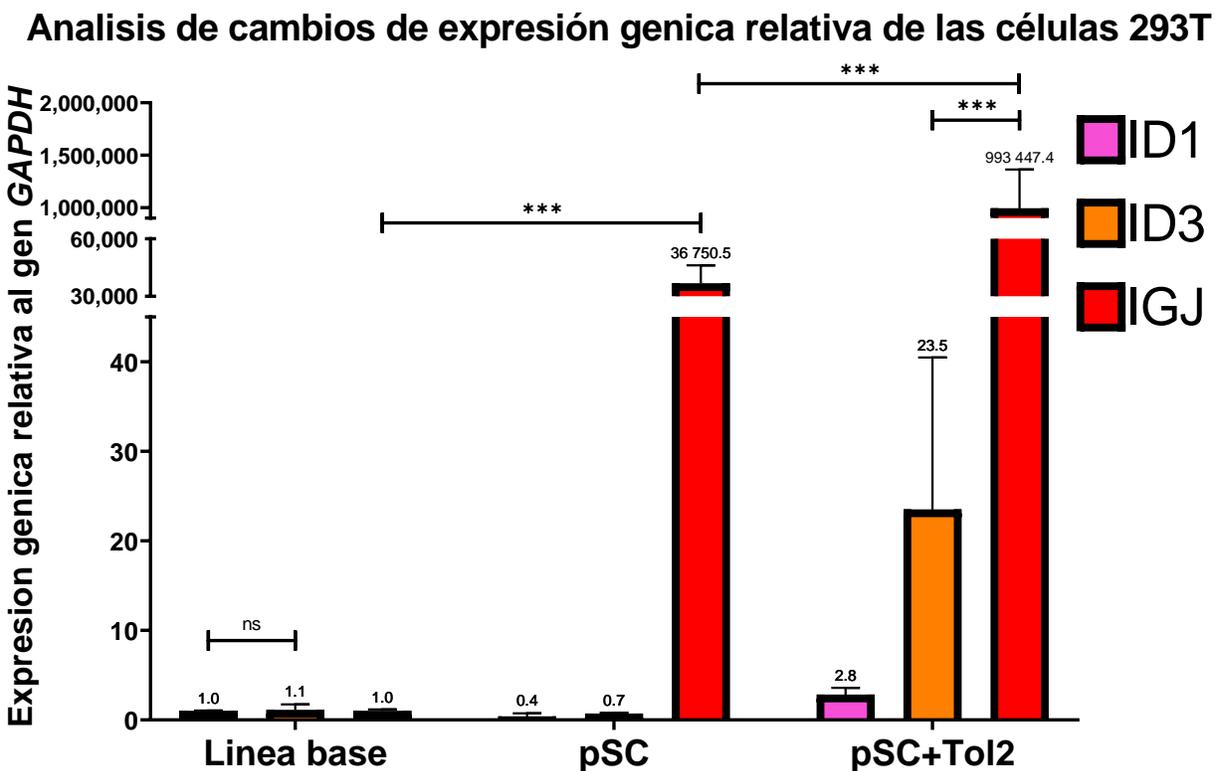
##### 4.4.1.1 Línea 293T

Se encontraron alteraciones en los niveles de expresión relativa de los genes de interés en los modelos transfectados y cotransfectados en comparación con la línea (**Fig. 17**). En la línea base, los niveles de expresión relativa de los genes *IDI*, *ID3* e *IGJ* endógenos no mostraron diferencias significativas entre ellos, lo que facilitó el análisis del aporte de los transgenes en las líneas transfectadas. El modelo 293T pSC+Tol2 presentó un aumento de los niveles de expresión de los tres genes, sin embargo, se observaron valores disímiles entre los genes evaluados. Se observó una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) en los niveles de expresión del gen *IGJ* (el último gen en el policistrón) en comparación con los otros genes del cassette, lo cual no concuerda con lo esperado para un ARN mensajero policistrónico (**Fig. 17**). Esta diferencia se evidenció tanto en el modelo 293T pSC como en el modelo 293T pSC+Tol2, por tal razón se descartó un evento azaroso

otorgado por la enzima Tol2 transposasa. Posiblemente, esta diferencia se deba a un aumento de los niveles de expresión del gen *IGJ* endógeno y del transgén.

### Figura 17.

Análisis de los cambios de expresión relativa de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* en las células no transfectadas, transfectadas y cotransfectadas con el sistema constitutivo incubadas con 1,0 µg/mL de puromicina después de 4 semanas (\*\**p* < 0,001; ns: no significancia).



#### 4.4.1.2 Línea NALM-6

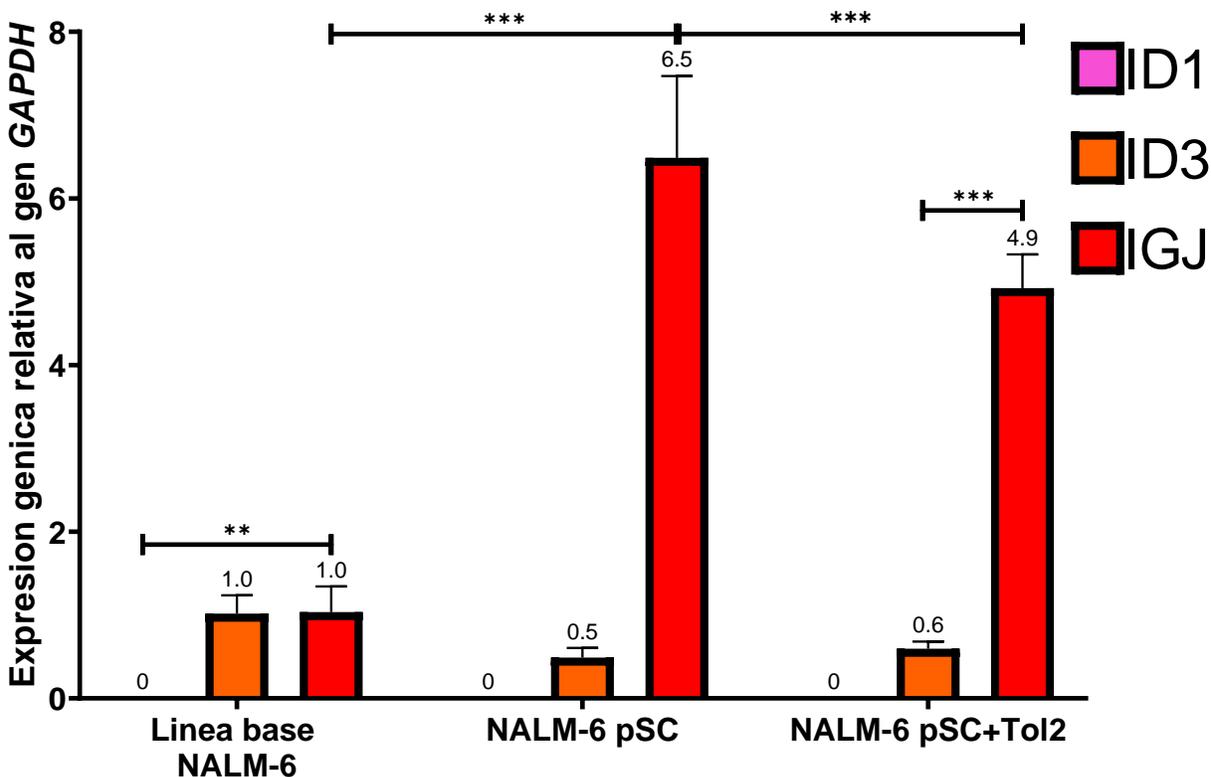
Con respecto a la línea base NALM-6 se observaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) en los niveles de expresión relativa para los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* endógenos (**Fig. 18**). Además, es importante mencionar que no se detectó expresión del gen *ID1*. Por otra parte, y de manera análoga

a las células 293T, las células NALM-6 transfectadas con pSC y pSC+Tol2 mostraron alteración en los niveles de expresión relativa en comparación con la línea base para el gen *IGJ* ( $p < 0,001$ ) que también eran disímiles entre los genes del policistrón. Similar a lo observado en las células 293T, la expresión relativa del gen *IGJ* fue significativamente superior ( $p < 0,001$ ) a los otros genes del cassette en las condiciones de estudio (**Fig. 18**). Teniendo en cuenta que no se detectó expresión del gen *IDI* en las líneas transfectadas, concluimos que el policistrón no se está transcribiendo y el aumento de los niveles del gen *IGJ* provienen del gen endógeno.

**Figura 18.**

*Análisis de los cambios de expresión relativa de los genes ID1, ID3 e IGJ en las células no transfectadas, transfectadas y cotransfectadas con el sistema constitutivo incubadas con 1,0 µg/mL de puromicina después de 4 semanas (\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p = 0,008$ ; ns: no significancia).*

