

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL ONCOGÉN  
*Evi1* EN UN MODELO MURINO DE LMA-*Evi1*<sup>+</sup>**

**MARÍA FERNANDA SILVA LARA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA**

**2012**

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL ONCOGÉN  
*Evi1* EN UN MODELO MURINO DE LMA-*Evi1*<sup>+</sup>**

**MARÍA FERNANDA SILVA LARA**

**Trabajo de Grado para optar al Título:  
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Director:**

**H José Arteaga N**

**Co-Directora:**

**María Eugenia Cardona**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA**

**2012**

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	14
1. ESTADO DEL ARTE	17
1.1 EVI1 EN CANCER	17
1.2 LMA Y EVI1.	18
1.3 EL GEN <i>EVI1</i> .	19
1.4 PROTEÍNA EVI1	20
1.5 PATRÓN DE EXPRESIÓN DE <i>EVI1</i> .	21
1.6 FUNCIONES DE LA ONCOPROTEÍNA EVI1 EN CONDICIONES NORMALES Y TUMORALES	22
1.6.1 EVI1 COMO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN.	23
1.6.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DESCRITAS PARA EVI1.	23
1.6.3 EVI1 ALTERA REGULADORES EPIGENÉTICOS.	30
1.6.4 EVI1 EN LA REGULACION DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS.	31
1.7 ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS DA-3	32
1.8 ARN INTERFERENTE	37
1.8.1 TECNOLOGÍA DEL ARNi	40
2. OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GENERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	44
4. MATERIALES Y MÉTODOS	46
4.1 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR REPORTERO pd2EGFP-N3-Evi1	46
4.2 SELECCIÓN DE SECUENCIAS siARN, DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PARA LA EXPRESIÓN DE ARNi	49
4.3 CULTIVO CELULAR	51
4.4 TRANSFECCIONES	51

4.5 MICROSCOPIA	53
4.6 CITOMETRIA DE FLUJO	53
4.7 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS	53
4.8 PCR EN TIEMPO REAL	55
4.9 CURVA DE PROLIFERACIÓN CELULAR	57
4.10 TRATAMIENTO CON CLOROFARABINA	57
5. RESULTADOS	59
5.1 EL VECTOR pd2EGFP-N3-Evi1 EXPRESA NIVELES SUFICIENTES DE LA PROTEINA FUSIÓN EVI1-d2EGFP COMO PARA SER UTILIZADO COMO VECTOR REPORTERO	59
5.2 LOS TRANSCRIPTOS DEL GEN <i>Evi-1</i> MURINO PRESENTAN UN BUEN NUMERO DE SECUENCIAS CON CARACTERISTICAS DE BLANCOS APROPIADOS PARA SU SILENCIAMIENTO MEDIANTE ARNi.	61
5.3 DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE DIVERSAS SECUENCIAS DE siARN CONTRA <i>Evi1</i> SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA DE FUSIÓN EVI1-d2EGFP	63
5.4 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>Evi1</i> EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS DA-3	66
5.5 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO SINÉRGICO EJERCIDO POR LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>Evi1</i> Y EL TRATAMIENTO CON CLOROFARABINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD DE LINEAS CÉLULARES DERIVADAS DE CELULAS DA-3.	73
6. DISCUSIONES.	75
7. CONCLUSIONES.	84
8. PERSPECTIVAS	86
9. BIBLIOGRAFÍA	88

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Genes regulados transcripcionalmente por EVI1.	25
Tabla 2. Iniciadores utilizados para la amplificación de Evi1	46
Tabla 3. <i>Características de las secuencias de siARN contra Evi1 obtenidas con el programa siDirect. Las secuencias resaltadas en azul reúnen características ideales y son específicas contra Evi1 de ratón, en verde se resaltan las secuencias con características ideales y que comparten identidad en genes murino y humano</i>	62
Tabla 4. Oligos diseñados a partir de las secuencias de ARNi contra <i>Evi1</i> seleccionadas	63
Tabla 5. Líneas celulares generadas de las células DA-3 dep y DA-3 ind mediante modificación con diferentes plásmidos que portan secuencias codificadoras de shRNA contra Evi1.	66

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Características generales del sistema pSuper.retro.puro stuffer (pRSP).	50
Figura 2. Características generales del constructo pd2EGFP-N3-Evi1. pCMV:	59
Figura 3. Expresión y localización de la proteína reportera Evi1-d2EGFP	60
Figura 4. Niveles de expresión de la proteína de fusión Evi1-d2EGFP en células 293T cotransfectadas con el plásmido reportero pd2EGFP-N3-Evi1 y cada uno de los vectores que expresan diferentes siARN contra Evi1.	64
Figura 5. Niveles de la proteína Evi1-d2EGFP en extractos de proteínas totales obtenidos de células 293T cotransfectadas con el plásmido reportero pd2EGFP-N3-Evi1 y cada uno de los vectores que expresan diferentes siARN contra Evi1.	65
Figura 6. Aislamiento de ARN total a partir de cultivos de líneas celulares generadas de las células DA-3 dep y DA-3 ind mediante modificación con diferentes plásmidos que portan secuencias codificadoras de shRNA contra Evi1.	67
Figura 7. Análisis de datos de PCR en tiempo real. Línea basal (en verde) corregida para las amplificaciones de los genes Evi1 (A) y GAPDH (B). C) Determinaciones de eficiencia (E) y ciclo umbral (Ct) para las diferentes replicas con las respectivas medias ( $\bar{x}$ ) y desviaciones estándares (S) para cada muestra.	68
Figura 8. Niveles de expresión relativa del oncogén Evi1 en relación al gen GAPDH en: A. líneas celulares DA-3 dep sin modificar (dep) y modificadas establemente con los vectores pRSP (pRSP), pRSP/Evi1sh5 (Evi1sh5) y pRSP/Evi1sh7 (Evi1sh7) y B. líneas DA-3 ind sin modificar (dep) y	

modificadas establemente con pRSP (pRSP), pRSP/Evi1sh5 (Evi1sh5) y pRSP/Evi1sh7 (Evi1sh7).	69
Figura 9. Patrones de proliferación de líneas celulares DA-3 dep y DA-3 ind modificadas establemente con los vectores pRSP (pRSP), pRSP/Evi1sh5 (Evi1sh5) y pRSP/Evi1sh7 (Evi1sh7).	71
Figura 10. Patrones de proliferación de líneas celulares DA-3 ind y DA-3 ind modificadas establemente con los vectores pRSP (pRSP), pRSP/Evi1sh5 (Evi1sh5) y pRSP/Evi1sh7 (Evi1sh7).	72
Figura 11. Efecto sinérgico sobre la inhibición de la proliferación de las células DA-3 dep ejercido por shRNA contra Evi1 y el tratamiento con clorofarabina.	74
Figura 12. Efecto sinérgico sobre la inhibición de la proliferación de las células DA-3 ind ejercido por shRNA contra Evi1 y el tratamiento con clorofarabina.	74

## LISTA DE GRAFICOS

	<b>Pág.</b>
Gráfico 1. EVI1 estimula la actividad de AP-1. EVI1 activa la transcripción de FOS. FOS se asocia con JUN para formar un heterodímero y estimular la transcripción mediada por TRE.	26
Gráfico 2. EVI1 reprime la señal inhibitoria del crecimiento mediada por TGFB. A. TGFB se une al complejo receptor del TGFB y activa la fosforilación de la Smad3.	27
Gráfico 3. EVI1 inhibe la actividad de JNK.	28
Gráfico 4. Procesamiento de miARN y shRNA en mamíferos	39

## RESUMEN

**TITULO: EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL ONCOGÉN *Evi1* EN UN MODELO MURINO DE LMA-*Evi1*<sup>+</sup>**

**AUTORES:** SILVA-LARA, María F.; CARDONA María; ARTEAGA, H. José.\*\*

**PALABRAS CLAVES:** EVI1, LMA, ARNi, DA-3

La sobre-expresión de *EVI1* es un indicador de mal pronóstico en leucemia mieloide aguda (LMA-*EVI1*<sup>+</sup>). *EVI1* es un factor de transcripción, esencial para el mantenimiento de las células madres hematopoyéticas y está involucrado en funciones leucogénicas. Se ha sugerido que *EVI1* es un factor esencial, pero no suficiente para el desarrollo de LMA-*Evi1*<sup>+</sup>. Recientemente, hemos desarrollado un modelo murino de LMA-*Evi1*<sup>+</sup>, partiendo de una línea celular no trasplantable, dependiente de GM-CSF (DA-3 dep), con sobre-expresión de *Evi1* como única lesión génica preleucémica. Esta línea es expandible en animales en condiciones de inflamación y la generación de una línea descendente independiente de factores de crecimiento (DA-3 ind) con fenotipo tumoral. Utilizando vectores de expresión constitutiva portadores de shRNA con secuencias de ARNi contra *Evi1*, de una eficiencia inhibitoria superior al 90%, evaluada en experimentos de cotransfección con plásmidos portadores del gen de fusión *Evi1-d2GFP*, hemos generado líneas celulares derivadas de las células DA-3 dep y DA-3 ind que expresan establemente ARNi contra *Evi1*. Estas líneas mostraron niveles de *Evi1* de menos del 50% y patrones de proliferación no muy diferentes a las células parentales pero con sensibilidad al efecto citotóxico de clorofarabina significativamente incrementada. Estos datos en su conjunto, sugieren que en este modelo la inhibición de *Evi1* niveles menores al 50% no afectan los mecanismos de proliferación, pero si incrementan la sensibilidad a la apoptosis celular. La recuperación de líneas modificadas establemente con secuencias que expresan siARN de alta eficiencia contra *Evi1* y con niveles de expresión cercanos al 50% pudiera indicar que, en este tipo de células, niveles inferiores de *Evi1* son letales. En resumen, estos resultados sugieren que *Evi1* pudiera ser la causa de la resistencia al tratamiento de la LMA-*EVI1*<sup>+</sup> y señalan a este oncogén como un posible blanco terapéutico.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Universidad Industrial de Santander. Facultad de Salud. Director: H. José Arteaga N. Co-Directora: María Eugenia Cardona.

## ABSTRACT

**TITLE:** IN VITRO EVALUATION OF THE *Evi1* INHIBITION EFFECT IN A MODEL OF MURINE *Evi1*<sup>+</sup>AML.\*

**AUTHORS\*\*:** SILVA-LARA, María F.; CARDONA María; ARTEAGA, H. José.\*\*

**KEYWORDS:** EVI1, AML, RNAi, DA-3

Overexpression of EVI1 oncogene is associated with high resistance to treatment and is an indicator of poor prognosis in acute myeloid leukemia (AML-*EVI1*<sup>+</sup>). *Evi1* is a transcription factor essential for the maintenance of pluripotent hematopoietic stem cells and is involved in potentially tumorigenic functions. It has been suggested that *Evi1* is essential but not sufficient for the development of *Evi1*<sup>+</sup>-AML. Recently, we have developed a mouse model of *Evi1*<sup>+</sup>-AML from a non-transplantable growth factor-dependent cell line (DA-3 dep), with overexpression of *Evi1* gene as a single preleukemic lesion. This line was allowed to expand in animals suffering of chronic inflammatory conditions from which it was possible to isolate growth factor independent cell lines (DA-3 ind) with a fully leukemic phenotype. Using vectors for constitutive expression of shRNAs carrying RNAi sequences against *Evi1* with an inhibitory efficiency of more than 90%, as assessed in cotransfection experiments with plasmids carrying the fusion gene *d2EGFP-Evi1*, we generated cell lines derived from cells DA-3 dep and DA-3 ind stably expressing RNAi against *Evi1*. These cell lines showed *Evi1* levels of less than 50%, but not different proliferation patterns, with respect to the parental cells. However, the new cell lines had a significantly increased sensitivity to the cytotoxic effect of clofarabine. These data suggest that, in this model, inhibition *Evi1* expression to levels close to 50% did not affect the mechanisms of cell proliferation, but increase the sensitivity to apoptosis. The recovery of cell lines stably expressing highly efficient siRNA sequences against *Evi1* and with levels of expression of this oncogene of around 50% could indicate that, in this type of cells, lower levels of *Evi1* are lethal. In summary, these results suggest that EVI1 could be the cause of resistance to the treatment of AML-*EVI1*<sup>+</sup> and signal this oncogene as a possible therapeutic target.

---

\* Draft grade

\*\* Industrial University of Santander. Faculty of Health. Director: H. Jose Arteaga N. Co-Director: Maria Eugenia Cardona.

## INTRODUCCIÓN

La terapia genética es aún un área de la medicina experimental, con gran potencial, que ofrece muchas opciones de posibles aproximaciones terapéuticas para ser evaluadas en estudios *in vitro* y en modelos animales. Un campo de gran interés en esta área es la terapia genética antitumoral. La comprensión de la biología celular de las enfermedades tumorales asociadas a la sobre-expresión de oncogenes o a la deficiencia en la expresión de genes reguladores ha permitido proponer diversos modelos de terapia genética basados en el silenciamiento o la restitución de la función de genes específicos según sea el caso.

Recientemente, el oncogén *EVI1* (del inglés *ecotropic viral integration site*) ha llegado a adquirir gran importancia en leucemia mieloide aguda (LMA) humana. Este oncogén se encuentra sobre-expresado en aproximadamente el 10% de los pacientes con LMA (LMA-*EVI1*<sup>+</sup>). La oncoproteína *EVI1* es de muy importante valor pronóstico debido a que el 100% de los pacientes no responden eficientemente a la fase de inducción del tratamiento antileucémico y su porcentaje de supervivencia, a los 5 años de iniciado el tratamiento, es cercano al 0%.

Las funciones atribuidas a *EVI1* en diversas vías de señalización y, en su conjunto, la información obtenida hasta ahora a partir de observaciones clínicas y de diversos estudios en modelos *in vivo* e *in vitro*, sugieren que *EVI1* podría tener una participación protagónica en el inicio y desarrollo de la LMA-*EVI1*<sup>+</sup>. La expresión de *EVI1* es esencial para la autorrenovación de células madres hematopoyéticas y bloquea su proceso de diferenciación. *EVI1* es una oncoproteína que confiere incremento de la proliferación, supervivencia y resistencia a la apoptosis celular. Adicionalmente *EVI1* se asocia con la regulación de los mecanismos de remodelación de la cromatina y de varios procesos epigenéticos. Pese a que todas estas evidencias señalan a *EVI1* como a un oncogén con una función fundamental en los procesos de leucogénesis, su

función y mecanismos de acción exactos en los procesos de transformación tumoral aún no están bien estudiados.

Las patologías tumorales son difíciles de modelar en animales debido a que se requieren varias alteraciones genéticas para conferir un fenotipo tumoral. Sin embargo, algunos modelos han sido desarrollados y validados satisfactoriamente como prototipos útiles para hacer inferencias de los mecanismos moleculares asociados al fenotipo tumoral. Muchos de estos mecanismos pueden ser extrapolables al modelo humano y pueden permitir la identificación de blancos terapéuticos y marcadores diagnósticos y de pronóstico.

Las células DA-3 son una línea murina promielocítica, con una única alteración genética identificada y asociada a la sobre-expresión de *Evi1*. Estas células son dependientes de GM-CSF para su crecimiento y no son trasplantables en ratones singénicos. Sin embargo, recientemente, nosotros hemos demostrado que las células DA-3 pueden causar un cuadro semejante a LMA-*Evi1*<sup>+</sup> en ratones que tienen altos niveles de GM-CSF, inducidos por un proceso de inflamación crónica. Adicionalmente, de estos ratones, fue posible recuperar células DA-3 independientes de GM-CSF y que presentaron un fenotipo de transformación tumoral completo, lo cual les permitió ser trasplantadas en ratones singénicos normales.

De las observaciones anteriores nosotros postulamos que la sobre-expresión de *Evi1* es una lesión genética preleucémica, la cual no es suficiente, pero sí determinante para conferir el fenotipo de transformación tumoral completa. Adicionalmente esta observación permite preguntarse si en el humano la expresión aberrante de *EVI1* está implicada en el origen de la LMA-*EVI1*<sup>+</sup> y si esta oncoproteína pudiera estar relacionada con la alta resistencia al tratamiento observada en los pacientes que padecen este tipo de leucemia.

Nuestro modelo de LMA-*Evi1*<sup>+</sup> es el primer modelo murino reproducible de LMA asociada a la sobre-expresión de *Evi1* y creemos que puede ser útil, entre otras cosas, para explorar diversos tipos de nuevas estrategias terapéuticas y, en un futuro, para adelantar estudios tendientes a la comprensión de la función de *Evi1* en el inicio y desarrollo de la LMA-*Evi1*<sup>+</sup>.

En este trabajo planteamos que el estudio de los efectos de la inhibición de *Evi1* mediante la tecnología del ARN interferente (ARNi) en una línea celular mielóide murina parental preleucémica *Evi1*<sup>+</sup>, dependiente de GM-CSF (DA-3 dep), y su descendiente, independiente de GM-CSF, con fenotipo leucémico completo (DA-3 ind), permitiría determinar la importancia de *Evi1* para la supervivencia y proliferación celular y evaluar la potencialidad de este oncogén como blanco un terapéutico.

## 1. ESTADO DEL ARTE

### 1.1 EVI1 EN CANCER

Varias evidencias sugieren que la desregulación de la expresión del oncogén *EVI1* podría tener una participación protagónica en el inicio y progresión de tumores tanto sólidos como hematológicos.

En cáncer de cerviz<sup>1</sup>, próstata<sup>2</sup>, pulmón<sup>1</sup>, cabeza y cuello<sup>3</sup> se han identificado algunos casos con alteraciones en la región cromosómica que contiene a *EVI1*. Sin embargo, la relación entre este tipo de alteraciones cromosómicas y los niveles de expresión de *EVI1* no ha sido sistemáticamente estudiada.

En cáncer colorrectal, Deng y cols. encontraron sobre-expresión de *EVI1* en el 53% de las muestras estudiadas<sup>4</sup>. En estudios de cáncer de ovario también se ha demostrado sobre-expresión de *EVI1* en un número considerable de muestras analizadas<sup>5,6,7</sup>. En algunos de estos estudios, la sobre-expresión del oncogén se observó, en la mayoría de los casos, como un evento independiente a la presencia de rearrreglos cromosómicos que involucran la región 3q26, región cromosómica donde se encuentra ubicado *EVI1*<sup>7</sup>. Sin embargo, Osterberg y cols. detectaron asociaciones cromosómicas alrededor de la región 3q26 asociadas con resistencia a la quimioterapia y frecuentemente con sobre-expresión *EVI1*<sup>6</sup>.

De otro lado, la relación entre la activación de *EVI1* y diversos tipos de leucemia con otros tipos de alteraciones mieloproliferativas ha sido ampliamente estudiada. En estos casos las alteraciones en la expresión de este oncogén pueden presentarse con o sin rearrreglos cromosómicos que impliquen su locus. Se han reportado casos de expresión inapropiada de *EVI1* en pacientes con leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ)<sup>8</sup> y leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-

B)<sup>9</sup>. En leucemia mieloide crónica (LMC) los pacientes *EVI1*<sup>+</sup> presentan menor supervivencia<sup>10</sup> y algunos estudios sugieren un papel determinante de la activación de *EVI1* en la progresión de la LMC hacia crisis blástica<sup>11-13</sup>.

Finalmente, en LMA, la patología principalmente relacionada con *EVI1*, la sobre-expresión de este oncogen se observa aproximadamente en el 10% de los casos. Pese al pequeño porcentaje de incidencia de LMA-*EVI1*<sup>+</sup>, el valor pronóstico de esta oncoproteína es muy importante debido a que este tipo de pacientes no responden eficientemente a ningún tratamiento y tienen un porcentaje de supervivencia cercano al 0% luego de 5 años iniciado el tratamiento<sup>14-17</sup>. Cabe mencionar que *EVI1* se encuentra también sobre-expresado en el 25% de los pacientes con síndrome mielodisplásicos (SMD), los cuales a su vez, parecen tener mayor riesgo de desarrollar LMA<sup>18-20</sup>.

## 1.2 LMA Y *EVI1*.

La LMA se produce por una expansión clonal de células neoplásicas de la línea mieloide, cuyo origen radica en la transformación maligna de precursores hematopoyéticos tempranos y se define según la OMS como la presencia de un mínimo de 20% de blastos en médula ósea<sup>21</sup>.

El pronóstico de los pacientes con LMA ha mejorado con el tratamiento farmacológico y el 65% de los infantes y adolescentes afectados presentan larga supervivencia en la actualidad<sup>22,23</sup>. Sin embargo, en todos los pacientes con LMA-*EVI1*<sup>+</sup> la respuesta al tratamiento es prácticamente negativa<sup>24</sup>.

La expresión inapropiada de *EVI1* en células precursoras de la línea mieloide ha sido implicada en el desarrollo o la progresión de LMA de alto riesgo. En LMA con anormalidades cromosómicas tipo inversiones o translocaciones que implican la región 3q26, la expresión aberrante de *EVI1* se cree que es causada por que existe un punto de quiebre donde suceden estos rearrreglos, el cual esta en o es

cercano al locus *EVI1*. Sin embargo se han encontrado pacientes con LMA-*EVI1*<sup>+</sup> sin rearrreglos cromosómicos en este locus. De todas maneras en ambos grupos de pacientes la respuesta al tratamiento es igualmente pobre<sup>25</sup>. De la misma manera, de las diferentes variantes generadas por el procesamiento alternativo de los transcritos de *EVI1*, con excepción de la variante *MDS1/EVI1*, todas se correlacionan con alta severidad de la enfermedad<sup>14</sup>.

### 1.3 EL GEN *EVI1*.

El gen *Evi1* fue identificado en ratones infectados con el Virus de la Leucemia Murina de Moloney (MoMLV). La inserción del genoma de este retrovirus se da preferencialmente en el locus de *Evi1* o en una región cercana e induce la sobreexpresión de este oncogén. Estos eventos generalmente se asocian a procesos de transformación de células de la línea mieloide y a la aparición de tumores de este linaje en los ratones infectados. De este tipo de tumores se pueden aislar *in vitro* líneas celulares, las cuales son generalmente dependientes para su crecimiento de interleuquina 3 (IL-3), G-CSF (del inglés, *granulocyte colony stimulating factor*) o GM-CSF (del inglés, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)<sup>26,27</sup>.

La secuencia de *EVI1* es altamente conservada y entre los genes humano y del ratón existe aproximadamente una homología del 94%<sup>28,29</sup>; el gen está localizado en la posición 3q26.2 y codifica para una proteína de 145 kDa. *EVI1* contiene 12 exones y sufre un proceso de escisión de intrones en forma alternativa entre los exones 1a y 1b<sup>29,30</sup>. Se han identificado al menos seis transcritos producto de las variantes alternativas de *EVI1* con diferente terminación en el extremo 5' (1a<sup>31</sup>, 1b<sup>31</sup>, 1c<sup>29</sup>, 1d<sup>32</sup>, 3L<sup>31</sup> y la *MDS1/EVI1*<sup>32</sup>). Las variantes 1a – 1d son producto de diferentes sitios de iniciación ubicados en el exón 1 que en todos los casos se unen usando el mismo sitio aceptor en el exón 2. En la variante 3L, los exones 1 y 2 de *EVI1* son remplazados por la secuencia genómica inmediatamente corriente arriba del exón 3. Para *MDS1/EVI1* los dos primeros exones de *MDS1* (del inglés,

*myelodysplasia syndrome 1*), un gen localizado arriba de *EVI1*, son unidos al exón 2 de *EVI1*. Una última variante descrita de *EVI1*<sup>29,33</sup>, la variante *EVI1*Δ324, es producida por una deleción de aproximadamente 972 nucleótidos (324 aminoácidos); dicha deleción elimina dos de los siete característicos motivos a manera de dedos de zinc que presenta la proteína *EVI1*.

#### 1.4 PROTEÍNA *EVI1*

Las distintas formas alternativas de la expresión del oncogén *EVI1* incluye al menos tres proteínas distintas: *EVI1*, *MDS1/EVI1* y *EVI1*Δ324. El principal producto, *EVI1*, es una proteína de 1051 aminoácidos con un peso molecular de 145 kDa<sup>29</sup>. *EVI1* también existe como una forma más larga, *MDS1/EVI1*; en adición a la secuencia entera de *EVI1*, esta variante contiene 188 aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal de la proteína, los cuales constituye un dominio denominado PR<sup>32</sup>. Algunas evidencias sugieren que el dominio PR le confiere a *MDS1/EVI1* la función de una proteína supresora de tumor, la cual regula la función oncogénica característica de la proteína *EVI1*. El dominio PR previene la oligomerización de *EVI1* y afecta de esta manera las funciones bioquímicas de la proteína<sup>34</sup>.

