



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**PAPEL DE ADAR1 Y 2 EN LA REGULACION DE MICRORNA RELACIONADOS
CON EL PROCESO DE FIBROSIS PULMONAR**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
GABRIELA DIAZ PIÑA

DIRECTOR DE TESIS
DR. VICTOR MANUEL RUIZ LOPEZ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ TUTOR
DRA. MARCELA LIZANO SOBERON
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. MAYO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme formar parte de tan privilegiada comunidad.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) por permitirme continuar con mi formación académica.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca número 290146.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social Centro Medico Siglo XXI.

Al Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim Alemania, por las facilidades brindadas durante mi estancia de investigación.

A mi Comité Tutor conformado por el Dr Victor Manuel Ruiz López, la Dra Marcela Lizano Soberon y el Dr Luis Felipe Jiménez García por las asesorías y recomendaciones durante el doctorado.

A los miembros del jurado de Examen de Grado: Dra Victoria Chagoya, Dr Moisés Selman, Dr Felipe Vaca y Dr Jorge Meléndez Zajgla.

A mi tutor, el Dr Victor Ruiz por su guía durante el desarrollo del proyecto.

A los doctores Annie Pardo y Moisés Selman por apoyarme y brindarme su consejo en cada ocasión que los consulte.

A Carina Becerril, Rosa María Ordoñez, Alfonso Salgado, que contribuyeron en gran medida en la realización de este proyecto.

A los doctores Pedro Zamudio, Eduardo Montes, Ignacio Paramo, Martha Montaña, Carlos Ramos, por haberme abierto las puertas de sus laboratorios y compartir conmigo su conocimiento y experiencia.

A Iliana Herrera, Miguel Negreros, Mariel Maldonado y Karla Rubio por su apoyo incondicional.

A los investigadores y alumnos de la Unidad de Investigación del INER y la Facultad de Ciencias, Jorge García, Pepe, Adrián, Ana Lilia, Erika Rubí, Luis Placido, Juan Manuel, Remedios Ramírez, Luis Felipe Domínguez, Héctor Nava, Raúl Barrera.

A mis padres por enseñarme que con dedicación y esfuerzo las metas se pueden cumplir.

A mi hermana por haberme dado el regalo más hermoso, Frida.

A Frida por darme la fuerza necesaria para seguir adelante cuando parecía que el camino era imposible y a quien dedico con todo mi amor este trabajo.

Parte de esta tesis doctoral fue financiada y realizada bajo la dirección de la DRA. ROSA MARÍA ORDOÑEZ RAZO en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. El número de registro del proyecto que financió esta parte de la tesis fue el R-2014-785-015 y con número de financiamiento FIS/IMSS/PROT/G15/1470. Como parte de esta co-dirección de la Dra. Ordoñez también me fue otorgada una beca por parte del IMSS con el número de matrícula de becario 99096854.

Lista de abreviaturas

Resumen	1
Abstract	2
I. Introducción	3
1.1 Fibrosis Pulmonar Idiopática	3
1.2 microRNAs en Fibrosis Pulmonar Idiopática	5
1.3 miR-21 y Let-7d	6
1.4 Desaminasas de Adenosina que Actúan sobre el RNA (ADAR)	7
1.4.1 Miembros de la familia ADAR	9
1.4.2 ADAR1	9
1.4.3 ADAR2	10
1.4.4 ADAR3	11
1.5 Edición de mRNA	12
1.5.1 Edición de microRNAs	13
1.6 Expresión de ADAR y su asociación con patologías	15
II. Justificación	16
III. Hipótesis	16
IV. Objetivos	17
4.1 General	17
4.2 Particulares	17
V. Metodología	18
5.1 Cultivo celular	18
5.2 Extracción y purificación de RNA total	18
5.3 Síntesis de cDNA y PCR en tiempo real	19
5.4 Inmunolocalización	21
5.5 Western blot	23
5.6 Selección de microRNAs blanco de ADAR	23
5.7 Sobreexpresión de ADAR1 y ADAR2 en dos líneas	

de fibroblastos fibróticos	24
5.8 Estímulo de fibroblastos con TGFβ1	24
5.9 Generación de plásmidos de sobreexpresión de las isoformas de ADAR1	24
5.10 Transfección de fibroblastos Control y FPI	25
5.11 RESS-qPCR	26
5.12 Preparación de muestras para ensayo de actividad catalítica	27
5.13 Ensayo de actividad catalítica de ADAR	27
5.14 Sobreexpresión de las isoformas de ADAR1	29
5.15 Análisis estadístico	29
VI. Resultados	29
6.1 Niveles de expresión de ADAR1 y ADAR2 en pulmón y fibroblastos pulmonares control y de FPI	29
6.2 Sobreexpresión de ADAR1 y ADAR2	30
6.3 Niveles de expresión de ADAR1 p110 y ADAR1 p150 en fibroblastos pulmonares control y de FPI	36
6.4 Sobreexpresión de ADAR1 p110 y ADAR1 p150	37
6.5 ADAR1 es hiperactiva en los fibroblastos de FPI	38
VII. Discusión	49
VIII. Conclusión	53
IX. Bibliografía	55

Lista de abreviaturas

FPI	Fibrosis Pulmonar Idiopática
ADAR	Desaminasa de Adenosina que Actúa sobre el RNA (del inglés Adenosine Deaminase that Act on RNA)
ADA	Desaminasa de Adenosina (Adenosine Deaminase)
PELI1	Pelino 1 (del inglés E3 ubiquitin-protein ligase pellino homolog 1)
SPRY2	Sprouty 2 (del inglés Protein sprouty homolog 2)
RNA	Ácido Ribonucleico (del inglés Ribonucleic Acid)
α –SMA	Alfa actina de músculo liso (del inglés alpha smooth muscle actin)
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta (del inglés Transforming Growth Factor Beta)
UTR	Región no traducida (del inglés Untranslated Region)
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero (del inglés Messenger RNA)
Smad7	Proteína Inhibidora de la vía de TGF- β (del inglés Mothers Against Decapentaplegic Homolog 7)
pri-microRNA	Transcrito primario del microRNA (del inglés primary microRNA)
pre-microRNA	Transcrito precursor del microRNA (del inglés precursor microRNA)
TRBP	Proteína de unión a RNA de doble cadena (del inglés HIV-1 TAR RNA binding protein)
RISC	Complejo de silenciamiento de ácido ribonucleico (del inglés RNA-induced Silencing Complex)
DGCR8	Subunidad de complejo microprocesador (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8)
dsRNA	Ácido Ribonucleico de doble cadena (del inglés double strand)

	Ribonucleic Acid)
RNAsa	Ribonucleasa
NES	Señal de exportación nuclear (Nuclear Export Signaling)
NLS	Señal de localización nuclear (Nuclear Localization Signaling)
KO	Bloqueo de genes (knock-out)
AMPA	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
GRIA2	Receptor de glutamato, Subunidad 2 del Receptor ionotrópico de glutamato tipo AMPA (glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2)
AKT	Proteína cinasa de serina/Treonina (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase)
GluR-B	Nombre alternativo del receptor GRIA2
Q/R	Glutamina/Arginina
AZIN1	Inhibidor de Antienzima tipo 1 (Antizyme Inhibitor 1)

Resumen

La fibrosis pulmonar idiopática es una patología progresiva y letal, para la cual no existen tratamientos efectivos. Es la más agresiva de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas. Se caracteriza por la proliferación de fibroblastos/miofibroblastos y la acumulación exagerada de matriz extracelular. En la actualidad se siguen estudiando los mecanismos moleculares que conllevan al desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática. En años recientes se ha estudiado a los microRNAs como reguladores postranscripcionales de la expresión génica y el papel que pueden desempeñar sobre el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática, a través de la regulación de proteínas que potencian la expresión de moléculas profibrosantes, como Pellino-1 y Sprouty-2.

Reciente evidencia comprueba que los microRNAs pueden ser editados por Desaminasas de Adenosina que actúan sobre el RNA (ADAR). Se ha reportado que la edición de microRNAs, mediada por ADAR, puede inhibir el procesamiento mediado por Drosha y Dicer, dos endonucleasas específicas de RNA de doble cadena, que convierten los precursores del microRNA en su forma madura. La edición representa un mecanismo de regulación tejido específico de la expresión de los microRNAs.

El objetivo de este trabajo fue determinar el papel de las Desaminasas de Adenosina que Actúan sobre el RNA sobre la expresión de miRNA-21 y Let-7d en fibroblastos pulmonares humanos a través de la cuantificación de la expresión génica, niveles proteicos y la sobreexpresión de dichas proteínas.

Las Desaminasas de Adenosina que actúan sobre el RNA están significativamente disminuidas en fibroblastos de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática; la sobreexpresión de ambas isoformas restablece los niveles de expresión de miRNA-21, pellino-1, sprouty-2 y Let-7d en fibroblastos de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. Estos cambios en el procesamiento de los microRNAs tienen un gran valor en el diagnóstico patológico, incluidas las enfermedades pulmonares, y juegan un papel importante en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en su desarrollo, así como nuevos blancos terapéuticos potenciales.

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis is a progressive and lethal pathology, for which there are no effective treatments. It is the most aggressive of the diffuse interstitial lung diseases. It is characterized by the proliferation of fibroblasts/myofibroblasts and the exaggerated accumulation of extracellular matrix. Currently, the molecular mechanisms that lead to the development of idiopathic pulmonary fibrosis continue to be studied. In recent years, microRNAs have been studied as post-transcriptional regulators of gene expression and the role they can play in the development of idiopathic pulmonary fibrosis, through the regulation of proteins that enhance the expression of profibrotic molecules, such as Pellino-1. and Sprouty-2.

Recent evidence proves that microRNAs can be edited by Adenosine Deaminases that act on RNA (ADAR). It has been reported that the editing of microRNAs, mediated by ADAR, can inhibit the processing mediated by Drosha and Dicer, two specific double-stranded RNA endonucleases, which convert the precursors of the microRNA into its mature form. The edition represents a tissue-specific regulatory mechanism for the expression of microRNAs.

The objective of this work was to determine the role of Adenosine Deaminases Acting on RNA on the expression of miRNA-21 and Let-7d in human lung fibroblasts through the quantification of gene expression, protein levels and overexpression of said proteins.

Adenosine deaminases that act on RNA are significantly decreased in fibroblasts of patients with idiopathic pulmonary fibrosis; the overexpression of both isoforms restores the expression levels of miRNA-21, pellino-1, sprouty-2 and Let-7d in fibroblasts of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. These changes in the processing of microRNAs are of great value in pathological diagnosis, including pulmonary diseases, and they play an important role in the understanding of the molecular mechanisms involved in their development, as well as new potential therapeutic targets.

“Papel de ADAR1 y 2 en la regulación de microRNA relacionados con el proceso de fibrosis pulmonar”

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Fibrosis Pulmonar Idiopática

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la más común de las neumonías intersticiales de etiología desconocida. Es el resultado final de microlesiones repetidas que inducen la activación del epitelio alveolar y de un heterogéneo grupo de factores de riesgo, entre los cuales encontramos aquellos asociados a hábitos tabáquicos, determinantes genéticos, factores ambientales como la contaminación, el reflujo gastro esofágico, infecciones virales y el envejecimiento; sin embargo, el origen y aparición no se entienden por completo [1]. Es una enfermedad crónica, progresiva, degenerativa y letal, para la cual no existen tratamientos efectivos; es la más agresiva de las neumopatías intersticiales difusas. Está caracterizada por cambios en el fenotipo de las células epiteliales alveolares, por la proliferación de fibroblastos, miofibroblastos y la acumulación exagerada de matriz extracelular en el parénquima pulmonar como respuesta al daño en los tejidos [2, 3]. La formación de focos de fibroblastos y miofibroblastos es un marcador importante en el diagnóstico de dicha patología, estos focos son agregados de fibroblastos activos, que promueven el depósito exagerado de componentes de matriz extracelular [4].

El promedio de supervivencia es de 2.5-3.5 años una vez realizado el diagnóstico y se presenta predominantemente en hombres. La mayoría de los pacientes tienen entre 50-70 años y la frecuencia de la enfermedad se incrementa con la edad. El peor pronóstico se asocia con la vejez (>70 años de edad), antecedentes de tabaquismo, bajo índice de masa corporal, deterioro fisiológico severo, gran extensión radiológica de la enfermedad e hipertensión pulmonar [1].

Sin embargo, se desconocen los mecanismos que ligan el desarrollo de la enfermedad con la edad [5]. Se ha estimado una prevalencia de 13 a 20 casos por cada 100,000 personas en Estados Unidos de América [6]. En México no se cuenta con estudios epidemiológicos, sin embargo; sabemos que al instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias llegan aproximadamente 100 casos al año. La inflamación tiene un papel fundamental en la mayoría de las enfermedades pulmonares intersticiales, si este proceso inflamatorio es crónico, la enfermedad evoluciona a fibrosis [7]. Sin embargo, se ha propuesto que la FPI es una enfermedad independiente del proceso de inflamación, ya que algunos pacientes no responden al tratamiento con antiinflamatorios, asociándose a la enfermedad con el proceso de activación de fibroblastos/miofibroblastos dependiente de las células epiteliales [8]. Sin embargo, se ha observado que en un subgrupo de pacientes con FPI la respuesta inmune adaptativa, seguida de la inflamación, podría tener un papel importante en el inicio y la progresión de la enfermedad [9]. Por lo que se han sugerido al menos dos rutas celulares diferentes que podrían conducir al desarrollo de la FPI: la vía inflamatoria y la vía epitelial [10, 11]

La proliferación de fibroblastos y la generación provisional de matriz extracelular es una respuesta primaria de los tejidos al daño ocasionado por varios estímulos, entre los cuales destacan; infecciones, respuestas autoinmunes, toxinas, radiación y daño mecánico [12]. En condiciones normales, este mecanismo de respuesta está regulado por un balance en la producción de matriz extracelular y la re-epitelización. Durante la fibrosis pulmonar idiopática, este balance es interrumpido, teniendo como consecuencia la acumulación excesiva de matriz extracelular en el parénquima pulmonar [13].

Los fibroblastos son el tipo celular más abundante en los tejidos conjuntivos no cartilaginosos, participan activamente en la producción y remodelación de la matriz extracelular, se encargan principalmente de la síntesis de colágena, esencialmente de los tipos I y III, fibras elásticas, proteoglicanos, fibronectina y otras glicoproteínas.

Los fibroblastos producen vimentina, pero no alfa actina de musculo liso (α -SMA) que es un marcador importante en la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos [14].

Los miofibroblastos son una subpoblación de fibroblastos diferenciados con características de las células de musculo liso, debido a que expresan α -SMA en su citoesqueleto. Desempeñan un papel importante en la embriogénesis, organogénesis, inflamación, reparación y cicatrización, teniendo una participación fundamental en los procesos de regeneración y reparación (fibrosis) que ocurren en los diferentes órganos [15]. Los miofibroblastos tienen orígenes heterogéneos y cuentan con capacidad de migración y secreción de matriz extracelular. La diferenciación de los miofibroblastos está influenciada por citosinas y factores de crecimiento secretados por las células locales, así como por células inflamatorias, la composición de la matriz extracelular y la rigidez de la misma. Los miofibroblastos son resistentes a apoptosis, lo cual promueve su acumulación en los tejidos fibróticos, los miofibroblastos activos elaboran gran cantidad de matriz extracelular, además de la secreción de Fas ligando, induciendo la apoptosis de las células epiteliales alveolares [16].

TGF β 1 es un mediador importante de la fibrosis pulmonar idiopática y puede inducir la activación y diferenciación de fibroblastos/miofibroblastos [17]

1.2 microRNAs en Fibrosis Pulmonar Idiopática

En los últimos años se ha incrementado la evidencia de que los RNAs no codificantes juegan un papel importante en la regulación postranscripcional de la expresión génica. Entre estos RNAs se encuentran los microRNAs (o miRNAs), que son un tipo de RNA cortos de alrededor de 19-22 nt que regulan la traducción de RNAs blanco, al unirse la región semilla del microRNA con la región 3' UTR del

mensajero, induciendo de manera específica su silenciamiento o su degradación (figura 1) [18]. Los miRNAs están implicados en el desarrollo de tejidos, diferenciación, proliferación celular y reparación de tejidos, así como en procesos patológicos y han sido propuestos como blancos terapéuticos potenciales [19, 20]. Los microRNAs regulan la expresión de aproximadamente 30% de los genes que codifican para proteínas. Algunos microRNAs funcionan como oncogenes o supresores de tumores [21]. La modificación de nucleótidos en la región de siembra promueve cambios en la especificidad del microRNA por sus mRNAs blanco [22].

Análisis por microarreglos de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática han demostrado que existen cambios en los perfiles de expresión de microRNAs específicos, principalmente aquellos que podrían estar implicados en procesos profibrosantes como la transición epitelio-mesénquima o afectar a mRNAs que codifican para proteínas relacionadas con los procesos fibrosantes como TGF β 1 y Smad7, que regula negativamente la vía de TGF β 1 [23, 24]. Algunos de los microRNAs que presentan cambios en sus perfiles de expresión durante el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática son let-7d, miR-181a, miR21, miR26a, miR-29, miR30a-3p, miR-203, miR30b, miR30c, miR30d, miR92, miR155 y miR200 [25,26].

1.3 miR-21 y Let-7d

Entre los microRNAs diferencialmente expresados en FPI se encuentran miRNA-21 y Let-7d. miRNA-21 se encuentra sobreexpresado en ratones tratados con bleomicina (modelo utilizado en el estudio de la FPI), así como en los pulmones de pacientes con FPI y se localiza principalmente en los focos de miofibroblastos.

La sobreexpresión de miRNA-21 favorece la activación de la vía de TGF β 1 al tener como blanco mRNAs que regulan negativamente esta vía como Smad7. Además, se ha observado que la disminución de miRNA-21 atenúa la actividad profibrosante de TGF β 1 [26]. Por el contrario, Let-7d es un microRNA con actividad antifibrosante que se encuentra disminuido en tejido y cultivos celulares de pacientes con FPI. Se ha

asociado a la disminución de este microRNA con el incremento en el depósito de colágena y el engrosamiento de los septos alveolares y se ha demostrado que la inhibición de Let-7d da como resultado el desarrollo de un fenotipo profibrosante [27].

1.4 Desaminasas de Adenosina que Actúan sobre el RNA (ADAR)

La edición de RNA es uno de los mecanismos postranscripcionales para introducir cambios en las secuencias de RNA codificadas por el genoma. En el reino animal el tipo de edición más común al RNA es el cambio de un nucleótido por otro mediado por las desaminasas de adenosina (ADAR) que actúan sobre el RNA. ADAR intercambia adenosinas específicas por inosinas en los mRNAs, estas inosinas son reconocidas como guanosinas por la maquinaria de traducción, esta edición da lugar a la formación de estructuras secundarias de doble cadena (dsRNA) imperfectas, además la edición puede llevar al cambio en la codificación de los codones, y como consecuencia cambios en la secuencia de la proteína, dando lugar a nuevas isoformas. Algunos microRNAs son blanco de edición mediada por ADAR, lo que puede afectar el proceso de maduración o re-direccionarlos a nuevos mRNAs blanco [28, 29].

Típicamente, el mRNA forma estructuras secundarias de doble cadena de tipo horquilla y tallo-asa. Esta topografía del RNA permite la unión específica de los dímeros de ADAR y la edición de adenosinas específicas [30]. Alrededor del 50% de las adenosinas presentes en mRNAs son editadas por ADAR y la mayoría ocurre en regiones UTR e intrones, se ha estimado que constituye alrededor de 15,000 eventos de edición en 2000 genes. La secuencia alrededor de la adenina y la estructura secundaria son elementos importantes en la eficiencia y selectividad de la edición [31].

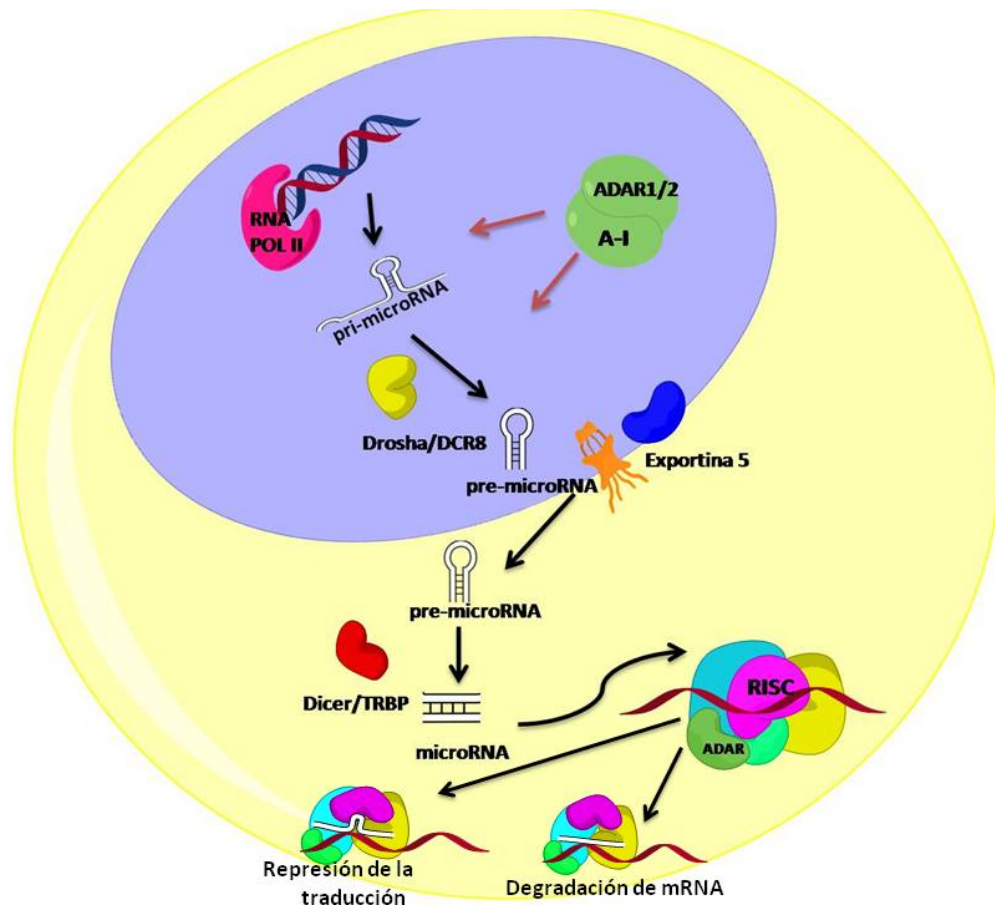


Figura 1: Los microRNAs son transcritos por la RNA Polimerasa II, dando lugar a la formación de un precursor largo llamado pri-microRNA, este puede ser sujeto de edición mediada por ADAR, el pri-microRNA es procesado por la RNasa tipo III Drosha en complejo con DGCR8, el producto es de aproximadamente 70 pb y es llamado pre-microRNA, este es exportado al citoplasma a través del complejo de poro nuclear por Exportina 5. En el citoplasma, el pre-microRNA es cortado por el complejo Dicer/TRBP formando un microRNA maduro que se une y dirige al complejo de RISC hacia el RNA mensajero blanco.

