





**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO



**Rol de la enzima ADAR en la proliferación y replicación del  
DNA durante la progresión del adenocarcinoma mamario.**

**Eduardo Alberto Sagredo Campos**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**Directores de Tesis:**

**Dr. Ricardo Armisen Y.**

**Dra. Katherine Marcelain C.**

**2017**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

**EDUARDO ALBERTO SAGREDO CAMPOS**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 22 de Noviembre de 2017.

**DR. RICARDO ARMISEN YAÑEZ**  
Director de Tesis  
Centro de Excelencia en Medicina de  
Presición (CEMP)

**DRA. KATHERINE MARCELAIN CUBILLOS**  
Directora de Tesis  
Facultad de Medicina  
Departamento de Oncología Básico-Clínico

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**DR. MARTIN MONTECINO LEONARD**

**DR. PATRICIO OLGUIN AGUILERA**

**DR. PATRICIO MANQUE MANQUE**

**DR. GONZALO CABRERA VALLEJOS**  
Presidente Comisión de Examen



## **Agradecimientos**

Quiero expresar mis sinceros agradecimientos hacia todas las personas que contribuyeron en la realización de este trabajo que con su apoyo, amistad y cariño permitieron el buen término de este proceso.

De manera especial quiero agradecer a toda mi familia, la cual me ha apoyado de manera incondicional, con los cuales celebramos nuestros triunfos y compartimos nuestras derrotas. A mi madre, Patricia, y mi padre, Flavio: Fundamentales en este proceso, gracias por entregarme su infinito amor y darme las herramientas necesarias para enfrentar el futuro con optimismo. Gracias tía Sonia, sin Ud. nada de esto habría ocurrido. Este trabajo tiene un sentido reconocimiento para mi tía Tita y tío Guido, quienes siempre estuvieron conmigo, apoyando mis desafíos y confiando en mí, los amo y extraño constantemente.

A mis tutores, Dra. Katherine Marcelain y Dr. Ricardo Armisen, que constantemente me brindaron su apoyo, paciencia y consejo en este proceso. En particular a la Dra. Marcelain por brindarme guía y orientación en este trabajo. A Ricardo, la paciencia y empatía que mostró conmigo a lo largo de este proceso doctoral fue una constante, muchas gracias.

Desenvolverse en Ciencias es un acto colaborativo. Este trabajo no podría haberse realizado sin la ayuda de múltiples personas que con mucho cariño y sabio consejo me han acompañado en este proceso doctoral. Primero, debo mencionar a mi hermano el cual no solo es mi compañero y amigo, sino que también fue fundamental en todo este trabajo. Así también a Alejandro Blanco, que sin su ayuda, colaboración y amistad este trabajo habría sido mucho más difícil y arduo. Mencionar además a todas las personas y amigos que de manera directa o indirecta han estado involucrados en este proyecto: Víctor, Jaime Espinoza, Jaime Riquelme, Eduardo, Aino, Pato, Liliana y Jack, gracias amigos por su constante apoyo, cariño, conversaciones y cervezas.

Además, quiero agradecer de forma muy sentida al Dr. Olivier Harismendy y al Dr. Alfredo Castelló, quienes me brindaron la oportunidad de estar en sus laboratorios y gracias a ellos pude ampliar mi espectro y entrenamiento científico, donde además tuve la oportunidad de conocer y compartir con personas increíbles en sus laboratorios. Marko, Manuel y Aino, muchas gracias por brindarme su tiempo y compartir conmigo en la parte final de este proceso.

Finalmente, agradecer a todas aquellas personas, maestros y tutores que me han acompañado a lo largo de todo este proceso, crean de verdad que les estoy muy agradecido y que han sido aportes reales a mi formación personal y profesional.

## Índice

1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Introducción	3
3.1. Epidemiología del Cáncer de mama	3
3.2. Cáncer de mama y tipificación molecular	3
3.3. Estrés de replicación e integridad del DNA en el cáncer	6
3.4. Edición del RNA y contexto genómico	11
3.5. ADAR1 y su relación con el cáncer	14
3.6. Rol de ADAR1 en la regulación del ciclo celular y la respuesta al daño al DNA	16
3.7. ADAR1 y cáncer de mama	19
4. Hipótesis	26
5. Objetivo General	26
6. Objetivos Específicos	26
7. Material y Métodos	27
8. Resultados	50
8.1. Analizar el rol de la expresión de ADAR1, en la expresión y estabilidad de los mRNAs de genes asociados a los procesos de respuesta al daño del DNA y control del ciclo celular en las líneas celulares MCF-7 y ZR-751	50
8.2. Determinar el efecto de la expresión de ADAR1 sobre el estrés replicativo en las líneas celulares MCF-7 y ZR-751	75
8.3. Evidenciar el efecto de la expresión de ADAR1 sobre la proliferación en las líneas celulares MCF-7 y ZR-751	85
8.4. Analizar la expresión de ADAR1 y la edición de mRNAs de genes que participan en los procesos de respuesta al daño del DNA y control del ciclo celular en pacientes con adenocarcinoma mamario	96
9. Discusión	112
10. Conclusiones	129
11. Anexos	132
12. Bibliografía	148



## 1. Resumen.

La enzima ADAR1 (Adenosina Deaminasa específica de RNA 1) presenta una expresión aumentada en diversos tumores, incluyendo el cáncer de mama. Múltiples análisis bioinformáticos y experimentales han revelado que la edición del mRNA mediada por esta proteína afecta preferentemente regiones intrónicas o regiones no traducibles del mRNA (UTRs), modificando la expresión o estabilidad de los transcritos editados por esta proteína. Adicionalmente, un grupo significativo de los genes editados en las regiones UTRs por ADAR1 están asociados a la respuesta al daño del DNA y puntos de control del ciclo celular, los cuales han sido relacionados a la progresión del cáncer de mama. A la fecha, no se ha determinado el efecto de la sobreexpresión de ADAR1 y el impacto de la edición de estos transcritos sobre la proliferación y la respuesta al daño del DNA de este tipo de cáncer, donde existe una alta expresión de esta enzima. Así, este trabajo propuso la siguiente Hipótesis: “La expresión de la enzima ADAR1 regula la estabilidad de los mRNAs de genes que participan en la respuesta al daño del DNA y puntos de control del ciclo celular, promoviendo el estrés replicativo y la proliferación celular en adenocarcinoma mamario” proponiendo como objetivo general determinar el efecto de la enzima ADAR1 sobre la expresión de genes asociados a los procesos de respuesta al daño del DNA y control del ciclo celular; y caracterizar su efecto sobre la replicación y proliferación celular, en el adenocarcinoma mamario. Para comprobar esta hipótesis se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos: 1. Analizar el efecto de la expresión de ADAR1, en la expresión y estabilidad de los mRNAs de genes asociados a los procesos de respuesta al daño del DNA y control del ciclo celular en las líneas celulares MCF-7 y ZR-751; 2. Determinar el efecto de la expresión de ADAR1 sobre el estrés replicativo en las líneas celulares MCF-7 y ZR-751; 3. Evidenciar el efecto de la expresión de ADAR1 sobre la proliferación en las líneas celulares MCF-7 y ZR-751; y 4. Analizar la expresión de ADAR1 y la edición de mRNAs de genes que participan en los procesos de respuesta al daño del DNA y control del ciclo celular, en muestras de pacientes con adenocarcinoma mamario. Los resultados muestran que la disminución de la expresión de ADAR1 en células ZR-751 produce cambios significativos en la estabilidad de los mRNAs editados por ADAR1 involucrados en los procesos de respuesta al daño del DNA, replicación y proliferación celular. Estos cambios se relacionaron con una disminución de la proliferación y un incremento en la apoptosis. Adicionalmente, células MCF7 y ZR-751 que presentan una disminución en la expresión de ADAR1, presentan una disminución significativa de la actividad de la cascada transduccional de respuesta al daño en el DNA y una acumulación en la fase S del ciclo celular. Por otro lado, el análisis de una cohorte de pacientes con cáncer de mama (The Cancer Genome Atlas, TCGA), mostró que los tumores presentan un mayor número de variantes, generadas por ADAR, en los UTRs analizados, en comparación a tejido mamario no tumoral. Finalmente, pacientes cuyos tumores presentan una mayor expresión de ADAR1 o número de variantes en sus UTRs, tienen una supervivencia significativamente menor que pacientes con baja expresión ADAR1. Así, este trabajo demuestra que ADAR1 desempeña un papel importante en la progresión de BRCA a través de la regulación de la estabilidad y expresión de genes que están involucrados en la replicación y la proliferación, afectando a la proliferación celular, viabilidad y respuesta al daño del DNA.

## 2. Abstract.

The double stranded RNA-specific adenosine deaminase (ADAR1) enzyme has an increased expression in various tumors, including breast cancer (BRCA). Multiple bioinformatic and experimental analyzes have revealed that mRNA editing mediated by ADAR1 preferentially affects intronic or untranslated regions (UTRs) of the mRNA, modifying the expression or stability of the edited transcripts. In addition, a significant group of genes edited in UTRs regions are associated with DNA damage response and cell cycle control points, which have been linked to breast cancer progression. However, the effect of the overexpression of ADAR1 and the impact of the editing of these transcripts on the proliferation and response to DNA damage of this type of cancer, where there is a high expression of this enzyme, has not been determined. This work aims to determine ADAR1 expression role on genes associated in DNA damage response and cell cycle, to further characterize its effect on replicative stress and proliferation in breast cancer. Based on that, the following hypothesis was formulated: "ADAR1 expression regulates the mRNAs stability of genes involved in the DNA damage response and cell cycle check points, promoting replicative stress and cell proliferation in breast cancer". With the following specific aims: 1. To Analyze the ADAR1 expression role on mRNA expression and stability of genes associated with DNA damage response and cell cycle processes in MCF-7 cell lines and ZR-751. 2. To determine the ADAR1 expression effect on replicative stress in MCF-7 and ZR-751 cell lines. 3. To demonstrate the ADAR1 expression effect on proliferation in cell lines MCF-7 and ZR-751 and 4. To analyze the ADAR1 expression pattern and RNA editing on genes involved in the DNA damage response and cell cycle control from patients with breast adenocarcinoma. Our results demonstrate that decreased ADAR1 expression in ZR-751 cells produces significant changes on mRNAs stability of edited transcripts by ADAR1 involved in DNA damage response and DNA replication. Furthermore, ADAR1 knock down cells shown a decreased proliferation, viability and an increased apoptosis, in comparison to control cells. Moreover, MCF7 and ZR-751 knock down cells exhibit a significant decrease of their DNA damage response activation with a significant accumulation on S phase, suggesting an impair cell cycle progression of these cells. Finally, breast cancer patients from The Cancer Genome Atlas shown an increased number of A to G variants, addressable to ADAR1 in their UTRs, compared to control patients from this cohort. Finally, patients with an increased ADAR1 expression or variants counts in their UTRs have shown a decreased overall survival, suggesting that ADAR1 function has an implicit clinical outcome. Taken together, this work shows that ADAR1 plays an important role in BRCA progression through the regulation of mRNA stability and expression from genes that are involved in the replication stress and proliferation, affecting the cell proliferation, DNA damage response and viability allowing the development of malignant phenotypes in breast cancer cells.

### **3. Introducción.**

#### **3.1. Epidemiología del Cáncer de mama.**

El cáncer de mama es el segundo cáncer más frecuente en el mundo y el más común en mujeres <sup>1,2</sup>, representando la quinta causa de muerte derivada de todos los tipos de cáncer a nivel mundial, y corresponde a la primera causa de muerte por tumores en mujeres de Latinoamérica y el Caribe <sup>1,3</sup>. En este contexto, Latinoamérica cuenta con aproximadamente el 10% de la incidencia de cáncer de mama del mundo, mientras que en nuestro país, estudios derivados del Ministerio de Salud han arrojado que la tasa diagnóstica ha incrementado en un 48,7%, entre los periodos 1990 y 2008 para esta enfermedad <sup>4</sup>. Adicionalmente, en nuestro país el cáncer de mama representa la primera causa de muerte oncológica en mujeres, con una tasa de mortalidad de 15 defunciones por cada 100.000 mujeres, similar a la tasa de mortalidad de países desarrollados <sup>5</sup>.

#### **3.2. Cáncer de mama y tipificación molecular.**

El adenocarcinoma mamario es un tipo tumoral que se presenta generalmente en mujeres, cuya incidencia promedio de edad en Chile es de 55 años y que, tanto para nuestro país como a nivel mundial, representa un problema de salud pública; debido a su alta incidencia y alta heterogeneidad, la cual repercute de manera significativa en el pronóstico de los pacientes con esta enfermedad <sup>4-6</sup>.

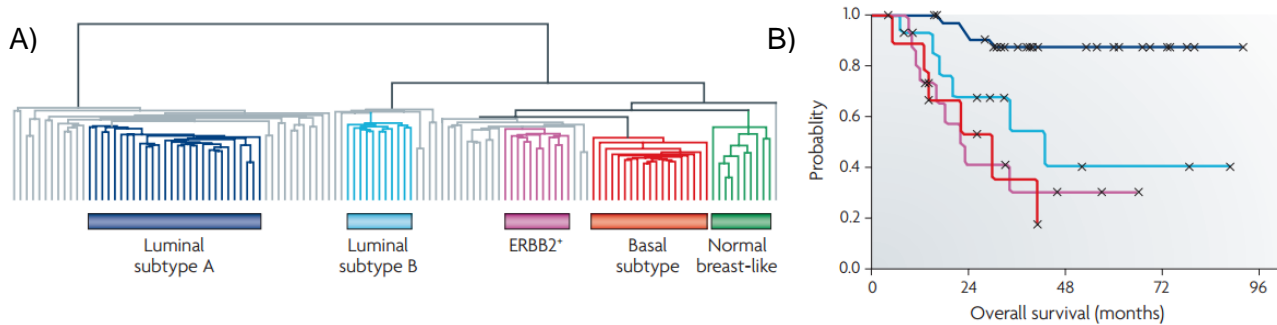
A partir del tejido comprometido, el adenocarcinoma mamario se clasifica en 2 subtipos mayoritarios. La primera forma y más común de este cáncer se denomina carcinoma ductal, producto de la transformación de las células que comprometen los ductos que movilizan la leche dentro de la mama. La segunda forma más frecuente de la enfermedad se denomina carcinoma lobular, y se origina en las glándulas productoras de leche en este órgano <sup>7</sup>.

Se estima que aproximadamente el 80% de los cánceres de mama pre invasivos e invasivos corresponderían al tipo ductal, y el 20% restante al fenotipo lobular <sup>8</sup>, y si bien la clasificación histopatológica de la enfermedad es acotada, esta enfermedad es altamente heterogénea en términos de sobrevida y respuesta a tratamientos convencionales en los pacientes, lo que ha derivado en el estudio y caracterización molecular de este cáncer <sup>9-14</sup>.

La primera clasificación molecular derivada de un estudio del cáncer mamario fue publicada en el año 1999, por el grupo de Perou y colaboradores <sup>9</sup>, la cual por medio de un análisis de expresión de mRNA utilizando microarreglos en 42 tumores, logró agrupar la expresión de estos en cuatro grandes categorías: Tipo luminal (*luminal like*), tipo basal (*basal like*), tipo normal (*normal like*) y aquellas muestras con expresión del receptor Erb-B2 o (*HER2/Erb-B2 like*), sugiriendo además en sus resultados que la marcada diferencia en los perfiles de expresión de cada subtipo molecular correlacionaba con la tipificación clínica de los pacientes, lo que fue corroborado por el mismo grupo el año 2001 <sup>10</sup>. En este trabajo, donde se distinguen por primera vez el tipo Luminal A y el tipo Luminal B, se describe que los pacientes que desarrollan los subtipos Luminal B, triple negativos (anteriormente denominados tipo basal) y/o alta expresión de Erb-B2, presentaban una bajísima sobrevida posterior a su diagnóstico, comparado con los tipo Luminal A: sobre el 70% de los pacientes con estos subtipos moleculares fallecieron entre los 48 y 72 meses posterior a su diagnóstico.

Adicionalmente, se han determinado las distintas características fenotípicas de cada subtipo molecular, sugiriendo que gran parte de los tipos luminales y Erb-B2 derivan de adenocarcinomas ductales, mientras que el subtipo basal se encuentra mayoritariamente confinado a adenocarcinomas lobulares <sup>8,15</sup>. Entre las principales características de los adenocarcinomas luminales se encuentra la presencia de receptores hormonales como el receptor de estrógenos y el receptor de progesterona. Además, una proporción importante de ellos expresan el receptor tirosina quinasa Erb-B2. Por otro lado, el tipo Erb-B2 o *HER2 like* presenta una marcada sobreexpresión de este receptor, debido a la amplificación de este gen. Finalmente, el tipo basal o también denominado triple negativo, debe su denominación a la ausencia de cualquiera de estos patrones de expresión anteriormente

mencionados, sobreexpresando otras vías de señalización relacionadas al cáncer como la vía WNT canónica <sup>16</sup>.



**Figura Número 1. Caracterización molecular del cáncer de mama.** En A) se muestra el agrupamiento jerárquico (*clustering*) de muestras mediante análisis de coexpresión, evidenciando 4 grupos característicos del cáncer de mama. En B) se muestra un gráfico de supervivencia, asociado a cada subtipo molecular, evidenciando una alta mortalidad para los subtipos Luminal B, ErbB2/Her2 y *Basal like*. Modificado desde Vargo-Gogola T & Rosen J, 2007.

Durante el año 2012, el consorcio Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) publicó un importante trabajo <sup>17</sup>, intentando aglomerar muchos de los esfuerzos anteriormente descritos, desde una óptica holística. En este trabajo se caracterizó los perfiles de expresión de mRNA, miRNA y proteínas, y se evaluó los cambios y aberraciones genéticas y genómicas, así como el grado de metilación del DNA en ciertos genes, en 593 adenocarcinomas mamarios. De esta forma, se generó un consenso en la tipificación molecular de este cáncer, anotando y caracterizando las principales mutaciones precursoras (*drivers*) de cada subtipo molecular, las vías de señalización más importantes involucradas en la progresión de cada tipo tumoral y las aberraciones genómicas características de cada subtipo molecular. En la Tabla número 1 se agrupan algunas de las características más importantes de cada subtipo molecular.

	Luminal A	Luminal B	Basal Like	HER2 amp
<b>TP53 pathway</b>	TP53 mutado en 12% de los casos, ganancia de MDM2 14% de los casos	TP53 mutado en 32% de los casos, ganancia de MDM2 en 31% de los casos	TP53 mutado en 84% de los casos, ganancia de MDM2 en 14% de los casos	TP53 mutado en 75% de los casos, ganancia de MDM2 en 30% de los casos
<b>PI3K/PTEN pathway</b>	PI3KCA mutado en 49% de los casos, PTEN mut/loss 13% de los casos	PI3KCA mutado en 32% de los casos, PTEN mut/loss 24% de los casos	PI3KCA mutado en 7% de los casos, PTEN mut/loss 35% de los casos	PI3KCA mutado en 42% de los casos, PTEN mut/loss 19% de los casos
<b>RB1 pathway</b>	Ciclina D1 amp 29%; ganancia de CDK4 14%;	Ciclina D1 amp 58%; ganancia de CDK4 25%;	Ciclina E amp 9%; RB1 perdida/mutaciones 20%;	Ciclina D1 amp 38%; ganancia de CDK4 24%;
<b>Expresión de mRNA</b>	Alta expresión de RE, baja proliferación, alta expresión de RB1	Baja expresión de RE, alta proliferación	Cluster Basal, alta proliferación, baja expresión de RB1	Amplificación de HER2, Alta proliferación
<b>Aberraciones cromosómicas</b>	Mayoría de los casos diploide; muchos casos con amplificaciones en 1q, 8q, 8p11	Mayoría de los casos aneuploide; muchos casos con amplificaciones en 1q, 8q, 8p11	Mayoría de los casos aneuploide; muchos casos con inestabilidad cromosómica en 1q y 10p	Mayoría de los casos aneuploide; muchos casos con amplificaciones en 1q, 8q
<b>Mutaciones puntuales</b>	PIK3CA (49%); TP53 (12%); GATA3 (14%); MAP3K1 (14%)	TP53 (32%); PIK3CA (32%); MAP3K1 (5%)	TP53 (84%); PIK3CA (7%)	TP53 (75%); PIK3CA (42%); PIK3R1 (8%)

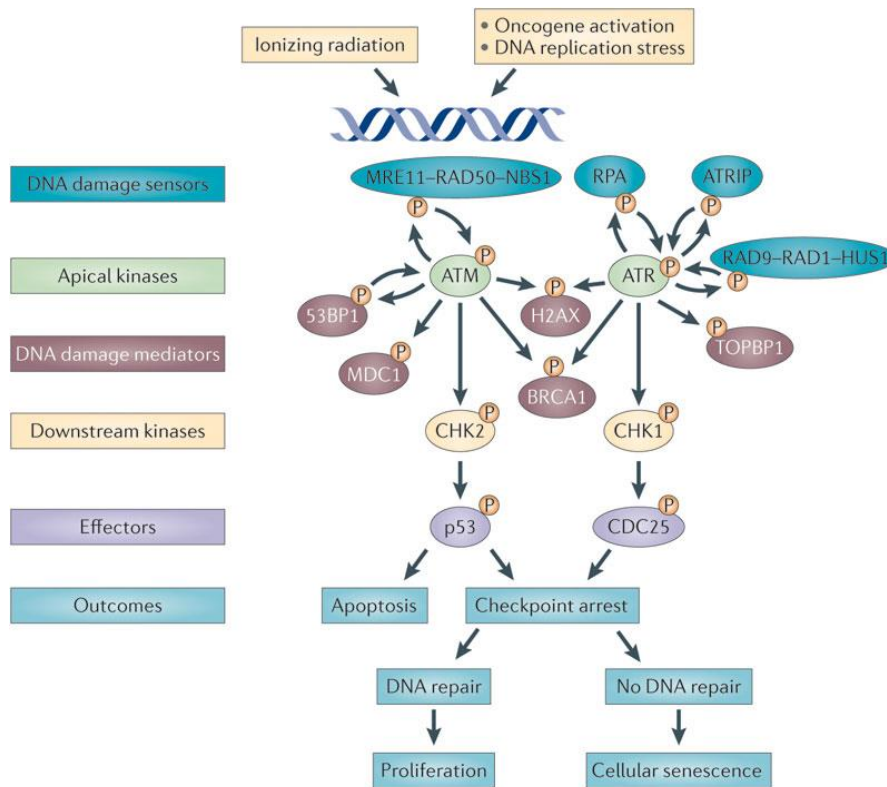
**Tabla número 1. Resumen de las principales características genómicas de cada subtipo molecular del cáncer de mama, en las muestras incluidas en el trabajo del Cancer Genome Atlas Network (TCGA).** Modificado desde Cancer Genome Atlas Network, 2012. (TNBCs: Triple-negative breast cancers, sin presencia de receptores ER1 y HER2; ER1/HER2: expresión de mRNA y proteínas del receptor de estrógenos y receptor tirosina quinasa Erb-B2).

### 3.3. Estrés de replicación e integridad del DNA en el cáncer.

La adquisición del fenotipo tumoral requiere de la acumulación de un conjunto de características, como la autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a las señales de anti-crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis) y un potencial replicativo ilimitado, revisado por Hanahan y Weinberg <sup>18</sup>, hace más de 10 años. No obstante, la evidencia actual sugiere la existencia de otros hitos del cáncer que permiten explicar características transversales a los tumores (a las neoplasias), tales como la pérdida de la expresión de supresores tumorales y el aumento de mutaciones puntuales y cromosómicas propia de la mayoría de los tumores sólidos <sup>19-22</sup>. En este sentido,

múltiples autores han descrito que el aumento en el daño del DNA y la posterior inestabilidad genómica presente en los tumores es mediado por el aumento de diversos estresores, los que afectarían de manera significativa el correcto funcionamiento del ciclo celular, la replicación del DNA y los mecanismos efectores de la respuesta al daño del DNA <sup>23-27</sup>.

Bajo condiciones fisiológicas normales, el daño al DNA es contenido por un conjunto de cascadas transduccionales conocidas en su conjunto como respuesta al daño del DNA, cuya función es sensor el daño presente en el DNA, permitiendo la activación de distintas proteínas efectoras, que promoverán el arresto del ciclo celular, la reparación del daño o el desencadenamiento de la apoptosis celular <sup>28-31</sup>. Brevemente, al producirse el daño mono o bicatenario del DNA este es detectado por medio de distintos complejos sensores, específicos para cada tipo de daño, mediante la activación de las quinasas ATM y ATR, para el daño bicatenario y monocatenario, respectivamente. La autofosforilación de estas quinasas, denominadas también quinasas apicales, mediará la activación de las quinasas efectoras CHEK1 y CHEK2, las que inhibirán de forma directa la progresión del ciclo celular, mediante la inactivación de fosfatasa asociadas al ciclo celular (CDC25A y CDC25C) <sup>32,33</sup> y la estabilización y aumento transcripcional de la proteína p53, la que promoverá la detención del ciclo celular, la reparación del DNA o la apoptosis celular mediante diversos mecanismos <sup>34,35</sup>. El desbalance o pérdida de expresión de supresores tumorales, tales como p53, PTEN o la proteína del retinoblastoma (RB), el aumento de expresión de oncogenes o la desregulación de la respuesta al daño al DNA, producto de cambios epigenéticos, predisposición genética o causas ambientales, tienen como principal consecuencia una constante presión de entrada al ciclo celular, promoviendo un fenómeno conocido como estrés replicativo, el cual se propone como la principal causa de las mutaciones e inestabilidad genómica observada en los tumores sólidos <sup>36-39</sup>.



**Figura número 2. Mecanismo de respuesta frente al daño del DNA.** La figura muestra las distintas proteínas involucradas en la respuesta al daño al DNA, las quinasas efectoras y la respuesta asociada tras la activación de estas quinasas. Adaptado desde Sulli, G y colaboradores, 2012.

El estrés replicativo se genera debido al “enlentecimiento y/o freno de la síntesis de DNA, ocurrido durante la replicación del DNA, debido al colapso de la horquilla de replicación”<sup>31</sup> y tiene como resultado el desensamblaje de parte de la maquinaria replicativa y el reclutamiento de proteínas de respuesta al daño del DNA. El reclutamiento de estas proteínas tiene 2 consecuencias generales: 1) A nivel local, la estabilización de la horquilla replicativa para su reparación y posterior rescate de la replicación, durante la fase S; y 2) a nivel global, la represión y retraso del ciclo celular, por medio de la activación de los puntos de control del ciclo celular<sup>40-42</sup>. La estabilización de la horquilla replicativa y la reparación del daño del DNA durante la fase S del ciclo celular es un proceso altamente complejo y coordinado, tanto espacial como temporalmente<sup>31,39,43</sup>. Si la lesión en el DNA



no es reparada, se produce la catástrofe de la horquilla de replicación y, consecuentemente, en condiciones normales, la apoptosis de la célula. Así, la célula hace uso de al menos 2 mecanismos reparatorios durante la fase S del ciclo celular, para evitar el colapso replicativo, denominados MMR o *mismatch repair* y TLS, o *translesion synthesis*<sup>44-47</sup>. El primer sistema reparatorio, permite remover nucleótidos mal apareados y posteriormente, mediante la utilización de DNA polimerasas particulares (Pol  $\delta$  y Pol  $\gamma$ ) el daño de hebra simple es reparado libre de errores<sup>48,49</sup>. Por el contrario, la síntesis translesional es un sistema de reparación, el cual no es libre de errores, que permite reparar el daño de hebra simple ocurrido en el DNA, para aquellos sitios abásicos en el DNA, donde existe un mal apareamiento de bases y/o donde se generaron lesiones espontáneas del DNA<sup>50,51</sup>. Este mecanismo recluta DNA polimerasas con baja fidelidad, capaces de sintetizar y reparar el DNA dañado, permitiendo el rescate de la horquilla replicativa detenida de forma rápida y eficaz, siendo el tipo de reparación más frecuente durante la fase S del ciclo celular<sup>30,50,52</sup>.

Diversos autores han postulado que el sistema translesional evolucionó como una forma de tolerar el daño presente en el DNA (este sistema reparatorio es también denominado DDT o DNA *damage tolerance response*) y así evitar el colapso de la horquilla de replicación evitando la apoptosis de la célula<sup>40,50</sup>. Sin embargo, la baja fidelidad de estas DNA polimerasas hace que este sistema no sea libre de errores y, por el contrario, la utilización de este sistema por parte de la célula es considerada como la mayor fuente de mutaciones somáticas derivadas de la replicación del DNA y el estrés replicativo<sup>50,53,54</sup>. Y aunque el rescate de la horquilla de replicación permite la sobrevivencia de la célula, bajo condiciones de estrés o presión proliferativa existe un importante incremento en el número de horquillas replicativas que colapsan y no pueden ser rescatadas<sup>31</sup>, promoviéndose así la generación de quiebres bicatenarios en el DNA, los que derivan en el fenotipo tumoral definido por Hannahan y colaboradores hace ya más de una década.

Si bien no existe consenso sobre el o los mecanismos por el cual son generados los quiebres de doble hebra, la respuesta al daño bicatenario y su reparación ha sido descrita con profundidad <sup>27,40,55</sup>. Brevemente, el complejo MRN (MRE11, RAD50, NBS1) sensa el daño e induce la activación de la quinasa ATM, la cual promoverá el reclutamiento de un complejo multiproteico, constituido por las proteínas FA (Fanconi Anemia, por sus siglas en inglés), promoviendo su actividad ubiquitina ligasa (E3), ubiquitinando a FANCD2 y FANCI (parte de la familia de proteínas FA), las que mediarán y atraerán a endonucleasas asociadas a daño del DNA y proteínas de reparación de daño de doble hebra, como BRCA1 y las proteínas XRC, permitiendo la reparación del DNA <sup>56-58</sup>. No obstante, se ha descrito que gran parte de los quiebres bicatenarios producidos tras el colapso de la horquilla de replicación, producto del estrés de replicación, están asociados a procesos de reparación de extremos no homólogos, aun cuando exista el reclutamiento de complejos asociados a la reparación de extremos homólogos, eliminando porciones del DNA templado, lo que a la larga deriva en la inestabilidad genómica característica del cáncer <sup>28,31,59</sup>.

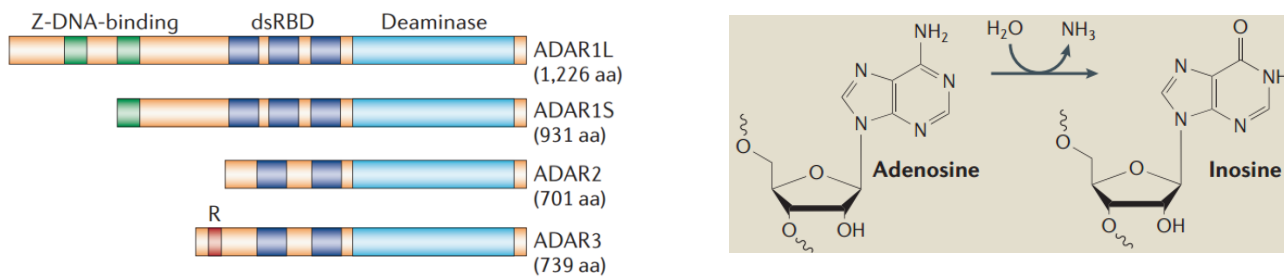
Como se señaló anteriormente, para la generación de mutaciones y la progresión del cáncer es necesaria la inhibición de los mecanismos de respuesta al daño del DNA, reparación del DNA y/o el descontrol de los puntos de control ciclo celular. En línea con estos antecedentes, múltiples autores han caracterizado que sobre el 40% de los tumores mamarios presentan mutaciones inactivantes del supresor tumoral p53, como también una pérdida transversal del número de copias normal para p53, el gen codificante para la proteína del retinoblastoma RB1, el supresor tumoral PTEN y de CDKN2A, codificante para el supresor de tumores p16; como también se ha descrito, un importante número de mutaciones puntuales en los genes BRCA1 y BRCA2, ATM, ATR, RB1, CHEK1, CHEK2 y la amplificación del gen codificante para la ciclina D (CCND1), incrementando la expresión de esta proteína, promoviendo la entrada al ciclo celular en este tipo de cáncer <sup>60-62</sup>.

Esto sugiere una alteración de los puntos de control del ciclo celular y la desregulación de la respuesta al daño del DNA, que por medio del aumento del estrés replicativo, promovería la progresión de la enfermedad y el fenotipo aneuploide característico de todos los subtipos moleculares del adenocarcinoma mamario <sup>11,14,17,63-65</sup>.

### **3.4. Edición del RNA y contexto genómico.**

La edición del RNA es un proceso post transcripcional que introduce cambios nucleotídicos en las secuencias de RNA <sup>66</sup>. Este fenómeno fue primeramente descrito como el efecto de la inserción o eliminación de nucleótidos de uridina en los mRNA dentro de la mitocondria del protozoo *Trypanosoma* en el año 1986 <sup>67</sup>. Un año después fue reportado el primer ejemplo de edición de mRNA en mamíferos <sup>68</sup>, proponiendo un mecanismo de edición transicional mediado por la edición de citosina y su conversión a uracilo, y un segundo mecanismo derivado de la deaminación de adeninas y su conversión a inosina, siendo este último tipo de edición (A → I) el más conservado a lo largo del reino animal <sup>69-71</sup>.

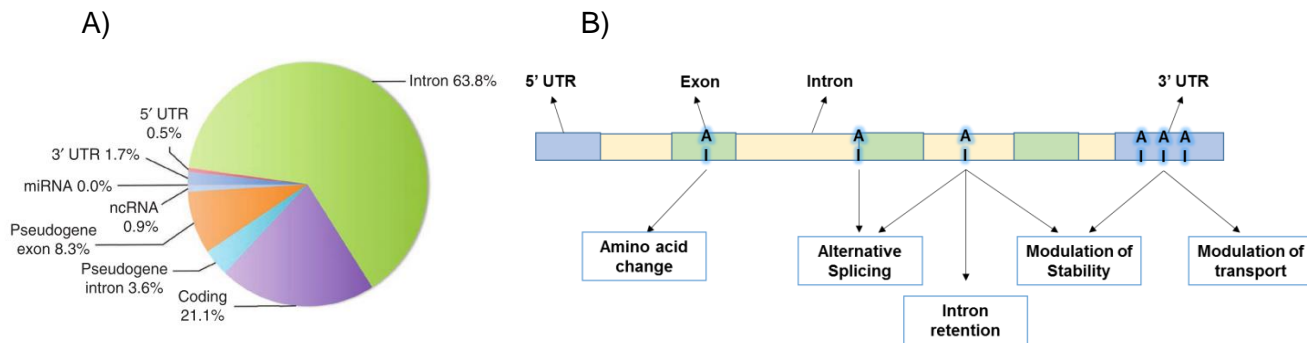
La deaminación de adeninas en el RNA es mediada por la familia de enzimas Adenosina Deaminasas específicas de RNAs o ADAR, las cuales catalizan mediante la hidrólisis del grupo amino presente en el carbono 6 de adeninas, la conversión de este nucleósido en inosina, como se muestra en la Figura número 3. La familia de enzimas ADAR fue descrita en *Xenopus laevis* y han sido caracterizadas en humanos, mosca, ratones y múltiples metazoos, identificándose 3 isoformas distintas en humanos: ADAR1, ADAR2 y ADAR3 las cuales se expresan ubicuamente en el organismo. Estas enzimas presentan al menos 2 dominios de interacción con RNA de doble hebra (dominio dsRBD) y un dominio catalítico, mientras que ADAR1 presenta adicionalmente, un dominio de interacción con DNA denominado Z DNA binding domain <sup>71-74</sup>.



**Figura número 3. Isoformas y reacción general mediada por ADAR.** En la figura se muestran las distintas isoformas de ADAR, sus dominios proteicos y la reacción asociada a la edición mediada por estas enzimas. Modificado desde Nishikura. K, 2006.

Se ha descrito que estas enzimas no presentan un sustrato específico para llevar a cabo su actividad enzimática, si no que requieren de la estructura secundaria formada por un lazo o *loop* del RNA para así editar al transcrito <sup>74</sup>. Esta función editora tendría implicancias biológicas relevantes, pues puede afectar distintas regiones del RNA, como las regiones 5' y 3' no traducibles (UTRs), la región codificante e incluso las regiones intrónicas en los mRNA inmaduro, generando una nueva y relevante forma de diversidad en la biología de la célula, pudiendo afectar la vida media y traducción de los transcritos, la secuencia codificante de las proteínas, modular la actividad de microRNAs e incluso inhibir o promover el corte y empalme de los transcritos en formación <sup>75-78</sup>, como se muestra en la Figura número 4.

El primer cambio funcional asociado a las proteínas ADAR fue descrito en los receptores neuronales de glutamato, *Caenorhabditis elegans* y humanos, donde se caracterizó que la edición del mRNA, específicamente en la región codificante de la subunidad del receptor de glutamato (GluR-2), es imprescindible para el normal funcionamiento cerebral y el desarrollo de los individuos adultos <sup>79-81</sup>.



**Figura número 4. Distribución de la edición mediada por ADAR y la función asociada a la edición del mRNA.** En A) se muestra la distribución de la edición mediada por ADAR1 y ADAR2, mientras que en B) se muestra una imagen del efecto de la edición en distintas regiones del pre mRNA. Modificado desde Wu y colaboradores (2011) y <http://www.su.se/cmlink/2.7576/research/2.25050>.

Adicionalmente, la irrupción de tecnologías de secuenciación de última generación y el análisis de genomas completos, han permitido determinar que la edición de los RNAs no se restringiría a un grupo pequeño de genes y procesos biológicos sino que, por el contrario, la edición de los RNAs representa un nuevo y relevante proceso de control epigenético que afectaría a gran parte del transcriptoma. En este sentido, durante el año 2012 fue publicado el primer trabajo de secuenciación masiva donde se compara el DNA genómico y los cambios presentes en el mRNA<sup>83</sup>, generando gran polémica y debate sobre la implicancia de los resultados encontrados, pues el estudio caracterizó aproximadamente 400.000 sitios con cambios significativos en el RNA, tras compararlos contra un DNA de referencia, involucrando en sus resultados a casi la totalidad de los genes humanos. Reportando que casi la totalidad (sobre el 93% de los sitios editados analizados) de los sitios editados correspondían a la transición A>I (G), catalizados preferentemente por ADAR1 y ADAR2. Este trabajo causó alta discusión entre distintos grupos de investigación, pues se argumentaba que la mayoría de los sitios reportados correspondían a artefactos o falsos positivos, propios de la transcripción de SNP's, o interpretaciones inadecuadas derivadas de la metodología utilizada<sup>84-89</sup>. Así, y de la mano de la implementación de nuevos *softwares* informáticos para poder discriminar falsos positivos, el grupo de investigación liderado por Jin Billy Li y colaboradores en el año 2013

<sup>86,90</sup>, corroboró -contrariamente a lo esperado- gran parte de los resultados encontrados con anterioridad e incrementó en 13.000 los sitios putativamente editados por ADAR1 y ADAR2. Adicionalmente, a fines del año 2013 el grupo de Wang y colaboradores <sup>91</sup> presenta los resultados del primer experimento de inmunoprecipitación de RNA asociado a secuenciación de RNA (RIP-seq) para ADAR1 y ADAR2, describiendo 4590 nuevos sitios de edición exclusivos para ADAR1 y 513 sitios editables de forma exclusiva por ADAR2, siendo el primer trabajo que demuestra que ADAR1 es un importante regulador de la expresión de los RNA blanco editados.

Al mismo tiempo, uno de los resultados más significativos de este trabajo es la demostración utilizando RNAseq y posterior validación por secuenciación convencional tipo Sanger de la edición en la región 3' UTR de ATM por ADAR1, sugiriendo que esta modificación afectaría su expresión. Finalmente este trabajo, mediante un análisis de enriquecimiento de vías de señalización, sugiere fuertemente que la edición de mRNA, mediada por ADAR1, presenta un enriquecimiento de genes asociados al control del ciclo celular <sup>91</sup>.

### **3.5. ADAR1 y su relación con el cáncer.**

La sobreexpresión de ADAR1 se ha descrito en diversos tipos de leucemias <sup>92</sup>, cáncer hepático <sup>93</sup>, melanoma <sup>94</sup>, cáncer esofágico escamoso<sup>95</sup>, carcinoma prostático <sup>96</sup> y el adenocarcinoma mamario <sup>97,98</sup>, relacionando su sobreexpresión con un aumento de la malignidad tumoral <sup>97,99,100</sup>. Sin embargo, pocos trabajos a la fecha han descrito una relación causal entre la sobreexpresión de esta proteína y el cáncer debido, en gran parte, a las dificultades técnicas asociadas a la pesquisa y validación de la edición del RNA.

Durante el año 2013 se publicó la primera relación causal entre el cáncer y la edición de transcritos mediada por ADAR1 <sup>95</sup>. En este trabajo se muestra una significativa sobreexpresión de ADAR1 en muestras tumorales de carcinoma esofágico escamoso, respecto a muestras controles y que esta proteína es capaz de editar en su región codificante a la proteína AZIN1, produciendo un cambio no sinónimo en la proteína

codificante la que tiene como resultado una disminución en su actividad, relacionada a la degradación de la ciclina D1 (CCND1). Estos cambios se asociaron a un descontrol en la proliferación celular, fenómeno demostrado tanto en modelos celulares como animales. Adicionalmente, un trabajo similar mostró una correlación inversa entre los niveles de expresión y/o actividad de ADAR1 en carcinoma hepático y la sobrevida de los pacientes <sup>93</sup>. Más aun, la sobreexpresión de ADAR1 se correlacionó con un mayor volumen tumoral en los modelos murinos utilizados y una mayor migración y viabilidad celular en las líneas celulares incluidas en este trabajo.