La proteína *EVI1* de 145 kDa se localiza en el núcleo<sup>35</sup>. La estructura de la proteína *EVI1*, con motivos a manera de dedos de zinc, le permite unirse al ADN para funcionar como factor de transcripción<sup>35</sup>. Los dedos de zinc reconocen una corta secuencia como resultado de la complementariedad entre la superficie de la proteína y la región apropiada de la doble banda de ADN. La proteína *EVI1* tiene dos dominios con series de 7 y 3 repeticiones de dedos de zinc tipo Cys2Hys2, localizados hacia los extremos amino y carboxilo-terminal, respectivamente<sup>26,28,35,36</sup>. Para obtener una alta afinidad con el sitio de unión específico se requieren varios dedos de zinc. El primer dominio se une a la secuencia consenso GA(C:T)AAGA(T:C)AAGATAA y el segundo a GAAGATGAG<sup>37</sup>. Solamente 4 de los 7 primeros dedos de zinc se unen

directamente al ADN, los demás asisten para lograr la unión completa al ADN<sup>38</sup>. Hacia el extremo carboxilo terminal, el dedo de zinc 9 es esencial para la unión de la proteína al ADN, mutaciones en la secuencia que codifica para este motivo previenen la unión completa ADN-EVI1. Es decir, ambos dominios son requeridos para la apropiada función de la proteína, sin embargo, el segundo dominio es mucho mas conservado, se une con mayor afinidad a la secuencia apropiada de ADN<sup>36</sup> y la actividad de la función de regulador de la transcripción de la oncoproteína depende de la unión de este dominio a su secuencia consenso de ADN<sup>39</sup>.

### **1.5 PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *EVI1*.**

El patrón de expresión normal de *Evi1* fue analizado inicialmente durante el desarrollo embrionario murino<sup>40</sup>. Durante esta fase, *Evi1* se expresa a niveles altos en el sistema urinario y conductos de Müller, pulmón y corazón. Adicionalmente, *Evi1* se detectó durante el desarrollo de las extremidades, en procesos de diferenciación hematopoyética y el desarrollo de ovocitos<sup>40,41</sup>. En tejidos de ratón adulto se han detectado altos niveles de Mds1/*Evi1* en riñón, pulmón, páncreas y ovario<sup>42</sup>; en otros tejidos, incluyendo músculo-esquelético, los niveles de *Evi1* disminuyen drásticamente.

Estudios en cuerpos embrionarios para diferenciar los niveles de expresión entre la proteína *Evi1* y la proteína Mds1/*Evi1*, mostraron que las dos formas de la proteína aparecen en diferentes tiempos durante la diferenciación de células madres embrionarias totipotenciales (ES). Mds1/*Evi1* se expresa a bajos niveles en células ES. En cambio, *Evi1* no aparece en células sin diferenciar sino durante el proceso de diferenciación<sup>43</sup>.

La mayoría de reportes indican que *EVI1* no es detectable ni en médula ósea ni en sangre normal<sup>13,18,20,37</sup>. Sin embargo, Privitera y cols. encontraron expresión de *EVI1* en médula ósea normal<sup>44</sup>. En células hematopoyéticas, la expresión de *EVI1*

es en un inicio a bajos niveles durante la diferenciación mieloide temprana, luego incrementa dramáticamente en el estado promielocítico para finalmente decrecer a niveles no detectables durante la diferenciación, inducida por G-CSF, de los precursores mieloides *CD34+*<sup>44,45</sup>.

Estudios de delección del gen han demostrado que la inapropiada expresión de *Evi1* impide finalizar la diferenciación en granulocitos, células eritroides y células progenitoras de médula osea<sup>46,47</sup>. En adultos *Evi1*, es esencial para el mantenimiento de las células madres hematopoyéticas (HSCs)<sup>48</sup>. Embriones *Evi1*<sup>-/-</sup> mueren a los 10 días con hipocelularidad, hemorragia y disrupción en el desarrollo del mesenquima paraxial. Además, se detectaron defectos en el corazón, los ganglios craneales y el sistema nervioso<sup>49</sup>.

El patrón de expresión de *EVI1* restringido espacial y temporalmente sugiere un rol esencial para *EVI1* en la organogénesis y morfogénesis así como en la proliferación y diferenciación hematopoyética.

## **1.6 FUNCIONES DE LA ONCOPROTEÍNA EVI1 EN CONDICIONES NORMALES Y TUMORALES**

En la actualidad, el interés de los investigadores por *EVI1* ha incrementado notablemente, numerosos estudios están enfocados a dilucidar no solo las funciones como factor de transcripción del oncogén *EVI1*, sino también, las vías de señalización en la cuales *EVI1* está implicado y los mecanismos por los cuales *EVI1* contribuye en los procesos de leucogénesis.

La proteína *EVI1* tiene la capacidad de contribuir a los procesos de leucogénesis alterando el normal funcionamiento de diferentes vías de señalización importantes para la célula. *EVI1* regula negativamente procesos de diferenciación, muerte

celular y arresto del ciclo a la vez que regula positivamente proliferación y ciclo celular. Adicionalmente, se ha demostrado que EVI1 puede inducir cambios epigenéticos. En conclusión, EVI1 logra alterar los patrones de expresión génica característicos de un tipo celular aportando a varias características asociadas a lo que conocemos como fenotipo tumoral.

### **1.6.1 EVI1 COMO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN.**

Dado su capacidad de unión al ADN, EVI1 es capaz de regular positiva y negativamente la transcripción de varios genes. En la **Tabla 1**, a manera de resumen, se relacionan los diferentes genes reportados con los cuales EVI1 se ha relacionado.

Sitios de unión para EVI1 se han identificado en varios otros genes: *FGF20*<sup>50</sup>, *FGF11*<sup>50</sup>, *SEC62*<sup>51</sup>, *KIF5A*, *MAP3K14*, *GADD45G* y *SKIL*<sup>52</sup>, sin embargo la clase de regulación que ejerce EVI1 sobre estos genes no ha sido aún identificada.

### **1.6.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DESCRITAS PARA EVI1.**

Una de las primeras vías de señalización en las cuales EVI1 se observó involucrado fue en la activación de la proteína AP-1 (proteína activadora). El complejo AP-1 es un factor de transcripción, que puede formarse por el heterodímero FOS-JUN o por el homodímero JUN-JUN, que regula la expresión de genes en procesos que incluyen diferenciación, apoptosis y proliferación. El segundo dominio a manera de dedos de zinc de EVI1 es esencial para la activación de AP-1 y para la transactivación del promotor que regula a *C-FOS*<sup>53</sup>(**Gráfico 1**).

Es muy probable que la agresividad de EVI1 se deba en parte por la habilidad de EVI1 para mantener a la célula constantemente en división celular. Se ha demostrado que EVI1 interactúa con BRG1 (del inglés, *brahma-related gene 1*) e incrementa la actividad del ciclo celular. Esta interacción es mediada por la región c-terminal y es requerida para la activación del promotor del factor de transcripción E2F1 (del inglés, *E2 promoter binding factor 1*). BRG1 controla la activación del promotor de E2F1 interactuando con la proteína RB (del inglés, *retinoblastoma protein*) y se ha sugerido que EVI-1 bloquea esta interacción<sup>54</sup>.

También, se ha visto que la expresión de EVI1 en fibroblasto conlleva a una fase G1 abreviada y a una reducción en el requerimiento de suero en la entrada a la fase S. Estos cambios biológicos están acompañados por el incremento en la producción de proteínas Ciclina A y CDK2, la dramática reducción en la actividad de p27 y al correspondiente incremento en los niveles de pRB hiperfosforilada<sup>55</sup>.

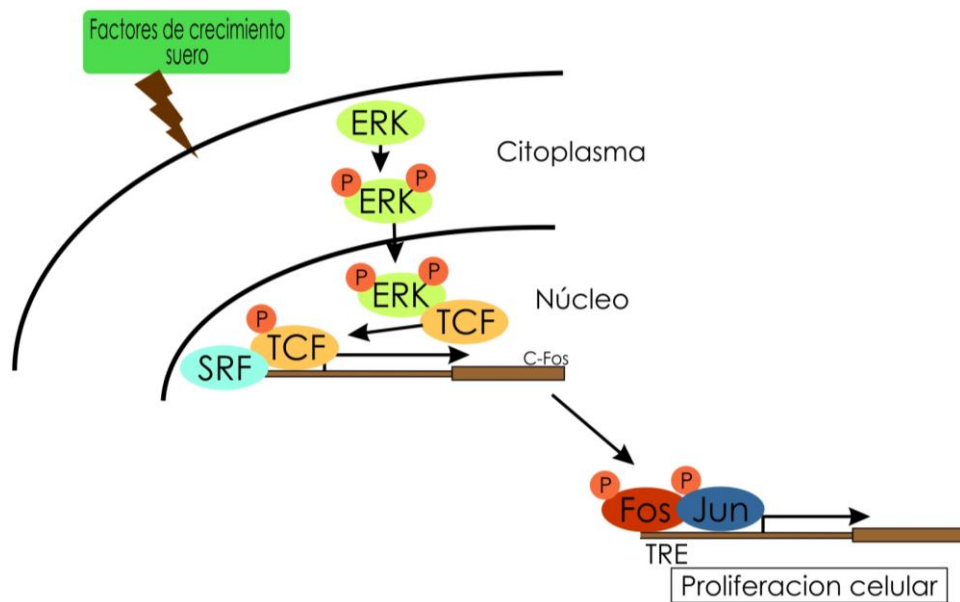
<b>Gen</b>	<b>Relación con EVI1</b>	<b>Ref</b>
<i>BCL2L1</i>	EVI1 directamente induce la expresión de <i>BCL2L1</i> . <i>BCL2L1</i> funciona como inhibidor de la apoptosis.	56
<i>TERC</i>	Cuando se sobre-expresa EVI1 en rearrreglos que implican la región 3q26 se observa un incremento de <i>TERC</i> . <i>TERC</i> es la telomerasa encargada de mantener los finales de los telómeros.	57
<i>ITPR2</i>	Usando una proteína quimérica de EVI1 se demostró que EVI1 directamente regula negativamente el receptor <i>ITPR2</i> . Los receptores <i>ITPR2</i> tienen un rol importante en el señalamiento intracelular de Ca <sub>2+</sub>	58
<i>CEBPA</i>	Evi1 suprime la expresión de la proteína <i>CEBPA</i> en un 90% y su actividad de unión al ADN en un 92%. <i>CEBPA</i> actúa como factor de transcripción. También, puede interactuar con CDK2 y CDK4 inhibiéndolas, causando arresto del ciclo celular	59

<i>CASP3</i>	A causa de la expresión de EVI1 la proteína CASP3 presenta un aumento. El gen <i>CASP3</i> codifica una proteína, la cual es miembro de la familia de las cisteína-proteasas. La activación secuencial de las caspasas conlleva a la fase de ejecución de la apoptosis celular.	60
<i>CALR</i>	EVI1 reprime la transcripción del gen <i>CALR</i> . Como consecuencia las células son vulnerables al estrés oxidativo.	61
<i>ZBTB16</i>	La sobre-expresión de <i>EVI1</i> permite a su vez la sobre-expresión del gen <i>ZBTB16</i> . Ensayos demuestran que al promotor del gen <i>ZBTB16</i> se puede unir directamente EVI1 y activarlo. <i>ZBTB16</i> se localiza en el núcleo, está envuelta en ciclo celular e interactúa con la histona deacetilasa.	62
<i>miR-133a-1</i>	EVI1 se une directamente al promotor del microARN <i>miR-133a-1</i> y lo regula positivamente. La función de <i>miR-133a-1</i> no ha sido aun dilucida.	63
<i>miR-1-2</i>	EVI1 se une directamente al promotor del microARN <i>miR-1-2</i> y lo regula positivamente. <i>miR-1-2</i> está envuelto en proliferación anormal.	63
<i>miR-143</i>	EVI1 es un supresor transcripcional del <i>miR-143</i> . No se conoce el mecanismo por el cual sucede. Transfección de <i>miR-143</i> inhibe significativamente la proliferación celular y la expresión de la proteína RAS	64
<i>miR499A</i>	EVI1 reprime transcripcionalmente el promotor de <i>MIR499A</i> . La reconstitución de <i>MIR499A</i> induce apoptosis y resulta en un fuerte decremento de la viabilidad celular.	65

**Tabla 1.** Genes regulados transcripcionalmente por EVI1.

De otro lado, EVI1 como oncoproteína está asociada a su capacidad para bloquear el efecto regulador del crecimiento celular mediado por algunas

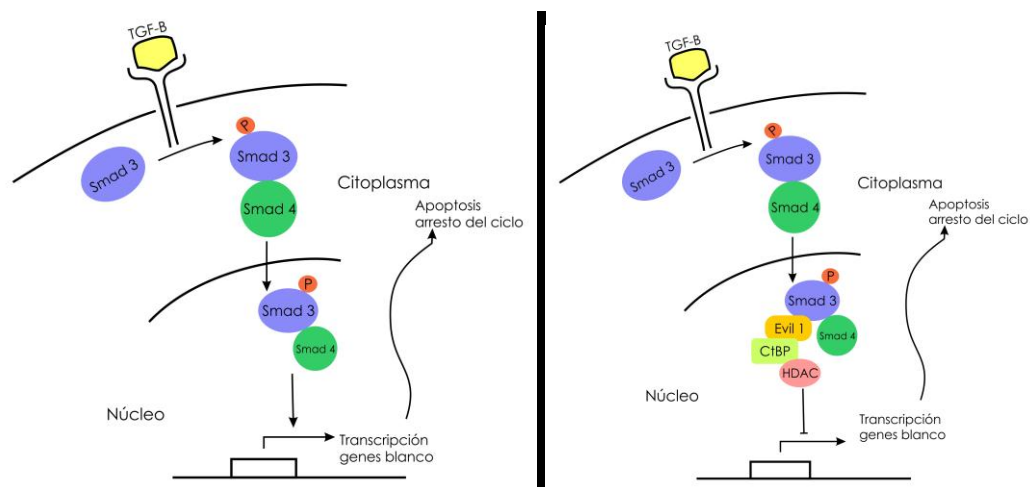
citoquinas. La expresión de EVI1 aboga los efectos antiproliferativos y apoptóticos del IFNA1 (del inglés, *interferon alpha 1*). EVI1 no reprime el señalamiento JAK/STAT o la activación de los genes inducidos en respuesta a el interferón, contrariamente, EVI1 prolonga la fosforilación de STAT1 y la activación de los promotores inducidos por el interferón, a excepción del gen *PML* (del inglés, *promyelocytic leukemia*). En conclusión EVI1 reprime la respuesta al interferón alfa represando selectivamente genes proapoptóticos tales como el *PML*<sup>66</sup>.



**Gráfico 1.** *EVI1 estimula la actividad de AP-1.* EVI1 activa la transcripción de FOS. FOS se asocia con JUN para formar un heterodímero y estimular la transcripción mediada por TRE. El incremento de la actividad de AP-1 mediada por EVI1 promueve la proliferación celular

EVI1 bloquea la actividad reguladora del TGF- $\beta$  (del inglés, *transforming growth factor beta*) mediante una interacción inhibitoria con el mediador de esta vía, SMAD3<sup>67,68</sup>. Otro mecanismo que pudiera explicar la inhibición de SMAD3 por EVI1 sería el reclutamiento de un complejo de HDAC (histonas deacetilasas)<sup>69</sup> a través de CtBP (del inglés, *C-terminal binding protein*)<sup>70,71</sup> (**Gráfico 2**), el cual interactúa con factores de transcripción que se unen directamente al ADN. TGF- $\beta$

es una proteína de secreción que lleva a cabo diversas funciones en la célula, como el control del crecimiento celular, proliferación celular, procesos de diferenciación y apoptosis; también, regula la función de varios factores de crecimiento incluyendo el GM-CSF. Alliston y cols. demostraron que EVI1 no solo interactúa con SMAD3 sino que, además, es capaz de reclutar las SMADs en general logrando inhibir el señalamiento inducido por TGF- $\beta$ /SMAD3, BMP/SMAD1 y actina/SMAD2<sup>72</sup>. Adicionalmente, debajo de la estimulación con TGF- $\beta$ , EVI1 y CtBP son reclutados al promotor de *SMAD7* inhibiendo la activación transcripcional inducida por TGF- $\beta$ . En células epiteliales, EVI1 no inhibe las vías de señalamiento inducidas por TGF- $\beta$  referentes a mecanismos de adhesión celular, transición celular o crecimiento celular, pero si inhibe la apoptosis mediada por TGF- $\beta$  mediante un proceso que implica la activación de la vía PI3K/AKT. La inhibición de EVI1 por ARNi inhibe la fosforilación de AKT e incrementa la sensibilidad de las células a la apoptosis<sup>73</sup>.

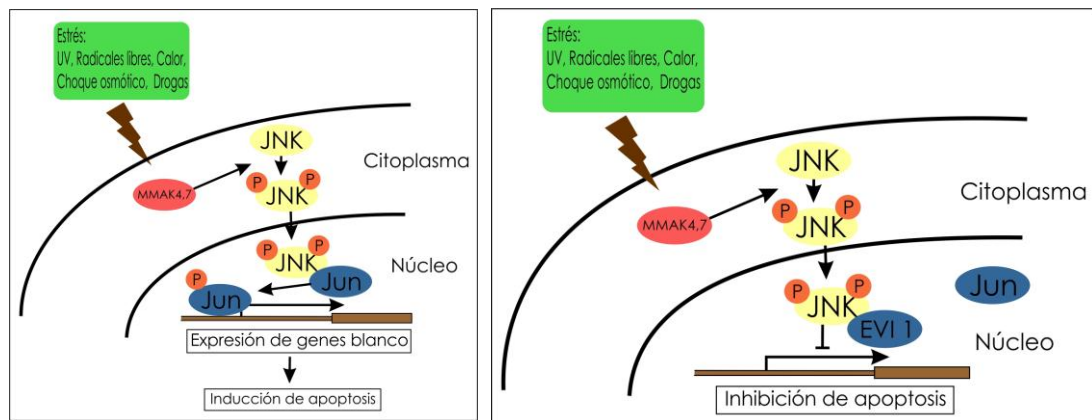


**Gráfico 2.** *EVI1 reprime la señal inhibitoria del crecimiento mediada por TGFB. A.* TGFB se une al complejo receptor del TGFB y activa la fosforilación de la Smad3. La forma fosforilada de Smad3 forma un complejo con Smad4, dicho complejo es translocado al núcleo en donde trabaja como un factor de transcripción para inhibir el crecimiento celular. **B.** EVI1 se une a Smad3 para interferir la actividad transcripcional del complejo Smad3/Smad4. EL reclutamiento de la HDAC por

parte de EVI1 a través de CtBP es un mecanismo subyacente para inhibir la señal apoptótica mediada por el TGFB.

La proteína JNK (proteína quinasa activada por mitógenos) responde a diversos estímulos de estrés y juegan un rol importante en el desencadenamiento de la apoptosis. EVI1 interactúa físicamente con JNK suprimiendo la fosforilación de JUN mediada por JNK<sup>74</sup> (**Gráfico 3**).

También se ha documentado que la interacción de EVI1 con RUNX1 (del inglés, *runt-related transcription factor 1*) altera la capacidad de RUNX1 de unirse a sus secuencias consenso de ADN, como parte del complejo CBF (del inglés *core binding factor*). Este complejo puede activar o reprimir la transcripción de genes claves para la regulación del crecimiento, diferenciación y sobrevivencia celular, actuando bien sea como oncogén o como un supresor de tumor<sup>75,76</sup>. RUNX1 actúa como regulador de genes involucrados en la vía de p53 (*ARF*, *WAF1*), en la vía de TGF- $\beta$  (*TGF $\beta$ -R1*), en la regulación del ciclo celular (*Ciclina D3*) y en la diferenciación hematopoyética (*TCR $\alpha$* ,  *$\beta$* ,  *$\gamma$* ,  *$\delta$* , *CD3 $\epsilon$* , *CD4*, *GM-CSF*, *IL-3*, *IgA1*, *IgC $\alpha$* , *M-CSFR*, *MPO* y *C/EBP $\delta$* ) entre otros<sup>77</sup>.



**Gráfico 3.** *EVI1 inhibe la actividad de JNK.* **A.** Diferentes señales de estrés activan la fosforilación de JNK. JNK activado es translocado al núcleo en donde media la fosforilación de factores de transcripción tales como JUN para inducir

apoptosis. **B.** EVI1 bloquea la interacción entre JNK y su sustrato reprimiendo la actividad de JNK para inducir apoptosis.

Varios estudios soportan la hipótesis de que la inapropiada expresión de EVI1 bloquea la eritropoyesis por represión de la transcripción de un grupo de genes blanco de GATA1<sup>47,78</sup>. Pese a que EVI1 reconoce la misma secuencia que GATA1 reconoce<sup>79</sup>, la inhibición de EVI1 sobre la actividad de GATA1 es llevada a cabo debido a que EVI1 interactúa físicamente con GATA1 e impide que esta realice su función como factor de transcripción<sup>47</sup>.

Genes involucrados en los mecanismos de hematopoyesis y diferenciación son regulados por EVI1. Varias de las relaciones descritas en la literatura se describen a continuación:

La proteína PU.1, regulador transcripcional importante para el desarrollo linfóide y mielóide, es inhibida por EVI1. EVI1 interactúa directamente con PU.1 impidiendo la unión de PU.1 al co-activador C-JUN<sup>80</sup>. En células 32Dcl3, la sobre-expresión de EVI1 bloquea la capacidad de las células para expresar mieloperoxidasa I y diferenciarse a granulocito en respuesta al estímulo con G-CSF<sup>46</sup>.

La proteína PTEN (del inglés, *Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) desempeña un rol importante en el crecimiento celular, migración y muerte celular. Eventos de delección o mutación en esta proteína promueven procesos de tumorigénesis<sup>81</sup>. En células leucémicas, EVI1 reprime la expresión de PTEN y activa la vía PI3K/AKT/mTOR interactuando con proteínas reguladoras de la cromatina<sup>82</sup>.

Recientemente, la disregulación de microARNs (miARNs), moléculas de ARN con función reguladora postranscripcional, se han asociado con la iniciación y progresión del cáncer<sup>83</sup>. En células primarias de médula ósea, EVI1 silencia la

expresión de *miR-124-3* mediante la metilación de isla CpG localizadas alrededor de *miR-124-3*<sup>84</sup>. *miR-124-3* es un regulador del ciclo celular.

La generación de un modelo murino animal con SMD *Evi1*<sup>+</sup> permitió determinar los efectos de *Evi1* en células de médula ósea. La sobre-expresión de *Evi1* conduce a una hiperproliferación celular y a la disminución de la expresión de los genes *EpoR* y *c-Mpl*, importantes para la diferenciación eritroide terminal y la formación de plaquetas<sup>85</sup>.

Finalmente, análisis de perfiles de expresión génica identifican a PBX1 como gen blanco de EVI1. Sobre-expresión de EVI1 aumenta la expresión de PBX1 en células progenitoras madres hematopoyéticas<sup>86</sup>. PBX1 es un regulador de las HSCs que contribuye a el mantenimiento del estado quiciente en células tipo HSC<sup>87</sup>. ANG1, al igual que PBX1, promueve el estado quiciente de las células HSC al interactuar con el receptor TIE2<sup>88</sup>. En células leucémicas, ANG1 es altamente expresado cuando EVI1 está presente.

### **1.6.3 EVI1 ALTERA REGULADORES EPIGENÉTICOS.**

Perturbaciones epigenéticas tales como alteración en la metilación del ADN o pérdida del remodelamiento de la cromatina por modificación de las histonas han emergido como marcador común de tumores<sup>89</sup>. Mediante una interacción proteína-proteína EVI1 inhibe la función de MBD3, deacetilasa de histonas<sup>90</sup>. Dickstein y cols. demostraron que la regulación negativa del gen *miR-124-3* en presencia de EVI1 era debido a la capacidad del oncogén de interactuar físicamente con la metiltransferasa de ADN (Dnmt3a/b), el complejo formado se une metilando dinucleótidos CpG en una región específica corriente arriba de *miR-124-3* para reprimir su expresión<sup>84</sup>.

El complejo de proteínas *Polycomb* (PcG) son reguladores epigenéticos que catalizan la adición de un grupo metil en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me) y funcionan como reguladores transcripcionales que silencian set de genes específicos mediante la modificación de la cromatina. EVI1 interactúa físicamente con las proteínas PcG y consecuentemente, induce la trimetilación, de la H3K27 ubicada en el locus del gen *PTEN*, remodelando la cromatina para reprimir la transcripción<sup>82</sup>.

Por último, Evi1 es capaz de formar complejo con dos importante metiltransferasas, SUV39H1 y EHMT2<sup>91</sup>. Se encontró que Evi1 interactúa directamente con SUV39H1 y con EHMT2 formando un complejo con actividad metiltransferasa que realza el potencial represivo transcripcional de EVI1<sup>92,93</sup>.