1.4.1 Miembros de la familia ADAR

Se han descrito tres isoformas de ADAR: ADAR 1, 2 y 3 [32]. La expresión de ADAR1 y 2 es ubicua, mientras que la expresión de ADAR3 se restringe al cerebro. Los miembros de la familia de ADAR tienen de 2 a 3 dominios de unión a RNA de doble cadena (dsRNA) en la región amino terminal seguidos de un dominio de desaminasa en la región carboxilo terminal y contienen algunos dominios de localización subcelular que les permiten trasladarse entre el nucléolo, núcleo y citoplasma (figura 2) [33]. Se ha observado que la dimerización de ADAR es necesaria para su actividad enzimática. ADAR1 y 2 pueden formar homodímeros catalíticamente activos y estables. El tratamiento con RNasa no afecta la dimerización de ADAR, lo que sugiere que este es un proceso independiente a la presencia de RNA. Se ha determinado que la expresión de ADAR y los niveles de inosina son tejido específicos, siendo el cerebro el sitio con mayor expresión de ADAR seguido del pulmón y el corazón. De manera interesante, esta expresión correlaciona con los niveles de inosina [34].

1.4.2 ADAR1

En humanos, el gen de ADAR1 está codificado en el brazo largo del cromosoma 1, en la posición 21.3 (1q21.3), contiene 17 exones, la expresión de este gen está dirigida por 3 promotores, de los cuales dos son constitutivos (1B y 1C) y dan lugar a la expresión de la isoforma pequeña de 110 KDa, que se encuentra primordialmente en el núcleo, aunque se ha observado que en ausencia de transcripción puede localizarse en citoplasma. La segunda isoforma es inducible por interferón y está regulada por el tercer promotor (1A), su peso es de 150 KDa y se encuentra en el núcleo y el citoplasma, debido a la presencia de una señal de exportación nuclear (NES). ADAR1 presenta dominios Z de unión a DNA (Z-DNA), Z α y Z β en la región amino terminal, esto le permite editar DNA antes de la transcripción, modificando los

sitios de splicing. Esta proteína presenta 3 dominios de unión a RNA de doble cadena (dsRBD).

La delección de ADAR1 en ratones tiene como resultado un fenotipo embrionario-letal que se caracteriza por defectos en la eritropoyesis, activación aberrante de la señalización de interferón y apoptosis generalizada. Por otro lado, el análisis de la expresión global de microRNAs en embriones de ratón indican que durante las semanas de desarrollo embrionario E11-E12 hay un rápido e importante aumento en los niveles de microRNAs que podrían ser indispensables en el desarrollo embrionario. En ratones KO de ADAR1 este incremento en la expresión global de microRNAs se ve considerablemente disminuido y los ratones mueren alrededor de la semana E-12. En estos ratones, los microRNAs no pueden ser procesados debido a la falta del complejo ADAR1 p110-Dicer, dando lugar a la desregulación de muchos mRNAs blanco de estos microRNAs, principalmente mRNAs involucrados en apoptosis y activación de la vía de interferón [35].

1.4.3 ADAR2

El gen que codifica para ADAR2 está codificado en la región 22.3 del brazo largo del cromosoma 21(21q22.3). Este gen está compuesto por 15 exones, se encuentra retenido en núcleo debido a la presencia de una señal de localización nuclear (NLS) y tiene dos dominios de unión a dsRNA. Se sobreexpresa en islotes pancreáticos de ratones con excesiva nutrición, este aumento en la expresión induce obesidad con resistencia a insulina además de aumento en la edición del RNA en respuesta al estímulo de glucosa. Los ratones deficientes de ADAR2 mueren varias semanas después del nacimiento, lo que indica que no es una proteína indispensable durante el desarrollo embrionario. Estos ratones experimentan repetidos episodios epilépticos debido al flujo excesivo de Ca^{2+} , ya que el canal de glutamato GluR-B necesita ser editado en los sitios Q/R (Glutamina/Arginina) del exón 11, este sitio de edición está localizado en el dominio del poro del canal. La edición del mRNA,

intercambia CAG (glutamina) por CIG arginina (sitio Q/R), lo que cambia la conformación tetramérica del canal, haciéndolo impermeable al Ca^{2+} ya que la región de splicing del mRNA de GluR se encuentra entre el exón 11 y 12, en la región Q/R. Esta edición da lugar a la formación de un sitio de splicing necesario para que la proteína sea funcional [34,37]. La deficiencia en la edición del sitio Q / R parece ser la base de la pérdida de neuronas motoras en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica esporádica (ALS). Además de la deficiencia de la edición del receptor GRIA2 se ha propuesto un exceso en el flujo de Ca^{+} que promueve la activación de AKT y podría conducir al desarrollo de glioblastoma, así como la muerte neuronal en la isquemia del presencefalo [35]

1.4.4 ADAR3

ADAR3 se encuentra codificado en la región 15.3 del brazo corto del cromosoma 10 (10p15.3) La secuencia de ADAR2 y 3 son muy similares; sin embargo, la expresión de ADAR3 sólo se ha reportado en cerebro. ADAR3 contiene secuencias ricas en Arginina en la región amino terminal, que le permiten reconocer RNA de una sola cadena. Se ha observado que su expresión se restringe a ciertas regiones del cerebro. No se ha demostrado su actividad catalítica, pero se ha visto que puede formar heterodímeros con ADAR1 y 2 e inhibir su actividad. No se han identificado transcritos producto de splicing alternativo [30,32,34,36].

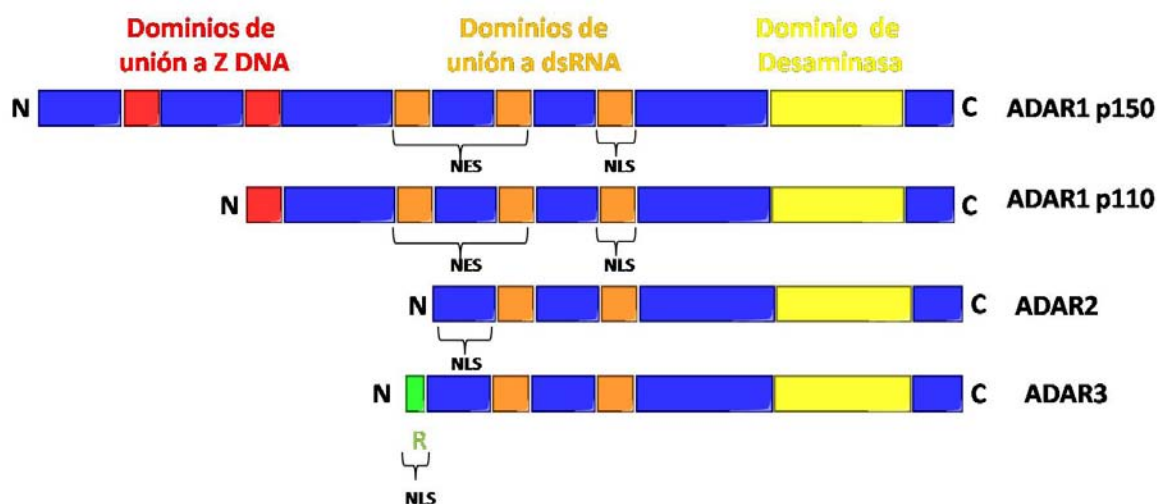


Figura 2: ADAR1 tiene uno o dos dominios de unión a Z DNA (Rojo), tres dominios de unión a dsRNA (dsRBD) y un dominio de desaminasa en la región carboxilo terminal (amarillo), ADAR2 no tiene dominios de unión a DNA, presenta únicamente dos dominios dsRBD (Naranja) y dominio desaminasa (Amarillo), mientras que ADAR3 además de los dominios anteriores presenta una región rica en arginina (R), que le permite unirse a RNA de una sola cadena.

1.5 Edición de mRNA

En los pre-mRNAs la mayoría de los sitios de edición se encuentran en regiones no codificantes. En este sentido, ADAR puede crear o eliminar sitios de splicing. Al igual que la maquinaria de traducción, el espliceosoma interpreta la inosina como guanosina y, de esta forma se crean sitios canónicos GU 5' y AG 3' de splicing por la desaminación de sitios AU (IU=GU) y sitios AA (AI=AG). Por otro lado, la edición de sitios AG (IG=GG) puede destruir los sitios de splicing [34].

La edición mediada por ADAR es un proceso esencial para la vida y el desarrollo. Los ratones homocigotos con una mutación deletérea en ADAR2 mueren unas semanas después del nacimiento. Se ha observado un fenotipo letal en embriones de ratones deficientes de ADAR1 debido a la desintegración del hígado y deficiencia en la eritropoyesis [37,38] mientras que la delección de ADAR2 genera cambios en la

abundancia de microRNAs específicos y sus mRNAs blanco, durante el desarrollo embrionario [39].

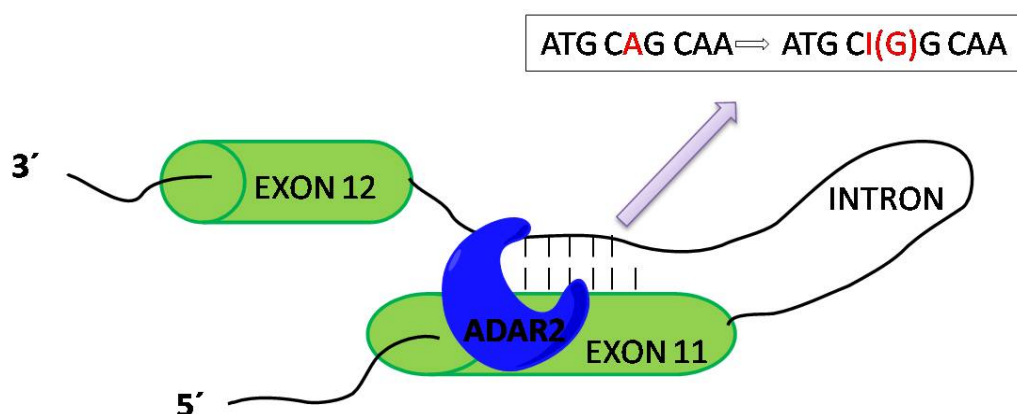


Figura 3: La edición del receptor de glutamato es esencial para la función normal del cerebro y la supervivencia. ADAR2 es la enzima responsable de la edición en el sitio Q/R del exón 11 del receptor. Los miembros de la familia del receptor de serotonina [5-hidrotriptamina (5-HT)], son importantes en la regulación del ciclo circadiano y la alimentación, además de desempeñar un papel fundamental en enfermedades mentales como ansiedad, depresión, migraña y esquizofrenia. Se ha visto que este receptor es sujeto de edición, esta modificación altera la eficiencia de unión [40]

1.5.1 Edición de microRNAs

Recientemente se ha descubierto que la edición de los pri-microRNAs y los pre-microRNAs regula el procesamiento de los microRNAs y puede dar como resultado la supresión del procesamiento mediado por Drosha y Dicer [41]. Como consecuencia los niveles de microRNAs maduros disminuyen. Algunos miRNAs se procesan de manera más eficiente cuando son editados por ADAR [42]. En otros casos, el pri-miRNA es procesado por el complejo Drosha/DGCR8 y da lugar a nuevas isoformas mientras que en otros casos la edición no permite que el pre-

miRNA sea reconocido por Exportin 5 y exportado al citoplasma [43]. En resumen, varios pri-microRNAs y pre-microRNAs están sujetos a edición mediada por ADAR y esto puede inhibir su procesamiento y la producción de microRNAs maduros, afectando la unión de los microRNAs al complejo de RISC, o redirigiéndolo a un nuevo grupo de mRNAs blanco [32, 44].

Un ejemplo de la regulación de la maduración de microRNAs mediada por la edición de ADAR es el siguiente: se ha observado que adenosinas específicas en el pri-miR-142 son editadas por ADAR1 o 2, la edición de este precursor del microRNA-142 que se expresa en células del tejido hematopoyético, tiene como resultado la supresión del procesamiento mediado por Drosha. El pri-microRNA editado es degradado por el complejo proteico Tudor-SN, que es un componente del complejo de RISC [45]. Sin embargo, en otros casos, como es el de miR-376, la edición del RNA causa el cambio de una base en la región semilla y genera miRNAs maduros editados, con genes blanco únicos y diferentes a los del microRNA no editado [45]. La diferencia entre la inhibición del procesamiento o el cambio hacia un nuevo mRNA radica en los sitios de edición y el número de adenosinas editadas. El complejo Drosha/DGCR8 corta 11 nt después de los segmentos basales mientras que Dicer corta 3 nt antes del sitio de inicio de la horquilla [46]; la edición en los sitios de corte modifica la estructura secundaria del microRNA e impide que puedan ser reconocidos por las enzimas responsables del procesamiento. La hiperedición del microRNA, es decir, la edición de más del 50% de adenosinas dentro de la secuencia promueve la rápida degradación del microRNA por la ribonucleasa Tudor-SN (figura 4) [37]. Cuando la edición no afecta los sitios de corte, un solo sitio de edición es suficiente para redireccionar el microRNA a un nuevo grupo de mRNAs blanco, ya que mediante ensayos *in silico* se ha predicho que el juego de mRNAs blanco para un microRNA editado difiere de los mRNAs del mismo microRNA no editado [47].

En un estudio más reciente se demostró que además de editar dsRNA, ADAR puede formar interacciones tipo proteína-proteína con Dicer incrementando la actividad de esta última proteína y facilitando la unión del microRNA con Dicer.

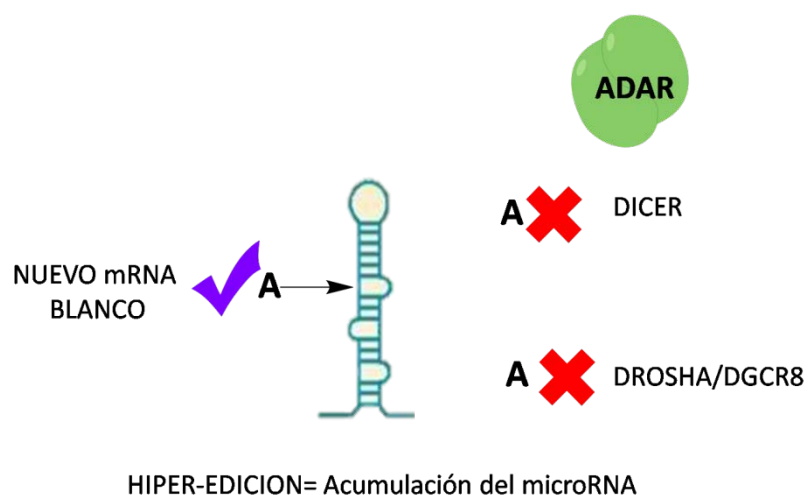


Figura 4: El sitio de edición y el número de adenosinas editadas son fundamentales en la inhibición del procesamiento o en la redirección a un nuevo mRNA blanco.

1.6 Expresión de ADAR y su asociación con patologías

La expresión de ADAR juega un papel importante en la regulación de procesos patológicos. En el cáncer, se han descrito cambios en los niveles de expresión de ADAR que han sido asociados con la desregulación en la edición, y estos cambios en ADAR son los responsables de la activación de oncogenes y la supresión de genes antitumorales. Los perfiles de expresión son específicos del tipo de cáncer que se desarrolla [63].

Uno de los ejemplos de cáncer en el que ADAR está implicado es el glioblastoma multiforme, que es un tipo de cáncer de cerebro que inicia en las células de la glía, es el grado más severo de astrocitoma y el promedio de vida es de 18 meses. Estudios en tejidos de pacientes con glioblastoma multiforme han demostrado que la actividad catalítica de ADAR2 esta significativamente disminuida en los pacientes con cáncer más avanzado y en etapas más malignas que en los controles y los pacientes con un glioblastoma en etapas más tempranas [48]. En el carcinoma hepatocelular se han encontrado incrementados los niveles de ADAR1, esto se ha asociado con la hiper-edición de AZIN1 (Inhibidor de antienzima 1) que es una proteína antitumoral y al estar editada se encuentra disminuida en el cáncer [49].

En el cáncer de mama, se ha asociado la disminución en la expresión de ADAR con el incremento en la proliferación de las células y la disminución de la apoptosis [50].

II. Justificación

Se desconocen los niveles de expresión de ADAR 1 y 2 en fibroblastos pulmonares y su efecto sobre la expresión de un grupo de microRNAs que se encuentran alterados en pacientes con FPI, entre éstos encontramos a miR-21 y Let-7d. Los cuales pudieran ser editados por ADAR 1 y 2, lo que podría regular su proceso de maduración o la especificidad por sus RNAs mensajeros blanco.

III. Hipótesis

La expresión de ADAR 1 y 2 está alterada en la FPI, por lo cual, habrá cambios en los procesos de maduración de miR-21 y Let-7d y como consecuencia se modificará la expresión de moléculas profibrosantes.

IV. Objetivos

4.1 General

Determinar el papel de ADAR1 y 2 en la expresión de microRNAs diferencialmente expresados en fibroblastos pulmonares derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.

4.2 Particulares

- I. Cuantificar los niveles de expresión de *ADAR1 p110*, *ADAR1 p150* y *ADAR2* en fibroblastos pulmonares control y procedentes de FPI.
- II. Cuantificar los niveles de expresión de los microRNAs; *miR-21*, *Let-7d* y sus respectivos pri-microRNAs, así como la expresión de los mRNAs blanco; *PELI1* y *SPRY2*, en fibroblastos procedentes de pacientes con FPI y control.
- III. Inmunolocalizar ADAR1 y ADAR2 en fibroblastos control y procedentes de FPI.
- IV. Analizar los niveles proteicos de ADAR1, ADAR1 p110, ADAR1 p150 y ADAR2 mediante Western Blot.
- V. Analizar los niveles de proteína de ADAR1 p110 y ADAR1 p150 en extractos diferenciales de núcleo y citoplasma de fibroblastos control y de FPI.
- VI. Sobreexpresar ADAR1 p110 wt y mutante, ADAR1 p150 wt y mutante, así como ADAR2 en fibroblastos pulmonares derivados de pacientes con FPI.
- VII. Cuantificar los niveles de expresión de los pri-microRNAs así como los

microRNAs postransfección.

- VIII. Estimular con TGF β 1 los fibroblastos transfectados con ADAR1 y ADAR2 y cuantificar los niveles de expresión de *miRNA-21*, *pri-miRNA-21*, *PELI1* y *SPRY2*.

V. Metodología

5.1 Cultivo celular

Se trabajó con 6 cultivos de fibroblastos pulmonares control (3 provenientes de pacientes mexicanos y 3 provenientes de pacientes alemanes) y 6 cultivos de fibroblastos fibróticos de pacientes (3 de pacientes alemanes y 3 de pacientes mexicanos) en medio Ham F-12 (Gibco), con 10% de suero fetal bovino a 37°C con 5% CO₂, hasta alcanzar una confluencia del 80%. Después de lo cual se extrajo el RNA total con Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mitad de la muestra obtenida fue utilizada para la extracción del RNA total por el método de Trizol y la otra mitad se extrajo utilizando el Kit miRNeasy Mini Kit (Qiagen) para enriquecer la fracción de los microRNAs.

5.2 Extracción y purificación de RNA total

A cada tubo con Trizol se agregaron 200 μ L de cloroformo y se incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos, posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 16 minutos a 4°C. En seguida se agregaron 0.5 μ L de Glucógeno a cada muestra. Se adicionaron 500 μ L de 2- propanol a cada muestra y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 11 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavó el botón con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 7500

rpm durante 6 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se dejaron secar las muestras sobre papel absorbente por aproximadamente 15 minutos. El RNA se resuspendió en 10 µL de agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato) al 0.5%. El RNA se cuantificó utilizando un espectrofotómetro UV (Spectrophotometer NanoDrop ND-1000) a una absorbancia de 260 nm. La pureza del RNA se determinó con las relaciones 260/280 y 260/23.