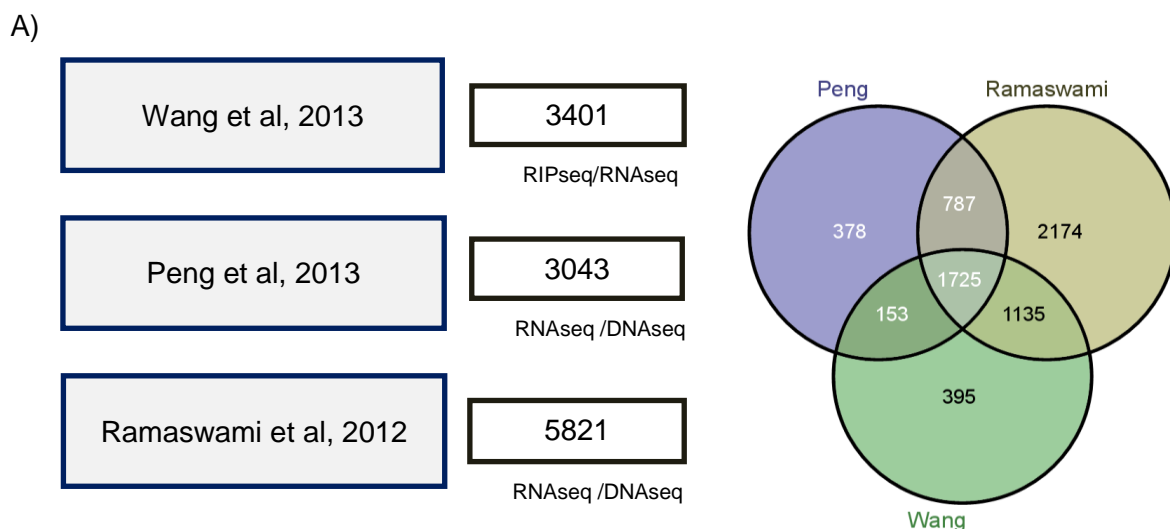
Por otro lado, recientemente se describió que existe una sobreexpresión significativa de ADAR1 en células madres cancerosas (CSC) derivadas de leucemia mieloide crónica <sup>92</sup>, correlacionando significativamente los niveles de mensajero de ADAR1 con la presencia de la translocación cromosómica t(9;22)(q34;q11) BCR-ABL (comúnmente conocida como cromosoma Filadelfia), fundamental para el desarrollo de esta enfermedad. Adicionalmente, en este estudio se describió que la sobreexpresión de ADAR1 en CSC leucémicas humanas promueve una mayor malignización de estas células y que su expresión correlacionaba de forma positiva con una menor sobrevida y mayor número de focos tumorales utilizando un modelo xenográfico murino.

Además, Shah y colaboradores (2009) analizaron mediante secuenciación masiva el DNA y RNA de 192 adenocarcinomas mamarios (112 tumores lobulares y 80 tumores ductales) con la finalidad de caracterizar las variaciones de un solo nucleótido presentes en los tumores respecto a un genoma de referencia (hg18) a alta resolución, encontrando un importante número de cambios en el RNA respecto a los nucleótidos de referencia del DNA secuenciado. Así, los autores encontraron 3122 variantes de un nucleótido, que comprometían a 1637 genes, sugiriendo cambios post transcripcionales que podrían afectar a las proteínas codificadas por de estos genes. De hecho, el estudio encontró 526 variaciones no sinónimas, 232 variaciones sinónimas y 2364 variantes en regiones del mRNA no traducibles (UTRs) e intrones. Estas discordancias entre el DNA de referencia y el mRNA secuenciado fueron atribuidas a ADAR1, dado que fue la única enzima capaz de modificar la secuencia del RNA que se encontró sobreexpresada en esta cohorte.

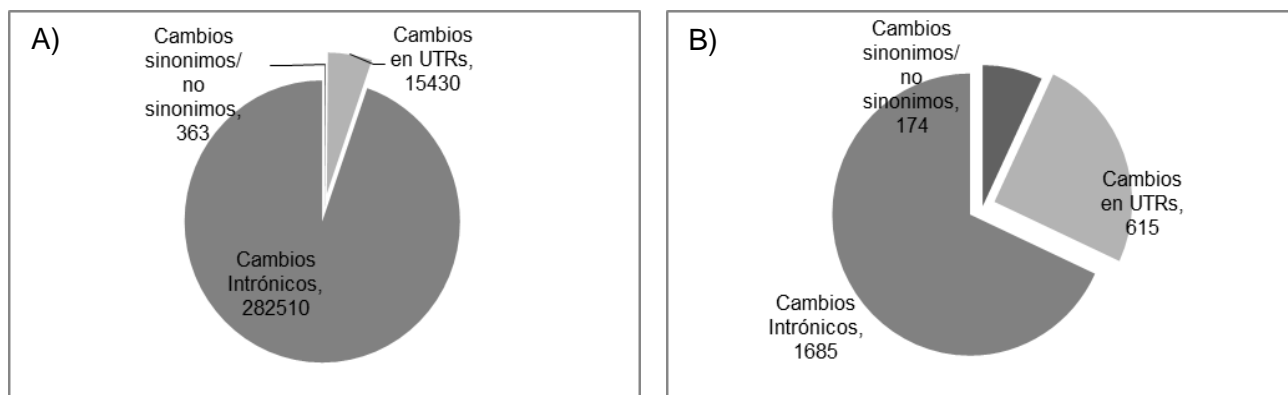
### **3.6. Rol de ADAR1 en la regulación del ciclo celular y la respuesta al daño al DNA.**

Si bien existe un considerable número de trabajos experimentales en los cuales se analiza la edición de genes mediada por ADAR, sólo en uno de ellos se ha intentado dilucidar si ADAR1 presenta una preferencia de edición sobre genes que pertenecen a ontologías o procesos celulares específicos<sup>84</sup>. En este sentido, nuestro laboratorio realizó un análisis comparativo de resultados obtenidos por los tres trabajos científicos más importantes de edición asociado a ADAR1<sup>83,84,89</sup> para obtener información relevante sobre posición de la edición en el genoma, región estructural del RNA editado y el nombre/identificador del gen editado para, finalmente, analizar si ADAR1 es capaz de editar preferentemente a un grupo de genes que agrupe a un tipo de ontología celular. Para ello, se analizaron los archivos suplementarios de estos trabajos y por medio de un diagrama de Venn se generó una lista de convergencia (Figura número 5) la cual contiene el identificador del gen, la posición de la edición registrada respecto a un genoma de referencia (hg19) y, por último, la región en la cual esta edición fue registrada. Así, se encontraron 298.403 sitios editados que fueron comunes a los 3 estudios. Estos sitios de edición involucran a 1.725 genes con una preferencia de edición en regiones intrónicas (282.510 sitios asociados), seguida de un significativo número de UTRs (15.430 sitios de edición), 671 genes y un pequeño número de ediciones en regiones codificantes (363 ediciones) que incluyen tanto cambios sinónimos como no sinónimos del RNA mensajero (Figura número 6).





**Figura número 5. Blancos editados por ADAR1.** En A) se muestran los blancos editados por ADAR1, de acuerdo a 3 diferentes trabajos, además de la intersección de genes incluidos en ellos, la cual presenta 1725 mRNAs blanco comunes entre estos estudios.



**Figura número 6. Edición de mRNA mediada por ADAR1 y enriquecimiento en regiones del mRNA.** En la A) se muestra el número de posiciones comprometidas en los 1725 genes seleccionados de acuerdo a la metodología mostrada en la figura número 5, identificando un número significativo de ediciones en regiones intrónicas y UTRs de los genes. Finalmente, en B) se muestra que 615 (615/1725) genes de esta lista presentan ediciones en UTRs, solamente 174 comprometen a ediciones en exónicas y 1685 genes presentan ediciones en sus intrones.

Además, esta lista de edición fue sometida a un análisis de enriquecimiento de vías de señalización y ontologías por medio de la utilización del software ClueGO (v2.1.5) y la base de datos DAVID (v6.7), el cual demostró que la edición mediada por ADAR1 presenta una significativa preferencia por genes asociados a los procesos de ciclo celular y respuesta al daño del DNA (Tablas número 2 y número 3). En particular, este grupo de genes está significativamente asociado a las ontologías de “fase S”, “ciclo celular”, “puntos de control del ciclo celular” e incluyen genes con amplio y reconocido impacto en la biología tumoral del cáncer de mama como BRCA2, ATR, ATM, MDM2, MDM4, FANCD2, TP53, RAD51, XRCC2, GINS1, GINS4, MCM8, ORC1 y ORC2. Estos resultados son concordantes con las observaciones presentadas por Zhang y colaboradores (2007), quienes describieron que la sobreexpresión de ADAR1 en células HeLa promueve la progresión del ciclo celular, aumentando la proporción de células en fase G<sub>1</sub>-S respecto a células controles, por medio de un aumento en la expresión de ciclina E<sup>101</sup>.

<b>Pathways associated to ADAR1 target genes (Reactome db)</b>		
<b>GOTerm</b>	<b>PValue</b>	<b>PValue Corrected with Bonferroni</b>
Cell Cycle	4.82E-17	8.19E-16
Cell Cycle, Mitotic	8.32E-15	1.33E-13
M Phase	7.51E-13	1.13E-11
Mitotic Anaphase	2.29E-12	3.20E-11

**Tabla número 2. Blancos editados por ADAR1 y ontologías asociadas de los blancos.**

Tabla resumen donde se muestran las ontologías asociadas a la lista de genes blancos de ADAR1 (*Reactome db, pathway ontology analysis*).

---

**Pathways associated to ADAR1 edited genes (Reactome db) in UTRs**

---

<b>GOTerm</b>	<b>Nr. Genes</b>	<b>Term PValue</b>
Cell Cycle Checkpoints	9	0.00131455
Cell Cycle	21	0.00335651
Mitotic G <sub>1</sub> -G <sub>1</sub> /S phases	8	0.00804763
Generic Transcription Pathway	17	0.00945575

---

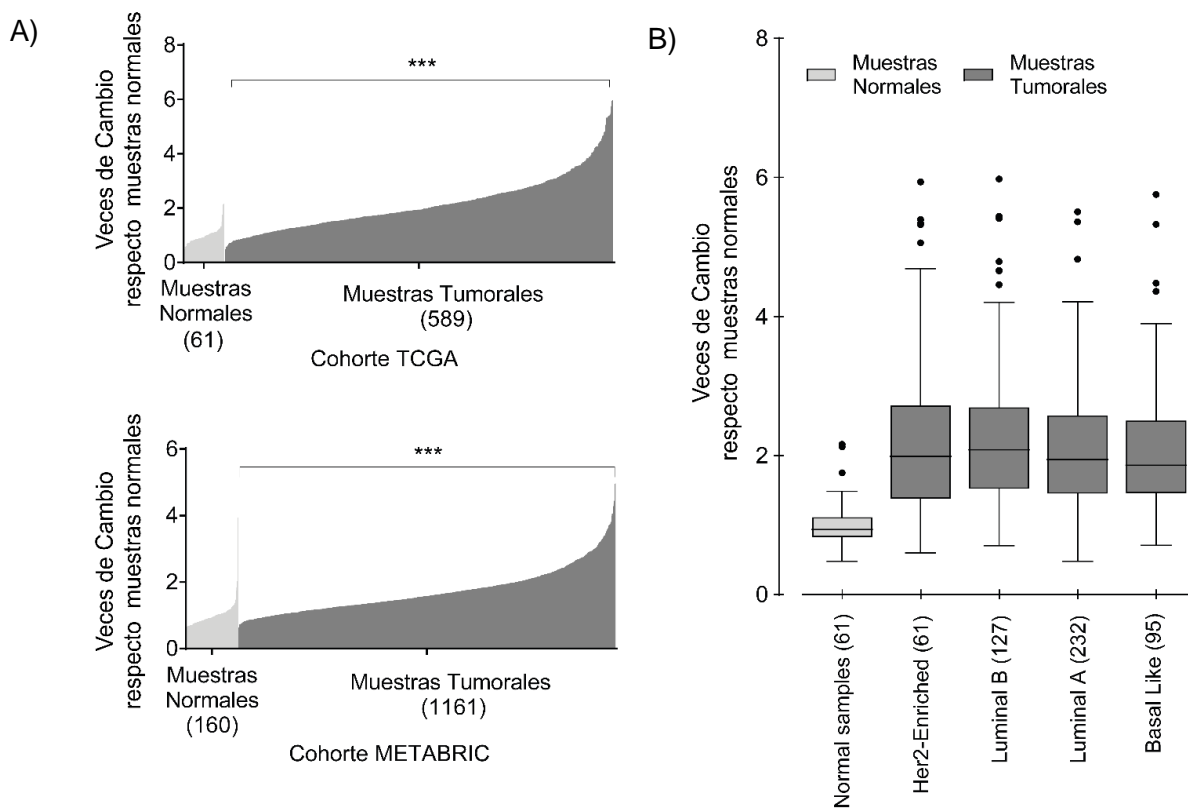
**Tabla número 3. Blancos editados por ADAR1 y ontologías asociadas de los blancos.**

La tabla muestra las ontologías asociadas a la lista de mRNAs editados por ADAR1 en los UTRs, previo a la validación de estos mRNAs en la base de datos RADAR db (*Reactome db, pathway ontology analysis*).

**3.7. ADAR1 y cáncer de mama.**

Recientemente, el consorcio The Cancer Genome Atlas (TCGA) de los Estados Unidos puso a disposición de la comunidad científica la gran mayoría de los datos generados por el proyecto, para su análisis independiente. Estos datos incluyen la caracterización molecular de los pacientes, datos epigenéticos, perfiles de expresión y secuenciación de RNA mensajero (mRNA), aberraciones genéticas y genómicas y perfiles de expresión de mRNA para 593 pacientes con adenocarcinoma mamario bajo la plataforma de microarreglos y 1214 pacientes analizados bajo la plataforma de RNase; constituyendo la mayor fuente de información científica a nivel mundial asociada a la enfermedad. Asimismo, el Consorcio Europeo Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium (METABRIC) ha puesto a disposición de la comunidad los datos de expresión génica generados por ellos, correspondientes a 1161 pacientes con adenocarcinoma mamario analizados por medio de microarreglos.

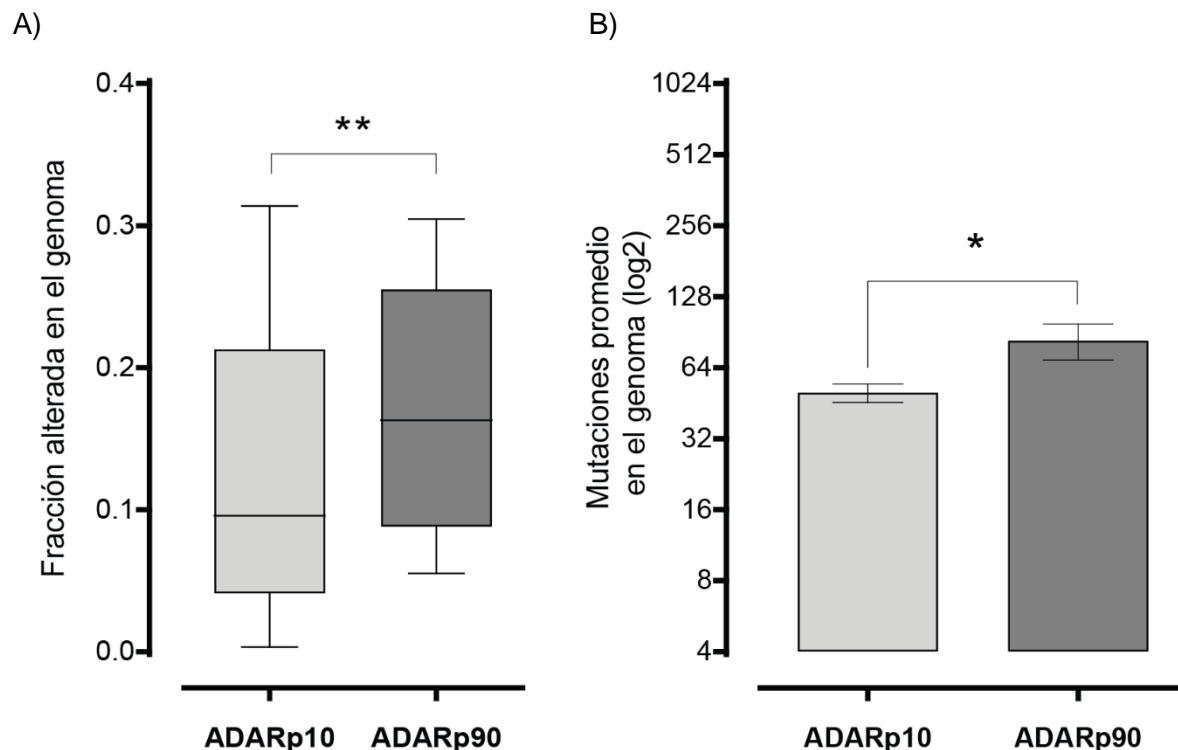
Utilizando esta información, se realizó un análisis bioinformático *de novo* con la finalidad de encontrar nuevos blancos asociados a la progresión del cáncer de mama, encontrando a ADAR1 entre los genes mayormente sobreexpresados (dentro del 1% mayormente sobreexpresado), el cual presentó una expresión en promedio 2.5 veces mayor en las muestras tumorales, respecto a las muestras controles incluidas en ambas cohortes (Figura número 7A). Así también, el resultado del análisis de microarreglos de TCGA, sugiere que la sobreexpresión de ADAR1 es transversal a todos los subtipos moleculares de esta enfermedad (Figura número 7B).



**Figura número 7. ADAR1 se encuentra sobreexpresado en muestras de pacientes con adenocarcinoma mamario.** A) Distribución de valores de expresión de ADAR1 en las cohortes TCGA y METABRIC. B) veces de cambio de la expresión de ADAR1 para los distintos tipos moleculares (PAM50) de cáncer de mama, respecto a muestras controles (TCGA, microarreglos). T-Test de 2 vías. \*\*\* $< 0.001$ . Cajas y bigotes con distribución de Tukey.

Por otro lado, al correlacionar la expresión de ADAR1 con la tasa de aberraciones genómicas de los tumores de pacientes de la cohorte TCGA, aquellos tumores que sobreexpresan ADAR1 -que pertenecen al decil con mayor expresión de ADAR1- presentan un incremento significativo de 1,4 veces en el índice aberraciones cromosómicas, según el índice GISTIC, el cual es calculado como la ocurrencia de ganancia o pérdida de segmentos cromosómicos en un conjunto de muestras tumorales (Figura número 8A). Adicionalmente a estos resultados, pacientes de esta cohorte con una mayor expresión de ADAR1 poseen un mayor número de mutaciones presentes en su genoma, comparado a pacientes con cáncer con una baja expresión de ADAR1 (Figura número 8B). Sugiriendo así, que ADAR1 podría estar involucrado en la acumulación de mutaciones y la estabilidad genómica de los pacientes con cáncer de mama de la cohorte TCGA.

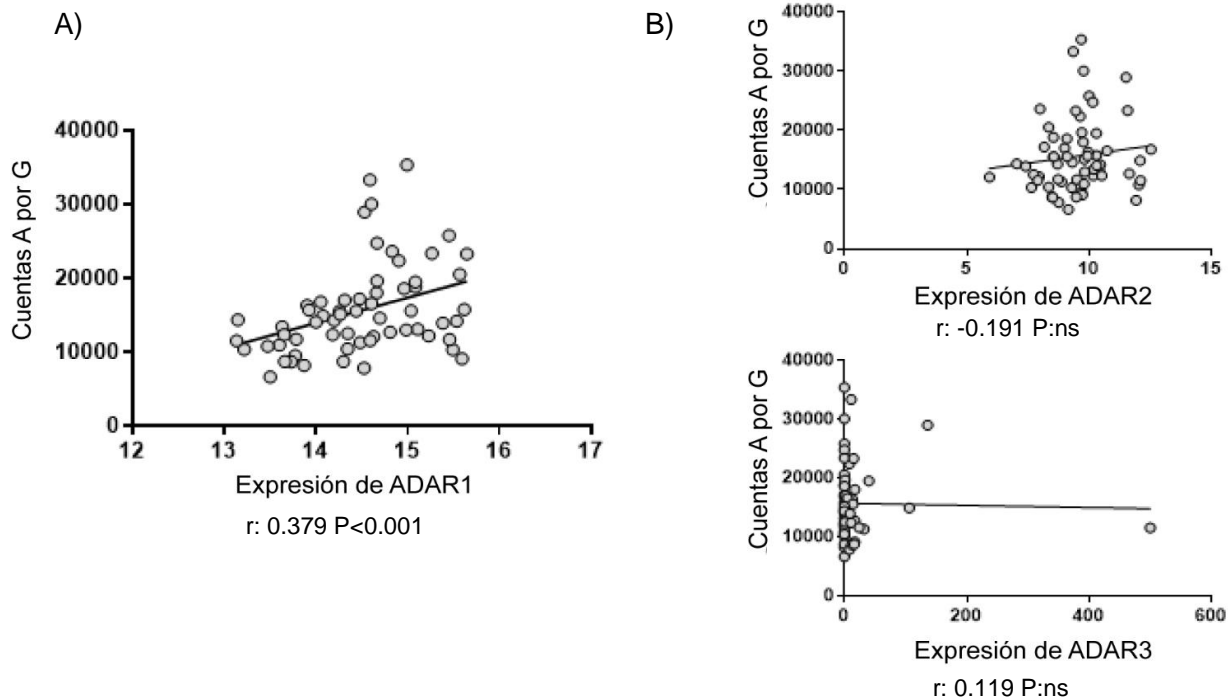
Por otro lado, se realizó un análisis de expresión diferencial y llamado de variantes en el RNA de 83 líneas celulares mamarias, 79 de ellas derivadas de pacientes con la enfermedad y 4 líneas celulares no tumorales inmortalizadas. Para esto, se utilizaron los archivos primarios de la secuenciación de RNA (.fastq) depositados en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO, PRJNA297219, Marcotte y colaboradores (2016)). Los resultados derivados de nuestros análisis bioinformáticos, indican que existe una gran dispersión en la expresión de ADAR1 a lo largo de las líneas celulares. No obstante, la media de expresión del mensajero de ADAR1 en las líneas celulares tumorales es significativamente mayor que las líneas celulares controles (Figura anexa número 1).



**Figura número 8. La expresión de ADAR1 se asocia al número de mutaciones/aberraciones cromosómicas presentes en pacientes con cáncer de mama.** En A) se muestra la proporción de aberraciones cromosómicas (GISTIC). En gris se muestran aquellos pacientes que presentan una baja expresión de ADAR1, siendo seleccionados el percentil 10 inferior (decil inferior N=110). Mientras que en gris oscuro se muestran aquellos pacientes con una mayor expresión de ADAR1 (decil superior N=110). La Figura B) muestra la proporción de mutaciones encontradas para estos pacientes con cáncer de mama de la cohorte TCGA, segregados por sus deciles superior e inferior. \* $<0.05$ ; \*\* $<0.001$ , T-test de dos vías. A) Cajas y bigotes con distribución de Tukey. B) Gráfico de barras mostrando media +/- SEM.

De forma concordante con los resultados encontrados para los pacientes con cáncer de mama de la cohorte TCGA, las 80 líneas celulares tumorales analizadas presentan una sobreexpresión transversal, independiente de su caracterización PAM50, respecto a las líneas celulares controles, mostrado en la Figura anexa número 1. Además, el análisis de variantes en el RNA, encontró un enriquecimiento de las transiciones A > I (G) en un número significativo de líneas celulares tumorales, las cuales sólo correlacionan

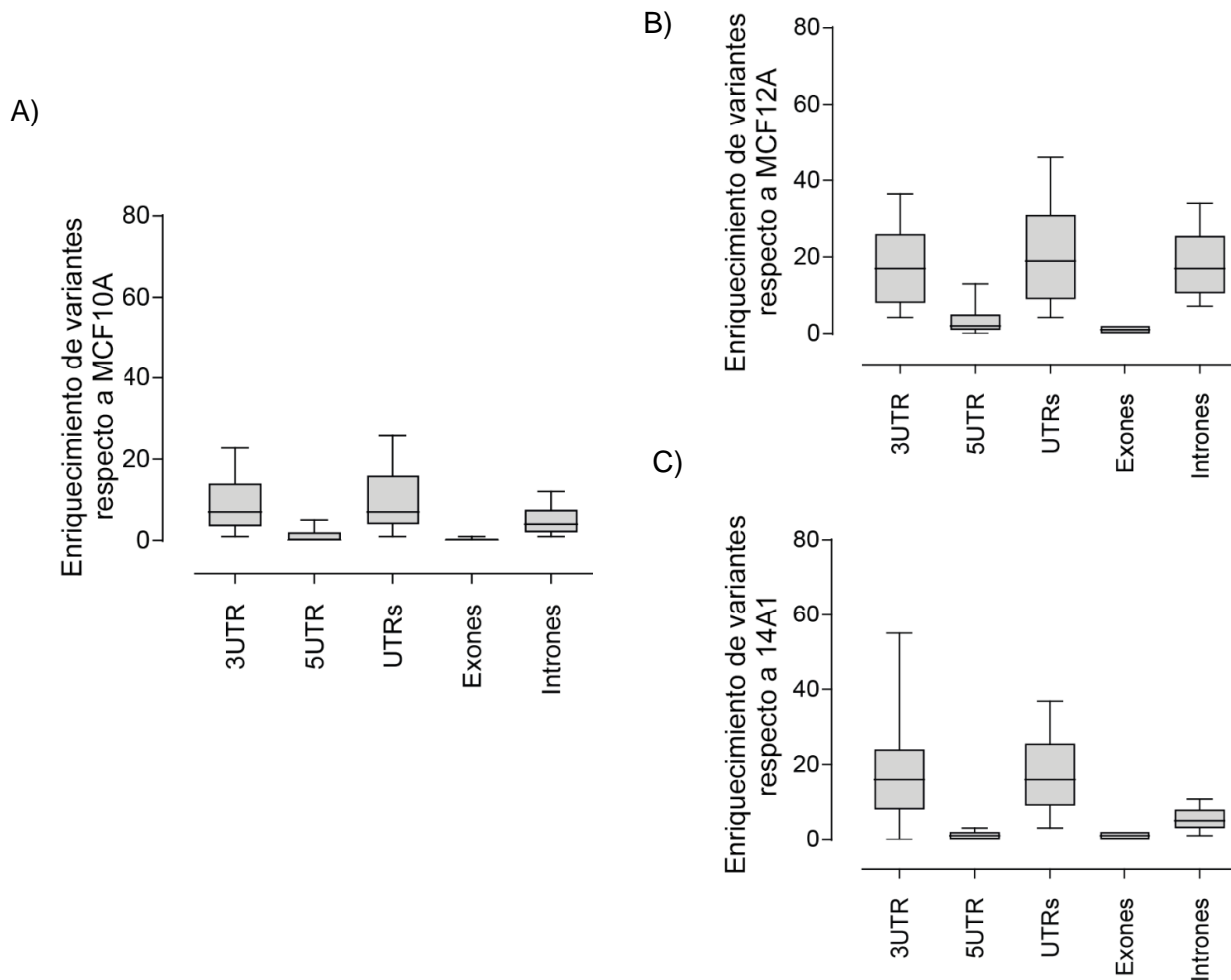
de forma significativa con la expresión de ADAR1 y no con las otras isoformas de ADAR, como se muestra en la Figura número 9.



**Figura número 9. Correlación de la expresión de ADAR y las variantes A por G encontradas en líneas celulares de mama.** A) Correlación entre la expresión de ADAR1 y el número de variantes A > G encontradas en las líneas celulares, provenientes del proyecto PRJNA297219. B) Correlación de la expresión de ADAR2 (arriba) y ADAR3 (abajo) con el número de variantes A > G de cada línea celular. ns: sin diferencias significativas.

Finalmente, al comparar las variantes comunes entre los modelos tumorales y controles presentes en el proyecto PRJNA297219, sólo se encontraron diferencias significativas en las fracciones alternativas de aquellas variantes presentes en regiones no traducibles. Vale decir, existe un enriquecimiento -exclusivo- de los mensajeros editados en las regiones UTRs y regiones intrónicas en las líneas tumorales, comparado a las 3 líneas inmortalizadas presentes en este estudio, como se muestra en la Figura número 10, lo cual sugiere que ADAR1 al estar sobreexpresado en los diversos tipos tumorales, podría

modular cambios en la estabilidad y/o expresión de los mRNAs, generando cambios fenotípicos, mediante ediciones en las regiones UTR de los transcritos editados.



**Figura número 10. Comparación de variantes A por G entre líneas celulares tumorales y líneas celulares inmortalizadas del proyecto PRJNA297219 y su distribución a través de distintas regiones del RNA.** La figura muestra el número de variantes que presentan una cobertura significativamente mayor en las líneas tumorales (mayor a un 25% de diferencia en la profundidad asignada a la variante alternativa) en comparación a las líneas celulares inmortalizadas, así como su distribución a través de las distintas regiones del mRNA, donde se incluyeron las regiones 3'UTRs, 5'UTRs, la suma de ellos (UTRs), exónes e intrones. En A) se presenta la comparación respecto a la línea celular inmortalizada MCF10A, en B) la línea celular inmortalizada MCF12 y finalmente en C) se muestra esta distribución para el modelo celular 14A1. Cajas y bigotes con distribución de Tukey.



Así, y en su conjunto, los antecedentes derivados del análisis de las cohortes de pacientes con cáncer de mama y líneas celulares de mama muestran un aumento significativo en la expresión de ADAR1 en esta enfermedad, sugiriendo además un aumento significativo en las ediciones de los RNAs blanco. Además, el análisis preliminar de blancos editados por esta enzima muestra un enriquecimiento significativo de mRNAs editados asociados a los procesos de replicación del DNA y control del ciclo celular, sugiriendo que un desbalance en las ediciones de estos mRNAs, podría afectar su estabilidad y/o expresión, promoviendo la desregulación del ciclo celular y el proceso replicativo, teniendo un profundo impacto en la progresión del cáncer de mama.

#### **4. Hipótesis.**

La enzima ADAR1 regula la estabilidad de los mRNAs de genes que participan en la respuesta al daño del DNA y puntos de control del ciclo celular, promoviendo el estrés replicativo y la proliferación celular en adenocarcinoma mamario.

#### **5. Objetivo General.**

Determinar el rol de ADAR1 en genes asociados a los procesos de respuesta al daño del DNA y control del ciclo celular; y caracterizar su efecto en el estrés replicativo y proliferación en el adenocarcinoma mamario.

#### **6. Objetivos Específicos.**

##### **I. Objetivo Específico 1.**

Analizar el efecto de la expresión de ADAR1, en la expresión y estabilidad de los mRNAs de genes asociados a los procesos de respuesta al daño del DNA y control del ciclo celular en las líneas celulares MCF-7 y ZR-751.

##### **II. Objetivo Específico 2.**

Determinar el efecto de la expresión de ADAR1 sobre el estrés replicativo en las líneas celulares MCF-7 y ZR-751.

##### **III. Objetivo Específico 3.**

Evidenciar el efecto de la expresión de ADAR1 sobre la proliferación en las líneas celulares MCF-7 y ZR-751.

##### **IV. Objetivo Específico 4.**

Analizar la expresión de ADAR1 y la edición de mRNAs de genes que participan en los procesos de respuesta al daño del DNA y control del ciclo celular en pacientes con adenocarcinoma mamario.

## **7. Material y Métodos.**

### **7.1. Cultivo celular.**

Para el desarrollo de la presente tesis doctoral se utilizaron los siguientes modelos celulares comerciales:

- Células de cáncer de mama MCF-7, originalmente obtenida a partir de un carcinoma in situ, de subtipo molecular luminal, expresan p53, receptor de Estrógenos y de progesterona.
- Células de cáncer de mama ZR-751, originalmente obtenidas de una metástasis acinar, es de tipo luminal y expresa receptor de estrógenos y de progesterona, posee una delección parcial de p53 y se caracteriza por una alta tasa proliferativa.
- Células mamarias epiteliales no tumorigénicas MCF10A, originalmente obtenidas de un tejido mamario normal, de una paciente con fibrosis quística. Se caracteriza por expresar p53 y poseer una baja tasa proliferativa.
- Células HeLa Flp-In T-REx ADARp110-GFP, las que fueron generadas en colaboración con el laboratorio del Dr. Alfredo Castelló (Universidad de Oxford). Este modelo celular permite la expresión inducible mediante el uso de doxiciclina de la proteína ADARp110 fusionada a una proteína GFP.

Todos los modelos antes señalados fueron obtenidos desde el repositorio ATCC, almacenados y expandidos bajo condiciones estándar, según recomendaciones del repositorio.

Las células MCF7 y todos los modelos utilizados derivados de esta línea celular, fueron cultivados en DMEM-LOW/F-12 (Corning) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) (Corning) y penicilina/estreptomicina (100 unidades/mL) (Thermo Scientific).

Las células MCF10A fueron cultivados en DMEM-LOW/F-12 (Corning) suplementado con 10% suero fetal equino (Corning), penicilina/estreptomicina (100 unidades/mL) (Thermo Scientific), insulina (10 ng/mL) (SIGMA), epidermal growth factor (EGF) (10 ng/mL) (R&D) e hidrocortisona (0,5 µg/mL) (SIGMA).

Las células ZR-751 y todos los modelos derivados de esta línea celular, fueron cultivados en RPMI-1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) y penicilina/estreptomicina (100 unidades/mL) (Thermo Scientific).

Las células HeLa Flp-In T-REx fueron cultivadas en DMEM-High, suplementado al 10% con SFB (Corning) y penicilina/estreptomicina (100 unidades/mL) (Thermo Scientific). La inducción de ADAR1 en este modelo fue realizada utilizando 1 µg/mL de Doxiciclina (US-Biological).

## **7.2. Transducción lentiviral y transfección.**

$1.5 \times 10^5$  células MCF7 y ZR-751 WT (*wild type*) fueron sembradas en placas de 24 pocillos durante 24 h. Posteriormente, los vectores lentivirales comerciales pre-empacados, pLenti shRNA-ADAR1 y pLenti shRNA *scrambled* (GeneTarget) fueron diluidos en medio celular completo suplementado con polibreno (Sigma-Aldrich-Aldrich) (concentración final de 5µg/mL). Una vez preparadas las partículas lentivirales, se realizó la transducción lentiviral utilizando un número de unidades equivalente a MOI: 5. Veinte y cuatro horas post-transducción, se reemplazó el medio celular con medio fresco completo, incubando por 24 h más. Finalmente, las células transducidas fueron seleccionadas con puromicina a una concentración final de 2 µg/mL (Invitrogen) durante 2 semanas, hasta obtener células resistentes a este antibiótico. Además, las células transformadas con estas partículas virales expresan la proteína RFP como marcador de seguimiento, las que fueron

sometidas a un procedimiento de *sorting* (FASCARIA, Facultad de Medicina, Universidad de Chile). De esta manera, se generaron líneas celulares estables, ZR-751 SHADAR1 y ZR-751 SHC, MCF7 SHADAR y MCF7 SHC. La disminución de la expresión de ADAR1 en las células *knock down*, junto con la expresión de ADAR1 en células SHC, fue determinada a través de RT-qPCR y western blot, para luego ser comparada con la expresión en células WT.

### **7.3. Extracto proteico a partir de células en cultivo.**

Para la obtención de extractos celulares totales, las células fueron incubadas por tres minutos en hielo y buffer de lisis (20mM Tris-HCl pH 7.5, 140mM NaCl, 1% Triton x100, 0.1% desoxicolato de Sodio), más un cóctel de inhibidores de proteasas (Calbiochem) y fosfatasa (Roche). Posteriormente, las células fueron raspadas de la placa de cultivo utilizando un rastrillo, facilitando el lisado celular, el cual fue homogeneizado mediante pipeteo, centrifugado a 4°C, alicuotado y guardado a -80°C. La contracción de proteínas fue determinada por medio del reactivo Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) y la lectura de absorbancia fue realizada en el equipo Cytation 3 (BioTek Inc).

### **7.4. Western Blot.**

Los inmunoblot fueron realizados utilizando procedimientos estándares. Brevemente, los extractos proteicos fueron diluidos en buffer Laemmli 5X (Biorad), con  $\beta$ -mercaptoetanol (Winkler), hasta una cantidad de 40  $\mu$ g de proteína por muestra, y separados electroforéticamente a través de SDS-PAGE al 10%. Posteriormente, se realizó la transferencia húmeda de las proteínas del gel de electroforesis a la membrana de nitrocelulosa, por 1 h y 15 minutos a 100 Volt. Al terminar la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con BSA al 5% en buffer TBS-Tween 20 (Winkler) (0.01%), por 1 h a temperatura ambiente.

La detección de las proteínas específicas se realizó utilizando los siguientes anticuerpos primarios: Ratón Anti-ADAR1 (Cell Signaling); ratón Anti-ATR (Cell Signaling), conejo Anti-fosfo-ATR (S428) (Cell Signaling), ratón anti-CHEK1 (Cell Signaling), ratón anti-CHEK2 (Cell Signaling), ratón anti-fosfo-CHEK1 (S345) (Cell Signaling), conejo anti-fosfo-CHEK2 (T68) (Cell Signaling), conejo anti-fosfo-ATM (S1981) (Cell Signaling), conejo anti-ATM (Cell Signaling), conejo Anti-fosfo-p53 (S15) (Cell Signaling), ratón anti-p53 (Cell Signaling), ratón anti-Ciclina D1 (Cell Signaling), ratón Anti- $\gamma$ H2AX (Millipore), ratón anti-BrdU (BD), rata anti-BrdU (Santa Cruz).

Como control de carga, se utilizó anti- $\alpha$ -Tubulina (ratón, Sigma-Aldrich), anti-HSP70 (ratón, Origene) o ratón anti Actina (Sigma-Aldrich). Todos los anticuerpos primarios fueron incubados toda la noche a 4°C y, posteriormente, detectados mediante anticuerpos secundarios apropiados conjugados con HRP y utilizando el reactivo de quimioluminiscencia (WestPico, SuperSignal™, Pierce). Las imágenes de cada uno de los inmunoblots fueron adquiridas en el fotodocumentador ChemiScope3500 Mini Chemiluminescence Imaging System (Clinx Science). Finalmente, el análisis densitométrico se realizó en el programa Image Studio™ Lite (LI-COR). Normalizando la señales obtenidas para cada inmunoblot por la correspondiente señal de su control de carga.

## **7.5. Inmunofluorescencia Indirecta y análisis.**

Las células fueron cultivadas en cámaras Lab-Tek® II CC2™ Chamber Slide™ (Thermo Scientific), hasta alcanzar una confluencia del 60-70 %, lavadas con PBS 1X a 4°C y fijadas en para-formaldehído 4%. Posteriormente fueron permeabilizadas con Tritón x-100 (0.1%), bloqueadas con BSA 3%, e incubadas 1 h a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos primarios específicos: Anti-ADAR (Cell Signaling) y Anti- $\gamma$ H2AX (Millipore). Posteriormente, fueron lavadas con PBS 1X y se realizó la incubación con los anticuerpos secundarios fluorescentes (Thermo Scientific) en cámara oscura. Finalmente,

los preparados fueron montados en el reactivo Prolong-DAPI (Thermo Scientific P36934) y visualizadas en microscopio confocal (DSU-IX81 Spinning Disc Confocal, Olympus).

Las imágenes obtenidas en formato *.TIFF*, fueron analizadas en el programa ImageJ. En cada preparado (3 por condición) se seleccionaron 5 campos y en ellos se escogieron de 10 a 20 células. Se dibujó el contorno del núcleo utilizando el canal DAPI, y usado como plantilla para el canal RED. Posteriormente, en el menú de herramientas “Set Measure” se eligieron los parámetros “AREA”, “INTEGRATED DENSITY” y “MEAN GRAY VALUE”. Seguidamente, se seleccionó en el menú de herramientas “Measure”. Procedimiento similar se realizó dibujando el contorno celular sin incluir el núcleo. Además, se midieron 3 regiones por campo sin células, lo que fue considerado como señal “Ruido”. Posteriormente en un archivo Excel se ordenaron los datos de: AREA, INTEGRATED DENSITY y “MEAN GRAY VALUE”, y se utilizó la siguiente fórmula para obtener la intensidad de fluorescencia corregida (FC):  $FC = \text{Integrated Density} - (\text{Area of selected cell} \times \text{Mean fluorescence of background readings})$ . Finalmente la fluorescencia corregida del núcleo (FCN), fue dividida por la fluorescencia corregida de la célula (FCC), FCN/FCC y el valor obtenido fue graficando en GraphPad Prisma6 para su análisis.