#### **1.6.4 EVI1 EN LA REGULACION DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS.**

Recientemente, estudios en ratón mostraron que *Evi1* es esencial en la proliferación y mantenimiento de las células madres hematopoyéticas (HSCs). Los hallazgos demuestran que *Evi1* puede participar en la generación de células madres leucémicas (LSCs) y causar la resistencia a la diferentes terapias. Yuasa y cols.<sup>77</sup> mostraron que *Evi1* es expresado preferencialmente en HSCs y promueve el desarrollo temprano hematopoyético. La mediación de la hematopoyesis se ha visto dependiente de la activación de GATA2 por la unión directa de EVI1 al promotor de *GATA2* y de la represión del señalamiento del TGF- $\beta$ <sup>77,94</sup>.

Experimentos en ratones *knockout* revelaron que *Evi1* regula la proliferación de las células HSC de manera dosis-dependiente<sup>48</sup>. Adicionalmente el locus de *EVI1* atrae la atención como “punto caliente” para la integración del genoma viral luego de procedimientos de terapia génica. Demostraciones sugieren que la activación transcripcional por integraciones virales dentro del locus *EVI1* confiere sobrevivencia y habilidad de renovación a células hematopoyéticas de ratón y

humano<sup>95-97</sup>. Los hallazgos indican fuertemente que la activación de EVI1 realiza la expansión de HSC.

### **1.7 ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS DA-3**

La relación entre retrovirus y leucogénesis ha sido ampliamente estudiada. Uno de los modelos más estudiados son las leucemias y linfomas inducidas por el MoMLV<sup>98</sup>. Ratones recién nacidos infectados con MoMLV desarrollan diferentes tipos de leucemias y linfomas después de un largo periodo de latencia y un episodio de viremia aguda<sup>99,100</sup>. Sin embargo, este tipo de virus no tiene efecto transformante *in vitro* y usualmente induce frecuentemente tumores hematológicos de la línea mieloide monoclonales a partir de los cuales es posible aislar líneas celulares que proliferan *in vitro* pero que son usualmente dependientes de factores de crecimiento<sup>101-103</sup>.

Una característica interesante de estas células es que no son trasplantables en receptores singénicos. A partir de estas observaciones se propusieron muy tempranamente tres posibles factores asociados al desarrollo de leucemias en este tipo de infecciones: (i) capacidad oncogénica viral intrínseca, (ii) activación de oncogenes por inserción viral y (iii) factores asociados a la repuesta inmune<sup>99</sup>.

Una de las primeras observaciones de la activación de oncogenes inducida por retrovirus fue la expresión aberrante de *C-MYC* en leucemia aviaria<sup>104</sup>. Sin embargo, desde estos trabajos iniciales se hicieron observaciones sugestivas de que las alteraciones genéticas causadas por la inserción retroviral podrían ser necesarias pero no suficientes para causar transformación leucémica<sup>105</sup>.

La activación de oncogenes por inserción del genoma viral ha sido un factor ampliamente estudiado y documentado en décadas pasadas<sup>99</sup>. Sin embargo, recientemente este tipo de estudios han recobrado interés debido a los efectos

secundarios observados en pacientes sometidos a procedimientos de terapia genética mediante la utilización vectores retrovirales<sup>106-108</sup>.

Con respecto al papel que pudiera jugar la respuesta inmune antiviral en la inducción de tumores hematológicos murinos, varios reportes de décadas pasadas muestran evidencias bastante sugestivas<sup>109,110</sup>. Una de las observaciones más llamativas relacionada con el papel de la respuesta inmune antiviral en los procesos de leucogénesis asociados a las infecciones retrovirales provienen del reporte de Lee e Ihle<sup>109</sup>, quienes claramente demostraron que existía una relación directa entre el desarrollo de una respuesta inmune antiviral crónica y el desarrollo de leucemias, después de la infección de ratones BALB/C recién nacidos con MoMLV.

En contraste con este hallazgo, ratones CBA/N sometidos al mismo tratamiento, desarrollaron viremia pero no se detectó una respuesta antiviral de células T ni desarrollo de leucemias o linfomas. Esta observación planteó la pregunta de si la carencia de desarrollo de leucemias en los ratones CBA/N estaba relacionada con la ausencia de una respuesta de células T específica. Estos autores postularon que, en este modelo, una respuesta inmune antiviral específica crónica proveería una gran población de blastos, los cuales serían un blanco muy apropiado para la transformación viral. Estas células estarían bajo continuo estímulo de factores de crecimiento lo que incrementaría la probabilidad de eventos de transformación posteriores.

Su hipótesis final fue que para el desarrollo de leucemias secundarias a la infección por MoMLV se requiere una respuesta inmune crónica. A mediados de la década de los 80, las características de varios linfomas murinos primarios inducidos por infecciones con retrovirus fueron reportadas<sup>99,111,112</sup>. Una gran variedad de alteraciones malignas hematopoyéticas fueron caracterizadas en estos estudios, pero dos características con respecto al fenotipo de las células

transformadas después de la infección retroviral fueron sobresalientes: (i) una alteración en el proceso de diferenciación y (ii) la desregulación de la capacidad de sobrevivencia y proliferación.

Una clase interesante de este tipo de tumores son los "linfomas" (reportados así inicialmente) murinos esplénicos inducidos por la infección con MoMLV. Un número significativo de ellos están genóticamente relacionados con linajes de diferenciación dependientes de IL-3. Estos tumores se pueden expandir *in vitro* con IL-3, pero son dependientes de este factor de crecimiento para su sobrevivencia y proliferación<sup>113</sup>.

La conclusión de estas observaciones fue que la transformación *in vivo* de precursores celulares de linajes dependientes de IL-3, suficiente para manifestarse *in vivo* como linfomas o leucemias, no requiere y no involucra en la gran mayoría de los casos, la pérdida de dependencia de IL-3 para su crecimiento. Adicionalmente, estas células proliferan permanentemente *in vitro* sin sufrir diferenciación. Estas observaciones fueron la base para proponer la hipótesis que los virus de la leucemia murina, no son virus directamente transformantes y que factores secundarios estarían involucrados en una transformación leucémica completa, asociada a la adquisición de independencia de factores de crecimiento<sup>114</sup>. Hasta donde es de nuestro conocimiento una identificación completa de estos posibles factores y un modelo de leucemia con transformación completa asociado a transformación viral más la contribución de factores externos asociados, no se ha llevado a cabo. Tampoco se ha explorado ampliamente el papel de la respuesta inmune como inductor de una transformación tumoral completa en líneas celulares con alteraciones genéticas secundarias a inserción retroviral.

Una de las líneas celulares generadas de este tipo de estudios, son las células DA-3. Esta línea celular fue aislada de bazo de ratones BALB/C infectados con MoMLV los cuales desarrollaron leucemias después de la infección<sup>99</sup>. Estas

células tienen una sola inserción del LTR viral en el locus *Cb-1/fim*, el cual está genéticamente ligado al oncogén *Evi1* y localizado a 90Kb de éste y activa su expresión a partir del promotor normal del gen, probablemente actuando como un potenciador de la transcripción a distancia<sup>115,116</sup>. En las leucemias murinas inducidas por MoMLV, *Evi1* es el sitio de integración retroviral más frecuente. Interesantemente, este locus es un sitio de rearreglos muy frecuentes en las leucemias mieloide agudas humanas de mal pronóstico.

Las células DA-3 son de origen mieloide. Estas células son mieloperoxidasa positivas y su fenotipo incluye algunos marcadores de superficie celular tales como Thy-1<sup>-</sup>, Ly-5<sup>+</sup>, H-11<sup>+</sup>, Ia<sup>+</sup>, Mac-1<sup>+</sup> y RB6-8C5<sup>+</sup><sup>99,114,117</sup>. Las células DA-3, como la mayoría de las líneas de este tipo son dependientes de IL-3 y proliferan ampliamente con GM-CSF pero no con CSF-1, G-CSF, LIF ó IL-6<sup>116,118</sup>.

Adicionalmente, estas células no alcanzan una diferenciación bajo la influencia de ninguno de estos factores de crecimiento. Nosotros hemos utilizado las células DA-3 para proponer un modelo de desarrollo de tumores hematológicos asociados a la desregulación de la expresión del oncogén *Evi1*, en este caso, debido a un evento de mutagénesis secundaria a la inserción del LTR retroviral. Como la mayoría de las líneas celulares de este tipo, las células DA-3 son monoclonales, indiferenciadas, en este caso con características fenotípicas de un estadio promielocítico, y dependientes para su supervivencia y proliferación de IL-3 o GM-CSF. Adicionalmente, estas células no son transplantables en ratones BALB/C sanos.

La dependencia de estas células de factores de crecimiento para su supervivencia y proliferación *in vitro*, hace pensar que en el ratón singénico infectado crónicamente, del cual fueron aisladas, existen condiciones que favorecen su supervivencia y proliferación y suficientes como para causar un síndrome mieloproliferativo letal, probablemente asociadas a la respuesta inmune antiviral,

la cual podría favorecer la presencia de concentraciones suficientes de factores de crecimiento. Una segunda posibilidad sería que el sistema inmune de un hospedero normal, sin infección retroviral, pudiera rechazar este tipo de células transformadas.

Para descartar una de las dos hipótesis, en estudios preliminares, las células DA-3 fueron modificadas genéticamente, para expresar el gen del *GM-CSF*. Este experimento nos permitió demostrar que la expresión constitutiva de *GM-CSF* en estas células les confiere capacidad de crecimiento autónomo<sup>119 120</sup>, las convierte en células trasplantables a ratones singénicos y por lo tanto, les otorga capacidad tumorigénica completa (manuscrito en preparación, Cardona ME y cols.)

Basados en estas observaciones, concluimos que las células DA-3 no son rechazadas por el sistema inmune de un hospedero singénico normal y proliferan *in vivo* si se las provee de factores de crecimiento en concentraciones suficientes. Estos resultados preliminares podrían considerarse como una comprobación experimental del concepto de que la sobre-expresión del oncogén *Evi-1* como evento primario de transformación génica en células hematológicas, no es suficiente para inducir transformación celular completa y que células hematológicas que sufren alteraciones génicas de este tipo requieren factores de crecimiento inducidos bien sea por una respuesta inmune específica crónica o un proceso de inflamación crónica para proliferar disreguladamente y causar síndromes mieloproliferativos letales. Posteriormente, nosotros propusimos las células DA-3 como un modelo para estudiar *in vivo*, el comportamiento y los posibles cambios de transformación tumoral de líneas celulares que sufren expresión disregulada de oncogenes tales como *Evi1*, en condiciones de inflamación crónica en las que se observan niveles elevados de factores de crecimiento. Ratones BALB/C fueron tratados con un protocolo de inmunización con proteoglicano, el cual induce un proceso de artritis autoinmune crónica<sup>121</sup>.

Una vez establecido el proceso inflamatorio crónico se observaron niveles elevados de GM-CSF en el suero de estos animales y células DA-3 transferidas a estos animales proliferaron in vivo causando un síndrome mieloproliferativo semejante a una LMA letal. Las células DA-3 recuperadas de estos animales crecieron in vitro en ausencia de GM-CSF indicando que habían adquirido independencia de factores de crecimiento para su proliferación probablemente por haber sufrido eventos posteriores de transformación después de su expansión in vivo. Finalmente, estas células transplantadas a ratones singénicos sanos, causaron un síndrome mieloproliferativo letal, semejante a una LMA (manuscrito en preparación Cardona ME y cols.).

Estos resultados sugieren que lesiones genéticas asociadas a la sobre-expresión de oncogenes, tales como *EVI1*, como sucede por ejemplo en los eventos de mutación insercional observados en recientes tratamientos de terapia genética<sup>97,107,108</sup> no son suficientes para inducir transformación tumoral, pero si son un factor de riesgo para el desarrollo de tumores hematológicos, especialmente si se asocian con condiciones en las que se encuentran niveles elevados de factores de crecimiento, tales como infecciones crónicas u otras condiciones inflamatorias crónicas.

## **1.8 ARN INTERFERENTE**

El ARNi es un mecanismo de silenciamiento genético postranscripcional mediado por la degradación o arresto de la traducción de un ARN mensajero blanco. Este mecanismo natural juega un papel importante en la defensa contra la infección viral y en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo celular<sup>122-124</sup>.

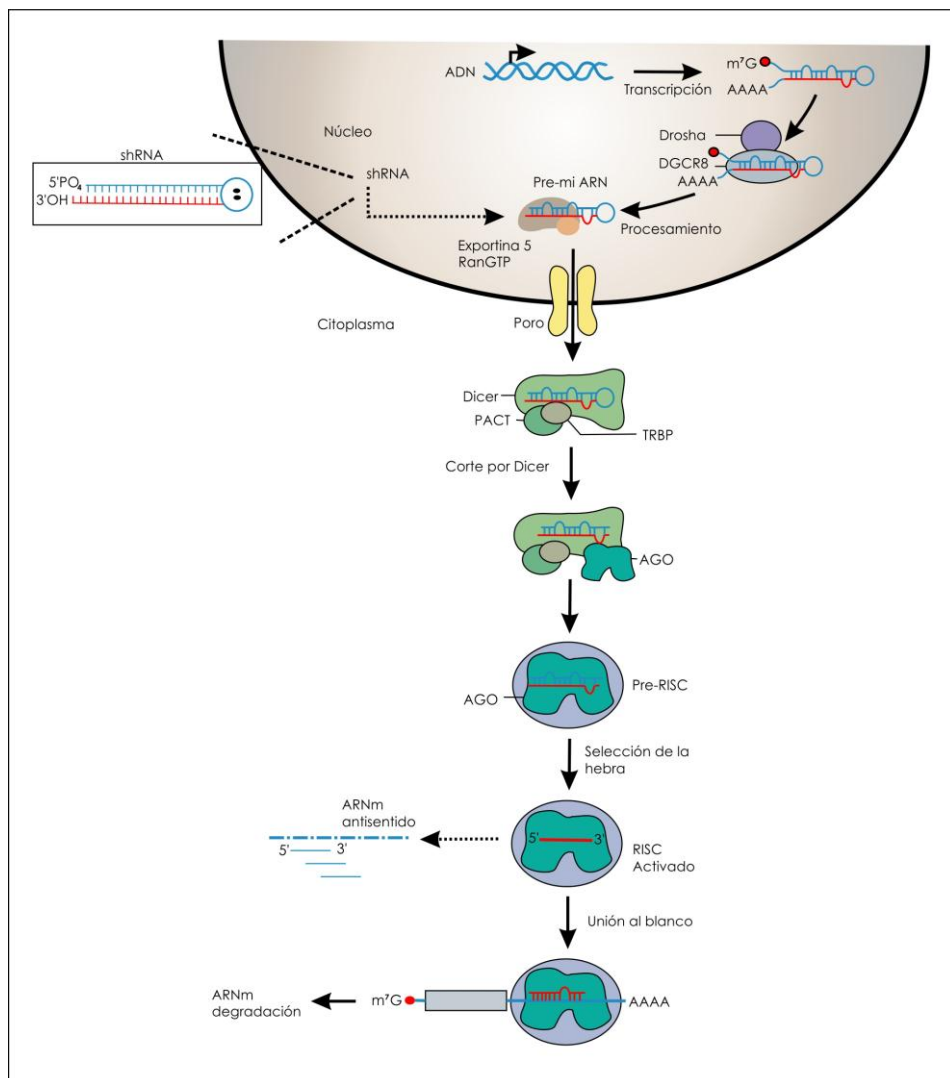
Inicialmente, Fire y cols. identificaron una molécula de ARN bicatenario (dsRNA) como la responsable del silenciamiento genético en *C. elegans*<sup>122</sup>. Estudios subsecuentes, permitieron dilucidar el mecanismo del ARNi, concluyendo que los dsRNA largos son procesados a ARN interferentes pequeños (siARN) de 21 a 23

pb por una endonucleasa de ARN llamada DICER (del inglés *Drosophila RNase III/helicase enzyme*). Una de las hebras del siARN es incorporada a un complejo enzimático conocido como RISC (del inglés *RNA-induced silencing complex*). RISC permite la unión de la hebra siARN a la molécula ARNm blanco complementaria e induce clivaje endonucleolítico de la hebra de ARNm en el sitio blanco. La generación de ARNm con terminaciones no protegidas activa una rápida degradación de la molécula de ARNm<sup>125</sup>.

Los microARNs son ARN pequeños de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, no codifican para proteínas y son generados a partir de transcritos endógenos que pueden formar estructuras en forma de horquilla. Los microARNs conforman una gran familia de genes reguladores postranscripcionales que controlan diversos procesos celulares y de desarrollo en eucariotas<sup>126</sup>.

Por la vía canónica (**Gráfico 4**), a partir de los genes que codifican para microARNs se transcriben precursores largos de ARN llamados microARNs primarios o (pri-microARNs, del inglés *primary transcripts*). La mayoría de los genes de microARNs son transcritos por la ARN polimerasa II<sup>127</sup>, sin embargo un grupo menor de microARNs asociado a repeticiones Alu es transcrito por la polimerasa III<sup>128</sup>. Los pri-microARNs generados por la ARN polimerasa II usualmente tienen varias kilobases de longitud y contienen estructuras en forma de horquilla compuesta de un tallo y un bucle<sup>129</sup>. En el primer paso de la maduración de los pri-microARNs Drosha, endonucleasa de RNA tipo III, en presencia del cofactor DGCR82 cliva el tallo de la estructura larga de ARN para formar una horquilla pequeña de aproximadamente 70 nucleótidos llamada precursor de microARNs (pre-microARNs, del inglés *precursor miRNA*)<sup>130</sup>. Los pre-microARNs son exportados del núcleo al citoplasma por medio de la exportina 5<sup>131</sup>. En el citoplasma, los pre-microARNs son reconocidos por el complejo de procesamiento de pre-microARNs formado por Dicer, la proteína de unión a ARN en respuesta a trans-activación (TRBP, del inglés *TAR RNA-binding protein*) y la

proteína quinasa activadora dependiente de ARN de cadena doble inducible por interferón (PRKRA, del inglés *protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator*)<sup>132</sup>. En el complejo de procesamiento Dicer cliva los pre-microARNs cerca del bucle terminal, generando un dúplex de microARN maduro de aproximadamente 22 nucleótidos, este dúplex contiene la cadena complementaria al ARN blanco, denominada hebra guía o sentido, y su cadena complementaria, la hebra pasajera o antisentido<sup>133</sup>.



**Gráfico 4.** Procesamiento de miARN y shRNA en mamíferos.

Posteriormente, este complejo se ensambla con la proteína Argonauta 2 (AGO), que hace parte del complejo silenciador inducido por microARNs RISC, AGO selecciona la hebra guía<sup>134</sup>. La hebra guía es la responsable de dirigir el silenciamiento. RISC puede dirigir la degradación del ARN mensajero blanco por dos vías basada en la complementariedad del ARN mensajero con la secuencia de ARNi<sup>135</sup>. Si la complementariedad es del 100% RISC induce la degradación del ARN mensajero blanco, mientras que si hay algunas bases no complementarias sucede un arresto de la traducción<sup>136</sup>. La degradación del ARNi ocurre en el citoplasma.

### 1.8.1 TECNOLOGÍA DEL ARNi

Luego de haberse descubierto el mecanismo del ARNi en *C. elegans*, Elbashir y cols. demostraron que el efecto del ARNi podría generarse en numerosas líneas celulares mediante la introducción de siARN sintéticos (ssiARN) obteniéndose la inhibición de un determinado gen<sup>137</sup>. Sin embargo, el uso de siARN conllevaba a un efecto supresor transitorio. En particular, esta desventaja fue superada a través de la expresión endógena de ARN pequeños en forma de pinza (shRNA, del inglés *short hairpin RNA*), estos dsRNA están conectados por un lazo de ARN de cadena sencilla. Un shRNA tiene una estructura de 19 pb (hebra sentido) – 6 bases (lazo) – 19 pb (hebra antisentido). Esta metodología permite suprimir la expresión genética en células de mamífero en forma estable<sup>138</sup>.

La expresión endógena de shRNAs se logra mediante la inserción de casetes de expresión que codifican para estos ARN pequeños en plásmidos o vectores virales. En mamíferos, las secuencias de ARNi son transcritas como secuencias sentido y antisentido conectadas por un lazo de nucleótidos no aparejados. Seguida la transcripción, debido a su similitud con la estructura de los microARNs, los shRNAs entran en la vía de procesamiento de los microARNs como pre-miARNs (**Gráfico 4**). El artificial pre-miARN es asociado a la exportina 5 y exportado al citoplasma, en donde el complejo enzimático formado por Dicer,

TRBP y PACT cortan el shRNA a fragmentos de 19 – 21 pares de bases para generar moléculas siARN con nucleótidos salientes hacia el extremo 3'<sup>139</sup>.

El dúplex de ARN se asocia con la proteína argonauta dentro del complejo precursor de RISC (pre-RISC), entonces una de las hebras del dúplex de ARN, la hebra pasajera, es removida. El complejo RISC conteniendo la hebra guía completa el silenciamiento postranscripcional por el apareamiento de la hebra guía con su secuencia complementaria en el ARN mensajero blanco.

Las características de la molécula ARNi complementaria al ARNm blanco son un factor crítico e importante en la inducción de un silenciamiento genético eficiente. Por esta razón, varios estudios se han enfocado en la optimización de las moléculas de siARN encontrándose como factores determinantes el tamaño de las secuencias, posicionamiento específico de ciertos nucleótidos, porcentaje del contenido G/C, flexibilidad termodinámica de la molécula, estructura secundaria del siARN, entre otros<sup>124,140,141</sup>

Normas básicas para la elección de una secuencia blanco dentro del ARNm han sido postuladas: i) La secuencia blanco debe elegirse luego de 100 nucleótidos de iniciado el marco de lectura, ii) las secuencia blanco no deben estar en las regiones no traducidas 5' o 3' del ARNm, iii) se deben elegir secuencias con un contenido de G/C del 50% , iv) evitar secuencias ricas en guanina garantiza que no se formen estructuras en forma de horquilla y iv) las secuencias blanco seleccionadas deben ser analizadas mediante BLAST (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*) para garantizar que solo un único gen este siendo silenciado<sup>137</sup>.

De otro lado, debido a que se ha demostrado que la funcionalidad del ARNi depende también de las propiedades específicas de la secuencia, criterios adicionales, en cuanto a las limitaciones termodinámicas del dúplex de ARN, se han estudiado. Algunos de los criterios sugeridos son: evitar repeticiones internas,

mantener un contenido de G/C entre el 30 – 50%, diseñar secuencias con una baja estabilidad interna en el extremo 3´ de la hebra guía, preferencia de base en algunas posiciones de la hebra sentido (posición 3, 10, 13 y 19), preferiblemente secuencias A/U hacia el extremo 5´ de la hebra pasajera y G/C hacia el extremo 5´ de la hebra sentido, el extremo 5´ terminal de la hebra antisentido debe ser rico en bases A/U y evitar secuencias GC repetidas en más de 9 nucleótidos<sup>140,141</sup>.

En consecuencia, las reglas para la selección de siARN eficientes mencionadas anteriormente han sido en su mayoría incorporadas dentro de herramientas computacionales que facilitan el hallazgo de secuencias blanco apropiadas.