### Analisis de cambios de expresión genica relativa de las células NALM-6



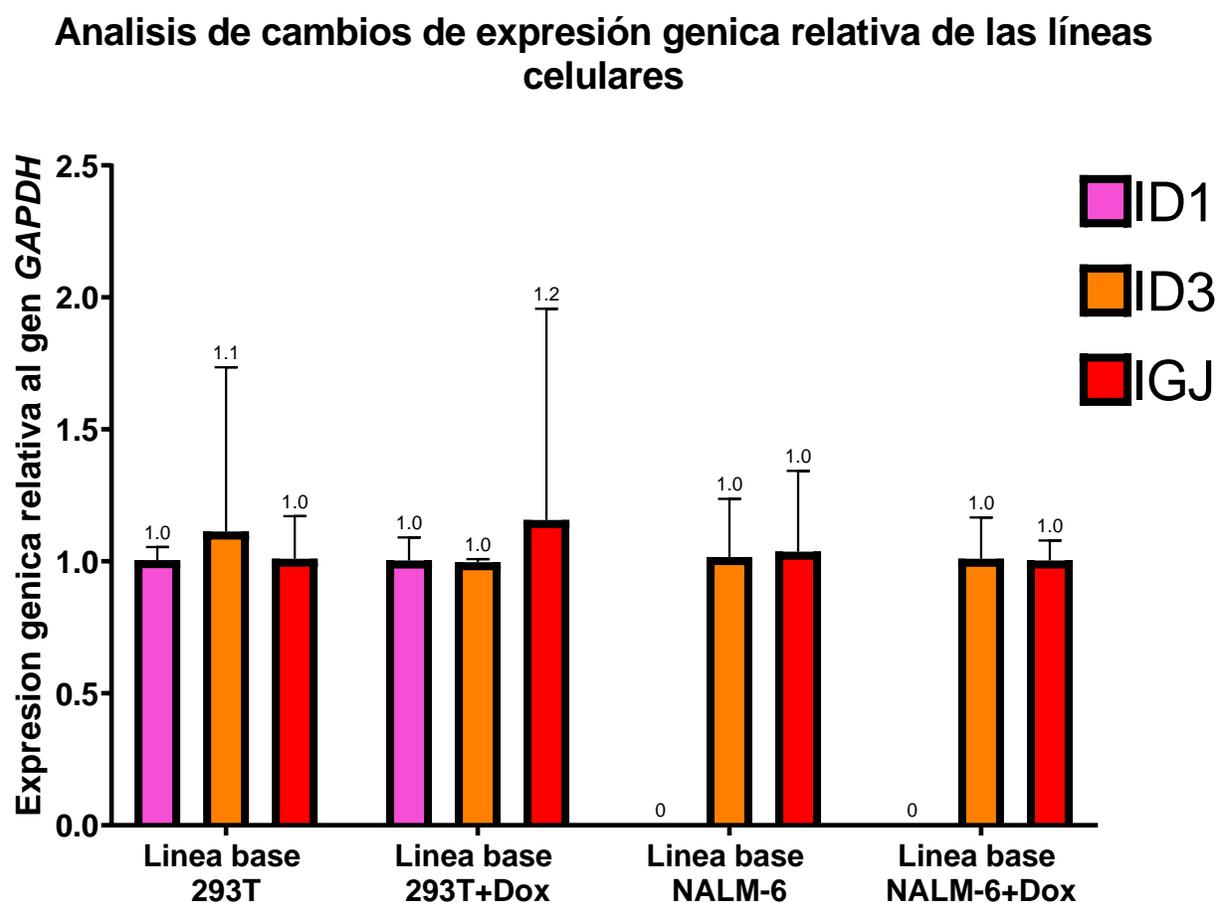
#### 4.4.2 Sistema de expresión inducible

Para el estudio de las modelos celulares inducibles se incubó las líneas celulares 293T y NALM-6 base en medio con 1 µL/mL de doxiciplina por 48 horas y se les realizó el análisis de

expresión. El objetivo de incluir condición fue revisar si la adición de la doxiciclina alteraba la expresión relativa de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ*. Se determinó que la concentración de 1  $\mu$ L/mL de doxiciclina por 48 horas no alteraba los niveles de los genes de interés, por lo tanto, la alteración de estos sería causada únicamente por la presencia de los transgenes (**Fig. 19**).

**Figura 19.**

*Análisis de los cambios de expresión relativa de los genes ID1, ID3 e IGJ en las líneas celulares con y sin la adición 1,0  $\mu$ g/mL de doxiciclina por 48 horas.*

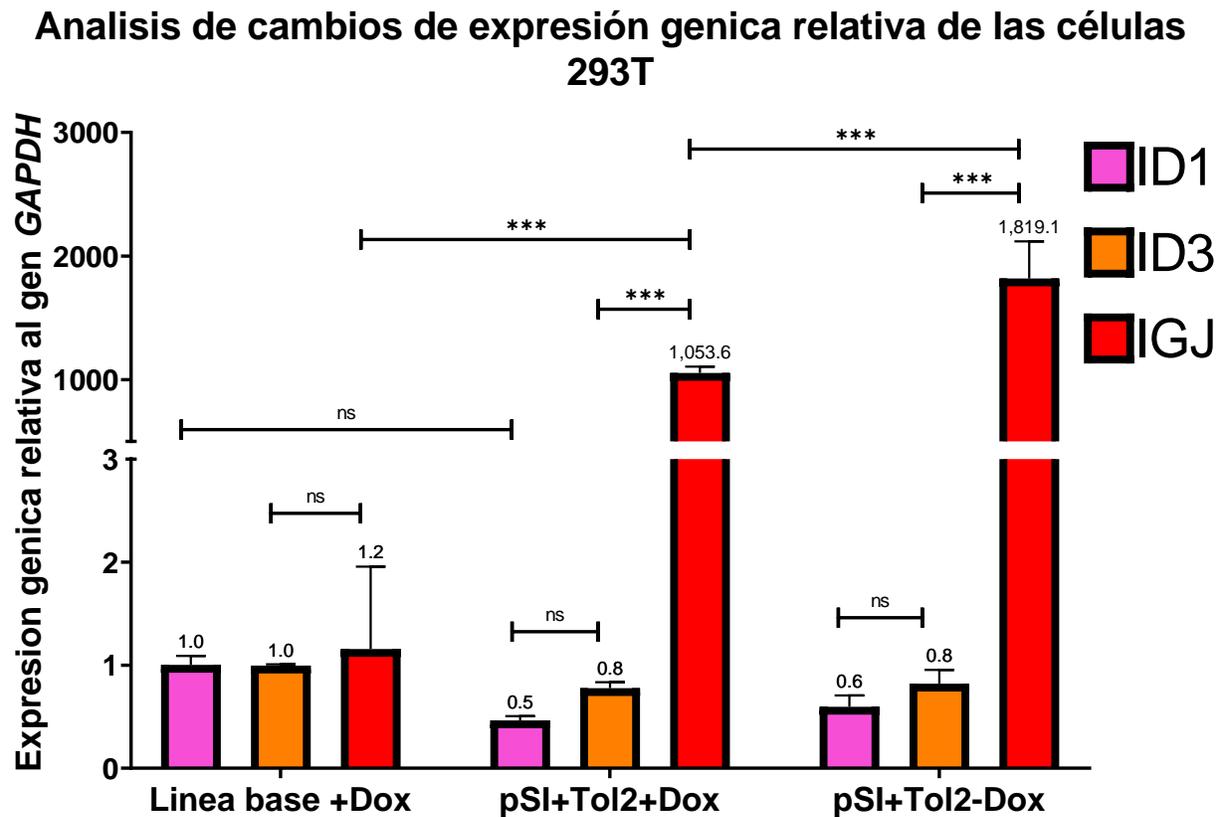


#### 4.4.2.1 Línea 293T

Nuevamente, se encontraron alteraciones en los niveles de expresión relativa del gen *IGJ* de interés en los modelos cotransfectados con y sin doxiciclina en comparación con la línea base ( $p < 0,001$ ) (**Fig. 20**). La adición de doxiciclina a las células transfectadas disminuyó el nivel de expresión del gen *IGJ* sin alterar los niveles de *ID1* e *ID3*, lo cual no concuerda con lo esperado para la expresión del modelo inducible (**Fig. 20**). De manera similar a lo encontrado en el sistema constitutivo, los resultados de los modelos 293T pSI+Tol2 no fueron los esperados para un ARN mensajero policistrónico. Los niveles del gen *IGJ* eran significativamente superiores a los otros genes del policistrón (**Fig. 20**). La ausencia de proteínas transgénicas indica que este aumento proviene del gen *IGJ* endógeno. Por lo tanto, concluimos que el sistema Tet-on no logró inducir la sobreexpresión de los transgenes en la línea celular 293T.

**Figura 20.**

Análisis de los cambios de expresión relativa de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* para las células 293T no transfectadas y cotransfectadas con el sistema inducible incubadas con 1,0 µg/mL de puromicina después de 3-4 semanas con y sin la adición 1,0 µg/mL de doxiciclina por 48 horas (\*\*\*) $p < 0,001$ ; ns: no significancia).



#### 4.4.2.2 Línea NALM-6

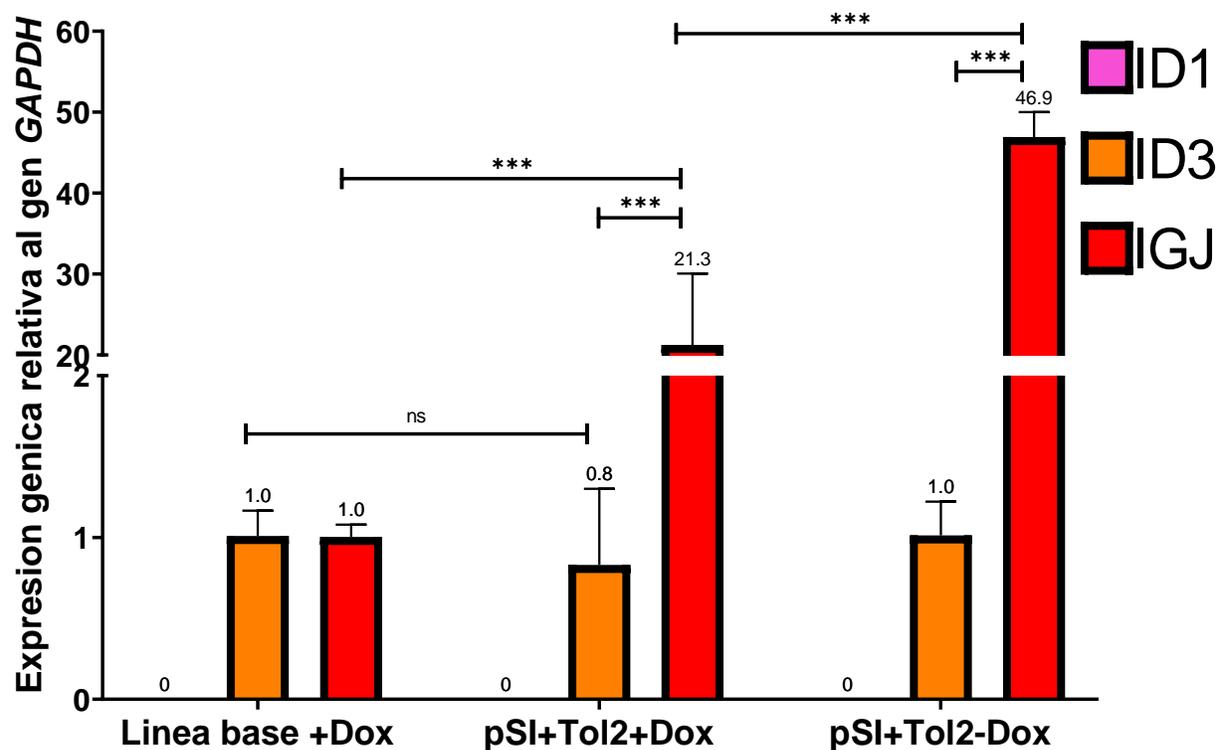
El nivel de expresión del gen *ID1* en los modelos NALM-6 no fue detectable en ninguna condición, similar a lo observado con el sistema constitutivo (Fig.18, Fig. 21). Únicamente se observó un aumento significativo del gen *IGJ* en las líneas transfectadas inducidas en comparación con la línea base incubada con doxiciclina. Igualmente, se observó que la adición de la doxiciclina

por 48 horas a las células transfectadas resultó en una disminución del nivel de expresión del gen *IGJ* sin alterar los niveles de *ID1* e *ID3*, similar a lo encontrado en las células 293T (**Fig. 20, Fig. 21**). La ausencia de proteínas transgénicas indica que este aumento proviene del gen *IGJ* endógeno. Por lo tanto, concluimos que el sistema Tet-on tampoco logró inducir la sobreexpresión de los transgenes en las células NALM-6.