## **7.6. Ensayo de Fibras de DNA.**

Las células ZR-751 SHC y SHADAR fueron sembradas hasta alcanzar un 70% de confluencia y posteriormente suplementadas con medio completo y 25  $\mu\text{M}$  de cloro-desoxiuridina (CldU) (Santa Cruz) durante 25 minutos. Luego, el medio fue removido y las células fueron lavadas dos veces para ser incubadas con medio completo con 250  $\mu\text{M}$  de Yodo-desoxiuridina (IdU) (Santa Cruz) durante otros 25 minutos. Una vez realizados ambos pulsos, las células fueron lavadas con DPBS dos veces, tripsinizadas y centrifugadas. A continuación, fueron resuspendidas en 1 mL de DPBS fresco y contadas utilizando el contador automático de células LUNA (Logos Biosystems). Luego, 3  $\mu\text{l}$  de suspensión celular fue depositada en un portaobjeto cargado positivamente (VWR super frost 48311-703) y se agregó sobre esta gota 7  $\mu\text{l}$  de solución de lisis (200 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM EDTA, 0.5 (v/v) % SDS) la cual fue incubada a temperatura ambiente durante

5 minutos; una vez realizada la incubación, los portaobjetos fueron colocados 25° respecto al mesón de trabajo para que la suspensión pudiera recorrer la totalidad del portaobjeto. Una vez que la gota recorriera la totalidad del vidrio esta se fijó utilizando Metanol: Ácido Acético (3:1) durante 20 minutos, lavada 3 veces y denaturada con HCl 2.5 M durante 1 h. Luego, los portaobjetos fueron lavados 3 veces en PBS y se realizó el bloqueo con 5% BSA/Tween 20 (0.1% V/V) durante 40 minutos. Finalmente, los portaobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios, anti CldU (1:400) y anti IdU (1:250) durante 16 h a 4°C. Posterior a 3 lavados en DPBS tres veces durante 5 minutos cada uno, se incubó con los anticuerpos secundarios Alexa 594 anti ratón y Alexa 488 anti rata. Una vez agregados los anticuerpos secundarios, estos fueron incubados durante 1 h a 4°C y posteriormente retirados, tras 3 lavados con DPBS por 5 minutos. Los portaobjetos, finalmente fueron montados utilizando Prolong Diamond Antifade Mountant® (Invitrogen) con DAPI. Siendo dejadas las placas a -20°C para su posterior análisis. Los portaobjetos fueron visualizados en un microscopio fluorescente BX53 (Olympus) utilizando un objetivo 60X (APOPLAN OIL) y el software Ocular (Q-Imaging), utilizando 300 ms de exposición para la visualización del canal FITC (488 nm) y 150 ms de exposición para el canal correspondiente a T-REX (594 nm). Posteriormente, las fibras fueron contadas y analizadas utilizando Image-J de acuerdo al protocolo publicado por Nikolova y colaboradores (2017).

### **7.7. Ensayo de timidina terminal, TUNEL.**

El ensayo TUNEL, fue realizado en células ZR-751 SHC y SHADAR. Para ello las células fueron cultivadas en cámaras Lab-Tek® II CC2™ Chamber Slide™ (Thermo Scientific), hasta alcanzar una confluencia del 60-70 %, lavadas con PBS 1X a 4°C y fijadas en para-formaldehído 4%. Posteriormente, fueron permeabilizadas con Tritón x-100 (0.1%) y bloqueadas con BSA 3%, para continuar con el protocolo de “DeadEnd fluorimetric TUNEL assay system”, de acuerdo a las condiciones del fabricante (Promega). Brevemente, las células fueron incubadas con una solución equilibrante para finalmente realizar la adición de la timidina terminal fluorescente. Luego, el exceso de timidina terminal fluorescente fue lavado con DPBS y el portaobjeto fue montado como se



describió anteriormente. Las imágenes fueron procesadas como se señaló anteriormente para  $\gamma$ H2AX.

### **7.8. Ensayo de proliferación celular.**

Para evaluar la proliferación celular, se utilizó el kit Cell-Titter 96 AQueous - MTS (Promega) en células ZR-751 SHADAR1, ZR-751 SHC, MCF7 SHC y MCF7-ADAR1. Las células, fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una cantidad de  $5 \times 10^3$  células. Tras 24 h, se utilizó el reactivo MTS para realizar mediciones de absorbancia a las 24, 48 y 72 h de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las mediciones de absorbancia a 490 nm fueron realizadas con el equipo Cytation 3 (BioTek Inc).

Adicionalmente, la viabilidad celular de células ZR-751 SHC, ZR-751 SHADAR, MCF7 SHC y MCF7 SHADAR fue evaluada por medio del reactivo Azul de tripán (Corning). Células fueron sembradas en placas de 60 mm y 48 h después tripsinizadas y contadas utilizando el equipo LUNA (Logos Biosystems), cada medición fue realizada en duplicado técnico y fue realizada al menos 8 oportunidades, para cada modelo celular.

### **7.9. Evaluación del ciclo celular.**

Para evaluar la distribución del ciclo celular, las células fueron tripsinizadas, fijadas con etanol 80% y teñidas con  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  de ioduro de propidio (PI) en presencia de  $10 \mu\text{g}$  DNase-free RNase A (MN GmbH & Co) por mL, según Marcelain y Hayman (2005). Los perfiles del ciclo celular fueron determinados por FACS (BD Bioscience) y los datos analizados en el programa BD FACSDiva. Seguidamente, fueron realizados experimentos para evaluar la síntesis de DNA por medio de la técnica de incorporación de BrdU en células ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR. Para ello, estas células fueron incubadas durante 45 minutos con  $10 \mu\text{M}$  de IdU, tripsinizadas, y permeabilizadas utilizando metanol 100%. Posteriormente, las muestras fueron denaturadas utilizando HCl/0.5% Triton X-100 durante 30 minutos e inmediatamente incubadas con tetraborato de sodio 0.1 M (Borax),

para, finalmente, ser lavadas con DPBS EDTA 0.5 mM. Una vez realizado este procedimiento, fueron incubadas durante 16 h en oscuridad con el anticuerpo primario ratón Anti-BrdU FITC (50  $\mu$ l 0.5% TTBS, 10  $\mu$ L anticuerpo primario y 5  $\mu$ L RNase A (10 mg/mL). Luego, las células fueron centrifugadas, para posteriormente retirar el sobrenadante y ser resuspendidas en 200  $\mu$ l DPBS 0.5 mM EDTA. 10 minutos antes de ser procesadas para su análisis por FACS (BD Bioscience, Fundación Ciencia y Vida). , se agregó 20  $\mu$ g/mL de ioduro de propidio (PI), incluyéndose controles sin marca del anticuerpo primario, anticuerpo sin marca fluorescente, además de células sin marca de ioduro de propio (PI) para cada condición analizada.

### **7.10. Ensayo de apoptosis.**

$10 \times 10^4$  células ZR-751 SHC y SHADAR fueron cultivadas en placas de 24 pocillos. Transcurridas 24 h se realizó el ensayo luminiscente Caspase-Glo® 3/7 (Promega) para determinar de manera indirecta la actividad enzimática de las caspasas 3 y 7. A continuación, se midió la luminiscencia generada, según instrucciones del fabricante, en placas de 96 pocillos blancas, utilizando el equipo Cytation 3 (BioTek Inc).

### **7.11. Ensayo reportero.**

El ensayo reportero fue realizado utilizando el protocolo descrito por Armisen & colaboradores<sup>105</sup>. Brevemente, células ZR-751 SHADAR y SHC fueron co-transfectadas con 0.5  $\mu$ g del plásmido pRL-Renilla (Promega) y 1  $\mu$ g del plásmido pGL3-p21 utilizando lipofectamina 3000 (Invitrogen), según instrucciones del fabricante. 24 h después de la transfección, la luminiscencia generada por la actividad enzimática de Renilla y Luciferasa derivada de los plásmidos pRL-Renilla y pGL3-TP21, respectivamente, fue analizada utilizando el reactivo Dual-Glo Luciferase system (Promega) acorde a las instrucciones del fabricante, en el equipo Cytation 3 (BioTek Inc).

### **7.12. qRT-PCR.**

Se realizó la extracción de RNA total utilizando el reactivo Trizol (LifeTech), seguido del tratamiento con DNasa (TURBO DNase, Ambion), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A continuación, se cuantificó el RNA en un espectrofotómetro (Take 3, Cytation BioTek Inc) y se sintetizó cDNA a partir de 1 µg de RNA. Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit AffinityScript cDNA Synthesis Kit (Agilent) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, utilizando 1.75 µL de Oligo dT y 0.25 µL de Random Primers por reacción. El análisis semi-cuantitativo de la expresión génica fue realizado mediante la utilización del partidores específicos y el kit Brilliant II SYBR Green qRT-PCR Master Mix (Agilent). Para la reacción se utilizó el termociclador EcoRealttime (Illumina), en 35 ciclos utilizando una temperatura de denaturación de 95°C, temperatura de annealing de 58°C y temperatura de elongación de 72°C. Los resultados fueron expresados en veces de cambio respecto a muestras controles, utilizando el  $\Delta\text{Ct}$  entre el gen de interés y el gen ACTB (Actina), como fue descrito por Paffi, 2001.

### **7.13. Transfección transitoria de ADAR1.**

Células MCF7 WT fueron transfectadas con 1 µg del plásmido RC219761 (Origene), el cual codifica para la variante p110 de ADAR1, o bien con el plásmido M13-EGFP (Genecopoeia) como control de transfección, utilizando lipofectamina 3000 (Invitrogen), según instrucciones del fabricante. 16 h después de la transfección, fueron suplementadas con medio completo por 8 h para finalmente realizar experimentos posteriores.

#### **7.14. Ensayo para la evaluación de sitios específicos editados en el RNA (RESS-qPCR).**

Para analizar los niveles de edición de transcritos mediados por ADAR1 en los modelos celulares utilizados en este trabajo, se utilizó la técnica RESS-qPCR para dos transcritos descritos como blancos de ADAR1. Para ello se utilizaron 2 juegos de partidores para amplificar una región susceptible a edición por ADAR1 para las posiciones (hg19) chr8:103841636 de AZIN1 (incluida en un exón de este mRNA) y la posición chr12:69237534 del 3' UTR del mensajero de MDM2. Un juego de estos partidores amplifica la fracción *wild type* o no editada por ADAR1, mientras que el otro juego de partidores presenta 3 pares de base distintas cuya finalidad es amplificar la fracción del mensajero editado putativamente por ADAR1. Después, ambas fracciones fueron comparadas y normalizadas por la expresión de un gen housekeeping, según lo descrito por Crews y colaboradores (2015). Como control positivo del uso de esta técnica, se transfectaron células ZR-751 *wild type* con un vector codificante para la variante corta de ADAR1 (ADAR1 p110, Origene) o un vector control eGFP (Genecopoeia).

#### **7.15. Ensayo de inhibición de la transcripción.**

Células ZR-751 SHC y SHADAR fueron sembradas hasta obtener un 70% de confluencia y, posteriormente, fueron tratadas con Actinomicina D (3 µg/mL, Sigma-Aldrich) durante 8 h o 16 h. Una vez cumplido estos periodos, inmediatamente las células fueron lavadas con PBS dos veces, y extraído su RNA total utilizando el kit de extracción RNA easy miniprep (Qiagen). Finalmente se realizó una retro-transcripción y qRT-PCR, como se describe en la sección 7.12.

### **7.16. Amplificación del 3' UTR del gen ATM y validación de productos de PCR por secuenciación Sanger.**

Con anterioridad, otros autores han descrito que parte de la región 3' UTR de ATM es susceptible a ser editado por ADAR1. Debido a estos antecedentes, fue secuenciado el cDNA de la región 3' UTR de ATM descrita por Wang y colaboradores (2013) en células MCF10A, ZR-751 y células ZR-751 transfectadas con ADAR1p110. Para ello, el mRNA total de estas células fue extraído y retrotranscrito utilizando el kit SMARTER 3' RACE cDNA, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Clontech), seguido de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando una DNA polimerasa de alta fidelidad (Phusion HF, Thermo) utilizando una temperatura de denaturación de 98 °C, una temperatura de annealing de 60°C y temperatura de elongación de 72°C durante 90 segundos por 35 ciclos. Posteriormente, fue realizada la purificación del fragmento amplificado (QIAquick gel extraction kit, QIAGEN), para finalmente enviar a secuenciar estos productos en la compañía Macrogen Inc. y analizar los electroferogramas utilizando el software CLC Workbench v5.5. Además, los blancos analizados mediante RESS-qPCR, descritos en la sección anterior, fueron secuenciados utilizando esta metodología.

### **7.17. Evaluación del patrón de expresión de ADAR1 en cohortes TCGA, METABRIC y USLACRN.**

Para la obtención de los valores de expresión de ADAR1 de las cohortes TCGA (The Cancer Genome Atlas) y METABRIC (The Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium), los archivos correspondientes fueron descargados desde el TCGA data portal y la base de datos c-bioportal, respectivamente. Los datos descargados desde TCGA corresponden a datos normalizados de RNAseq (plataforma Illumina) y microarreglos (plataforma Agilent Array 2 colores, 244K). Por otro lado, los datos de la cohorte METABRIC corresponden a una plataforma de microarreglos (Illumina HT 12A). Además, para este trabajo fueron utilizados los datos de expresión provenientes de la cohorte USLACRN (United States-Latin-American-Cancer research Network) de Chile, los cuales corresponden a plataforma de microarreglos Agilent 2 colores, 244K. Para esta

última plataforma, los datos de expresión fueron normalizados utilizando el software Genespring GX, usando el modo automático. Una vez descargados y pre procesados los valores de expresión utilizando línea de comandos unix o Microsoft Excel, se compararon las veces de cambio de la expresión de ADAR1 en las muestras tumorales, respecto a las muestras controles, para cada una de las cohortes estudiadas. Para el análisis de la expresión de las distintas variantes de mensajero de ADAR1, se utilizaron los datos de expresión de mRNA provenientes de la plataforma TCGA RNAseq V2 (RSEM), toda vez que presenta cuentas de RNA variante específica, utilizando las lecturas de las variantes uc001ffk.2 y uc001ffi.2 que codifican para ADAR1 p110 y ADAR1 p150, respectivamente.

#### **7.18. Análisis de coexpresión desde las plataformas TCGA, USLACRN y LINCS.**

Para realizar los análisis de coexpresión en las cohortes TCGA y USLACRN se utilizó el algoritmo de clusterización K-means (K=10, iteraciones=100) desde el software MeV (Multiexperiment Viewer v4.9). La lista de genes en cuyo conjunto o clúster se encontraba el gen ADAR1 fue utilizada para analizar el enriquecimiento de vías de señalización, utilizando la base de datos Reactome, por medio del uso de Cytoscape (v3.0.1) y el complemento ClueGO (v3.3.3). Este análisis de enriquecimiento de ontologías también fue realizado en los datos de coexpresión de la base de datos LINC's (Library of Integrated Network-Based Cellular Signatures) en colaboración con el Dr Olivier Harismendy, del Moores Cancer Center, USCD, la cual corresponde a una base de datos que presenta más de 20.000 *knock down* individuales por medio de la utilización de shRNA's, en 9 líneas celulares distintas, incluyendo el *knock down* de ADAR1.

### 7.19. Análisis de variantes en UTRs desde cohorte TCGA.

Brevemente, fueron seleccionados aquellos UTRs que previamente habían sido descritos y que adicionalmente presentaran una posición validada en la base de datos de ediciones de RNA, RADAR (RNA editing database, [www.rnaedit.com](http://www.rnaedit.com)). Para ello, fueron seleccionados los genes correspondientes a la intersección de los resultados generados por Peng et al <sup>83</sup>, Ramaswami et al <sup>89</sup> y Wang et al <sup>91</sup> para identificar aquellos mRNAs con al menos una posición validada en RADAR que estuviera en alguno de sus UTRs, generando así una lista de 571 UTRs. Luego, se procedió a descargar los archivos de expresión .bam asociados a cada paciente de la cohorte BRCA (Breast Cancer) TCGA, correspondientes a 1214 archivos individuales, desde la plataforma c-Hub UCSC. Posterior a esto, se seleccionaron las regiones de interés a analizar, correspondientes a los 571 UTRs, para finalmente realizar el llamado de variantes en el RNA. Las variantes encontradas fueron segregadas en 3 categorías: “variantes nuevas” o variantes no descritas con anterioridad, “variantes *gold standart*” o previamente descritas por Wang et al. (2013), las cuales tuvieron que ser transformadas a hg19, utilizando el software liftOver de UCSC y finalmente, SNPs transcritos, descritos en dbSNP 1.38. También, se comparó la distribución de transición/transversión encontrada en los distintos tipos de variantes descubiertas, como, asimismo, la correspondencia de las variantes encontradas en posiciones genómicas descritas como Alu. Para ello, se utilizó la base de datos *Repeatmasker* de UCSC con el objetivo de determinar la proporción de variantes localizada en estas posiciones.

## **7.20. Análisis de sobrevida de pacientes con cáncer mama de la cohorte TCGA.**

Para la realización de las curvas de sobrevida, se utilizaron los datos clínicos de sobrevida de los pacientes TCGA, los cuales fueron descargados desde TCGA data portal y corroborados en c-bioportal. Una vez realizado esto, fueron seleccionados aquellos pacientes triple negativos, de acuerdo a su ficha y caracterización clínica –presente en TCGA- y segregados de acuerdo al número de variantes encontradas en sus UTRs. Así, fueron generados dos grupos, de acuerdo a la mediana de las variantes contabilizadas y fueron graficadas sus curvas de sobrevida y recurrencia en el programa Graphpad Prism6.

## **7.21. Secuenciación de RNA en células *knock down* de ADAR1.**

Células ZR-751 SHC y SHADAR fueron sembradas en placas de 6 pocillos en una confluencia de 70% para 16 h después, ser tratadas con DMSO o el inhibidor de la RNA polimerasa II Triptolide, a una concentración final de 100 nM durante 16 h. Las células fueron inmediatamente procesadas para extraer su RNA total, utilizando el kit de extracción de RNA QIAGEN RNAeasy mini kit (QIAGEN), incluyendo tratamiento con DNasa I (QIAGEN). Las muestras fueron cuantificadas utilizando el espectrofotómetro Cytation 3 con el microadaptador Take3 (Biotek) y la calidad de estos RNAs fue analizada utilizando el sistema de electroforesis automatizada Experion (Biorad). Este experimento fue realizado en 4 oportunidades de manera independiente. Una vez realizada la extracción, cuantificación y control de calidad de los RNAs, se realizó una librería de secuenciación utilizando el kit TruSeq Stranded Total RNA LT Kit (Illumina), incluyendo el uso del kit Ribo-Zero rRNA removal kit (Epicentre) a partir de 500 ng totales por muestra. Sólo fueron generadas librerías para aquellas muestras con un RQI>9 y que además presentaran una diferencia superior a un 60% de expresión diferencial para ADAR1 entre células SHC y SHADAR en cada replica realizada, mediada mediante qRT-PCR. Cada librería fue analizada mediante el uso del equipo de electroforesis automatizada Bioanalyzer 2100 (Agilent), para finalmente ser enviadas a secuenciar utilizando un equipo Hiseq2500 (GenomaMayor, por medio de servicio BGI, 2 lanes para 18 muestras).



## **7.22. Análisis de expresión diferencial derivado de la secuenciación de RNA.**

Para los análisis de expresión diferencial, los archivos alineados con STAR (.bam) fueron utilizados para realizar cuentas de genes por medio de la utilización del software HT-seq (v0.6.1p1, utilizando HTseq-count). Para ello se utilizó hg19 y el archivo de coordenadas de genes/transcritos (.gff) gencode hg19v19, para después realizar el análisis de expresión diferencial con DEseq2 (v1.10.1), de acuerdo al manual de este programa. Los archivos de cuentas fueron depurados de aquellos genes sin cuentas para, posteriormente, realizar DEseq2 en su modo automático, utilizando como diseño experimental la condición experimental de ADAR1 (*knock down* o *scrambled*), como primer factor y el replicado biológico como segundo factor, para realizar todas las comparaciones posteriores.

## **7.23. Comparación de variantes entre células ZR-751 SHC y células ZR-751 SHADAR.**

Para la comparación del número de variantes presentes en cada línea celular, fueron seleccionados los archivos .vcf de las células ZR-751 SHC sin tratar e indistintamente aquellas tratadas con 100 nM de DMSO durante 16 h, y fueron comparadas con los archivos .vcf provenientes de células ZR-751 SHADAR sin tratar y células ZR-751 SHADAR tratadas con 100 nM de DMSO. Una vez seleccionados los archivos .vcf a comparar, fueron generados archivos temporales que contuvieran las variantes atribuibles a la función de ADAR1 (A > G y T > C) y luego se realizó un conteo del número de variantes en cada gen presentes en los archivos utilizando intersectBed (Bedtools v2.20.1). Finalmente se realizó la sustracción del número de variantes por gen con el fin de comparar los cambios producidos por el *knock down* de ADAR1. Para análisis posteriores fueron considerados arbitrariamente aquellos genes con al menos un 25% de diferencia en el número de variantes presentes, al comparar células ZR-751 SHC y células ZR-751 SHADAR.

## 7.24. Análisis de variantes para líneas celulares de mama.

Los archivos de secuenciación de 83 líneas celulares de mama fueron descargados desde la base de datos SRA (Sequence Read Archive) del NCBI, utilizando el software Fastq-dump, del SRA Tool kit (v2.5.7). Estos archivos provienen del proyecto PRJNA297219 del SRA y contienen en su interior archivos de secuenciación de RNAseq. Una vez descargados los archivos, fueron pre procesados y mapeados/alineados utilizando STAR, para continuar siendo procesados, siguiendo el flujo “The GATK Best Practices for variant calling on RNAseq” disponible en la página web: <https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices/>; como se describió anteriormente. Adicionalmente, los archivos derivados de llamado de variantes (.vcf) fueron anotados utilizando la base de datos dbSNP (dbSNP v1.47) usando el variant annotator de GATK (v3.6).

Para comparaciones posteriores y conteos respecto a regiones de interés, se descargaron las posiciones de ediciones validadas de las bases de datos RADAR y DANRED ( srv00.recas.ba.infn.it/atlas), las que fueron intersectadas con los archivos de variantes, resultantes del llamado de variantes, por medio del uso de intersectBed (Bedtools v2.20.1). Además, se realizó el conteo de variantes respecto a posiciones genómicas -regiones del mRNA - lo cual tenía como finalidad contar variantes de acuerdo a su ubicación, respecto a una región de interés en el mRNA, siendo definidas como regiones exónicas, intrónicas y regiones no traducibles (UTRs) según hg19. Estos archivos fueron generados en base al archivo .gtf descrito anteriormente y procesado utilizando Rstudio (v0.98).

## 7.25. Análisis de enriquecimiento de variantes en regiones del mRNA.

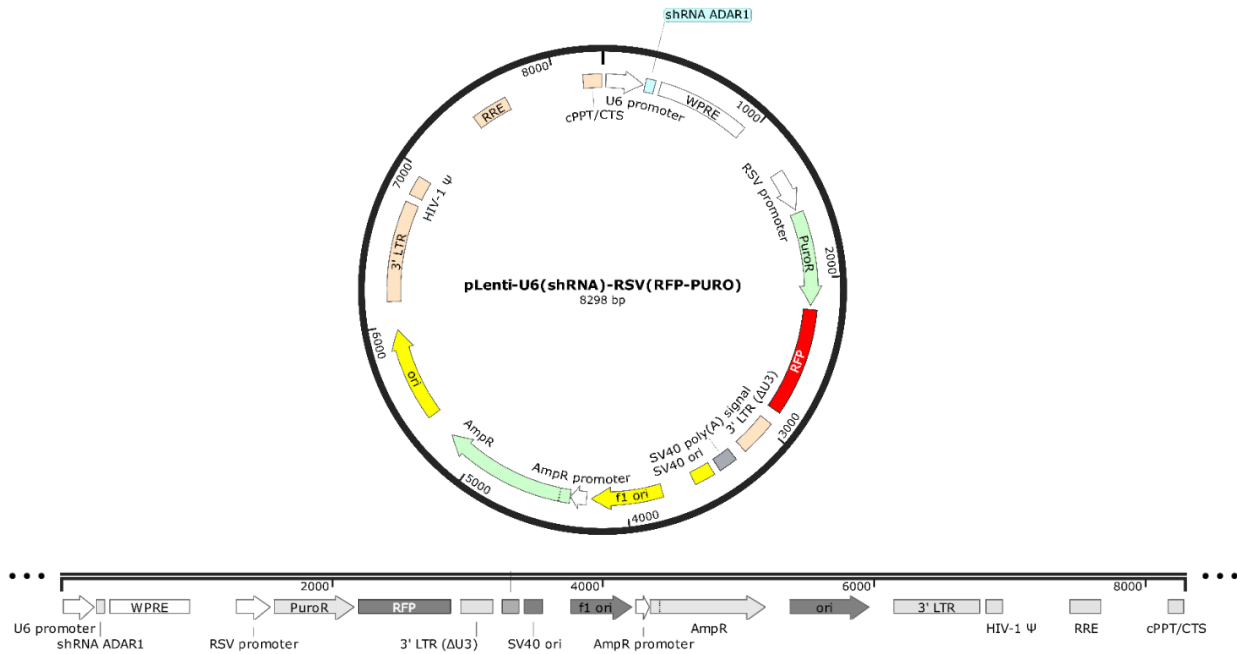
Fue comparado el enriquecimiento/proporción de variantes entre líneas celulares tumorales y las líneas celulares controles de este proyecto SRA. Para ello, los archivos de variantes fueron depurados y seleccionadas aquellas variantes producidas por ADAR (A > G en variantes producto de mRNAs transcritos en la hebra positiva, y T > C para transcritos desde la hebra negativa). Posteriormente, se intersectaron las variantes usando la base de datos RADAR (Bedtools v2.20.1). Una vez realizado esto se generaron archivos tabulados (utilizando VCFtools v0.1.13) para comparar posiciones comunes entre las líneas celulares tumorales y las líneas controles, seleccionando aquellas posiciones con una diferencia mayor al 30% en su fracción alternativa, para caracterizar el enriquecimiento de estas variantes entre las células. Esto fue realizado utilizando el siguiente algoritmo:

$$f(x) = \frac{READS\ ALT}{READS\ REF + READS\ ALT} \times 100$$

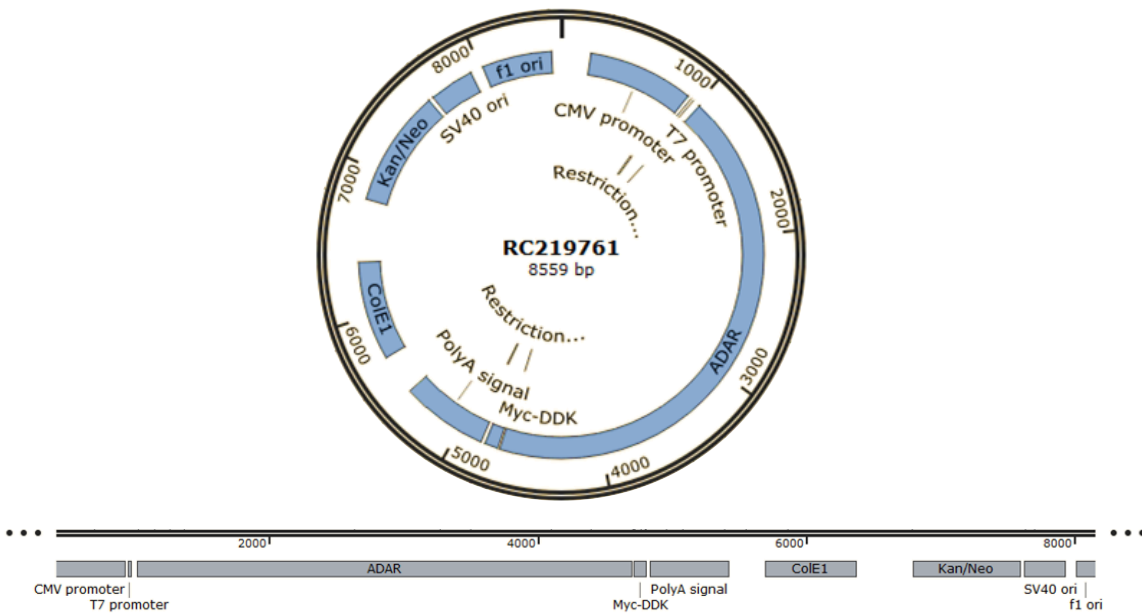
$$f(\text{linea control}) - f(\text{LineaN}) < -30$$

La fórmula utilizada permite calcular la fracción alternativa en todas las variantes seleccionadas, de cada línea celular para posteriormente realizar una sustracción entre las líneas tumorales y la línea control analizada, y si existiese una diferencia mayor a un 30% en esa posición, la posición es anotada y contada como una variante enriquecida. Finalmente, esto es graficado de manera tal que se visualizan los conteos respecto a la región del mRNA donde estaba contenida.

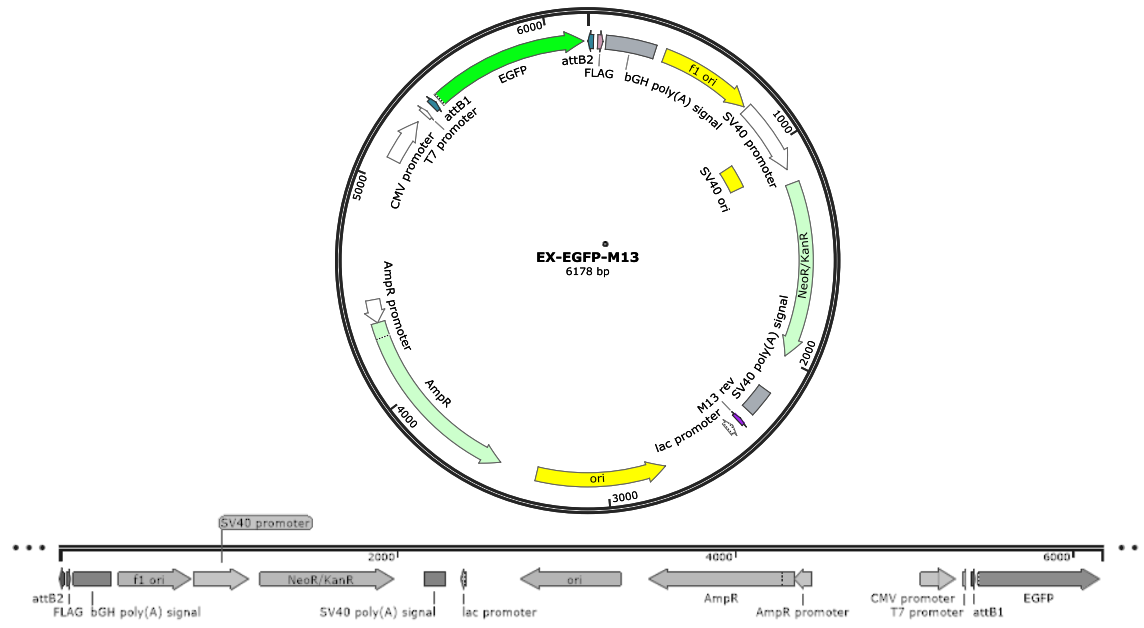
## 7.26. Listado de plásmidos, partidores y anticuerpos utilizados



Estructura del vector lentiviral comercial utilizado para la expresión que codifica para un shRNA contra ADAR y para el SHC revuelto (scrambled), *GeneTarget Inc.*



Estructura del plásmido comercial utilizado para la expresión del ADAR1 (ADAR p110 variante de mRNA 4, RC219761), *Origene Inc.*



**Estructura del vector plásmido comercial utilizado para control de Transfección eGFP. EX-EGFP-M13, Genecopoeia Inc.**

## Partidores utilizados para qRT-PCR.

ADAR p110	Fw	GAC TGA AGG TAG AGA AGG CTA CG
ADAR p110	Rv	TGC ACT TCC TCG GGA CAC
ADAR1 p150	Fw	CTT TCC GAG GAA ACG AAA GCG A
ADAR1 p150	Rv	CCG CTA CTC CGC ACT GGA A
ADAR1_ORF	Fw	AAG GCA GAA CGC ATG GGT TTC A
ADAR1_ORF	Rv	AGT GTC TTT GGC TGT GCT TCT GG
Actina	Fw	AAC GGC TCC GGC ATG TGC AAG
Actina	Rv	GCC GTG CTC GAT GGG GTA CTT
Azin Outer	Fw	ACT GAA TGA CAT CAT GTA ATA AAT GGC T
Azin Outer	Rv	AAT ACA AGG AAG ATG AGC CTC TGT TTA C
Wt Azin	Fw	CAT TCA GCT CAG GAA GAA GAC ATC T
Wt Azin	Rv	AAT ACA AGG AAG ATG AGC CTC TGT TTA C
Edited Azin	Fw	ACT GAA TGA CAT CAT GTA ATA AAT GGC T
Edited Azin	Rv	GAG CTT GAT CAA ATT GTG GCA G
MDM2 Outer	Fw	ATA GGA CTG AGG TAA TTC TGC ACA GCA
MDM2 Outer	Rv	AAG AGA TTC TGC TTG GTT GTA GCT GAA G
MDM2 Wt	Fw	ATA GGA CTG AGG TAA TTC TGC ACA GCA
MDM2 Wt	Rv	ATA ATG CTT GGA GGA CCT CCA CAT GT
Edited MDM2	Fw	TAA ATG GCC AAA GGG ATT AGT AGT GTG
Edited MDM2	Rv	AAG AGA TTC TGC TTG GTT GTA GCT GAA G
ORC2	Fw	CGG GCG CGA ATT ACT GGA AA
ORC2	Rv	TCA CCG CTA GGT TTC CGT CTG
GINS1	Fw	AGC AAA GTC AGG TGG ACG AAG T

GIN51	Rv	TGA GTG CTC TGA TCC GAA GCA A
GIN54	Fw	AAA GAT TGG AGC AGG CCT GGA T
GIN54	Rv	ATG TGC TCC AGC TGT TCC ATG A
MCM4	Fw	TTG GCC TCA CTG CGT ACG TAA T
MCM4	Rv	AGC AGA TGC CGT TGT CAC TCA
MCM8	Fw	GAG CAA CAG GTC AAC AGC GAA A
MCM8	Rv	TGG CAA TCT GCC GAA GTT GAT G
CCNE1	Fw	AGG CCC TTA AGT GGC GTT TAA GTC
CCNE1	Rv	CTG CGG CAG TAG CAC TTC ATG TAA
NEK2	Fw	GAA TGC CAC AGA CGA AGT GAT GGT
NEK2	Rv	CCC AAA GTC TCC AAG CTT GAC GTT
MYBL2	Fw	TTC AGA TGT GCC GGA GCA GA
MYBL2	Rv	TCA GCC ACC TGT ACT GGC ATT
CCND1	Fw	CCA CCT GTC CCA CTC CTA CGA T
CCND1	Rv	GCA GGG CCG TTG GGT AGA AA
MYC	Fw	CGA CTC GGT GCA GCC GTA TT
MYC	Rv	GGT GTG ACC GCA ACG TAG GA
ATM_3UTR	Fw	ACCCTACTCTGAATGCAGATGACC
ATM_3UTR	Rv	CTGTCGCCAAGGCTGGAATACAAT

**Anticuerpos primarios utilizados:**

<b>Anticuerpo</b>	<b>ID</b>	<b>Origen</b>	<b>Proveedor</b>
ADAR1	14175	Conejo	CST
ATR	2790	Conejo	CST
phospho-ATR (S428)	2853	Conejo	CST
ATR	2873	Conejo	CST
phospho-ATM (S1981)	5883	Conejo	CST
CHEK1	2360	Ratón	CST
phospho-CHEK1 (S345)	2348	Conejo	CST
CHEK2	3440	Ratón	CST
phospho-CHEK2 (T68)	2197	Conejo	CST
p53	2524	Ratón	CST
phospho-p53 (S15)	9286	Ratón	CST
Ciclina D1	2926	Ratón	CST
IdU	347580	Ratón	BD
CldU	SC-56258	Rata	Santa Cruz
BrdU	B44 FITC	Ratón	BD
$\gamma$ H2AX	5636	Conejo	Millipore
Tubulina	T5168	Ratón	Sigma-Aldrich
HSP70	TA309356	Ratón	Origene
Actina	A1978	Ratón	Sigma-Aldrich



**Anticuerpos Secundarios Utilizados:**

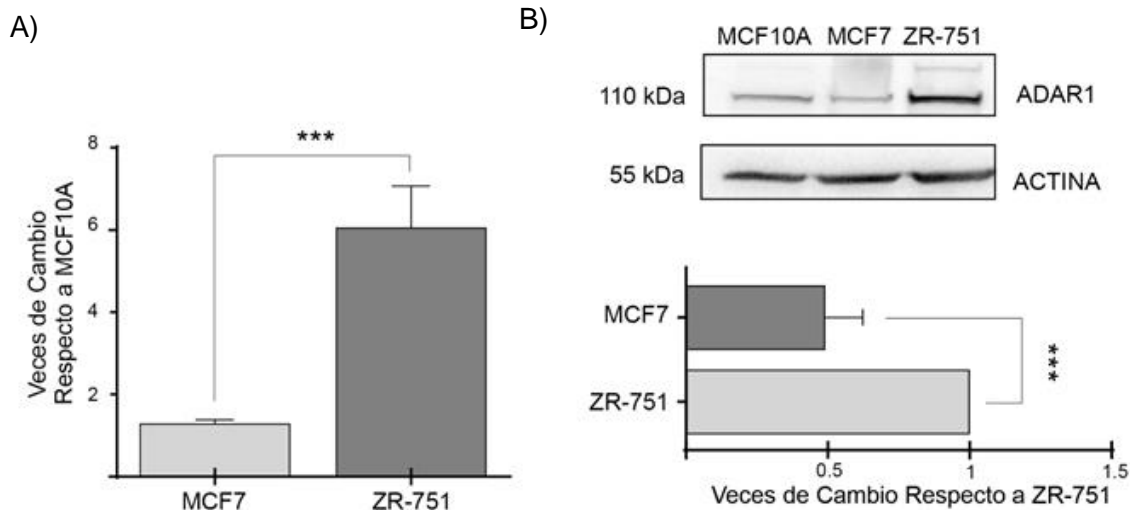
<b>Anticuerpo</b>	<b>ID</b>	<b>Origen</b>	<b>Proveedor</b>
Anti-Conejo HRP	170-6515	Cabra	Thermo/Molecular Probes
Anti-Ratón HRP	170-6516	Cabra	Thermo/Molecular Probes
Anti-Ratón Alexa Fluor 488	A-11001	Cabra	Thermo/Molecular Probes
Anti-Ratón Alexa Fluor 594	A-11032	Cabra	Thermo/Molecular Probes
Anti-Conejo Alexa Fluor 488	A-11034	Cabra	Thermo/Molecular Probes
Anti-Rata Alexa fluor 488	A-11006	Cabra	Thermo/Molecular Probes

## 8. Resultados.

### 8.1. Analizar el efecto de ADAR1, en la expresión y estabilidad de los mRNAs de genes asociados a los procesos de respuesta al daño del DNA y control del ciclo celular en las líneas celulares MCF-7 y ZR-751.

#### 8.1.1 Caracterización de los modelos celulares utilizados, respecto a los niveles y actividad de ADAR1.

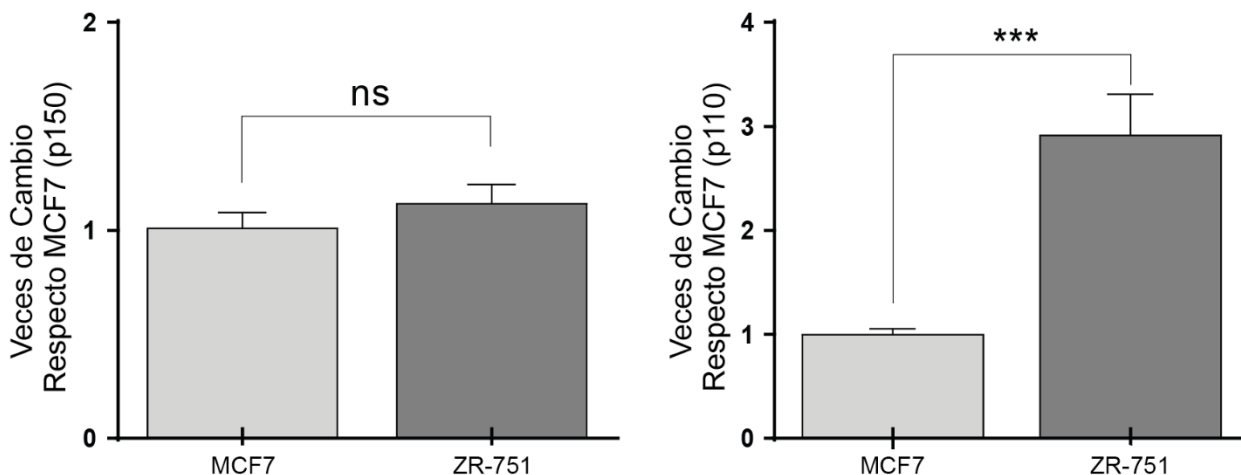
Con el objetivo de caracterizar los modelos a utilizar, se determinó los niveles de expresión de ADAR1 en los modelos celulares de cáncer de mama MCF y ZR-751 y se compararon con la expresión en las células mamarias no tumorales MCF10A. Nuestros resultados indican que las células ZR-751 expresan alrededor de 6 veces más mRNA de ADAR1 que las células MCF7 (Figura número 11A).