En resumen, los eventos que condujeron a la adquisición de independencia de factores de crecimiento y adquisición de un fenotipo tumoral completo en las células DA-3 no los conocemos pero, en nuestra opinión, creemos que por las evidencias descritas en la literatura acerca de la función de *EVI1*, es probable que *EVI1* como lesión primaria preleucémica sea fundamental en el proceso de transformación tumoral completa. Nosotros proponemos que la evaluación de la inhibición de la expresión del oncogén *Evi1*, mediante la tecnología del ARNi, en las líneas DA-3 dependientes y DA-3 independientes permitiría determinar la potencialidad de este oncogén como blanco terapéutico. Los resultados de este estudio son relevantes dada la comprobación del papel de este oncogén como factor de mal pronóstico en LMA con sobre-expresión de *EVI1* (LMA-*EVI1*<sup>+</sup>) en humanos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la inhibición de la expresión del oncogén *Evi1* en una línea celular mieloide murina parental preleucémica *Evi1*<sup>+</sup> y su descendiente con fenotipo leucémico completo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

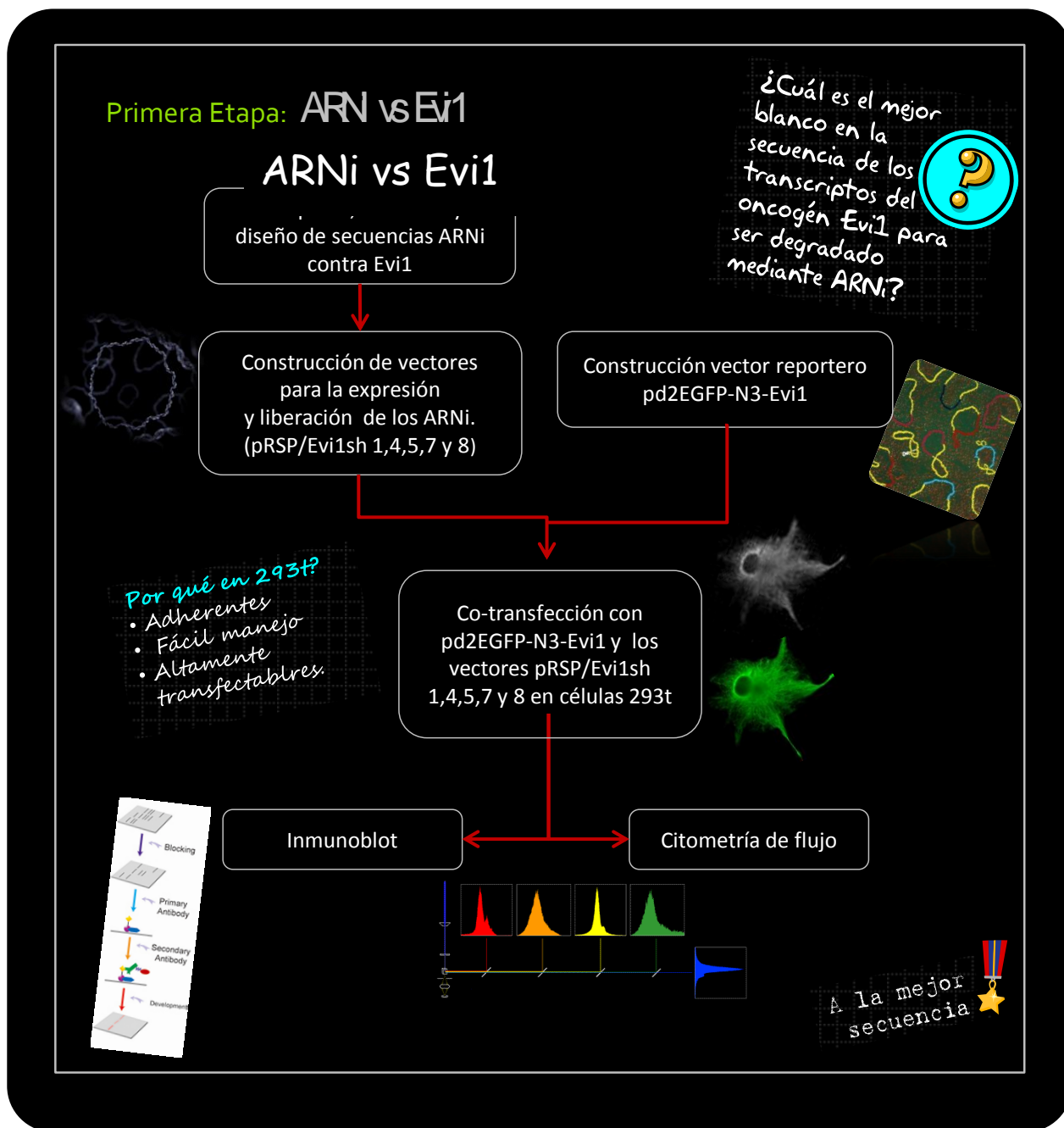
**2.2.1** Diseñar y evaluar secuencias ARNi para inhibir la expresión del oncogén *Evi1*.

**2.2.2** Evaluar *in vitro* el efecto de la inhibición de la expresión del oncogén *Evi1* sobre el crecimiento y proliferación de una línea celular mieloide murina parental preleucémica *Evi1*<sup>+</sup> y su descendiente con fenotipo leucémico completo.

**2.2.3** Evaluar *in vitro* el efecto de la inhibición de la expresión del oncogén *Evi1* en una línea celular mieloide murina parental preleucémica *Evi1*<sup>+</sup> y su descendiente con fenotipo leucémico completo tratadas con drogas citotóxicas

### 3. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental propuesto para desarrollar este estudio se describe a continuación en forma gráfica en dos etapas.



## Segunda Etapa: ARNi vs Evi1 en células DA-3 ARNi en células DA-3

**Pregunta:**  
¿Cuál es el efecto  
de la inhibición  
de Evi1 en el  
crecimiento y  
proliferación  
sobre células DA-3  
y sus  
descendientes?



Selección mejor vector  
pRSP/Evi1sh



mejor  
secuencia  
ARNi -  
primera  
etapa.

Electroporación + Selección =  
Líneas estables

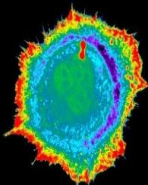
- DA-3 dep pRSP/vi1sh
- DA-3 ind pRSP/Evi1sh

PCR en tiempo real  
para Evi1



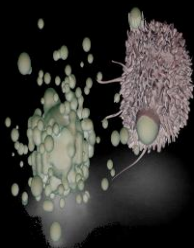
WST1

Proliferación celular



WST1

Respuesta a drogas  
citotóxicas



Wright

To be  
continued...

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR REPORTERO pd2EGFP-N3-Evi1

El vector reportero pd2EGFP-N3-Evi1 fue generado por clonación, en dos pasos, de la secuencia completa del ADN que codifica para Evi1 amplificada por PCR e insertada en el extremo 5' del gen d2GFP (del inglés, *green fluorescent protein*) en el vector pd2EGFP-N3. El vector pd2EGFP-N3, obtenido en trabajos anteriores en nuestro laboratorio, es el producto del remplazo de la secuencia de ADN que codifica para la proteína EGFP por la secuencia de ADN que codifica para la proteína d2EGFP en el vector reportero pEGFP-N3. La proteína d2EGFP es una variante desestabilizada de la GFP. La proteína d2EGFP tiene una vida media de aproximadamente 2 horas, esta característica es útil en estudios de inhibición.

Debido al gran tamaño del gen *Evi1* (3 kb), su amplificación y clonación se realizó en dos fases. Para amplificar los segmentos de 1,2 kb y 1,8 kb correspondientes al marco de lectura de Evi1 se diseñaron dos pares de iniciadores mostrados en la **Tabla 2**.

Evi1 1 <i>Forward</i>	CGGAATTCCATGGCGCCTGA	<i>EcoRI</i>
Evi1 1 <i>Reverse</i>	AAAGTACTGGCTCTACCCCTACTGC	<i>ScaI</i>
Evi1 2 <i>Forward</i>	TCCCCCGGGACAAAGTTGAC	<i>SmaI</i>
Evi1 2 <i>Reverse</i>	CGACCGGTGCACTGGATTCT	<i>AgeI</i>

**Tabla 2.** Iniciadores utilizados para la amplificación de Evi1

Los iniciadores se diseñaron con sitios para el reconocimiento de endonucleasas de restricción en los extremos 5' y 3' como se muestra en la Tabla 2. Adicionalmente, en el iniciador reverso para la amplificación del último segmento

de la secuencia codificante de *Evi1*, se introdujo una modificación de una base para anular el codón de parada en el ADN a amplificar. Los iniciadores diseñados fueron sintetizados comercialmente (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA) y fueron reconstituidos según las indicaciones de la compañía.

El plásmido pBS21, donado amablemente por Prof. Morishita<sup>142</sup> (Dpto. Ciencias Médicas, Universidad de Miyazaki, Japón), fue utilizado como template para las amplificaciones del gen *Evi1*. En la primera fase de clonación, se amplificó el segmento flanqueado por el set de iniciadores *Evi1* 2F y *Evi1* 2R. La reacción de PCR se realizó con 100 ng de ADN, 1  $\mu$ M de cada iniciador, 200  $\mu$ M de dNTPs (Promega; Wisconsin, USA), solución de tampón 1 X, 2,5 mM de  $MgCl_2$  y 1,25 U de polimerasa Ampli Taq Gold (Applied Biosystems; California, USA). La reacción se llevó a cabo en 32 ciclos, cada ciclo consistía en: desnaturalización a 94°C por 30s, hibridación de los iniciadores a 54°C por 30s, elongación a 72°C durante 2min, con un tiempo inicial de desnaturalización en el primer ciclo de 4 min a 94°C y un tiempo adicional de elongación de 10min en el último ciclo. La reacción de PCR fue purificada utilizando el kit de purificación para PCR (Qiagen; California, USA).

Luego de la amplificación del segmento, se procedió a realizar la digestión del vector pd2EGFP-N3 (~ 6 $\mu$ g) y del amplificado obtenido en la PCR (~4  $\mu$ g) con las enzimas ***Sma***I y ***Age***I (Fermentas; Maryland, USA), seguido se realizó purificación por columna (Qiagen; California, USA) y visualización del purificado de ADN por electroforesis. La ligación de los segmentos se realizó con la enzima T4 DNA Ligase (Fermentas; Maryland, USA): se adicionó 300 ng de vector, 370 ng de inserto, solución tampón 1X y 2,5 U de la enzima en un volumen final de 12  $\mu$ l, la reacción se incubó por 4h a 22°C y 16 h a 4°C.

El producto de transformación se uso para transformar ***Escherichia coli***, cepa DH5 $\alpha$ , mediante choque térmico. A varias de las colonias positivas, se les realizó

extracción de ADN plasmídico (Qiagen California, USA). Los ADN plasmídicos obtenidos fueron analizados por digestión con la enzima **NotI** (Fermentas; Maryland, USA para verificar que el fragmento de 1,8 Kb hubiera sido correctamente insertado. El vector obtenido, el pd2EGFPN-3-Evi1(2), fue utilizado como vector para la siguiente clonación.

En la segunda fase de clonación se realizó amplificación del segmento flanqueado en el plásmido pBS21 por el set de iniciadores Evi1 1F y Evi1 1R. La reacción de PCR se llevó a cabo con 100 ng de ADN, 1  $\mu$ M de cada iniciador, 200  $\mu$ M de dNTPs (Promega; Wisconsin, USA), solución tampón 1X,  $MgCl_2$  en 2,5 mM y 1,25 U de polimerasa Ampli Taq Gold en 30 ciclos, los 10 primeros ciclos incluyeron: desnaturalización a 94° C por 30 s, hibridación de los iniciadores a 53,5° C por 30 s, elongación a 72° C durante 8 min; los ciclos restantes se desarrollaron con el mismo protocolo a excepción del tiempo de elongación que fue extendido a 12 min. La PCR se realizó con un tiempo inicial de desnaturalización en el primer ciclo de 4 min a 94° C y un tiempo adicional de elongación de 10 min al finalizar los 30 ciclos. El producto obtenido en la reacción de PCR fue purificado por columna utilizando el kit de purificación para PCR (Qiagen). El amplificado obtenido (~5  $\mu$ g) fue digerido con las enzimas **EcoRI** (Promega) y **SmaI** (Fermentas). En paralelo, 5  $\mu$ g del vector pd2EGFPN-3-Evi1(2) fueron digeridos con las enzimas **EcoRI** y **SmaI** (Fermentas).

Luego de las reacciones enzimáticas se realizó purificación por columna. Los ADN purificados se visualizaron en gel de agarosa. La ligación de los segmentos (relación 1:3, vector: inserto) se realizó con la enzima T4 DNA Ligase; se adicionó 200 ng de vector, 57,4 ng de inserto, solución tampón 1X y 2,5 U de la enzima en un volumen final de 12  $\mu$ l, la reacción se incubó por 4h a 22°C y 16 h a 4°C. De la misma manera que en la clonación descrita anteriormente, se llevó a cabo los procedimientos de transformación y extracción de ADN plasmídico. Los

recombinantes fueron analizados mediante las enzimas de restricción, **EcoRI**, **SmaI**, **NotI** y **BglII** (Fermentas) para verificar una correcta inserción del fragmento.

#### **4.2 SELECCIÓN DE SECUENCIAS siARN, DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PARA LA EXPRESIÓN DE ARNi**

Para el diseño de las secuencias siARN (ARN interferente pequeño), se tomó como blanco la secuencia que codifica para el gen *Evi1* de ratón. El ADN codificante para la proteína factor de transcripción Evi1, variante delta 105 expresada en la línea celular murina DA-3 (Número de acceso Gen Bank<sup>143</sup>: AJ001482).

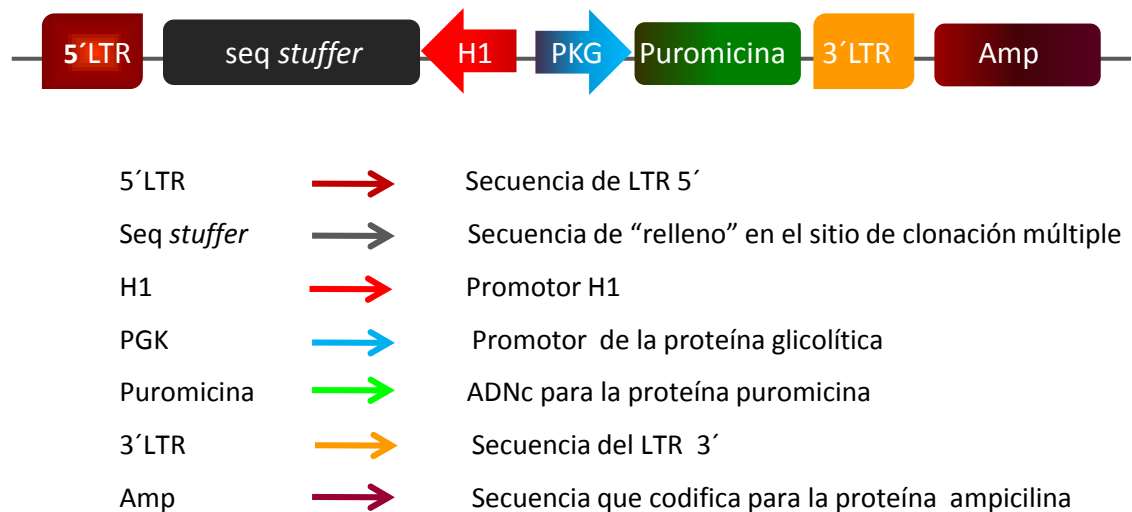
Se eligieron blancos específicos en el marco de lectura abierto de *Evi1* utilizando el programa siDirect<sup>144</sup>. Las secuencias fueron elegidas en base a las reglas propuestas por Ui – Tei y cols.<sup>140</sup> y Reynolds y cols<sup>141</sup>.

Adicionalmente, con el fin de evaluar secuencias que pudiesen ser eficientes en la inhibición de la expresión del oncogén *EVI1* en humanos, se buscó que las secuencias resultantes representaran un 100% de complementariedad con la secuencias codificante del gen *EVI1* de humano (número de acceso Gen Bank X54989).

Por último, para las secuencias ARNi encontradas por siDirect se realizó una búsqueda en la base de datos BLAST<sup>145</sup> para descartar la presencia de secuencias similares en otras regiones codificantes del genoma del ratón y humano que pudieran ser blancos no deseados. (De las secuencias que cumplían los parámetros mencionados anteriormente se seleccionaron cinco de ellas).

Para la liberación y expresión de ARNi se utilizó el vector comercial pRetro.Super.puro *stuffer* (Oligoengine, Washington, USA), vector para clonación y expresión de shARNs en líneas celulares de mamífero. El sistema comercial

pSuper.retro.puro *stuffer* (pRSP) (**Figura 1**), sistema para expresión de ARNi en células de mamífero, dirige la síntesis intracelular de secuencias siARN como transcritos que contienen dos nucleótidos colgantes en el extremo 3'. La expresión de las secuencias siARN es regulada por el promotor tipo III, H1, que regula normalmente pequeños transcritos de ARN que carecen de cola de poliadenilación, a cambio como señal de finalización de la transcripción presenta en el extremo una fila de cinco timidinas (T5). De esta manera el vector permite la expresión estable de siARN y una supresión persistente de la expresión génica del gen blanco puede lograrse.



**Figura 1.** Características generales del sistema pSuper.retro.puro *stuffer* (pRSP). La secuencia *stuffer* es un fragmento de ADN de 950 pares de bases proveniente del vector pBR322 introducida en medio del sitio múltiple de clonación (MCS) para facilitar la linearización del vector.

Las secuencias de siARN seleccionadas previamente se utilizaron para diseñar secuencias conteniendo shRNA (del inglés, *short harpin* RNA) siguiendo las instrucciones descritas por Oligoengine. Los oligonucleótidos obtenidos fueron

sintetizados por The Midland Certified Reagent Company (Texas, USA). Cada uno de los oligonucleótidos sintetizados se clonó en el vector pRSP siguiendo las indicaciones sugeridas por Oligoengine.

Las clonaciones fueron verificadas mediante análisis de restricción. Se obtuvieron un total de cinco vectores: pRSP/Evi1sh1, pRSP/Evi1sh4, pRSP/Evi1sh5, pRSP/Evi1sh7 y pRSP/Evi1sh8.

### **4.3 CULTIVO CELULAR**

Células HEK 293T (del inglés, *human embryonic kidney*; transformada con el gen E1A del adenovirus y el antígeno T del virus simiano 40) y HeLa (línea celular humana de epitelio tumoral de cerviz) fueron cultivadas y mantenidas en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma, St. Louis, USA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Sigma; St. Louis, USA) y 2 mM de L-glutamina.

Las líneas celulares mieloides de ratón DA-3 dependiente de factor de crecimiento para su proliferación (DA-3 dep) (generosamente donada por Prof. Ihle, St. Jude Hospital, USA) y su derivada DA-3 independientes de GM-CSF (DA-3 ind) fueron expandidas en medio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, USA) suplementado con 10% de SBF y 2 mM de L-glutamina. Las células DA-3 dependientes de factores de crecimiento fueron mantenidas con GM-CSF a una concentración de 0,25 ug/ml. (ImmunoTools, Cloppenburg, Alemania)

Todas las líneas celulares fueron cultivadas y mantenidas en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### **4.4 TRANSFECCIONES**

La evaluación del vector reportero se realizó mediante transfección transitoria de células HeLa con el vector pEGFP-N3-Evi1, usando FuGene 6 (Roche; Basilea,

Suiza), reactivo multicomponente no-liposomal, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para determinar la eficiencia de la actividad inhibitoria de las secuencias ARNi diseñadas, aproximadamente, 280.000 células 293T fueron sembradas por pozo, en platos de 6 pozos. 24 horas después, las células a una densidad entre el 70 y 80%, fueron co-transfectadas el vector reportero pEGFP-N3-Evi1 y los plásmidos que expresan las secuencias de ARNi (pRSP/Evi1sh1, pRSP/Evi1sh4, pRSP/Evi1sh5, pRSP/Evi1sh7, pRSP/Evi1sh8 y pRSP) usando FuGene HD (Roche). Para el control positivo de fluorescencia pd2EGFP-N3 se utilizo un radio FuGene: ADN de 6:2, para el control vector reportero pEGFP-N3-Evi1 de 8:2,5 y para las co-transfecciones, el radio utilizado fue de 8:3,5; el complejo ADN contenía 60% del plásmido codificante del shRNA y 40% del vector reportero. Luego de 48h de transfección, la expresión de GFP fue evaluada por citometría de flujo e inmunodetección.

Líneas celulares DA-3 dep y DA-3 ind expresando establemente los vectores portadores de las secuencias de ADN que codifican para los shRNA Evi1sh5 y Evi1sh7 fueron generadas mediante electroporación con los vectores pRSP (control), pRSP/Evi1sh5 y pRSP/Evi1sh7. Las dos líneas celulares ( $4 \times 10^6$  células por mililitro) fueron electroporadas en medio RPMI suplementado con 1,25% de dimetil sulfóxido (DMSO) y 10  $\mu\text{g}$  de ADN, a temperatura ambiente en cubetas de 0,4 cm en un volumen de 400  $\mu\text{l}$ . Las células fueron pulsadas dos veces a 190 V por 10 ms con un intervalo de 10 s entre un pulso y el otro utilizando el Gene Pulser Xcell (Biorad; California, USA). Posteriormente se cultivaron con medio de post-electroporación (RPMI con glutamina 2mM y SBF al 20%) precalentado a 37° C. El proceso de selección de clonas resistentes a puromicina, se inició luego de 48 horas de la transfección, con puromicina a una concentración de 2 mg/ $\mu\text{l}$  (Invitrogen; California, USA).

#### **4.5 MICROSCOPIA**

Células HeLa transfectadas con el vector pEGFP-N3-Evi1(F), luego de 48h de transfectadas fueron visualizadas en microscopia de fluorescencia en un microscopio Leica DMRXA (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania) equipada con una cámara CCD (Modelo S/N 370 KL 0565, Cooke Corporation)(Kelheim, Alemania). Las imágenes fueron adquiridas usando el programa Slidebook 2.1 (Intelligent Imaging Innovations Inc; Colorado,USA).

#### **4.6 CITOMETRIA DE FLUJO**

Las células 293T co-transfectadas con el vector reportero pEGFP-N3-Evi1(F) y los plásmidos que expresan las secuencias de ARNi fueron analizadas por citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de células GFP positivas, utilizando el citómetro CyFlow (Partec; Münster, Alemania) con los filtros para evidenciar presencia de GFP (excitación: 488 nm; emisión: 507 nm). Células no transfectadas fueron utilizadas como control negativo. La adquisición de datos se realizó mediante el programa FloMax (Partec; Münster, Alemania).

#### **4.7 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS**

Las células 293T, co-transfectadas e incubadas durante 48h fueron lavadas con PBS 1X, tripsinizadas, resuspendidas en PBS 1X, recogidas por centrifugación durante 10 minutos a 1500 rpm y lavadas dos veces con PBS 1X frío.

Seguidamente, las células fueron lisadas resuspendiéndolas en solución de lisis (120 mM NaCl, 0,5% de Igepal (Sigma, St. Louis, USA), 0,1% SDS (Sigma), 50 mM de Tris-HCl e inhibidor de proteasa diluido 20:1 (Sigma) durante 15 min en hielo, los detritos celulares fueron removidos del extracto proteico por centrifugación de las muestras durante 10 min a 13000 rpm a 4°C. La concentración de proteínas fue determinada por espectrofotometría usando el reactivo Bradford (Biorad; California, USA) mediante curva para concentraciones estándar de BSA según protocolo descrito por Bradford<sup>146</sup>. Aproximadamente 35

µg de proteína por muestra fueron separadas por sobre geles al 7% de poliacrilamida, según el método descrito por Laemmli<sup>147</sup>. La calidad de la electroforesis fue verificada por tinción de los geles con el reactivo Azul de Coomassie (Biorad; California, USA).

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, de poro de 0,2 µM, (Amersham Hybond; Münster, Alemania), en tampón de transferencia (25 mM de tris-base, 192 mM de glicina, 12% de metanol y 0,07% de dodecilsulfato sódico (SDS) por 16 h a 40 V. La membrana fue incubada en solución de bloqueo (5% de leche descremada, 1% de Tween 20 en solución TBS (NaCl 0,9% y Tris-HCl 20 mM pH 7,4) bajo agitación durante 5 horas a temperatura ambiente. Seguidamente la membrana fue lavada repetidamente con TBS e incubada bajo agitación toda la noche a 4°C con un anticuerpo contra GFP (Anti-GFP policlonal de conejo. Invitrogen; California, USA) diluido 1:3300 en solución de dilución (Tween 20 al 0,2%, leche descremada al 0,5% en TBS).

La membrana fue lavada repetidamente durante 30 min con TBS e incubada durante 3 h a temperatura ambiente con anticuerpo secundario policlonal conjugado (HRP; del inglés, *Horsedish peroxidase*) (Dako Cytomation; Glostrup, Dinamarca) diluido 1:5000 en solución de dilución. La detección de las proteínas se hizo por incubación de la membrana durante 5 min a temperatura ambiente con 2 ml de solución del sustrato quimio-luminiscente SuperSignal (Pierce; Illinois, USA) y revelada en un filme de rayos X.

La proteína β-actina fue usada como control interno, utilizando el mismo procedimiento descrito. La membrana se incubó toda la noche con el anticuerpo monoclonal de ratón Anti-β-Actina en dilución 1: 3300 (Sigma, St. Louis, USA). El anticuerpo secundario se utilizó a una dilución de 1:1000 en solución de dilución (Anticuerpo policlonal conjugado de ratón HRP. Dako Cytomation; Glostrup, Dinamarca).

#### 4.8 PCR EN TIEMPO REAL

Cuantificación de la expresión del oncogén *Evi1* se realizó en las líneas DA-3 dep y DA-3 ind estable para la expresión de los plásmidos pRSP/*Evi1sh5*, pRSP/*Evi1sh7* mediante PCR en tiempo real.

Para cada línea celular se realizó una siembra de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células en botellas de  $25 \text{ cm}^3$ , las células fueron incubadas por 24h. Cada uno de los cultivo fue contado, ARN total fue extraído de aproximadamente  $7 \times 10^6$  células usando el reactivo TriZol (Invitrogen; California, USA) realizándose el procedimiento descrito por Invitrogen.

La calidad y concentración del ARN fue cuantificada por espectrofotometría (Nanodrop 2000. Thermo; Pierce; Illinois, USA) a 260 nm y absorbancia relativas 230 nm y 280 nm. Adicionalmente, la integridad del ARN extraído fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. El ARN fue tratado con la ADNasa RQ1 (Promega; Wisconsin, USA). Seguidamente, el ARN fue convertido a ADNc usando el kit para síntesis de ADNc de Fermentas (Maryland, USA) de acuerdo al protocolo sugerido por ellos.