**Figura 21.**

Análisis de los cambios de expresión relativa de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* para las células *NALM-6* no transfectadas y cotransfectadas con el sistema inducible incubadas con 1,0  $\mu\text{g/mL}$  de puromicina después de 3 semanas con y sin la adición 1,0  $\mu\text{g/mL}$  de doxiciclina por 48 horas (\*\*\*) $p < 0,001$ ; ns: no significancia).

### Analisis de cambios de expresión genica relativa de las células *NALM-6*



## 5.4 Evaluación de la expresión proteica

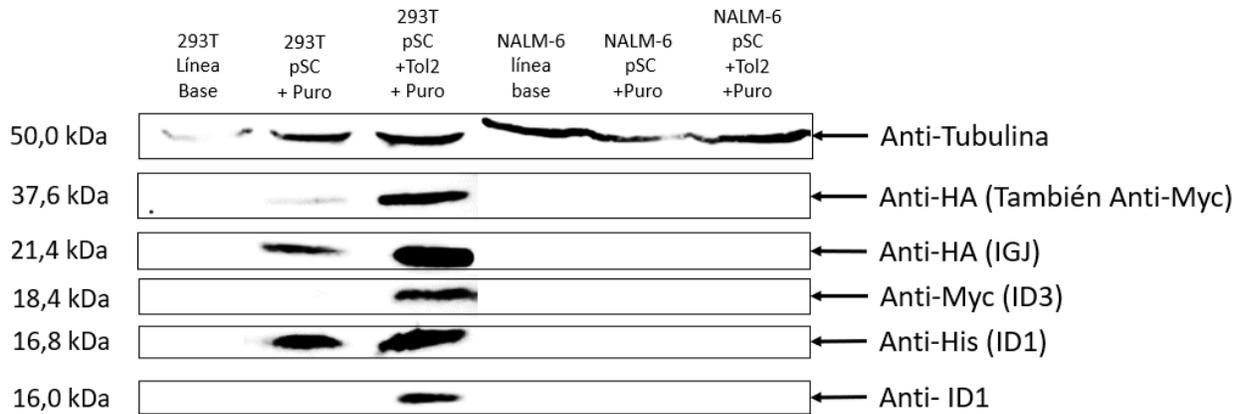
### 5.4.1 Sistema de expresión constitutivo

En primer lugar, se determinó la presencia de las proteínas codificadas por el transgén en las células 293T, usando como control de carga la proteína beta tubulina, de 50 kDa. Las células

293T transfectadas con pSC y cotransfectadas con pSC+Tol2 expresaban las proteínas de los transgenes en los tamaños esperados (His-ID1:16,8 kDa; Myc-ID3:18,4 kDa; HA-IGJ: 21,4 kDa) (**Fig. 17**). De igual manera, se observó una banda de un tamaño de 37,6 kDa al utilizar los anticuerpos Anti-Myc y Anti-HA, lo cual sugiere la presencia de una proteína de fusión entre ID3 e IGJ (**Fig. 15**) sugiriendo que el péptido 2A no estaría funcionando como se espera en todos los eventos traduccionales. Notablemente, en las células NALM-6 transfectadas con los mismos plásmidos, arriba mencionados, no se detectó expresión de ninguna proteína recombinante (**Fig. 15**). Adicionalmente, al utilizar un anticuerpo anti-ID1, que detecta la proteína endógena (16 kDa) y la recombinante, no se logró detectar la expresión esperada ni la línea base ni en las células transfectadas o cotransfectadas (**Fig. 15**). Es importante mencionar que en los ensayos de Western blot de las proteínas de los modelos NALM-6 siempre se utilizaron las proteínas de las células 293T pSC+Tol2 como control. Así mismo, es necesario mencionar que la extracción de proteínas de los modelos de ambas líneas celulares se realizó 6 semanas después de los protocolos de transfección.

**Figura 22.**

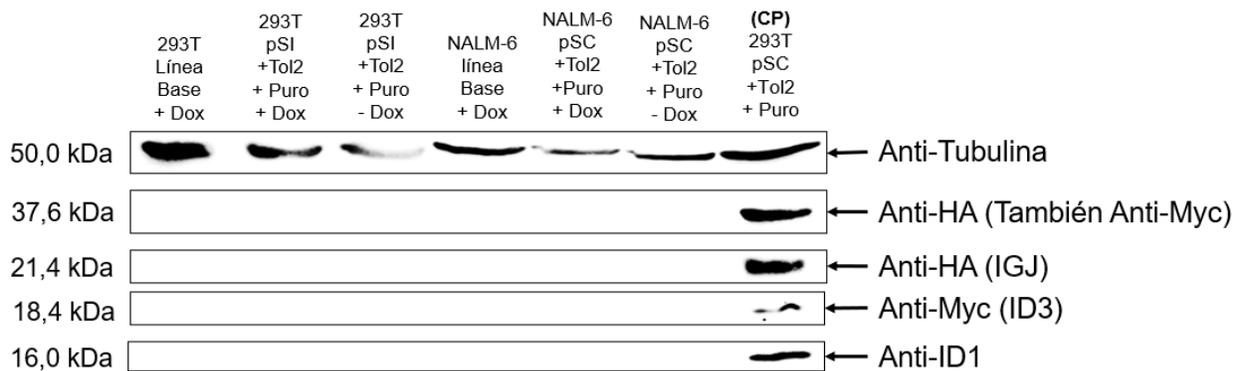
*Resultados de Western blot para las células no transfectadas, transfectadas y cotransfectadas con el sistema constitutivo incubadas con 1,0 µg/mL de puromicina para los modelos 293T y 0,15 µg/mL de puromicina para los modelos NALM-6 después de 6 semanas.*

**5.4.2 Sistema de expresión inducible**

Para el análisis de la expresión proteica en los modelos celulares inducibles se empleó el modelo 293T pSC+Tol2 mantenido en medio de cultivo suplementado con 1,0 µg/mL de puromicina como control positivo (CP), ya que estas células expresan todas las proteínas de interés. Como se puede ver en la **figura 18**, no se detectó expresión de las proteínas provenientes de los transgenes en el modelo 293T pSI+Tol2 ni NALM-6 pSI+Tol2. Adicionalmente, tampoco se detectó la proteína ID1 en ninguna de los modelos usando el anticuerpo específico que detecta la proteína endógena y del transgén (**Fig. 18**). Es importante mencionar que la extracción de proteínas de las células 293T se realizó 3 semanas después de la lipofección, mientras que la extracción de las células NALM-6 se realizó 4 semanas después de la electroporación.

**Figura 23.**

*Resultados de Western blot para las células no transfectadas y cotransfectadas con el sistema inducible incubadas con 1,0 µg/mL de puromicina para los modelos 293T y 0,15 µg/mL de puromicina para los modelos NALM-6 después de 3-4 semanas con y sin la adición 1,0 µg/mL de doxiciclina por 48 horas.*

**6. Discusión**

Las líneas celulares genéticamente modificadas son esenciales para estudios de función génica, ya que permiten evaluar diversas hipótesis en un modelo de fácil manipulación. Sin embargo, los modelos celulares han cambiado a través del tiempo debido a la necesidad de que su propia biología no afecte los resultados de las investigaciones. Actualmente, el campo de conocimiento que más emplea modelos celulares es la terapia génica y muchas investigaciones se basan en los hallazgos de esta área para diseñar sus propias líneas celulares modificadas (Alhaji et al., 2019). Por esta razón y al limitado acceso a laboratorios con altos niveles de bioseguridad, se ha presentado un reemplazo del uso de los vectores virales convencionales para la integración génica por vectores no virales (Hardee et al., 2017). Por otra parte, el uso de secuencias policistrónicas para la expresión génica ha sido empleado desde hace muchos años con excelentes

resultados. Esta es una herramienta muy útil en investigaciones que requieren analizar la función de varios genes de manera simultánea en un mismo organismo. Sin embargo, es recomendable agregar otras secuencias que permitan diferenciar la expresión proveniente de los genes endógenos de los transgenes. Además de secuencias que permitan obtener cada proteína de manera independiente con el fin de evitar las proteínas fusionadas no funcionales. De igual manera, es imperativo que todas las líneas celulares genéticamente modificadas sean seleccionadas y evaluadas a nivel de expresión génica y proteica. Es importante considerar que un aumento en los niveles de expresión de un gen específico no siempre producirá una proteína funcional, tal como se ha reportado ampliamente en la literatura (Karginov et al., 2017). Incluso, en algunos casos es necesario determinar la presencia de proteínas fusionadas que, a pesar de expresarse, no van a llevar a cabo sus funciones debido a mal plegamiento.

Para obtener una población de líneas celulares transfectadas es conveniente proveer a las células de una característica distintiva como, por ejemplo, la resistencia a puromicina. La resistencia a este antibiótico permite seleccionar a las células transfectadas con el fin de evitar la posible interferencia de las líneas celulares no transfectadas en los análisis posteriores. Esta situación es evidente en las células 293T transfectadas con pSC y pSC+Tol2 incubadas con puromicina donde se observó un aumento en el número de células GFP positivas, mientras que en aquellas incubadas sin el antibiótico de selección se evidenció una disminución en el número de células GFP positivas (Datos no incluidos).