**Figura número 11. Patrón de expresión de ADAR1 en líneas celulares MCF10A, MCF7 y ZR-751.** A) Expresión del RNA mensajero de ADAR1 en células MCF7 y ZR-751 *wild type*, valores expresados como veces de cambio respecto a células MCF10A, línea celular inmortalizada mamaria. B) Western blot representativo para la proteína ADAR1 y cuantificación de 3 experimentos independientes. \*\*\* $< 0.0001$  T-Test de 2 colas, gráfico de barras, N=3. Media +/- SEM.

Además, mediante western blot, se determinaron los niveles proteicos de ADAR1 en las células MCF7 y ZR-751, evidenciando una menor expresión en las células MCF7 que las células ZR-751 (Figura número 11B). Finalmente, se evaluaron las variantes de mensajero que codifican para ADAR1 p150 y p110 en los modelos celulares incluidos en esta tesis doctoral. Estos resultados, mostrados en la Figura número 12, muestran que no existen diferencias significativas en la expresión de la variante que codifica para ADAR1 p150 al analizar los modelos celulares MCF7, ZR-751 y MCF10A. Sin embargo, se encontró un aumento significativo en la expresión de la variante de mRNA que codifica para ADAR1 p110 en las células ZR-751 comparado a las células MCF7. Sugiriendo que las diferencias funcionales podrían estar mediadas por esta variante del mRNA.

A)



**Figura número 12. Niveles de expresión de variantes del mensajero que codifican para ADAR1 p110 y ADAR1 p150 en líneas celulares MCF7 y ZR-751.** Comparación de la expresión de las variantes de RNA mensajero de ADAR1; para la variante larga (p150) a la izquierda y p110 (variante corta) de este mensajero a la derecha del gráfico. Gráfico de barras, N=3. Media +/- SEM. ns: sin diferencias significativas; \*\*\* < 0.0001 T-Test de 2 colas.

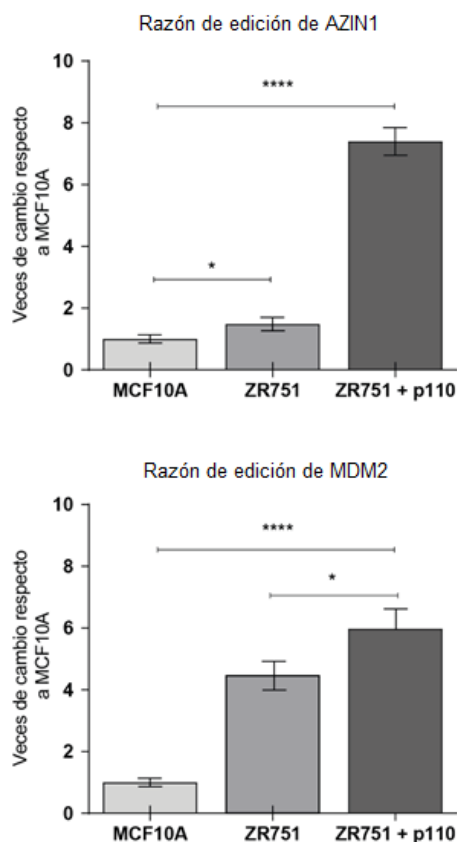
Posteriormente, se analizaron sitios informativos de edición mediada por ADAR1 y se determinó el porcentaje de edición presente en los mRNAs de AZIN1 (chr8:103841636) y MDM2 (chr12:69237534), posiciones susceptibles de edición reportadas con anterioridad por Crews y colaboradores (2015). Para este análisis, se utilizaron los archivos de secuenciación del proyecto SRA PRJNA297219, descrito en la metodología (sección 7.24) encontrando una mayor fracción de la variante alternativa (G) en las células ZR-751, respecto a las células MCF7 y MCF10A como se muestra en las Tablas número 4A y 4B. Finalmente, se analizó la actividad de ADAR1 para los sitios informativos AZIN1 y MDM2 en células ZR-751 y MCF10A, por medio de la técnica RESS-qPCR y posterior secuenciación Sanger de estos productos de PCR, utilizando una DNA polimerasa de alta fidelidad. Además, se secuenció parte de la región 3' UTR del mRNA de ATM, según lo descrito en la sección de materiales y métodos (sección 7.16) para así comparar la fracción editada en nuestros modelos de estudio.

<b>MDM2 posición chr12:69237534 (hg19)</b>						
Muestra	Número de lecturas	Referencia	Suma	Variante	Suma	Proporción Editada
MCF10A	160	A	97	G	61	38.125
MCF7	198	A	100	G	98	49.495
ZR751	219	A	73	G	142	64.840
<b>AZIN1 posición chr8:103841636 (hg19)</b>						
Muestra	Número de lecturas	Referencia	Suma	Variante	Suma	Proporción Editada
MCF10A	211	T	209	C	1	0.474
MCF7	307	T	286	C	21	6.840
ZR751	522	T	329	C	192	36.781

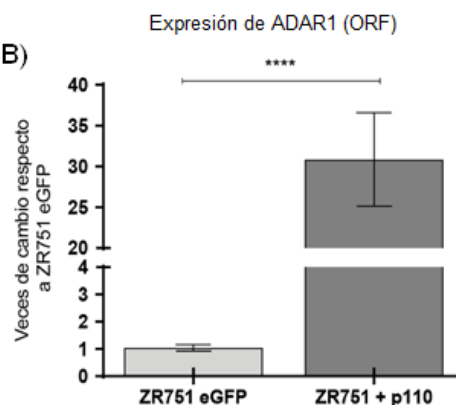
**Tabla número 4. Estatus de edición en dos sitios informativos, en modelos celulares *wild type*.** Se muestran dos posiciones susceptibles de edición por ADAR1 en los 3 modelos celulares utilizados en esta tesis doctoral y la proporción/porcentaje de edición en cada uno de ellos. Datos obtenidos desde el proyecto PRJNA297219.

Los resultados derivados del experimento del RESS-qPCR y secuenciación tipo Sanger, muestran un aumento significativo en la proporción de mRNAs editados en células ZR-751 respecto a las células MCF10A, para los transcritos de AZIN1 y MDM2, resultado que se muestra en las Figuras número 13A y 13B y Figura número 14A. Además, el electroferograma de la región 3' UTR de ATM muestra un incremento en la señal correspondiente a la adición del nucleótido de guanina en sitios de referencia de adenosinas, exclusivo para las células ZR-751 *wild type* y las células ZR-751 transfectadas con ADAR1p110, utilizadas como control positivo (Figura número 13B).

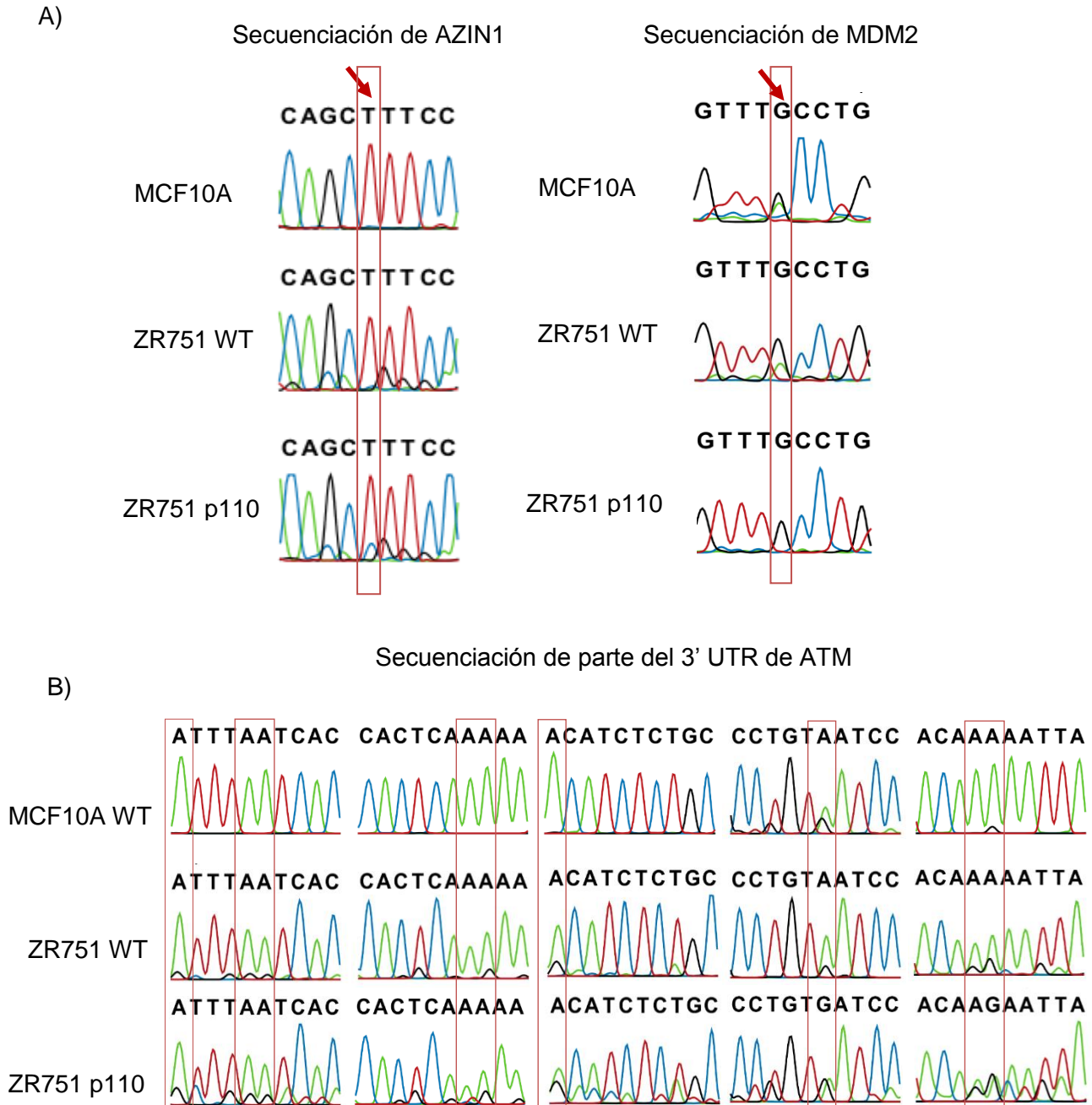
A)



B)

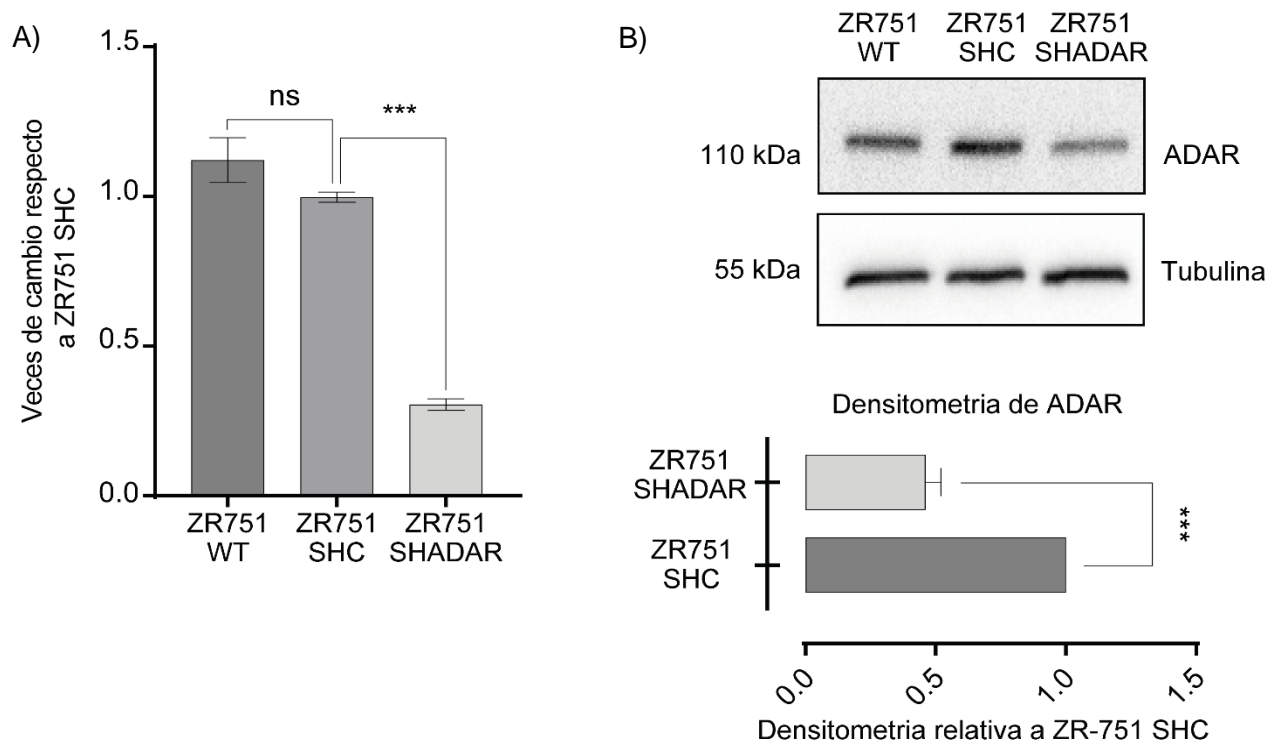


**Figura número 13. Niveles de edición en líneas celulares MCF10A y ZR-751.** A) Niveles de edición para 2 blancos validados de ADAR1, en células MCF10A, ZR-751 y ZR-751 transfectadas con ADAR p110, determinado mediante el ensayo RESS-qPCR. B) Experimento de sobreexpresión de p110, por medio de transfección en células ZR-751, transfectadas con el plásmido correspondiente (ADAR1 p110 cds) o plásmido control (eGFP). Los resultados se expresan como veces de cambio respecto a los valores de MCF10A. \*\*\*\*<0.001; \* <0.005. T-test de dos colas. Gráfico de barras, N=3. Media +/- SEM.



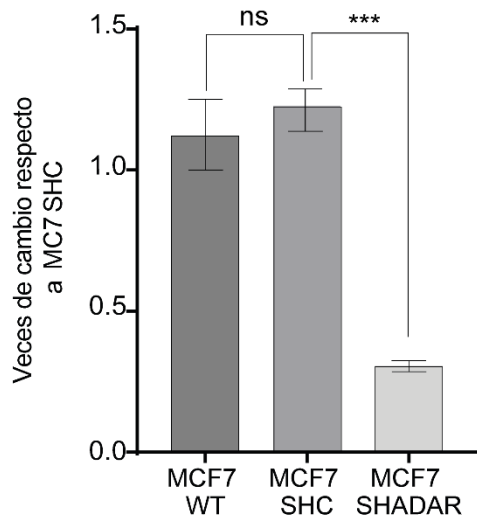
**Figura número 14. Electroferograma de AZIN1, MDM2 y ATM en las posiciones editadas por ADAR en las líneas celulares MCF10A y ZR-751.** A) Electroferograma para la posición de AZIN1 y MDM2 sujeta a edición y cambio de base (T > C o A > G, respectivamente) en células MCF10A *wild type*, ZR-751 *wild type* y ZR-751 transfectadas con el plásmido codificante para ADAR1 p110. B) Electroferograma de parte del 3'UTR de ATM mostrando las distintas posiciones sujetas a cambio/edición, en los tres modelos anteriormente señalados.

Debido a las diferencias en la expresión de ADAR1 encontradas en las líneas celulares ZR-751 y MCF7, en un primer momento se decidió disminuir la expresión de ADAR1 en células ZR-751 y sobreexpresar ADAR1 en células MCF7, aun cuando fueron incluidos experimentos utilizando células MCF7 *knock down* para ADAR1. Como fue descrito en la sección de Materiales y Métodos; células ZR-751 *wild type* fueron transducidas con un vector lentiviral comercial (Genetarget), el cual codifica para un shRNA dirigido específicamente contra el mRNA de ADAR1 (SHADAR). Como control, se realizó una transducción lentiviral en estas mismas células con un shRNA revuelto o *scrambled* (SHC).

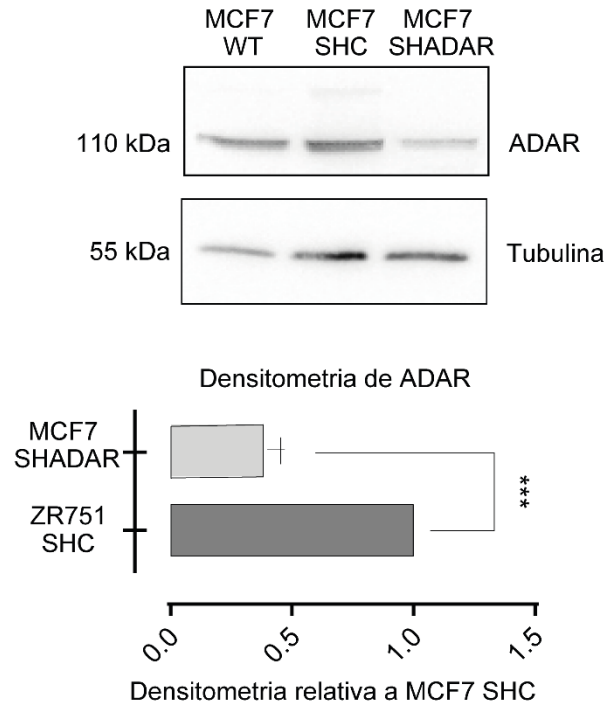


**Figura número 15. Disminución de la expresión de ADAR1 mediante el uso de partículas lentivirales en células ZR-751.** En A) se muestra las diferencias de expresión (mRNA) de ADAR1, analizadas por tiempo real, en células ZR-751 WT, y en células ZR-751 transducidas con partículas lentivirales que codifican para un shRNA revuelto (*scrambled*, ZR-751 SHC) y un shRNA específico contra ADAR1 (ZR-751 SHADAR). B) Expresión proteica de ADAR1 en células ZR-751 WT, SHC y SHADAR, determinada por western blot. Arriba, se muestra un resultado representativo y abajo, la cuantificación densitométrica (N=3. Media +/- SEM). T-Test de 2 colas. ns: sin diferencias significativas; \*\*\* < 0.0001.

A)



B)

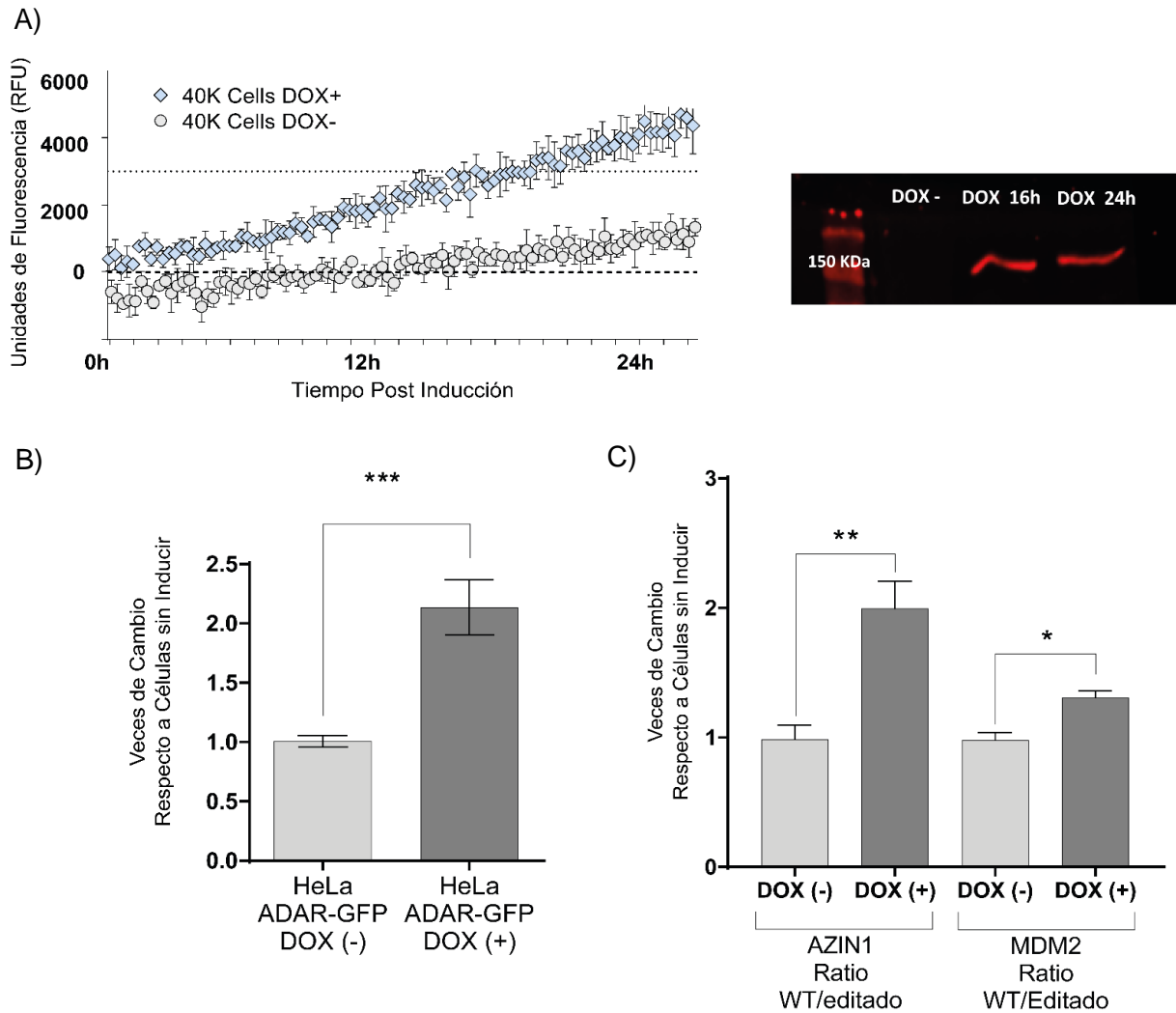


**Figura número 16. Disminución de la expresión de ADAR1 mediante el uso de partículas lentivirales en células MCF7.** En A) se muestran las diferencias de expresión (mRNA) analizadas por tiempo real de células MCF7 WT, células transducidas con partículas lentivirales revueltas (MCF7 SHC) y un shRNA específico contra ADAR1 (MCF7 SHADAR). B) Expresión proteica de ADAR1 en células MCF7 WT, células MCF7 transducidas con partículas lentivirales que codifican para un shRNA revuelto (*scrambled*) y con partículas con un shRNA específico contra ADAR1, mostrando un western blot representativo y su cuantificación densitométrica. T-Test de 2 colas. ns: sin diferencias significativas; \*\*\*< 0.0001. Gráfico de barras, N=3. Media +/- SEM.



Mediante qRT-PCR se determinó la expresión del gen ADAR1 posterior a la transducción lentiviral y selección antibiótica, evidenciando que las células ZR-751 SHADAR1 expresan aproximadamente un 30% del mensajero de ADAR1 comparado a las células ZR-751 WT. Por otra parte, las células ZR-751 SHC no presentaron cambios significativos en la expresión del mRNA de ADAR1 respecto a las células WT (Figura número 15A).

A continuación, se evaluó la expresión de la proteína ADAR1 por western blot, evidenciando una significativa disminución en la cantidad proteica de ADAR1 en las células ZR-751 SHADAR comparado a las células controles (Figura número 15B). Resultados similares se obtuvieron al realizar la transducción lentiviral del shRNA en células MCF7 (Figura número 16). Finalmente, se evaluó la inducción y actividad de ADAR1 en el modelo celular HeLa Flp-IN T-REx ADARp110-GFP por medio de la administración de doxiciclina (1 µg/mL) al medio celular. En este modelo, la inducción de la proteína fue analizada a las 16 y 24 h post tratamiento mediante western blot, mientras que la expresión del transcrito de ADAR1 y la actividad editora se analizaron mediante RESS-qPCR 24 h post tratamiento. Se evidenció la expresión de ADAR1-GFP a ambos tiempos de inducción, así como un incremento significativo del transcrito de ADAR1 y un aumento de las fracciones editadas de los mRNAs de MDM2 y AZIN1 24 h post inducción de estas células con doxiciclina (Figura número 17).



**Figura número 17. El incremento de la expresión de ADAR1 en células HeLa Flp In T-REx produce un aumento en las fracciones editadas de los mRNAs de MDM2 y AZIN1. A)** Curva de inducción con doxificiclina y western blot representativo de células HeLa Flp In T-Rex inducidas con doxificiclina. **B)** qRT-PCR del mensajero de ADAR1 (ADAR1 p110), comparando células inducidas durante 24 h con doxificiclina (DOX (+)) (1µg/mL) y células sin inducir (DOX (-)). **C)** RESS-qPCR de AZIN1 y MDM2, comparando células inducidas durante 24 h con doxificiclina (1µg/mL) (DOX (+)) y células sin inducir (DOX (-)). N=3, T-test de 2 vías; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ; \*\*  $< 0.01$ ; \*  $< 0.05$ ; ns: sin diferencias significativas. Gráfico de barras. Media +/- SEM.

### 8.1.2 Análisis de coexpresión ADAR1, utilizando bases de datos de acceso público.

Una vez caracterizados los modelos utilizados en esta tesis doctoral, se analizaron distintas plataformas y bases de datos genómicos para evaluar de manera indirecta el rol de ADAR1 en la expresión de ontologías asociadas al control del ciclo celular, respuesta al daño al DNA y replicación. En un primer momento, se realizaron dos análisis de coexpresión de ADAR1 en las cohortes TCGA y USLACRN, las cuales corresponden a las mayores cohortes de pacientes de cáncer de mama disponibles, las que además presentan información transcriptómica de estos pacientes. Para la realización de estos análisis se utilizó el algoritmo de clusterización K-means (K=10, iteraciones=100) para después ocupar la lista de genes en cuyo conjunto o *clúster* se encontraba el gen ADAR1 y realizar posteriormente, un análisis de enriquecimiento de vías de señalización, utilizando la bases de datos Reactome por medio del uso de Cytoscape (v3.0.1) y el complemento ClueGO (v3.3.3). Los resultados se describen en la Tabla número 5 y número 6.

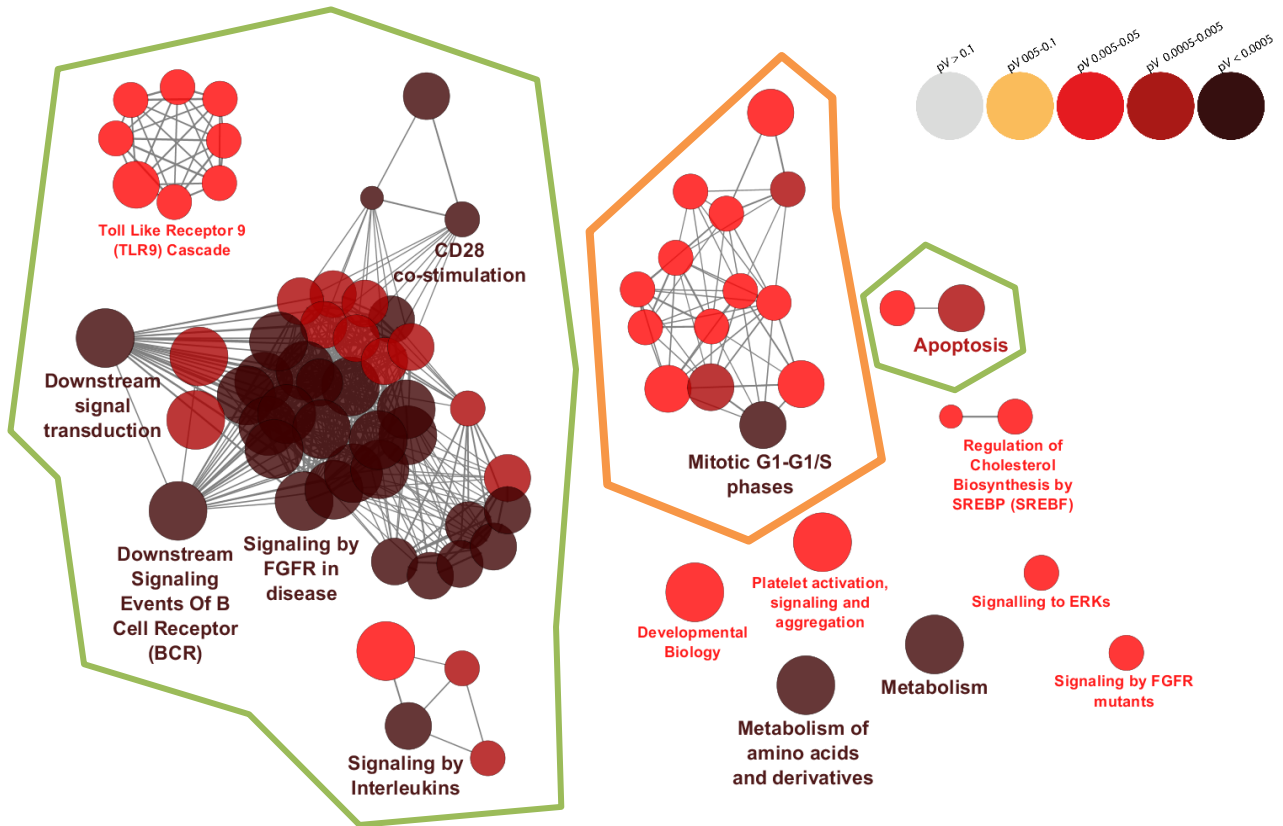
Grupo de coexpresión de ADAR1 (USLACRN)	
GOTerm	P Value
Generic Transcription Pathway	3.91E-05
snRNP Assembly	2.47E-04
Cell Cycle	0.0084
DNA Repair	0.0196
S Phase	0.0293

**Tabla número 5. Análisis de coexpresión de ADAR1 en distintas cohortes de adenocarcinoma mamario.** En la tabla se muestra el análisis de coexpresión de ADAR1 en la cohorte USLACRN. Donde se aprecian 5 vías de señalización más significativas asociadas a la expresión de ADAR1 en la cohorte con muestras de pacientes chilenas USLACRN. Se muestran las 5 vías de señalización con mayor p-value corregido (Pearson con Bonferroni).

<b>Grupo de coexpresión de ADAR1 (TCGA)</b>	
<b>GOTerm</b>	<b>P Value</b>
Cell Cycle, Mitotic	1.05e-28
Telomere Maintenance	3.13e-13
DNA Replication	2.90e-10
Cell Cycle Checkpoints	2.28e-09
DNA Repair	1.95e-04

**Tabla número 6. Análisis de coexpresión de ADAR1 en distintas cohortes de adenocarcinoma mamario.** Se muestra la tabla de coexpresión de ADAR1 en la cohorte TCGA. Se pueden apreciar las vías de señalización más significativas asociadas a la expresión de ADAR1 derivado del análisis de coexpresión de ADAR1 para la cohorte TCGA. Se muestran las 5 vías de señalización con mayor p-value corregido (Pearson con Bonferroni).

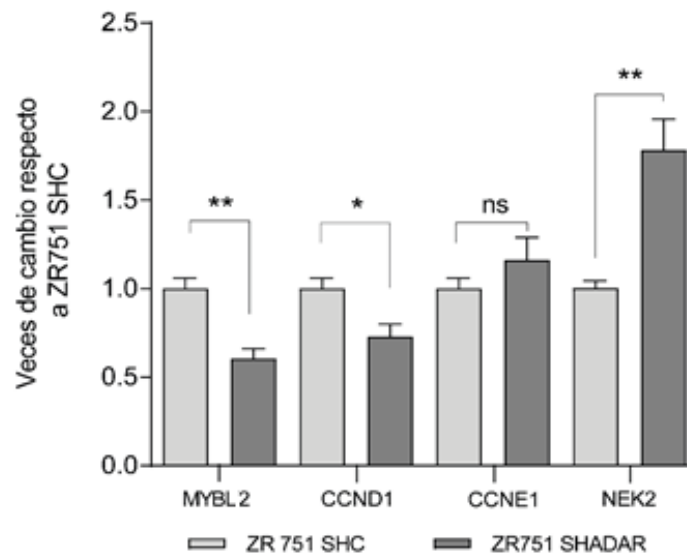
Adicionalmente, se realizó un análisis de enriquecimiento de ontologías utilizando los resultados provenientes de la base de datos LINCx del National Institute of Health (NIH), en colaboración con el Dr. Olivier Harismendy (Moore's Cancer Center, USC), la cual es una base de datos que presenta más de 20.000 *knock down* individuales mediante la utilización de shRNA's en 9 líneas celulares distintas, incluyendo el *knock down* de ADAR1. El análisis de enriquecimiento de ontologías derivado de la base de datos LINCx, así como los resultados de coexpresión derivados de las cohortes TCGA y USLACRN indican que existe un enriquecimiento significativo de vías de señalización asociadas a ciclo celular, fase G<sub>1</sub>-S y reparación del DNA, entre otras vías de señalización tales como la replicación del DNA, ensamblaje de snRNP, mantenimiento de los telómeros y señalización asociada a FGFR, resultados que se muestran en la Figura número 18, los cuales sugieren que ADAR1 podría estar involucrado en estos procesos biológicos.



**Figura número 18. Análisis de coexpresión de ADAR1 en distintas líneas celulares.** Análisis de coexpresión (Reactome db) para ADAR1, derivado de los datos generados por la plataforma LINCS-NIH. Los valores de significancia se encuentran en la esquina superior derecha. Gráfico realizado utilizando el software Clue-GO (Cytoscape v3.2).

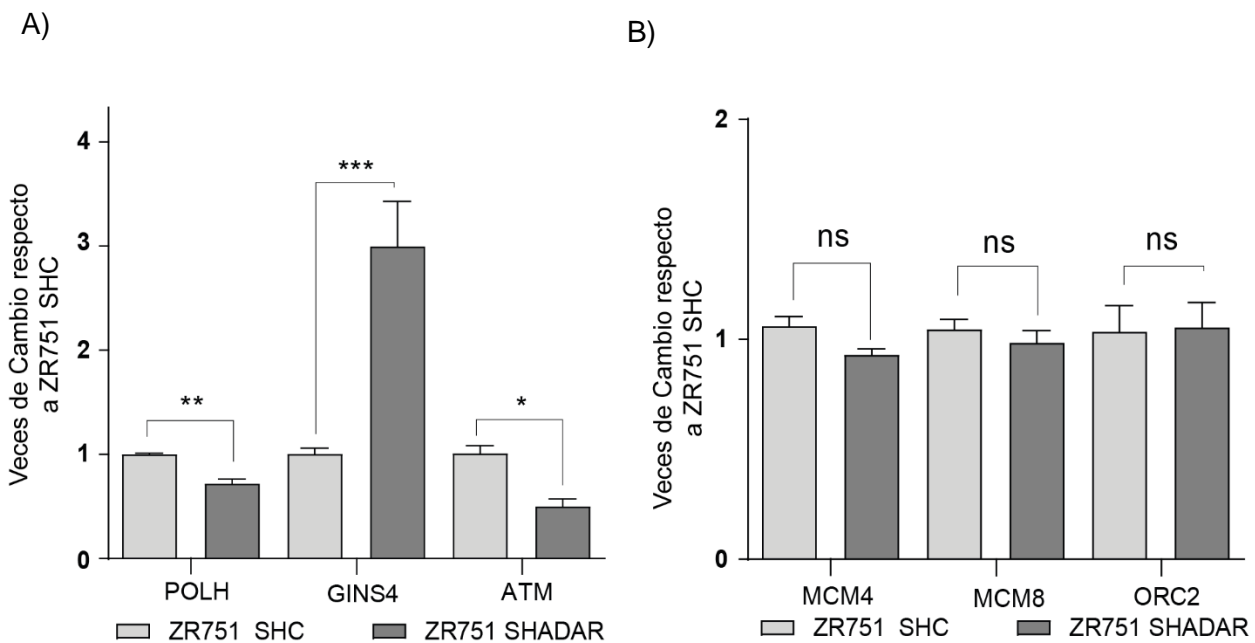
### 8.1.3. Efecto de los niveles de ADAR1 sobre la expresión de marcadores de ciclo celular, replicación y respuesta al daño en el DNA.

Considerando los resultados obtenidos del análisis de las bases de datos genómicas, se evaluó la expresión de diversos marcadores asociados al ciclo celular en los modelos celulares ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR, mediante qRT-PCR. En la Figura número 19 se pueden observar cambios significativos de los niveles del mRNA de distintos marcadores asociados a G<sub>1</sub>-S, al comparar ambos modelos celulares, encontrando una disminución significativa en la expresión de los genes de ciclina D1, el proto oncogen MYB, así como un aumento significativo en la expresión del marcador de entrada a fase S, NEK2. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de la ciclina E.



**Figura número 19. Expresión de marcadores de ciclo celular en células ZR-751 *knock down* para ADAR1.** Expresión de marcadores de ciclo celular en células ZR-751 SHC y ZR SHADAR, valores expresados en veces de cambio respecto a células ZR SHC. \*<0.05, \*\*<0.005, ns: sin diferencias significativas. Gráfico de barras, N=3. Media +/- SEM.

Al mismo tiempo, se evaluaron los niveles de mRNAs asociados a los procesos de respuesta al daño del DNA (DDR) y replicación celular en los modelos celulares ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR. Nuestros resultados sugieren que la disminución de la expresión de ADAR1 tiene un impacto significativo en la expresión de algunos de los genes evaluados, incluyendo cambios en la expresión de los mensajeros de GINS4, ATM y POLH. Sin embargo, al evaluar otros mRNAs relacionados a estos procesos – editados por ADAR1- tales como los mRNAs de ORC2, MCM4 y MCM8 no se encontraron diferencias significativas en los niveles de mensajero al comparar ambos modelos celulares (Figura número 20).

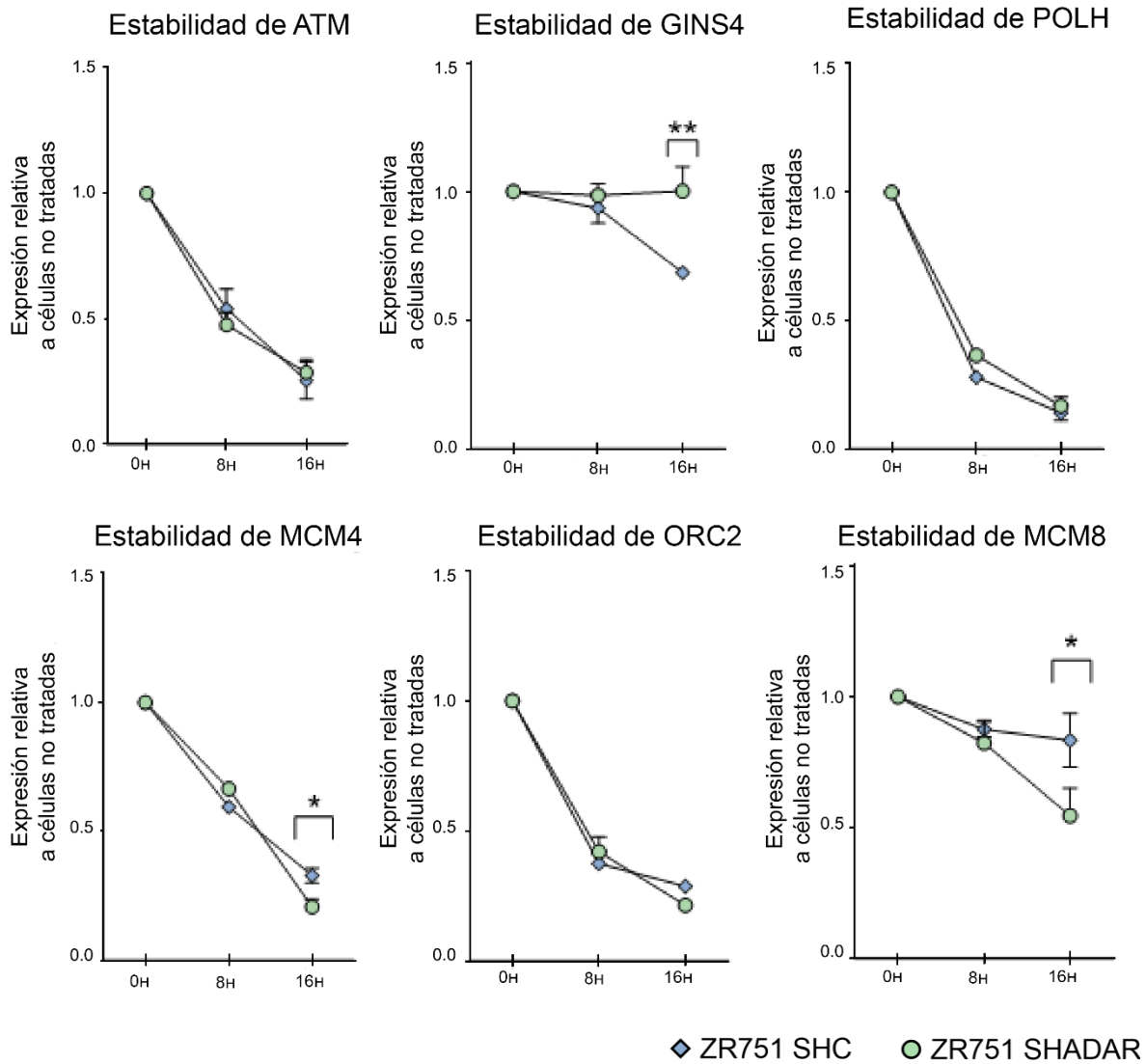


**Figura número 20. Expresión de marcadores de Respuesta al daño del DNA y Replicación en células ZR-751 knock down para ADAR1.** Expresión de marcadores de respuesta al daño del DNA (A) y replicación celular (B) en células ZR-751 SHC y ZR SHADAR. Valores expresados en veces de cambio respecto a células ZR SHC. T-Test de 2 vías. \*<0.05, \*\*<0.005, \*\*\*<0.001, ns: sin diferencias significativas. Gráfico de barras, N=3. Media +/- SEM.