5.3 Síntesis de cDNA y PCR en tiempo real

El RNA obtenido se utilizó para sintetizar cDNA. Para eliminar el DNA genómico contaminante 1 µg de RNA total fue tratado con 1 µL de DNAsa y 1 µL de buffer (Fermentas), durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se le agregó 2 µL de EDTA 25 mM y se incubó por 10 minutos a 65°. La síntesis de cDNA se realizó por transcripción reversa. El cDNA se sintetizó utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription de Applied Biosystems de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Un microgramo de RNA previamente tratado con DNAsa, fue mezclado con una solución que consiste en 2 µL de RTb 10x, 0.8 µL de dNTP's 25x, 2 µL de RT Random 10x, 1.2 µL de agua tratada con DEPC, 1 µL de inhibidor de RNAsa y 1 µL de la enzima Transcriptasa Reversa. Con las siguientes condiciones:

$$\begin{array}{cccc} \frac{25ndC}{10min} & \frac{37^{\circ}7C}{27rs} & \frac{85^{\circ}5C}{5seg} & \frac{4}{\infty} C \end{array}$$

Posteriormente éste se utilizó para cuantificar por PCR en tiempo real los niveles de expresión de los mRNA *ADAR1* y *ADAR2*, *pri-miR-21* y *pri-miRLet7d*. Como control endógeno se utilizó PolR2A.

Para cuantificar los niveles de expresión de los microRNAs se tomaron 10 ng de RNA enriquecido con el kit de Qiagen, para la reacción de transcripción reversa

(TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, applied biosystems), el cDNA obtenido fue utilizado para determinar los niveles de expresión de *miR-21* y *Let-7d* en líneas fibróticas y control, los datos fueron normalizados con *U6*.

El cDNA sintetizado se utilizó para la PCR en tiempo real, utilizando el sistema QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 10 µL, el cual contenía: 2 µL de cDNA, 5 µL de Master Mix (TaqMan Universal PCR Master Mix o Fast SYBR™ Green Master Mix, Thermo Fisher), 0.2 µL de sonda u oligo y se llevó a un volumen final de 10 µL con agua libre de nucleasas. Se amplificaron los productos de *ADAR1 p110*, *ADAR1 p150*, *ADAR2*, *pri-miR-21*, *pri-Let-7d*, *miR-21*, *Let-7d* utilizando sondas (Applied Biosystems, Tabla 1) u oligos específicos (Tabla 2) para cada mensajero. Como genes endógenos se utilizaron *PolR2A* (para mRNA) y *RNU6B* (para microRNAs). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

$$\frac{94^{\circ}C}{5 \text{ seg}} \quad \frac{94^{\circ}C}{15 \text{ seg}} \quad \frac{60^{\circ}C}{1 \text{ min}} \quad \frac{72^{\circ}C}{2 \text{ seg}} \quad \frac{72^{\circ}C}{2 \text{ min}}$$

1

40x

Tabla 1: Sondas TaqMan utilizadas en la qPCR

Gen	Numero de catálogo (Thermo Fisher)
<i>ADAR2</i>	Hs00953724_m1
<i>Pri-Let-7d</i>	Hs03302562_pri
<i>Pri-miR-21</i>	Hs03302625_pri

<i>PolR2a</i>	Hs00172187_m1
<i>Let-7d</i>	4427975 ID 002283
<i>miR-21</i>	4427975 ID 000397
<i>U6</i>	4427975 ID 001093

Tabla 2: Secuencia de oligos específicos para qPCR

Gen	Fwd primer 5'-3'	Rwd primer 5'-3'
<i>ADAR1</i> <i>p150</i>	CTTCCAGTGCGGAGTAGCG	ATTCATTGCGCCCGCGAG
<i>ADAR1</i> <i>p110</i>	TGGCAGCCTCCGGGTG	TGTCTGTGCTCATAGCCTTG
<i>APOBEC3</i> <i>D wt</i>	GTCCAGGCTGGAATGCAATGT CA	GAGGCTGAAGCAGAAGAAT CGCTTAAAC
<i>APOBEC3</i> <i>D edit</i>	CTCTGGGATCTCTCTGCCTCC AAATATC	GAGGTTGCAGTGAGTCCAG ATGGC

5.4 Inmunolocalización

Las 6 líneas control y 6 provenientes de pacientes con FPI fueron sembradas en portaobjetos de vidrio, después de 24 horas se fijaron con metanol frío, posteriormente se bloqueó durante 20 minutos con bloqueador universal 1x (biogenex) y se incubaron los anticuerpos respectivos para ADAR1, ADAR2 y

fibrilarina o nucleolina (Tabla 3). Después de esto las laminillas fueron incubadas con anticuerpos secundarios acoplados a un fluoróforo (Jackson ImmunoResearch, tabla 3), estas células fueron analizadas utilizando microscopio confocal (Olympus FV1000 confocal microscope).

Tabla 3: Anticuerpos

Proteína	Número de catálogo
ADAR1	sc-73408
ADAR2	sc-10012
Fibrilarina	sc-166021
Nucleolina	396400 (Invitrogen)
LMNB1	Sc-6216 (Santa Cruz Biotechnology)
GAPDH	GTX100118
B-ACTINA	622102 (BioLegend)
Secundario anti-mouse	A16011 (Invitrogene)
Secundario anti-rabbit	31458 (Thermo Scientific)
Secundario anti-goat	sc-2020 (Santa Cruz Biotechnology)
Alexa fluor 488	715-545-150 (Jackson ImmunoResearch)
Alexa fluor 594	711-585-152 (Jackson ImmunoResearch)
Alexa fluor 647	705-605-147 (Jackson ImmunoResearch)
DAPI	R37606 (Molecular probes)

5.5 Western blot

Para determinar si lo descubierto a nivel de transcritos corresponde a nivel de proteínas, se realizó western blot de extractos de proteínas totales, estas fueron aisladas utilizando buffer de lisis RIPA (Santa Cruz Biotechnology), además de extractos diferenciales de núcleo (Buffer L1) y citoplasma (RIPA), en presencia de 1 μ L de inhibidor de proteasas (Proteases inhibitor cocktail, calbiochem). Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (Pierce), en un espectrofotómetro Beckman DU 640.

Los Western blots se realizaron en geles de poliacrilamida, utilizando métodos estándar, las proteínas fueron transferidas en cámara húmeda a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad), estas membranas fueron bloqueadas con 5% de leche diluida en PBS-T 0.1%, posteriormente fueron incubadas con los respectivos anticuerpos primarios específicos para ADAR1, ADAR2, LMNB1, GAPDH o b-actina. Las proteínas fueron visualizadas utilizando el anticuerpo secundario correspondiente para cada anticuerpo conjugado con HRP, utilizando como sustrato para la detección Super Signal West Dura Extended Duration Substrate detection solutions (Thermo Scientific). La señal fue detectada y analizada con el sistema Chemi Doc technology (Bio-Rad).

5.6 Selección de microRNAs blanco de ADAR

Para identificar las adenosinas que pueden ser editadas por ADAR en Let-7d y miRNA-21 se utilizó la plataforma Inosine predict software (University of Utah School of Medicine) y se consideraron como significativas las adenosinas con una probabilidad $\geq 50\%$ de ser editadas.

5.7 Sobreexpresión de ADAR1 y ADAR2 en dos líneas de fibroblastos fibróticos

Se transfectaron dos líneas de fibroblastos diagnosticados con fibrosis pulmonar idiopática con vectores específicos para la sobreexpresión de ADAR1 (RC207522) y ADAR2 (RC209073, OriGene, Maryland, USA). Como método de transfección se utilizó el sistema Nucleofector™ 2b Device y el kit Basic Fibroblasts Nucleofector® Kit (VPI-1002, Lonza, Basel, Switzerland). Como control negativo se utilizó el vector vacío (PS100001, OriGene), 24 horas postransfección se extrajo el RNA y la proteína a dichos fibroblastos, este material fue utilizado para la cuantificación de la expresión de los mRNAs y la cuantificación de las proteínas. Un grupo de estos fibroblastos fue estimulado con 5 ng/mL of TGFβ1 durante 24 horas postransfección.

5.8 Estimulo de fibroblastos con TGFβ1

Los fibroblastos fueron estimulados con 5 ng/mL de TGFβ1 recombinante (100-B, R&D) 24 horas post transfección. En medio Opti MEM (catalogo: 11058021, Thermo Scientific) sin suero fetal bovino, durante 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio y las células se lavaron dos veces con PBS frío. Se agregó Trizol y se extrajo el RNA de las células, que fue utilizado para la cuantificación de miRNA-21, pri-miRNA-21, PELI1 y SPRY2. Como genes endógenos se utilizaron POLR2A y U6.

5.9 Generación de plásmidos de sobreexpresión de las isoformas de ADAR1

Los plásmidos de sobreexpresión de ADAR1 p150 wt y mutante fueron donados por el grupo del Doctor Zipeto de la División de Medicina Regenerativa, Departamento

de Medicina, Centro de Cáncer Moors, Universidad de California, La Jolla, CA 92093, USA.

Utilizando como templado el plásmido ADAR1 wt se clonó la variante ADAR1 p110 por PCR con la polimerasa Platinum-Pfx Polymerase (ThermoFisher Scientific #11708013), siguiendo protocolos estándar. Los productos de PCR fueron purificados en gel de agarosa y digeridos con BamHI (NEB) y XbaI (NEB), y ligados toda la noche a 16°C en el vector linearizado pcDNA3.1-Flag-HA (Addgene #10792). El plásmido ADAR1 p110 mutante (catalíticamente inactivo) fue generado utilizando el plásmido ADAR1^{E912A} [51] como templado y fue clonado por PCR con la polimerasa Platinum-Pfx. Todas las secuencias de las construcciones fueron verificadas. Los oligos utilizados para la clonación de ADAR1 p110 se encuentran en la tabla 4.

Tabla 4: Oligos para clonación

Nombre	Fwd primer 5'-3'	Rwd primer 5'-3'
ADAR1 p110 clon	AAGGATCCATGGCCGAGATCAA	CCTCTAGACTATACTGGGCAGAG

5.10 Transfección de fibroblastos Control y FPI

Con la finalidad de confirmar si el aumento en la expresión de ADAR1 y ADAR2 regula la expresión de miR-21 se realizó la transfección de vectores específicos para la sobreexpresión de ADAR1 o ADAR2 (Origene, Rockville, Maryland, USA), en dos cultivos primarios de fibroblastos de pacientes diagnosticados con FPI. Utilizando como método de transfección Nucleofector™ 2b Device (Lonza, Basilea, Suiza) y el Basic Fibroblasts Nucleofector® Kit (Lonza, Basilea, Suiza). De acuerdo a las

instrucciones del fabricante, se llevó a cabo la estandarización de la transfección para cada cultivo primario y para cada plásmido. Como control negativo se utilizó el vector vacío con marco de lectura abierto (Origene, Rockville, Maryland, USA).

La transfección de las isoformas de ADAR1 se llevó a cabo utilizando lipofectamina 2000 (Thermo Fisher), en un ratio de 1:2, la mezcla se realizó en medio reducido en suero Opti-MEM (Gibco). Las células fueron incubadas con la lipofectamina y el plásmido por 48 horas, después de lo cual se realizó la extracción de RNA o proteínas, estos experimentos fueron realizados por duplicado.

5.11 RESS-qPCR

La edición de RNA en fibroblastos control comparados con fibroblastos de FPI fue medida utilizando la técnica de RESS-qPCR [52] de la siguiente manera. Como templado de edición se seleccionó APOBEC3D, blanco de edición mediada por ADAR1. Utilizando el cDNA de 6 líneas control y 6 líneas fibróticas (2 μ L cDNA por muestra), como templado se amplificó por PCR utilizando la secuencia de oligos publicada por Crews para APOBEC3D (Tabla 2), estos oligos reconocen una adenosina específica, de tal manera que se puede diferenciar entre los transcritos wild type (wt) y los transcritos editados (Edit). Mediante diluciones seriales se probó la eficiencia de los primers, APOBEC3D wt y APOBEC3D edit en un volumen final de 10 μ L (5 μ L SYBR GreenER Super Mix Life Technologies, 0.2 μ L de oligos, aforado a 10 μ L con agua libre de nucleasas) utilizando el sistema QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher), bajo las siguientes condiciones:

Las tasas de edición fueron calculadas utilizando los valores de la eficiencia de los oligos de la siguiente manera:

$$\text{Tasa relativa de edición de RNA} = \frac{E^{-ct \text{ Edit}}}{E^{-ct WT}}$$

5.12 Preparación de muestras para ensayo de actividad catalítica

Un cultivo primario de fibroblastos control y un cultivo primario de fibroblastos fibróticos fue transfectado con vectores de sobreexpresión para ADAR1 p110 wt, ADAR1 p110 mutante, ADAR1 p150 wt y ADAR1 p150 mutante, así como el vector vacío, utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), 24 horas post transfección las células fueron tratadas con 0.5 μM de pentostatina (Santa Cruz Biotechnology) para inhibir la actividad catalítica de las Desaminasas de Adenosina (ADA), con la finalidad de hacer más específico el ensayo, 48 horas post transfección las células fueron colectadas y se utilizaron para el ensayo de actividad catalítica.

5.13 Ensayo de actividad catalítica de ADAR

Para cuantificar la formación de inosinas resultado de la hidrólisis de Adenosinas se utilizaron alícuotas de las proteínas extraídas de las células transfectadas con los plásmidos específicos para cada isoforma de ADAR1 tanto Wild type como mutante se utilizó el ensayo colorimétrico Adenosine Deaminase Activity Assay Kit (Biosvision). El extracto de proteínas de las células se preparó agregando 150 μL de buffer de ensayo ADA 1x frío con inhibidor de proteasas (calbiochem), el homogenado se transfirió a un tubo de 1.5 mL frío y se centrifugaron a 16,000 $\times g$ a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo pre enfriado, este lisado fue utilizado para analizar la actividad catalítica de ADAR1.

El estándar de inosinas se diluyó a una concentración final de 1 mM, agregando 10 μL de estándar de inosina a 90 μL de buffer de ensayo 1x ADA. El estándar se

agregó a los pozos en diluciones seriales (0, 2, 4, 6, 8 y 10 μL de Inosine Standard 1 mM), llevando a un volumen final de 50 μL / pozo con 1x ADA Assay Buffer.

Se agregaron 2-50 μL de muestra por pozo. Como control positivo se utilizaron 2 μL o del control provisto dentro del kit en un nuevo pozo. La muestra y el control positivo fueron llevados a un volumen final de 50 μL / pozo con 1x ADA Assay Buffer. Como control negativo se utilizó únicamente 50 μL de 1x ADA Assay Buffer.

Para la preparación de la mezcla de reacción se utilizó por muestra 41 μL de 1x ADA Assay Buffer, 2 μL ADA Convertor, 2 μL ADA Developer, 5 μL ADA Substrate. Agregando 50 μL de la mezcla por pozo. La placa se incubó a 37°C por 5 minutos después de lo cual se leyó a una longitud de onda de 293 nm utilizando el lector de placas Infinite 200 (Tecan) en el tiempo 0, 10 minutos, 20 minutos y 40 minutos. Los datos fueron analizados utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad catalítica de ADAR por muestra} = \frac{B}{\Delta t \cdot \mu\text{g de proteína}} \cdot DF = \text{nmol/min}/\mu\text{g} = \text{mU}/\mu\text{g}$$

Donde:

B es la cantidad de inosina de la curva estándar (nmol).

Δt es el tiempo de reacción (min.)

μg de proteína es la cantidad de proteína / pozo (μg)

DF es el factor de dilución de la muestra

Se graficó la actividad específica de ADAR en lisado de fibroblastos pulmonares control y de FPI transfectados con las isoformas WT y mutantes de ADAR1.

5.14 Sobreexpresión de las isoformas de ADAR1

Un cultivo primario de fibroblastos provenientes de un paciente diagnosticado con FPI fue transfectado con las isoformas de ADAR1 p110 wt, ADAR1 p110 mutante, ADAR1 p150 wt y ADAR1 p150 mutante, así como el respectivo control fueron transfectados utilizando lipofectamina 2000 en una proporción 1:2, los fibroblastos fueron colectados para la extracción de RNA por el método de trizol.

5.15 Análisis estadístico

Nuestros datos tienen una distribución normal, fueron analizados con la prueba T de Student para comparar los niveles de expresión, los resultados se expresan como la media $\pm$ SD, todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism (San Diego, CA).

VI. Resultados

6.1 Niveles de expresión de ADAR1 y ADAR2 en pulmón y fibroblastos pulmonares control y de FPI

El análisis de expresión génica de *ADAR1* y *ADAR2* en pacientes con FPI, en comparación con controles, mostró una disminución significativa de *ADAR1* (*p=0.0141, Figura 5A) en tejido de pulmón y en fibroblastos pulmonares (*p=0.05, Figura 5C), mientras que *ADAR2* no muestra diferencias significativas (Figura 5B y D). El análisis de proteínas mediante Western Blot y su posterior análisis densitométrico mostró una disminución significativa en ambas proteínas (*ADAR1*; 76% y *ADAR2*; 55%, Figura 6A y B) en los extractos proteicos totales de los fibroblastos de FPI con respecto a los controles. En la inmunocitoquímica (Figura

6C) y los ensayos de inmunofluorescencia de todos los cultivos celulares, se encontraron diferencias en la distribución de ADAR1 y ADAR2. Esto fue corroborado por la medición de la densidad óptica integrada (Figura 6D y E). En los fibroblastos control, ADAR1 y ADAR2 están localizados principalmente en el nucléolo (ADAR1 91.52% y ADAR2 60.0%, Figura 6E); mientras que en los fibroblastos FPI, se encuentra principalmente en el nucleoplasma (ADAR1 42.59% y ADAR2 83.13%, Figura 6E). En cuanto a la expresión de miRNA-21 y pri-miRNA-21, se encontró que la expresión basal de pri-miRNA-21 (Figura 7A) no se modifica en fibroblastos FPI con respecto a los fibroblastos control, sin embargo; miRNA-21 se encontró sobreexpresado en FPI con respecto a los controles (*p=0.0052, Figura 7B).

6.2 Sobreexpresión de ADAR1 y ADAR2

La transfección de los plásmidos específicos para ADAR1 y ADAR2, en dos cultivos de fibroblastos primarios de FPI mostró un incremento significativo de la expresión de ambos transcritos (ADAR1 *p=0.05 y ADAR2 *p=0.000019, Figura 8A y B). El control se muestra como el promedio de expresión de los fibroblastos basales y los fibroblastos transfectados con el vector vacío. mediante la cuantificación por qPCR. Esta misma sobreexpresión se observó a nivel de proteína (Figura 8C y D). Como control de carga se utilizó beta actina (Figura 8C Y D). El análisis densitométrico muestra un incremento significativo de ADAR1 (44.4%, *p=0.05) y ADAR2 (444%, *p=0.000019) La sobreexpresión ADAR1 y 2 en estas células estuvo asociada con el incremento en la expresión de pri-miRNA-21 (ADAR1 *p=0.01 y ADAR2 *p=0.008, figura 9A) y la disminución de miRNA-21 (ADAR1 y ADAR2 *p=0.05, figura 9B). Los mRNAs de *PELI1* y *SPRY2* muestran un aumento significativo en los fibroblastos que transfectados con ADAR1 y ADAR2 (figura 9C y D). En el grupo de fibroblastos que fueron estimulados con TGFβ1 después de la transfección, se observó que la transfección con ADAR1 favorece el aumento significativo en la expresión de *PELI1*. TGFβ1 estimula el aumento significativo de *SPRY2* en las células sobre los ADAR expresado (figura 9).