El aumento del número de células fluorescentes después de la selección con puromicina del modelo 293T pSC+Puro podría explicarse por la expresión del gen de resistencia en el plásmido

de forma episomal. Sin embargo, se ha reportado que las líneas celulares de mamíferos pierden eventualmente el plásmido de forma episomal, ya que este no se transmite eficientemente a las células hijas (Xuan Wang et al., 2016). Este fenómeno también podría presentarse en el modelo 293T pSC+Tol2+Puro, debido a que los protocolos de transfección no aseguran la presencia de ambos plásmidos en la misma célula y el plásmido Tol2 no contiene un elemento que permita verificar su presencia de forma rápida. Por lo tanto, la resistencia a puromicina no puede ser el único indicador para diferenciar las células pSC+Puro de pSC+Tol2+Puro y es necesario hacer análisis de la expresión génica u otros estudios.

Como se evidenció previamente, existen diferencias entre la expresión génica relativa de los modelos 293T transfectados y cotransfectados en comparación con la línea base. Se presentaron resultados que no están de acuerdo con lo reportado por la literatura para un único evento transcripcional (Karginov et al., 2017). Si bien, se obtuvo un aumento de los niveles de expresión relativa de los tres genes en el modelo pSC+Tol2+Puro, no se evidenciaron niveles similares entre los genes del policistrón. Es posible que las diferencias en la expresión relativa de los genes de interés sean causadas por un aumento de los niveles de los genes endógenos como mecanismo de respuesta hacia la presencia de los transgenes, pero no sean provenientes del policistrón.

Se detectó la expresión de proteínas transgénicas en los modelos 293T pSC+Puro y 293T pSC+Tol2+Puro. Desafortunadamente, se pudo evidenciar presencia de bandas que indican proteínas fusionadas, tanto en el modelo 293T pSC+Puro como en el modelo 293T pSC+Tol2+Puro. Específicamente, se evidenció este fenómeno en la fusión de ID3 con IGJ, lo que sugiere que el péptido P2A entre ellas no funciona correctamente en todos los casos, fenómeno

que ha sido reportado por otros autores (Chng et al., 2015; Shaimardanova et al., 2019). Incluso algunos investigadores recomiendan utilizar diferentes péptidos 2A en el mismo policistrón para mejorar la eficiencia del salto ribosomal y evitar las proteínas fusionadas. (Szymczak-Workman et al., 2012). Esta es una situación similar a lo encontrado en los modelo, sin embargo, existen otros estudios donde se emplea el mismo péptido 2A más de una vez mismo policistrón sin inconvenientes (Liu et al., 2017). Por tal razón, no es posible establecer una regla concreta sobre este particular.

Con respecto a los análisis de la expresión génica relativa inducible de las líneas celulares se encontró que la doxiciclina no alteraba los niveles de los genes de interés. Este resultado concuerda con lo reportado por la literatura donde se recomienda el uso de moléculas pequeñas como antibióticos para los sistemas de inducción debido a que los efectos secundarios son ausentes o muy bajos y porque no afectan las vías de señalización celulares endógenas (Page et al., 2020).

Para los modelos 293T cotransfectados no se logró la sobreexpresión inducible de los transgenes del policistrón, a pesar de utilizar la concentración recomendada por la casa comercial y por otros autores para esta línea celular (Das, Zhou, et al., 2016). Si bien se evidenció alteración en los niveles de expresión relativa del gen *IGJ*, este aumento no se vio reflejado en los genes *IDI* e *ID3* y tampoco se detectó proteína transgénica. Debido a que la secuencia del plásmido fue verificada por digestiones con enzimas de restricción y secuenciación, nuestra hipótesis es que el promotor bidireccional establecido por Ocegüera-Yañez no permite obtener niveles suficientes de la proteína rtTA, la cual es esencial para el funcionamiento de este sistema (Ocegüera-Yañez et al., 2016).

A diferencia de la facilidad en la transfección de líneas celulares adherentes, como la línea 293T, la transfección a líneas celulares en suspensión es materia de revisión por muchos investigadores (Maeder & Gersbach, 2016). Esto se debe a que no todos los métodos son aplicables a la línea de estudio y en algunos casos el método de transfección puede conducir a sesgos en los resultados. A pesar de la baja eficiencia de la lipofección en este tipo de células (Basiouni et al., 2012), se comprobó este fenómeno en nuestra línea de estudio. Incluso se probó una metodología de adherencia a la placa de cultivo con clara de huevo siguiendo las indicaciones de los autores originales sin obtener resultados exitosos (Basiouni et al., 2012). Por tal razón, se empleó un protocolo de electroporación adaptado de una metodología previamente utilizada por integrantes de nuestro grupo de investigación para transfección de líneas celulares en suspensión (Cardona et al., 2016). La electroporación de líneas celulares en suspensión genera una población mixta de células viables y no viables en el medio de cultivo. Existen varias alternativas para la selección de la población viable transfectada, pero en su gran mayoría requieren equipos o insumos de alto costo. En esta investigación se logró estandarizar exitosamente una metodología de separación celular con base en su densidad utilizando el reactivo Optiprep. Esta es una herramienta muy útil y fácilmente accesible que puede ser empleada en investigaciones posteriores. Precisamente esta herramienta permitió separar las células NALM-6 viables transfectadas resistentes a puromicina y facilitar su observación en el microscopio de fluorescencia.

A pesar de que los modelos NALM-6 pSC y NALM-6 pSC+Tol2 eran viables y resistentes puromicina, las células NALM-6 pSC+Tol2+Puro mostraron una disminución significativa de la población celular GFP+ en comparación con las células NALM-6 pSC+Puro. Este resultado sugiere un posible silenciamiento sobre la expresión de los genes regulados por el promotor

constitutivo EF-1 $\alpha$  en la línea integrada. De tal manera, la baja cantidad de proteína PuroR obtenida es suficiente para mantener la línea celular incubada con este antibiótico, pero la fluorescencia es claramente menor en comparación con el modelo transitorio. Estos resultados son similares a los obtenidos en la cotransfección de cada gen en plásmidos independientes con la enzima Tol2 transposasa (Datos no incluidos). Por lo cual, se descarta un evento azaroso.

El silenciamiento de transgenes en líneas celulares es uno de los problemas más frecuentes en el establecimiento de modelos de estudio (Alhaji et al., 2019). La medición de los niveles de expresión por RT-qPCR muestran un silenciamiento total del gen *ID1* en todos los modelos analizados, tanto del transgén como del gen endógeno. Con respecto al gen *ID3*, no se evidenciaron cambios significativos en los niveles de expresión en ningún modelo celular, por lo tanto, el transgén *ID3* también está silenciado. Si bien se encontró un aumento en los niveles de expresión relativa del gen *IGJ*, este aumento es dado por el gen endógeno y no del transgén. De manera interesante, este aumento ocurre en presencia de los transgenes, ya sea de forma episomal o integrada y podría ser un mecanismo de defensa de las células ante el material genético externo. Sin embargo, este proceso requiere investigaciones más profundas que no fueron contempladas en la presente investigación. Los resultados obtenidos muestran que los modelos NALM-6 no expresaron ninguna proteína proveniente de los transgenes ni su propia proteína ID1. De tal manera, no fue posible obtener la sobreexpresión génica de manera constitutiva ni inducible en los modelos NALM-6 con la metodología empleada, por lo tanto, se descartaría la hipótesis de trabajo.

Estudios preliminares de nuestro grupo encontraron que es posible sobreexpresar los tres genes en un modelo celular NALM-6 utilizando plásmidos independientes de forma episomal por

un tiempo menor a 48 horas (Datos no incluidos). Posterior a este tiempo, se pierde la sobreexpresión al analizarse por medio de RT-qPCR. Es posible que la pérdida se presente por un silenciamiento del promotor CMV a través del tiempo y no por la expresión transitoria. El silenciamiento de los transgenes puede ser debido a una metilación del promotor que impide tener un modelo celular constitutivo integrado. Si bien existen reportes donde se ha utilizado el promotor CMV en la línea NALM-6, los modelos generados son analizados en un periodo de tiempo corto y los transgenes no son integrados al genoma (Ono et al., 2009). A pesar de esta limitación, se ha reportado que el promotor CMV va perdiendo su capacidad de mantener niveles altos de expresión del gen de interés y se han propuesto modificaciones a la secuencia del promotor para mejorar este aspecto (Ebadat et al., 2017; Zúñiga et al., 2019).

A pesar de utilizar las concentraciones de doxiciclina recomendadas por la literatura (Ono et al., 2009), tampoco se obtuvo la sobreexpresión inducible de los transgenes del policistrón ni obtención de proteína transgénica inducible. Por lo cual, se presenta más evidencia que el sistema Tet-on con promotor bidireccional no funciona según lo esperado. Es importante señalar que al reemplazar el promotor CMV por el sistema Tet-on se logró reestablecer los niveles de fluorescencia, lo cual apoya la hipótesis de un silenciamiento del promotor viral que incluso podría afectar al promotor EF-1 $\alpha$  en el modelo NALM-6 pSC+Tol2.

Por otra parte, existen pocas investigaciones enfocadas en el diseño de modelos celulares para estudiar la función génica que incluyan los componentes empleados en este trabajo. Según nuestra revisión, este es el primer trabajo que emplea varios de los componentes de los sistemas de expresión y del cassette de genes en la línea celular NALM-6. Por tal razón fue necesaria la

estandarización de todos los protocolos en la línea 293T, en la cual se obtuvieron resultados promisorios que requieren mayor investigación.

Existe una gran información sobre el funcionamiento de las proteínas de la familia ID en procesos tumorales, pero según nuestra revisión, este es el primer trabajo que busca estudiar la relevancia de estas con el gen *IGJ* en modelos neoplásicos. Por tal razón, y a pesar de no obtener los resultados esperados, consideramos importante llevar a cabo los análisis posteriores de funcionalidad de estos modelos celulares. Si bien no fue posible cumplir nuestro objetivo de establecer modelos integrados con la sobreexpresión simultánea de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* es posible que la alteración de los niveles del gen *IGJ* conlleve a un cambio en el perfil de resistencia, proliferación o metabolismo celular y requiera ser estudiados con más detalle.