#### **8.1.4 Evaluación del efecto de la disminución de los niveles de ADAR1 sobre la expresión y estabilidad de mRNAs asociados a replicación y respuesta al daño en el DNA.**

Con la finalidad de profundizar en el efecto de ADAR1 sobre la estabilidad en mRNAs asociados a la replicación y respuesta al daño del DNA se inhibió la síntesis de mRNAs, utilizando del inhibidor farmacológico Actinomicina D, un inhibidor no selectivo de la RNA polimerasa II, cuyo mecanismo de acción es inhibir la función de la topoisomerasa, impidiendo el avance de la RNA polimerasa y la síntesis de nuevos transcritos. Brevemente, células ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR fueron incubadas con una concentración final de 3 µg/ml de actinomicina D durante dos periodos, como se describe en materiales y métodos (sección 7.15) para, posteriormente, analizar las diferencias de expresión, comparando la estabilidad de los mensajeros entre células controles y células con el *knock down* de ADAR1. Tras comparar la estabilidad en el tiempo entre ambos modelos celulares, se evidenció la existencia de diferencias significativas en la estabilidad de los mRNAs de MCM4, MCM8 y GINS4, mientras que no se encontraron diferencias significativas para los transcritos de ATM, POLH y ORC2 (Figura número 21). Estos resultados sugieren que la estabilidad de los mRNAs de los genes MCM4, MCM8 y GINS4 se ve afectada en células ZR-751 *knock down* para ADAR1, en comparación a las células controles. Además, estos resultados sugieren que los cambios en la expresión de ATM y POLH no serían explicados por la variación en la estabilidad de sus transcritos.





**Figura número 21. Estabilidad de RNA mensajeros en células ZR-751 *knock down* para ADAR1.** Ensayos de estabilidad de los mensajeros de POLH, ATM, ORC2, GINS4, MCM8 y MCM4 en células ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR tratadas con Actinomicina (3 µg/mL). Ensayo realizado para N=3; T-Test de 2 vías \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , datos normalizados respecto a células no tratadas (T0 h), Media +/- SEM.

### **8.1.5 Evaluación del efecto de la disminución de los niveles de ADAR1 sobre la expresión y estabilidad del transcriptoma completo en células ZR-751.**

Finalmente, fue realizado un experimento de secuenciación de RNA en células ZR-751 SHC y células ZR-751 SHADAR; También, fueron secuenciados los RNAs de células ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR posterior a la inhibición farmacológica de la RNA polimerasa II, utilizando el inhibidor farmacológico Triptolide, el cual inhibe de manera selectiva la transcripción mediada por la RNA polimerasa II, inhibiendo la actividad ATPasa de uno de los factores generales de la transcripción, impidiendo el posicionamiento y avance del complejo de la transcripción <sup>107,108</sup>.

Para este experimento, células ZR-751 SHC y SHADAR fueron tratadas durante 16 h con este inhibidor o su control de vehículo (DMSO) de acuerdo a lo descrito en la metodología para posteriormente ser secuenciados sus RNAs y, finalmente, evaluar las diferencias producidas tras este tratamiento en ambos modelos celulares. Así, fue realizada la extracción de RNA y tratamiento con DNAsa de cada una de las muestras, para posteriormente cuantificar y analizar la calidad del RNA extraído en cada condición y replicado, utilizando un sistema automatizado de electroforesis capilar (Experion, Biorad). En la Tabla número 6 y Figura anexa número 3 se presentan el número de muestras incluidas, los índices de calidad, como también las concentraciones (ng/μL) de cada una de las muestras. Estos resultados indican que todas las muestras incluidas en el experimento presentaban la calidad y concentración suficientes para realizar librerías de secuenciación de sus RNAs.

Posterior a la generación de las librerías y su secuenciación fueron analizados parámetros generales de la secuenciación para cada muestra, incluyendo una inspección general y cuantificación de lecturas por muestra (Tabla anexa número 1), por medio de la utilización de software FastQC (datos no mostrados). Los resultados de este análisis mostraron un número de lecturas de 42.725.000 lecturas promedio para cada muestra, mostrando un índice de calidad Q mayor a 30 a lo largo de todos los ciclos de

secuenciación para todas las muestras. Además, una gran proporción de lecturas poseía un largo concordante con las especificaciones de la librería (100 pares de bases). Así, y en su conjunto, la inspección de los resultados de secuenciación mostraban que las librerías secuenciadas presentaban los parámetros de calidad y número de lecturas suficiente para realizar análisis de llamado de variantes en el mRNA y el análisis de expresión diferencial, acorde a las sugerencias de Piskol (2013) y Ramaswami (2013).

Adicionalmente, fueron realizados análisis de componente principal y agrupamiento para analizar la interrelación de las muestras para, por último, realizar el análisis de expresión diferencial y llamado de variantes en el RNA, comparando las células ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR. Los resultados del análisis de componente principal, presentados en las Figuras anexas 4 y 5, muestran diferencias significativas entre las células SHC y SHADAR, así como también entre cada réplica biológica, diferencias tomadas en consideración en los análisis posteriores.

Una vez realizados los análisis de control de calidad, se diseñó un flujo bioinformático para el análisis de expresión diferencial y el llamado de variantes, para así analizar las diferencias en el número de variantes atribuibles a ADAR en los modelos celulares ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR. La Figura anexa 6 resume ambos flujos de trabajo, incluyendo el procesamiento de los archivos de secuenciación (.fastq), los softwares utilizados y parámetros generales utilizados para el análisis.

Los resultados del análisis de cuentas de transcritos en el RNA confirman una inhibición promedio de un 63% de ADAR1 en los modelos ZR-751 SHADAR, respecto a los modelos SHC. Además, las células ZR-751 SHADAR presentan un número significativamente menor de variantes A > G totales, al ser comparadas con los modelos ZR-751 SHC. Estos resultados se presentan en la Figura número 22, confirmando una inhibición significativa de la expresión de ADAR1 y la función de esta proteína. Por otro lado, en ninguno de los modelos celulares se detectaron lecturas para las otras isoformas de ADAR en nuestro análisis (Figura anexa número 7C).

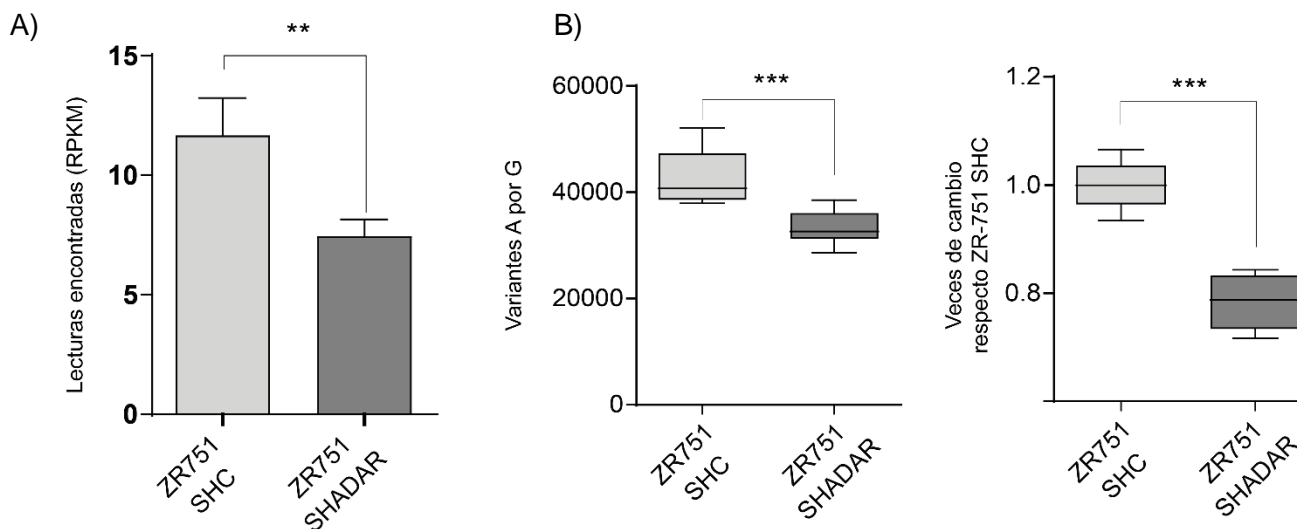
	Nombre de la muestra	ID	Concentración de RNA (ng/μL)	Ratio (28S:18S)	RQI
1	SHC N1	1	306.31	1.82	10
2	SHC DMSO N1	2	281.08	1.8	10
3	SHC Triptolide N1	3	231.93	1.54	9.8
7	SHADAR N1	7	205.23	1.87	10
8	SHADAR DMSO N1	8	208.04	1.78	10
9	SHADAR Triptolide N1	9	108.76	1.56	9.8

	Nombre de la muestra	ID	Concentración de RNA (ng/μL)	Ratio (28S:18S)	RQI
1	SHC N2	1	492.99	1.74	10
2	SHC DMSO N2	2	371.4	1.69	9.9
3	SHC Triptolide N2	3	358.76	1.51	9.8
7	SHADAR N2	7	342.67	1.83	10
8	SHADAR DMSO N2	8	366.37	1.67	9.9
9	SHADAR Triptolide N2	9	334.88	1.54	9.8

	Nombre de la muestra	ID	Concentración de RNA (ng/μL)	Ratio (28S:18S)	RQI
1	SHC N3	1	264.23	1.86	10
2	SHC DMSO N3	2	224.08	1.85	10
3	SHC Triptolide N3	3	115.69	1.56	9.8
7	SHADAR N3	7	126.84	1.56	9.8
8	SHADAR DMSO N3	8	73.12	1.72	9.9
9	SHADAR Triptolide N3	8	52.32	1.49	9.8

**Tabla número 6. Control de calidad de los RNAs totales incluidos en experimentos de secuenciación de RNA.** Tabla resumen de los RNAs incluidos en los experimento de secuenciación de RNA, donde se incluyen parámetros de la muestra como la concentración (ng/μL), la relación 28S:18S y el parámetro de control de calidad RQI.

Posterior al análisis de cuentas o lecturas individual para las isoformas de ADAR, se realizó el análisis de expresión diferencial entre las células ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR, para seguidamente realizar un análisis de enriquecimiento de vías de señalización utilizando el software Cytoscape v3.5.0 y el *plugin* ClueGo v2.3.3 (Reactome Pathways) para así poder identificar las vías de señalización que disminuyen y aumentan su expresión como consecuencia del *knock down* de ADAR1.



**Figura número 22. El *knock down* de ADAR1 produce una disminución en el número de lecturas encontradas para este mRNA, así como una disminución en el número de variantes A por G en las células ZR-751 transducidas con el shRNA.** A) Número de cuentas (RPKM) encontradas en las muestras ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR secuenciadas, para el transcrito de ADAR1. B) número de variantes A > G encontradas en las células ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR secuenciadas. Además, se muestra esta proporción en veces de cambio, respecto a células ZR-751 SHC. N=6 T-test de dos vías \*\*< 0.01, \*\*\*\*<0.0001. Gráfico de barras, Media +/- SEM.

El resultado del análisis de expresión diferencial, el cual se muestra en la Tabla número 7A y 7B, muestra que el *knock down* de ADAR1 produce una inhibición significativa de la expresión de vías de señalización asociadas al ciclo celular y señalización dependiente de PI3K-AKT, destacando la señalización dependiente del Insulin receptor substrate (IRS1), IGF1R (Insulin like growth factor receptor) y la

señalización dependiente de AKT. Además, el *knock down* de ADAR1 en células ZR-751 SHADAR produce un aumento significativo en la expresión de la señalización dependiente de NGF, un aumento de la transcripción general, así como la sobreexpresión de la muerte celular programada mediada por un aumento en la expresión de mensajeros de la vía de señalización de JNK ( *c-Jun kinases*).

A)

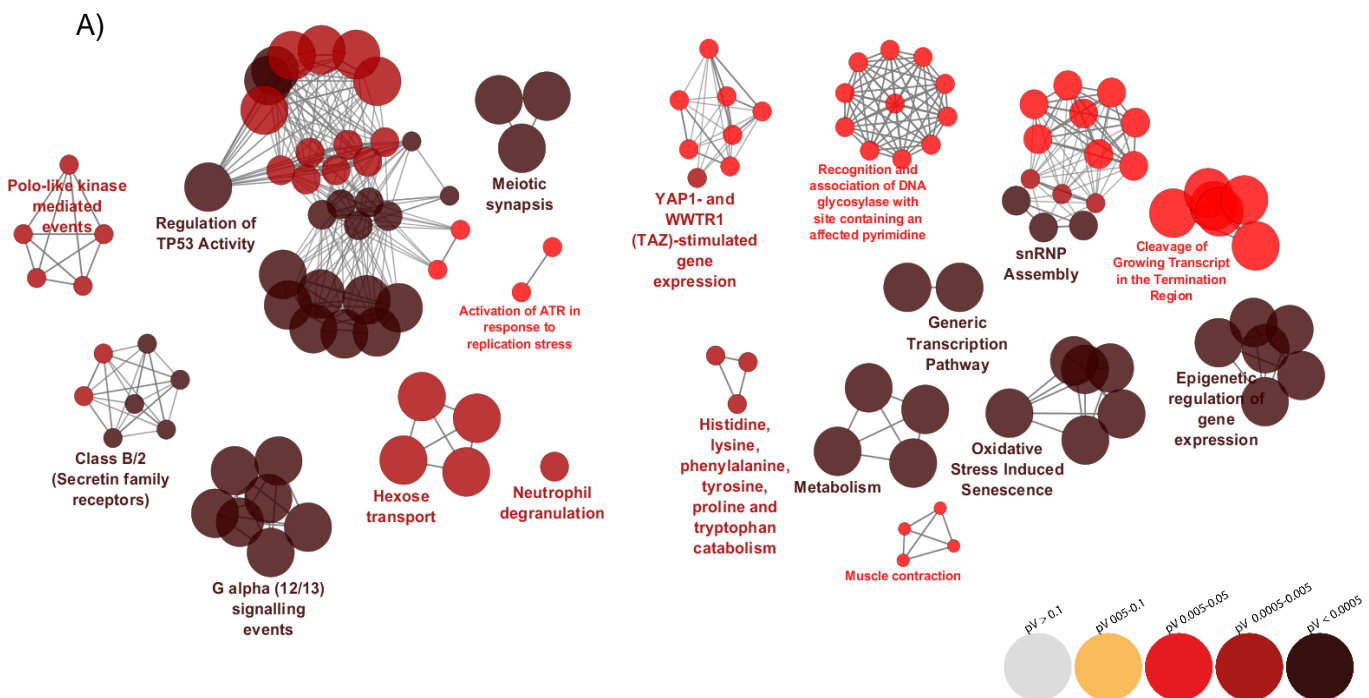
GOTerm	Term PValue
<b>Meiotic synapsis</b>	<b>4.91E-04</b>
Neurotransmitter Receptor Binding And Downstream Transmission In The Postsynaptic Cell	5.93E-04
Neurotransmitter Release Cycle	0.0017292
<b>IRS-mediated signalling</b>	<b>0.00376739</b>
<b>Activation of AKT2</b>	<b>0.01146697</b>
Generic Transcription Pathway	0.02425795
<b>SHC-related events triggered by IGF1R</b>	<b>0.02606547</b>

B)

GOTerm	Term PValue
<b>Generic Transcription Pathway</b>	<b>2.23E-05</b>
Gene Expression	2.23E-05
Signalling by NGF	4.12E-04
<b>NRAGE signals death through JNK</b>	<b>4.12E-04</b>
<b>p75 NTR receptor-mediated signalling</b>	<b>4.12E-04</b>
<b>Cell death signalling via NRAGE, NRIF and NADE</b>	<b>4.12E-04</b>
Signaling by GPCR	4.12E-04

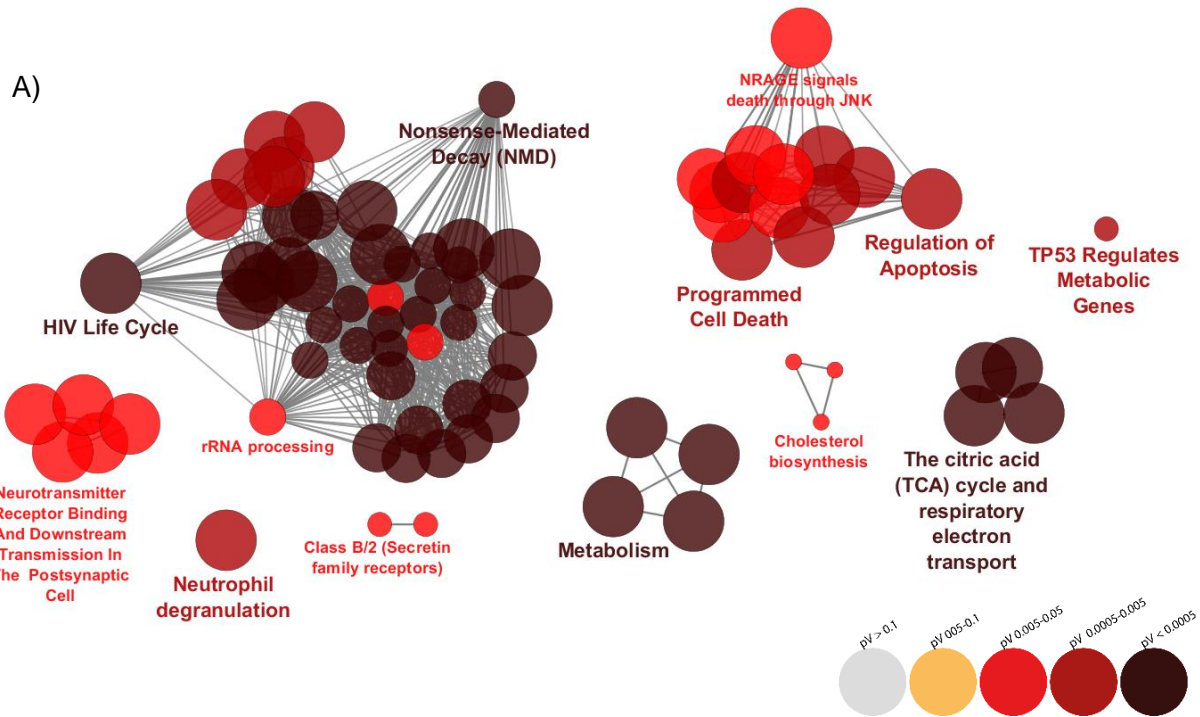
**Tabla número 7. Análisis de enriquecimiento de ontologías.** A) Análisis de enriquecimiento de Vías de señalización para mRNAs que presentan una disminución en la expresión en células ZR-751 SHADAR, respecto a células SHC. B) Análisis de enriquecimiento de Vías de señalización para mRNAs que presentan un aumento en la expresión en células ZR-751 SHADAR, respecto a células SHC. Fue utilizada la lista de genes con un Pvalue menor a 0.05, así como un *fold change* mayor a 0.2 veces, respecto al tratamiento control.

Para evaluar si existe una relación entre los cambios en niveles de expresión de mRNAs y la estabilidad de los mensajeros, se analizó el experimento de secuenciación de RNA en presencia del inhibidor específico de la RNA polimerasa. Los resultados de la inhibición de la actividad transcripcional en ambos modelos celulares se pueden ver reflejados en las Figuras número 23 y número 24, donde se aprecia que existe una disminución significativa de la estabilidad de mRNAs involucrados en múltiples procesos biológicos, incluyendo a los las ontologías y vías de señalización relacionadas a la progresión del ciclo celular, la replicación del DNA y respuesta al daño del DNA, y la transcripción general al comparar las células ZR-751 SHADAR respecto a las células ZR-751 SHC.



**Figura número 23. Agrupaciones de mRNAs que sufren una disminución en su estabilidad en células ZR-751 SHADAR, respecto a células ZR-751 SHC.** A) Análisis de enriquecimiento de vías de señalización (Reactome db) de aquellos mRNAs que sufren una disminución significativa de su estabilidad al ser tratados con triptolide en células SHADAR, respecto a células SHC.

Por otro lado, un pequeño grupo de ontologías sufre un aumento en la estabilidad de sus mRNAs en las células SHADAR respecto a las células SHC, incluyendo a vías de señalización asociadas a la regulación de la apoptosis y el metabolismo del RNA general donde se incluye el procesamiento de RNAs virales, degradación del mRNA y el procesamiento del RNA ribosomal.

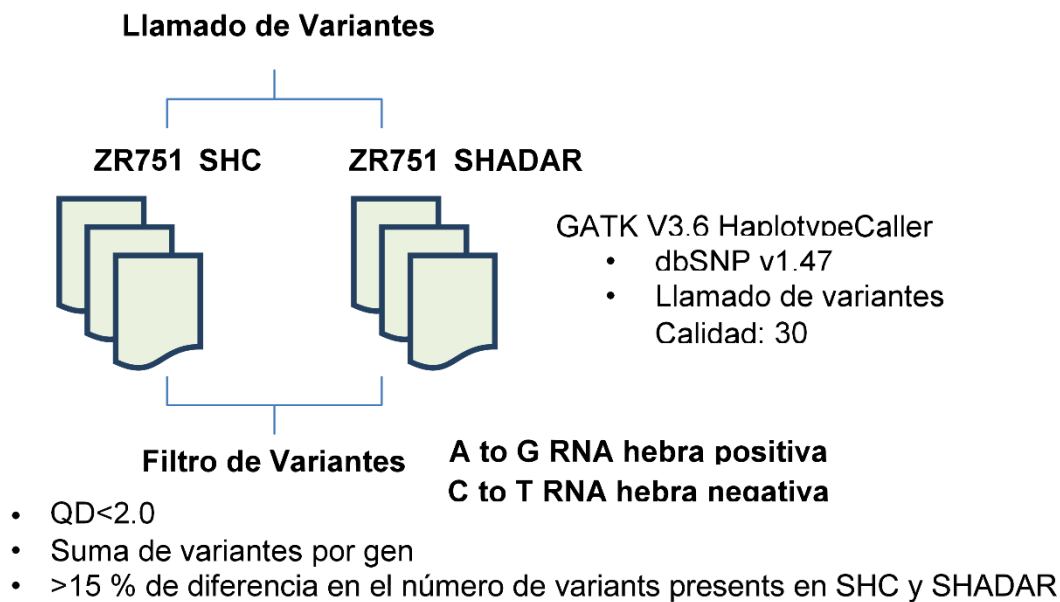


**Figura número 24. Agrupaciones de mRNAs que sufren un aumento en su estabilidad en células ZR-751 SHADAR, respecto a células ZR-751 SHC.** A) Análisis de enriquecimiento de vías de señalización (Reactome db) de aquellos mRNAs que sufren un aumento significativo de su estabilidad al ser tratados con triptolide en células SHADAR, respecto a células SHC.

Ya realizados los análisis de expresión diferencial en ambos diseños experimentales, fue realizado el estudio de variantes presentes en el mRNA en las células ZR-751 SHC y SHADAR. Para ello, fueron seleccionadas sólo aquellas variantes A > G llamadas por el *variant caller*, para luego ser contadas y, finalmente, segregadas por posiciones genómicas, con la finalidad de contabilizar el número de variantes presentes en cada mRNA/gen a lo largo de las muestras. En la Figura número 25 se presenta el diagrama de trabajo utilizado para el conteo de variantes. Realizado el conteo de variantes

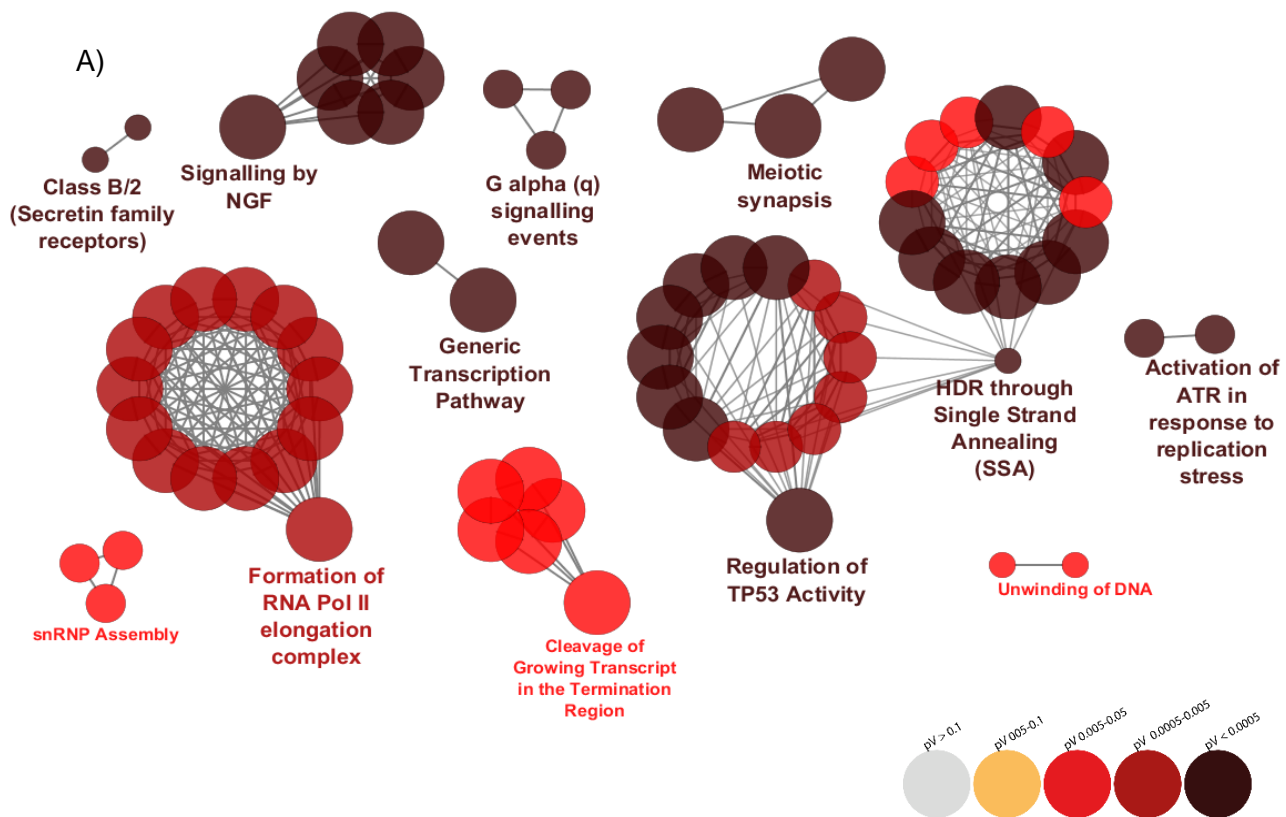


en cada muestra, estas fueron sumadas para luego comparar las cuentas por gen en modelos SHC y SHADAR incluidos en la secuenciación de RNA, para, al final, realizar una comparación entre ambas condiciones, donde fueron incluidos solo aquellos genes cuya diferencia en conteos fuese mayor a un 15% entre las células SHC y células SHADAR (luego de realizar un diagrama de frecuencias, datos no mostrados), generando una lista de genes diferencialmente editados que posteriormente fue analizada utilizando el software ClueGo v2.3.3 (Reactome pathways).



**Figura número 25. Diagrama de flujo para el procesamiento y obtención mRNAs diferencialmente editados en las muestras secuenciadas.** Figura resumen del flujo de trabajo para la identificación de genes diferencialmente editados entre células ZR-751 SHADAR y SHC.

Los resultados de este análisis se muestran en la Figura número 26. Se encontró un enriquecimiento significativo de genes asociados a las vías de señalización de la transcripción general mediada por la RNA polimerasa II, la regulación transcripcional de la respuesta al daño del DNA, incluyéndose la regulación de TP53 y ATR, así como la señalización dependiente de NGF, destacando, además, los mRNAs involucrados en la activación de ATR en respuesta al estrés replicativo y mRNAs relacionados a la regulación transcripcional de p53.



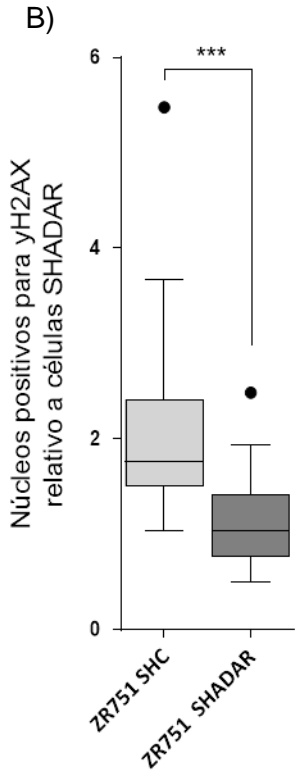
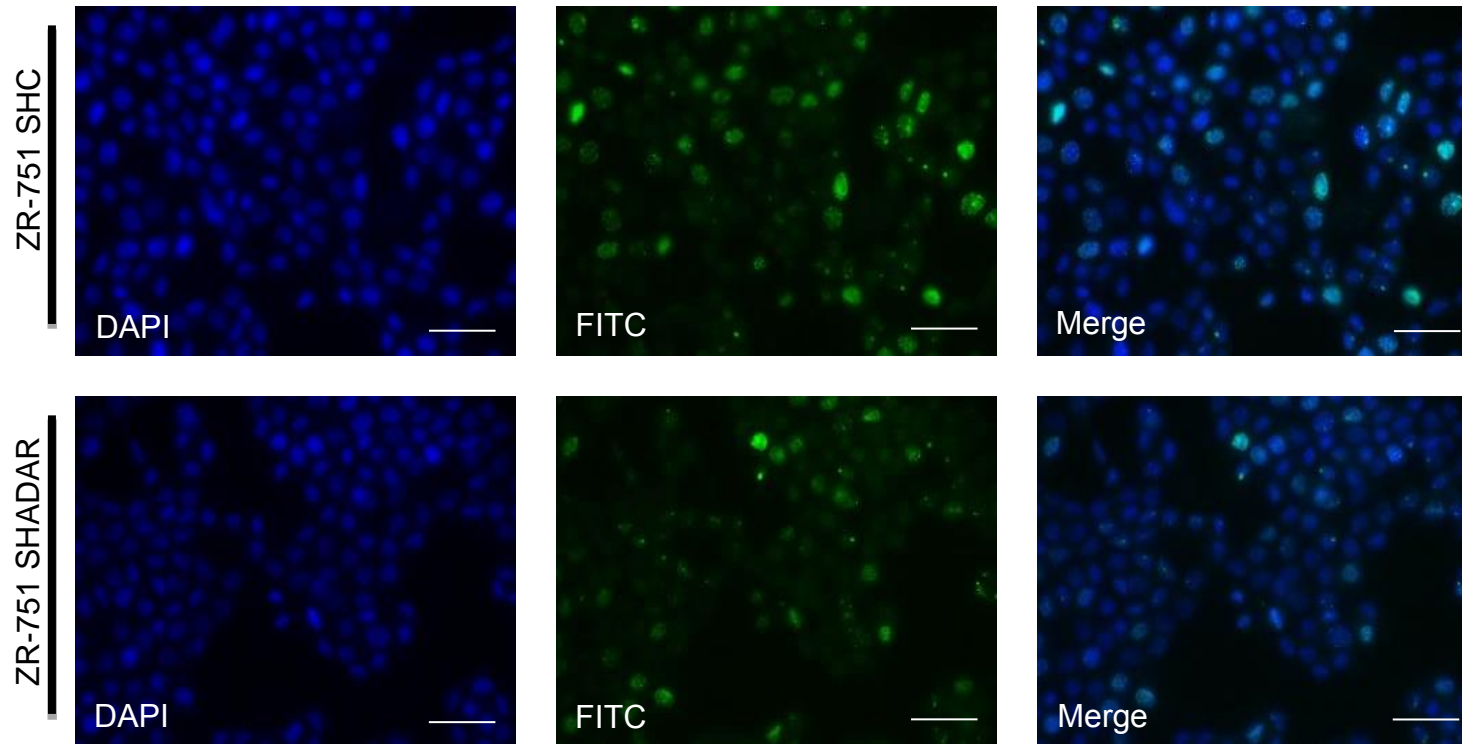
**Figura número 26. Agrupaciones de mRNAs que presentan una disminución de sus variantes A por G en células ZR-751 SHADAR, respecto a células ZR-751 SHC. A) Análisis de enriquecimiento de vías de señalización (Reactome db) de aquellos mRNAs que sufren una disminución significativa del número de variantes A > G comparando células ZR-751 SHC y células ZR-751 SHADAR.**

## **8.2. Determinar el efecto de la expresión de ADAR1 sobre el estrés replicativo en las líneas celulares MCF-7 y ZR-751.**

Dado que ADAR1 modifica a un conjunto de mRNAs asociados a la respuesta al daño del DNA, replicación y puntos de control del ciclo celular, se propuso evaluar la respuesta al daño del DNA mediante inmunofluorescencia indirecta en células ZR-751 SHADAR y células ZR-751 SHC, por medio del análisis y cuantificación de núcleos positivos del marcador general de la respuesta al daño del  $\gamma$ H2AX. Este marcador corresponde a la fosforilación de la serina 139 (S139) de la histona H2AX, el cual es fosforilado por las quinasas ATM y ATR, induciendo el reclutamiento de distintos complejos proteicos en respuesta al daño al DNA, permitiendo su reparación. El resultado de este experimento, mostrado en la Figura número 27A y la cuantificación de este en la Figura número 27B, muestran una disminución significativa en el número de núcleos positivos para  $\gamma$ H2AX en células ZR-751 SHADAR, respecto a células controles ZR-751 SHC.

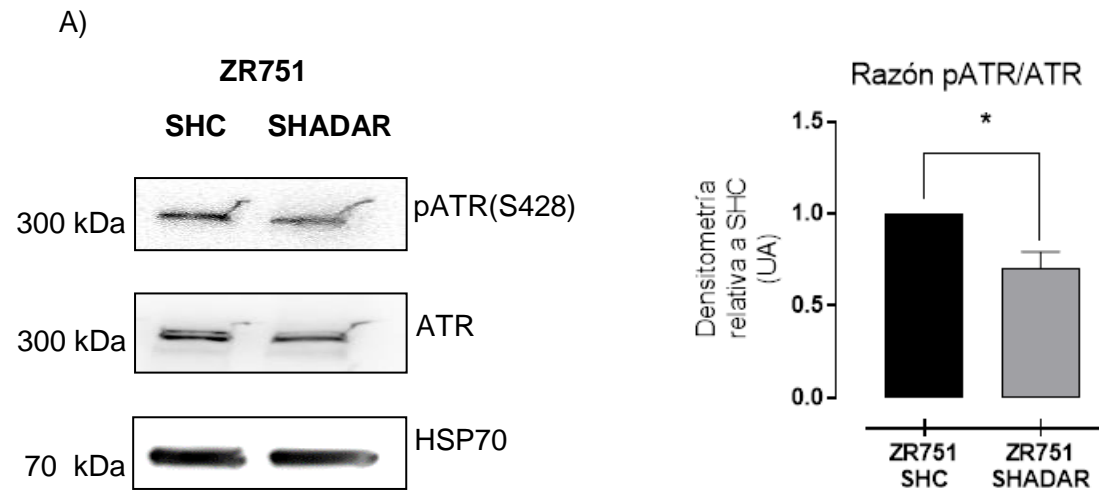
Posterior a este experimento, fue analizada la cascada transduccional de la respuesta al daño del DNA en células ZR-751 controles y células *knock down para* ADAR1, por medio de western blot, donde fueron incluidos los análisis de las quinasas CHEK1 y su fosforilación activadora pCHEK1 en serina 345 (S345), CHEK2 y su fosforilación activadora pCHEK2 treonina 68 (T68), ATR y la fosforilación activadora de esta quinasa pATR serina 428 (S428), así como ATM y su fosforilación activadora en serina 1981 (S1981), para así analizar los niveles de expresión proteica y su activación en las células anteriormente descritas.

A)

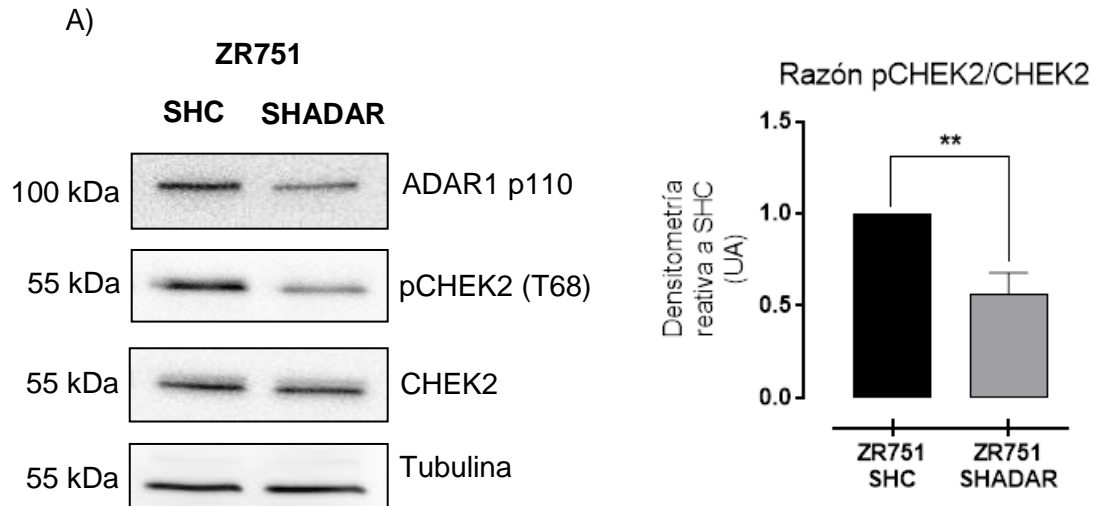


**Figura número 27. Células ZR-751 *knock down* para ADAR1 presentan menor número de núcleos positivos para  $\gamma$ H2AX.** A) Imágenes representativas de la señal de  $\gamma$ H2AX en células ZR-751 SHC y SHADAR. B) Cuantificación de núcleos positivos de  $\gamma$ H2AX en células ZR-751 SHC y SHADAR, Cuantificados 20 campos para cada condición. Cajas y bigotes con distribución de Tukey, N=4. Expresado en veces de cambio respecto a células SHADAR. Barra de escala corresponde a 40  $\mu$ m.

Los resultados obtenidos de los experimentos de western blot muestran una disminución significativa de la activación de la quinasas ATR, sin encontrar diferencias significativas en los niveles totales de esta proteína al analizar ambos modelos celulares, resultado que se muestra en la Figura número 28. Adicionalmente, nuestros resultados muestran una disminución significativa de la activación de pCHEK2 (T68) en las células ZR-751 SHADAR, en comparación a las células ZR-751 SHC tras realizar el análisis densitométrico correspondiente, resultado que se puede observar en la Figura número 29.



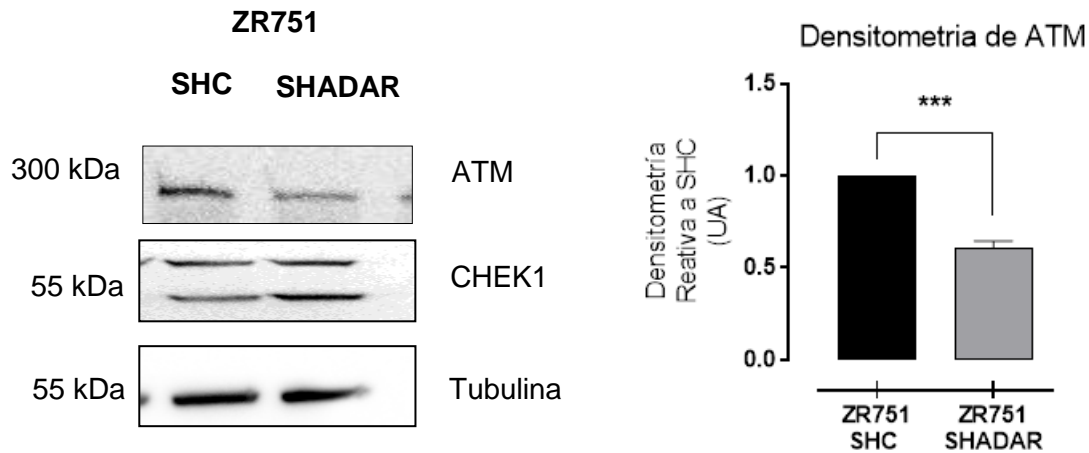
**Figura número 28. Células ZR-751 *knock down* para ADAR1 presentan una disminución de la fosforilación activadora de ATR.** Western blot representativo de ATR y su fosforilación activadora en células ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR. Además, se muestran los valores normalizados de la señal densitométrica (UA) comparando células ZR-751 SHC y SHADAR; N= 4 T-Test de 2 vías \* $<0.05$ . Gráfico de barras, Media +/- SEM.