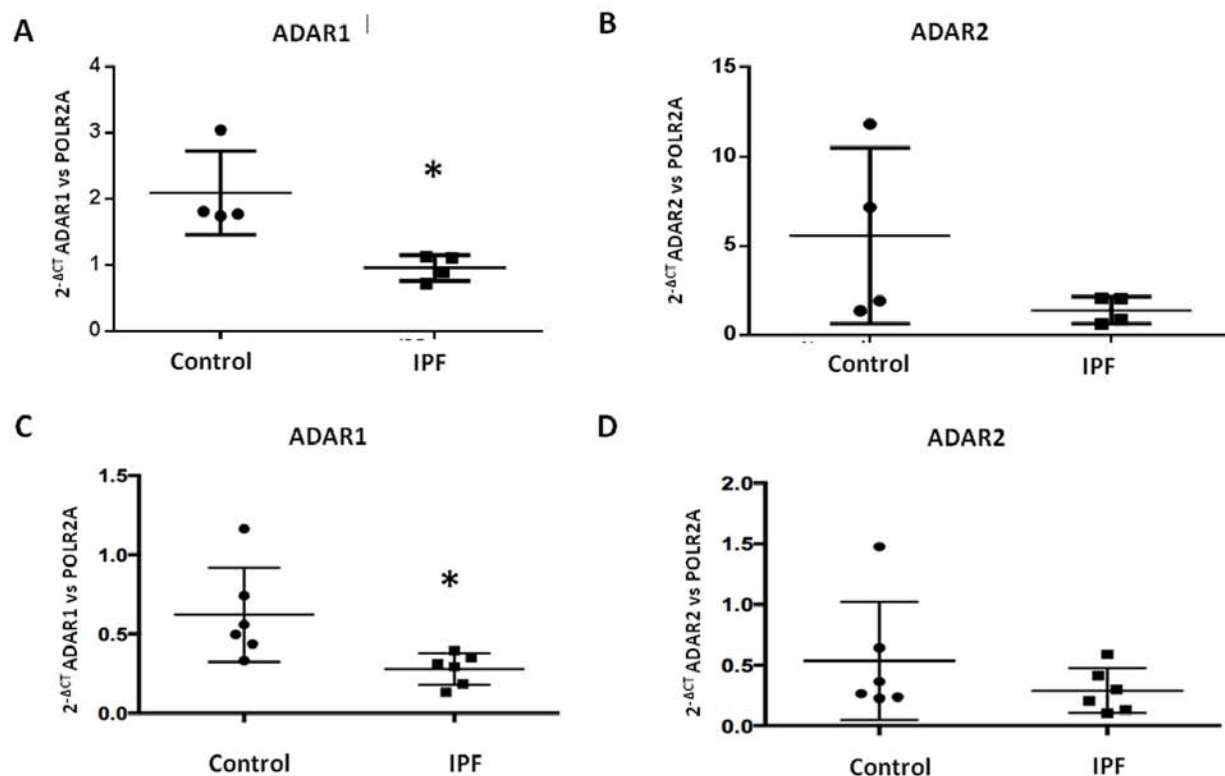


Figura 5. ADAR1 está significativamente disminuido en fibroblastos y pulmón de pacientes con FPI. Nivel de expresión de ADAR1 y 2 en pulmón. ADAR1 está disminuido significativamente en los tejidos de FPI en comparación con los tejidos control (**p=0,0141, A). Mientras que ADAR2 no muestra diferencias significativas (p=0.1454, B). Nivel de expresión de ADAR1 y 2 en fibroblastos de pulmón. La expresión de ADAR1 es significativamente menor en fibroblastos FPI (*p=0.05, C). ADAR2 no muestra diferencias significativas (p=0.076, D)

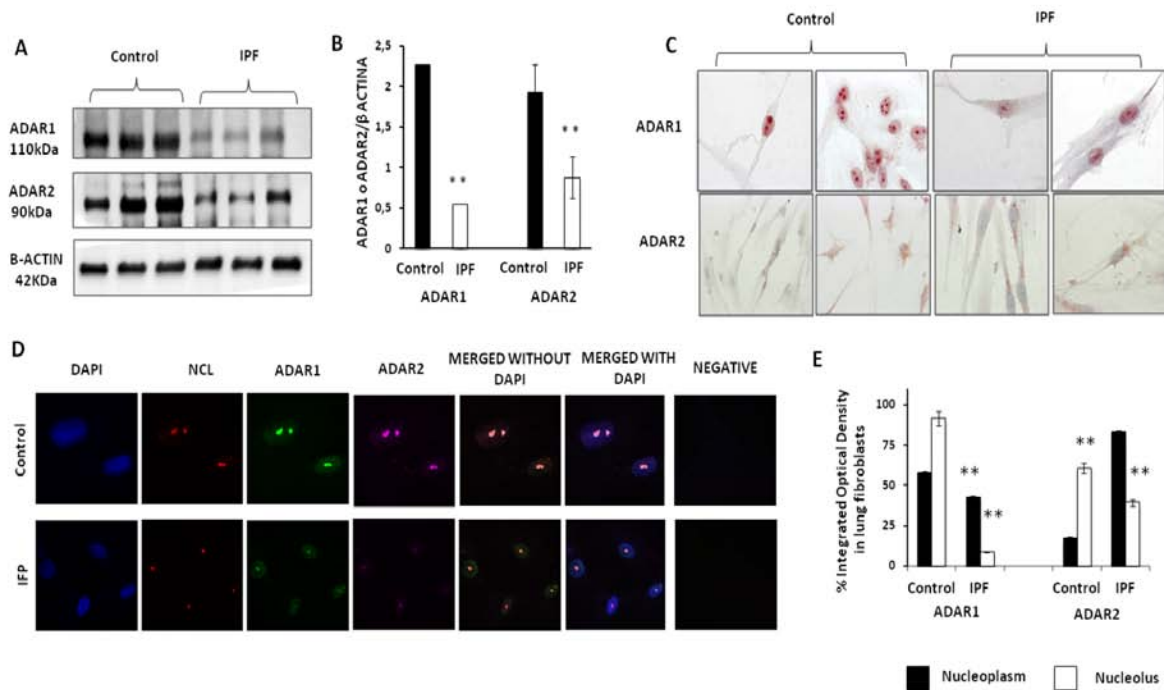


Figura 6. ADAR1 y 2 se localizan principalmente en el nucléolo de los fibroblastos de FPI. Niveles de proteína de ADAR1 y 2 en fibroblastos de pulmón. Análisis densitométrico de ADAR1 y 2, usando β -actina como control de carga. Ambas proteínas están reguladas negativamente en FPI (ADAR1; 76% $**p=0.000025$, ADAR2; 55% $**p=0.0074$, A y B). Las inmunocitoquímicas de ADAR1 y 2 mostraron que ambas proteínas se localizan en el núcleo de los fibroblastos de pulmón (figura C). La inmunofluorescencia de ADAR1 (verde) y ADAR2 (magenta) en fibroblastos de pulmón, mostró que ambas proteínas se encuentran principalmente en el nucléolo, delimitado por el uso de nucleolina (rojo) de las células control (figura D). Análisis de la densidad óptica integrada en fibroblastos pulmonares control y fibróticos, muestra una mayor intensidad de la señal de ADAR1 en el nucleoplasma de los fibroblastos control ($**p=0.000919$, E) con respecto a los fibroblastos FPI. ADAR1 se localiza principalmente en el nucléolo de las células control ($**p=0.00011$, E), ADAR2 se localiza principalmente en el nucléolo de las células control ($**p=0.000028$), mientras que en el nucleoplasma de las células FPI encontramos más ADAR2 frente a fibroblastos de control ($**p=0.000187$, E) (n=6).

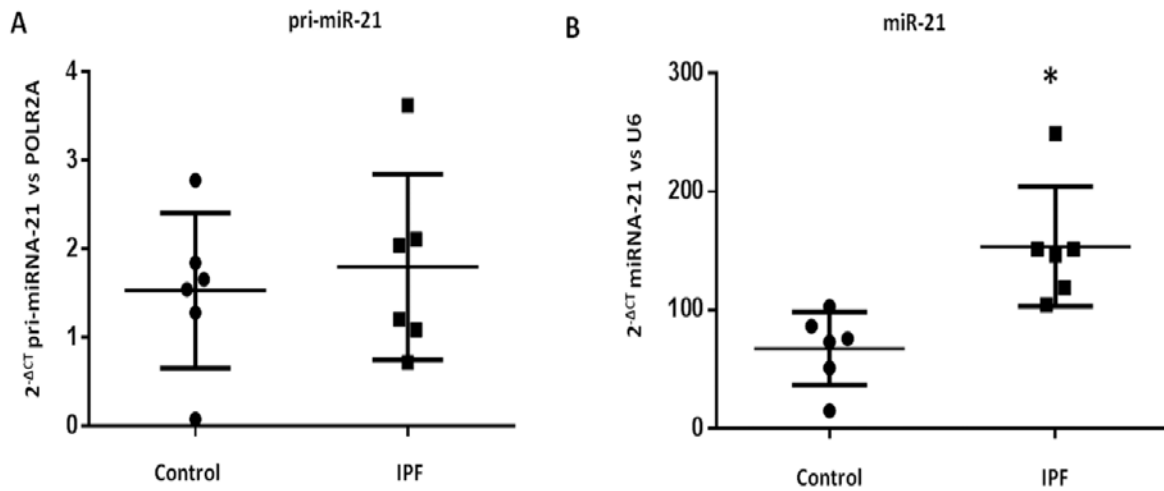


Figura 7. miRNA-21 esta sobreexpresado en fibroblastos fibróticos. Niveles de expresión de pri-miRNA-21 y miRNA-21 en fibroblastos de pulmón. Pri-miRNA-21 no muestra diferencias significativas entre control y fibroblastos de FPI ($p=0,66431$, A y B), mientras que miRNA-21 se encuentra sobreexpresado en fibroblastos FPI (** $p=0,0052$).

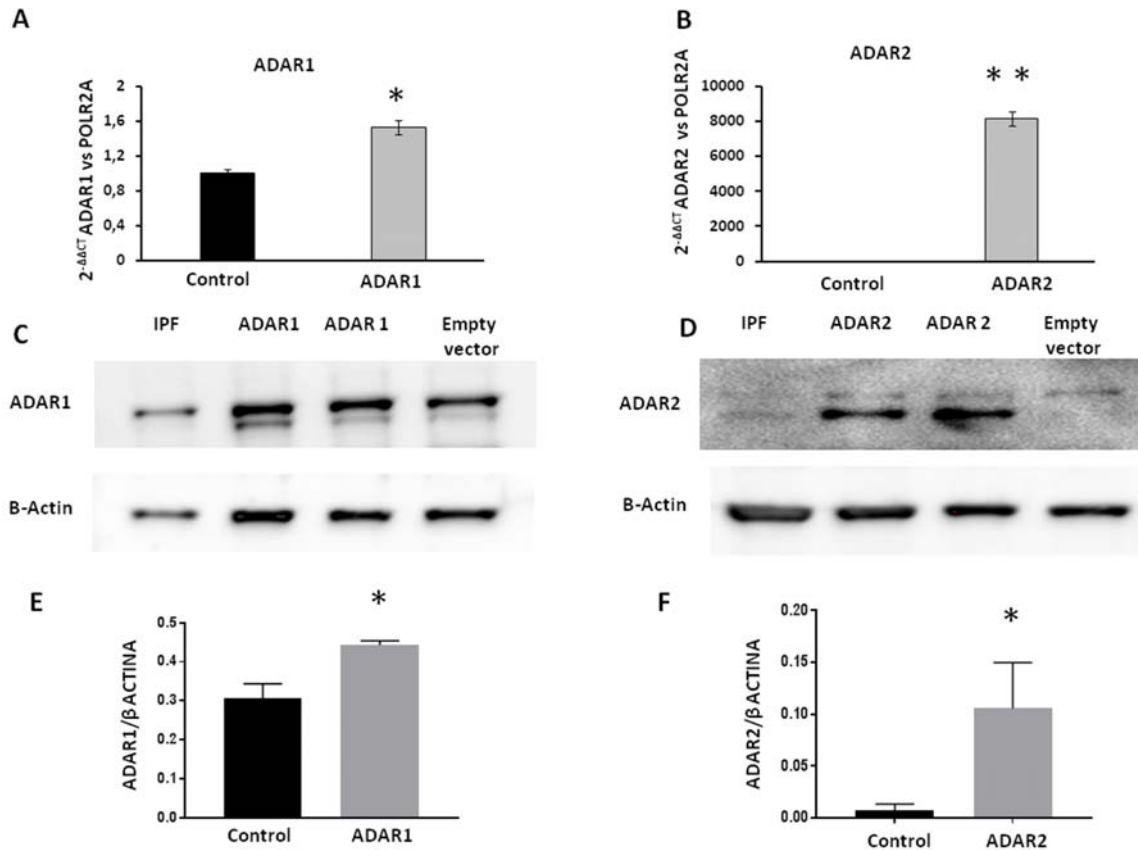


Figura 8. Sobreexpresión de ADAR1 y 2 en dos líneas de fibroblastos de FPI. Niveles de expresión de ADAR1 y 2 en dos líneas de fibroblastos fibróticos transfectados, el incremento en la sobreexpresión fue significativo para ambos plásmidos (ADAR1 0.53 número de veces de incremento * $p=0.05$ y ADAR2 8159 veces más, ** $p=0.000019$, figura A y B), el control es el promedio de los niveles de expresión de los fibroblastos basales y los fibroblastos transfectados con el vector vacío. Niveles de proteína después de la sobreexpresión de ADAR1 y ADAR2 y β -actina como control de carga (C y D). El análisis densitométrico del western blot de las células transfectadas muestra el aumento del 44,4% en la expresión de ADAR1 (* $p=0,0375$, E) y el 442% de ADAR2 (* $p=0,0452$, F).

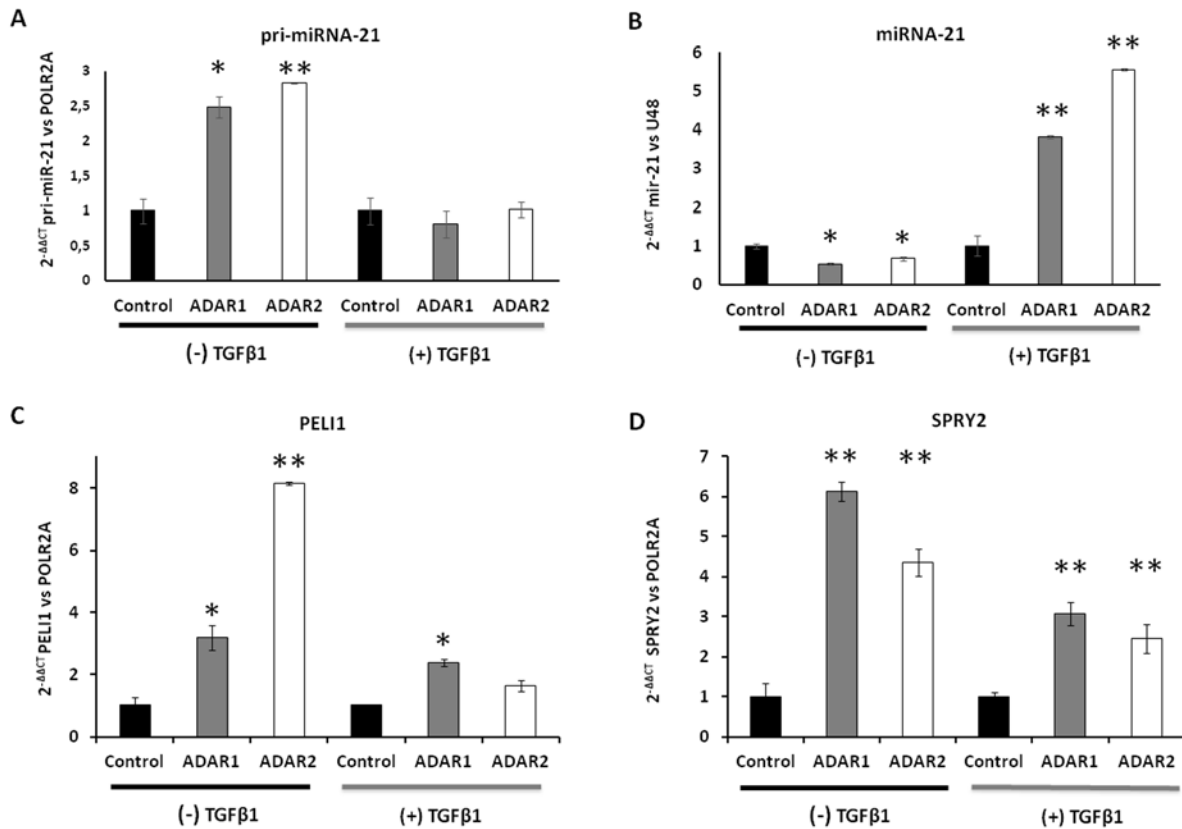


Figura 9. La sobreexpresión de ADAR1 y 2 promueven la acumulación de *pri-miRNA-21*. ADAR1 y ADAR2 favorecen la sobreexpresión significativa de *pri-miRNA-21* en dos líneas de fibroblastos provenientes de pacientes con FPI (ADAR1, 1.48 veces más, barra gris * $p=0.01$, ADAR2 1.82 veces más, barra blanca, ** $p=0.008$, A). La estimulación con TGFβ1 no promueve cambios significativos en los niveles de expresión de *pri-miRNA-21* ($p=0.2689$, A). La disminución de la expresión *miRNA-21* es significativa en las células transfectadas con ADAR1 y 2 (ADAR1 0.53 * $p=0.05$, barra gris y ADAR2 0.68, * $p=0.05$, barra blanca). El estímulo con TGFβ1 promueve la sobreexpresión de *miRNA-21* en fibroblastos FPI transfectados (ADAR1 ** $p=0.000909$, barra gris y ADAR2 ** $p=0.00006603$, barra blanca, B). *PELI1* se encontró aumentado después de la sobreexpresión de ADAR1 y 2 (ADAR1 * $p=0.016$, barra gris y ADAR2 ** $p=0.00067$, barra blanca, C). El tratamiento de fibroblastos con TGFβ1 revierte el efecto de ADAR2 sobre la expresión de *PELI1* ($p = 0.0613$, barra blanca, C), pero no sobre ADAR1 (* $p = 0.037$, barra gris, C). *SPRY2* se encontró elevado después de la sobreexpresión de ADAR1 y 2 (ADAR1 ** $p=0.00046$ barra gris. ADAR2 ** $p=0.0035$, barra blanca, D). *SPRY2* aumenta en ambos cultivos después del estímulo con TGFβ1 (ADAR1 ** $p=0.0011$, barra gris y ADAR2 ** $p=0.006$, barra blanca, D) pero no en el mismo nivel de expresión que en las células transfectadas con ADAR sin estímulo con TGFβ1.

6.3 Niveles de expresión de ADAR1 p110 y ADAR1 p150 en fibroblastos pulmonares control y de FPI

Por otro lado, se analizaron los niveles de expresión basales de las isoformas de ADAR1 en fibroblastos pulmonares, ADAR1 p110 y ADAR1 p150, así como los niveles de expresión de Let-7d y pri-miRNA-Let-7d. A nivel de mensajero encontramos que, ADAR1 p110 (**p=0.008, figura 10 A) y Let-7d (**p=0.0028, figura 12) se encuentran significativamente subregulados en los fibroblastos de pacientes con FPI. Por otro lado, ADAR1 p150 (***p=0.0005, figura 10 B) y pri-Let-7d (*p=0.05, figura 11) se encuentran sobreexpresados significativamente en los fibroblastos provenientes de pacientes con FPI.

La expresión de pri-Let-7d en pacientes con FPI fue mayor comparada con los controles y el Let-7d disminuyó. La correlación entre la expresión de las isoformas de ADAR con respecto a la expresión de pri-Let7d y Let-7d mostró una correlación positiva entre Let-7d y la isoforma p150 de ADAR y una correlación negativa con respecto a la isoforma p110 (figura 12). El análisis con el pri-miR-Let7 no mostró diferencias significativas (figura 11). Para analizar las diferencias en las correlaciones entre el pri-miR-Let-7d y Let7d con las isoformas de ADAR se realizaron ensayos de transfección en una línea celular normal y una fibrótica.

En el análisis de las isoformas de ADAR1 por western blot y su posterior cuantificación densitométrica de los mismos cultivos primarios de fibroblastos analizados anteriormente se observó que únicamente la proteína correspondiente a la isoforma ADAR p110 muestra una disminución (Figura 10 C) en extractos proteícos totales en fibroblastos de FPI respecto a las líneas de fibroblastos control. La comparación de los diferentes compartimientos celulares (núcleo y citoplasma) mostró que la isoforma p110 se encuentra disminuida (carril Nuc; figura 10 D) y que en el citoplasma estaba ausente (carril Cyt; figura 10 D) en los fibroblastos FPI comparado con los controles (Carril Nuc y Cyt; figura 10 D), por otro lado la isoforma

p150 se encuentra incrementada en el citoplasma de fibroblastos FPI, comparada con las líneas de fibroblastos control (carril Cyt, figura 10 D). Por otro lado, en el núcleo la isoforma p150 tiene una menor expresión tanto en controles como en FPI (carriles N en Control y FPI). Por inmunofluorescencia se corroboraron los resultados observados en el western blot (figura 13). Cuando se analizaron los núcleos se observó que ADAR1 está distribuida en el nucléolo y el nucleoplasma de los fibroblastos control, con una mayor tinción de los nucléolos, delimitados por el uso de fibrilarina, en cuanto a los fibroblastos de FPI, se observó la tinción para ADAR1 en el nucleoplasma de las células, mientras que en los nucléolos no se observó señal (figura 13).

6.4 Sobreexpresión de ADAR1 p110 y ADAR1 p150

Para determinar el papel de las isoformas de ADAR1 sobre la expresión de Let-7d, se transfectó una línea de fibroblastos control y una línea de fibroblastos fibróticos con los siguientes plásmidos específicos: ADAR1 p110 wt, p110 mutante, p150 wt y p150 mutante y se analizaron los niveles de expresión de Let-7d y pri-miR-Let7d. Al transfectar ADAR1 p110 wt en fibroblastos control, los niveles del transcrito de pri-miR-Let-7d disminuyen significativamente (* $p=0.054479$, figura 17), en comparación con los niveles de expresión basales. La sobreexpresión de ambas isoformas wt en fibroblastos fibróticos favorece la disminución de pri-miR-Let-7d. ADAR1 p110 wt (** $p=0.0002108$, figura 17) y ADAR1 p150 wt (** $p=0.00038554$, figura 17). Mientras que los niveles de expresión de Let-7d incrementan significativamente con ADAR1 p110 wt (** $p=0.001477$, figura 18) y ADAR1 p150 wt (** $p=0.001946$, figura 18) en los fibroblastos control. En fibroblastos fibróticos la sobreexpresión de las isoformas de ADAR1 promovió el incremento significativo de la expresión de Let-7d, ADAR1 p110 wt (** $p=0.000151$, figura 18) y ADAR1 p150 wt (** $p=0.000855$, figura 18).