Finalmente la PCR cuantitativa se realizo adicionando 2  $\mu\text{l}$  de ADNc e iniciadores hacia adelante y reverso para *Evi1*, 5' GTGTGAAAACCTGTGCCAAGG 3' y 5' GATGTGCTTGTGCTGTTTGAG 3' respectivamente, a una concentración 200 nM para cada uno a 18  $\mu\text{l}$  de la mezcla qPCR Supermix Universal SYBR Green (Invitrogen; California, USA). Para el gen normalizador, GAPDH (del inglés, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), las concentraciones utilizadas fueron iguales a las descritas. Los iniciadores para GAPDH fueron 5' CATGAGAAGTATGACAACAGCCT 3' y 5' AGTCCTTCCACGATACCAAAGT, hacia adelante y reverso respectivamente.

El protocolo utilizado para la PCR de Evi1 y de GAPDH fue: de 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 30 s a 57,2°C, 1 min a 72°C, lectura del plato por 40 ciclos y curva de fusión de 40°C a 100°C. Los experimentos fueron corridos por triplicado en un DNA Engine Opticon® System (Biorad; California, USA). Para chequear los amplificadores producidos las muestras fueron corridas por electroforesis en gel de agarosa al 2% y curvas de disociación fueron llevadas a cabo para todos las PCRs.

Los datos de fluorescencia obtenidos desde la PCR fueron analizados en el programa LinRegPCR 12<sup>148</sup>. Este programa importa los datos sin línea base sustraída, luego preforma la línea base corregida para cada muestra por separado identificando en cada curva una ventana de linealidad y usando análisis de regresión lineal para determinar la eficiencia de la PCR por muestra de la pendiente de la regresión lineal. Con valores de eficiencia ( $E$ ), el ciclo umbral ( $C_t$ ) se procedió a realizar el análisis de cuantificación relativa.

El análisis para cuantificar relativamente la expresión génica para Evi1 se realizó por el método GED (del inglés, *Gene Expression's C<sub>T</sub> Difference*) descrito por Shefe y cols<sup>149</sup>. El nivel de expresión relativa para el gen de interés ( $rER$ ), definido como el nivel de expresión del gen de interés, en este caso *Evi1*, en la muestra de interés vs una muestra de referencia fue calculado mediante la **Fórmula 1**. Como valores de referencia se utilizó la media de la  $E$  y del  $C_t$  obtenidos de las muestras de las líneas DA-3 dep y DA-3 ind.

$$rER = \frac{R_{norm}(SOI)}{R_{norm}(ref)} = \frac{(1 + E(GOI))^{-\Delta C_T(GOI)}}{(1 + E(HKG))^{-\Delta C_T(HKG)}}$$

$$\Delta C_T(\text{gen}) = C_T(\text{gen}; SOI) - C_T(\text{gen}; ref)$$

**Fórmula 1.** Ecuación GED

#### **4.9 CURVA DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

Se determinaron curvas de proliferación para las líneas DA-3 dep y DA-3 ind estables para la expresión de los plásmidos pRSP/Evi1sh5, pRSP/Evi1sh7 y pRSP mediante pruebas de actividad metabólica utilizando el sustrato WST1 (Roche; Basilea, Suiza).

Para establecer el patrón de crecimiento se usaron dos procedimientos diferentes. En el primero, se sembraron las células en seis concentraciones seriadas (de 781 a 25.000 células/pozo) en platos de cultivo de 96 pozos, se incubaron por 48 h, se adicionó el reactivo de proliferación y se realizó lectura de las absorbancias a 450 nm el lector de placas Model 550 (Biorad). En el segundo procedimiento, las células fueron sembradas a una densidad de 4.000 células/pozo, y el reactivo se adicionó y leyó a las 24h, 48h, 72h y 96 h. Las lecturas de absorbancias se realizan de manera similar a la realizada en el primer experimento, es decir, luego de 4 horas de incubación, a 37° C en ausencia de luz, con el reactivo WST1.

Para cada curva de proliferación se realizaron tres ensayos, con diluciones en triplicado. Para el análisis de los datos se determinó desviación estándar, promedio y absorbancia, los resultados fueron graficados por dispersión de los datos.

#### **4.10 TRATAMIENTO CON CLOROFARABINA**

Líneas celulares DA-3 dep y DA-3 ind estables para la expresión de los plásmidos pRSP/Evi1sh5, pRSP/Evi1sh7 y pRSP sembradas en platos de 96 pozos a una densidad de 30,000 células/pozo en 100 µl fueron tratadas por 48 h con concentraciones seriadas de clorofarabina (Genzyme; Massachusetts, USA) (5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM y 0,625 µM). Luego de las 48 h se procedió a determinar la actividad metabólica utilizando el reactivo WST1, el reactivo se incubó con las células por 4 h y se realizó medición de las absorbancias. Con los datos obtenidos

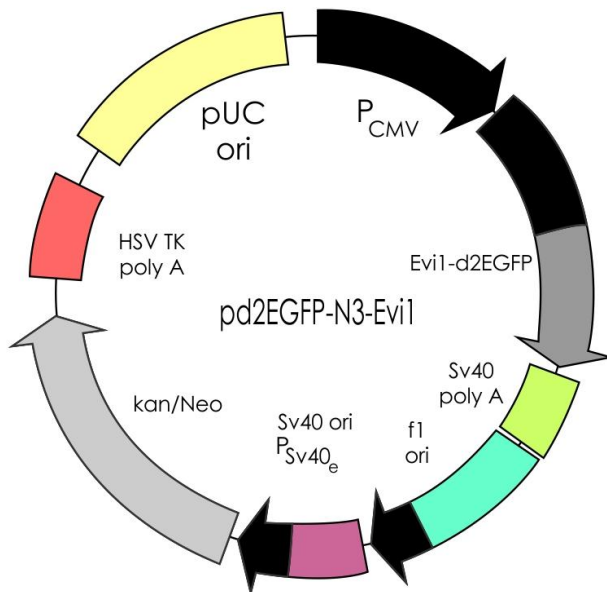
se determinó la concentración de clorofarabina necesaria para matar el 50% de la población celular (DL50). La dosis letal determinada se utilizó para el siguiente ensayo.

Para determinar proliferación en respuesta a la DL50 de clorofarabina dos reactivos de proliferación fueron analizados, WST1 y Wright, en experimentos por separado. Para cada experimento, las mismas líneas celulares mencionadas en el primer párrafo fueron sembradas en platos de 96 pozos a una concentración de 30.000 células/pozo y se realizó incubación de las células por 48 h con clorofarabina a una concentración de 2  $\mu$ M, la dosis letal 50. Pasadas las 48h se adicionó el reactivo de proliferación. Para WST-1, las absorbancias fueron leídas luego de 4 h de incubación. Para Wright, la viabilidad celular fue determinada mediante lectura por triplicado en un microscopio óptico de un total de 100 células, en las cuales se observó la capacidad de la membrana celular de ser permeable o no al reactivo Wright.

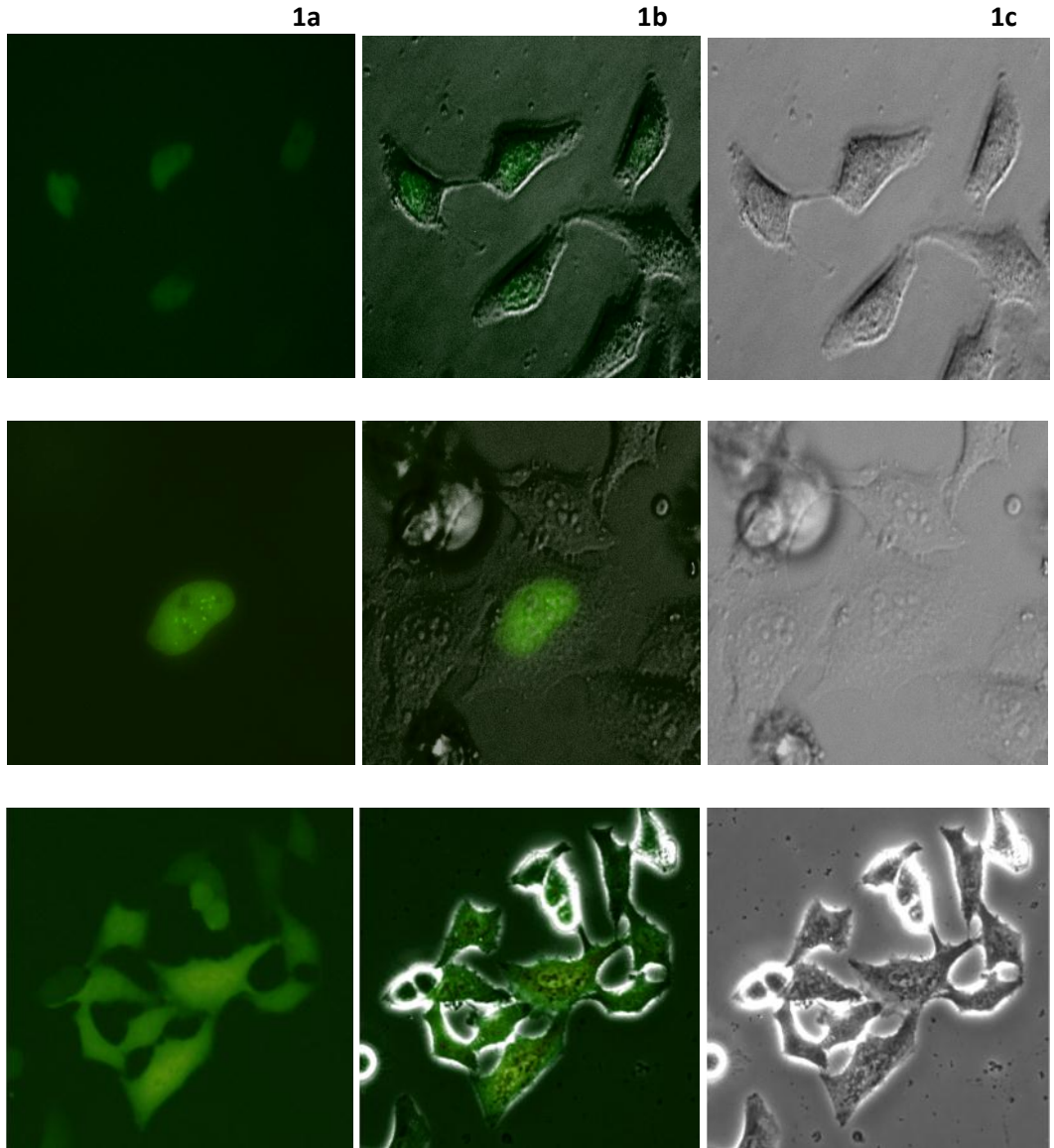
## 5. RESULTADOS

### 5.1 EL VECTOR pd2EGFP-N3-Evi1 EXPRESA NIVELES SUFICIENTES DE LA PROTEINA FUSIÓN EVI1-d2EGFP COMO PARA SER UTILIZADO COMO VECTOR REPORTERO

La funcionalidad del vector reportero pd2EGFP-N3-Evi1 (**Figura 2**), fue analizada en células HeLa transfectadas transitoriamente. Las células transfectadas con el plásmido pd2EGFP-N3-Evi1 exhiben una señal fluorescente de localización estrictamente restringida al núcleo (**Figura 3**, paneles 1 y 2), mientras que las células transfectadas con el plásmido pd2EGFPN3 muestran una señal fluorescente localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células (**Figura 3** paneles 3). En este ensayo la intensidad de la fluorescencia de la proteína Evi1-d2EGFP mostró una proporción relativamente baja con respecto a la fluorescencia de la d2EGFP. Sin embargo, el nivel de expresión del vector pd2EGFP-N3-Evi1 es suficiente como para ser utilizado como un vector reportero en ensayos de citometría de flujo (**Figura 4**) e inmunoelectrotransferencia (**Figura 5**).



**Figura 2.** Características generales del constructo pd2EGFP-N3-Evi1. pCMV: promotor de citomegalovirus; Evi1-d2EGFP: ADNc para la proteína fusión Evi1-d2EGFP; SV 40 poly A: señal de poliadenilación; f1 ori: origen de replicación; Kan/Neo: gen de resistencia a neomicina y kanamicina; HSV TK poly A: señal de poliadenilación de la timidina quinasa del virus del herpes simple; pUC ori: origen de replicación del pUC19.



**Figura 3.** *Expresión y localización de la proteína reportera Evi1-d2EGFP.* En los paneles 1 y 2 se observa claramente la localización nuclear de la proteína Evi1-d2EGFP. En el panel 3 (control) se observa la localización nuclear y citoplasmática de la d2EGFP en células HeLa transfectadas con el vector pd2EGFP-N3.






## 5.2 LOS TRANSCRIPTOS DEL GEN *Evi-1* MURINO PRESENTAN UN BUEN NUMERO DE SECUENCIAS CON CARACTERISTICAS DE BLANCOS APROPIADOS PARA SU SILENCIAMIENTO MEDIANTE ARNi.

Al ser introducida la secuencia del ADNc de *Evi1* en el programa de computación siDirect<sup>144</sup> para la identificación de blancos apropiados para silenciamiento de la expresión del gen con moléculas siARN, se obtuvieron un total de 22 secuencias de ARNi contra la secuencia que codifica para el gen *Evi1* de ratón.

Estas secuencias se presentan en la **Tabla 3** como un cuadro comparativo en la que se relacionan diversas características, entre ellas su complementariedad con el gen *EVI1* humano y otras que son requerimientos para su selección como blancos apropiados de ARNi. Las secuencias para la generación de los diferentes siARN se seleccionaron entre aquellas que presentaban las siguientes características: (i) no redundancia en el genoma del ratón y el humano, (ii) mayor número de nucleótidos diferentes respecto a secuencias similares en otra región del genoma y (iii) preferiblemente con complementariedad del 100% para el gen *EVI1* en humano.

De las ocho secuencias que cumplían las características deseadas, se escogió al azar cinco de ellas (**Tabla 3**, secuencias números 1, 4, 5, 7 y 8)

Las secuencias elegidas fueron utilizadas para diseñar constructos codificadores de shRNA portadores de los respectivos siARN para la liberación intracelular de los mismos (**Tabla 4**). Los segmentos de ADN codificadores de los shRNAs fueron sintetizados comercialmente y subclonados en el vector comercial pRetro.Super.puro *stuffer* para generar los vectores pRSP/Evi1sh1, pRSP/Evi1sh4, pRSP/Evi1sh5, pRSP/Evi1sh7 y pRSP/Evi1sh8 (estos vectores fueron denominados con la misma designación numeral de las secuencias seleccionadas)

	Ubicación en la secuencia AJ001482	Secuencia	No Redundan		Diferencia de nucleótidos respecto a secuencias similares en otras partes del genoma.	secuencia presente en 	ARNi	
								
	169 - 191	TGGAGGAGGACTTGCAACAAAAC	No	Si	> 3	x	x	x
1	492 - 514	TGCCCCGAGTGTGGTAAAACATT	Si	Si	> 3	x	√	x
2	686 - 708	CAGCACTACGTCTTCTTAAATA	Si	Si	> 2	√	√	√
3	689 - 711	CACTACGTCTTCTTAAATAAAC	Si	Si	> 2	√	√	√
4	692 - 714	TACGTCTTCTTAAATAAACACA	Si	No	> 3	√	√	x
5	782 - 804	TGGAACCCCAGCTATGGATAAAA	Si	Si	> 3	√	√	√
	892 - 914	CAGCTCTGGATTTTCTTTAGC	Si	No	> 2	x	√	x
6	942 - 964	TACCACAGGCCTCCTTTGATACC	Si	Si	> 2	√	√	√
	963 - 985	TACCACAGGCCTCCTTTGATACC	Si	Si	> 2	x	√	x
	976 - 998	CTGTAAAGGATTATCAAGTACC	Si	No	> 2	x	√	x
	989 - 1011	ATCAAGTACCGAACAGTCAAACA	No	Si	> 2	x	x	x
	992 - 1014	AAGTACCGAACAGTCAAACAAT	Si	Si	> 2	x	√	x
	1026 - 1048	CTCTTGACACATCCTCAGATACT	No	Si	> 1	x	x	x
	1052 - 1074	AGCTACACAGGATATTTGAAGG	Si	No	> 2	x	√	x
	1439 - 1461	TGCGTCTATTGCTGAAAAACT	No	Si	> 1	x	x	x
	1543 - 1565	TTCCAGCATTCTCAATCAATG	Si	No	> 2	x	√	x
	1563 - 1585	ATGTACCCATTTCTGATAGAGA	No	Si	> 1	√	x	√
7	1917 - 1939	ATGGACCCCATTTATAGAGTAGA	Si	No	> 3	x	√	x
	1994 - 2016	TTCTCCAGGATTCTGTTTCACC	Si	No	> 2	x	√	x
	2370 - 2392	AAGCCATTTAAGTGTCATTTATG	Si	Si	> 2	x	√	x
8	2507 - 2529	CGCAATCCTGGATGACAAAGAAG	Si	No	> 3	x	√	x
	2615 - 2637	TGGCAGTCACTTCAAGGATAAAA	Si	Si	> 2	x	√	x

**Tabla 3.** Características de las secuencias de siARN contra *Evi1* obtenidas con el programa *siDirect*. Las secuencias resaltadas en azul reúnen características ideales y son específicas contra *Evi1* de ratón, en verde se resaltan las secuencias con características ideales y que comparten identidad en genes murino y humano.

Evi1 sh1	gatccccCCCGAGTGTGGTAAACAttcaagagaTGTTTTACCACACTCGGGGtttttgaaa
Evi1 sh4	gatccccCGTCTTCCTTAAATAAACAttcaagagaTGTTTTATTTAAGGAAGACGtttttgaaa
Evi1 sh5	gatccccGAACCCAGCTATGGATAAttcaagagaTTATCCATAGCTGGGGTTCtttttgaaa
Evi1 sh7	gatccccGGACCCATTTATAGAGTAttcaagagaTACTCTATAAATGGGGTCCtttttgaaa
Evi1 sh8	gatccccCAATCCTGGATGACAAAGAttcaagagaTCTTTGTCATCCAGGATTGtttttgaaa

**Tabla 4.** Oligos diseñados a partir de las secuencias de ARNi contra *Evi1* seleccionadas

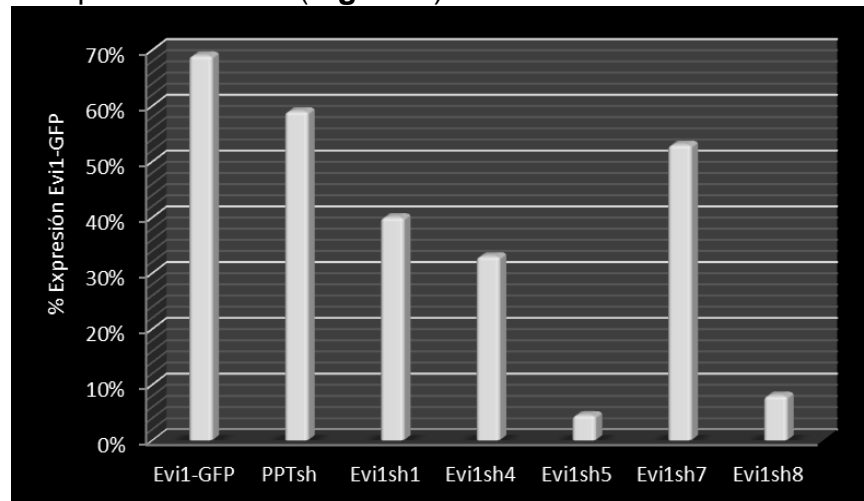
### 5.3 DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE DIVERSAS SECUENCIAS DE siARN CONTRA *Evi1* SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA DE FUSIÓN EVI1-d2EGFP

La eficiencia de la actividad inhibitoria de las secuencias de siARN contra *Evi1* fue evaluada en células 293T cotransfectadas con el plásmido pd2EGFP-N3-Evi1 y cada uno de los vectores que expresan los diferentes siARN contra *Evi1* (pRSP/Evi1sh1, pRSP/Evi1sh4, pRSP/Evi1sh5, pRSP/Evi1sh7 y pRSP/Evi1sh8).

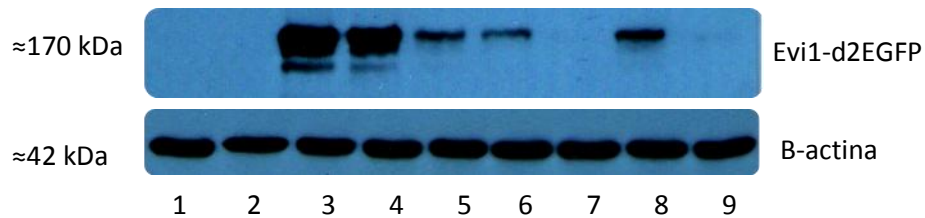
El análisis de los niveles de expresión del vector pd2EGFP-N3-Evi1 mediante la determinación de la proteína Evi1-d2EGFP, después de 48h de la cotransfección, por citometría de flujo mostró que todos los vectores portadores de secuencias codificadoras de shRNA para la liberación de siARN contra *Evi1* presentan algún nivel de actividad inhibitoria sobre la expresión del gen que codifica para proteína Evi1-d2EGFP. Dos de los 5 vectores evaluados (pRSP/Evi1sh5 y pRSP/Evi1sh8) presentaron porcentajes de inhibición, cercanos al 90% (**Figura 4**).

El análisis por inmunoelectrotransferencia mostró clara concordancia con los resultados obtenidas en el análisis por citometría de flujo. Los niveles de la proteína Evi1-d2EGFP presentes en extractos de proteínas totales de las células cotransfectadas mostraron que todos los siARN tienen algún nivel de actividad

inhibitoria de la expresión del gen reportero y que los ARNi liberados a partir de los vectores pRSP/Evi1sh5 y pRSP/Evi1sh8 bloquean casi completamente la expresión de la proteína fusión (**Figura 5**).



**Figura 4.** Niveles de expresión de la proteína de fusión *Evi1-d2EGFP* en células 293T cotransfectadas con el plásmido reportero *pd2EGFP-N3-Evi1* y cada uno de los vectores que expresan diferentes siARN contra ***Evi1***. Evi1-GFP: células transfectadas con el plásmido reportero únicamente; PPTsh: células cotransfectadas con *pd2EGFP-N3-Evi1* y un vector portador de un shRNA no relacionado; Evi1sh1, Evi1sh4, Evi1sh5, Evi1sh7 y Evi1sh8: células cotransfectadas con el vector *pd2EGFP-N3-Evi1* y los vectores que expresan diferentes siARN contra *Evi1*. Los porcentajes de fluorescencia se obtuvieron mediante análisis por citometría de flujo, la grafica representa uno de 2 experimentos con comportamiento similar



**Figura 5.** Niveles de la proteína *Evi1-d2EGFP* en extractos de proteínas totales obtenidos de células 293T cotransfectadas con el plásmido reportero *pd2EGFP-N3-Evi1* y cada uno de los vectores que expresan diferentes *siARN* contra *Evi1*. La fotografía muestra los resultados de la determinación de la proteína de fusión *Evi1-d2EGFP* mediante un ensayo de inmunoelectrotransferencia utilizando un anticuerpo específico contra GFP (panel superior) o un anticuerpo contra  $\beta$ -actina (panel inferior) como control de la concentración de proteínas totales. 1: células no transfectadas, 2: células transfectadas con el vector *pd2EGFPN3*, 3: células transfectadas con el plásmido *pd2EGFP-N3-Evi1*, 4: células cotransfectadas con los vectores *pd2EGFP-N3-Evi1* y el vector no relacionado, el *pRSP/PPTsh*, 5 - 9: células cotransfectadas con los plásmidos *pd2EGFP-N3-Evi1* y los vectores portadores de las secuencias codificadoras de los *shRNA*: *pRSP/Evi1sh1*, *Evi1sh4*, *Evi1sh5*, *Evi1sh7* y *Evi1sh8*. La gráfica muestra el resultado de uno de dos ensayos similares.

De acuerdo a los resultados anteriores la secuencia de *ARNi* descrita como *Evi1sh5* mostró la mayor capacidad inhibitoria de la expresión de la proteína de fusión *Evi1-d2EGFP* con una eficiencia de más del 90% mientras que la menor actividad inhibitoria se observó en la secuencia *Evi1sh7*. Por lo tanto, para los ensayos posteriores de evaluación del efecto inhibitorio de la expresión de *Evi1* sobre los patrones de proliferación y supervivencia de las células DA-3 dep y DA-3 ind se utilizaron los vectores portadores de estas secuencias, pues que estos podrían permitir observar el efecto dosis respuesta del *ARNi* sobre *Evi1*.