Es importante señalar que este trabajo tiene algunas limitaciones que deben ser reconocidas. Entre estas podemos resaltar la necesidad de utilizar la línea NALM-6 que fue aislada de un paciente masculino norteamericano de 19 años debido a que no se cuenta con una línea celular comercial de un paciente colombiano o al menos, latinoamericano. Como se presentó previamente, el origen étnico de este paciente es importante en la biología de la célula tumoral y su respuesta al tratamiento. Por tal razón, es posible que esta línea posea otros cambios genéticos que impidan replicar lo observado en los pacientes colombianos. Con respecto a este punto, las investigaciones posteriores se realizarán en otras líneas celulares comerciales y se comparará los resultados.

Debido a la integración aleatoria en regiones eucromatinicas del genoma por la enzima Tol2 transposasa, es posible que algunos de los resultados obtenidos sean debidos a la falla del funcionamiento celular causado por la alteración de secuencias génicas por la integración del transposón. Para tal aspecto, es importante realizar estudios de estos genes usando herramientas de edición génica como CRISPR-Cas sitio específico y CRISPRa.

## 7. Conclusiones

Se logró obtener modelos celulares NALM-6 transgénicos integradas usando la transposasa Tol2. Esto permite tener alternativas diferentes al uso de vectores virales, los cuales requieren niveles de bioseguridad BS2 o mayores.

Las líneas celulares transgénicas generadas usando el sistema constitutivo (293T y NALM-6) presentan similares alteraciones dispares en los niveles de expresión entre los genes de la firma. Este patrón de expresión no es compatible con genes transcritos de manera policistrónica, por lo tanto, concluimos que no se logró sobreexpresión concomitante de los genes de la firma mediada por el transgén.

La línea estable para el sistema constitutivo en las células 293T, usada como control, mostró bajos niveles de expresión de los genes del transgén, como pudo evidenciarse por los análisis de proteínas por Western blot. Sin embargo, en el modelo estable NALM-6 el transgén parece estar silenciado completamente, fenómeno que puede deberse al promotor viral CMV usado. La expresión de proteínas transgénicas constitutivas en las células 293T permitan afirmar que los componentes del plásmido pSC funcionan correctamente. Sin embargo, el hecho de

detectar proteínas de fusión entre ID3 e IGH nos lleva a concluir que, en el sistema evaluado, el péptido P2A funciona entre el primero y segundo gen, pero lo hace de manera ineficiente entre el segundo y el tercer gen del policistrón.

Las líneas celulares transgénicas generadas usando el sistema inducible (293T y NALM-6) no mostraron activación transcripcional de los genes de la firma en presencia de doxiciclina. Este fenómeno probablemente no se deba a silenciamiento epigenético sino a la funcionalidad del promotor bidireccional.

## **8. Recomendaciones**

A pesar de que los resultados sugieren que la integración al genoma fue realizada por la enzima Tol2 transposasa en las líneas transfectadas, se recomienda identificar los sitios de integración por medio de PCR convencional y secuenciación. Debido al posible silenciamiento del promotor CMV en el sistema constitutivo, se sugiere reemplazarlo por promotores eucariotas como el promotor  $\beta$ -actina (pActB) y EF-1 $\alpha$  o sintéticos como pCAG y pCBH. Para el sistema inducible, se recomienda realizar verificaciones del funcionamiento del sistema con la expresión de genes reporteros y utilizar otro sistema Tet-on donde la regulación de la proteína rtTA sea independiente del promotor inducible TRE.

Es posible que la línea celular NALM-6 no permita la expresión de estos transgenes, por lo cual se recomienda considerar el uso de otras líneas comerciales LLA-B como KARPAS, Reh o 697. Así mismo, se recomienda aplicar herramientas de edición génica como CRISPR-Cas sitio específico o CRISPRa.

Finalmente, debido a la detección de proteínas recombinantes fusionadas se recomienda reemplazar el segundo péptido P2A por otro péptido 2A o por un elemento IRES. Incluso, se podría considerar la transfección de cada gen en plásmidos independientes con el fin evitar este proceso y la posible alteración de la función proteica por un mal plegamiento.

### Referencias Bibliográficas

- Adachi, N., Nishijima, H., & Shibahara, K. ichi. (2008). Gene targeting using the human Nalm-6 pre-B cell line. *BioScience Trends*, 2(5), 169–180.
- Alhaji, S. Y., Ngai, S. C., & Abdullah, S. (2019). Silencing of transgene expression in mammalian cells by DNA methylation and histone modifications in gene therapy perspective. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 35(1), 1–25. <https://doi.org/10.1080/02648725.2018.1551594>
- Allemani, C., Matsuda, T., Di Carlo, V., Harewood, R., Matz, M., Nikšić, M., Bonaventure, A., Valkov, M., Johnson, C. J., Estève, J., Ogunbiyi, O. J., Azevedo e Silva, G., Chen, W. Q., Eser, S., Engholm, G., Stiller, C. A., Monnereau, A., Woods, R. R., Visser, O., ... Lewis, C. (2018). Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *The Lancet*, 391(10125), 1023–1075. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33326-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33326-3)
- Allemani, C., Weir, H. K., Carreira, H., Harewood, R., Spika, D., Wang, X. S., Bannon, F., Ahn, J. V., Johnson, C. J., Bonaventure, A., Marcos-Gragera, R., Stiller, C., Azevedo E Silva, G., Chen, W. Q., Ogunbiyi, O. J., Rachet, B., Soeberg, M. J., You, H., Matsuda, T., ... Miles, S. A. (2015). Global surveillance of cancer survival 1995-2009: Analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet*, 385(9972), 977–1010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62038-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62038-9)
- Alsadeq, A., Fedders, H., Vokuhl, C., Belau, N. M., Zimmermann, M., Wirbelauer, T., Spielberg, S., Vossen-Gajcy, M., Cario, G., Schrappe, M., & Schewe, D. M. (2017). The role of ZAP70

- kinase in acute lymphoblastic leukemia infiltration into the central nervous system. *Haematologica*, *102*(2), 346–355. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.147744>
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Borowitz, M. J., Beau, M. M. Le, Bloomfield, C. D., Cazzola, M., Vardiman, J. W., Westergaard, T., Andersen, P. K., Pedersen, J. B., Olsen, J. H., Frisch, M., Sorensen, H. T., Wohlfahrt, J., & Melbye, M. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, *127*(20), 2391–2406. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.The
- Basiouni, S., Fuhrmann, H., & Schumann, J. (2012). High-efficiency transfection of suspension cell lines. *BioTechniques*, *53*(2), 1–4. <https://doi.org/10.2144/000113914>
- Bhatia, S., Sather, H. N., Heerema, N. A., Trigg, M. E., Gaynon, P. S., & Robison, L. L. (2002). Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *100*(6), 1957–1964. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0395>
- Bhatla, T., Jones, C. L., Meyer, J. a, Vitanza, N. a, Elizabeth, A., & Carroll, W. L. (2014). *The Biology of Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia: Opportunities for Therapeutic Interventions*. *36*(6), 413–418. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000000179>.The
- Bueno, C., Calero-Nieto, F. J., Wang, X., Valdés-Mas, R., Gutiérrez-Agüera, F., Roca-Ho, H., Ayllon, V., Real, P. J., Arambilet, D., Espinosa, L., Torres-Ruiz, R., Agraz-Doblas, A., Varela, I., de Boer, J., Bigas, A., Gottgens, B., Marschalek, R., & Menendez, P. (2019). Enhanced hemato-endothelial specification during human embryonic differentiation through developmental cooperation between AF4-MLL and MLL-AF4 fusions. *Haematologica*, *104*(6), 1189–1201. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.202044>
- Cardona, M. E., Simonson, O. E., Oprea, I. I., Moreno, P. M. D., Silva-Lara, M. F., Mohamed, A. J., Christensson, B., Gahrton, G., Dilber, M. S., Smith, C. I. E., & Arteaga, H. J. (2016). A

- murine model of acute myeloid leukemia with Evi1 overexpression and autocrine stimulation by an intracellular form of GM-CSF in DA-3 cells. *Leukemia & Lymphoma*, 57(1), 183–192. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1043547>
- Castano, J., Bueno, C., Jimenez-Delgado, S., Roca-Ho, H., Fraga, M. F., Fernandez, A. F., Nakanishi, M., Torres-Ruiz, R., Rodriguez-Perales, S., & Menendez, P. (2017). Generation and characterization of a human iPSC cell line expressing inducible Cas9 in the “safe harbor” AAVS1 locus. *Stem Cell Research*, 21, 137–140. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.04.011>
- Castro, C. D., & Flajnik, M. F. (2014). Putting J chain back on the map: how might its expression define plasma cell development? *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(7), 3248–3255. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400531>
- Chen, L., Tang, L., Xiang, H., Jin, L., Li, Q., Dong, Y., Wang, W., & Zhang, G. (2014). Advances in genome editing technology and its promising application in evolutionary and ecological studies. *GigaScience*, 3(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-3-24>
- Chen, S., Xing, H., Li, S., Yu, J., Li, H., Liu, S., Tian, Z., Tang, K., Rao, Q., Wang, M., & Wang, J. (2015). Up-regulated A20 promotes proliferation, regulates cell cycle progression and induces chemotherapy resistance of acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia Research*, 39(9), 976–983. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2015.06.004>
- Chiaretti, S., Zini, G., & Bassan, R. (2014). Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 6(1). <https://doi.org/10.4084/mjhid.2014.073>
- Chicaybam, L., Sodre, A. L., Curzio, B. A., & Bonamino, M. H. (2013). An Efficient Low Cost Method for Gene Transfer to T Lymphocytes. *PLoS ONE*, 8(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060298>

- Chng, J., Wang, T., Nian, R., Lau, A., Hoi, K. M., Ho, S. C. L., Gagnon, P., Bi, X., & Yang, Y. (2015). Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells. *MAbs*, 7(2), 403–412. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1008351>
- Cochrane, S. W., Zhao, Y., Perry, S. S., Urbaniak, T., & Sun, X.-H. (2011). Id1 has a physiological role in regulating early B lymphopoiesis. *Cellular & Molecular Immunology*, 8(1), 41–49. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.58>
- Combariza, J. F., Casas, C. P., Rodríguez, M., Cardona, A. F., Ospina, É., & Grajales, M. (2007). Supervivencia en adultos con leucemia linfoide aguda de novo tratados con el esquema HyperCVAD en el Instituto Nacional de Cancerología ( Colombia ), entre enero de 2001 y junio de 200. *Revista Colombiana de Cancerología*, 11(9), 92–100.
- Cruz-Rodríguez, N., Combata, A. L., Enciso, L. J., Quijano, S. M., Pinzon, P. L., Lozano, O. C., Castillo, J. S., Li, L., Bareño, J., Cardozo, C., Solano, J., Herrera, M. V., Cudris, J., & Zabaleta, J. (2016). High expression of ID family and IGJ genes signature as predictor of low induction treatment response and worst survival in adult Hispanic patients with B-Acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0333-z>
- Cruz-Rodríguez, N., Combata, A. L., Enciso, L. J., Raney, L. F., Pinzon, P. L., Lozano, O. C., Campos, A. M., Peñaloza, N., Solano, J., Herrera, M. V., Zabaleta, J., & Quijano, S. (2017a). Prognostic stratification improvement by integrating ID1/ID3/IGJ gene expression signature and immunophenotypic profile in adult patients with B-ALL. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0506-4>
- Cruz-Rodríguez, N., Combata, A. L., Enciso, L. J., Raney, L. F., Pinzon, P. L., Lozano, O. C., Campos, A. M., Peñaloza, N., Solano, J., Herrera, M. V., Zabaleta, J., & Quijano, S. (2017b).