6.5 ADAR1 es hiperactiva en los fibroblastos de FPI

Los niveles de actividad catalítica de las isoformas de ADAR1 en fibroblastos fibróticos y control fueron analizados mediante la técnica RESS-qPCR (por sus siglas en ingles: RNA Editing fingerprint Site-Specific Quantitative PCR). Utilizando el RNA total de 6 fibroblastos de FPI y 6 controles, analizando los niveles de edición de APOBEC3D (desaminasa de citidinas que actúa sobre el DNA). Encontramos que los fibroblastos fibróticos tienen una mayor actividad de edición en adenosinas específicas sobre APOBEC3D comparado con los fibroblastos control (figura 14). Fue importante determinar el efecto que cada isoforma de ADAR tiene sobre la edición de APOBEC, para lo cual se sobreexpresó ADAR1 p110 wt, ADAR1 p150 wt y como controles negativos se transfectaron ADAR1 p110 mutante y ADAR1 p150 mutante, en líneas de fibroblastos control y en fibroblastos de FPI. Los resultados se analizaron midiendo la proporción de actividad de edición de los fibroblastos transfectados con respecto al vector vacío. Como era de esperarse, la actividad catalítica de los fibroblastos transfectados con las isoformas catalíticamente activas de ADAR1, sobre APOBEC3D aumento significativamente (figura 15). Mientras que la actividad catalítica no se modificó con la transfección de las isoformas mutantes. Estos resultados fueron corroborados utilizando el ensayo, Adenosine Deaminase Activity Assay Kit (BioVision). En condiciones basales, los fibroblastos fibróticos muestran una mayor actividad catalítica con respecto a los fibroblastos control. La actividad catalítica en fibroblastos control y fibróticos disminuye considerablemente al ser tratados con pentostatina (inhibidor específico de la actividad catalítica de Adenosin Deaminases ADA, pero no de ADAR). Los resultados muestran un aumento en la actividad de ADAR en los fibroblastos de FPI en comparación con los fibroblastos control, ambos en condiciones basales. Se realizaron curvas estándar de inosina en 4 tiempos diferentes para el análisis de los datos. Es posible observar que los fibroblastos control y los fibroblastos fibróticos responden de manera similar a la transfección con las isoformas de ADAR. Sin embargo, observamos que la sobreexpresión de ADAR1 p150 wt correlaciona con el aumento de actividad más significativa en fibroblastos control, mientras que la sobreexpresión de ADAR1 p110 wt aumenta significativamente la

actividad de ADAR en fibroblastos de FPI (figura 16). Se confirmó que ambas construcciones mutantes p150 y p110 son catalíticamente inactivas.

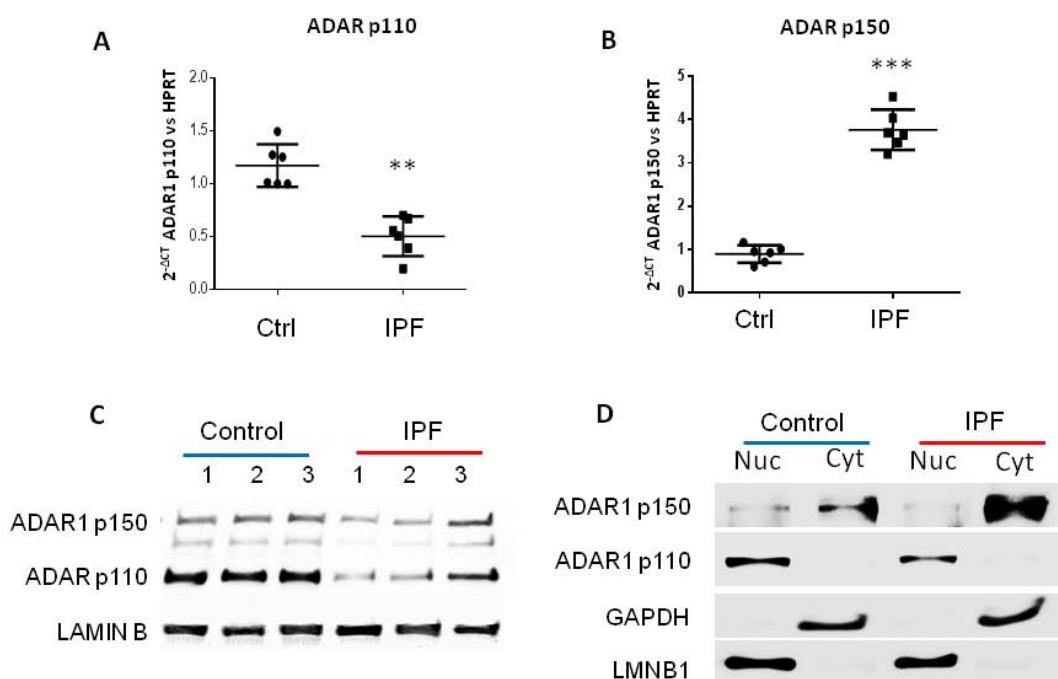


Figura 10: Niveles de expresión de ADAR1 p110 y ADAR1 p150 en fibroblastos control comparados con fibroblastos fibróticos. ADAR1 p110 se encuentra significativamente sub expresado en los fibroblastos de FPI (**p=0.008, A). ADAR1 p150 se encuentra significativamente sobreexpresado en fibroblastos de FPI (***p0.0005, B). El análisis de los niveles de proteína de las isoformas de ADAR1 en extractos proteicos totales corroboró la disminución de ADAR1 p110 (C), mientras que ADAR1 p150 no mostro diferencias significativas (C). El análisis de los niveles proteicos de ADAR en extractos diferenciales de núcleo y citoplasma en una línea control y una línea fibrótica, corrobora el incremento de ADAR1 p150 en citoplasma (D) y la disminución de ADAR1 p110 en núcleo (D).

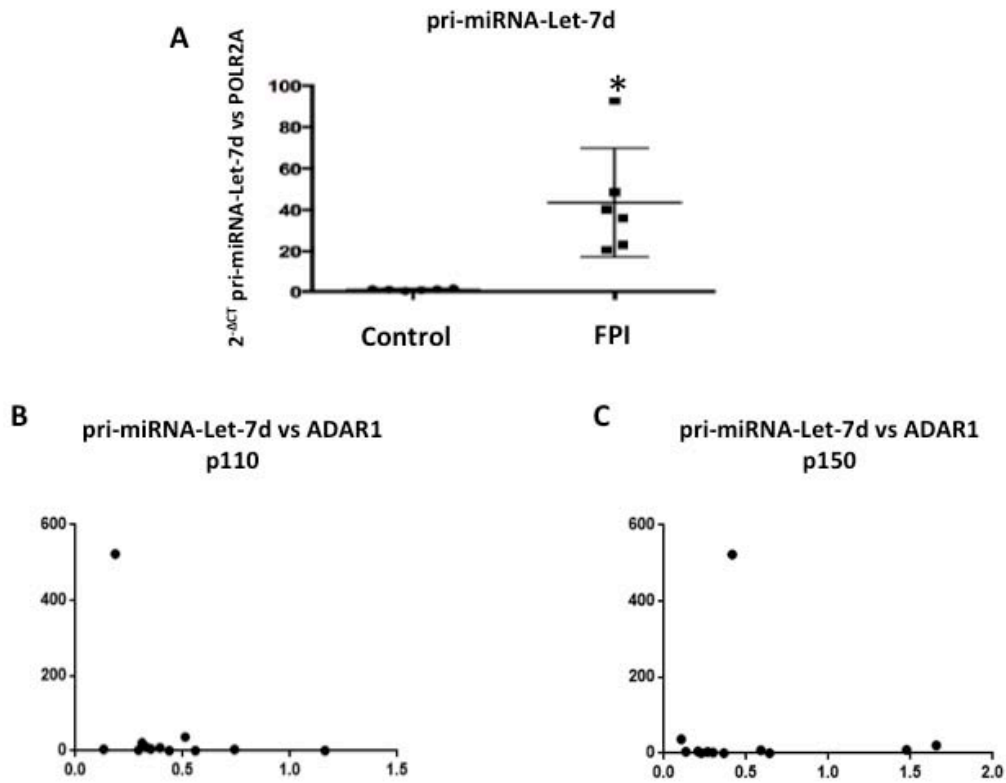


Figura 11: pri-miRNA-Let-7d se encuentra sobreexpresado en fibroblastos de FPI. La expresión de pri-miRNA-Let-7d es mayor en los fibroblastos de FPI comparados con los fibroblastos control (* $p=0.05$, A). La correlación con las isoformas de ADAR1 no muestra diferencias significativas ADAR1 p110 (figura B), ADAR1 p150 (figura C).

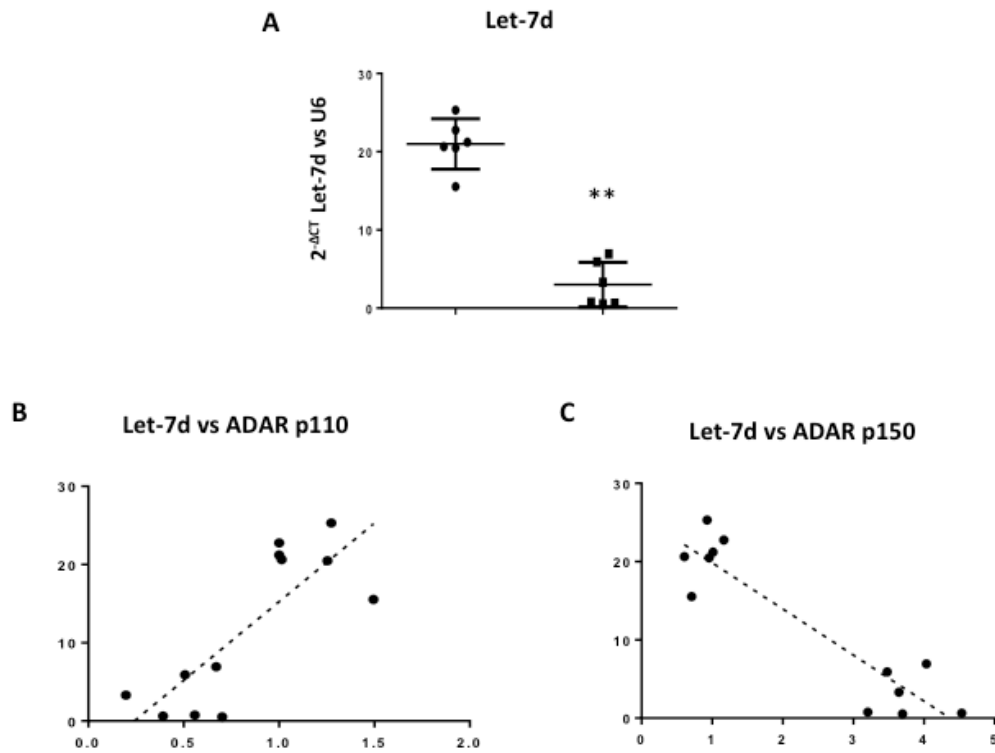


Figura 12: Let-7d se encuentra disminuido en los fibroblastos de pacientes con FPI. La expresión de Let-7d es menor en los fibroblastos de FPI comparado con los niveles de expresión de los fibroblastos control (** $p=0.0028$, figura A). Por otro lado, Let-7d tiene una correlación negativa con ADAR1 p150 (**** $p < 0.0001$, figura B) y positiva con ADAR1 p110 (** $p=0.0014$, figura C)

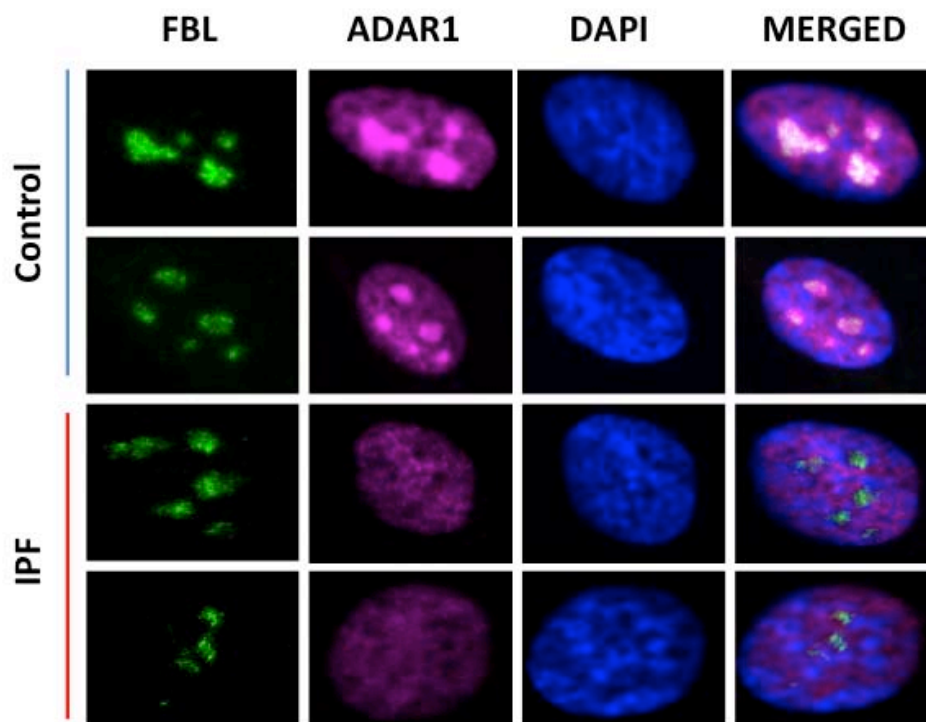


Figura 13: Inmunolocalización de ADAR1 en fibroblastos pulmonares control y fibróticos. Como marcador específico de nucléolo se utilizó fibrilarina (verde), ADAR1 (magenta) y DAPI (azul) delimitando el núcleo. En fibroblastos control ADAR1 se localiza en nucléolo y nucleoplasma (carril 2), mientras que en los fibroblastos fibróticos, la distribución de ADAR1 es únicamente en nucleoplasma (n=3).

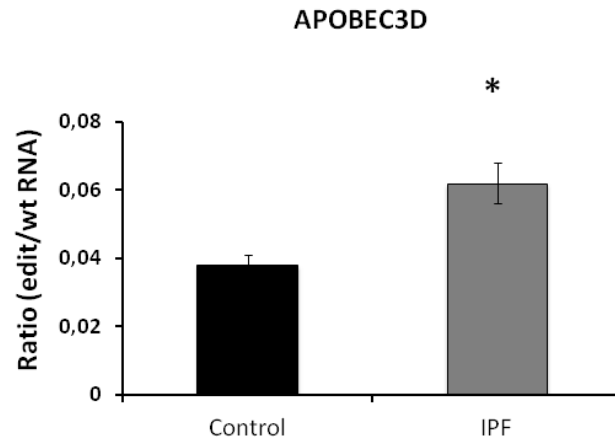


Figura 14: Actividad catalítica de ADAR1 sobre APOBEC3D en fibroblastos control comparados con fibroblastos fibróticos. ADAR1 tiene una mayor actividad catalítica en los fibroblastos de FPI con respecto a los fibroblastos control (*p=0.0193). El incremento en la actividad catalítica se muestra como la tasa de edición sobre la tasa silvestre (n=6)

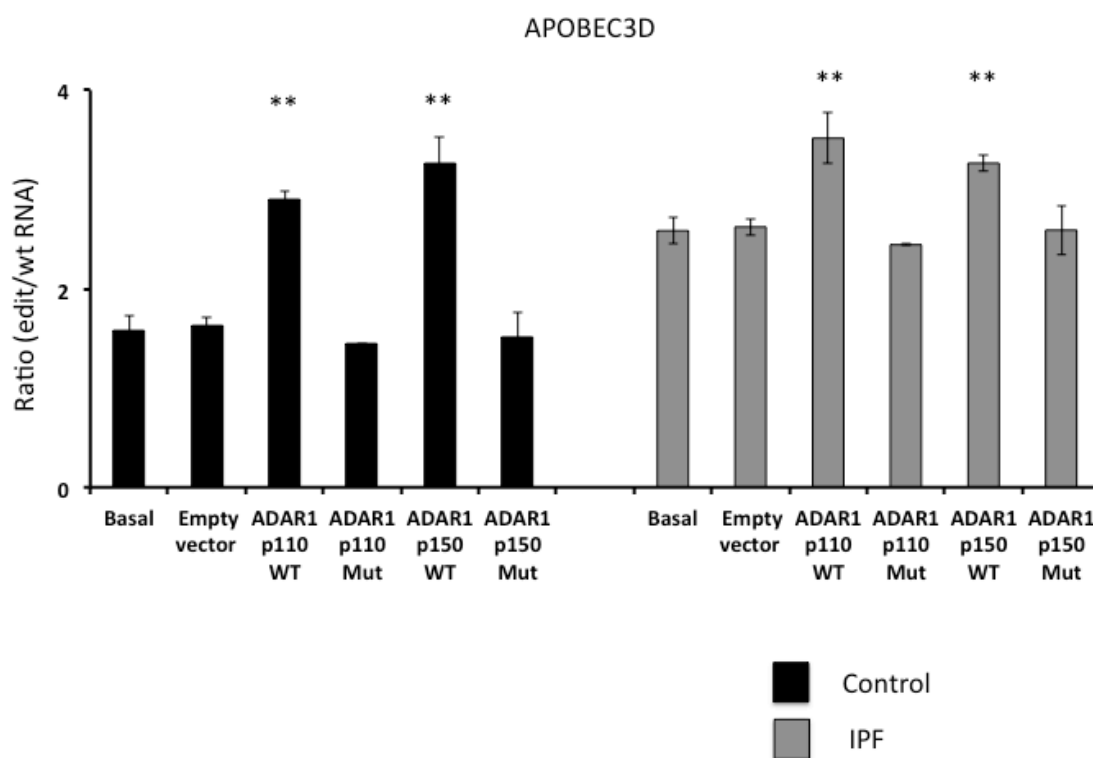


Figura 15: Actividad catalítica de ADAR sobre APOBEC3D en fibroblastos control y fibróticos que sobreexpresan las isoformas de ADAR1. La tasa de edición se calculó en los fibroblastos control y fibróticos a los cuales se les transfectaron las isoformas silvestres y mutantes de ADAR1. Como es de esperarse, la actividad catalítica se ve incrementada después de la transfección con los plásmidos catalíticamente activos, mientras que los plásmidos mutantes no modifican la actividad. En los fibroblastos control (barras negras), ADAR1 p110 wt muestra un incremento significativo de la actividad catalítica (**p=0.003737), el mayor incremento de la actividad catalítica se observa con la isoforma p150 (**p= 0.000139). Mientras que el mayor incremento de la actividad catalítica en los fibroblastos de FPI se observa con la sobreexpresión de la isoforma p110 (**p= 0.007030). El incremento de la actividad de ADAR1 p150 wt también fue significativo (**p=0.009158).

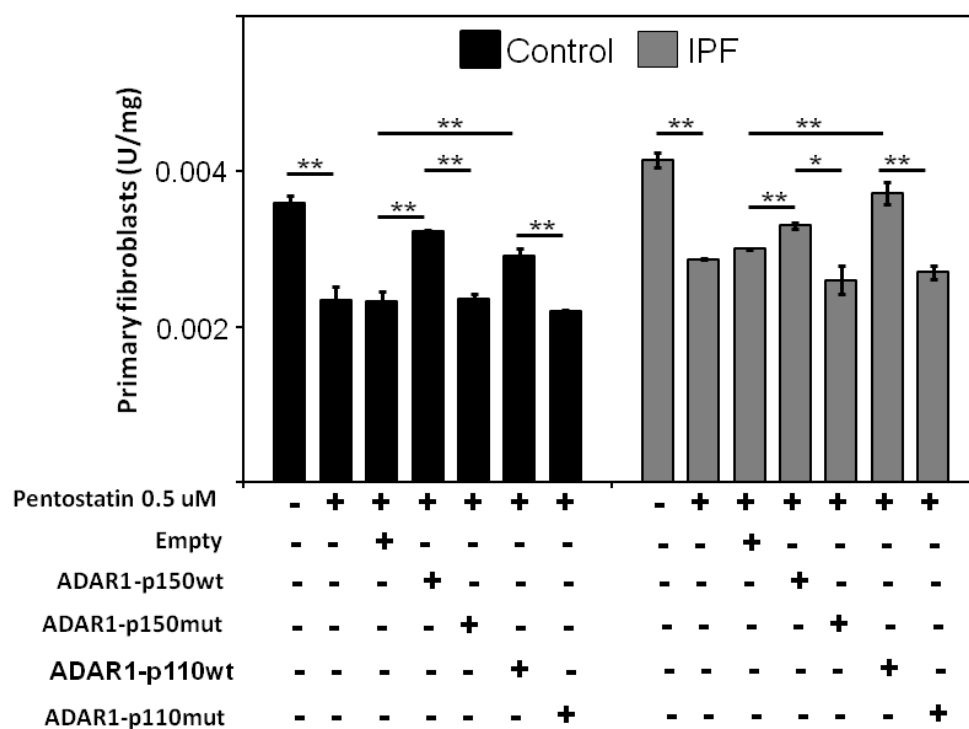


Figura 16: La actividad catalítica específica de ADAR1 esta incrementada en cultivos primarios de fibroblastos de FPI. El uso de Pentostatina como inhibidor específico de ADA, disminuye significativamente la actividad catalítica en fibroblastos control (**p=0.0059) y en fibroblastos de FPI (**p=0.0014). La sobreexpresión de ADAR1 p150 wt (**p=0.0058) y ADAR1 p110 wt (**p=0.0018) incrementan significativamente la actividad catalítica de ADAR en los fibroblastos control. Mientras que la sobreexpresión de ADAR1 p150 mutante (p=0.8) y ADAR1 p110 mutante (p=0.72) no inducen cambios significativos en la actividad catalítica en los fibroblastos control. Por otro lado, al sobreexpresar ADAR1 p150 wt en fibroblastos de FPI la actividad incrementa significativamente (**p=0.0042) al igual que con la sobreexpresión de ADAR1 p110 (**p=0.0067). Mientras que la sobreexpresión de los plásmidos mutantes no modifica la actividad. ADAR1 p150 mutante (p=0.2) y ADAR1 P110 mutante (p=0.02)

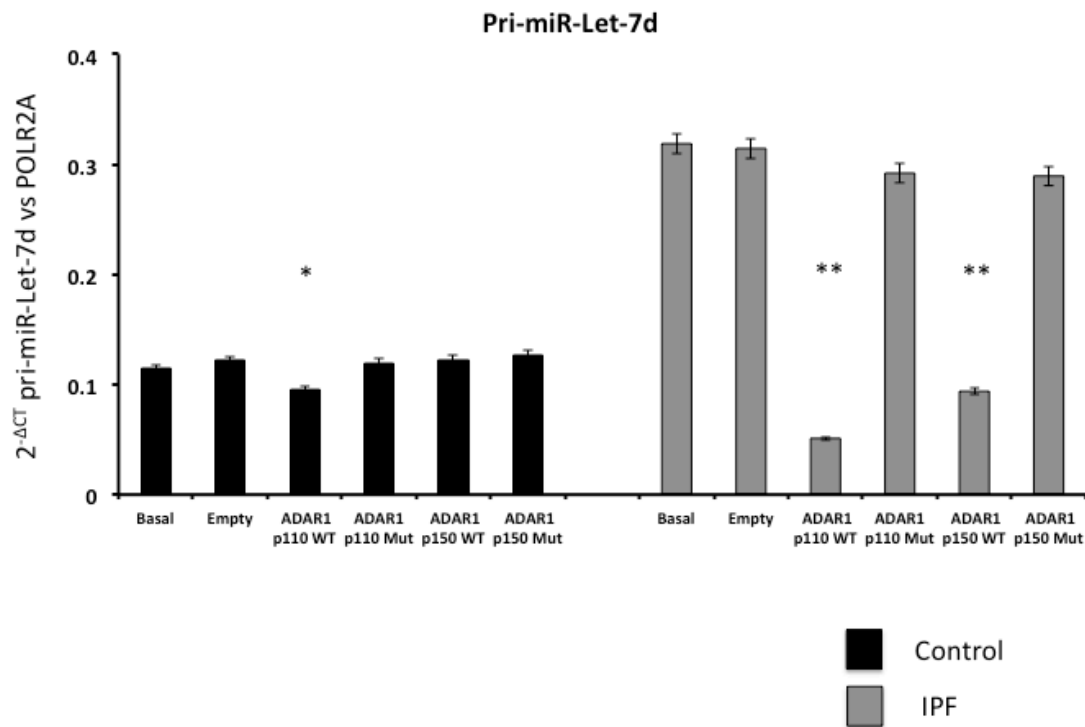


Figura 17: La expresión de pri-miR-Let-7d se modifica con la sobreexpresión de ADAR1 p110 wt y ADAR1 p150 wt. En fibroblastos control, la sobreexpresión de ADAR1 p110 wt disminuye significativamente la expresión de pri-miR-Let-7d (* $p=0.054479$). Mientras que en fibroblastos de FPI, ambas isoformas promueven la disminución de pri-miR-Let-7d. ADAR1 p110 wt (** $p=0.0002108$) y ADAR1 p150 wt (** $p=0.00038554$) en una proporción mayor comparado con los fibroblastos control.