**Figura número 29. Células ZR-751 *knock down* para ADAR1 presentan una disminución de la fosforilación activadora de CHEK2.** Western blot representativo de CHEK2 y su fosforilación activadora en células ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR. Además, se muestran los valores normalizados de la señal densitométrica (UA) comparando células ZR-751 SHC y SHADAR; N= 4 T-Test de 2 vías  $** < 0.01$ . Gráfico de barras, Media +/- SEM.

Concordantemente con los resultados derivados del qRT-PCR descrito con anterioridad, encontramos una disminución significativa de la cantidad de ATM total en las células ZR-751 *knock down* en comparación a las células controles, como se puede observar en la Figura número 30. Conjuntamente a estos resultados, no se encontraron diferencias significativas en la expresión proteica de CHEK1, tras comparar los extractos proteicos de los modelos ZR-751 SHC y SHADAR (Figura número 30). Así también, cabe destacar que no fue posible evidenciar la fosforilación de CHEK1 y ATM (S1981) en los modelos celulares analizados.

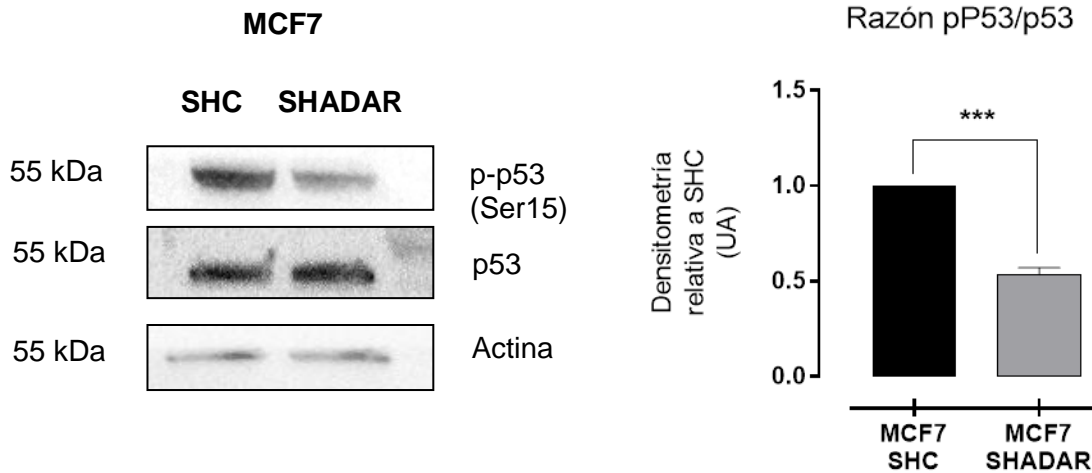
A)



**Figura número 30. Células ZR-751 *knock down* para ADAR1 presentan una disminución en la cantidad proteica de ATM.** Western blot representativo de ATM y su CHEK1 en células ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR. Además, se muestran los valores normalizados de la señal densitométrica (UA) comparando células ZR-751 SHC y SHADAR; N=3 T-Test de 2 vías  $** < 0.01$ . Gráfico de barras, Media +/- SEM.

Diversos trabajos han demostrado que la respuesta al daño del DNA tiene como consecuencia la activación de p53, la cual desencadena una amplia respuesta celular, que involucra procesos reparatorios del DNA, cambios transcripcionales e incluso la apoptosis celular <sup>109-111</sup>. En este sentido, fueron evaluados los niveles de activación de p53 (serina 15, S15) y la cantidad total de esta proteína en los modelos celulares MCF7 SHC y MCF7 SHADAR por medio de western blot. Se optó por usar estas células tumorales en particular ya que conservan una mayor actividad de esta proteína supresora de tumores, en comparación a las células ZR-751 <sup>112</sup>. Los resultados derivados del análisis densitométrico, mostrado en la Figura número 31, muestran una disminución significativa en la activación de p53 en los modelos *knock down*, en comparación a las células controles, sin encontrar diferencias significativas en la cantidad total de p53 en ambos modelos.

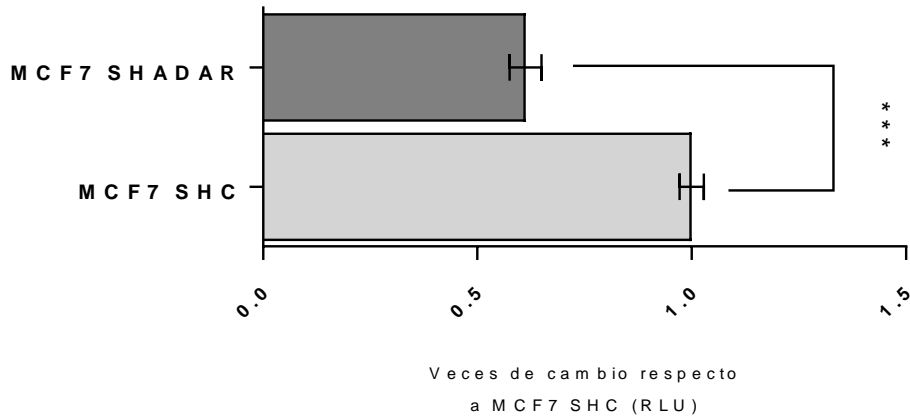
A)



**Figura número 31. Células MCF7 *knock down* para ADAR1 presentan una disminución de la fosforilación activadora de p53.** Western blot representativo de p53 y su fosforilación activadora en células MCF7 SHC y MCF7 SHADAR. Además, se muestran los valores normalizados de la señal densitométrica (UA) comparando células MCF7 SHC y MCF7 SHADAR; N= 3 T-Test de 2 vías \*\*\*<0.001.

Además, fue utilizado un ensayo reportero para analizar la actividad de p53, utilizando un vector luciferasa que en el promotor de este gen reportero posee sitios de unión y activación a p53. En este experimento el vector utilizado para la transfección presenta parte del promotor del gen p21, cuya activación transcripcional en respuesta al daño del DNA es dependiente de p53<sup>113</sup>. En la Figura número 32, se muestra el resultado derivado de este experimento, el cual muestra diferencias significativas en la señal normalizada entre ambos modelos celulares MCF7 SHC y MCF7 SHADAR, encontrando una disminución significativa de la activación o señal de la luciferasa en este último modelo, respecto a las células controles.

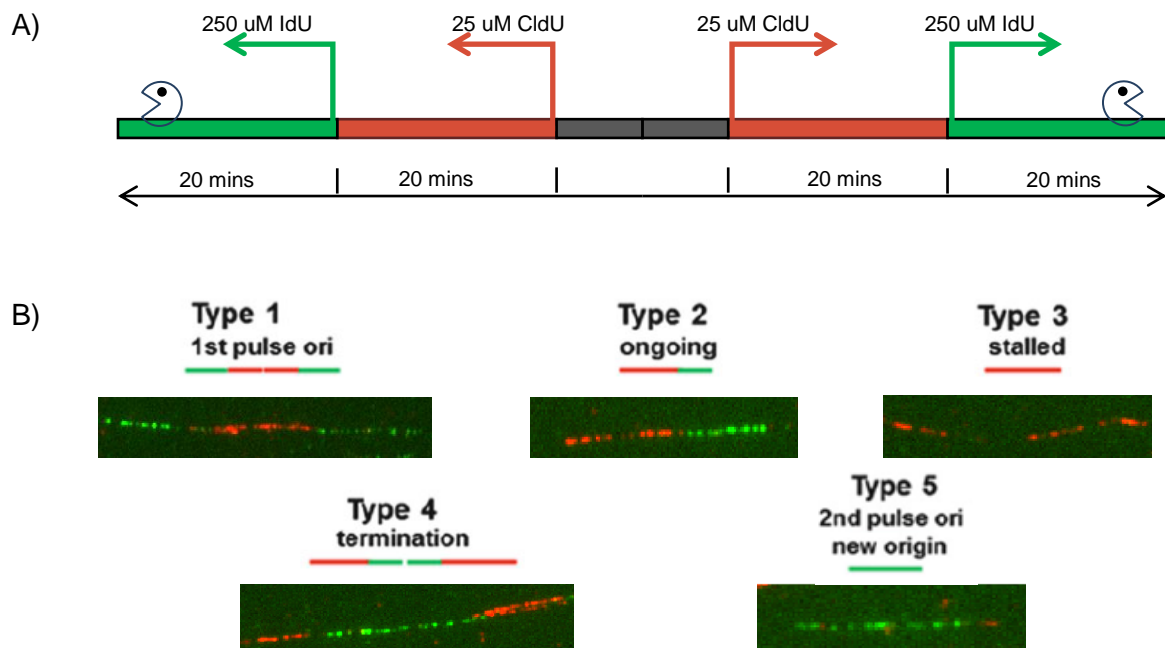




**Figura número 32. Células MCF7 *knock down* para ADAR1 presentan una disminución de la activación transcripcional dependiente de p53.** Ensayo reportero utilizado para la detección de la actividad transcripcional dependiente de p53. Se muestran los valores de intensidad normalizados, respecto a la señal de luminiscencia obtenida en células MCF7 SHC. N= 3 T-Test de 2 vías \*\*\*<0.001. Gráfico de barras, Media +/- SEM.

Finalmente, mediante inmunofluorescencia indirecta fue analizada la incorporación de análogos de nucleótidos y el estatus de las horquillas replicativas, utilizando la técnica de fibras de DNA. En la Figura número 33A se muestra un diagrama del experimento realizado, donde se describen los pulsos así como el color representado por la incubación de los anticuerpos secundarios utilizados para pesquisar a estos análogos de nucleótidos. Asimismo, la Figura número 33B muestra estructuras tipo, pesquizadas en el experimento realizado, de acuerdo a lo descrito por Nikolova y colaboradores (2017).

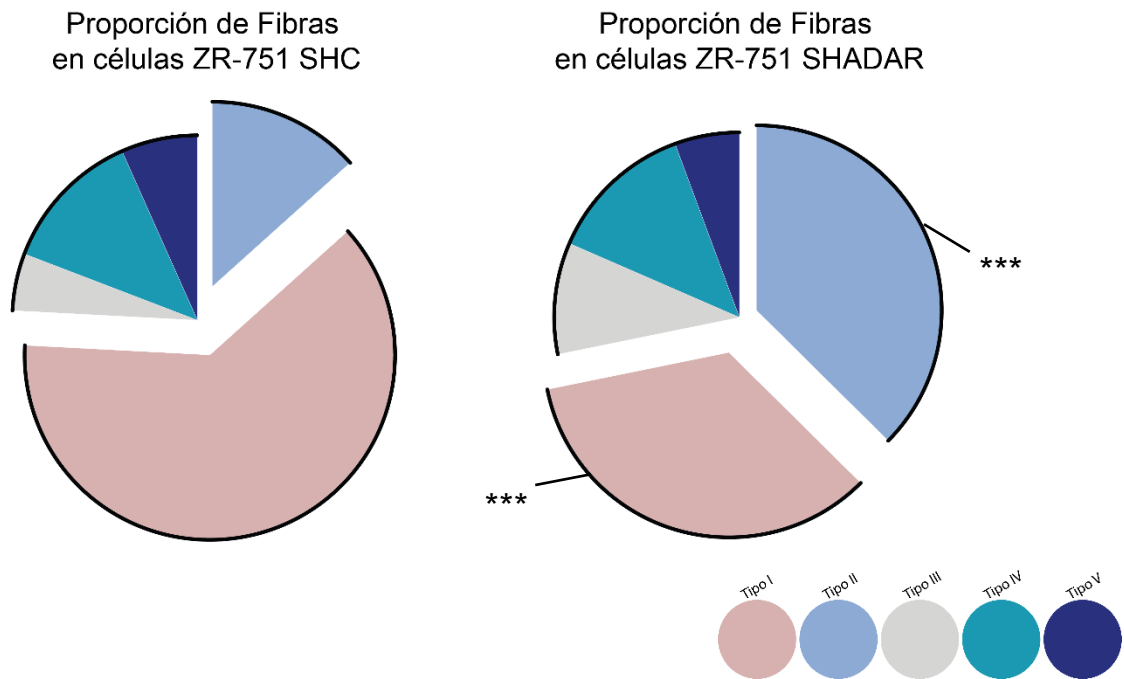
Tras la realización del ensayo y posterior inmunofluorescencia, es posible pesquisar 5 formas tipo, las que permiten describir el avance de la horquilla bidireccional propia de la replicación del DNA eucarionte: Horquillas recientemente establecidas y en avance, donde es posible visualizar un patrón continuo de 3 colores, caracterizado por un patrón de señal fluorescente verde y en su interior rojo seguido, que continua con una señal fluorescente verde, el cual es explicado por la cercanía de ambas horquillas replicativas bidireccionales, que promueven la replicación en direcciones opuestas incorporando en un primer momento el nucleótido IdU, visualizado en el canal de fluorescencia rojo para posteriormente incorporar aquel análogo que es visualizado en el canal verde.



**Figura número 33. Ensayo de fibras de DNA en células ZR-751.** A) Esquema explicativo del experimento de fibras de DNA realizado. B) Fibras pesquisadas en el análisis, según clasificación descrita por Nikolova y colaboradores (2017). Debajo del esquema de cada tipo de fibra (Type 1-5), se muestra un ejemplo de las fibras de cada tipo encontradas en el experimento (60X).

En un segundo lugar, un patrón de fibras de DNA de 2 colores denominado “fibras de tipo 2” o horquillas replicativas en movimiento, toda vez que su establecimiento y avance, desde un punto central de ambas horquillas, fue anterior a la incorporación de los análogos de nucleótidos, evidenciando un patrón de 2 colores (rojo seguido de verde). Además, y de acuerdo a Nilokova y colaboradores, existe un tercer patrón de avance de las horquillas con 3 colores, el cual corresponde a horquillas replicativas bidireccionales que se acercan entre sí, las que presentan un patrón contrario al patrón de colores formado por las fibras de tipo 1, donde las fibras presentan un patrón verde en su interior -denominado patrón del tipo 4 según lo descrito en la bibliografía-. Finalmente, se encuentran las horquillas que han sufrido una detención en su avance las cuales sólo pudieron incorporar solo el primer análogo de nucleótidos, visualizando estas fibras de color rojo -denominadas como fibras de tipo 3- y aquellas horquillas replicativas tardías que comenzaron la replicación posterior a la incorporación del análogo de nucleótidos halogenado, incorporando solamente la marca visualizada en el canal verde, las que son descritas como fibras de tipo 5 o corresponden a nuevos orígenes de replicación.

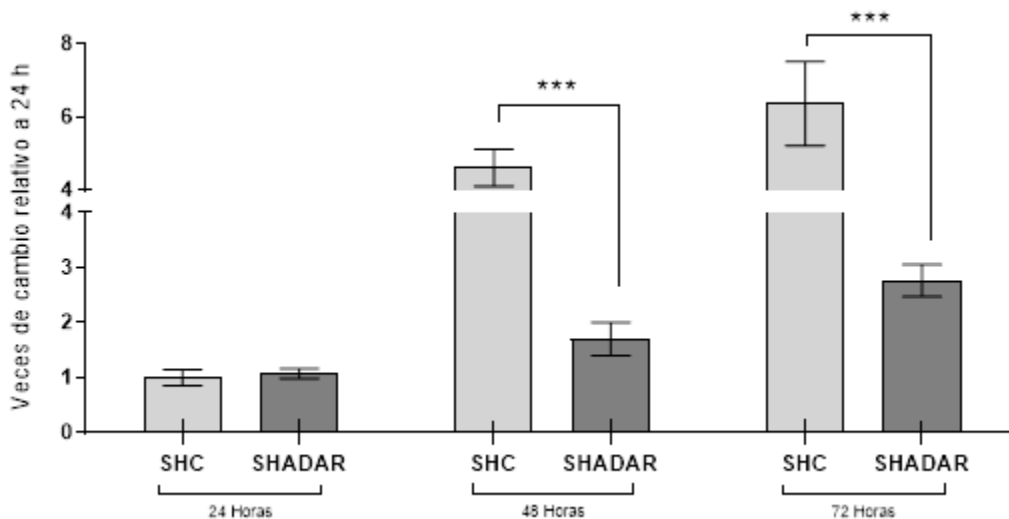
El análisis derivado del conteo de los distintos patrones presentes en las células analizadas, muestra diferencias significativas en la proporción de patrones encontrados en las células ZR-751 SHC y células ZR-751 SHADAR. Mientras que las células ZR-751 SHC presentan una mayor proporción de sitios replicativos activos (denominadas como fibras en marcha), las células ZR-751 SHADAR presentan una menor proporción de este tipo de fibras. Además, las células ZR-751 SHADAR presentan una mayor proporción de regiones replicativas recientemente establecidas en comparación a las células ZR-751 SHC, resultados que se pueden observar en la Figura número 34. Estos resultados sugieren que el avance de las horquillas replicativas en los modelos *knock down* es más lento, en comparación a las células controles. Además, las células *knock down* presentan una mayor proporción de horquillas detenidas en comparación a las células SHC, indicando que el avance de las horquillas replicativas es más dificultoso en las células *knock down* que en las células controles.



**Figura número 34. Células ZR-751 SHADAR presentan una distribución de fibras de DNA distinta a células ZR-751 SHC.** Proporción de fibras analizadas en los modelos celulares ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR. N= 3. (240 fibras individuales SHC, 192 fibras individuales para ZR-751 SHADAR). Análisis Contingencia Chi-Cuadrado y Z-Test para comparación de proporciones entre células SHC y SHADAR. \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

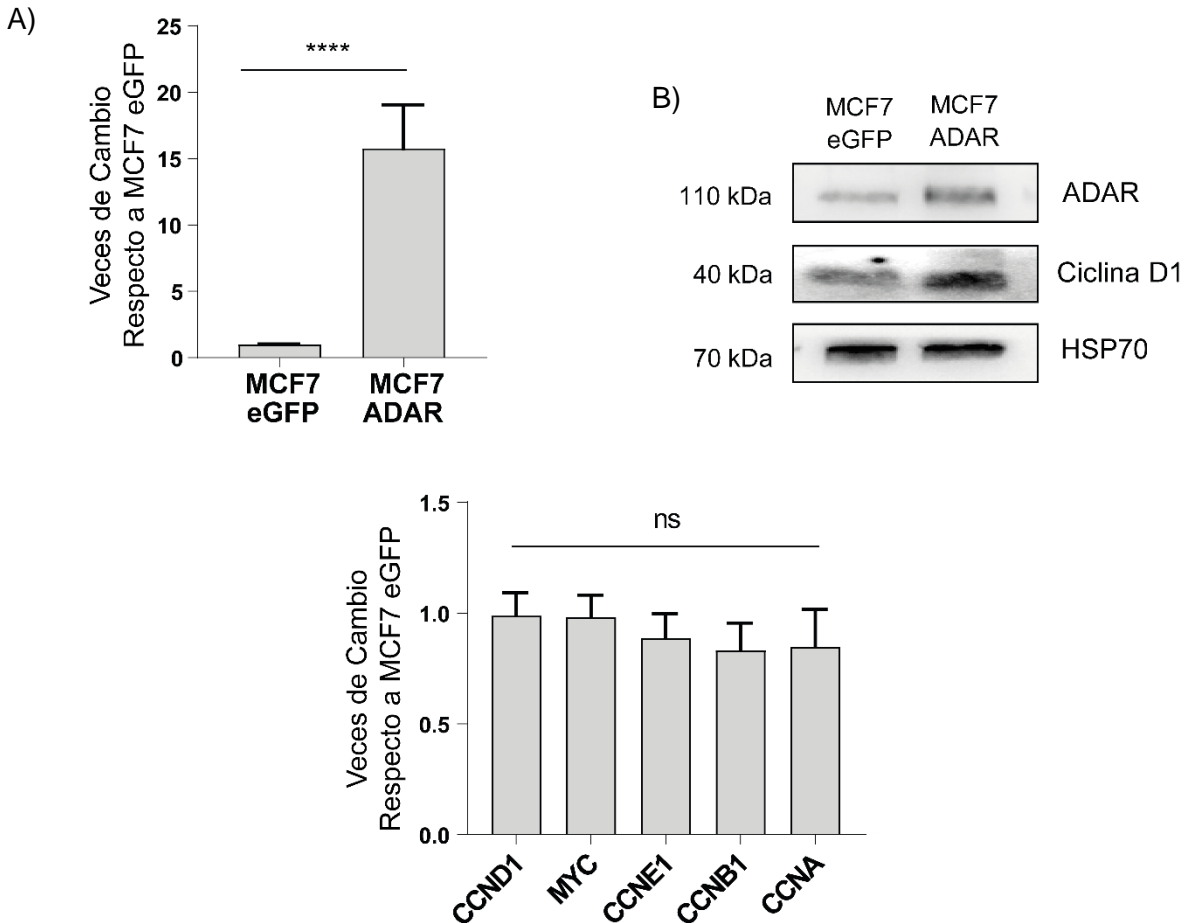
### 8.3. Evidenciar el efecto de la expresión de ADAR1 sobre la proliferación en las líneas celulares MCF-7 y ZR-751.

La actividad de ADAR1 ha sido relacionada con un aumento en la capacidad proliferativa al estimular la estabilidad proteica de la ciclina D, así como un aumento en la expresión de marcadores proliferativos, como C-MYC y la ciclina E (CCNE1) en distintos tipos celulares. Con estos antecedentes, fue analizada la capacidad proliferativa en los modelos de cáncer de mama incluidos en este trabajo mediante el ensayo de MTS. Los resultados obtenidos muestran que la disminución de la expresión de ADAR1 en las células ZR-751 se acompaña de una disminución significativa en la proliferación celular (Figura número 35), así como de una disminución significativa en la expresión de marcadores proliferativos en las células SHADAR, respecto a las células ZR-751 SHC.



**Figura número 35. Células ZR-751 SHADAR presentan una menor proliferación que células ZR-751 SHC.** Determinación de viabilidad celular en el tiempo utilizando MTS. Datos adquiridos a las 24h, 48h y 72 h. Se sembraron  $10 \times 10^4$  células al comienzo del experimento en condiciones normales de cultivo celular. Cada punto del gráfico se encuentra normalizado respecto a las 24 h de las células ZR-751 SHC N= 3. Media +/- SEM. Análisis estadístico T-test de una cola. \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

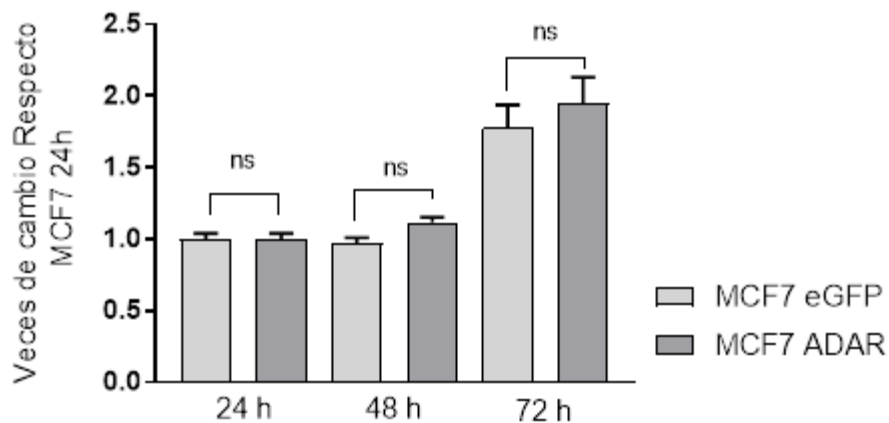
Con anterioridad fue descrito que la sobreexpresión de ADAR1 regula la estabilidad proteica de la ciclina D1<sup>114</sup>. Por ello, fue analizada la expresión de esta ciclina en células MCF7 que sobreexpresan ADAR1 mediante la transfección transitoria de su cDNA utilizando un plásmido comercial pEntry-CMV-ADAR1 (Origene).



**Figura número 36. Sobreexpresión de ADAR1 en modelo celular MCF7.** A) Expresión del mRNA de ADAR1 en células MCF7 transfectadas con ADAR1. Gráfico expresado en veces de cambio respecto a células transfectadas con un vector no relacionado (eGFP). B) Expresión proteica de ADAR1 y Ciclina D en células transfectadas con eGFP y células transfectadas con un vector de expresión (pEntry-ADAR1-p110) codificante para ADAR durante 16 h. C) expresión de mRNAs asociados a ciclo celular en células transfectadas con ADAR1 p110, expresado en veces de cambio respecto a células transfectadas con vector eGFP. \*\*\*\*< 0.0001; ns: sin diferencias significativas. Gráfico de barras, Media +/- SEM.

Dieciseis horas después de la transfección fueron evaluadas la expresión de ADAR1 por qRT-PCR y western blot. Encontrando un aumento significativo en la expresión del transcrito y la cantidad de proteína de ADAR1 tras la transfección, lo que además produce un incremento en la cantidad proteica de la ciclina D, en comparación a las células transfectadas con el vector eGFP (Figura 36A y 36B). Sin embargo, como se indica en la Figura número 36C, no existen diferencias significativas en los niveles de mRNA de la ciclina D, ni otros marcadores del ciclo celular y proliferación, al comparar células transfectadas con un vector control (pM13-GFP). Los resultados encontrados son similares a los encontrados por Chen y colaboradores (2013), donde la sobreexpresión de ADAR1 genera un aumento significativo en los niveles proteicos de la ciclina D, sin modificar los niveles del mRNA de este gen, sugiriendo que ADAR1 promueve un aumento en la estabilidad de la ciclina D.

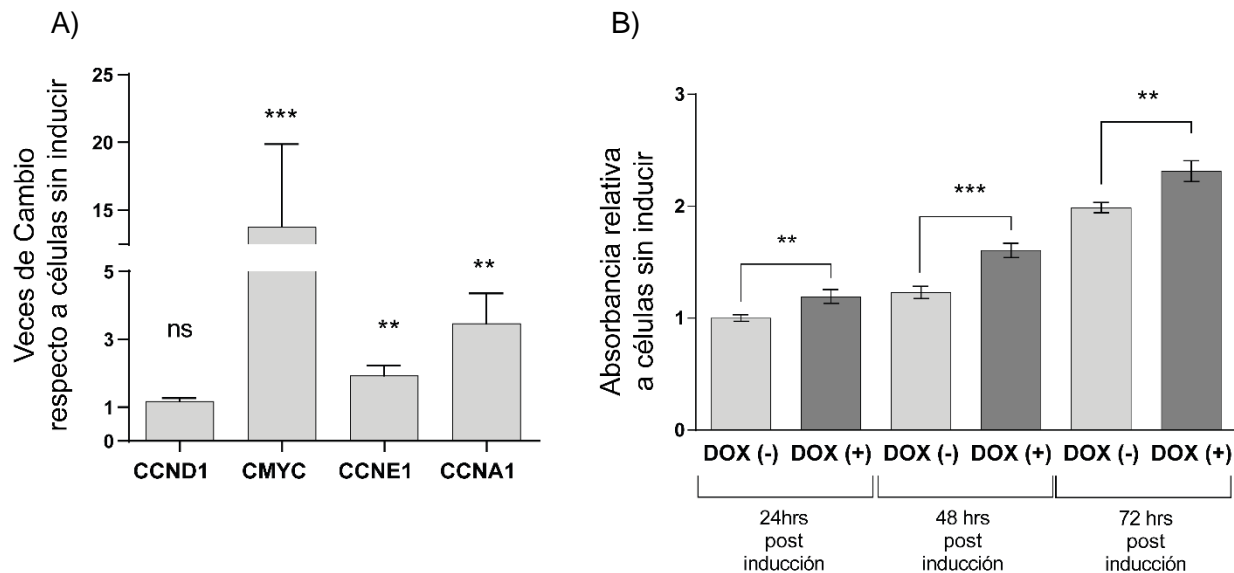
Posteriormente, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de ADAR1 en la proliferación en células MCF7 mediante el ensayo de MTS, para ello fueron sembradas  $10 \times 10^4$  células al comienzo del experimento en condiciones normales de cultivo celular y fue evaluada la absorbancia producida por las células transfectadas con un vector eGFP o el vector que codifica para ADAR1 p110, durante 24 h, 48 h y 72 h luego de sembrar las células. En este experimento no se observaron diferencias significativas en la proliferación al comparar las células que sobreexpresan ADAR1 con las células MCF7 controles, transfectadas con un vector eGFP, como se muestra en la Figura número 37.



**Figura número 37. Efecto de la sobreexpresión de ADAR1 en la proliferación en el modelo MCF7.** Determinación de viabilidad celular en el tiempo utilizando MTS. Datos adquiridos a 24, 48 y 72 h. El gráfico se encuentra normalizado respecto a las 24 h de las células MCF7 eGFP o células MCF7 que sobreexpresan ADAR1. N= 3. Media +/- SEM. Análisis estadístico T-test de una cola. ns: Sin diferencias significativas.

Adicionalmente a los experimentos utilizando células MCF7 transfectadas con el vector de expresión ADAR1 p110, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de ADAR1 en la proliferación en la línea celular inducible HeLa Flp In T-REx ADAR1, utilizando el ensayo MTS descrito con anterioridad. Para ello, 5.000 células fueron sembradas e inducidas durante 24 h con doxiciclina (1 µg/mL), siendo evaluada la absorbancia producida hasta las 72 h post inducción. Además, fueron analizados marcadores de ciclo celular y proliferación en este modelo celular a las 24 h post inducción mediante qRT-PCR. Los resultados de este experimento indican que existe un incremento significativo de los niveles de expresión de los marcadores de proliferación analizados en las células HeLa inducidas con doxiciclina, respecto a aquellas células sin inducir (Figura número 38A) y que, por consiguiente, existe un incremento significativo en la absorbancia producida por las células inducidas, respecto a las células sin inducir en el tiempo, sugiriendo un incremento en la proliferación en este modelo celular, comparado con las células HeLa Flp In T-REx ADAR1 no inducidas, como se puede ver en la Figura número 38B.



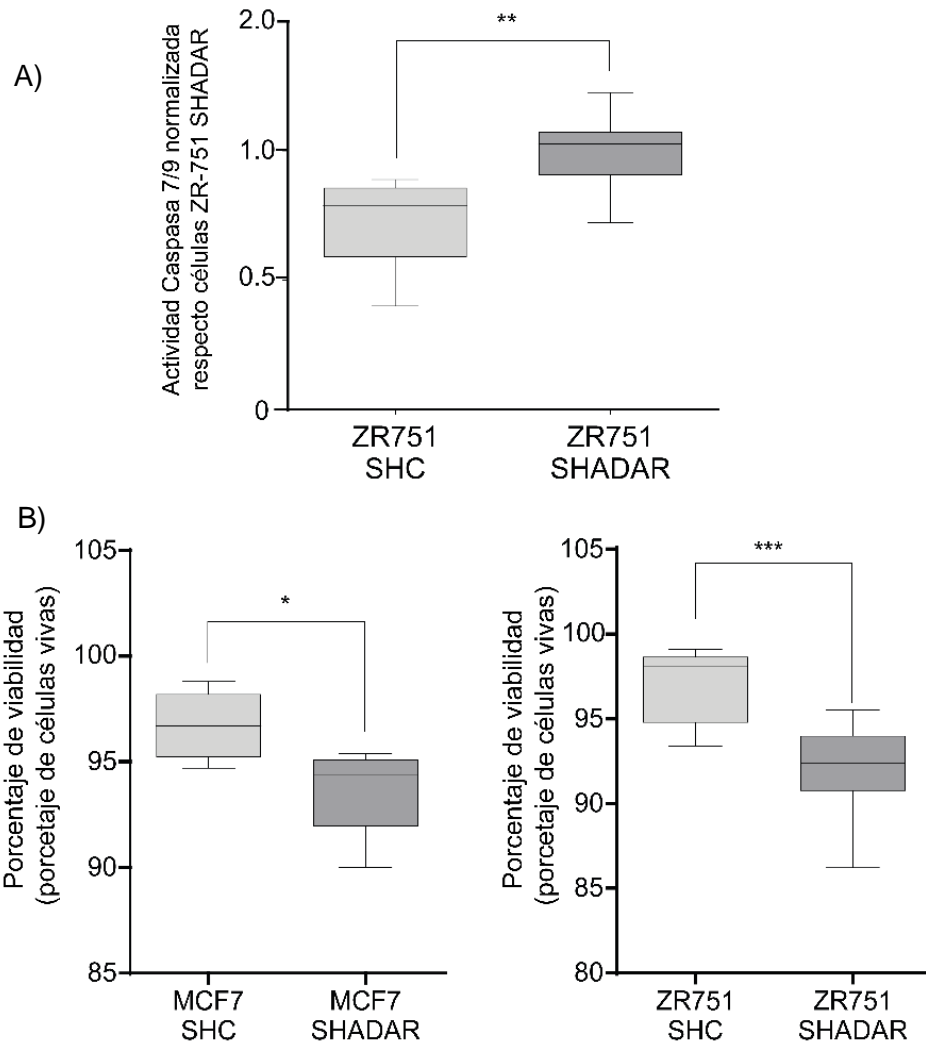


**Figura número 38. La sobreexpresión de ADAR1 en modelo celular HeLa Flp In T-REx produce un incremento en la proliferación celular.** A) Expresión de mRNAs asociados a ciclo celular y proliferación en células HeLa Flp In ADAR1 inducidas durante 24 h, expresado en veces de cambio respecto a células no inducidas. B) Ensayo MTS en células HeLa Flp IN T-REx ADAR1 DOX. N=3, T-test de 2 vías; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ; \*\*  $< 0.01$ ; \*  $< 0.05$ ; ns : sin diferencias significativas. Gráfico de barras, Media +/- SEM.

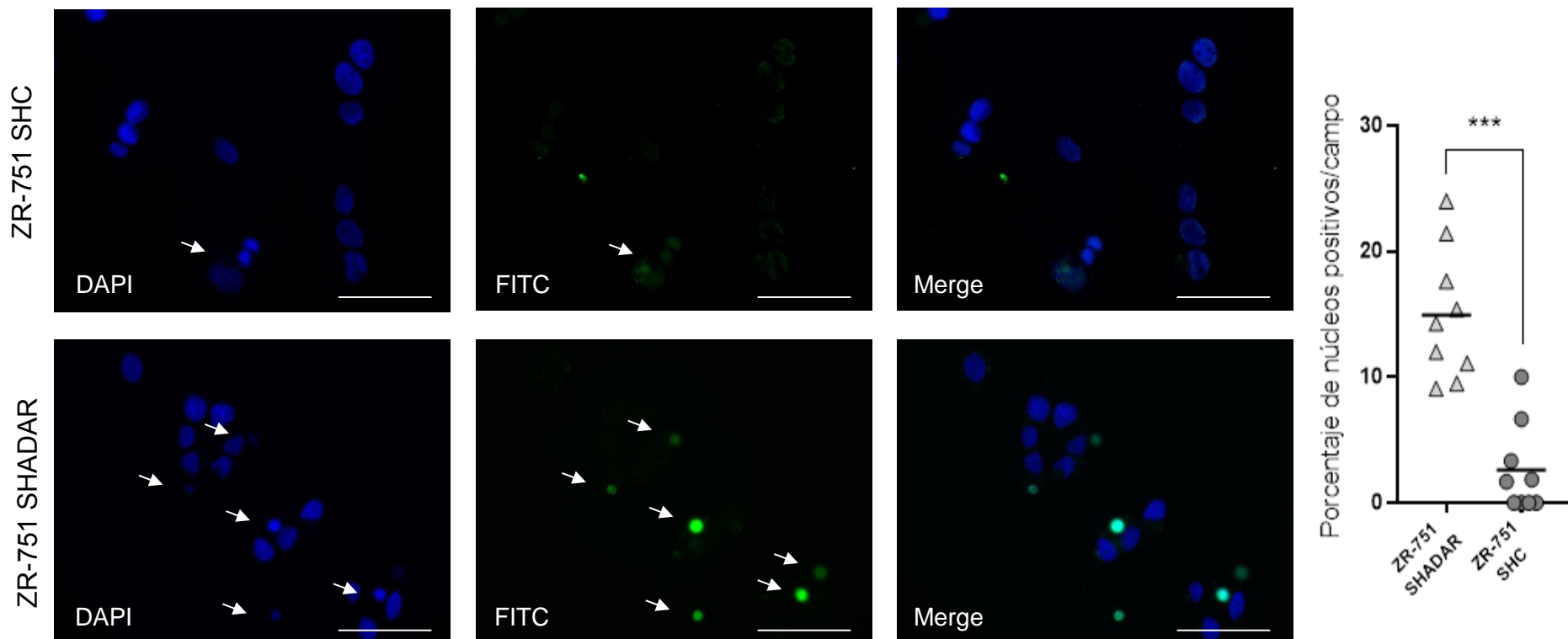
Una vez realizados los experimentos de proliferación celular en los modelos HeLa Flp In T-REx y MCF7 transfectadas con ADAR p110, fueron realizados experimentos relacionados a la apoptosis celular, toda vez que la disminución en la viabilidad o proliferación pudiera ser explicada por un aumento en la muerte celular mediada por la apoptosis de las células.

Para ello, se determinó la actividad de las Caspasas 3 y 7 en las células ZR-751 SHADAR y SHC, utilizando el ensayo Caspase-Glo® 3/7 (Promega). Los resultados de este ensayo muestran que las células SHADAR presentan un aumento de la actividad de estas caspasas, sugiriendo un aumento de la apoptosis en estos modelos, en comparación a las células controles (Figura número 39A). Una vez realizados estos experimentos, se realizó un conteo celular en las células MCF-7 SHADAR, MCF7 SHC, ZR-751 SHADAR y ZR-751 SHC mediante la tinción de azul tripan y posterior conteo celular automatizado, utilizando el equipo LUNA cell counter (Logos Biosystems), con la finalidad de caracterizar el porcentaje de células vivas en cada tipo celular. Los resultados sugieren una disminución parcial pero significativa de la viabilidad de las células *knock down*, respecto a las células control analizadas, como se observa en la Figura número 39B.

Por último, fue evaluada la incorporación de timidina terminal fluorescente por medio de una DNA nucleótido transferasa terminal (TUNEL) mediante inmunofluorescencia, en células ZR-751 ZR-751 SHC y SHADAR para así determinar cuerpos apoptóticos o la incorporación de este nucleótido fluorescente, como marcador de la apoptosis. Nuestros resultados, sugieren un aumento en el número de focos positivos para la marca fluorescente en las células ZR-751 SHADAR, en comparación a las células ZR-751 SHC, como se muestra en la Figura número 40.



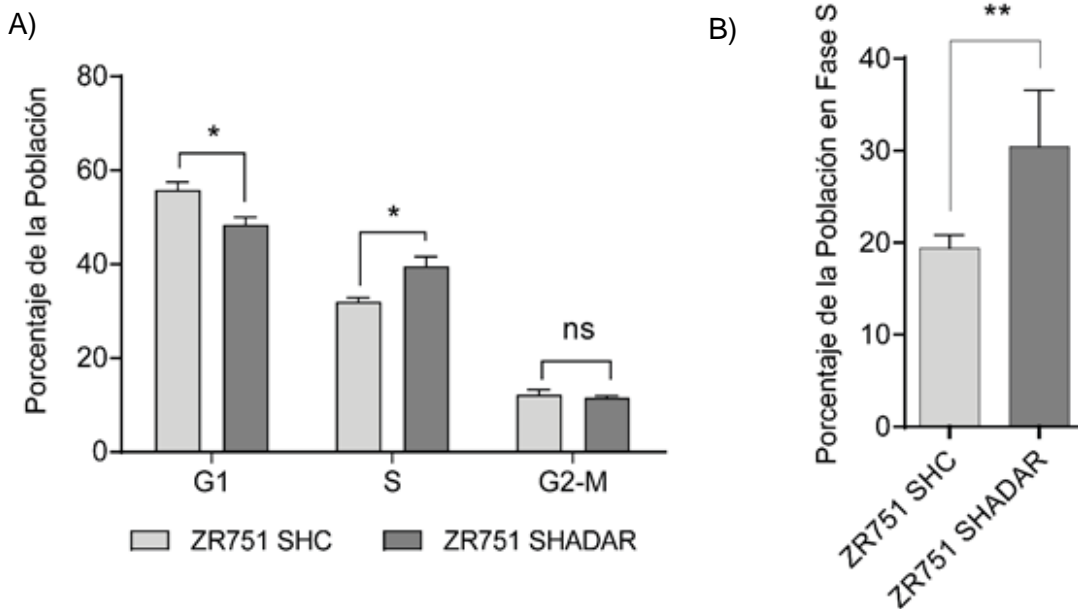
**Figura número 39. La disminución de la expresión de ADAR1 produce una disminución en la viabilidad y aumento de la apoptosis en células ZR-751.** A) Conteo celular y determinación de viabilidad celular utilizando azul de tripan en los modelos celulares SHC y SHADAR. Se sembraron  $5 \times 10^6$  células al comienzo del experimento en condiciones normales de cultivo celular, para luego analizar las células utilizando este reactivo. B)  $10 \times 10^4$  células fueron sembradas, transcurridas 24 h se realizó el ensayo luminiscente Caspase-Glo® 3/7 (Promega) para determinar de manera indirecta la actividad enzimática de Caspasa 3 y 7 en células ZR-751 SHADAR y SHC N= 3 T-Test de 2 vías  $** < 0.01$ ,  $\leq 0.05$ ,  $***: P \leq 0.001$ . Gráfico de cajas y bigotes con distribución de Tukey.