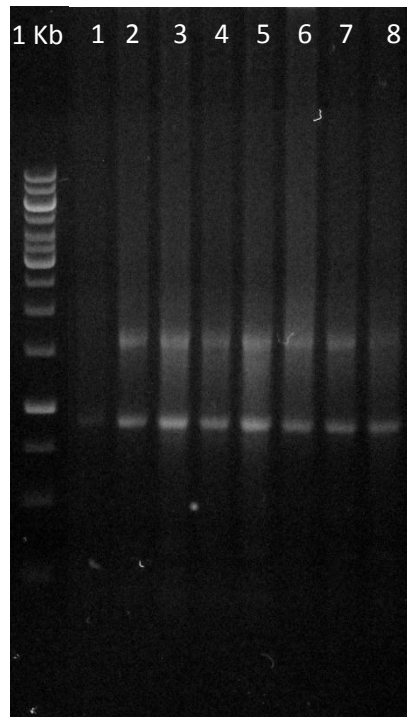
#### 5.4 EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *Evi1* EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS DA-3

Líneas DA-3 dep y DA-3 ind se modificaron genéticamente para que expresen establemente las secuencias de shRNA portadas en los plásmidos pRSP, pRSP/*Evi1sh5* y pRSP/*Evi1sh7* mediante transfección y selección con el marcador de resistencia a puromicina. De esta manera se generaron diversas líneas celulares en las cuales se evaluaron los niveles de expresión de *Evi1* mediante una técnica semicuantitativa de PCR en tiempo real.

En la **Tabla 5** se nombran las diferentes líneas generadas y en la misma se indican las concentraciones y la pureza del ARN obtenido de los cultivos de estas células y en la **Figura 6** se observa la integridad del mismo.

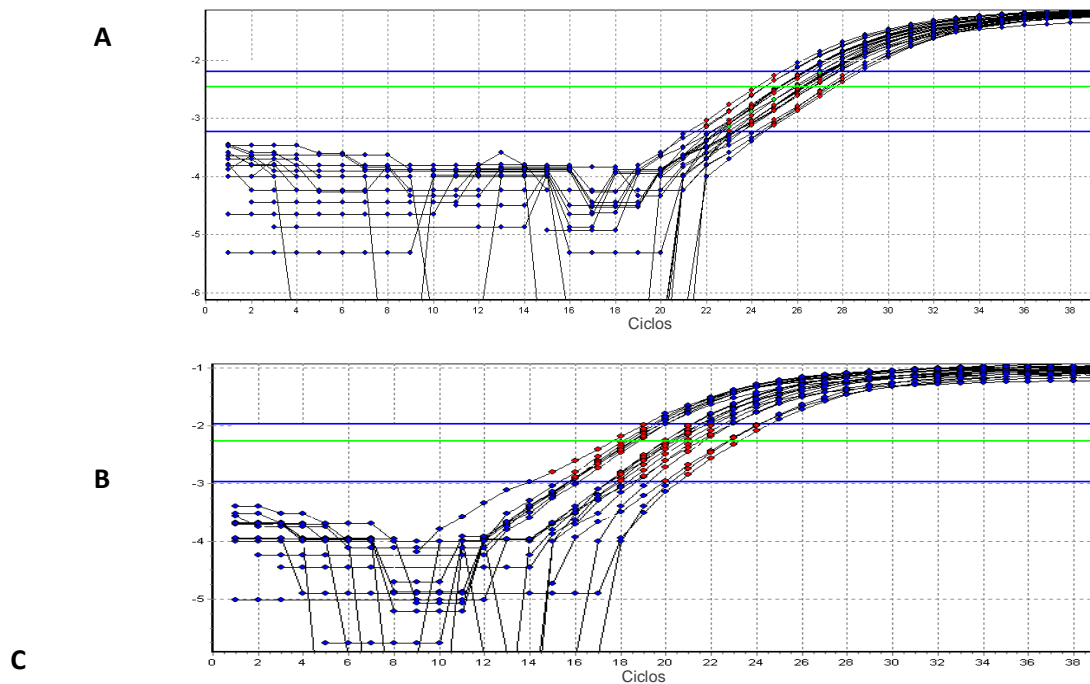
	[ ] ng/μl	260/280
DA-3 dependiente	393	2,08
DA-3 dep / pSuper.retro.puro	218	2,08
DA-3 dep / pSuper.retro.puro/ <i>Evi1sh5</i>	254	2,08
DA-3 dep / pSuper.retro.puro/ <i>Evi1sh7</i>	192	2,05
DA-3 independiente	216	2,1
DA-3 ind / pSuper.retro.puro	64	2,02
DA-3 ind / pSuper.retro.puro/ <i>Evi1sh5</i>	363	2,09
DA-3 ind / pSuper.retro.puro/ <i>Evi1sh7</i>	92	2

**Tabla 5.** Líneas celulares generadas de las células DA-3 dep y DA-3 ind mediante modificación con diferentes plásmidos que portan secuencias codificadoras de shRNA contra *Evi1*.



**Figura 6.** Aislamiento de ARN total a partir de cultivos de líneas celulares generadas de las células DA-3 dep y DA-3 ind mediante modificación con diferentes plásmidos que portan secuencias codificadoras de shRNA contra **Evi1**. La fotografía muestra la integridad de las bandas de ARNr 28s y 18s visualizadas por electroforesis de agarosa. 1 Kb: Marcador de peso molecular; Líneas 1 – 4: células DA-3 independientes de GM-CSF, (1) transfectadas establemente con el vector pSuper.retro.puro, (2) sin transfectar, (3 y 4 ) transfectadas establemente con los vectores pSuper.retro.puro/Evi1sh5 y pSuper.retro.puro/Evi1sh7, respectivamente; líneas 5 – 8: células DA-3 dependientes de GM-CSF, (5) sin transfectar, (6, 7 y 8) transfectadas establemente con los vectores pSuper.retro.puro, pSuper.retro.puro/Evi1sh5 y pSuper.retro.puro/Evi1sh7, respectivamente.

A partir de los datos de fluorescencia obtenidos para cada ciclo por PCR se determinó mediante el programa LinRegPCR 12<sup>148</sup> la lineal basal y los valores de eficiencia ( $E$ ) y ciclo umbral ( $C_t$ ) para muestra (**Figura 7**).

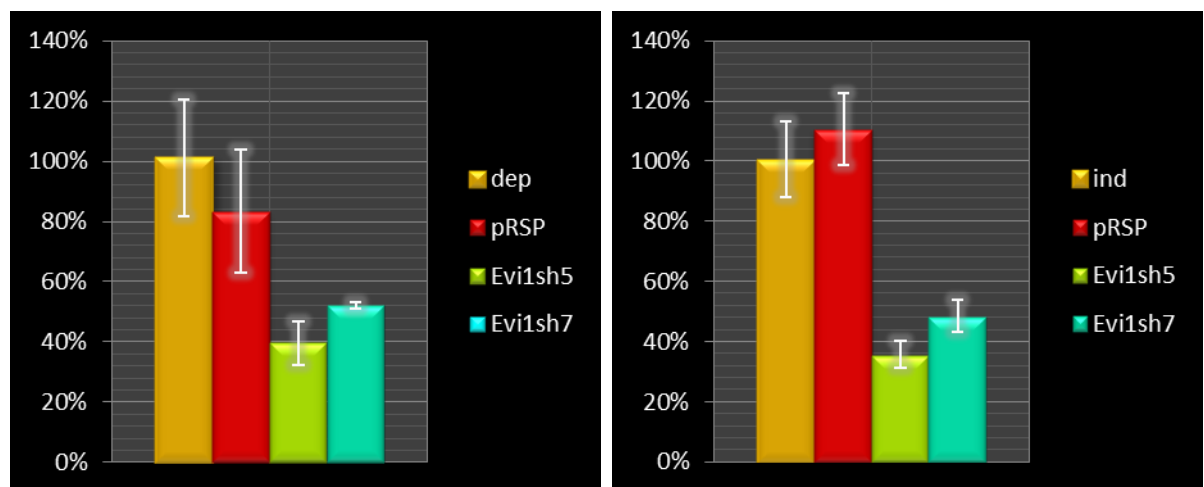


<i>Evi1</i>	1	2	3	$\chi E$	<i>S E</i>	1	2	3	$\chi C_t$	<i>S C_t</i>
DA-3 dep	0,690	0,815	0,797	0,767	0,06769	25,668	25,192	25,011	25,290	0,33950
pRSP	0,798	0,703	0,724	0,742	0,04974	26,267	26,393	27,109	26,589	0,45400
pRSP/ <i>Evi1sh5</i>	0,816	0,870	0,796	0,827	0,03840	24,955	25,581	25,171	25,236	0,31787
pRSP/ <i>Evi1sh7</i>	0,811	0,915	0,888	0,871	0,05430	24,948	24,997	25,036	24,994	0,04384
<b><i>GAPDH</i></b>										
DA-3 dep	0,828	0,842	ND	0,835	0,00991	20,020	19,981	ND	20,001	0,02802
pRSP	0,806	0,859	0,851	0,838	0,02847	20,950	20,569	21,308	20,942	0,36941
pRSP/ <i>Evi1sh5</i>	0,856	0,774	0,713	0,781	0,07191	18,327	18,132	18,668	18,376	0,27128
pRSP/ <i>Evi1sh7</i>	0,831	0,782	0,789	0,801	0,02675	18,498	18,495	18,833	18,608	0,19442
<i>Evi1</i>	1	2	3	$\chi E$	<i>S E</i>	1	2	3	$\chi C_t$	<i>S C_t</i>
DA-3 ind	0,859	0,815	0,853	0,842	0,02378	25,604	25,978	25,932	25,838	0,20388
pRSP	0,776	0,888	0,774	0,813	0,06556	27,212	27,036	27,398	27,215	0,18143
pRSP/ <i>Evi1sh5</i>	0,795	0,808	0,856	0,820	0,03217	23,976	24,337	24,321	24,211	0,20370
pRSP/ <i>Evi1sh7</i>	0,781	0,784	0,781	0,782	0,00150	26,038	26,046	26,374	26,153	0,19190
<b><i>GAPDH</i></b>										
DA-3 ind	0,611	0,740	0,836	0,729	0,11324	21,033	21,492	21,390	21,305	0,24144
pRSP	0,740	0,784	0,796	0,773	0,02949	22,784	22,878	23,268	22,977	0,25668
pRSP/ <i>Evi1sh5</i>	0,628	ND	ND	0,628	ND	17,654	ND	ND	17,654	ND
pRSP/ <i>Evi1sh7</i>	0,874	0,780	0,741	0,798	0,06836	20,307	20,203	20,433	20,314	0,11512

**Figura 7.** Análisis de datos de PCR en tiempo real. Línea basal (en verde) corregida para las amplificaciones de los genes *Evi1* (A) y *GAPDH* (B). C) Determinaciones de eficiencia (E) y ciclo umbral ( $C_t$ ) para las diferentes replicas con las respectivas medias ( $\chi$ ) y desviaciones estándares (S) para cada muestra.

Los valores de  $E$  y  $C_t$  fueron utilizados para calcular, los niveles de expresión de *Evi1* en relación a *GAPDH* de las diferentes líneas celulares modificadas genéticamente relativa a la expresión de *Evi1* en relación a *GAPDH* en las líneas DA-3 no modificadas (**Figura 8**).

En los niveles de expresión relativa de *Evi1*, por PCR en tiempo real, en las líneas celulares derivadas de las células DA-3 dep se observa una inhibición del 60% de la expresión de este oncogén en las células que expresan el shRNA Evi1sh5, y del 48%, para las líneas que expresan el shRNA Evi1sh7.



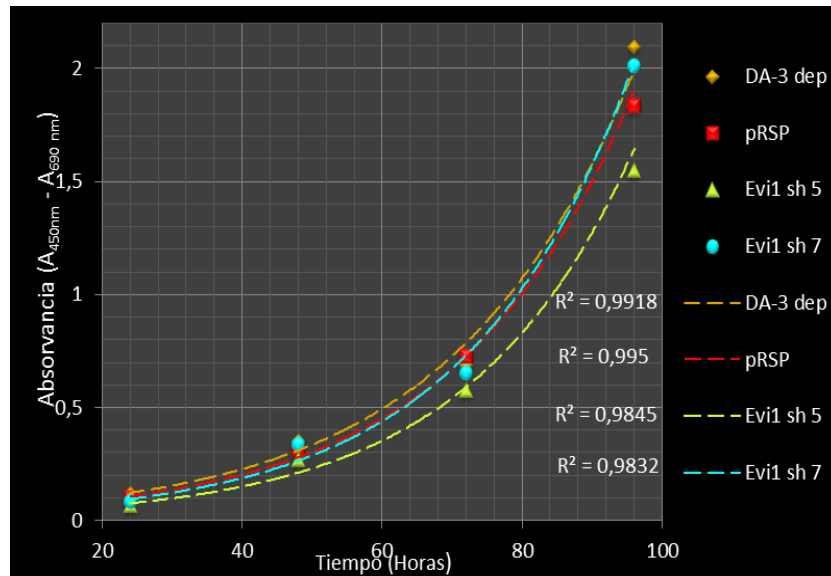
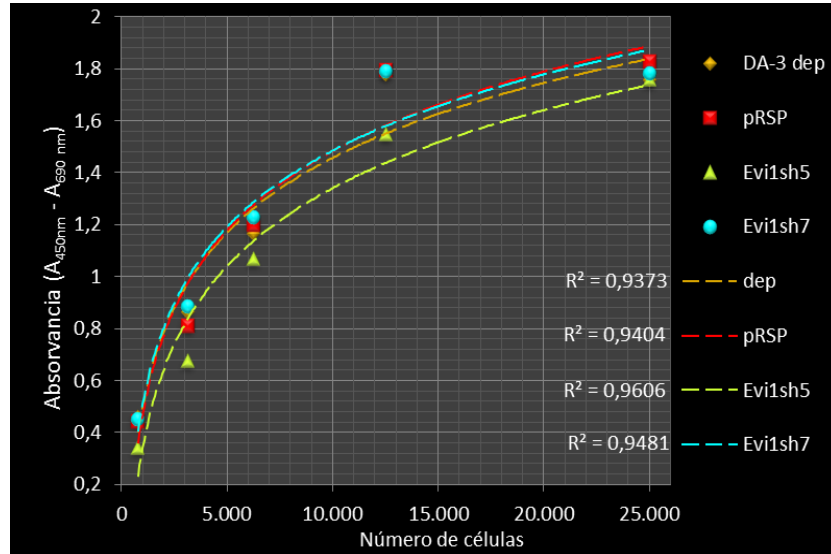
**Figura 8.** Niveles de expresión relativa del oncogén *Evi1* en relación al gen *GAPDH* en: **A.** líneas celulares DA-3 dep sin modificar (dep) y modificadas establemente con los vectores pRSP (pRSP), pRSP/Evi1sh5 (Evi1sh5) y pRSP/Evi1sh7 (Evi1sh7) y **B.** líneas DA-3 ind sin modificar (dep) y modificadas establemente con pRSP (pRSP), pRSP/Evi1sh5 (Evi1sh5) y pRSP/Evi1sh7 (Evi1sh7).

En las líneas celulares derivadas de las células DA-3 dep, las DA-3 ind, se observó un comportamiento similar con una inhibición de la expresión de *Evi1* del 64% en las células que expresan el shRNA Evi1sh5, y del 52%, en la línea que

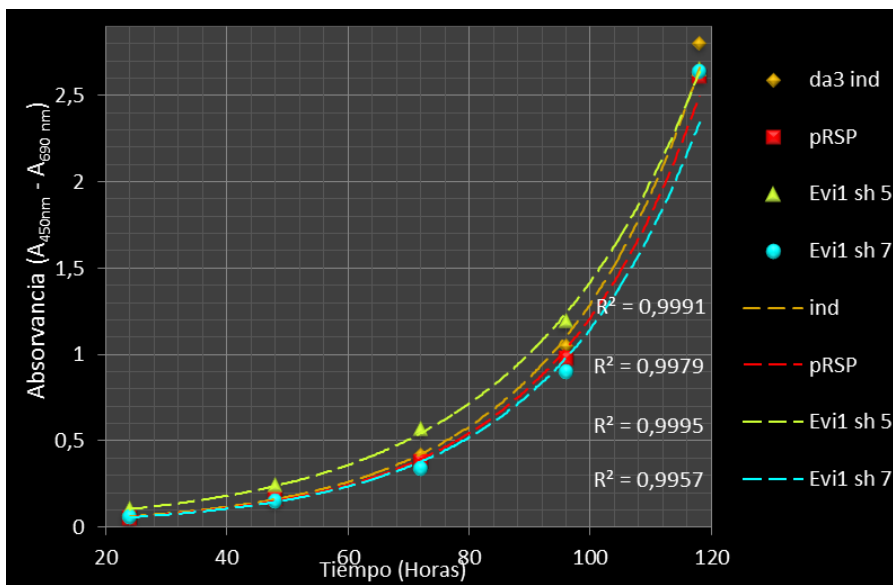
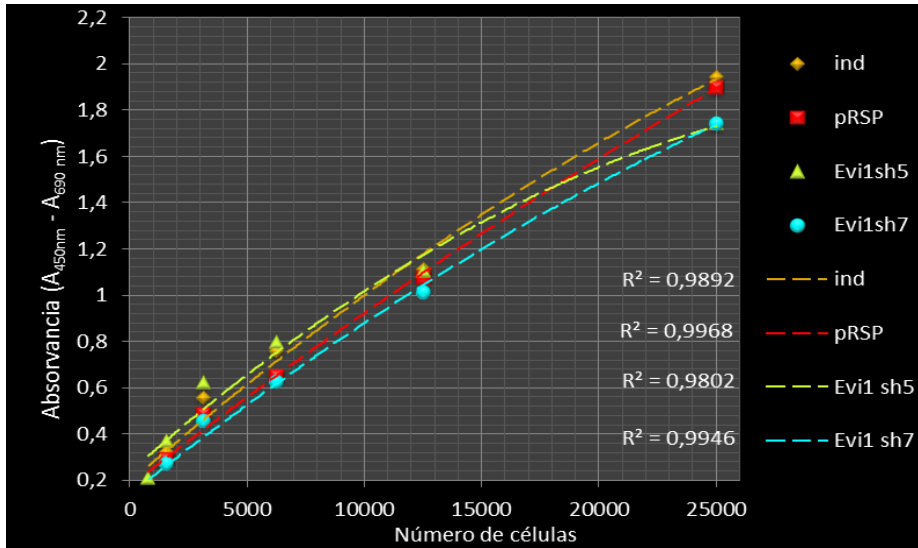
expresa el shRNA Evi1sh7. Pese a que al igual que en los experimentos de cotransfección transitoria, en células 293T, la secuencia de ARNi número 5 es más eficiente para la inhibición de la expresión de *Evi1* que la secuencia número 7, en las líneas celulares derivadas de los dos tipos de células DA-3 se observa una disminución considerable de la actividad inhibitoria del shRNA 5. En el caso del shRNA 7, la actividad inhibitoria aumento en las células DA-3 a comparación de los experimentos en células 293T.

Luego de realizada la cuantificación relativa de la expresión de *Evi1* en las diferentes líneas celulares, para determinar el efecto que pudiera tener la inhibición de *Evi1*, a los niveles observados, sobre los patrones de proliferación y supervivencia celular de las líneas DA-3 dep y DA-3 ind, se generaron curvas de proliferación de las células derivadas de las dos líneas que expresan establemente los vectores pRSP, pRSP/Evi1sh5 y pRSP/Evi1sh7.

En estos experimentos, los patrones de crecimiento de las líneas parentales DA-3 dependientes e independientes de GM-CSF fueron muy similares a los de las líneas que expresan establemente shRNA contra Ev1 (**Figura 9** y **Figura 10**). Sin embargo, la línea celular DA-3 dep que expresa establemente el shRNA de mayor actividad inhibitoria contra Evi1 (pRSP/Evi1sh5) presentó consistentemente un nivel de crecimiento levemente menor en comparación con las demás líneas analizadas (**Figura 9**). Aunque el efecto inhibitorio de la proliferación celular asociado al shRNA Evi1sh5 es muy discreto en comparación con las demás líneas celulares, estos resultados están en concordancia con la eficiencia inhibitoria de la expresión de *Evi1* determinada tanto en el modelo del vector reportero como en los experimentos de PCR en tiempo real.



**Figura 9.** Patrones de proliferación de líneas celulares DA-3 dep y DA-3 ind modificadas establemente con los vectores pRSP (pRSP), pRSP/Evi1sh5 (Evi1sh5) y pRSP/Evi1sh7 (Evi1sh7). **a)** Proliferación después de 48h de cultivos celulares con diferente número de células. **b)** Proliferación de cultivos celulares de igual número de células determinada cada 24 horas. Las gráficas muestran las líneas de tendencia de la curva de proliferación de cada línea celular generada a partir del promedio de las DO registrada a 450nm (puntos) de los diferentes cultivos después de ser tratados con WST1 por 4 h. Para cada línea de tendencia se presenta la R correspondiente al nivel de ajuste de la línea con respecto a los valores de cada punto



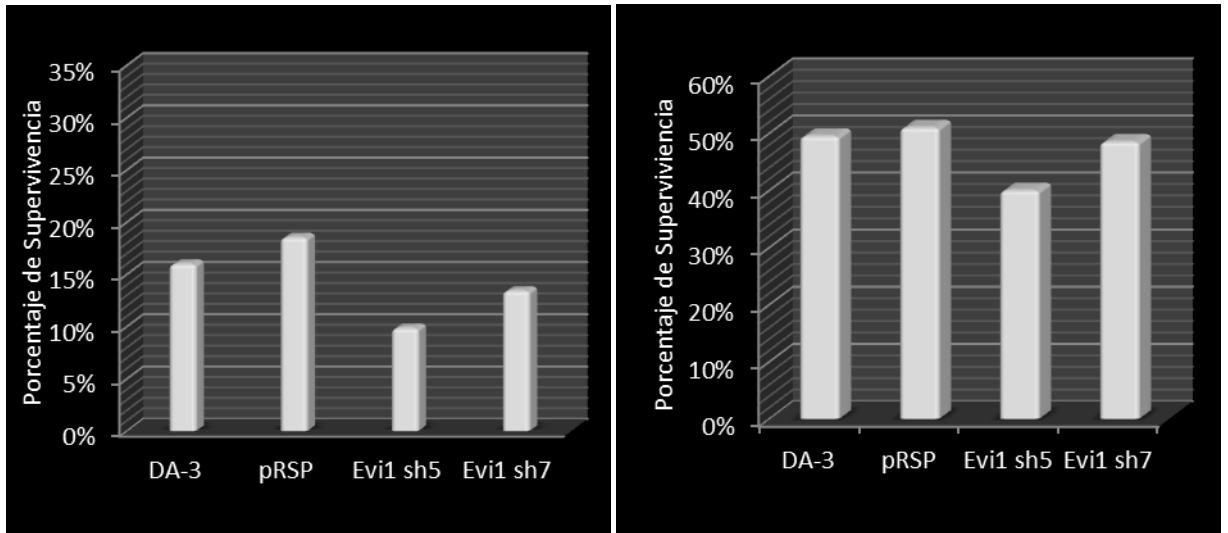
**Figura 10.** Patrones de proliferación de líneas celulares DA-3 ind y DA-3 ind modificadas establemente con los vectores pRSP (pRSP), pRSP/Evi1sh5 (Evi1sh5) y pRSP/Evi1sh7 (Evi1sh7). **a)** Proliferación después de 48h de cultivos celulares con diferente número de células. **b)** Proliferación de cultivos celulares de igual número de células determinada cada 24 horas. Las gráficas muestran las líneas de tendencia de la curva de proliferación de cada línea celular generada a partir del promedio de las DO registrada a 450nm (puntos) de los diferentes cultivos. Para cada línea de tendencia se presenta la R correspondiente al nivel de ajuste de la línea con respecto a los valores de cada punto.

Los anteriores hallazgos sugieren que la inhibición de la expresión de *Evi1* en las líneas celulares DA-3 dep y DA-3 ind, al menos en un porcentaje no superior al 60%, no afecta de manera importante la capacidad proliferativa de estas dos líneas celulares.