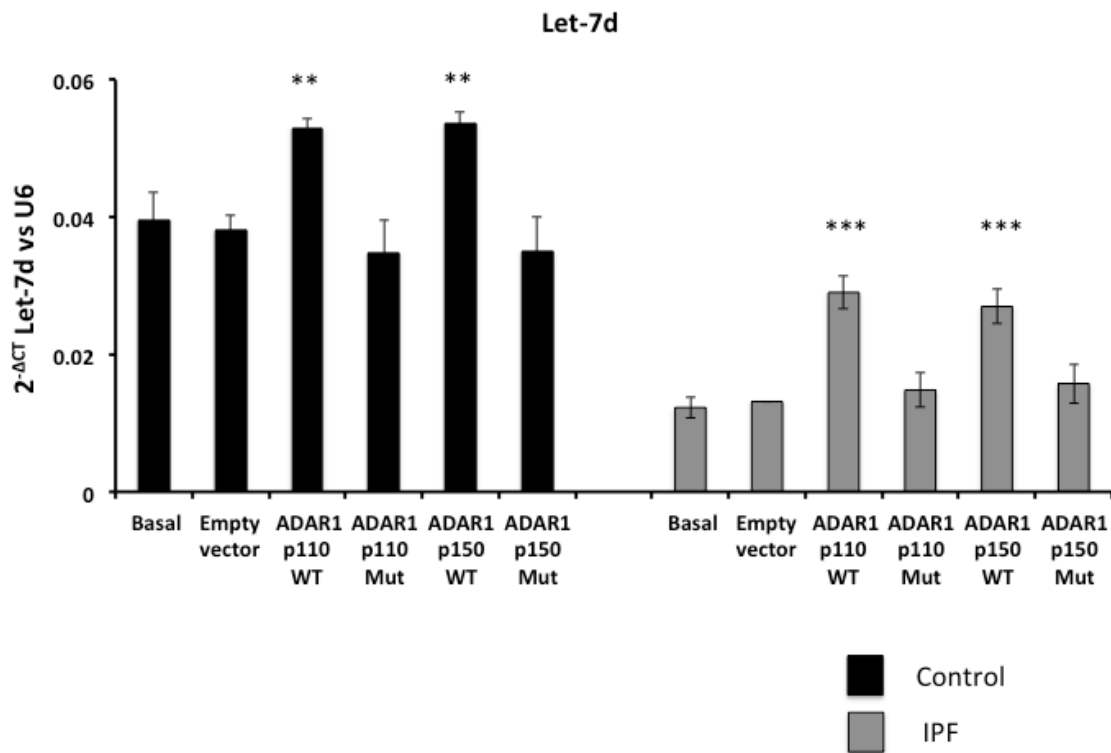


Figura 18: La expresión de Let-7d aumenta en los fibroblastos trasnfectados con ADAR1. En fibroblastos control la expresión de Let-7d se incrementa significativamente al sobreexpresar ADAR1 p110 wt (**p=0.001477) y ADAR1 p150 wt (**p=0.001946). en los fibroblastos de FPI, la sobreexpresión de las isoformas catalíticamente activas promueve el incremento significativo de Let-7d. ADAR1 p110 wt (**p=0.000151) y ADAR1 p150 wt (**p= 0.000855).

VII. Discusión

Los niveles de expresión de ADAR son tejido específicos, y además de afectar la expresión de RNAs mensajeros, se ha descrito que estas enzimas pueden regular el procesamiento y la actividad de los microRNAs a diferentes niveles. Las desaminasas de adenosina que actúan sobre el RNA juegan un papel fundamental en el desarrollo y diferenciación además de estar asociadas con la progresión de diferentes tipos de cáncer. Las diferencias en los patrones de expresión entre los tejidos y el tipo de cáncer proveen información importante sobre los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo y el pronóstico del cáncer. Esta información resulta importante en el diagnóstico de enfermedades y en el pronóstico del rumbo que dicha enfermedad puede tomar, además de representar un blanco terapéutico potencial.

Este es el primer trabajo en el que se analizan los niveles de expresión de ADAR1 y ADAR2 en fibroblastos y biopsias pulmonares de pacientes diagnosticados con FPI. Además del efecto de la expresión de dichas proteínas sobre el procesamiento y expresión de dos microRNAs relevantes en el desarrollo de la FPI, miRNA-21 y Let-7d [23, 26] .

Los fibroblastos y miofibroblastos son las células con mayor capacidad de producción de proteínas de la matriz extracelular y se encuentran muy activas en FPI [53], cuando analizamos la expresión de ADAR1 y ADAR2 en fibroblastos procedentes de FPI observamos que existe una disminución de la expresión de ADAR1, mientras que para ADAR2 no se encontraron cambios significativos a nivel de expresión, en tanto que a nivel de proteína, cuyos resultados se observaron por western blot e inmunofluorescencia se observó una disminución de ADAR1 y ADAR2 en fibroblastos de FPI. Para determinar si este fenómeno sólo es a nivel de fibroblastos, adicionalmente cuantificamos los niveles de expresión de ADAR1 y 2 en tejido e biopsias de pulmones con FPI, interesantemente observamos que a nivel expresión los niveles de ADAR1 se encuentran disminuidos, lo cual correlaciona con lo encontrado

en los fibroblastos, sin embargo ADAR2 no mostró diferencias. Se sugiere que este fenómeno de subexpresión de ADAR puede estar regulado por la autoedición de ADAR como se ha visto en ADAR2, esta edición genera un sitio de splicing nuevo que promueve la disminución de esta proteína al activar un mecanismo de retroalimentación negativa [36]. Sin embargo, independientemente de la causa de la sub regulación, lo que logramos demostrar es que estas disminuciones en la expresión tienen un efecto directo sobre miR-21. Ya que al sobreexpresar tanto a ADAR1 como 2 se modificó la expresión del pri-microRNA y el miR-21 (Figura 9 C and D).

Mediante análisis *in silico*, utilizando el programa Inosine Predict [56], determinamos que, miRNA-21 y Let-7d son blancos potenciales de edición mediada por ADAR en adenosinas específicas. miRNA-21 tiene cuatro adenosinas con una probabilidad $\geq 50\%$ de ser editadas por estas enzimas, dichas adenosinas se encuentran en la región de siembra del microRNA, sin embargo; dos de ellas se encuentran cerca de la región de corte de Dicer. Cuando es editado, la formación de la estructura de doble cadena imperfecta impide el reconocimiento del microRNA por la enzima Dicer se favorece la acumulación del pri-miRNA-21 en el núcleo, lo que podría tener como consecuencia, la disminución o el incremento de la maduración de miRNA-21. Mientras que Let-7d tiene siete adenosinas que podrían ser editadas por ADAR, cinco de las cuales se encuentran en las regiones de corte de Dicer y Drosha.

Como se ha visto, la edición de los pri-miRNAs y pre-miRNAs regula el procesamiento de los miRNAs y puede dar como resultado la supresión del procesamiento mediado por Drosha y Dicer, o la acumulación de pri-miRNAs ricos en inosinas en el núcleo. Como consecuencia, los niveles del microRNA maduro disminuyen. Algunos microRNAs se procesan de manera más eficiente cuando son editados por ADAR [34]. En otros casos, el pri-miRNA es procesado por el complejo Drosha/DGCR8 dando lugar a la formación de nuevas isoformas, mientras que en otros casos, la edición no permite que el pre-miRNA sea reconocido por Exportin 5 y exportado al citoplasma [57]. En resumen, varios pri-miRNAs y pre-miRNAs son sujeto de edición mediada por

ADAR y esto puede inhibir su procesamiento y la producción de miRNAs maduros, afectando la unión de los miRNAs al complejo RISC o re-dirigiéndolos a un nuevo grupo de mRNAs blanco [58].

La concentración relativa del *miRNA-21* se encuentra incrementada en la FPI; este miRNA tiene como blanco mRNAs que codifican proteínas anti-fibrosantes [34]. Cuando analizamos la expresión de dos genes blanco de *miRNA-21*, *SPRY2* y *PELI1*, encontramos que estos estaban disminuidos en FPI, lo que podría estar asociado con el aumento de la expresión de *miRNA-21*. No se ha descrito el papel de *PELI1* y *SPRY2* en la fibrosis pulmonar; sin embargo, los microarreglos de fibroblastos de FPI mostraron que estos mRNAs están disminuidos [54]. *SPRY2* puede regular la señalización de MAPK en procesos de desarrollo, así como en la transición epitelio-mesénquima; además, la disminución en la expresión de *SPRY2* favorece la acumulación de componentes de la matriz extracelular [55].

Por otro lado, *PELI1* es una ubiquitina ligasa E3, que disminuye en los pulmones de pacientes con FPI. Sin embargo; su papel en el desarrollo de esta enfermedad aún se desconoce.

Al sobreexpresar ADAR1 y ADAR2, los niveles de expresión de *miRNA-21* disminuyeron con respecto al control, y los niveles de expresión de *PELI1* y *SPRY2* aumentaron con respecto a los fibroblastos de FPI. Cuando estimulamos estos fibroblastos que sobreexpresan ADAR1 o ADAR2 con TGF β 1. La expresión de *miRNA-21* aumentó como se esperaba. Mientras que los niveles de pri-miRNA-21 no se modificaron, como en los fibroblastos de FPI sin ADAR. Los niveles de expresión de *PELI1* y *SPRY2* se incrementaron con el estímulo de TGF β 1.

Por otro lado, el análisis de la expresión y el papel de las isoformas de ADAR1 en la progresión de FPI no se han explorado. En los fibroblastos de FPI el transcrito de ADAR1 p110, la cual se ha reportado localizada a nivel nuclear, esta disminuida. La isoforma ADAR1 p150, reportada principalmente en citoplasma y generalmente

activada por interferon gama [62], se encontró incrementada en el citoplasma de los fibroblastos de FPI. Estos resultados fueron obtenidos en extractos totales, extractos de núcleo y de citoplasma de los fibroblastos y corroborados por inmunofluorescencia.

En fibroblastos control, ADAR1 puede localizarse en nucléolo, un estudio anterior muestra que la localización nucleolar de ADAR2 disminuye la capacidad de actividad de edición y lo mismo puede ocurrir en ADAR1, ya que ambas proteínas tienen dominios de unión a dsRNA (DRBM) y pueden reconocer rRNA [36]. La localización de ADAR en el nucléolo se produce temporalmente en ausencia de sustrato y se traslada al nucleoplasma cuando este aparece [37].

Otro de los blancos de ADAR1 es el microRNA Let-7d, que se encuentra disminuido en los fibroblastos de FPI, y cuya relación con ADAR1 ha sido estudiada en el desarrollo de leucemia [51].

Como es de esperarse, el incremento en la actividad catalítica de ADAR tiene como consecuencia cambios en los procesos de maduración de Let-7d. Los niveles de expresión de las isoformas, así como su localización nos indican que los mecanismos de regulación para cada isoforma son específicos y complejos.

La actividad catalítica es independiente de los niveles de proteína. Los niveles de expresión de ADAR y la frecuencia de edición no se correlacionan todo el tiempo [60,61], por lo que la actividad catalítica de ADAR puede regularse por la presencia de los blancos y la localización de estas proteínas, el nucleoplasma es uno de los compartimentos en los que ADAR tiene actividad catalítica, teniendo como blanco los pri-microRNAs. En los fibroblastos de FPI encontramos menos niveles de ADAR1 p110, pero están localizados en nucleoplasma, mientras que en los fibroblastos control, encontramos una mayor expresión, pero se localiza predominantemente en el nucléolo.

Al incrementar los niveles de expresión de las isoformas podemos observar que esto depende de los niveles basales de expresión, siendo así que se obtuvo un mayor

incremento en la expresión y actividad de ADAR1 p150 en los fibroblastos control, mientras que en los fibroblastos fibróticos se obtuvo un incremento mayor al sobreexpresar ADAR1 p110, podríamos sugerir la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa por lo cual es importante mantener niveles de expresión específicos de estas proteínas para mantener las células con una función óptima. El aumento de la actividad de ADAR observado en fibroblastos primarios podría deberse a la actividad citosólica de ADAR p150.

VIII. Conclusión

Demostramos que, en condiciones basales, la isoforma ADAR1-p110 está regulada negativamente, mientras que la isoforma ADAR1-p150 está sobreexpresada en fibroblastos de FPI. Como sabemos, algunos pri-microRNAs pueden ser editados por ADAR y esta edición puede inhibir su procesamiento ya que estos pri-microRNAs pierden la estructura secundaria de doble cadena y no pueden ser reconocidos por Dicer y Drosha [21, 22].

Los cambios en los niveles de expresión de las isoformas de ADAR1 y ADAR2 y su ubicación indican que los mecanismos reguladores de cada isoforma son específicos y complejos. La existencia de ubicaciones diferenciales para cada isoforma de ADAR1 nos lleva a sugerir que ADAR1 p110 es responsable de editar pri-miR-Let-7d, y que ADAR1 p150 citoplásmico podría editar Let-7d.

Nuestras transfecciones de las isoformas ADAR1 silvestres demostraron que el aumento en la expresión de estas podría compensar la expresión basal. Es decir, cuando la expresión basal de la isoforma de ADAR1 es baja, como en el caso de ADAR1-p110, y esta se sobreexpresa exógenamente, sus niveles de actividad de edición aumentan. Por lo tanto, podríamos sugerir la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa, que es importante para mantener los niveles de expresión específicos de las proteínas de ADAR1 para lograr una función óptima de las células.

Sin embargo, observamos que la actividad de edición aumentó significativamente tanto en cultivos primarios control como fibróticos, cuando se transfectaron con las isoformas de silvestres, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos reguladores implicados en la actividad catalítica de ADAR en fibroblastos de FPI.

En resumen, la regulación de la biosíntesis y el procesamiento de miRNA-21 y Let-7d mediante la expresión de ADAR1 y ADAR2 podría ser objeto de nuevos estudios y, en el futuro podrían considerarse como blancos terapéuticos importantes para la fibrosis pulmonar idiopática.

IX. Bibliografía

1. Isis E Fernandez, Oliver Eickelberg (2012) New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*; 380: 680–88
2. Selman M, Pardo A, Kaminski N. (2008) Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Aberrant Recapitulation of Developmental Programs?. *Plos Med.*; 5:373-380
3. Lee J, Collard H et al. (2010) Does Chronic Microaspiration Cause Idiopathic Pulmonary Fibrosis?. *Am J Med.* 123: 304-311
4. King TE Jr, Pardo A, Selman M (2011) Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*; 378: 1949–61
5. Selman M and Pardo A (2014) Revealing the Pathogenic and Aging-related Mechanisms of the Enigmatic Idiopathic Pulmonary Fibrosis An Integral Model. *Am J Respir Crit Care Med.* 189, 10;1161–1172.
6. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G (2006) Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*; 174: 810–16.
7. American Thoracic Society/European Respiratory Society (2002) International multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*;165: 277–304.
8. Selman M, King TE Jr, Pardo A (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*; 134: 136–51.
9. Gilani SR, Vuga LJ, Lindell KO, et al. (2010) CD28 down-regulation on circulating CD4 T-cells is associated with poor prognoses of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *PloS One*; 5: e8959.
10. Williams K, Malarkey D, Cohn L, Patrick D, Dye J, Toews G (2004) Identification of spontaneous feline idiopathic pulmonary fibrosis: morphology and ultrastructural evidence for a type II pneumocyte defect. *Chest*; 125: 2278–88.
11. Sisson TH, Mendez M, Choi K, et al. (2010) Targeted injury of type II alveolar

- epithelial cells induces pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1;181(3):254-63
12. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G (2007). The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 170(6):1807-16.
 13. Selman M and Pardo A (2002) Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res.* 3(1): 3.
 14. Pardo A, Selman M (2002) Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis *Front Biosci.* 1;7:d1743-61.
 15. Kis K, Liu X, Hagood JS (2011) Myofibroblast differentiation and survival in fibrotic disease. *Expert Rev Mol Med.* 23;13:e27.
 16. Golan-Gerstl R, Wallach-Dayana SB, Amir G, Breuer R (2007) Epithelial cell apoptosis by fas ligand-positive myofibroblasts in lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol;* 36(3):270-5.
 17. Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 199-210
 18. Bushati N, Cohen S (2007) microRNA function. *Ann Rev Cell and Biol;* 23: 175-2005
 19. Narry Kim V. MicroRNA Biogenesis: Coordinated crooping and dicing. *Nature reviews.* 2005; 6: 1-11
 20. Yang S, Banerjee S et al. Participation of miR-200 in Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol.* 2012; 180: 484-493
 21. Faller M and Guo F (2008) MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta.* 1779(11): 663-667
 22. Habig J, Dale T et al (2007) miRNA Editing- We Should Have Inosine This Coming. *Mol Cell.* 25: 792-793
 23. Pandit K, Corcoran D et al (2010) Inhibition and Role of let-7d in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 182: 220-229
 24. Pandit K, Milosevic J et al (2011) MiRNAs in Idiopathic pulmonary fibrosis. *Trans Res.* 157: 191-199
 25. Yang S, Banerjee S et al (2012) Participation of miR-200 in Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol.* 180: 484-493

26. Liu G, Friggeri A et al (2010) miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. JEM. 1-9
27. Huleihel L, Ben-Yehudah A, Milosevic J, Yu G, Pandit K, Sakamoto K, Yousef H, LeJeune M, Coon TA, Redinger CJ, Chensny L, Manor E, Schatten G, KaminskiN (2014). Let7d microRNA affects mesenchymal phenotypic properties of lung fibroblasts. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol; 306(6): L534-42.
28. Heale B, Keegan L et al. Editing independent effects of ADARs on the miRNA/siRNAs pathways. EMBO J. 2009; 28: 3145-3156
29. Luciano D, Mirsky H, et al. RNA editing of a miRNA precursor. RNA. 2004; 10: 1174-1177
30. Valente L and Nishikura K (2005). ADAR gene family and A-to-I RNA editing: Diverse Roles in Posttranscriptional Gene Regulation. Nuc Acid Res. 79: 299-338
31. Barraud P, Allain FH (2012) ADAR proteins: double-stranded RNA and Z-DNA binding domains. Curr Top Microbiol Immunol. 353:35-60.
32. Tomaselli S, Bonamassa B. (2013) ADAR enzyme and miRNA story: a nucleotide that can make the difference. Int J Mol Sci. 14(11): 22796-816
33. Paul M and Bass B. Inosine exists in mRNA at tissue-specific levels and is most abundant in brain mRNA. EMBO. 1998; 17(4): 1120-1127
34. Savva YA, Rieder LE (2012) The ADAR protein family. Genome Biol. 13 (12):252.
35. Nishikura K (2016) A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs. Nat Rev Mol Cell Biol. 17(2):83-96.
36. Orlandi C, Barbon A et al. (2012) Activity Regulation of Adenosine Deaminases Acting on RNA (ADARs). Mol Neurobiol. 45: 61-75
37. Nishikura K (2010) Function and Regulation of RNA Editing by ADAR Deaminases. Ann Rev Biochem. 79: 321-349
38. Heale B, Keegan L, et al (2009) Editing independent effects of ADARs on the miRNA/siRNA pathways. EMBO. 28: 3145-3156
39. Vesely C, Tauber S (2012) Adenosine deaminases that act on RNA induce