- Prognostic stratification improvement by integrating ID1/ID3/IGJ gene expression signature and immunophenotypic profile in adult patients with B-ALL. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0506-4>
- Curado, M. P., Pontes, T., Guerra-Yi, M. E., & Cancela, M. de C. (2011). Leukemia mortality trends among children, adolescents, and young adults in Latin America. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 29(2), 96–102. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892011000200004>
- Das, A. T., Tenenbaum, L., & Berkhout, B. (2016). Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Current Gene Therapy*, 16(3), 156–167. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27216914><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5070417>
- Das, A. T., Zhou, X., Metz, S. W., Vink, M. A., & Berkhout, B. (2016). Selecting the optimal Tet-On system for doxycycline-inducible gene expression in transiently transfected and stably transduced mammalian cells. *Biotechnology Journal*, 11(1), 71–79. <https://doi.org/10.1002/biot.201500236>
- Debaize, L., Jakobczyk, H., Avner, S., Gaudichon, J., Rio, A. G., Sérandour, A. A., Dorsheimer, L., Chalmel, F., Carroll, J. S., Zörnig, M., Rieger, M. A., Delalande, O., Salbert, G., Galibert, M. D., Gandemer, V., & Troadec, M. B. (2018). Interplay between transcription regulators RUNX1 and FUBP1 activates an enhancer of the oncogene c-KIT and amplifies cell proliferation. *Nucleic Acids Research*, 46(21), 11214–11228. <https://doi.org/10.1093/nar/gky756>
- Ebadat, S., Ahmadi, S., Ahmadi, M., Nematpour, F., Barkhordari, F., Mahdian, R., Davami, F., & Mahboudi, F. (2017). Evaluating the efficiency of CHEF and CMV promoter with IRES and

- Furin/2A linker sequences for monoclonal antibody expression in CHO cells. *PLoS ONE*, *12*(10), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185967>
- Ferreira, D., Adegá, F., & Chaves, R. (2013). The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methylation Analysis and Anticancer Drugs Testing. *Oncogenomics and Cancer Proteomics - Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer*. <https://doi.org/10.5772/53110>
- Gillet, J. P., Varma, S., & Gottesman, M. M. (2013). The clinical relevance of cancer cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, *105*(7), 452–458. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt007>
- Hardee, C. L., Arévalo-Soliz, L. M., Hornstein, B. D., & Zechiedrich, L. (2017). Advances in non-viral DNA vectors for gene therapy. *Genes*, *8*(2). <https://doi.org/10.3390/genes8020065>
- Hart, M. R., Anderson, D. J., Porter, C. C., Neff, T., Levin, M., & Horwitz, M. S. (2018). Activating PAX gene family paralogs to complement PAX5 leukemia driver mutations. In *PLoS Genetics* (Vol. 14, Issue 9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007642>
- Harvey, R. C., Mullighan, C. G., Wang, X., Dobbin, K. K., Davidson, G. S., Bedrick, E. J., Chen, I. M., Atlas, S. R., Kang, H., Ar, K., Wilson, C. S., Wharton, W., Murphy, M., Devidas, M., Carroll, A. J., Borowitz, M. J., Bowman, W. P., Downing, J. R., Relling, M., ... Willman, C. L. (2010). Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: Correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*, *116*(23), 4874–4884. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-239681>
- Hayat Khan, K. (2013). Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *3*(2), 257–263. <https://doi.org/10.5681/apb>
- Hofacre, A., Yagiz, K., Mendoza, D., Lopez Espinoza, F., Munday, A. W., Burrascano, C., Singer,

- O., Gruber, H. E., Jolly, D. J., & Lin, A. H. (2017). Efficient Therapeutic Protein Expression Using Retroviral Replicating Vector with 2A Peptide in Cancer Models. *Human Gene Therapy*, 29(4), 437–451. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.205>
- Hoffmann, K., Firth, M. J., Beesley, A. H., Freitas, J. R., Ford, J., Senanayake, S., De Klerk, N. H., Baker, D. L., & Kees, U. R. (2008). Prediction of relapse in paediatric pre-B acute lymphoblastic leukaemia using a three-gene risk index. *British Journal of Haematology*, 140(6), 656–664. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.06981.x>
- Huang, L., Cai, J., Guo, H., Gu, J., Tong, Y., Qiu, B., Wang, C., Li, M., Xia, L., Zhang, J., Wu, H., Kong, X., & Xia, Q. (2019). ID3 Promotes Stem Cell Features and Predicts Chemotherapeutic Response of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. In *Hepatology* (Vol. 69, Issue 5). <https://doi.org/10.1002/hep.30404>
- Huang, X., Guo, H., Tammana, S., Jung, Y. C., Mellgren, E., Bassi, P., Cao, Q., Tu, Z. J., Kim, Y. C., Ekker, S. C., Wu, X., Wang, S. M., & Zhou, X. (2010). Gene transfer efficiency and genome-wide integration profiling of sleeping beauty, Tol2, and PiggyBac transposons in human primary t cells. *Molecular Therapy*, 18(10), 1803–1813. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.141>
- Hudecek, M., Izsvák, Z., Johnen, S., Renner, M., Thumann, G., & Ivics, Z. (2017). Going non-viral: the Sleeping Beauty transposon system breaks on through to the clinical side. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(4), 355–380. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1304354>
- Hui, C. M., Cheung, P. Y., Ling, M. T., Tsao, S. W., Wang, X., Wong, Y. C., & Cheung, A. L. M. (2006). Id-1 promotes proliferation of p53-deficient esophageal cancer cells. *International Journal of Cancer*, 119(3), 508–514. <https://doi.org/10.1002/ijc.21874>

- Inaba, H., Greaves, M., & Mullighan, C. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, *5*(3), 379–390. <https://doi.org/10.2217/FON.09.6.Dendritic>
- Jing, W., & Li, J. (2019). Identification of biomarkers for the prediction of relapse-free survival in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncology Reports*, *41*(1), 659–667. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6846>
- Jones, C. L., Bhatla, T., Blum, R., Wang, J., Paugh, S. W., Wen, X., Bourgeois, W., Bitterman, D. S., Raetz, E. A., Morrison, D. J., Teachey, D. T., Evans, W. E., Garabedian, M. J., & Carroll, W. L. (2014). Loss of TBL1XR1 disrupts glucocorticoid receptor recruitment to chromatin and results in glucocorticoid resistance in a B-lymphoblastic leukemia model. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(30), 20502–20515. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.569889>
- Jorissen, R. N., Gibbs, P., Christie, M., Prakash, S., Lipton, L., Desai, J., Kerr, D., Aaltonen, L. A., Arango, D., Kruhøffer, M., Ørntoft, T. F., Andersen, C. L., Gruidl, M., Kamath, V. P., Eschrich, S., Yeatman, T. J., & Sieber, O. M. (2009). Metastasis-associated gene expression changes predict poor outcomes in patients with Dukes stage B and C colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, *15*(24), 7642–7651. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1431>
- Kahn, J. M., Keegan, T. H. M., Tao, L., Abrahão, R., Bleyer, A., & Viny, A. D. (2016). Racial disparities in the survival of American children, adolescents, and young adults with acute lymphoblastic leukemia, acute myelogenous leukemia, and Hodgkin lymphoma. *Cancer*, *122*(17), 2723–2730. <https://doi.org/10.1002/cncr.30089>
- Kallunki, T., Barisic, M., Jäättelä, M., & Liu, B. (2019). How to Choose the Right Inducible Gene Expression System for Mammalian Studies? *Cells*, *8*(8), 1–16. <https://doi.org/10.3390/cells8080796>

- Kang, H., Chen, I.-M., Wilson, C. S., Bedrick, E. J., Harvey, R. C., Atlas, S. R., Devidas, M., Mullighan, C. G., Wang, X., Murphy, M., Ar, K., Wharton, W., Borowitz, M. J., Bowman, W. P., Bhojwani, D., Carroll, W. L., Camitta, B. M., Reaman, G. H., Smith, M. A., ... Willman, C. L. (2010). Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *115*(7), 1394–1405. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-218560>
- Karginov, T. A., Pastor, D. P. H., Semler, B. L., & Gomez, C. M. (2017). Mammalian Polycistronic mRNAs and Disease. *Trends in Genetics*, *33*(2), 129–142. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.11.007>
- Katz, A. J., Chia, V. M., Schoonen, W. M., & Kelsh, M. A. (2015). Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival, and disease burden. *Cancer Causes and Control*, *26*(11), 1627–1642. <https://doi.org/10.1007/s10552-015-0657-6>
- Kaufman, R. J. (2000). Overview of vector design for mammalian gene expression. *Molecular Biotechnology*, *16*(2), 151–160. <https://doi.org/10.1385/MB:16:2:151>
- Kawakami, K. (2007). Tol2: A versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biology*, *8*(SUPPL. 1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-s1-s7>
- Ke, J., Wu, R., Chen, Y., & Abba, M. L. (2018). Inhibitor of DNA binding proteins: Implications in human cancer progression and metastasis. *American Journal of Translational Research*, *10*(12), 3887–3910.
- Kee, B. L., Rivera, R. R., & Murre, C. (2001). Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF-beta. *Nature Immunology*, *2*(3), 242–247. <https://doi.org/10.1038/85303>