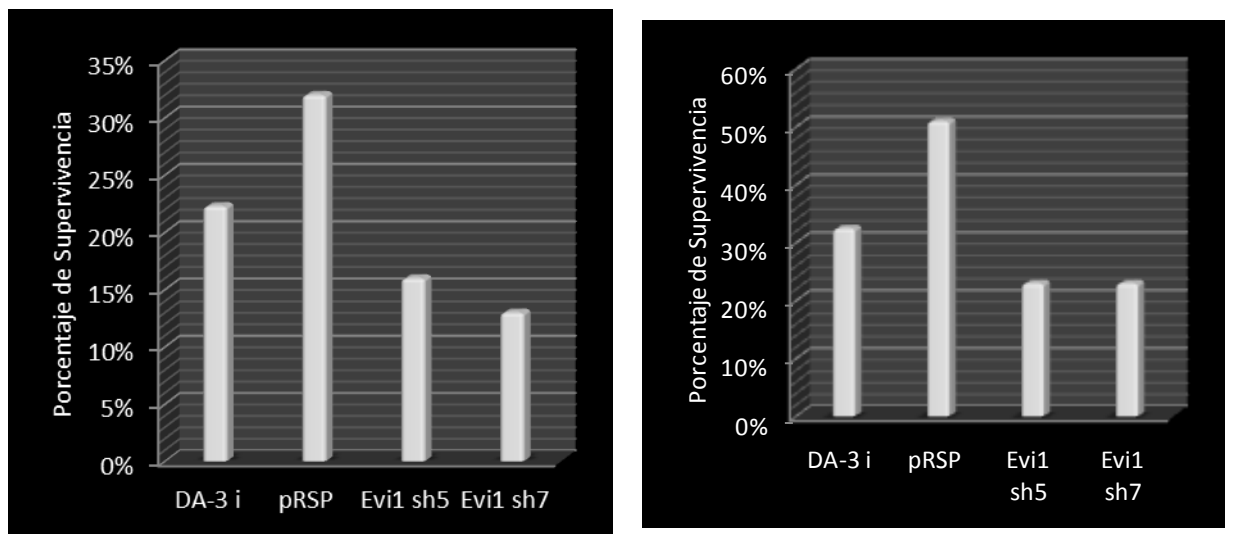
### **5.5 EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO SINÉRGICO EJERCIDO POR LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *Evi1* Y EL TRATAMIENTO CON CLOROFARABINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD DE LINEAS CÉLULARES DERIVADAS DE CELULAS DA-3.**

Para determinar si la inhibición de *Evi1* podría potenciar el efecto de drogas citotóxicas antileucémicas, en las líneas DA-3 dep e ind se realizaron cultivos de las diferentes líneas celulares modificadas establemente con los vectores que expresan shRNA contra *Evi1* en presencia de clorofarabina en el medio de cultivo a la concentración inhibitoria 50 (2 $\mu$ M, determinada anteriormente, datos no mostrados). Luego de 48 h de incubación de los diferentes cultivos se analizó viabilidad celular mediante el método de WST1 y la coloración Wright

En los cultivos de células DA-3 dependientes de GM-CSF se observó un efecto sinérgico moderado entre la inhibición de la expresión de *Evi1* por los shRNA Evi1sh5 y Evi1sh7 y el tratamiento con clorofarabina de aproximadamente 10% y 5%, respectivamente, por los diferentes métodos analizados (**Figura 11**). Un efecto similar pero mucho más marcado se observó en células DA-3 ind (**Figura 12**).



**Figura 11.** Efecto sinérgico sobre la inhibición de la proliferación de las células DA-3 dep ejercido por shRNA contra Evi1 y el tratamiento con clorofarabina. Las gráficas representan el porcentaje de supervivencia de las células de las diferentes líneas tratadas con respecto a células sin tratamiento. **A.** Medición de actividad metabólica con WST1; **B.** Determinación de la viabilidad celular mediante tinción de Wright.



**Figura 12.** Efecto sinérgico sobre la inhibición de la proliferación de las células DA-3 ind ejercido por shRNA contra Evi1 y el tratamiento con clorofarabina. Las gráficas representan el porcentaje de supervivencia de las células de las diferentes líneas tratadas con respecto a células sin tratamiento. **A.** Medición de actividad metabólica con WST1; **B.** Determinación de la viabilidad celular mediante tinción de Wright.

## 6. DISCUSIONES.

La expresión anormal de *EVI1* se ha visto asociado a alteraciones en: el ciclo celular<sup>54,55,59,62,74</sup>, la proliferación<sup>53,63-65</sup>, la susceptibilidad a la apoptosis<sup>56,60,66,68,73</sup> y los procesos de diferenciación celular<sup>46,77,79,80,82,85,86</sup>. Estas alteraciones pueden estar asociadas, en ocasiones, a mecanismos epigenéticos, los cuales pueden también verse afectados por la expresión aberrante de *EVI1*<sup>82,84,90-93</sup>. Las observaciones relacionadas con la capacidad de *EVI1* para alterar los diferentes mecanismos de control de la proliferación y supervivencia celular sumadas a la asociación de la expresión de *EVI1* con resistencia al tratamiento en LMA-*EVI1*<sup>+14-17</sup> sugieren un papel importante para este oncogén en los mecanismos de leucogénesis.

De otro lado, nuestro modelo murino de LMA-*Evi1*<sup>+</sup>, en donde a partir de una línea celular con una única lesión preleucémica -la sobre-expresión de *Evi1*- estimulada en un ambiente de inflamación crónica se obtiene una línea descendiente tumoral independiente de factores de crecimiento, permite proponer la hipótesis de que si bien la sobre-expresión de *Evi1* por si sola no es suficiente, si es determinante para conferir un fenotipo de transformación tumoral.

Por lo anterior, sería razonable esperar que la inhibición de la expresión del oncogén *Evi1*, mediante ARNi, en la línea celular mielóide murina parental preleucémica *Evi1*<sup>+</sup> (DA-3 dep) y en su descendiente con fenotipo leucémico completo (DA-3 ind), tuviese un efecto negativo en la capacidad proliferativa de estas células y al mismo tiempo se asociara con un incremento en la susceptibilidad a la apoptosis y al efecto citotóxico a drogas antileucémicas.

La metodología de elección actual para estudios del efecto de la inhibición de oncogenes en modelos de tumores es el ARNi. Una de los métodos convencionales para la evaluación de la eficiencia de secuencias ARNi contra un

blanco determinado es la utilización de genes reporteros que codifiquen para una proteína de fusión en donde la proteína de interés se sintetice fusionada a otra proteína fácilmente detectable (revisado en <sup>150</sup>).

La proteína fluorescente verde ha sido ampliamente utilizada como proteína marcadora; esta es una proteína fácil de detectar y altamente estable, lo cual permite, cuando se sintetiza fusionada a una proteína de interés, una fácil localización y cuantificación de esta última. Sin embargo, esta alta estabilidad, con una vida media de aproximadamente 24 h *in vivo*<sup>151</sup>, también limita su aplicación en estudios que requieren un reciclamiento rápido de la proteína reportera. Li y cols. crearon una variante de GFP desestabilizada, la d2EGFP, la cual tiene una vida media de fluorescencia de tan solo 2 h<sup>152</sup>. Por lo anterior en nuestro estudio decidimos utilizar esta variante para la construcción del vector reportero d2EGFP-N3-Evi1, con el fin de monitorear la eficiencia del tratamiento con ARNi para inhibir la expresión de *Evi1*. El diseño se realizó teniendo en cuenta el orden de las proteínas; la secuencia que codifica para la proteína Evi1, se inserto al inicio y en marco abierto de lectura con la secuencia que codifica para la proteína reportera. La ubicación hacia el extremo C-terminal de la proteína d2EGFP garantiza, con mayor probabilidad, que la visualización de la fluorescencia sea debido a la expresión correcta de la proteína de fusión.

Experimentos de transfección con el vector reportero pd2EGFP-N3-Evi1 evidenciaron la expresión de una proteína fluorescente con una localización restringida al nucleó. Este resultado concuerda con la función de factor regulador de la transcripción y la localización nuclear de Evi1, reportada en trabajos anteriores<sup>35</sup>. Adicionalmente en los ensayos de inmunoelectrotransferencia con extractos de proteínas obtenidos de estas células, se detecto con anticuerpos contra la proteína GFP, un péptido de aproximadamente 170 kDa, el cual concuerda con la sumatoria del peso molecular de la proteína Evi1 (145 kDa)<sup>29</sup>, y

de la proteína marcadora d2EGFP (31 kDa<sup>152</sup>) que corresponde a la de la proteína de fusión Evi1-GFP.

La nueva proteína de fusión Evi1-d2EGFP exhibe una fluorescencia considerablemente más baja en comparación con la proteína d2EGFP. Lo anterior podría explicarse por dos posibles razones: **(i)** desafortunadamente durante el proceso de clonación se omitió incluir con el segmento de *Evi1* la secuencia consenso de Kozak<sup>153</sup>; se ha demostrado que mutaciones en esta secuencia pueden alterar la expresión de proteínas reporteras<sup>154</sup> y **(ii)** es posible que el tamaño del gen de fusión, de aproximadamente 4 kb, limite la expresión de este. Sin embargo, pese a la disminución de la fluorescencia observada por microscopia de luz UV en la proteína de fusión con respecto al control, los resultados de los análisis por citometría de flujo e inmunoelectrotransferencia muestran unos niveles de fluorescencia y una cantidad de proteína aceptables. Por lo tanto consideramos que la fluorescencia obtenida es suficiente para la función reportera de esta proteína y para monitorear el efecto inhibitorio de la expresión Evi1 por medio de ARNi.

Para la selección de secuencias de ARNi contra el oncogén *Evi1* nosotros consideramos, idealmente, aquellas secuencias que, además de cumplir todas las reglas clásicas aceptadas para la selección de secuencias de ARNi, tuviesen identidad del 100% con la secuencia del gen *EVI1* humano con el fin de que la secuencias pudiesen ser utilizadas, en posteriores ensayos, con células humanas. A pesar de la similitud de las secuencias de este oncogén (94%) entre los genes humano y de ratón<sup>28,29</sup>, solo la mitad de las secuencias obtenidas por el programa siDirect fueron idénticas con la secuencia *EVI1* humano. Esta limitación, nos llevó a elegir las secuencias más apropiadas indistintamente del criterio de identidad con la secuencia humana. De las 8 secuencias seleccionadas, por otro tipo criterios, solo se pudieron evaluar 5 de ellas. La selección de esta secuencias se realizó al azar considerando estudios que demuestran que aunque una secuencias

cumpla con todas las reglas de selección no se garantiza una alta eficiencia y que usualmente es necesaria la evaluación de tres o cuatro secuencias para obtener al menos una con alta funcionalidad<sup>155</sup>. La evaluación de la actividad inhibitoria de las 5 secuencias seleccionadas en ensayos con el vector reportero en células 293T mostró que dos de las 5 moléculas seleccionadas presentan alta actividad inhibitoria, mayor del 90%. Estos resultados fueron altamente concordantes en las evaluaciones por citometría de flujo e inmunoelectrotransferencia. Actualmente, existen bases de datos de ARNi alimentadas con secuencia validadas *in vitro*<sup>156</sup>, este tipo de herramientas aumenta la probabilidad de elegir secuencias funcionales.

La secuencia que presentó la mayor actividad inhibitoria se seleccionó para realizar la evaluación del efecto de la inhibición del oncogén *Evi1* sobre el crecimiento las células DA-3 dep y DA-3 ind. Se sabe que estudios de inhibición de genes relevantes para la supervivencia y proliferación celular, deben realizarse, preferencialmente, mediante sistemas de vectores de expresión génica condicional con el fin de evitar la inhibición abrupta de dichos genes (revisado en <sup>157</sup>).

Desafortunadamente nuestros sistemas de vectores de expresión condicional no fueron funcionales (datos no mostrados). Ante esta limitación, optamos por una aproximación estratégica mediante la utilización de una secuencia control de baja eficiencia inhibitoria (*Evi1sh7*). En estas condiciones, se esperaría que si la inhibición de *Evi1* es letal para estas células, estas, al ser modificadas con el vector pRSP/*Evi1sh5*, no sobrevivieran a lo largo del proceso de selección con el marcador de resistencia, mientras que las células modificadas con el vector de baja eficiencia inhibitoria (pRSP/*Evi1sh7*) podrían sobrevivir, permitiendo, así, observar un efecto dosis respuesta de la inhibición de *Evi1* mediante ARNi. Sin embargo después de la transfección de los dos tipos de células DA-3 con los vectores pRSP/*Evi1sh5* y pRSP/*Evi1sh7* y un periodo de selección completo con

puromicina, fue posible seleccionar líneas celulares estables que expresan los shRNAs *Evi1sh5* o *Evi1sh7*. Estos resultados sugieren que la inhibición de la expresión de *Evi1* a niveles no mayores del 60%, al menos en este modelo, no fue letal para las células s DA-3 dep y DA-3 ind.

La medición de la expresión relativa de *Evi1*, por PCR en tiempo real, demostró una disminución muy similar de la expresión de *Evi1* tanto en líneas DA-3 dep como DA-3 ind modificadas establemente con el vector pRSP/*Evi1sh5*; los niveles de inhibición mediados por el vector pRSP/*Evi1sh7* fueron también muy similares en las dos líneas celulares. Sin embargo, la eficiencia de inhibición de los dos vectores son muy diferentes a la observada en células 293T. El vector pRSP/*Evi1sh5* mostró una actividad inhibitoria en las células DA-3 mucho menor que la observada en las células 293T. Por el contrario, la eficiencia de la inhibición de *Evi1* del vector pRSP/*Evi1sh7* fue mayor en las células DA-3 con respecto a la eficacia observada en células 293T.

Varias razones podrían explicar las observaciones anteriores:

- i) Durante el proceso de selección para la clonación de las líneas que expresan establemente shRNA contra *Evi1* es probable que se hayan seleccionado líneas celulares provenientes de clones completamente independientes o parcialmente dependientes de *Evi1* para su proliferación y supervivencia. Esto explicaría la clonación de células con niveles de expresión de *Evi1* menores del 40%
- ii) Es posible que niveles de expresión menores del 40% aun sean suficientes para garantizar la condición de inmortalidad de las líneas de células DA-3 dep y DA-3 ind.
- iii) En esta misma línea de razonamiento también pudiera darse que durante el proceso de selección se hayan seleccionado clones en las cuales los niveles de expresión del vector pRSP/*Evi1sh5* sea muy bajo y que aquellas clones en las

cuales el vector pRSP/Evi1sh5 se expresa eficientemente no hayan sobrevivido a los altos niveles de inhibición de la expresión de *Evi1*.

- iv) A excepción de la utilización de partículas virales para la transducción y la modificación celular estable con transgenes, los demás métodos, basados en la selección de transfectantes estables mediante marcadores de selección, no garantizan la inserción de todos los casetes de expresión del constructo en la misma célula; por lo tanto, es probable que aunque algunas líneas sean resistentes al fármaco selector o sea, en nuestro caso, que hayan insertado el transgen que confiere resistencia a la puomicina, no todas hayan insertado el casete para la expresión de moléculas de ARNi; en este caso pudiéramos tener en el cultivo seleccionado clonas de células resistentes a la droga selectora pero sin inhibición de *Evi1* y clonas resistentes y con expresión de shRNAs contra *Evi1*.
- v) Adicionalmente, existe la probabilidad de que los mecanismos de procesamiento de los shRNA tengan una eficiencia diferente en líneas celulares evaluadas, lo cual conllevaría a una eficiencia inhibitoria diferente. Esta última posibilidad podría explicar la falta de concordancia de la actividad inhibitoria de los constructos que expresan los shRNA contra *Evi1* en las líneas celulares, 293T y DA-3.

Independiente de las posibles explicaciones de los resultados, por los análisis PCR en tiempo real, es claro que la reducción de *Evi1*, en al menos porcentajes inferiores al 60%, no tiene un efecto significativo en la capacidad proliferativa de las células estudiadas. En las líneas celulares derivadas de las células DA-3 dep, solo las células DA-3 dep pRSP/Evi1sh5 presentan una leve disminución en su capacidad proliferativa. Varias de las vías de señalización en las que al parecer participa *Evi1*, sugieren la participación de este oncogén en los mecanismos reguladores de la proliferación celular. Por ejemplo, Chi y cols. demostraron que *Evi1* promueve la proliferación celular por interacción directa con la proteína BGR1, dicha interacción bloque la represión de BRG1 sobre el promotor E2F1<sup>54</sup>.

También, se ha observado que la expresión de Evi1 se asocia a una fase G1 abreviada, reducción en el requerimiento de suero para la entrada a la fase S, dramática reducción en la actividad de p27 e incremento en la producción de las proteínas Cíclina A, CDK2, y niveles de pRB hiperfosforilada<sup>55</sup>.

En experimentos con líneas celulares leucémicas dependientes de GM-CSF con sobre-expresión de *Evi1* se observó una disminución en la expresión del oncogén al privar las células del factor de crecimiento <sup>158</sup>. Estos hallazgos podrían explicar los resultados obtenidos en las líneas DA-3 ind en donde, pese a la inhibición de la expresión del oncogén en aproximadamente un 60%, no se observa ninguna disminución en la actividad proliferativa de las células.

Una posibilidad para explicar esta observación es que la independencia de factores crecimiento de las células DA-3 ind adquirida durante el proceso de transformación tumoral pudiese estar acompañada, en paralelo, con una independencia de Evi1 para el crecimiento de las células. Adicionalmente, estudios preliminares de los perfiles de expresión génica de la línea parental DA-3 dep y su descendiente DA-3 ind, permitieron identificar 257 genes con niveles de expresión diferente en la línea con transformación tumoral completa con respecto a la línea parental (datos no mostrados). Pudiera ser posible, que durante este proceso de transformación tumoral varias vías implicadas en los mecanismos de proliferación hayan sido alteradas ocasionando la activación de vías redundantes con las vías en las que participa Evi1.

En la evaluación *in vitro* del efecto sinérgico entre la inhibición de Evi1 y el tratamiento con clorofarabina los resultados fueron más claros. Tanto en la línea parental DA-3 dep como en la descendiente DA-3 ind la inhibición de *Evi1* se asocia claramente con un incremento en la sensibilidad al tratamiento con clorofarabina ( $\approx 50\%$ ). Estos resultados sugieren un papel para Evi1 en los procesos de sobrevivencia y resistencia o susceptibilidad a la apoptosis. Esta observación concuerda con estudios previos en los que se ha demostrado que

EV11 inhibe la apoptosis mediados por el TGF- $\beta$  mediante un proceso que involucra la activación de la vía PI3K/AKT. En estos estudios se demostró que la inhibición de EV11 por ARNi inhibe la fosforilación de AKT e incrementa la sensibilidad de las células tratadas a la apoptosis<sup>73</sup>. Igualmente se ha demostrado que EV11 bloque los efectos apoptóticos del IFN $\alpha$ 1<sup>66</sup>.

Adicionalmente, cuando se evaluó la expresión relativa de *Evi1* en las diferentes líneas celulares se observó que las células DA-3 ind tratadas con el vector vacío (DA-3 ind pRSP), presentan una sobre-expresión mayor de *Evi1*, en comparación con las células DA-3 ind sin modificar. En estas células, se observa una mayor resistencia al tratamiento con clorofarabina. Esta observación sugiere que, en concordancia con los datos clínicos de pacientes con LMA-*EV11*<sup>+</sup>, la sobre-expresión del oncogén *EV11* confiere resistencia al tratamiento antileucémico<sup>14-17</sup>. Si bien es cierto que los niveles de *Evi1* y la resistencia al tratamiento de estas células, están de acuerdo a lo esperado, los niveles de sobre-expresión de *Evi1* tiene gran variabilidad y esta observación requiere más experimentos confirmatorios. No obstante, los niveles de *Evi1* incrementados en estas células pudieran ser explicados como efecto secundario producido durante la selección con puromicina para la generación de líneas estables durante la cual se pudo ocasionar la selección de clones con niveles más altos de *Evi1*.

Finalmente tomando en su conjunto estas observaciones nuestros resultados sugieren que una inhibición cercana al 50% de la oncoproteína *Evi1* en una línea celular mieloide murina parental preleucémica *Evi1*<sup>+</sup> y en su descendiente con fenotipo leucémico completo no afecta los mecanismos de proliferación y por lo tanto no tiene un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento irrestricto de las células, pero sí afecta la susceptibilidad de las mismas a las drogas citotóxicas probablemente debido a un incremento en la sensibilidad a la apoptosis.

Debido a las limitaciones técnicas expuestas a lo largo de la discusión, creemos que nuestros resultados deben considerarse como datos muy preliminares con respecto al papel protagónico sugerido para *Evi1* en la patogénesis de la LMA-*Evi1*<sup>+</sup>. El desarrollo de un vector eficiente para la liberación inducible de las moléculas de ARNi contra *Evi1* permitiría hacer un análisis confiable sobre los efectos de la inhibición de *Evi1* en este tipo de modelos.

## 7. CONCLUSIONES.

Nosotros generamos secuencias ARNi contra *Evi1* con diferentes niveles de eficiencia, estas pueden ser utilizadas para efectos dosis-respuesta en estudios de inhibición de *Evi1* en modelos tumorales *Evi1*<sup>+</sup>

Se generaron líneas DA-3 preleucémicas dependientes de GM-CSF y DA-3 totalmente leucémicas independientes de factores de crecimiento expresando constitutivamente siARN contra *Evi1*. Se obtuvo una reducción en los niveles de *Evi1* cercano al 50% en comparación a las líneas parentales.

Las células DA-3 preleucémicas muestran una leve dependencia de *Evi1* para su crecimiento y proliferación en comparación con las DA-3 leucémicas. El proceso de transformación tumoral inducido en las DA-3 independientes a factores de crecimiento pudo haber estimulado la ocurrencia de vías alternas a *Evi1* para mantener el crecimiento irrestricto característico de estas células.

La inhibición de la expresión de *Evi1* en niveles aproximados del 50% no afecta significativamente los patrones de proliferación de estas líneas pero confiere un incremento en la susceptibilidad al efecto citotóxico causado por los análogos de nucleósidos. Estas observaciones sugieren un incremento de la sensibilidad de estas líneas celulares a la vía de la apoptosis mediada por el daño de ADN.

La recuperación después de la selección de líneas DA-3 dependientes e independientes de GM-CSF estables para la expresión de shRNA contra *Evi1*, pese a la alta eficiencia de las secuencias siARN utilizadas y los niveles de reducción de *Evi1* entre el 50 y 60% en comparación con los niveles originales podrían sugerir que niveles más bajos de esta oncoproteína son letales para este tipo de líneas celulares.

Los resultados obtenidos sugieren que EVI1 puede ser una causa directa de la resistencia al tratamiento característico de las LMA-*EVI1*<sup>+</sup> y señalan a este oncogén como un posible blanco terapéutico.

## 8. PERSPECTIVAS

Conseguir un efecto inhibitorio inducible nos permitiría silenciar a *Evi1* en forma temporal y apreciar de forma directa la respuesta de la inhibición de *Evi1* sobre el crecimiento y susceptibilidad a las drogas de las células DA-3 dep y DA-3 ind. En la actualidad, han sido validados satisfactoriamente varios sistemas de inhibición por ARNi inducible por diferentes tipo de moléculas.

Luego de poder garantizar un efecto inhibitorio condicional, directo y efectivo valdría la pena realizar la evaluación del efecto inhibitorio de *Evi1 in vivo* en nuestro modelo de LMA-*Evi1*<sup>+</sup>. Intentar desarrollar nuevamente el modelo con el mismo protocolo a partir de las mismas células preleucémicas DA-3 dep pero con una expresión de *Evi1* silenciada, podría determinar si *Evi1* es relevante o no en los proceso de leucogénesis.

Es importante investigar sobre cuales de los mecanismos de muerte celular son los afectados por *Evi1*, de esta manera se comprendería mejor porqué las LMA-*EVI1*<sup>+</sup> son resistentes a los tratamientos antileucémicos convencionales.

A futuro, queremos evaluar el efecto sinérgico de la inhibición de *Evi1* junto con blancos terapéuticos alternativos. Recientemente, los inhibidores de proteosomas han sido utilizados como una nueva aproximación para el tratamiento de tumores. Datos preliminares de experimentos *in vitro* muestran que Bortezomib, un inhibidor de proteosoma, tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación de las líneas celulares DA-3 dep y DA-3 ind. Estas observaciones abren la posibilidad de encontrar un mayor efecto sinérgico al obtenido con la clorofarabina evaluando fármacos inhibidores de NF-kB junto con el silenciamiento de *Evi1* como tratamiento para la LMA-*Evi1*<sup>+</sup>.