- reproducible changes in abundance and sequence of embryonic miRNAs. *Genome Res.* 22(8): 1468-76.
40. Wang Q, et al (1999) ADAR1 regulates ARHGAP26 gene expression through RNA editing by disrupting miR-30b-3p and miR-573 binding. *RNA.* 19:1525-1536.
 41. Nishikura K, Sakurai M, Ariyoshi K, Ota H (2013) Antagonistic and stimulative roles of ADAR1 in RNA silencing. *RNA Biol.* 10(8):1240-7.
 42. Yang W, Chendrimada T et al (2006) Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol.* 13: 1-20
 43. Das AK, Carmichael GG (2007) ADAR editing wobbles the microRNA world. *ACS Chemical Biology.* 2(4): 217-220
 44. Maydanovich O and Beal PA (2006) Breaking the central dogma by RNA editing. *Chem Rev.* 106(8): 3397-3411
 45. Watanabe K, Takai D (2013) Disruption of the expression and function of microRNAs in lung cancer as a result of epigenetic changes. *Front Genet.* 4:275.
 46. Chan SP and Slack FJ (2007) And now introducing mammalian mirtrons. *Dev Cell.* 13(5): 605-607
 47. Kawahara Y, et al (2007) Redirection of Silencing Targets by Adenosine-to-Inosine Editing of miRNAs. *Science.* 315:1137-1140
 48. Galeano F, et al (2013) ADAR2-editing activity inhibits glioblastoma growth through the modulation of the CDC14B/Skp2/p21/p27 axis. *Onc.* 32:998–1009.
 49. Chan TH, et al (2014). A disrupted RNA editing balance mediated by ADARs (Adenosine Deaminases that act on RNA) in human hepatocellular carcinoma. 63:832-843
 50. Fumagalli D, et al (2015) Principles governing A-to-I RNA editing in the breast cancer transcriptome. *Cell Rep.* 13(2):277-89.
 51. Zipeto MA, Court AC, Sadarangani A, et al (2016) ADAR1 Activation Drives Leukemia Stem Cell Self-Renewal by Impairing Let-7 Biogenesis. *Cell Stem Cell.*

- 19(2): 177-191.
52. Crews LA, Jiang Q, et al (2015) An RNA editing fingerprint of cancer stem cell reprogramming. 13:52
53. Ryan T. Kendall and Carol A. Feghali-Bostwick (2014) Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. Front. In Pharm. 5. 1-13
54. Meltzer EB, Barry WT, D'Amico TA, Davis RD et al (2011) Bayesian probit regression model for the diagnosis of pulmonary fibrosis: proof-of-principle. BMC Med Genomics. 5;4:70.
55. Lovicu Frank J et al (2016) Fibrosis in the lens. Sprouty regulation of TGF β -signaling prevents lens EMT leading to cataract. Exp. Eye. Res. 142. 92-101
56. Julie M. Eggington, Thomas Greene, Brenda L. Bass (2011) Predicting sites of ADAR editing in double-stranded RNA. Nat Commun. 2:319.
57. Heale B, Keegan L et al (2009) Editing independent effects of ADARs on the miRNA/siRNA pathways. EMBO. 28: 3145-3156
58. Yang W, Chendrimada T et al (2006) Modulation of miRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. Nat Struct Mol Biol. 13: 1-20
59. O'Connell MA, Keegan LP (2006) Drosha versus ADAR: wrangling over pri-miRNA. Nat Struct Mol Biol. 13(1):3-4.
60. Liu, Y., Emeson, R.B. and Samuel, C.E. (1999) Serotonin-2C receptor pre-mRNA editing in rat brain and in vitro by splice site variants of the interferon-inducible double-stranded RNA-specific adenosine deaminase ADAR1. J. Biol. Chem. 274, 18351–18358
61. Lai, F., Chen, C.X., Lee, V.M. and Nishikura, K. (1997) Dramatic increase of the RNA editing for glutamate receptor subunits during terminal differentiation of clonal human neurons. J. Neurochem. 69, 43–52
62. Patterson JB, Samuel CE (1995) Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase. Mol Cell Biol. 15:5376-5388.



The Role of ADAR1 and ADAR2 in the Regulation of miRNA-21 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis

Gabriela Díaz-Piña¹ · Rosa Ma. Ordoñez-Razo² · Eduardo Montes³ · Ignacio Páramo³ · Carina Becerril¹ · Alfonso Salgado¹ · J. Alfredo Santibañez-Salgado⁴ · Mariel Maldonado¹ · Víctor Ruiz^{1,5}

Received: 11 December 2017 / Accepted: 29 March 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Introduction microRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that post-transcriptionally regulate gene expression. Recent evidence shows that adenosine deaminases that act on RNA (ADAR) can edit miRNAs. miRNAs are involved in the development of different diseases, such as idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). In IPF, about 40% of the miRNAs are differentially expressed with respect to controls. Among these miRNAs, miRNA-21 has been found over-expressed in IPF and its targets are anti-fibrosing molecules such as PELI1 and SPRY2. The objective of this study is to determine the role of ADAR1 and 2 on the expression of miRNA-21 in human lung fibroblasts through quantification of gene expression, protein levels, and overexpression of ADAR1 and 2.

Methods Six control and six fibrotic primary fibroblast cell cultures were used for RNA extraction, ADAR1, ADAR2, PELI1, SPRY2, miRNA-21, and pri-miRNA-21 expression was measured. Subsequently, two fibrotic fibroblast cultures were used for overexpression of ADAR1 and ADAR2, and they were stimulated with TGFβ1. Real-time PCR and Western blot were performed.

Results ADAR1 is significantly downregulated in IPF fibroblasts; the overexpression of ADAR1 and ADAR2 reestablishes the expression levels of miRNA-21, PELI1, and SPRY2 in fibroblasts of patients with IPF.

Conclusion These changes in the processing of miRNAs have great value in pathology diagnosis, including lung diseases, and play an important role in the understanding of molecular mechanisms involved in the development of different pathologies, as well as representing new therapeutic targets.

Keywords ADAR edition · miRNA-21 · IPF · miRNA processing

✉ Víctor Ruiz
vicoruz@yahoo.com.mx

¹ Departamento de Investigación en Fibrosis Pulmonar, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, Calz. Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, 14080 Mexico City, Mexico

² Hospital de Pediatría, Centro Médico Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06720 Mexico City, Mexico

³ Clínica de Asma, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, Calz. Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, 14080 Mexico City, Mexico

⁴ Departamento de Cirugía Experimental, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, Calz. Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, 14080 Mexico City, Mexico

⁵ Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, Calz. Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, 14080 Mexico City, Mexico

Introduction

Among diffuse interstitial pneumopathies, idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) represents the most aggressive prototype. It is a disease of unknown etiology and it is lethal, for which there are no effective treatments. It is characterized by changes in the phenotype of alveolar epithelial cells, fibroblast and myofibroblasts proliferation, and the exaggerated accumulation of extracellular matrix components which compromise the structure of the pulmonary parenchyma [1, 2]. The average survival after diagnosis is 2.5–3.5 years and it is predominantly present in males. Most of the patients are between 50 and 70 years of age [3].

In recent years, there has been increasing evidence that non-coding RNAs such as microRNAs (miRNAs) play an important role in the post-transcriptional regulation in IPF. miRNAs are short RNA sequences (around 19–22 nt), which regulate the translation of target mRNAs when the seed region of the miRNA joins the 3' UTR region of the messenger, specifically inducing its silencing or degradation [4]. They are involved in tissue development, differentiation, cell proliferation, tissue repair, as well as pathologic processes. They have been suggested as potential therapeutic targets [5, 6]. Analysis by microarrays of patients with IPF has shown that there are changes in the expression profile of some miRNAs, mainly those that could be involved in profibrotic processes such as the epithelial to mesenchymal transition (EMT) and the activation of the TGF β pathway [7, 8]. Some miRNAs that present changes in their expression in IPF are let-7d, miRNA-21, miRNA-29, miRNA-155, and miRNA-200 [9, 10].

The edition of the secondary structure of double-stranded RNAs is a post-transcriptional mechanism that can induce changes in the sequences of these RNAs. The most common type of RNA edition is the hydrolysis of an adenosine nucleoside, generating an inosine nucleoside, mediated by the adenosine deaminases that act on RNA (ADAR) [11, 12]. The ADAR dimers recognize the secondary structures of the loop-type double-stranded chain and the stem-loop of mRNAs, and with them, they edit specific adenosines [13, 14]. Around 50% of adenosines in mRNAs are edited by ADAR, mainly in UTR regions and introns. The sequence around adenine and the secondary structure are important in the efficiency and selectivity of the edition [15]. Thus, the changes present in the miRNAs expression profile in IPF may be due to the edition of themselves.

The generated inosines give rise to the formation of imperfect double-stranded secondary structures that can carry out a modification of the splicing sites. In addition, these inosines are recognized as guanosines by the translation machinery, causing changes in codon coding and, as a consequence, in the generation of modified proteins.

In the case of miRNAs, ADAR-mediated edition can affect its maturation process, change their specificity or re-direct them to new mRNAs targets when the nucleoside modification takes place in the seed region [11–13]. It has been observed that in mice deficient of ADAR2 there are changes in the abundance of specific miRNAs and their mRNAs targets during embryo development [16].

Three isoforms of ADAR have been described: ADAR 1, 2, and 3 [17, 18]. The expression of ADAR 1 and 2 is ubiquitous, while the expression of ADAR 3 is restricted to the brain. It has been determined that the expression of ADAR and inosine levels are tissue-specific, the brain being the site with higher expression followed by the lung and the heart. This expression correlates with inosine levels [19, 20].

Between miRNAs whose expression is modified in IPF, miRNA-21 is over-expressed in lung tissue and pulmonary fibroblasts from patients with IPF. This miRNA has as targets anti-fibrotic proteins such as SMAD7, TGF β R2, TIMP3, VEGFA [9, 10]. The overexpression of miRNA-21 may be due to a deficient edition by ADAR. Therefore, the objective of the present work was to determine the expression levels of ADAR1 and 2 in IPF fibroblasts compared to control fibroblasts and to explore their role in the regulation of the processing of pri-miRNA-21 and miRNA-21.

It was found that the expression of ADAR1 and 2 is downregulated in fibroblasts from patients with IPF, which is associated with the overexpression of miRNA-21. This association is supported when ADAR is over-expressed; the accumulation of the primary transcript of miRNA-21 is favored and the mature transcript is decreased.

Methods

Cell Culture and RNA Purification

We used six primary cultures of pulmonary fibroblasts of controls and six primary cultures of fibrotic patients biopsies with the diagnosis of IPF in Ham F-12 medium (Gibco), with 10% fetal bovine serum at 37 °C with 5% CO₂. Total RNA was extracted with Trizol (Thermo Fisher, CA) according to the instructions of the manufacturer. The tissue obtained from the biopsies of patients diagnosed with IPF and from healthy tissue controls where homogenated with Trizol, using a PT 2500 E Polytron (Kinematica, Schweiz). Total mRNA was used for reverse transcription.

Synthesis of cDNA and Real-Time PCR

In order to quantify through Real-Time PCR, the expression levels of ADAR1 and 2, PELI1, SPRY1, and that of pri-miRNA-21 mRNAs levels, the total RNA obtained was used for the synthesis of cDNA. 1.0 μ g of total RNA was treated

with DNase (Thermo Fischer, CA). The cDNA synthesis was made using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fischer) according to manufacturer's instructions. Later, it was used to quantify through qPCR the expression levels of mRNA from ADAR1 (Applied Biosystems, CA. Hs01017596_ml), ADAR2 (Hs0053724_ml), PELI1 (Hs00900505_ml), SPRY2 (Hs00183386_ml), and pri-miRNA-21 (Hs03302625_pri). PolR2A (Hs00172187_ml) was used as endogenous control. The expression levels were analyzed using the Quant Studio 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

To quantify the expression levels of miRNA-21, 10 ng of total RNA was used for the reverse transcription reaction (TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems). The obtained cDNA was used to determine the expression levels of miRNA-21 (assay 4427975 ID: 000397) in fibrotic lines and controls. Data were normalized with U6 (assay 4427975 ID: 001093).

Western Blot

Western blot was done with the total protein extracts, using RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, Dallas), using the standard methods with specific antibodies for ADAR1 (sc-73408) and ADAR2 (sc-10012, Santa Cruz Biotechnology). The proteins were visualized using specific antibodies coupled with HRP (sc-2020 and #SA1-100, Thermo Scientific) using Super Signal West Dura Extended Duration Substrate detection solutions (#34075, Thermo Fischer). The signal was detected and analyzed with Chemi Doc Technology (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Using as load control beta actin protein (622102, BioLegend, San Diego, CA).

Immunolocalization

Cells were seeded in glass slides, blocked for 20 min with universal blocker 1× (Biogenex, CA) and incubated with the respective antibodies for ADAR1, ADAR2 (Santa Cruz Biotechnology) and nucleolin, as a specific marker of nucleolus (D4C70, Cell Signaling, Massachusetts). Later, the slides were incubated with secondary antibodies coupled with a fluorophore (cat: 715-545-150, 711-585-152, 705-605-147, Jackson ImmunoResearch, PA). Afterwards, the cells were analyzed using an FV-1000 (Olympus, Tokyo, Japan) confocal microscope. Using the ImageJ Fiji software, the images were analyzed by Integrated Optical Density and compared between nucleoplasm and nucleolus.

ADAR1 and ADAR2 Transfection

We transfected the specific vectors for the overexpression of ADAR1 (RC207522) or ADAR2 (RC209073, OriGene,

Maryland), in two primary cultures of IPF fibroblasts. Using as transfection method Nucleofector™ 2b Device and the Basic Fibroblasts Nucleofector® Kit (VPI-1002, Lonza, Basel, Switzerland). As a negative control, the empty vector was used (PS100001, OriGene). A group of fibroblasts was stimulated with 5 ng/ml of TGFβ1, 24 h post transfection. Subsequently, the expression levels of the genes were analyzed.

All the graphs were made using Graph Pad Prism 6 (San Diego, CA).

Results

The gene expression analysis of ADAR1 and 2 in patients with IPF compared with controls showed a significant decrease of ADAR1 ($*p=0.0141$, Fig. 1a) in lung homogenate and lung fibroblasts ($*p=0.05$, Fig. 1c), while ADAR2 shows no significant differences (Fig. 1b, d). The protein analysis by Western blot and its densitometric analysis showed a significant decrease in both (ADAR1 76% and ADAR2 55%, Fig. 2a, b) in the total protein extracts from IPF fibroblasts with respect to control. In the immunocytochemistry (Fig. 2c) and immunofluorescence assays of all cell cultures, differences in the distribution of ADAR1 and ADAR2 were found. This was corroborated by the integrated optical density measurement (Fig. 2d, e). In the control fibroblasts, ADAR1 and ADAR2 are located mainly in the nucleolus (ADAR1 91.52% and ADAR2 60.0%, Fig. 2e); while in the IPF fibroblasts, it is located mainly in the nucleoplasm (ADAR1 42.59% and ADAR2 83.13%, Fig. 2e). Regarding the expression of miRNA-21 and pri-miRNA-21, it was found that the basal expression of pri-miRNA-21 (Fig. 3a) is not modified in IPF fibroblasts with respect to control fibroblasts; however, miRNA-21 was found to be over-expressed in IPF with respect to controls ($*p=0.0052$, Fig. 3b).

ADAR1 and ADAR2 Transfection

The transfection of the specific plasmids for ADAR1 and ADAR2 in primary fibroblast cultures from IPF showed the overexpression of both transcripts (ADAR1 $*p=0.05$ and ADAR2 $*p=0.000019$, Fig. 4a, b) when quantified by qPCR. This same overexpression was seen at the protein level (Fig. 4c, d). The expression of pri-miRNA-21 and of miRNA-21 in these transfected cells was high for pri-miRNA-21 (ADAR1 $*p=0.01$ and ADAR2 $*p=0.008$, Fig. 5a) while that of the miRNA-21 was found decreased (ADAR1 and ADAR2 $*p=0.05$, Fig. 5b). PELI1 and SPRY2 mRNAs show a significant increase in the fibroblasts that were transfected with ADAR1 and ADAR2 (Fig. 5c, d). A group of fibroblasts was stimulated with TGFβ1 post transfection. Subsequently, the expression levels of the genes

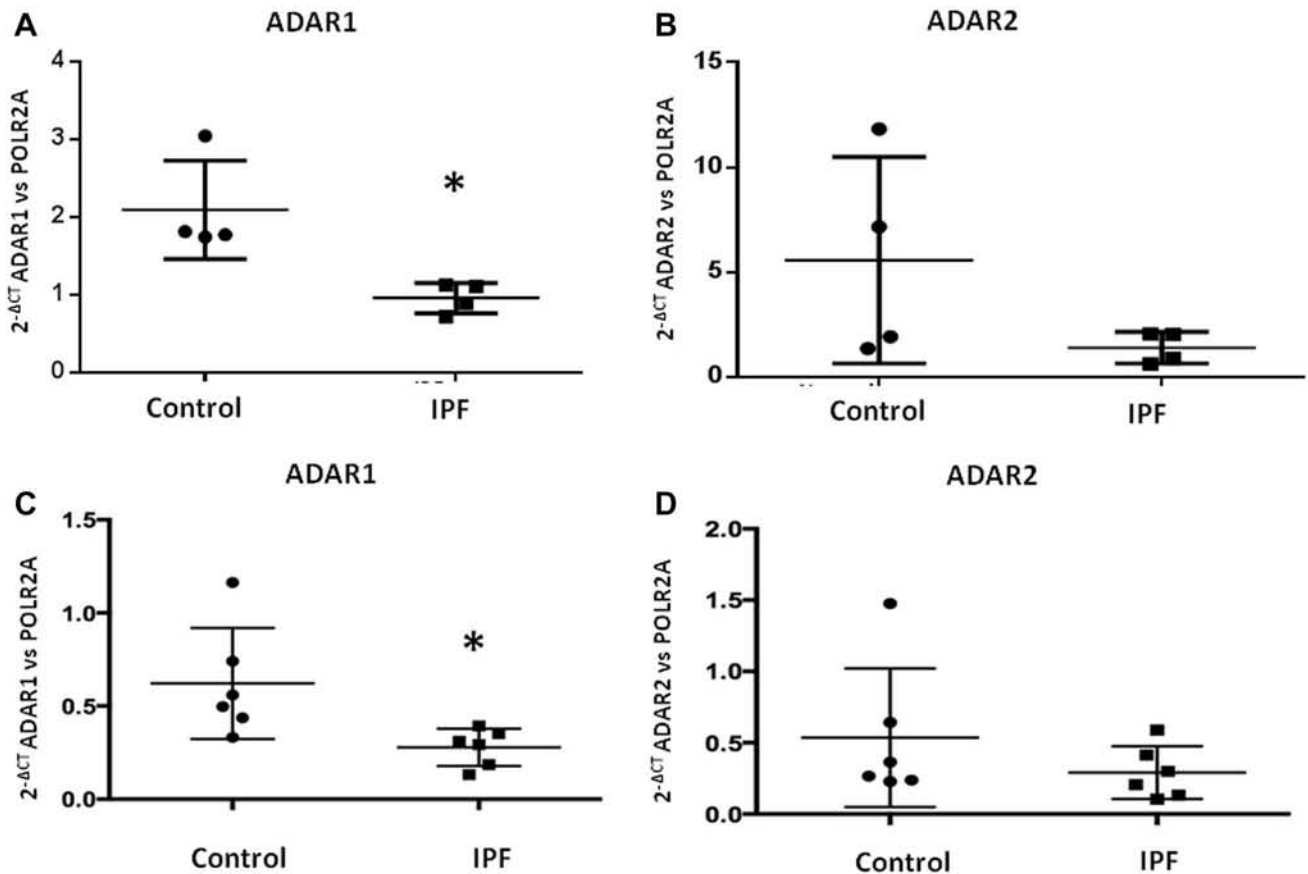


Fig. 1 **a** and **b** Expression level of ADAR1 and 2 in lung. ADAR1 is significantly downregulated in IPF tissues versus control (** $p=0.0141$). ADAR2 does not show significant differences

($p=0.1454$). **c** and **d** Expression level of ADAR1 and 2 in lung fibroblasts. ADAR1 is significantly downregulated in IPF fibroblasts (* $p=0.05$). ADAR2 does not show significant differences ($p=0.076$)

were analyzed, where the transfection with ADAR1 favors the significant increase in the expression of PELI1. TGF β 1 stimulates the significant increase of SPRY2 in cells over-expressed ADARs (Fig. 5).

Conclusion

This is the first work in which the expression of ADAR1 and 2 in fibroblasts and lung biopsies from patients with IPF is analyzed. Additionally, the effect of the expression of these proteins in the expression and maturation of miRNA-21 was analyzed, which has relevance in IPF, since it regulates mRNAs that are involved in the process of pulmonary fibrosis [7, 10].