**Figura número 40. La disminución de la expresión de ADAR1 produce un aumento de la apoptosis en células ZR-751.** Imagen representativa de diferencias en el número de núcleos positivos para timidina terminal (en canal FITC); Además, se muestra una imagen del canal DAPI (DNA/núcleo), seguido de la superposición de estas imágenes representativas. Imágenes obtenidas desde microscopio de epifluorescencia obj: 60X, barra de escala corresponde a 40  $\mu$ m. \*\*\*:  $P \leq 0.001$ . T-Test de 2 vías,  $N=4$ .

Para establecer la proporción de células en cada etapa del ciclo celular se utilizó yoduro de propidio, mediante citometría de flujo en células ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR. Los resultados de este experimento muestran un incremento en la proporción de células en fase S en los modelos SHADAR, respecto a la proporción de células en fase S en el modelo SHC, además de una disminución significativa de la fase G<sub>1</sub> en las células ZR-751 *knock down*, respecto a las células ZR-751 SHC, resultado que se muestra en la Figura número 42A.

Finalmente, realizó un ensayo de incorporación de nucleótidos, con la finalidad de analizar de manera más sensible las diferencias encontradas anteriormente por el ensayo de yoduro de propidio. Para ello, células ZR-751 SHC y SHADAR, fueron incubadas con un análogo de nucleótidos, (5-yodo-2'-dioxidurina), para posteriormente ser marcados con yoduro de propidio y ser analizados por citometría de flujo. Así, los resultados encontrados corroboran los resultados encontrados con anterioridad, encontrando un aumento significativo en la proporción de población de células SHADAR1 en fase S, respecto a la proporción encontrada en células ZR-751 SHC como se puede ver en la Figura número 42B.



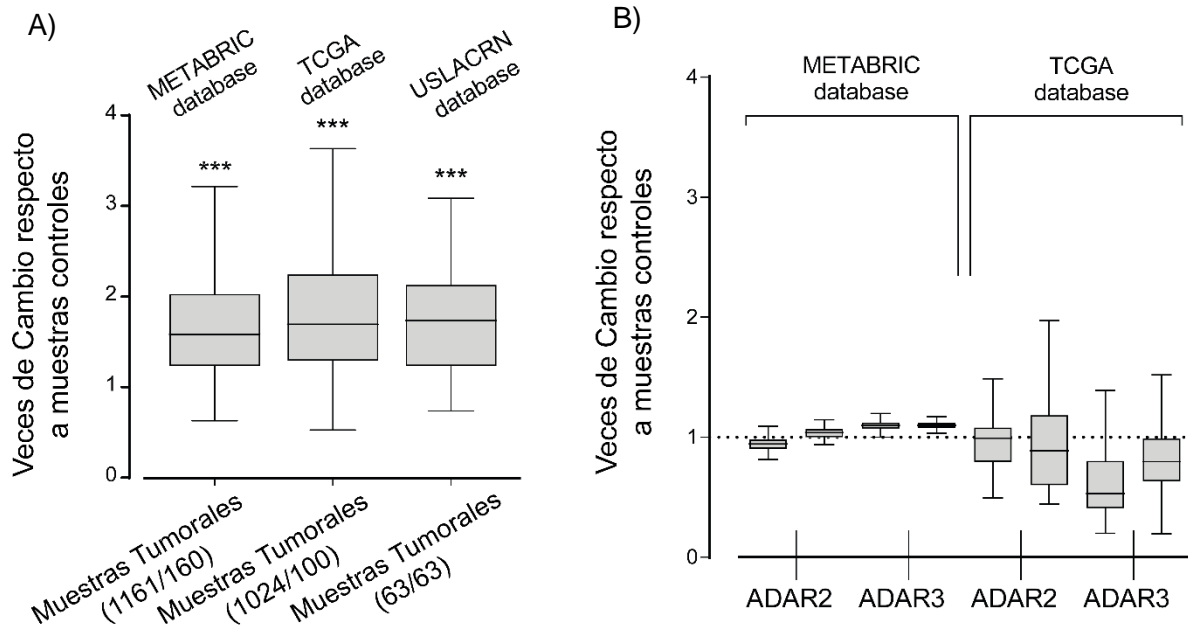
**Figura número 42. La disminución de la expresión de ADAR1 produce un aumento de la proporción de células en la fase S en células ZR-751.** A) Determinación de las distintas fases del ciclo celular en células ZR-751 SHC y SHADAR por medio de citometría celular y PI. Experimento realizado utilizando 4 réplicas técnicas con al menos 25.000 eventos cada una, N= 3. B) Determinación de incorporación de IdU en el DNA por medio de citometría de flujo, marcaje de DNA con anti BrdU y PI. N=4, Para A) fue realizado un test ANNOVA de una vía, en B) se utilizó un T-test de dos vías. \*\*< 0.01, \*< 0.05 ns: sin diferencias significativas para ambos experimentos. Gráfico de barras, Media +/- SEM.

#### **8.4. Analizar la expresión de ADAR1 y la edición de mRNAs de genes que participan en los procesos de respuesta al daño del DNA y control del ciclo celular en pacientes con adenocarcinoma mamario.**

A la fecha, existen dos trabajos que muestran la expresión de ADAR en muestras de pacientes con cáncer de mama <sup>115,116</sup>, los cuales sugieren que ADAR1 presenta una expresión aumentada en las muestras tumorales, respecto a las muestras controles analizadas, sin caracterizar la expresión de las otras isoformas de ADAR, las cuales tienen la capacidad de editar el RNA y/o interaccionar con el RNA blanco. Para complementar estos resultados, los cuales fueron publicados durante el desarrollo de este trabajo doctoral, se realizó una comparación de la expresión de las distintas isoformas de ADAR en las cohortes TCGA, tanto en la plataforma de microarreglos y RNAseq (RSEM, v2), METABRIC y USLACRN, además del análisis de coexpresión de estas cohortes, respecto a ADAR1. Para ello fueron descargados los datos de expresión de las distintas cohortes. Los datos descargados desde TCGA corresponden a datos normalizados de RNAseq (plataforma Illumina) y microarreglos (plataforma descontinuada en el estudio, Agilent Array 2 colores, 244K).

Nuestros resultados en estas tres cohortes de cáncer de mama, muestran un aumento significativo de la expresión de ADAR1 en las muestras tumorales, en comparación a las muestras controles incluidas en cada uno de estos estudios (Figura número 43A). Adicionalmente, se evaluaron los niveles de expresión de ADAR2 y ADAR3 en las cohortes TCGA, METABRIC y USLACRN. Así, el mensajero de ADAR2 muestra una disminución significativa en las muestras tumorales, respecto a los controles en ambos estudios. Respecto a la expresión del mensajero de ADAR3, no se encontraron diferencias significativas en la cohorte METABRIC, pero sí una disminución significativa de la expresión de ADAR3 en las muestras tumorales, respecto a las muestras controles en la cohorte TCGA (microarreglos). Igualmente, se realizó este mismo análisis en los datos de RNAseq provenientes de TCGA, sin

identificar diferencias significativas en la expresión de ADAR2 y ADAR3 en las muestras tumorales y controles presentes (Figura número 43B).



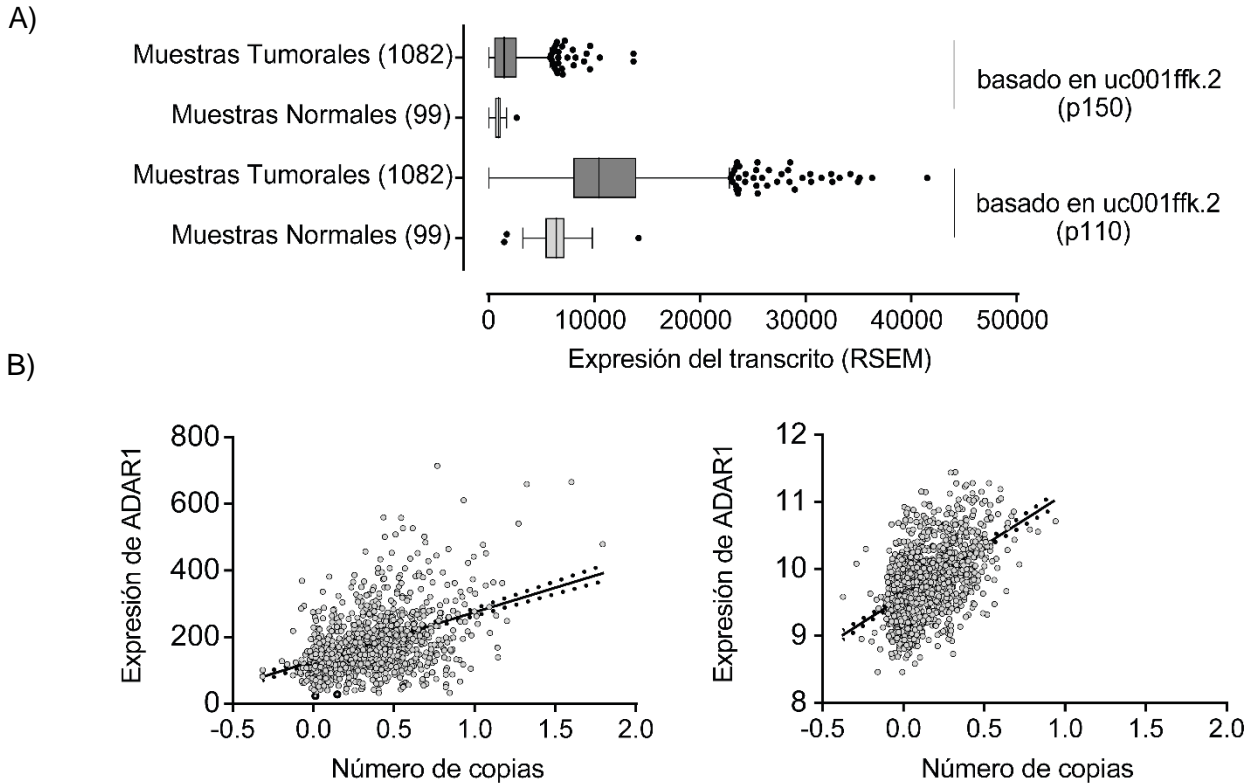
**Figura número 43. ADAR1 se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama.** A) Veces de cambio de ADAR1 en 3 cohortes de carcinoma mamario, TCGA, METABRIC y USLACRN y la distribución de valores de expresión de ADAR1 en las cohortes TCGA y METABRIC. B) Muestra los valores de expresión de las otras isoformas de ADAR expresadas en veces de cambio respecto a muestras normales T-Test de 2 vías. \*\*\*< 0.001, ns: sin diferencias significativas. Gráfico de cajas y bigotes con distribución de Tukey.

Posteriormente, se realizó el análisis de la expresión de las distintas variantes de mensajero de ADAR1, para identificar los diferentes patrones de expresión de las variantes de mensajero que codifican para ADAR1 p110 y ADAR1 p150. Esto fue solo posible en la plataforma TCGA RNAseq V2 (RSEM), ya que sólo ésta permite diferenciar las diferentes variantes de mensajero asociadas a la expresión de ADAR1.



Así, nuestros resultados indican que sólo la variante uc001ffk.2, correspondiente a la variante del mensajero de ADAR1 que codifica para la isoforma ADAR1 p110, es la que se sobre expresa en los tumores respecto a las muestras controles incluidas en la cohorte, mientras que la variante uc001ffi.2, variante que codifica para ADAR1 p150, no presenta diferencias significativas en su expresión al comparar las muestras tumorales y controles presentes en esta cohorte (Figura número 44A).

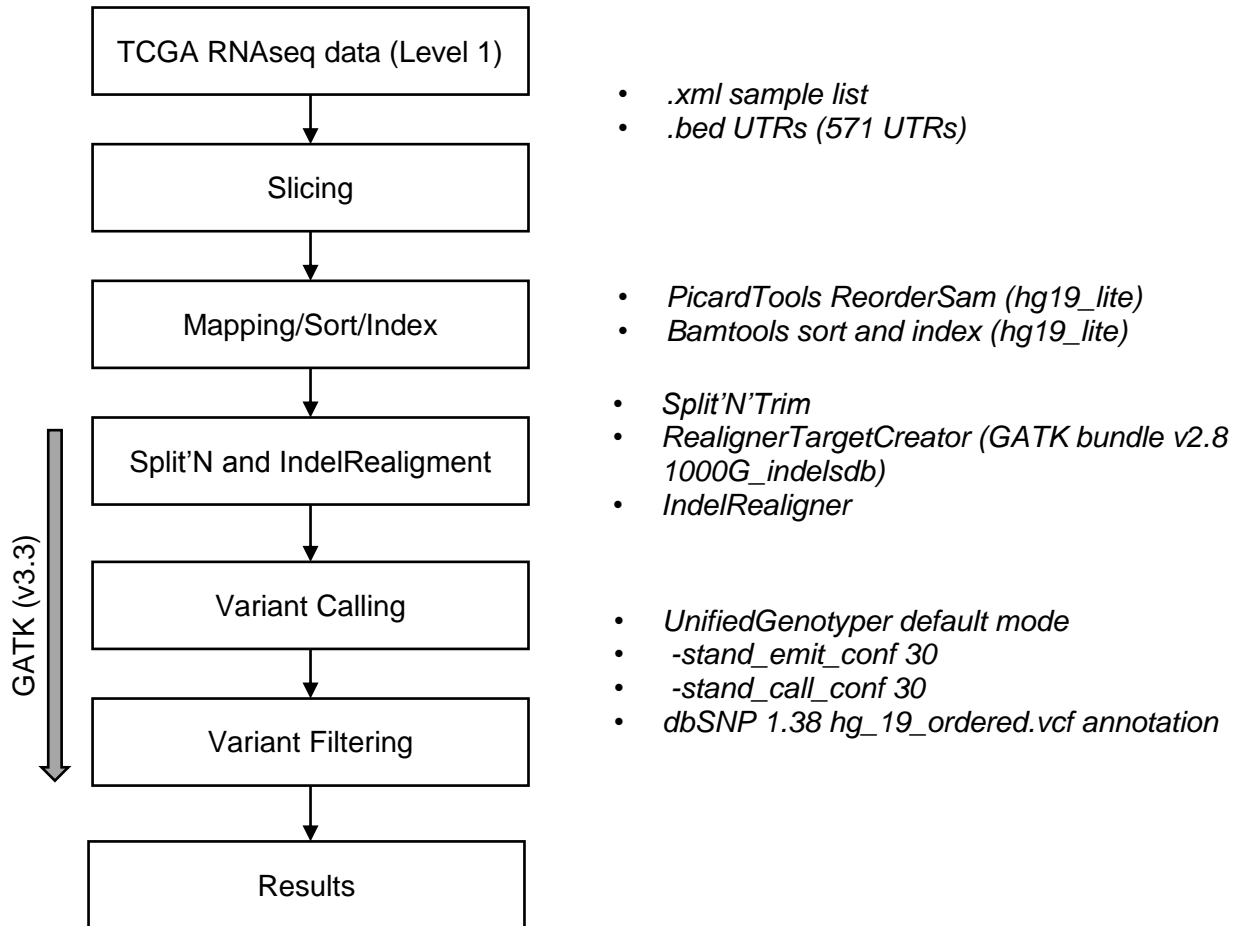
Posterior al análisis de expresión de ADAR1 y sus distintas variantes de mensajero, se realizó un análisis de correlación entre la expresión del mRNA y el número de copias del gen, utilizando las cohortes TCGA y METABRIC, toda vez que con anterioridad se ha sugerido que la sobreexpresión de ADAR1 podría estar modulada por la amplificación del brazo largo del cromosoma 1, así como por la señalización asociada a interferón dado que el promotor de ADAR1 presenta múltiples sitios unión a los factores de transcripción STAT1 y STAT3, activados por este agonista <sup>78</sup>. Para realizar este análisis, fueron descargados los datos de número de copias del gen de ADAR1 (CNVs) provenientes de las bases de datos c-bioportal y OASIS Pfizer (algoritmo GISTIC), para posteriormente correlacionar los valores de expresión de ADAR1 en las distintas cohortes con los valores GISTIC asociados al número de copias de ADAR1. Este análisis muestra una importante y significativa correlación en la expresión de ADAR1 con la amplificación de este segmento cromosómico en las cohortes TCGA y METABRIC, de forma independiente (Figura número 44B).



**Figura número 44. La expresión de ADAR1 se relaciona a la expresión de una de sus variantes de mRNA y esta correlaciona con el número de copias del gen en el cáncer de mama.** A) Valores de expresión de las diferentes variantes de mensajero de ADAR1 que codifican para p110 y p150, provenientes de la cohorte TCGA (RNAseq V2 RSEM values). T-Test de 2 vías. \*\*\*< 0.001, ns: sin diferencias significativas. Gráfico de cajas y bigotes con distribución de Tukey. En B) se muestra la correlación de expresión de ADAR1 y el número de copias para las cohortes METABRIC (derecha, Log2) y TCGA (izquierda, lineal). T-test de 2 vías \*\*\*<0.001. R: 0.433 para la correlación de TCGA; R: 0.503 para la correlación de METABRIC.

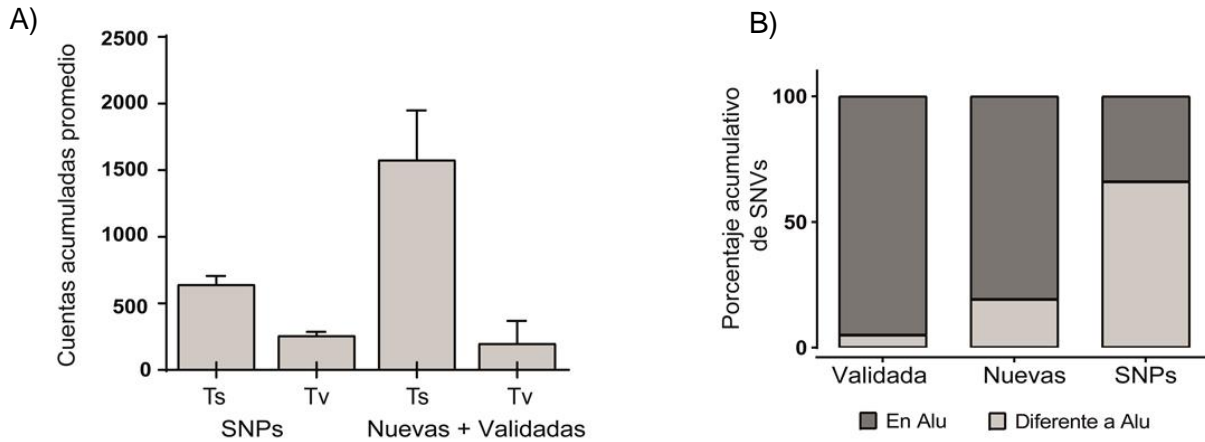
A la fecha, no existe un trabajo que intente caracterizar y/o sistematizar la edición de mRNAs relacionados a los procesos de respuesta al daño del DNA, replicación y control del ciclo celular en el contexto del cáncer de mama. Como se describió con anterioridad, un conjunto significativo de mRNAs asociados a la respuesta al daño del DNA y la replicación celular son editados por ADAR1 en sus regiones UTR. Así también, nuestros resultados tras inhibir la expresión de ADAR1 en células de cáncer de mama, muestran una disminución significativa en la proliferación, un aumento en la apoptosis de la célula así como una disminución significativa en la activación de la cascada transduccional de la respuesta al daño del DNA en estos modelos, lo que además es acompañado de una disminución en el número de variantes atribuibles a ADAR1 (A > G) en los mRNAs de genes de estos procesos biológicos. Para complementar estos resultados, fueron analizadas las variantes presentes en el RNA de los pacientes de la cohorte TCGA con cáncer de mama, las cuales preferentemente se asocian a estas ontologías (Tabla número 3). Para realizar este análisis se seleccionaron 571 UTRs basados en un flujo de trabajo presentado en la Figura anexa número 8. Brevemente, fueron seleccionados aquellos UTRs que previamente habían sido descritos en la literatura y que, al mismo tiempo, presentaran una posición validada en la base de datos de ediciones de RNA, RADAR. Para ello, fueron seleccionados los genes correspondientes a la intersección de los resultados generados por Peng y colaboradores (2012), Ramaswami y colaboradores (2013) y Wang y colaboradores (2013), como describe la Figura número 5 para posteriormente, identificar aquellos mRNAs con al menos una posición validada en RADAR que estuviera en alguno de sus UTRs, generando así una lista de 571 UTRs. Para el desarrollo de esta metodología se procedió a descargar los archivos de expresión .bam asociados a cada paciente de la cohorte BRCA TCGA (1214 archivos individuales). Posterior a esto, se seleccionaron las regiones de interés a analizar, utilizando los criterios de inclusión descritos en la Figura anexa número 8 (parte superior), para, a continuación, realizar el análisis primario y secundario descrito en la Figura número 45. Las variantes encontradas fueron segregadas en 3 categorías: “variantes nuevas” o variantes no descritas con anterioridad, “variantes *goldstandard*” o previamente descritas por Wang et al. (2013), las cuales tuvieron que ser transformadas a hg19,

utilizando el software liftOver de UCSC y finalmente, SNPs transcritos, descritos en dbSNP 1.38.



**Figura número 45. Flujo utilizado para el llamado de variantes en los 3'UTRs de cohorte BRCA TCGA RNAseq.** Flujo de trabajo realizado para el llamado de variantes de un nucleótido en RNA desde la cohorte de pacientes con cáncer de mama TCGA, donde se describe que la información fue descargada y depurada para finalmente realizar el llamado de variantes y el procesamiento de ellas para identificar los diferentes tipos de cambio presentes en el RNA, respecto al genoma de referencia (hg19).

Así se comparó la distribución de transición/transversión encontrada en los distintos tipos de variantes descubiertas. Se encontró una proporción Ts/Tv de 2.48 en los SNPs llamados por nuestra metodología y una proporción de Ts/Tv de 7.88 en las variantes nuevas descubiertas por nuestra metodología (Figura número 46A).

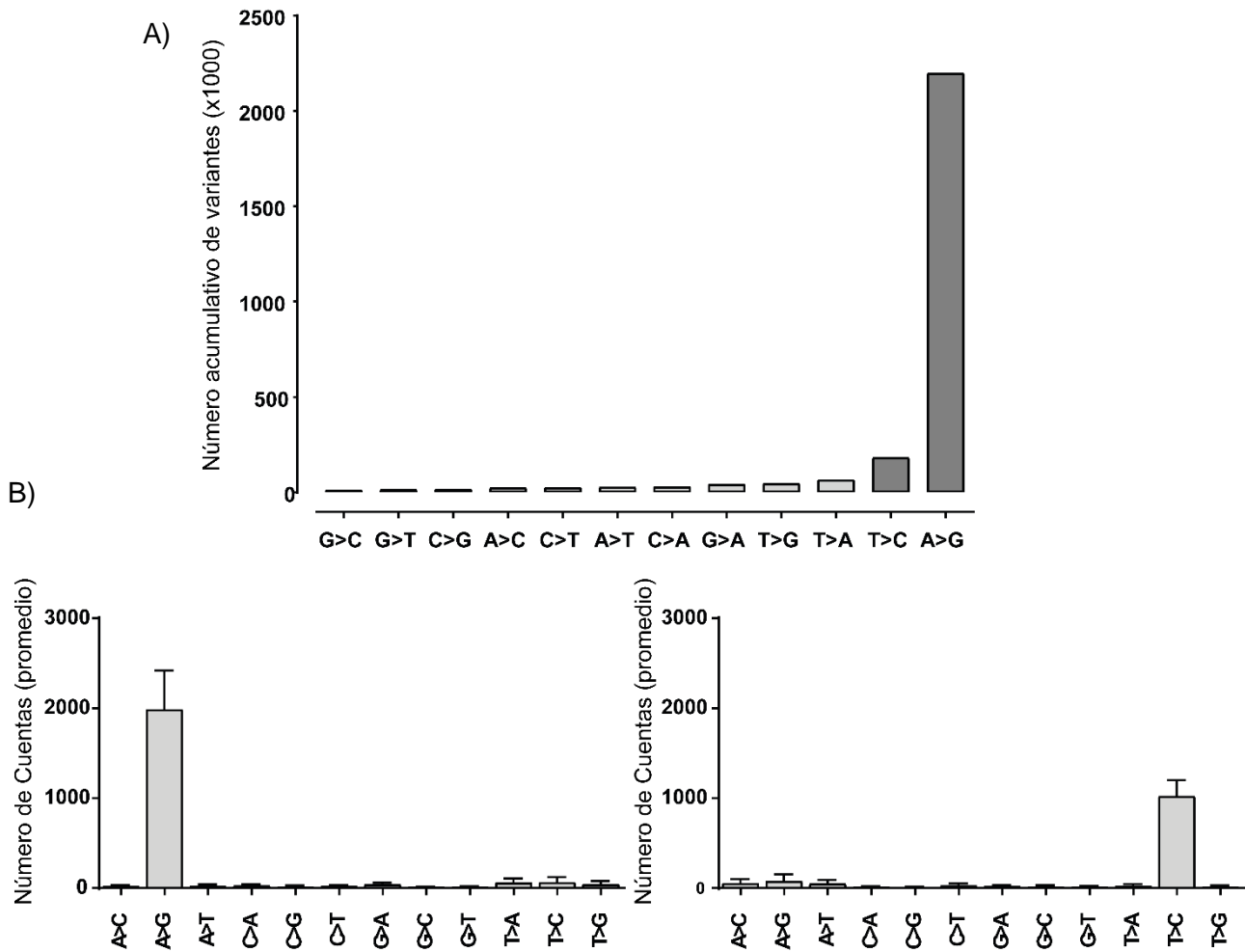


SNPs		Variantes Nuevas	
Cuentas	Ratio	Cuentas	Ratio
<b>Ts</b>	778616	<b>Ts</b>	1915697
<b>Tv</b>	313623	<b>Tv</b>	243020
	2.482		7.882

**Figura número 46. Distribución de variantes encontradas en cohorte de cáncer de mama TCGA.** A) Relación de Transiciones/Transversiones encontradas para SNPs y variantes distintas a SNPs, siendo estas “Validadas” o previamente descritas o “Nuevas” variantes, distintas a SNPs. B) distribución de variantes que se encuentran en una posición genómica asociada a Alus (hg19), variantes clasificadas como información previamente validada, variantes nuevas encontradas y SNPs.

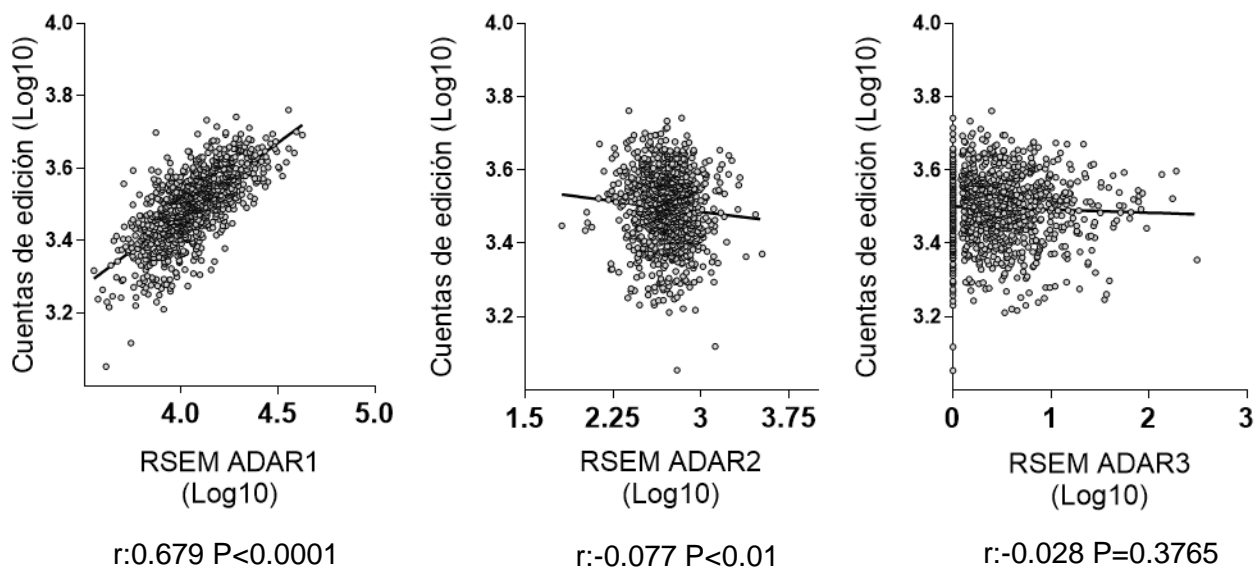
Luego, se analizó la proporción de las variantes descubiertas en posiciones genómicas descritas como *Alu*, donde se ha descrito la mayor proporción de modificaciones realizadas por ADAR1<sup>117,118</sup> (Figura número 46B). Para ello, se utilizó la base de datos *Repeatmasker* de UCSC para determinar la proporción de variantes localizada en estas posiciones. En este sentido, las variantes previamente validadas presentaron una proporción mayor al 95% encontradas en posiciones genómicas correspondientes a *Alus*, mientras que las variantes nuevas, no validadas previamente, presentaron una proporción cercana al 81% en posiciones correspondientes a *Alu* y los SNPs por el contrario no presentan relación en estas posiciones con 65% de todas las variantes fuera de posiciones genómicas atribuidas a *Alu*.

Luego de calcular la proporción de transiciones/transversiones encontradas provenientes de nuestros datos y correlacionar nuestras variantes con las regiones *Alu* en el genoma, se analizó el enriquecimiento de variantes en cada tipo de cambio posible de un nucleótido en el RNA, vale decir se segregaron todas las variantes encontradas en los 12 posibles tipos de cambio de un nucleótido, para luego ser contadas y analizar la distribución de estas variantes. De esta forma, se encontró un incremento significativo de las variantes T > C y A > G respecto a los 10 restantes variantes posibles, sugiriendo un incremento de la actividad de ADAR, toda vez que las únicas enzimas capaces de generar este tipo de cambio en el RNA son las enzimas de la familia ADAR. Aun cuando la mayor proporción de variantes corresponde a la transición A > G, existe un aumento significativo de la transición T > C en las variantes encontradas (Figura número 47A). Para corroborar la identidad de este tipo de cambio, fueron separadas las variantes encontradas según la direccionalidad de los transcritos analizados, respecto a su procedencia respecto a la hebra molde de DNA (5'→3'). (Figura número 47B). Así, nuestros resultados muestran que para los UTRs transcritos en la hebra anti sentido sólo existe un enriquecimiento en las variantes T > C y en los transcritos en dirección sentido de la hebra molde, solo un enriquecimiento de las variantes A > G, respecto a las coordenadas genómicas. Esto ya había sido descrito por diversos autores, siendo consecuencia propia de la secuenciación, al secuenciar la hebra complementaria al cDNA retrotranscrito<sup>89,95,119</sup>.



**Figura número 47. Existe un aumento exclusivo de las variantes generadas por ADAR tras analizar las variantes en el RNAseq de la cohorte de cáncer de mama TCGA.** A) Distribución de variantes diferentes a SNPs encontradas en la cohorte BRCA TCGA. En B) se muestra la distribución de variantes encontradas, para aquellos mRNAs transcritos en la hebra sentido 5' → 3' (izquierda del gráfico) y aquellos que se encuentran en la hebra anti sentido 3' → 5' (derecha del gráfico) de acuerdo a las coordenadas genómicas.

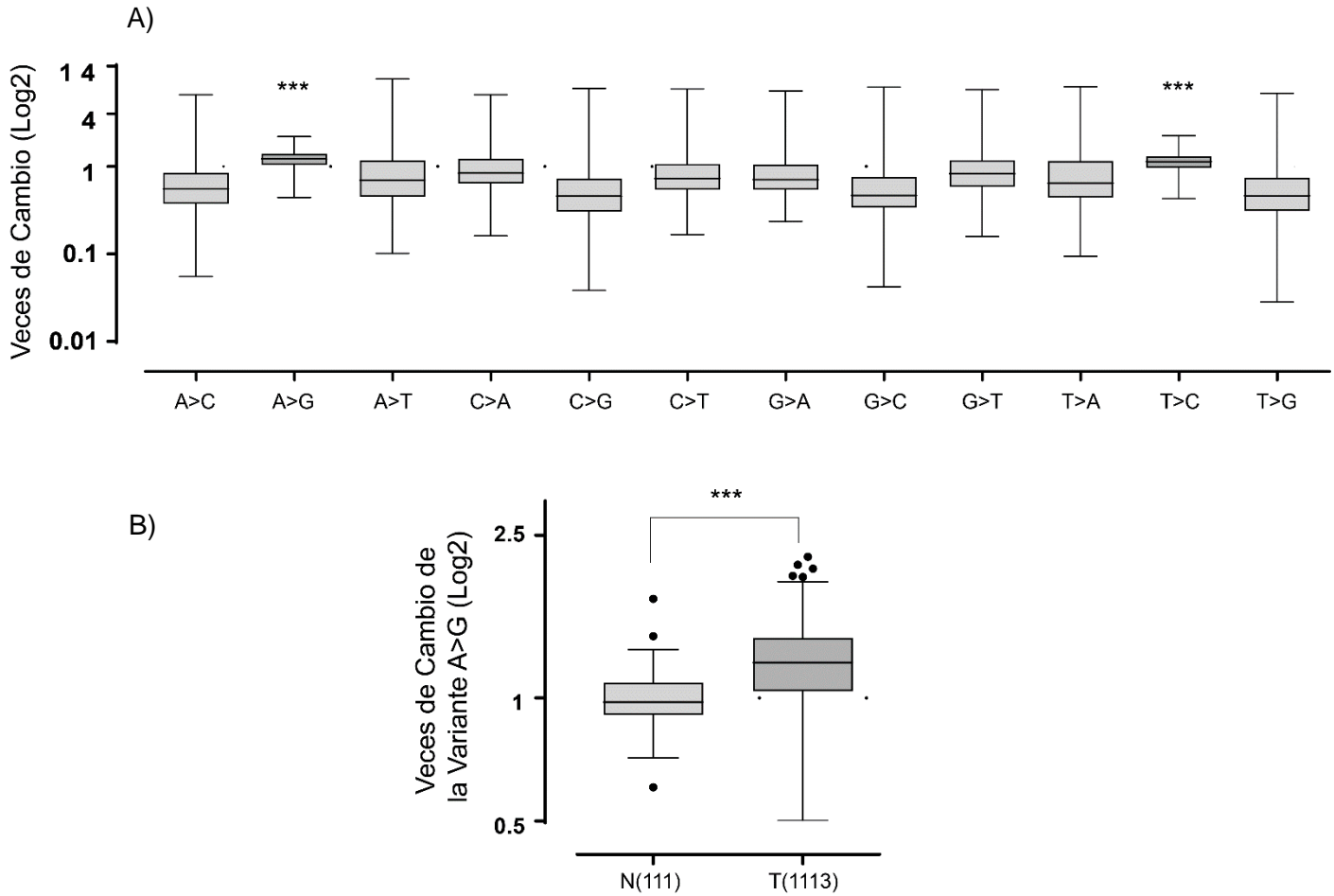
A continuación, se realizó una correlación de número de variantes A > G encontradas con la expresión de isoformas de ADAR en cohorte TCGA. Para ello, se correlacionó la expresión de las diversas isoformas de ADAR con el número de variantes A > G encontradas en las muestras tumorales de TCGA, y se encontró una fuerte y significativa correlación positiva entre los niveles de expresión de ADAR1 y el número de variantes A > G por paciente. Mientras que no se encontró correlación significativa alguna con los niveles de expresión y número de variantes A > G en ADAR2 ni ADAR3. Esto sugiere que el número de variantes A > G encontrado podría ser atribuible a la función y expresión de ADAR1 (Figura número 48).



**Figura número 48. Correlación de la expresión de ADAR con número de variantes A por G encontradas en el RNA-seq de la cohorte de cáncer de mama TCGA.** Correlación de los valores de expresión para ADAR1 (izquierda), ADAR2 (centro) y ADAR3 (derecha) con respecto al número de variantes A > G encontradas para los pacientes con cáncer de mama en cohorte TCGA. En el eje X se muestran las cuentas de ADAR normalizadas en escala logarítmica (cuentas de RNA para cada muestra utilizando algoritmo RSEM, TCGA RNA-seq)).

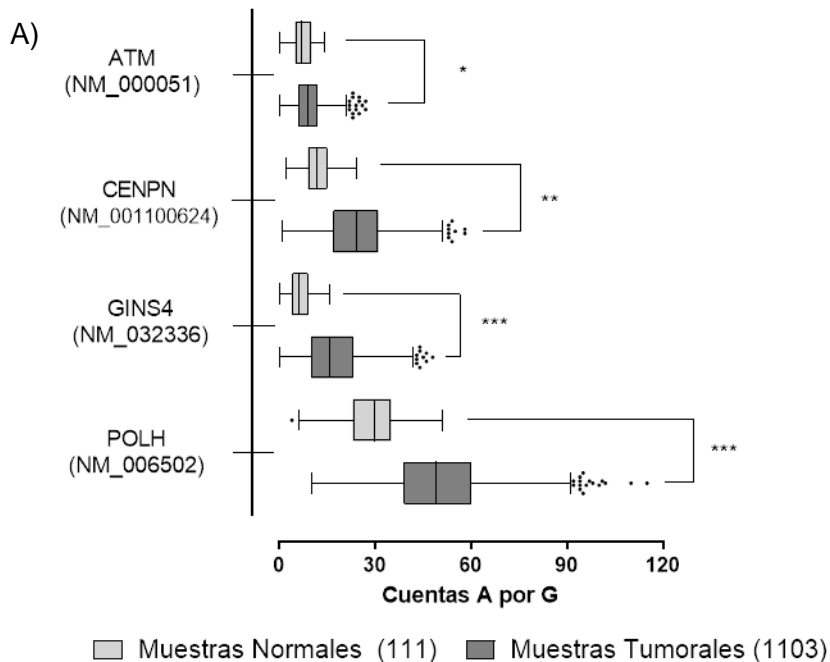


Una vez realizado estos análisis, se compararon el número de alteraciones presentes en el RNA para los tumores y muestras controles de la cohorte para cada tipo de cambio/variante posible en el RNA. Esta comparación muestra un aumento significativo en el número promedio de variantes A > G en las muestras tumorales (1113), respecto al número de variantes A > G encontradas en las muestras controles (111), como se muestra en la Figura número 49A. Además, este análisis no encontró diferencias significativas en el número promedio de las otras variantes presentes en el RNA al comparar el número promedio de variantes en ambos tipos de muestras. Finalmente, el gráfico de la Figura número 49B muestra las veces de cambio para las variantes A > G, asociables a ADAR1 para todos los pacientes de la cohorte graficado como las veces de cambio respecto al número promedio de variantes A > G de las muestras controles, corrigiendo el *strand bias*, o aquellas variantes descritas como T > C, toda vez que corresponde a la secuenciación de la hebra complementaria del cDNA analizado.



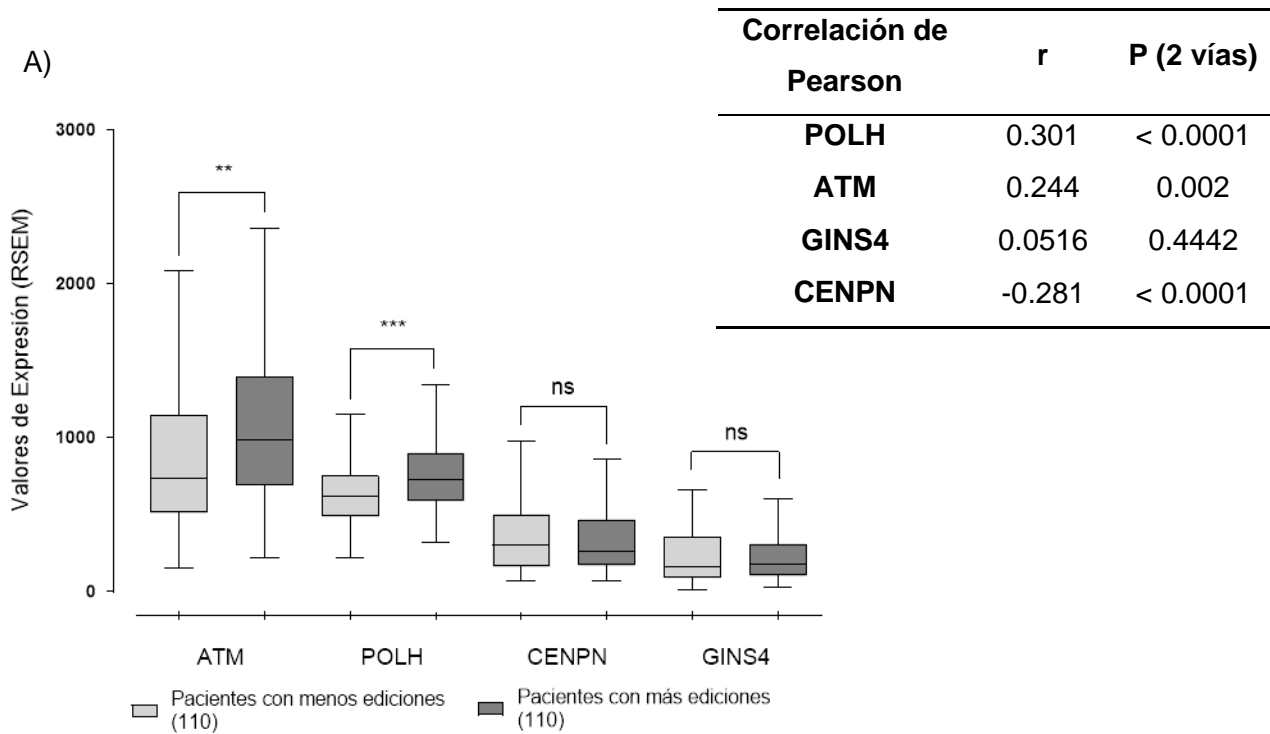
**Figura número 49. Pacientes con cáncer de mama presentan un aumento significativo en el número de variantes A por G en el RNA, comparado a las muestras controles provenientes de la cohorte TCGA.** A) Veces de cambio de las variantes encontradas, para todos los tipos de cambio presentes en el RNA, graficado como veces de cambio respecto a la media de variantes encontradas en muestras controles. B) distribución de las variantes A > G de los 3' UTR analizados, única variante atribuible a la función de ADAR1, graficado como veces de cambio respecto al número de variantes encontradas en pacientes controles. T-Test de 2 vías. \*\*\*< 0.001. Gráfico de cajas y bigotes con distribución de Tukey.