Por último, nosotros proponemos que un análisis comparativo de los perfiles de expresión génica de las células DA-3 dependientes y DA-3 independientes de GM-CSF generadas a partir del modelo murino de LMA-*Evi1*<sup>+</sup>, con y sin expresión de ARNi contra *Evi1*, nos permitiría: i) construir un mapa de interacciones moleculares de *Evi1* para este modelo, ii) identificar posibles alteraciones moleculares conducentes a LMA aun no descritas y iii) acercarnos a la dilucidación del rol de *Evi1* en la génesis de la LMA-*Evi1*<sup>+</sup>.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Sugita M, Tanaka N, Davidson S, et al. Molecular definition of a small amplification domain within 3q26 in tumors of cervix, ovary, and lung. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;117:9-18.
2. Sattler HP, Lensch R, Rohde V, et al. Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer. *Prostate* 2000;45:207-15.
3. Bergamo NA, Rogatto SR, Poli-Frederico RC, et al. Comparative genomic hybridization analysis detects frequent over-representation of DNA sequences at 3q, 7p, and 8q in head and neck carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;119:48-55.
4. Deng X, Cao Y, Liu Y, et al. Overexpression of Evi-1 oncoprotein represses TGF-beta signaling in colorectal cancer. *Mol Carcinog* 2011.
5. Nanjundan M, Nakayama Y, Cheng KW, et al. Amplification of MDS1/EVI1 and EVI1, located in the 3q26.2 amplicon, is associated with favorable patient prognosis in ovarian cancer. *Cancer Res* 2007;67:3074-84.
6. Osterberg L, Levan K, Partheen K, et al. Potential predictive markers of chemotherapy resistance in stage III ovarian serous carcinomas. *BMC Cancer* 2009;9:368.
7. Brooks DJ, Woodward S, Thompson FH, et al. Expression of the zinc finger gene EVI-1 in ovarian and other cancers. *Br J Cancer* 1996;74:1518-25.
8. Gerhardt TM, Schmahl GE, Flotho C, Rath AV, Niemeyer CM. Expression of the Evi-1 gene in haemopoietic cells of children with juvenile myelomonocytic leukaemia and normal donors. *Br J Haematol* 1997;99:882-7.
9. Shivarov V, Stoimenov A, Galabova I, Balatzenko G, Guenova M. Very early onset of an acute myeloid leukemia in an adult patient with B-cell lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol* 2009;31:106-13.
10. Daghistani M, Marin D, Khorashad JS, et al. EVI-1 oncogene expression predicts survival in chronic-phase CML patients resistant to imatinib treated with second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2010;116:6014-7.

11. Carapeti M, Goldman JM, Cross NC. Overexpression of EVI-1 in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1561.
12. Ogawa S, Kurokawa M, Tanaka T, et al. Increased Evi-1 expression is frequently observed in blastic crisis of chronic myelocytic leukemia. *Leukemia* 1996;10:788-94.
13. Russell M, Thompson F, Spier C, Taetle R. Expression of the EVI1 gene in chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Leukemia* 1993;7:1654-7.
14. Haas K, Kundi M, Sperr WR, et al. Expression and prognostic significance of different mRNA 5'-end variants of the oncogene EVI1 in 266 patients with de novo AML: EVI1 and MDS1/EVI1 overexpression both predict short remission duration. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:288-98.
15. Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, et al. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood* 2008;111:4329-37.
16. Balgobind BV, Lugthart S, Hollink IH, et al. EVI1 overexpression in distinct subtypes of pediatric acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2010;24:942-9.
17. Groschel S, Lugthart S, Schlenk RF, et al. High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. *J Clin Oncol* 2010;28:2101-7.
18. Russell M, List A, Greenberg P, et al. Expression of EVI1 in myelodysplastic syndromes and other hematologic malignancies without 3q26 translocations. *Blood* 1994;84:1243-8.
19. Ogawa S, Mitani K, Kurokawa M, et al. Abnormal expression of Evi-1 gene in human leukemias. *Hum Cell* 1996;9:323-32.
20. Dreyfus F, Bouscary D, Melle J, Ribrag V, Guesnu M, Varet B. Expression of the Evi-1 gene in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1995;9:203-5.
21. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008;22:14-22.

22. Kaspers GJ, Creutzig U. Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions. *Leukemia* 2005;19:2025-9.
23. Kaspers GJ, Zwaan CM. Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. *Haematologica* 2007;92:1519-32.
24. Reiter E, Greinix H, Rabitsch W, et al. Low curative potential of bone marrow transplantation for highly aggressive acute myelogenous leukemia with inversion inv (3)(q21q26) or homologous translocation t(3;3) (q21;q26). *Ann Hematol* 2000;79:374-7.
25. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, et al. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood* 2003;101:837-45.
26. Morishita K, Parker DS, Mucenski ML, Jenkins NA, Copeland NG, Ihle JN. Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines. *Cell* 1988;54:831-40.
27. Mucenski ML, Taylor BA, Ihle JN, et al. Identification of a common ecotropic viral integration site, Evi-1, in the DNA of AKXD murine myeloid tumors. *Molecular and cellular biology* 1988;8:301-8.
28. Morishita K, Parganas E, Williams CL, et al. Activation of EVI1 gene expression in human acute myelogenous leukemias by translocations spanning 300-400 kilobases on chromosome band 3q26. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:3937-41.
29. Morishita K, Parganas E, Douglass EC, Ihle JN. Unique expression of the human Evi-1 gene in an endometrial carcinoma cell line: sequence of cDNAs and structure of alternatively spliced transcripts. *Oncogene* 1990;5:963-71.
30. Suzukawa K, Taki T, Abe T, et al. Identification of translocational breakpoints within the intron region before the last coding exon (exon 12) of the EVI1 gene in two cases of CML-BC with inv(3)(q21q26). *Genomics* 1997;42:356-60.

31. Vinatzer U, Mannhalter C, Mitterbauer M, et al. Quantitative comparison of the expression of EVI1 and its presumptive antagonist, MDS1/EVI1, in patients with myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36:80-9.
32. Fears S, Mathieu C, Zeleznik-Le N, Huang S, Rowley JD, Nucifora G. Intergenic splicing of MDS1 and EVI1 occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:1642-7.
33. Bordereaux D, Fichelson S, Tambourin P, Gisselbrecht S. Alternative splicing of the Evi-1 zinc finger gene generates mRNAs which differ by the number of zinc finger motifs. *Oncogene* 1990;5:925-7.
34. Nitta E, Izutsu K, Yamaguchi Y, et al. Oligomerization of Evi-1 regulated by the PR domain contributes to recruitment of corepressor CtBP. *Oncogene* 2005;24:6165-73.
35. Matsugi T, Morishita K, Ihle JN. Identification, nuclear localization, and DNA-binding activity of the zinc finger protein encoded by the Evi-1 myeloid transforming gene. *Molecular and cellular biology* 1990;10:1259-64.
36. Perkins AS, Fishel R, Jenkins NA, Copeland NG. Evi-1, a murine zinc finger proto-oncogene, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Molecular and cellular biology* 1991;11:2665-74.
37. Xi ZF, Russell M, Woodward S, Thompson F, Wagner L, Taetle R. Expression of the Zn finger gene, EVI-1, in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 1997;11:212-20.
38. Funabiki T, Kreider BL, Ihle JN. The carboxyl domain of zinc fingers of the Evi-1 myeloid transforming gene binds a consensus sequence of GAAGATGAG. *Oncogene* 1994;9:1575-81.
39. Morishita K, Suzukawa K, Taki T, Ihle JN, Yokota J. EVI-1 zinc finger protein works as a transcriptional activator via binding to a consensus sequence of GACAAGATAAGATAAN1-28 CTCATCTTC. *Oncogene* 1995;10:1961-7.

40. Perkins AS, Mercer JA, Jenkins NA, Copeland NG. Patterns of Evi-1 expression in embryonic and adult tissues suggest that Evi-1 plays an important regulatory role in mouse development. *Development* 1991;111:479-87.
41. Morishita K, Parganas E, Parham DM, Matsugi T, Ihle JN. The Evi-1 zinc finger myeloid transforming gene is normally expressed in the kidney and in developing oocytes. *Oncogene* 1990;5:1419-23.
42. Nucifora G, Begy CR, Kobayashi H, et al. Consistent intergenic splicing and production of multiple transcripts between AML1 at 21q22 and unrelated genes at 3q26 in (3;21)(q26;q22) translocations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91:4004-8.
43. Sitailo S, Sood R, Barton K, Nucifora G. Forced expression of the leukemia-associated gene EVI1 in ES cells: a model for myeloid leukemia with 3q26 rearrangements. *Leukemia* 1999;13:1639-45.
44. Privitera E, Longoni D, Brambillasca F, Biondi A. EVI-1 gene expression in myeloid clonogenic cells from juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia* 1997;11:2045-8.
45. Lopingco MC, Perkins AS. Molecular analysis of Evi1, a zinc finger oncogene involved in myeloid leukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;211:211-22.
46. Morishita K, Parganas E, Matsugi T, Ihle JN. Expression of the Evi-1 zinc finger gene in 32Dc13 myeloid cells blocks granulocytic differentiation in response to granulocyte colony-stimulating factor. *Molecular and cellular biology* 1992;12:183-9.
47. Kreider BL, Orkin SH, Ihle JN. Loss of erythropoietin responsiveness in erythroid progenitors due to expression of the Evi-1 myeloid-transforming gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90:6454-8.
48. Goyama S, Yamamoto G, Shimabe M, et al. Evi-1 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and transformed leukemic cells. *Cell Stem Cell* 2008;3:207-20.

49. Hoyt PR, Bartholomew C, Davis AJ, et al. The Evi1 proto-oncogene is required at midgestation for neural, heart, and paraxial mesenchyme development. *Mech Dev* 1997;65:55-70.
50. Kato M. Comparative genomics on FGF20 orthologs. *Oncol Rep* 2005;14:287-90.
51. Daimon M, Susa S, Kato T. Fine structure of the human translocation protein 1 (HTP1/TLOC1) gene. *IUBMB Life* 1999;48:619-24.
52. Yatsula B, Lin S, Read AJ, et al. Identification of binding sites of EVI1 in mammalian cells. *J Biol Chem* 2005;280:30712-22.
53. Tanaka T, Nishida J, Mitani K, Ogawa S, Yazaki Y, Hirai H. Evi-1 raises AP-1 activity and stimulates c-fos promoter transactivation with dependence on the second zinc finger domain. *J Biol Chem* 1994;269:24020-6.
54. Chi Y, Senyuk V, Chakraborty S, Nucifora G. EVI1 promotes cell proliferation by interacting with BRG1 and blocking the repression of BRG1 on E2F1 activity. *J Biol Chem* 2003;278:49806-11.
55. Kilbey A, Stephens V, Bartholomew C. Loss of cell cycle control by deregulation of cyclin-dependent kinase 2 kinase activity in Evi-1 transformed fibroblasts. *Cell Growth Differ* 1999;10:601-10.
56. Pradhan AK, Mohapatra AD, Nayak KB, Chakraborty S. Acetylation of the proto-oncogene EVI1 abrogates Bcl-xL promoter binding and induces apoptosis. *PLoS One* 2011;6:e25370.
57. Yokoi S, Yasui K, Iizasa T, Imoto I, Fujisawa T, Inazawa J. TERC identified as a probable target within the 3q26 amplicon that is detected frequently in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2003;9:4705-13.
58. Kim JH, Hui P, Yue D, et al. Identification of candidate target genes for EVI-1, a zinc finger oncoprotein, using a novel selection strategy. *Oncogene* 1998;17:1527-38.
59. Helbling D, Mueller BU, Timchenko NA, et al. The leukemic fusion gene AML1-MDS1-EVI1 suppresses CEBPA in acute myeloid leukemia by activation of

Calreticulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:13312-7.

60. Roy P, Reavey E, Rayne M, et al. Enhanced sensitivity to hydrogen peroxide-induced apoptosis in Evi1 transformed Rat1 fibroblasts due to repression of carbonic anhydrase III. *FEBS J* 2010;277:441-52.

61. Qiu Y, Lynch J, Guo L, Yatsula B, Perkins AS, Michalak M. Regulation of the calreticulin gene by GATA6 and Evi-1 transcription factors. *Biochemistry* 2008;47:3697-704.

62. Takahashi S, Licht JD. The human promyelocytic leukemia zinc finger gene is regulated by the Evi-1 oncoprotein and a novel guanine-rich site binding protein. *Leukemia* 2002;16:1755-62.

63. Gomez-Benito M, Conchillo A, Garcia MA, et al. EVI1 controls proliferation in acute myeloid leukaemia through modulation of miR-1-2. *Br J Cancer* 2010;103:1292-6.

64. Gao JS, Zhang Y, Tang X, et al. The Evi1, microRNA-143, K-Ras axis in colon cancer. *FEBS Lett* 2011;585:693-9.

65. De Weer A, Van der Meulen J, Rondou P, et al. EVI1-mediated down regulation of MIR449A is essential for the survival of EVI1 positive leukaemic cells. *Br J Haematol* 2011;154:337-48.

66. Buonamici S, Li D, Mikhail FM, et al. EVI1 abrogates interferon-alpha response by selectively blocking PML induction. *J Biol Chem* 2005;280:428-36.

67. Kurokawa M, Mitani K, Irie K, et al. The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3. *Nature* 1998;394:92-6.

68. Sood R, Talwar-Trikha A, Chakrabarti SR, Nucifora G. MDS1/EVI1 enhances TGF-beta1 signaling and strengthens its growth-inhibitory effect but the leukemia-associated fusion protein AML1/MDS1/EVI1, product of the t(3;21), abrogates growth-inhibition in response to TGF-beta1. *Leukemia* 1999;13:348-57.

69. Vinatzer U, Taplick J, Seiser C, Fonatsch C, Wieser R. The leukaemia-associated transcription factors EVI-1 and MDS1/EVI1 repress transcription and interact with histone deacetylase. *Br J Haematol* 2001;114:566-73.

70. Izutsu K, Kurokawa M, Imai Y, Maki K, Mitani K, Hirai H. The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor beta signaling. *Blood* 2001;97:2815-22.
71. Chakraborty S, Senyuk V, Sitailo S, Chi Y, Nucifora G. Interaction of EVI1 with cAMP-responsive element-binding protein-binding protein (CBP) and p300/CBP-associated factor (P/CAF) results in reversible acetylation of EVI1 and in co-localization in nuclear speckles. *J Biol Chem* 2001;276:44936-43.
72. Alliston T, Ko TC, Cao Y, et al. Repression of bone morphogenetic protein and activin-inducible transcription by Evi-1. *J Biol Chem* 2005;280:24227-37.
73. Liu Y, Chen L, Ko TC, Fields AP, Thompson EA. Evi1 is a survival factor which conveys resistance to both TGFbeta- and taxol-mediated cell death via PI3K/AKT. *Oncogene* 2006;25:3565-75.
74. Kurokawa M, Mitani K, Yamagata T, et al. The evi-1 oncoprotein inhibits c-Jun N-terminal kinase and prevents stress-induced cell death. *The EMBO journal* 2000;19:2958-68.
75. Otto F, Lubbert M, Stock M. Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem* 2003;89:9-18.
76. Swantek D, Gergen JP. Ftz modulates Runt-dependent activation and repression of segment-polarity gene transcription. *Development* 2004;131:2281-90.
77. Yuasa H, Oike Y, Iwama A, et al. Oncogenic transcription factor Evi1 regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression. *The EMBO journal* 2005;24:1976-87.
78. Soderholm J, Kobayashi H, Mathieu C, Rowley JD, Nucifora G. The leukemia-associated gene MDS1/EVI1 is a new type of GATA-binding transactivator. *Leukemia* 1997;11:352-8.
79. Perkins AS, Kim JH. Zinc fingers 1-7 of EVI1 fail to bind to the GATA motif by itself but require the core site GACAAGATA for binding. *J Biol Chem* 1996;271:1104-10.
80. Laricchia-Robbio L, Premanand K, Rinaldi CR, Nucifora G. EVI1 Impairs myelopoiesis by deregulation of PU.1 function. *Cancer Res* 2009;69:1633-42.

81. Yin Y, Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene* 2008;27:5443-53.
82. Yoshimi A, Goyama S, Watanabe-Okochi N, et al. Evi1 represses PTEN expression and activates PI3K/AKT/mTOR via interactions with polycomb proteins. *Blood* 2011;117:3617-28.
83. Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle* 2008;7:2643-6.
84. Dickstein J, Senyuk V, Premanand K, et al. Methylation and silencing of miRNA-124 by EVI1 and self-renewal exhaustion of hematopoietic stem cells in murine myelodysplastic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:9783-8.
85. Buonamici S, Li D, Chi Y, et al. EVI1 induces myelodysplastic syndrome in mice. *J Clin Invest* 2004;114:713-9.
86. Shimabe M, Goyama S, Watanabe-Okochi N, et al. Pbx1 is a downstream target of Evi-1 in hematopoietic stem/progenitors and leukemic cells. *Oncogene* 2009;28:4364-74.
87. Ficara F, Murphy MJ, Lin M, Cleary ML. Pbx1 regulates self-renewal of long-term hematopoietic stem cells by maintaining their quiescence. *Cell Stem Cell* 2008;2:484-96.
88. Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004;118:149-61.
89. Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 2007;96 Suppl:R26-30.
90. Spensberger D, Vermeulen M, Le Guezennec X, et al. Myeloid transforming protein Evi1 interacts with methyl-CpG binding domain protein 3 and inhibits in vitro histone deacetylation by Mbd3/Mi-2/NuRD. *Biochemistry* 2008;47:6418-26.
91. Spensberger D, Delwel R. A novel interaction between the proto-oncogene Evi1 and histone methyltransferases, SUV39H1 and G9a. *FEBS Lett* 2008;582:2761-7.

92. Cattaneo F, Nucifora G. EVI1 recruits the histone methyltransferase SUV39H1 for transcription repression. *J Cell Biochem* 2008;105:344-52.
93. Goyama S, Nitta E, Yoshino T, et al. EVI-1 interacts with histone methyltransferases SUV39H1 and G9a for transcriptional repression and bone marrow immortalization. *Leukemia*;24:81-8.
94. Sato T, Goyama S, Nitta E, et al. Evi-1 promotes para-aortic splanchnopleural hematopoiesis through up-regulation of GATA-2 and repression of TGF- $\beta$  signaling. *Cancer Sci* 2008;99:1407-13.
95. Kustikova O, Fehse B, Modlich U, et al. Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. *Science* 2005;308:1171-4.
96. Calmels B, Ferguson C, Laukkanen MO, et al. Recurrent retroviral vector integration at the Mds1/Evi1 locus in nonhuman primate hematopoietic cells. *Blood* 2005;106:2530-3.
97. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 2006;12:401-9.
98. Moloney JB. Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. *J Natl Cancer Inst* 1960;24:933-51.
99. Ihle JN RA, Mural R. Immunological and virological mechanisms in retrovirus induced murine leukemogenesis. In: Klein G, ed. *Advances in Viral Oncology*. Raven, New York; 1984:95 - 137.
100. Gisselbrecht S, Pozo F, Debre P, Hurot MA, Lacombe MJ, Levy JP. Genetic control of sensitivity to Moloney-virus-induced leukemias in mice. I. Demonstration of multigenic control. *Int J Cancer* 1978;21:626-34.
101. Canaani E, Aaronson SA. Restriction enzyme analysis of mouse cellular type C viral DNA: emergence of new viral sequences in spontaneous AKR/J lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979;76:1677-81.

102. Steffen D, Weinberg RA. The integrated genome of murine leukemia virus. *Cell* 1978;15:1003-10.
103. Tschlis PN, Strauss PG, Hu LF. A common region for proviral DNA integration in MoMuLV-induced rat thymic lymphomas. *Nature* 1983;302:445-9.
104. Noori-Dalooi MR, Swift RA, Kung HJ, Crittenden LB, Witter RL. Specific integration of REV proviruses in avian bursal lymphomas. *Nature* 1981;294:574-6.
105. Cooper GM, Neiman PE. Transforming genes of neoplasms induced by avian lymphoid leukosis viruses. *Nature* 1980;287:656-9.
106. Baum C, Dullmann J, Li Z, et al. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 2003;101:2099-114.
107. Baum C, Fehse B. Mutagenesis by retroviral transgene insertion: risk assessment and potential alternatives. *Curr Opin Mol Ther* 2003;5:458-62.
108. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000;288:669-72.
109. Lee JC, Ihle JN. Chronic immune stimulation is required for Moloney leukaemia virus-induced lymphomas. *Nature* 1981;289:407-9.
110. Lee JC, Ihle JN. Increased responses to lymphokines are correlated with preleukemia in mice inoculated with Moloney leukemia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981;78:7712-6.
111. Ihle JN, Askew D. Origins and properties of hematopoietic growth factor-dependent cell lines. *Int J Cell Cloning* 1989;7:68-91.
112. Ihle JN, Morishita K, Bartholomew C, Matsugi T, Askew D. Phenotypes and mechanisms in the transformation of hematopoietic cells. *Int J Cell Cloning* 1990;8 Suppl 1:130-46.
113. Pepersack L, Lee JC, McEwan R, Ihle JN. Phenotypic heterogeneity of Moloney leukemia virus-induced T cell lymphomas. *J Immunol* 1980;124:279-85.
114. Holmes KL, Palaszynski E, Fredrickson TN, Morse HC, 3rd, Ihle JN. Correlation of cell-surface phenotype with the establishment of interleukin 3-dependent cell lines from wild-mouse murine leukemia virus-induced neoplasms.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1985;82:6687-91.

115. Bartholomew C, Ihle JN. Retroviral insertions 90 kilobases proximal to the Evi-1 myeloid transforming gene activate transcription from the normal promoter. *Molecular and cellular biology* 1991;11:1820-8.

116. Bartholomew C, Morishita K, Askew D, et al. Retroviral insertions in the CB-1/Fim-3 common site of integration activate expression of the Evi-1 gene. *Oncogene* 1989;4:529-34.

117. Isfort RJ. Frequency and mechanisms of factor independence in IL-3-dependent cell lines. *Somat Cell Mol Genet* 1990;16:109-21.

118. Weinstein Y, Ihle JN, Lavu S, Reddy EP. Truncation of the c-myb gene by a retroviral integration in an interleukin 3-dependent myeloid leukemia cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83:5010-4.

119. Arteaga HJ, Mohamed AJ, Christensson B, Gahrton G, Smith CI, Dilber MS. Expression and release of stable and active forms of murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (mGM-CSF) targeted to different subcellular compartments. *Cytokine* 2001;14:136-42.

120. Arteaga HJ, Mohamed AJ, Christensson B, et al. Genetically modified autoactivated cells expressing intracellular forms of GM-CSF as a model for regulated administration of cytokines. *Scand J Immunol* 2005;62:429-36.

121. Hanyecz A, Berlo SE, Szanto S, Broeren CP, Mikecz K, Glant TT. Achievement of a synergistic adjuvant effect on arthritis induction by activation of innate immunity and forcing the immune response toward the Th1 phenotype. *Arthritis Rheum* 2004;50:1665-76.

122. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.

123. Rychahou PG, Jackson LN, Farrow BJ, Evers BM. RNA interference: mechanisms of action and therapeutic consideration. *Surgery* 2006;140:719-25.

124. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-8.
125. Aigner A. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *J Biotechnol* 2006;124:12-25.
126. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215-33.
127. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 2004;23:4051-60.
128. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13:1097-101.
129. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415-9.
130. Han J, Lee Y, Yeom KH, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006;125:887-901.
131. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003;17:3011-6.
132. Provost P, Dishart D, Doucet J, Frendewey D, Samuelsson B, Radmark O. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *The EMBO journal* 2002;21:5864-74.
133. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363-6.
134. Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 2004;305:1434-7.
135. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002;297:2056-60.
136. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:9779-84.

137. Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002;26:199-213.
138. Siolas D, Lerner C, Burchard J, et al. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* 2005;23:227-31.
139. Davidson BL, McCray PB, Jr. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet* 2011;12:329-40.
140. Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2004;32:936-48.
141. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 2004;22:326-30.
142. Morishita K, Parganas E, Bartholomew C, et al. The human Evi-1 gene is located on chromosome 3q24-q28 but is not rearranged in three cases of acute nonlymphocytic leukemias containing t(3;5)(q25;q34) translocations. *Oncogene Res* 1990;5:221-31.
143. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. In.
144. <http://genomics.jp/sidirect/>. In.
145. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. In.
146. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
147. Laemmli UK, Molbert E, Showe M, Kellenberger E. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol* 1970;49:99-113.
148. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 2009;37:e45.
149. Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl)* 2006;84:901-10.

150. Schenborn E, Groskreutz D. Reporter gene vectors and assays. *Mol Biotechnol* 1999;13:29-44.
151. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994;263:802-5.
152. Li X, Zhao X, Fang Y, et al. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem* 1998;273:34970-5.
153. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 1987;15:8125-48.
154. Du M, Ye L, Liu J, Yang L. [Enhancement of GFP expression by Kozak sequence +4G in HEK293 cells]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2008;24:491-4.
155. Patzel V, Rutz S, Dietrich I, Koberle C, Scheffold A, Kaufmann SH. Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency. *Nat Biotechnol* 2005;23:1440-4.
156. Mazur S, Csucs G, Kozak K. RNAiAtlas: a database for RNAi (siRNA) libraries and their specificity. *Database (Oxford)* 2012;2012:bas027.
157. Wiznerowicz M, Szulc J, Trono D. Tuning silence: conditional systems for RNA interference. *Nat Methods* 2006;3:682-8.
158. Oval J, Smedsrud M, Taetle R. Expression and regulation of the evi-1 gene in the human factor-dependent leukemia cell line, UCSD/AML1. *Leukemia* 1992;6:446-51.