- Keller, B.-M., Maier, J., Weldle, M., Segan, S., Traenkle, B., & Rothbauer, U. (2019). A Strategy to Optimize the Generation of Stable Chromobody Cell Lines for Visualization and Quantification of Endogenous Proteins in Living Cells. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/antib8010010>
- Khan, K. (2010). Gene Transfer Technologies and their Applications: Roles in Human Diseases. In *Asian Journal of Experimental Biological Science* (Vol. 1).
- Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., & Hou, H. (2016). Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*, 2016, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/2405954>
- Kim, H., Chung, H., Kim, H.-J., Lee, J.-Y., Oh, M.-Y., Kim, Y., & Kong, G. (2008). Id-1 regulates Bcl-2 and Bax expression through p53 and NF-kappaB in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 112(2), 287–296. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9871-6>
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173–3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- Kirtane, K., & Lee, S. J. (2017). Racial and ethnic disparities in hematologic malignancies. *Blood*, 130(15), 1699–1705. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-778225>
- Ko, M., Ahn, J., Lee, C., Chung, H., Jeon, S. H., Chung, H. Y., & Seong, R. H. (2004). E2A/HEB and Id3 proteins control the sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis in thymocytes by regulating the SRG3 expression. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 21916–21923. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402145200>
- Komar, A. A., & Hatzoglou, M. (2011). Cellular IRES-mediated translation: The war of ITAFs in

- pathophysiological states. *Cell Cycle*, *10*(2), 229–240. <https://doi.org/10.4161/cc.10.2.14472>
- Kuo, C. H. S., Liu, C. Y., Pavlidis, S., Lo, Y. L., Wang, Y. W., Chen, C. H., Ko, H. W., Chung, F. T., Lin, T. Y., Wang, T. Y., Lee, K. Y., Guo, Y. K., Wang, T. H., & Yang, C. T. (2018). Unique immune gene expression patterns in bronchoalveolar lavage and tumor adjacent non-neoplastic lung tissue in non-small cell lung cancer. *Frontiers in Immunology*, *9*(FEB), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00232>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lasorella, A., Benezra, R., & Iavarone, A. (2014). The ID proteins: Master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness. *Nature Reviews Cancer*, *14*(2), 77–91. <https://doi.org/10.1038/nrc3638>
- Lee, S., Kim, J., Kim, H., Chung, S., Kim, K., & Choe, H. K. (2019). *Molecules and Cells Real-Time Temporal Dynamics of Bicistronic Expression Mediated by Internal Ribosome Entry Site and 2A Cleaving Sequence*. *42*(5), 418–425.
- Lee, Y. S., Yoon, S., Yoon, H. J., Lee, K., Yoon, H. K., Lee, J. H., & Song, C. W. (2009). Inhibitor of differentiation 1 (Id1) expression attenuates the degree of TiO<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in H1299 non-small cell lung cancer cells. *Toxicology Letters*, *189*(3), 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.05.019>
- Li, B., Xu, W. W., Guan, X. Y., Qin, Y. R., Law, S., Lee, N. P. Y., Chan, K. T., Tam, P. Y., Li, Y. Y., Chan, K. W., Yuen, H. F., Tsao, S. W., He, Q. Y., & Cheung, A. L. M. (2016). Competitive binding between Id1 and E2F1 to Cdc20 regulates E2F1 degradation and thymidylate synthase expression to promote esophageal cancer chemoresistance. *Clinical Cancer Research*, *22*(5), 1243–1255. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1196>

- Lin, J., Guan, Z., Wang, C., Feng, L., Zheng, Y., Caicedo, E., Bearth, E., Peng, J.-R., Gaffney, P., & Ondrey, F. G. (2010). Inhibitor of differentiation 1 contributes to head and neck squamous cell carcinoma survival via the NF-kappaB/survivin and phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *16*(1), 77–87. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2362>
- Linger, R. M. A., Lee-Sherick, A. B., DeRyckere, D., Cohen, R. A., Jacobsen, K. M., McGranahan, A., Brandão, L. N., Wings, A., Sawczyn, K. K., Liang, X., Keating, A. K., Tan, A. C., Earp, H. S., & Graham, D. K. (2013). Mer receptor tyrosine kinase is a therapeutic target in pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *122*(9), 1599–1609. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-478156>
- Liu, Z., Chen, O., Wall, J. B. J., Zheng, M., Zhou, Y., Wang, L., Ruth Vaseghi, H., Qian, L., & Liu, J. (2017). Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02460-2>
- Lu, S. X., & Abdel-Wahab, O. (2016). Genetic drivers of vulnerability and resistance in relapsed acute lymphoblastic leukemia: Table 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(40), 11071–11073. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613836113>
- Lyu, C., Shen, J., Wang, R., Gu, H., Zhang, J., Xue, F., Liu, X., Liu, W., Fu, R., Zhang, L., Li, H., Zhang, X., Cheng, T., Yang, R., & Zhang, L. (2018). Targeted genome engineering in human induced pluripotent stem cells from patients with hemophilia B using the CRISPR-Cas9 system. *Stem Cell Research & Therapy*, *9*(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0839-8>
- Maeder, M. L., & Gersbach, C. A. (2016). Genome-editing technologies for gene and cell therapy.

- Molecular Therapy*, 24(3), 430–446. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.10>
- Mailliot, J., & Martin, F. (2018). Viral internal ribosomal entry sites: four classes for one goal. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 9(2). <https://doi.org/10.1002/wrna.1458>
- Malard, F., & Mohty, M. (2020). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 395(10230), 1146–1162. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33018-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1)
- Matsuo, Y., & Drexler, H. G. (2004). Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 24(9), 1554. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(88\)90405-1](https://doi.org/10.1016/0277-5379(88)90405-1)
- May, A. M., Frey, A. V., Bogatyreva, L., Benkisser-Petersen, M., Hauschke, D., Lübbert, M., Wäsch, R., Werner, M., Hasskarl, J., & Lassmann, S. (2014). ID2 and ID3 protein expression mirrors granulopoietic maturation and discriminates between acute leukemia subtypes. *Histochemistry and Cell Biology*, 141(4), 431–440. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1169-7>
- Moon, S. Bin, Kim, D. Y., Ko, J. H., & Kim, Y. S. (2019). Recent advances in the CRISPR genome editing tool set. *Experimental and Molecular Medicine*, 51(11). <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0339-7>
- Morita, D., Nishio, N., Saito, S., Tanaka, M., Kawashima, N., Okuno, Y., Suzuki, S., Matsuda, K., Maeda, Y., Wilson, M. H., Dotti, G., Rooney, C. M., Takahashi, Y., & Nakazawa, Y. (2018). Enhanced Expression of Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor in piggyBac Transposon-Engineered T Cells. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 8(March), 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.12.003>
- Mowery, C. T., Reyes, J. M., Cabal-Hierro, L., Higby, K. J., Karlin, K. L., Wang, J. H., Kimmerling, R. J., Cejas, P., Lim, K., Li, H., Furusawa, T., Long, H. W., Pellman, D.,

- Chapuy, B., Bustin, M., Manalis, S. R., Westbrook, T. F., Lin, C. Y., & Lane, A. A. (2018). Trisomy of a Down Syndrome Critical Region Globally Amplifies Transcription via HMGN1 Overexpression. *Cell Reports*, 25(7), 1898-1911.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.061>
- Mrózek, K., Harper, D. P., & Aplan, P. D. (2009). Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 23(5), 991–1010. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.07.001>
- Mullighan, C. G. (2012). Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(10), 3407–3415. <https://doi.org/10.1172/JCI61203>
- Ni, J., Wangenstein, K. J., Nelsen, D., Balciunas, D., Skuster, K. J., Urban, M. D., & Ekker, S. C. (2016). Active recombinant Tol2 transposase for gene transfer and gene discovery applications. *Mobile DNA*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13100-016-0062-z>
- O'Brien, C. A., Kreso, A., Ryan, P., Hermans, K. G., Gibson, L., Wang, Y., Tsatsanis, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2012). ID1 and ID3 Regulate the Self-Renewal Capacity of Human Colon Cancer-Initiating Cells through p21. *Cancer Cell*, 21(6), 777–792. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.036>
- Oceguera-Yanez, F., Kim, S. Il, Matsumoto, T., Tan, G. W., Xiang, L., Hatani, T., Kondo, T., Ikeya, M., Yoshida, Y., Inoue, H., & Woltjen, K. (2016). Engineering the AAVS1 locus for consistent and scalable transgene expression in human iPSCs and their differentiated derivatives. *Methods*, 101, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.12.012>
- Ono, T., Nishijima, H., Adachi, N., Iizumi, S., Morohoshi, A., Koyama, H., & Shibahara, K. (2009). Generation of tetracycline-inducible conditional gene knockout cells in a human Nalm-6 cell line. *Journal of Biotechnology*, 141(1–2), 1–7.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.12.010>

Osborn, M. J., Belanto, J. J., Tolar, J., & Voytas, D. F. (2016). Gene editing and its application for hematological diseases. *International Journal of Hematology*, *104*(1), 18–28. <https://doi.org/10.1007/s12185-016-2017-z>

Oshima, K., Khiabani, H., da Silva-Almeida, A. C., Tzoneva, G., Abate, F., Ambesi-Impiombato, A., Sanchez-Martin, M., Carpenter, Z., Penson, A., Perez-Garcia, A., Eckert, C., Nicolas, C., Balbin, M., Sulis, M. L., Kato, M., Koh, K., Paganin, M., Basso, G., Gastier-Foster, J. M., ... Ferrando, A. A. (2016). Mutational landscape, clonal evolution patterns, and role of RAS mutations in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(40), 11306–11311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608420113>

Page, A., Fusil, F., & Cosset, F.-L. (2020). Toward Tightly Tuned Gene Expression Following Lentiviral Vector Transduction. *Viruses*, *12*(12). <https://doi.org/10.3390/v12121427>

Paul, S., Kantarjian, H., & Jabbour, E. J. (2016). Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clinic Proceedings*, *91*(11), 1645–1666. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.010>

Pollock, B. H., DeBaun, M. R., Camitta, B. M., Shuster, J. J., Ravindranath, Y., Pullen, D. J., Land, V. J., Mahoney, D. H., Lauer, S. J., & Murphy, S. B. (2000). Racial differences in the survival of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: A Pediatric Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, *18*(4), 813–823.