Fibroblasts and myofibroblasts are the cells with the greatest capacity for the production of proteins of the extracellular matrix and are found very active in IPF [21, 22]. Upon analysis of the expression of ADAR1 and 2 in IPF fibroblasts, we observed a decrease in the expression of ADAR1, while in ADAR2 no relevant changes at the

expression level were found. At the protein level, the results of western blot and immunofluorescence showed a decrease of ADAR1 and 2 in IPF fibroblasts. To determine if this phenomenon is seen only at the fibroblast level, we quantified the expression levels of ADAR1 and ADAR2 in IPF lung biopsy tissue; interestingly, we found the expression levels of ADAR1 to be decreased, which correlates with what was found in the fibroblasts; this could have as a consequence the decreased edition of some miRNAs. However, ADAR2 showed no differences. This suggests that this phenomenon of under-expression of ADAR may be regulated by the self-edition of ADAR, as seen in ADAR2 [23]. However, independent from the cause of the down-regulation, what we were able to demonstrate is that these decreases in expression have a direct effect on miRNA-21. Because, when ADAR1 and 2 were over-expressed there was a modification on the expression of the pri-miRNA and miRNA-21 (Fig. 5c, d).

By in silico analysis, using the Inosine Predict software [24], we determined that miRNA-21 is a potential edition target through ADAR in specific adenosines. It has four

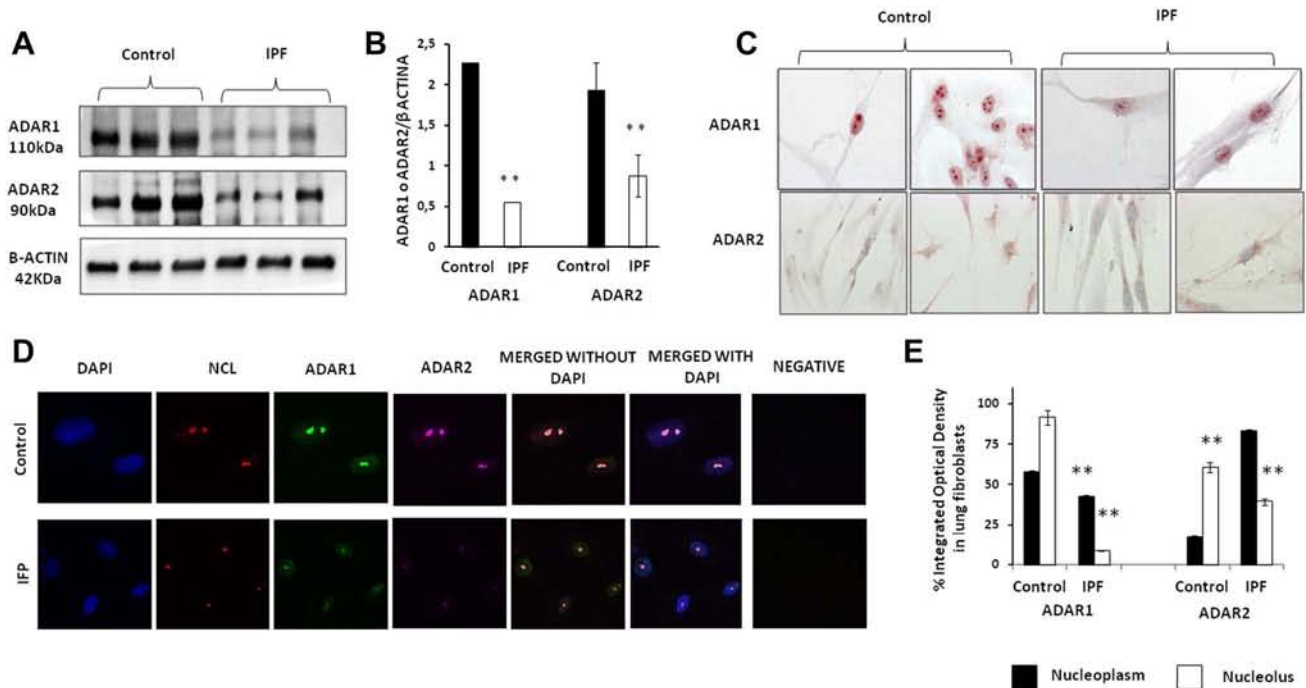
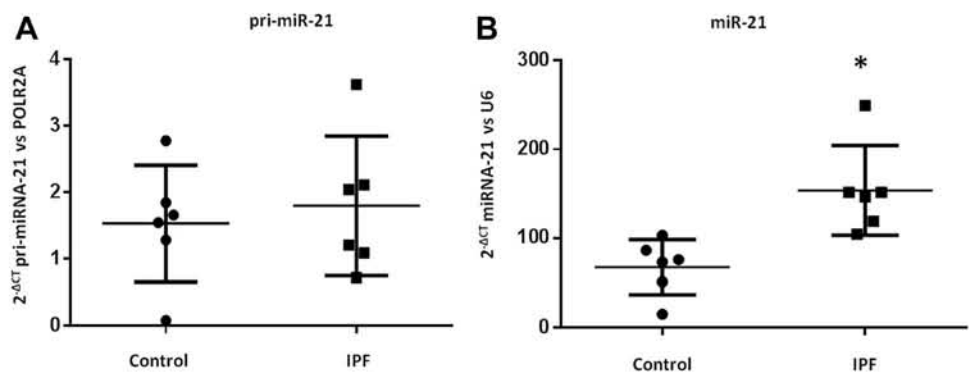


Fig. 2 **a** Protein levels of ADAR1 and 2 in lung fibroblasts. **b** Densitometric analysis of ADAR1 and 2, using B-ACTIN as load control. Both proteins are downregulated in IPF (ADAR1 76% $**p=0.000025$, ADAR2 55% $**p=0.0074$). **c** ADAR1 and 2 immunocytochemistry showed both proteins to be localized in nucleus. **d** Immunolocalization of ADAR1 (green) and ADAR2 (magenta) in lung fibroblasts showed that they are mainly located in the nucleolus, delimited by the use of nucleolin (red). **e** Analysis of the integrated

optical density in control and fibrotic pulmonary fibroblasts, we found more ADAR1 in nucleoplasm of control fibroblasts ($**p=0.000919$) with respect to IPF fibroblasts. ADAR1 is mainly located in the nucleolus of control cells ($**p=0.00011$); ADAR2 is mainly localized in the nucleolus of control cells ($**p=0.000028$), while in the nucleoplasm of IPF cells we found more ADAR2 versus control fibroblasts ($**p=0.000187$) ($n=6$)

Fig. 3 **a** and **b** Expression levels of pri-miRNA-21 and miRNA-21 in lung fibroblasts. Pri-miRNA-21 does not show significant differences between control and IPF fibroblasts ($p=0.6431$), while miRNA-21 is over-expressed in IPF fibroblasts ($**p=0.0052$)



adenosines with a greater or equal to 50% probability of being edited by these enzymes. Two of these adenosines are close to the Dicer cut region. When edited, the formation of an imperfect double chain structure would impede the recognition by Dicer and would favor the accumulation of pri-miRNA-21 in the nucleus, which would bring, as a consequence, the decrease or increase of miRNA-21 maturation.

It has been seen that the edition of pri-miRNAs and pre-miRNAs regulates the processing of miRNAs and can give as a result the suppression of the processing mediated by

Drosha and Dicer, or the accumulation of the inosine-rich pri-miRNAs in the nucleus. As a consequence, mature miRNAs levels decrease. Some miRNAs are processed in a more efficient way when edited by ADAR [25]. In other cases, the pri-miRNA is processed by the Drosha/DGCR8 complex and give rise to new isoforms, while in other cases the edition does not allow the pre-miRNA to be recognized by Exportin 5 and exported to the cytoplasm [26]. Briefly, various pri-miRNAs and pre-miRNAs are subjected to ADAR-mediated edition and this may inhibit its processing and

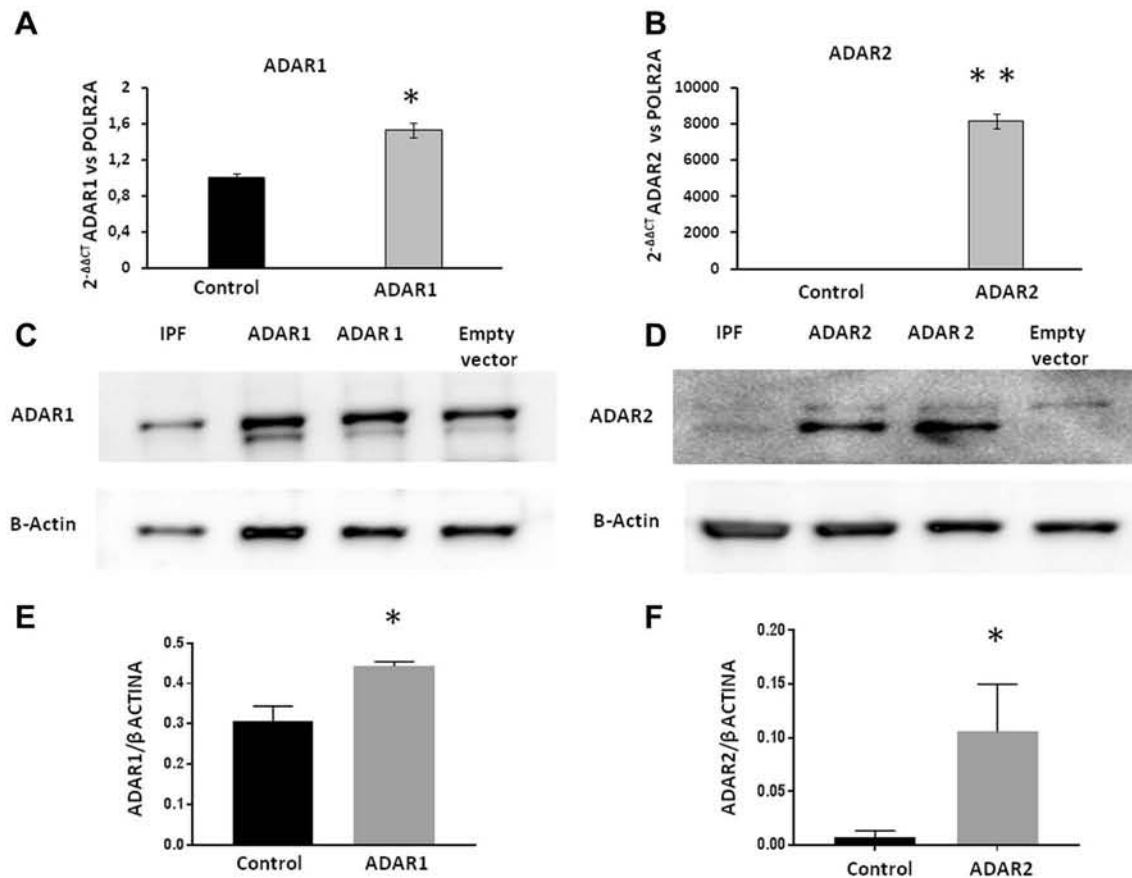


Fig. 4 **a** and **b** ADAR1 and 2 overexpression in two IPF fibroblast lines. (ADAR1 0.53 times, $*p=0.05$ and ADAR2 8159 times more, $*p=0.000019$), the control is the average of the expression levels of the basal fibroblasts and the fibroblasts transfected with the empty vector. Protein levels after overexpression of ADAR1 and ADAR2

and its corresponding loading control (**c** and **d**). The densitometric analysis of the western blot shows the 44.4% increase in the expression of ADAR1 ($*p=0.0375$, **e**) and 442% of ADAR2 ($*p=0.0452$, **f**)

the production of mature miRNAs, affecting the binding of miRNAs to the RISC complex or redirecting them to a new group of target mRNAs [26, 27].

miRNA-21 is found increased in IPF, this miRNA has as targets mRNAs that code for anti-fibrosing proteins [7]. Interestingly, when we analyzed the expression of two miRNA-21 target genes, SPRY2 and PELI1, we found that it was decreased, which could be associated with the increase of miRNA-21 expression in IPF. In pulmonary fibrosis, the role of PELI1 and SPRY2 has not been described; however, IPF fibroblasts microarray showed that these mRNAs are decreased in IPF [28]. SPRY2 can regulate the signaling of the MAPK in development processes, as well as the EMT; in addition, the decrease in the expression of SPRY2 favors the accumulation of extracellular matrix components [29].

On the other hand, PELI1 is an ubiquitin ligase E3, which is decreased in the lungs of patients with IPF; however, its role in the development of this disease is still unknown.

When overexpressing ADAR1 and ADAR2, the expression levels of miRNA-21 decreased with respect to the

control, and the expression levels of PELI1 and SPRY2 increased with respect to IPF fibroblasts. When we stimulated these ADAR-overexpressing fibroblasts with TGFβ1, miRNA-21 expression increased as expected. Levels of pri-miRNA-21 are not modified, as in IPF fibroblasts without ADAR. Expression levels of PELI1 and SPRY2 were increased with TGFβ1 stimulus.

The ADAR expression levels are tissue-specific and besides affecting the expression of mRNAs, it has been described that these enzymes can regulate the processing and activity of miRNAs at different levels. The ADAR play a fundamental role in the development and differentiation besides being associated with the progression of different types of cancer. The differences in expression patterns between tissues and the type of cancer provide important information about the molecular mechanisms involved in the development and prognosis of cancer. This information has great importance in the diagnosis of diseases as well as in the prognosis of such diseases, besides representing potential therapeutic targets.

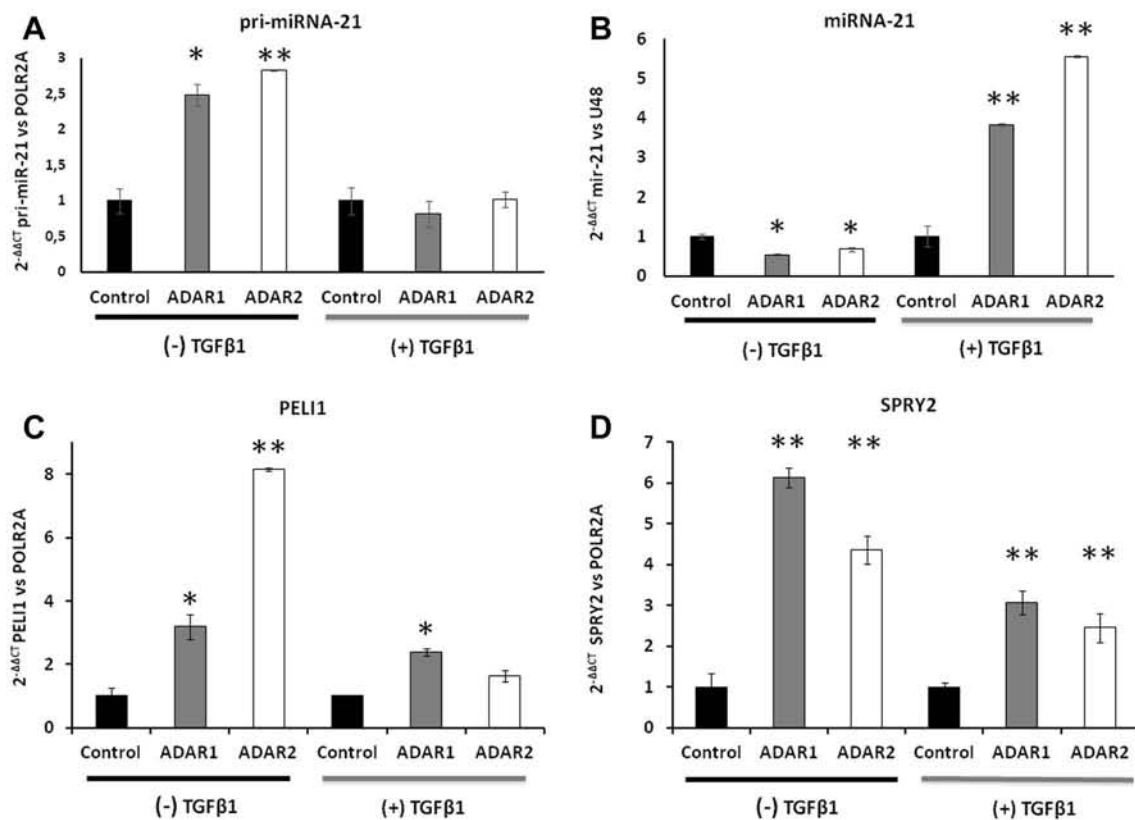


Fig. 5 The overexpression of ADAR1 and 2 generates the accumulation of pri-miRNA-21 (ADAR1, 1.48 times more, gray bar $*p=0.01$, ADAR2, 1.82 times more, white bar, $**p=0.008$ (a)). The stimulation with TGFβ1 does not promote changes in the expression levels of pri-miRNA-21 ($p=0.2689$ (a)). The down-regulation of miRNA-21 is significant (ADAR1 0.53 $*p=0.05$, gray bar and ADAR2 0.68, $*p=0.05$, white bar). The stimulation with TGFβ1 promotes the overexpression of miRNA-21 in IPF fibroblasts transfected with ADAR1 and 2 (ADAR1 $**p=0.000909$, gray bar and ADAR2 $**p=0.0006603$, white bar, (b)). PELI1 was found increased after

ADAR1 and 2 overexpression (ADAR1 $*p=0.016$, gray bar and ADAR2 $**p=0.00067$, white bar, (c)). Such as, treatment of fibroblasts with TGFβ1 reverts the effect of ADAR2 on PELI1 expression ($p=0.0613$, white bar, (c)), but not ADAR1 ($*p=0.037$, gray bar, (c)). SPRY2 was found increased after ADAR1 and 2 overexpression (ADAR1 $**p=0.00046$ Gy bar. ADAR2 $**p=0.0035$, white bar, (d)). SPRY2 is increased in both cells after TGFβ1 stimulus (ADAR1 $**p=0.0011$, gray bar and ADAR2 $**p=0.006$, white bar, (d)) but not at the same level of expression as in the cells transfected with ADAR without TGFβ1 stimulation

The changes in expression levels of ADAR1 and ADAR2 may represent an important regulatory mechanism in IPF, by regulating the processing of key miRNAs such as miRNA-21.

To overexpress ADAR in IPF patients could represent a potential therapeutic strategy by generating changes in the expression levels of key miRNAs in IPF, such as the case of miRNA-21.

Acknowledgements Gabriela Díaz Piña is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the fellowship 290146 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Selman M, Pardo A, Kaminski N (2008) Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs? *PLoS Med* 5:373–380
- Lee J, Collard H et al (2010) Does chronic microaspiration cause idiopathic pulmonary fibrosis? *Am J Med* 123:304–311
- Pardo A, Selman M (2012) Role of matrix metalloproteases in idiopathic pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5(Suppl 1):S9
- Bushati N, Cohen S (2007) miRNA function. *Annu Rev Cell Biol* 23:175–2005
- Kim NV (2005) miRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev* 6:1–11
- Yang S, Banerjee S et al (2012) Participation of miR-200 in pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 180:484–493
- Liu G, Friggeri A et al (2010) miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *JEM* 207(8):1–9

8. Willis B, Borok Z (2007) TGF- β -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol* 293:L525–L534
9. Pandit K, Corcoran D et al (2010) Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182:220–229
10. Pandit K, Milosevic J et al (2011) MiRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res* 157:191–199
11. Faller M, Guo F (2008) MiRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta* 1779(11):663–667
12. Habig J, Dale T et al (2007) miRNA editing—we should have inosine this coming. *Mol Cell* 25:792–793
13. Heale B, Keegan L et al (2009) Editing independent effects of ADARs on the miRNA/siRNAs pathways. *EMBO J* 28:3145–3156
14. Luciano D, Mirsky H et al (2004) RNA editing of a miRNA precursor. *RNA* 10:1174–1177
15. Valente L, Nishikura K (2005) ADAR gene family and A-to-I RNA editing: diverse roles in posttranscriptional gene regulation. *Nucl Acid Res* 33:299–338
16. Vesely C, Tauber S (2012) Adenosine deaminases that act on RNA induce reproducible changes in abundance and sequence of embryonic miRNAs. *Genome Res* 22(8):1468–1476
17. Barraud P, Allain FH (2012) ADAR proteins: double-stranded RNA and Z-DNA binding domains. *Curr Top Microbiol Immunol* 353:35–60
18. Tomaselli S, Bonamassa B (2013) ADAR enzyme and miRNA story: a nucleotide that can make the difference. *Int J Mol Sci* 14(11):22796–22816
19. Paul M, Bass B (1998) Inosine exists in mRNA at tissue-specific levels and is most abundant in brain mRNA. *EMBO* 17(4):1120–1127
20. Orlandi C, Barbon A et al (2012) Activity regulation of adenosine deaminases acting on RNA (ADARs). *Mol Neurobiol* 45:61–75
21. Peng R, Sridhar S, Tyagi G, Phillips JE, Garrido R, Harris P (2013) Bleomycin induces molecular changes directly relevant to idiopathic pulmonary fibrosis: a model for “active” disease. *PLoS ONE* 8(4):e59348
22. Ryan T, Kendall, Carol A, Feghali-Bostwick (2014) Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol* 5:1–13
23. Yiannis A, Savva LE, Rieder, Robert A, Reenan (2012) The ADAR protein family. *Genome Biol* 13:252
24. Julie M, Eggington T, Greene BL, Bass (2011) Predicting sites of ADAR editing in double-stranded RNA. *Nat Commun* 2:319
25. Heale B, Keegan L et al (2009) Editing independent effects of ADARs on the miRNA/siRNA pathways. *EMBO* 28:3145–3156
26. Yang W, Chendrimada T et al (2006) Modulation of miRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol* 13:1–20
27. Asis K, Das, Carmichael GG (2007) ADAR editing wobbles the miRNA world. *ACS Chem Biol* 2(4):217–220
28. Meltzer EB, Barry WT, D'Amico TA, Davis RD et al (2011) Bayesian probit regression model for the diagnosis of pulmonary fibrosis: proof-of-principle. *BMC Med Genom* 4:70
29. Lovicu Frank J et al (2016) Fibrosis in the lens. Sprouty regulation of TGF β -signaling prevents lens EMT leading to cataract. *Exp Eye Res* 142:92–101