Przybyła, T., Sakowicz-Burkiewicz, M., Maciejewska, I., Bielarczyk, H., & Pawełczyk, T. (2017). Suppression of ID1 expression in colon cancer cells increases sensitivity to 5-fluorouracil. *Acta Biochimica Polonica*, *64*(2), 315–322. [https://doi.org/10.18388/abp.2016\\_1421](https://doi.org/10.18388/abp.2016_1421)

Pullarkat, V., Forman, S. J., Slovak, M. L., Appelbaum, F. R., & Kopecky, K. J. (2008). Impact of cytogenetics on the outcome of adult acute lymphoblastic leukemia: results of Southwest

- Oncology Group 9400 study. *Blood*, *111*(5), 2563–2572. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-116186>
- Qin, J. Y., Zhang, L., Clift, K. L., Hular, I., Xiang, A. P., Ren, B. Z., & Lahn, B. T. (2010). Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS ONE*, *5*(5), 3–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010611>
- Roschger, C., & Cabrele, C. (2017). The Id-protein family in developmental and cancer-associated pathways Fritz Aberger. *Cell Communication and Signaling*, *15*(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0161-y>
- Sachindra, Larribère, L., Novak, D., Wu, H., Hüser, L., Granados, K., Orouji, E., & Utikal, J. (2017). New role of ID3 in melanoma adaptive drug-resistance. *Oncotarget*, *8*(66), 110166–110175. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22698>
- Shaimardanova, A. A., Chulpanova, D. S., Kitaeva, K. V., Abdrakhmanova, I. I., Chernov, V. M., Rutland, C. S., Rizvanov, A. A., & Solovyeva, V. V. (2019). Production and application of multicistronic constructs for various human disease therapies. *Pharmaceutics*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110580>
- Sharma, P., Patel, D., & Chaudhary, J. (2012). Id1 and Id3 expression is associated with increasing grade of prostate cancer: Id3 preferentially regulates CDKN1B. *Cancer Medicine*, *1*(2), 187–197. <https://doi.org/10.1002/cam4.19>
- Slone, W. L., Moses, B. S., Hare, I., Evans, R., Piktel, D., & Gibson, L. F. (2016). BCL6 modulation of acute lymphoblastic leukemia response to chemotherapy. *Oncotarget*, *7*(17). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8273>
- Song, C., Pan, X., Ge, Z., Gowda, C., Ding, Y., Li, H., Li, Z., Yochum, G., Muschen, M., Li, Q., Payne, K. J., & Dovat, S. (2016). Epigenetic regulation of gene expression by Ikaros, HDAC1

- and Casein Kinase II in leukemia. *Leukemia*, 30(6), 1436–1440.  
<https://doi.org/10.1038/leu.2015.331>
- Szymczak-Workman, A. L., Vignali, K. M., & Vignali, D. A. A. (2012). Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. *Cold Spring Harbor Protocols*, 7(2), 199–204.  
<https://doi.org/10.1101/pdb.ip067876>
- Szymczak, A. L., Workman, C. J., Wang, Y., Vignali, K. M., Dilioglou, S., Vanin, E. F., & Vignali, D. A. A. (2004). Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single “self-cleaving” 2A peptide-based retroviral vector. *Nature Biotechnology*, 22(5), 589–594.  
<https://doi.org/10.1038/nbt957>
- Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, 7(6), e577. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>
- Tsukahara, T., Iwase, N., Kawakami, K., Iwasaki, M., Yamamoto, C., Ohmine, K., Uchibori, R., Teruya, T., Ido, H., Saga, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Nakamura, M., Brentjens, R., & Ozawa, K. (2015). The Tol2 transposon system mediates the genetic engineering of T-cells with CD19-specific chimeric antigen receptors for B-cell malignancies. *Gene Therapy*, 22(2), 209–215. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1038/gt.2014.104>
- Wang, L., Man, N., Sun, X. J., Tan, Y., Cao, M. G., Liu, F., Hatlen, M., Xu, H., Huang, G., Mattlin, M., Mehta, A., Rampersaud, E., Benezra, R., & Nimer, S. D. (2015). Regulation of AKT signaling by Id1 controls t(8;21) leukemia initiation and progression. *Blood*, 126(5), 640–650.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-635532>
- Wang, Xiaoyin, Xu, Z., Tian, Z., Zhang, X., Xu, D., Li, Q., Zhang, J., & Wang, T. (2017). The EF-1 $\alpha$  promoter maintains high-level transgene expression from episomal vectors in transfected CHO-K1 cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(11), 3044–3054.

<https://doi.org/10.1111/jcmm.13216>

- Wang, Xuan, Le, N., Denoth-Lippuner, A., Barral, Y., & Kroschewski, R. (2016). Asymmetric partitioning of transfected DNA during mammalian cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(26), 7177–7182. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606091113>
- Weiler, S., Ademokun, J. A., & Norton, J. D. (2015). ID helix-loop-helix proteins as determinants of cell survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Molecular Cancer*, *14*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12943-014-0286-9>
- Wilding, J. L., & Bodmer, W. F. (2014). Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer Research*, *74*(9), 2377–2384. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2971>
- Xia, W., Bringmann, P., McClary, J., Jones, P. P., Manzana, W., Zhu, Y., Wang, S., Liu, Y., Harvey, S., Madlansacay, M. R., McLean, K., Rosser, M. P., MacRobbie, J., Olsen, C. L., & Cobb, R. R. (2006). High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. *Protein Expression and Purification*, *45*(1), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.07.008>
- Xu, X., & Qi, L. S. (2019). A CRISPR–dCas Toolbox for Genetic Engineering and Synthetic Biology. *Journal of Molecular Biology*, *431*(1), 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.037>
- Yang, J. J., Cheng, C., Devidas, M., Cao, X., Fan, Y., Campana, D., Yang, W., Neale, G., Cox, N. J., Scheet, P., Borowitz, M. J., Winick, N. J., Martin, P. L., Willman, C. L., Bowman, W. P., Camitta, B. M., Carroll, A., Reaman, G. H., Carroll, W. L., ... Relling, M. V. (2011). Ancestry and pharmacogenomics of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, *43*(3), 237–241. <https://doi.org/10.1038/ng.763>

- Yin, X., Tang, B., Li, J. H., Wang, Y., Zhang, L., Xie, X. Y., Zhang, B. H., Qiu, S. J., Wu, W. Z., & Ren, Z. G. (2017). ID1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation and confers chemoresistance to oxaliplatin by activating pentose phosphate pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *36*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0637-7>
- Young, C. L., Britton, Z. T., & Robinson, A. S. (2012). Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*, *7*(5), 620–634. <https://doi.org/10.1002/biot.201100155>
- Yu, H., Yue, X., Zhao, Y., Li, X., Wu, L., Zhang, C., Liu, Z., Lin, K., Xu-Monette, Z. Y., Young, K. H., Liu, J., Shen, Z., Feng, Z., & Hu, W. (2014). LIF negatively regulates tumour-suppressor p53 through Stat3/ID1/MDM2 in colorectal cancers. *Nature Communications*, *5*, 5218. <https://doi.org/10.1038/ncomms6218>
- Yu, X., Geng, W., Zhao, H., Wang, G., Zhao, Y., Zhu, Z., & Geng, X. (2017). Using a Commonly Down-Regulated Cytomegalovirus (CMV) Promoter for High-Level Expression of Ectopic Gene in a Human B Lymphoma Cell Line. *Medical Science Monitor*, *23*, 5943–5950. <https://doi.org/10.12659/msm.906240>
- Zhang, Xiaohui, Rastogi, P., Shah, B., & Zhang, L. (2017). B lymphoblastic leukemia/lymphoma: new insights into genetics, molecular aberrations, subclassification and targeted therapy. *Oncotarget*, *8*(39), 66728–66741. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19271>
- Zhang, Xiaomeng, Ling, M.-T., Wang, Q., Lau, C.-K., Leung, S. C. L., Lee, T. K., Cheung, A. L. M., Wong, Y.-C., & Wang, X. (2007). Identification of a novel inhibitor of differentiation-1 (ID-1) binding partner, caveolin-1, and its role in epithelial-mesenchymal transition and resistance to apoptosis in prostate cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(46),

33284–33294. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705089200>

Zhang, Xiaomeng, Ling, M.-T., Wang, X., & Wong, Y. C. (2006). Inactivation of Id-1 in prostate cancer cells: A potential therapeutic target in inducing chemosensitization to taxol through activation of JNK pathway. *International Journal of Cancer*, *118*(8), 2072–2081. <https://doi.org/10.1002/ijc.21592>

Zhang, Z., Qin, K., Zhang, W., Yang, B., Zhao, C., Zhang, X., Zhang, F., Zhao, L., & Shan, B. (2019). Postoperative recurrence of epithelial ovarian cancer patients and chemoresistance related protein analyses. *Journal of Ovarian Research*, *12*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0499-z>

Zhao, S., Jiang, E., Yu, Z., Chen, S., Gu, Y., Shangguan, A. J., Lv, T., & Luo, L. (2016). PiggyBac transposon vectors: The tools of the human gene encoding. *Translational Lung Cancer Research*, *5*(1), 120–125. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.05>

Zhao, Y., Luo, A., Li, S., Zhang, W., Chen, H., Li, Y., Ding, F., Huang, F., & Liu, Z. (2016). Inhibitor of Differentiation/DNA Binding 1 (ID1) Inhibits Etoposide-induced Apoptosis in a c-Jun/c-Fos-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(13), 6831–6842. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.704361>

Zhou, X., Vink, M., Klaver, B., Berkhout, B., & Das, A. T. (2006). Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene Therapy*, *13*(19), 1382–1390. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302780>

Zúñiga, R. A., Gutiérrez-González, M., Collazo, N., Sotelo, P. H., Ribeiro, C. H., Altamirano, C., Lorenzo, C., Aguillón, J. C., & Molina, M. C. (2019). Development of a new promoter to avoid the silencing of genes in the production of recombinant antibodies in chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Engineering*, *13*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13036->

019-0187-y