Una vez realizada la comparación del número de variantes A > G de las muestras normales y muestras tumorales de la cohorte, se realizó el conteo de variantes por UTRs en las muestras controles y tumorales, para así comparar e identificar los UTRs más editados en las muestras tumorales. Nuestros resultados muestran que los UTRs que presentan una mayor diferencia promedio en el número de ediciones corresponden a los 3'UTRs de los mRNAs de GINS4, CENPN y POLH. Además, el 3' UTR de ATM presentó un enriquecimiento relevante en el número de variantes al contar las variantes atribuibles a ADAR1 en las muestras tumorales y las muestras controles. Como se puede ver en la Figura número 50 y Tabla anexa número 3. Adicionalmente, se muestra la distribución posicional de las variantes encontradas en la Figura anexa número 10.



**Figura número 50. Cuentas de Variantes A por G encontradas en 3'UTRs asociadas a la respuesta al daño del DNA.** A) Grafico de cajas y bigotes mostrando la distribución de variantes A > G de los UTRs descritos en la tabla A, para muestras controles y tumores. T-Test de 2 vías. \*\*\*< 0.001. Gráfico de cajas y bigotes con distribución de Tukey.

Luego de haber encontrado a los UTRs más editados en las muestras tumorales, fue correlacionada la expresión de estos mRNAs con el número de ediciones en sus UTRs utilizando los deciles superior e inferior con mayor y menor número de variantes A > G de estos UTRs. Así, pacientes con un mayor número de variantes, presentan un significativo aumento en la expresión de ATM y POLH, mientras que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de CENPN y GINS4, mostrando una leve pero significativa correlación positiva entre ambos parámetros, resultados similares a los encontrados por Zhang et al <sup>120</sup> (Figura número 51).



**Figura número 51. Correlación entre la expresión y blancos editados asociados a la respuesta al daño del DNA.** A) Expresión de los genes ATM, POLH, CENPN y GINS4 (RSEM) del decil (110 pacientes con menor o mayor expresión de ADAR) inferior y superior, según el número de A > G encontradas. B) Correlación entre los niveles de expresión de estos genes y el número de ediciones (variantes A > G) encontradas en los deciles anteriormente descritos. T-Test de 2 vías. ns: sin diferencias significativas; \*\* <0.001, \*\*\* < 0.0001. Gráfico de cajas y bigotes con distribución de Tukey.

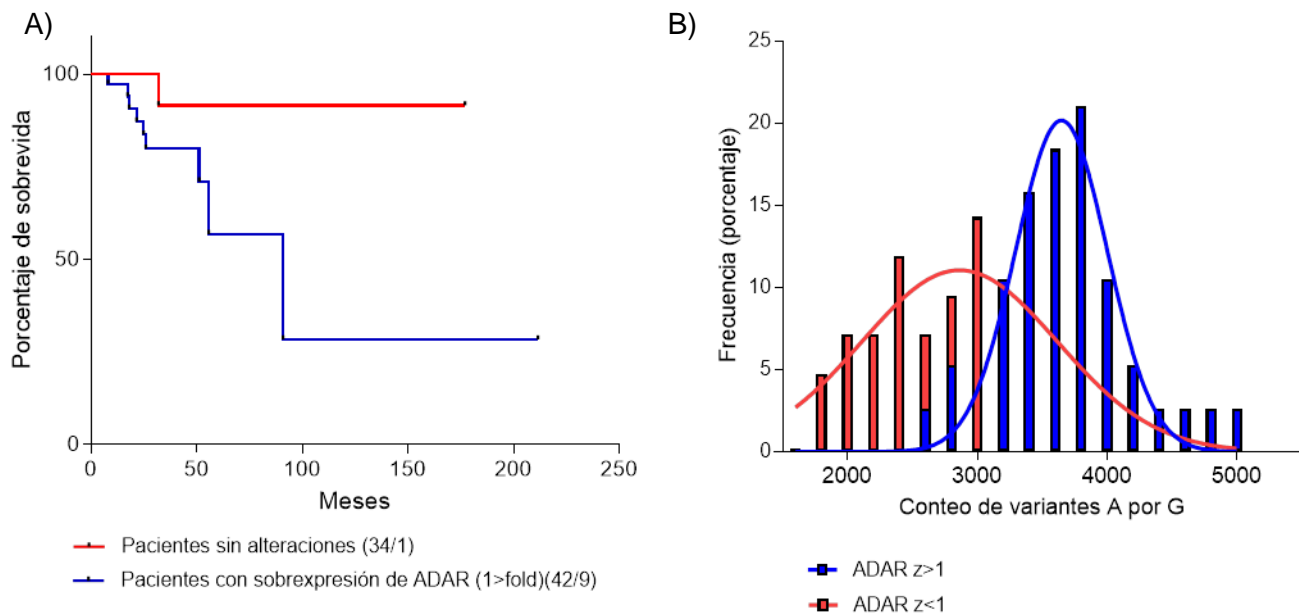
Finalmente, fueron realizados análisis de sobrevida asociados a las muestras incluidas en TCGA, con la finalidad de dilucidar si la expresión o número de ediciones presente en los UTRs analizados posee una importancia clínica en los pacientes con cáncer de mama de la cohorte. Para ello se utilizó el cuartil superior (232 pacientes) e inferior (230 pacientes), de pacientes con mayor y menor número de variantes A > G presentes en sus UTRs en la cohorte TCGA. Previo a esto, se realizó un test de normalidad sobre la distribución de variantes encontradas en cada paciente, encontrando una distribución normal en el número de variantes en la población estudiada y con este criterio se decidió utilizar ambos cuartiles (Figura anexa número 9). Esta actividad se realizó en colaboración con el Dr. Ricardo Verdugo y el Sr. Alejandro Blanco (PGH, ICBM). Brevemente, este análisis, basado en R y el paquete “Survival” de CRAN, utiliza los parámetros de sobrevida presentes en c-bioportal e imputa la recurrencia y sobrevida de los pacientes en una matriz de R, para posteriormente generar un gráfico Kaplan-Meier y una prueba estadística de resultados esperados (Chi-cuadrado). Los resultados de este análisis, mostrados en la Tabla número 8, no mostraron diferencias significativas en la recurrencia de la enfermedad en ambos cuartiles analizados. Por otra parte, los resultados de la mediana de sobrevida (tiempo en meses) de ambos cuartiles muestran diferencias significativas en la sobrevida de los pacientes, donde el cuartil de pacientes con mayor número de ediciones presentan una mediana de meses de sobrevida de 6.14 meses, con una mediana esperada 11.6 meses, mientras que el cuartil de pacientes menos editados, presentan una mediana de 16.3 meses de sobrevida como de sobrevida, con 10.8 meses de mediana esperada.

	DFS (meses)		
	N	Observado(media)na	Esperado
Pacientes con menos ediciones	230	24.7	20.5
Pacientes con más ediciones	232	17.9	22.1
Chisq= 1.8 con un grado de libertad, p= 0.181			

	Sobrevida general (meses)		
	N	Observado(media)na	Esperado
Pacientes con menos ediciones	230	16.3	10.8
Pacientes con más ediciones	232	6.14	11.6
Chisq= 5.7 con un grado de libertad, p= 0.0169			

**Tabla número 8. Asociación de ADAR1 con la supervivencia de pacientes con cáncer de mama.** Tablas de supervivencia asociadas a los pacientes con mayor número de variante A > G (cuartil superior) y pacientes con menor número de variantes A > G (cuartil inferior) en los UTRs analizados.

Adicionalmente, se realizó un análisis Kaplan-Maier con aquellos pacientes del tipo basal de la cohorte, como se muestra en la Figura número 52A, donde se puede visualizar la curva de supervivencia Kaplan-Maier para aquellos pacientes con alta expresión de ADAR (en azul) y aquellos con bajos niveles del mRNA de ADAR1. Encontrando que pacientes del tipo basal con una mayor expresión de ADAR1 poseen una supervivencia significativamente menor a aquellos pacientes con bajos niveles de expresión de ADAR1. Estos resultados fueron complementados utilizando un histograma de la expresión y variantes encontradas para estos pacientes, como se puede ver en la gráfica de la Figura número 52, donde que aquellos pacientes con mayores niveles de ADAR1, son aquellos que presentan un mayor número de variantes en sus UTR (Figura número 52B).



**Figura número 51. Pacientes del subtipo molecular basal con altos niveles de expresión ADAR1 o número aumentado de variantes A por G en su RNA presentan una menor sobrevida.** A) Curva de sobrevida (Kaplan Maier) de aquellos pacientes Basal like que presentan una sobreexpresión del mRNA en azul (42 pacientes censados, 9 de ellos mueren) de ADAR1 y aquellos que no sobre expresan al gen en rojo (34 pacientes censados, 1 de ellos muere). B) Distribución del número de ediciones en pacientes con alta y baja expresión de ADAR1 (barras azules y rojas, respectivamente), mostrado para aquellos pacientes analizados en la curva Kaplan Maier. Datos extraídos desde c-bioportal y analizados en Graphpad. Pvalue: 0.0192; Mantel-Cox test.

## 9. Discusión.

Recientemente, múltiples grupos de investigación han descrito el importante rol de las proteínas de unión a RNA en diferentes enfermedades, incluyendo al cáncer <sup>121-124</sup>. En este sentido, las proteínas editoras de RNA han ganado gran importancia en el estudio de esta enfermedad ya que la expresión y función aberrante de estas proteínas podría promover la progresión tumoral mediante una amplia gama de mecanismos, donde se incluye la activación de vías de señalización, la modificación nucleotídica de regiones codificantes del mRNA, que consecuentemente puede generar un cambio aminoacídico del blanco modificado, así como la modulación de la expresión y cambios en la estabilidad de genes asociados al fenotipo de la enfermedad <sup>69,84,125-127</sup>.

En mamíferos existen dos familias de proteínas con la capacidad de modificar la secuencia nucleotídica de RNA, cada una de estas familias proteicas presenta una función altamente especializada, promoviendo modificaciones distintas y excluyentes en las diversas poblaciones de RNA existentes en el organismo; Siendo estas la familia de adenosina deaminasas y la familia de citidina deaminasas de RNA <sup>97</sup>. Esta última, no solo tiene la capacidad de modificar la secuencia de RNA blanco sino que también ha sido descrita como una editora de DNA y recientemente se fue descubierto que cumple un papel relevante en la generación de mutaciones espontáneas en diversos tipos tumorales, asociando su función a la evolución y heterogeneidad tumoral <sup>128-130</sup>.

Por otro lado, la señalización aberrante de las adenosinas deaminasas específicas de RNA (ADAR) ha sido relacionada con diversas enfermedades mendelianas, enfermedades del sistema nervioso e incluso con la respuesta antiviral del hospedero <sup>74,131-136</sup>. Durante los últimos años, se ha intentado dilucidar el abanico de RNAs modificables/editables por esta familia proteica en distintos modelos celulares, para poder comprender la función de estas proteínas en un contexto genómico. Nuestro laboratorio realizó un análisis comparativo de los resultados obtenidos de tres trabajos científicos, donde se describe la edición del RNA asociada a ADAR1 por medio de distintas técnicas y metodologías de secuenciación de RNA, con la finalidad de



obtener información posicional relevante de la edición, así como la identificación de los blancos editados, para finalmente analizar si ADAR1 modifica preferentemente a un grupo de genes que agrupe a un tipo de ontología celular específica. A la fecha, pocos trabajos <sup>82,91,137</sup> han intentado dilucidar si ADAR1 presenta una preferencia de edición sobre una región o un grupo de genes que involucre a una vía de señalización particular y mucho menos intentar relacionar de esta manera a ADAR1 con el contexto de una enfermedad como el cáncer <sup>138</sup>. De manera interesante, los resultados derivados del análisis comparativo de los tres trabajos que describían a los blancos de ADAR1, arrojaron un enriquecimiento significativo de mRNAs editados los cuales se asocian a procesos biológicos íntimamente relacionados con la progresión tumoral: mRNAs involucrados en las vías de señalización de la reparación del DNA, control de la fase S del ciclo celular y del establecimiento de la horquilla replicativo fueron algunos de los resultados descubiertos, como se describió en las Tablas número 2 y número 3, así como en la Tabla Anexa número 12. Cabe destacar además, y de manera correlacional, que pacientes con cáncer de mama que evidencian una expresión aumentada de ADAR1 presentan un mayor número de mutaciones y una mayor fracción alterada de su genoma (Figura número 8), similar al comportamiento encontrado en la citidina deaminasa APOBEC(G), cuyo patrón de expresión se encuentra aumentado en muestras tumorales, lo que correlaciona con un aumento en el número de mutaciones y una mayor inestabilidad genómica en los pacientes de la cohorte TCGA con cáncer de mama. Además de relacionarse con un aumento del estrés replicativo y la respuesta al daño del DNA de las células tumorales de mama <sup>129</sup>, sugiriendo que ADAR1 podría estar involucrado en una de las características asociadas al descontrol de los mRNAs editados: la inestabilidad genómica y el estrés replicativo.

La edición de RNA es un proceso post transcripcional fisiológico que contribuye a la diversidad del transcriptoma mediante la modificación de los nucleósidos de RNA y cuya implicancia funcional varía de acuerdo a la región del pre-mRNA modificado. Aun cuando la edición de regiones codificantes en el RNA posee un impacto directo sobre la función proteica del transcrito editado, el número de variantes y la generación de modificaciones no sinónimas descritas son muy limitados. Estos resultados, sumado a

las conclusiones de otros autores <sup>125,137,139</sup> muestran que las ediciones, mediadas por ADAR1, en regiones exónicas del mRNA representan menos del 1% del total de variantes en el mensajero, como se puede observar en la Figura número 6A, y que afectan a un número no mayor a 200 transcritos distintos, donde la mayor parte de las variantes generadas producen cambios sinónimos al ser traducidos los mRNAs, de acuerdo a la base de datos RADAR. En contraparte, sobre el 98% de las variantes en el pre-mRNA mediadas por ADAR1 son producidas en regiones intrónicas o regiones no traducibles (UTRs) del pre-mRNA, afectando a un número importante de mensajeros distintos y cuya implicancia podría no estar limitada al cambio aminoacídico producido por la deaminación del RNA.

Con anterioridad ha sido descrito que regionesceptoras o dadoras del *splicing* o corte y empalme del RNA pueden verse afectadas por el proceso de edición del RNA, promoviendo la retención intrónica o la generación de variantes alternativas de un transcrito <sup>125</sup>. Recientemente Bahn y colaboradores (2015), describió que las ediciones en regiones 3' UTR, mediadas por ADAR1, promueven el uso de sitios alternativos de poliadenilación, generando variantes de mRNA con regiones 3' UTR más largas, lo que hace suponer que la modificación de las regiones intrónicas y UTR podría promover una gama de mecanismos por los cuales el RNA blanco podría modificar su expresión, estabilidad e incluso su traducción, toda vez que la aparición de uno o múltiples sitios editados promovería o desplazaría la interacción de complejos que estabilizan o promueven la degradación del RNA blanco. Además, a finales de 2016 fue descrito un nuevo mecanismo por el cual las ediciones del RNA mediadas por ADAR pueden modular la expresión de los mRNAs, independiente de la interacción del transcrito con complejos proteicos. En este mecanismo se sugiere que las ediciones en las regiones 3' UTR de los RNAs editados modifican la interacción canónica RNA/RNA del blanco con miRNAs, promoviendo o inhibiendo el silenciamiento de la expresión del blanco por la modificación de la complementariedad de bases entre ambas poblaciones de RNA, llevando al RNA blanco a degradación <sup>138</sup>. Este trabajo además propone un modelo para la función editora en cáncer, donde de forma preferente mRNAs de genes supresores de tumores serían silenciados mediante este mecanismo y proto-

oncogenes u oncogenes, editados en la región 3' UTR, ven disminuida su interacción canónica con miRNAs, promoviendo así un aumento en su expresión.

Tras analizar el transcriptoma de más de 80 líneas celulares de cáncer de mama, los resultados reflejan una correlación entre la expresión de ADAR1 con el número de variantes A > G detectadas en el RNA de cada una de estas líneas celulares (Figura número 9A). Sin embargo, no fueron encontradas diferencias importantes en el número de estas variantes al comparar las líneas celulares inmortalizadas con las líneas celulares tumorales, suponiendo que este proceso es un proceso fisiológico normal y que podría tener una limitante en el número de blancos editables, posiblemente debido a la saturación de sitios editables o accesibilidad/disponibilidad de la enzima. No obstante, al segregar el enriquecimiento de estas variantes por regiones del genoma, vale decir por regiones codificantes, intrónicas y UTRs, encontramos que las variantes comunes entre las líneas tumorales y las controles presentan un enriquecimiento en su fracción alélica o un porcentaje de edición significativamente mayor y exclusivo en la regiones UTRs e intrónicas para las muestras tumorales comparado a todos los modelos inmortalizados de la cohorte MCF10A, MCF12A y 14A1 (Figura número 10). Este resultado apoya la idea que ADAR1 modula la expresión, estabilidad y la variabilidad presente en el transcriptoma del cáncer de mama mediante los mecanismos descritos con anterioridad.

ADAR1 exhibe un patrón de expresión aumentado en múltiples tipos tumorales, sugiriendo que la progresión tumoral podría ser modulada de forma general por la edición del RNA. Particularmente en el cáncer de mama, los resultados obtenidos muestran una sobreexpresión del mRNA de ADAR1 al analizar la cohorte METABRIC y TCGA, y que además este transcrito se encuentra sobreexpresado indistintamente de los subtipos moleculares del cáncer de mama (Figura número 7). Concordantemente a estos resultados, tras analizar el patrón de expresión de ADAR1 a lo largo de las diferentes líneas celulares, se evidenció una sobreexpresión de este transcrito en los modelos celulares tumorales respecto a las líneas celulares inmortalizadas. Además, la sobreexpresión de ADAR1 no obedece a un solo subtipo molecular, como se evidencia

tras analizar las cohortes de pacientes con cáncer de mama (Figura anexa número 1). Estos resultados son concordantes con los reportados por Fumigalli y colaboradores (2016), donde tras caracterizar la expresión de ADAR1 y las variantes en el RNA presentes en 68 pacientes con cáncer de mama, encontraron una sobreexpresión transversal de ADAR1 y un aumento significativo en el número de variantes asociables a ADAR en las muestras tumorales, respecto a muestras controles.

En la presente tesis doctoral, se evaluó el rol de ADAR1 en la respuesta al daño del DNA, su función sobre la proliferación celular y cómo la expresión de este gen podría modular cambios en la expresión o estabilidad de los blancos editados, toda vez que existe un enriquecimiento significativo de blancos editados asociados a estas vías de señalización y que además, las ediciones presentes en estos blancos se encuentran en regiones no traducibles, sugiriendo que cambios en el patrón de edición mediados por ADAR1 podría modificar la expresión o estabilidad de estos blancos en el contexto tumoral.

En muestras de pacientes con cáncer de mama y el análisis de la bases de datos LINCs, muestran que ADAR1 coexpresa con mRNAs asociados a la transcripción general, ciclo celular, reparación del DNA, fase S, replicación del DNA y apoptosis de la célula. Así también, Wang y colaboradores (2013), describieron una alta correlación entre la expresión de ADAR1 y los niveles de expresión de los blancos editados, resultados que sugieren que ADAR1 podría estar implicado en estos procesos biológicos. Concordantemente con estos antecedentes, en células de carcinoma mamario ZR-751 la disminución en la expresión de ADAR1 se acompaña de una disminución significativa de mRNAs asociados a la proliferación y entrada a ciclo celular (G1 temprano), como la ciclina D1, el proto oncogen MYB y el mRNA del gen NEK2, un marcador de G1-S. Sin embargo, no se identificaron diferencias en la expresión del mRNA de la ciclina E.

Tras analizar la expresión de mRNAs asociados a la respuesta al daño del DNA y replicación celular que presentan ediciones en sus secuencias acorde a los antecedentes preliminares del laboratorio, fue encontrada una disminución significativa en la expresión de los mRNAs de POLH, GINS4 y ATM, mientras que no se encontró diferencias significativas en la expresión de los mRNAs de MCM4, MCM8 y ORC2. Estos resultados son contradictorios a los encontrados por Wang y colaboradores (2013), donde en células linfoides, el silenciamiento de ADAR1 mediante el uso de un siRNA produce una disminución en el número promedio de ediciones encontradas, así como una disminución de la expresión de estos mRNAs donde se incluye el transcrito de MCM4 y MCM8. Estos resultados podrían explicarse por la metodología utilizada por nuestro laboratorio, correspondiente a una transducción lentiviral, produciendo un *knock down* crónico, que debe ser compensado por las células a lo largo del tiempo y los pasajes, mientras que el uso de un siRNA produce una inhibición aguda de ADAR1 para la pesquisa del fenotipo. Complementario a estos resultados, fue evaluada la estabilidad de los transcritos, por medio de la inhibición de la RNA polimerasa II y posterior evaluación de los mensajeros anteriormente señalados, donde se encontraron diferencias significativas en la estabilidad los mensajeros de GINS4, MCM4 y MCM8 tras comparar la vida media de estos transcritos en células ZR-751 SHC y células ZR-751 SHADAR. Estos resultados podrían explicar así las diferencias encontradas por Wang y colaboradores, sugiriendo que los transcritos de MCM4 y MCM8 presentan una menor estabilidad en células *knock down*, comparado a células controles. Sin embargo, no fueron encontradas diferencias significativas en la estabilidad para los mensajeros de ATM y POLH, aun cuando presentan una disminución significativa de su expresión al comparar células *knock down* y células SHC, lo que sugiere un mecanismo indirecto, aun no demostrado, de la regulación de la expresión de estos genes.

Con la finalidad de corroborar los resultados anteriormente descritos y ahondar en el rol de ADAR1 sobre la expresión y/o estabilidad en el transcriptoma, se realizaron experimentos de secuenciación de RNA en los modelos celulares ZR-751 SHC y SHADAR, incluyendo células tratadas con Triptolide, inhibidor específico de la RNA polimerasa II, como se describe en la sección de materiales y métodos. Los

resultados muestran una disminución significativa de vías de señalización asociadas a la supervivencia y proliferación celular, todas ellas dependientes de la señalización a través de PI3K-AKT, así como un aumento en la expresión de mensajeros asociados a la apoptosis mediada por JNK, lo cual es concordante con la literatura reciente, donde ha sido descrito que el *knock down* de ADAR1 produce un aumento en la expresión de mRNAs pro-apoptóticos<sup>140–143</sup>. Por otro lado, el análisis de expresión diferencial derivado de las muestras tratadas con el inhibidor de la RNA polimerasa II, demostró importantes cambios en la estabilidad de los transcritos editados por ADAR1, encontrando un aumento de la estabilidad de los transcritos asociados a la apoptosis celular mediada por JNK, concordantemente con lo descrito recientemente por Sakurai y colaboradores (2017), donde se muestra que tras el *knock down* de ADAR1, mRNAs que normalmente son regulados por ADAR1 y se asocian a una actividad anti-apoptótica ven favorecida su interacción con Staufen, una proteína de interacción a RNA que degrada a estos mRNAs, promoviendo la apoptosis de la célula, mediante un mecanismo denominado decaimiento mediado por Staufen (SMD, *Staufen mediated decay*). Adicionalmente, la inhibición de ADAR1 favorece la estabilidad de mRNAs de proteínas involucradas en el procesamiento de RNAs, donde se incluyen mRNAs de genes asociados al procesamiento del rRNA y mRNAs de genes involucrados en la “vigilancia” y control de calidad del mRNA por medio de la vía de señalización, mediante nonsense-mediated decay (NMD), una vía de señalización que promueve la degradación de mRNAs mal procesados que presentan codones de termino prematuros a la señal de termino normal de un mRNA maduro.

Ya con anterioridad se ha descrito una relación funcional entre ADAR1 y el NMD. ADAR1 interactúa con la maquinaria proteica de esta vía de señalización, siendo propuesto que la edición del RNA es una señal blanco para la degradación de pre-mRNAs mal procesados que luego es censada por UPF1<sup>144</sup>, el principal componente de este mecanismo de control de calidad. No obstante, este es el primer trabajo que describe que la estabilidad de los mRNAs asociados a este proceso se ven favorecidos en células *knock down* para ADAR1, lo que podría suponer un aumento en la actividad de este mecanismo de control de calidad del RNA.

Mientras que un limitado número de vías de señalización ven aumentada su estabilidad en células *knock down*, gran parte de los procesos biológicos que sufren edición del RNA presentan una disminución en su estabilidad en las células ZR-751 SHADAR, comparadas a las células ZR-751 SHC. En este sentido, mRNAs relacionados a la regulación y respuesta al daño al DNA, proliferación y replicación del DNA sufren una disminución significativa en su estabilidad, en comparación a las células controles, encontrando una importante concordancia con los resultados derivados de los ensayos de inhibición de la transcripción utilizando actinomicina D, donde la estabilidad de MCM4, MCM8 y otros mRNAs íntimamente relacionados al proceso replicativo, presentan una disminución significativa de su estabilidad en células ZR-751 SHADAR en comparación a células ZR-751 SHC.

Los resultados obtenidos del análisis de edición diferencial presentaron alta concordancia con los datos preliminares presentados, así como la información de otros autores <sup>91,145</sup>. En particular, el *knock down* de ADAR1 en células ZR-751 produce una disminución significativa de las variantes de todos los transcritos analizados de forma preliminar, vale decir: BRCA2, ATR, ATM, MDM2, MDM4, FANCD2, RAD51, XRCC2, GINS1, GINS4, MCM8, ORC1 y ORC2, exceptuando solamente al transcrito de TP53, donde no se encontraron diferencias en el número de variantes presentes en las células ZR-751 SHC y células SHADAR. De forma similar a los resultados de otros autores en modelos de linfoma <sup>125</sup>, el mRNA que sufrió una mayor disminución en su cantidad de variantes corresponde al codificante del gen MAVS, Mitochondrial Antiviral Signaling Protein, recientemente descrita como una proteína fundamental en el desarrollo embrionario, el cual debe su regulación casi exclusivamente a las ediciones presente en su secuencia <sup>146,147</sup>, seguido del codificante del gen ZNF83, ya descrito por otros autores como un factor de transcripción altamente editado <sup>125</sup>. De esta manera, encontramos una disminución significativa del número de variantes A > G en las células SHADAR, en comparación a las células controles de mRNAs asociados a los procesos biológicos de la “meiosis sináptica”, regulación de la actividad de p53, la activación de ATR como consecuencia del estrés replicativo y la respuesta al daño al DNA general,

así como una disminución del número de variantes de RNAs asociados a la transcripción general y replicación del DNA, demostrando así que ADAR1 promueve importantes cambios en la estabilidad de los RNAs que presentan una disminución en sus variantes A > G presentes en su secuencia, ampliando la idea de otros trabajos que muestran que ADAR regula la expresión de sus blancos a través de la regulación de complejos RNA-proteína, sugiriendo que es la estabilidad del mRNA la que se ve afectada tras el *knock down* crónico de ADAR1 en este modelo de cáncer de mama.

Recientemente, el trabajo publicado por Jisheng y colaboradores (2016), describe que el aumento de la expresión de ADAR1 p150 en células HEK293 conlleva a un aumento en la expresión de un conjunto de proteínas asociadas a la proliferación y respuesta del daño del DNA, siendo denominada por los autores como PCNA *network*. Estos resultados complementan los resultados encontrados en esta investigación, donde células ZR-751 SHADAR presentan una respuesta al daño del DNA basal menor que células controles. Este fenómeno se puede visualizar en la Figura número 28, donde células *knock down* para ADAR1 presentan una disminución significativa en la cantidad de focos positivos para el marcador de daño del DNA  $\gamma$ H2AX, lo cual podría sugerir una disminución general de la respuesta del daño al DNA en este modelo. Células ZR-751 SHADAR presentan una disminución, bajo condiciones basales de la fosforilación activadora de CHEK2, así como también una disminución significativa de los niveles de la fosforilación activadora de Atr. Adicionalmente, los resultados obtenidos sugieren, que el *knock down* de ADAR1 en células MCF7 produce una disminución en la actividad transcripcional de p53, y de su fosforilación activadora.

En la actualidad, existe amplio consenso que la evolución del cáncer, la generación de mutaciones e inestabilidad genómica propias de la enfermedad, son consecuencia de la señalización aberrante que confluye en la desregulación del proceso replicativo, los que finalmente promueven el enlentecimiento, detención de la síntesis de DNA o el desensamblaje de las horquillas replicativas durante la fase S, generando segmentos de DNA sin duplicar, sitios reparados bajo procesos no libres de



errores y/o sitios abasicos, producto del estrés oncogénico que presiona a la célula a proliferar de manera constante <sup>20,27,31,40,149,150</sup>. En este fenotipo, existe un aumento sostenido y basal de la respuesta al daño del DNA por parte de las células, la cual no logra contener la presión por proliferar, no se ve acompañado de un aumento en la apoptosis celular, toda vez que los mecanismos canónicos de la apoptosis se encuentran inhibidos. En este contexto, recientemente fue descrito que la citidina deaminasa APOBEC, promueve el estrés replicativo en células de cáncer de mama y otros modelos celulares de manera indirecta, a través de la señalización dependiente de Her2, un oncogén característico del cáncer de mama, promoviendo su actividad deaminasa en el DNA <sup>129</sup>. Así también, fue descrito que esta proteína editora de RNA promueve la activación de la respuesta al daño al DNA, la cual se ve disminuida al inhibir la expresión de este gen, haciendo a las células sensibles a la apoptosis tras ser tratadas con inhibidores farmacológicos de ATR y CHEK1 <sup>151</sup>. Adicionalmente, los autores describen que la actividad y expresión de esta proteína logra ser inhibida al aliviar el estrés replicativo por medio de la adición de altas concentraciones de nucleótidos a las células, sugiriendo que la familia de editoras de RNA podría estar relacionada al proceso replicativo <sup>129,152</sup>. Los resultados encontrados en esta investigación sugieren que ADAR1 podría estar involucrado en el estrés replicativo de la célula, como fue descrito recientemente para APOBEC, donde hemos demostrado que células *knock down* para ADAR1 presentan una disminución significativa de actividad de la respuesta al daño del DNA en los modelos celulares ZR-751 y MCF7.

La replicación del DNA es un proceso altamente regulado, que permite la duplicación del material hereditario de forma precisa para su posterior herencia. Este proceso es llevado a cabo por una compleja maquinaria proteica denominada “replisoma” <sup>153,154</sup>, la cual tiene por función replicar el DNA bidireccionalmente desde un punto de origen, de manera semi conservativa <sup>155</sup>. Este proceso celular se encuentra altamente concertado con el ciclo celular y la reparación del DNA, requiriendo de la formación de diversos complejos que son regulados transcripcional, post transcripcional y temporalmente, para la correcta duplicación del DNA y posterior mitosis celular. Los resultados obtenidos indican que cambios en la expresión en ADAR1 generan un

profundo impacto en la estabilidad de los mensajeros implicados en el replisoma, modificando su estabilidad de forma significativa, incluyendo a múltiples mRNAs que codifican para el complejo MCM, GINS y ORC, fundamentales para el correcto posicionamiento, ensamblaje y activación del proceso replicativo. Posteriormente, fueron realizados ensayos de fibras de DNA, el cual nos permitió caracterizar la distribución y avance de las horquillas y figuras replicativas tras el *knock down* de ADAR1 y compararlas con células controles. Los resultados encontrados indican que las horquillas replicativas en células *knock down*, presentan un enriquecimiento de figuras replicativas recientemente establecidas, en comparación a las células controles, donde la mayor proporción de figuras replicativas se relaciona con fibras en marcha, sugiriendo que el avance de la replicación en células SHC es más rápida que en células SHADAR. Este resultado da cuenta de las diferencias encontradas tras analizar el ciclo celular en las células SHADAR y SHC, donde existe un incremento significativo de células que se encuentran en la fase S del ciclo celular en las células SHADAR, que podría suponer una diferencia temporal de la replicación, más allá de promover la proliferación celular como ha sido descrito para otros genes implicados en la replicación celular <sup>156-158</sup>.

La sobreexpresión de ADAR1 en la línea celular MCF7 produce un aumento significativo de la expresión proteica de la ciclina D1, sin cambios significativos en la cantidad del mensajero, tras comparar las células transfectadas con un vector control (eGFP) y las células transfectadas con ADAR1 p110. Estos resultados sugieren que la estabilidad de la ciclina podría verse aumentada tras la sobreexpresión de ADAR1, resultado similar a los encontrados por Chen y colaboradores (2013), quienes mostraron que células de cáncer hepático transfectadas con ADAR1 poseen un aumento de la estabilidad proteica de la ciclina D1, que consecuentemente estimula la proliferación celular en ese modelo celular. En este trabajo, los autores describen que este proceso es mediado por la aparición de una única edición producida en la región codificante de AZIN1, una proteína que modula de manera indirecta la estabilidad de la ciclina, inhibiendo la degradación de la ciclina D y la ornitina decarboxilasa. Sin embargo, la sobreexpresión del ADAR1 en células MCF7, no es suficiente para

aumentar la proliferación celular. Esto podría ser explicado por las diferencias genéticas entre los modelos celulares utilizados. Las células MCF7 presentan p53 y otros supresores tumorales que hacen probable que este modelo requiera de alteraciones génicas adicionales a la sobreexpresión de ADAR1 para aumentar la proliferación celular, comparada con las células ZR-751. No obstante a estos resultados, tras inducir la expresión de ADAR1 en los modelos HeLa Flp IN T-REx, se encontró un aumento en la proliferación sostenida en el tiempo, así como un incremento significativo de los marcadores de proliferación MYC, CCNE1 y CCNA1, resultados similares a los encontrados por Zhang y colaboradores (2007) , quienes describieron que la sobreexpresión de ADAR1 en células HeLa promueve una mayor proporción de células en fase G<sub>1</sub>-S respecto a células controles.

Varios trabajos han demostrado que ADAR1 está asociada a fenotipos tumorales. Recientemente, Fumagalli y colaboradores (2015), publicaron un trabajo mostrando que la inhibición mediante siRNA de ADAR1 p150, promueve una disminución en la viabilidad de los modelos celulares cáncer de mama MCF7 y MDA-231. De forma similar, células ZR-751 *knock down* para ADAR1 presentan una viabilidad disminuida en el tiempo, comparado a células controles, como también los ensayos de citometría de flujo y determinación de poblaciones celulares por medio del marcaje de Yoduro de Propidio (PI) y el ensayo de incorporación de BrdU, en células ZR-751 SHC y células ZR-751 SHADAR muestran una acumulación significativa de las células ZR-751 SHADAR en fase S, respecto a la distribución encontrada en las células ZR-751 SHC. Estos resultados sugieren que existe un descontrol de esta fase en las células *knock down*, respecto a las células controles, lo cual podría deberse a diferencias en el periodo del proceso replicativo en ambos modelos celulares. No obstante, futuros trabajos se deben realizar para conocer el mecanismo detrás de estas diferencias en la distribución del ciclo celular en los modelos estudiados.

La expresión aberrante de ADAR1 en diversos tumores se encuentra relacionada con un aumento de la proliferación celular<sup>160-162</sup>, junto a la adquisición de fenotipos invasivos y una disminución de la apoptosis<sup>163</sup>. Por esta razón, se evaluó la apoptosis celular en los modelos ZR-751 SHADAR y SHC. Células ZR-751 SHADAR presentan una mayor intensidad y número de focos positivos derivados del ensayo de timidina terminal, así como una mayor actividad de las caspasas intrínsecas 3 y 7 y una menor viabilidad en general. Estos resultados fenotípicos podrían explicarse por el aumento en la estabilidad y expresión de mensajeros asociados a la apoptosis en células *knock down* para ADAR1, apoyado además por la literatura actual que relaciona al silenciamiento de ADAR1 con una menor estabilidad de mRNAs anti-apoptóticos<sup>140</sup>, llevando a las células a la apoptosis y el fenotipo mostrado por ratones y células MEF *knock out* de ADAR1, los cuales presentan una apoptosis aumentada en el hígado y una mayor sensibilidad a la privación de suero que modelos WT<sup>142,164</sup>. Los resultados provenientes de 3 cohortes diferentes de carcinoma mamario, donde se incluyen las dos cohortes más importantes de cáncer de mama, TCGA y METABRIC, muestran un aumento significativo de la expresión de ADAR1 en las muestras tumorales respecto a las muestras controles incluidas en cada cohorte, sin encontrar diferencias en las otras isoformas de ADAR (ADAR2 y ADAR3), resultados similares a los ya encontrados por otros autores, en distintos tipos de cáncer, así como recientemente en cáncer de mama<sup>115,116,138</sup>.

Diversos autores se han cuestionado sobre cual isoforma de ADAR1 es aquella relacionada con la progresión tumoral. En el caso de tumores líquidos existe consenso que es ADAR1 p150 aquella isoforma que se sobreexpresa y ejerce un papel relevante en la enfermedad, mientras que en tumores sólidos existe gran controversia sobre cuál es la isoforma predominante, así como los mecanismos que permiten la sobreexpresión de esta proteína. Nuestros resultados indican que existe una sobreexpresión significativa de la variante de mensajero que codifica para ADAR1 p110, tras comparar la expresión endógena de nuestros modelos celulares MCF10A, MCF7 y ZR-751 por qRT-PCR y WB (*western blot*). Además, los resultados derivados del RNAseq de TCGA, no indican que existe un enriquecimiento de lecturas para la variante uc001ffk, la cual codifica

para ADAR1 p110, esto además es concordante con la localización subcelular encontrada en los modelos MCF7, ZR-751 y HeLa, donde se encontró un patrón predominantemente nuclear y nucleolar (Figura anexa número 2), el que corresponde a la localización subcelular de ADAR1 p110 acorde a lo sugerido por Patterson y colaboradores (1995), mientras que la isoforma larga de ADAR1 (ADAR p150), presenta una distribución mucho más amplia que incluye al citoplasma de la célula, de acuerdo a lo descrito por Desterro y colaboradores (2003) y Patterson y colaboradores (1995). Por otro lado, los resultados de Fumigalli y colaboradores (2015) muestran que la expresión de ADAR1 solo se correlaciona con la amplificación del brazo largo del cromosoma 1 (1q); Sin encontrar una correlación significativa entre la expresión de ADAR1 y la señalización mediada por interferón tras analizar 56 muestras de adenocarcinoma mamario. Lo cual apoya la idea que ADAR1 p110 es aquella isoforma predominante en la enfermedad, toda vez que existe amplio consenso que la isoforma larga de ADAR1 es inducible por la señalización dependiente de interferón<sup>78,69</sup>. Estos resultados son similares a los encontrados durante el desarrollo de esta investigación, tras analizar las cohortes TCGA y METABRIC, y comparar a la expresión de este gen y el número de copias del gen. Así, los resultados obtenidos por nuestro grupo y grupos independientes indican que ADAR1 p110 es la isoforma que sufre una sobreexpresión significativa en el contexto del cáncer de mama, sin estar relacionada p150 en la biología tumoral del carcinoma mamario.

Otros grupos han correlacionado el número de variantes A > G en el transcriptoma de pacientes con cáncer, con la supervivencia de estos durante los últimos años<sup>116,167</sup>. No obstante, estos trabajos han centrado sus esfuerzos en correlacionar el número de variantes encontradas en regiones codificantes con la supervivencia de estos pacientes. En este trabajo fueron seleccionados 571 UTR con información previamente validada, para analizar el número de variantes atribuibles a ADAR en estas regiones en pacientes con cáncer de mama de la cohorte TCGA. Los resultados obtenidos reflejan gran concordancia con los trabajos recientemente publicados en cáncer de mama, ambos analizando de forma global la cohorte TCGA en todos sus tipos tumorales, centrando sus esfuerzos en la búsqueda de variantes y correlaciones con regiones

codificantes del transcriptoma. Concordantemente con los resultados reportados por otros autores, nuestros resultados muestran un incremento significativo de variantes atribuibles a ADAR a lo largo de las muestras analizadas, como también una altísima correlación de estas variantes con su posicionamiento en regiones *Alu*, lo cual ya había sido cotejado con anterioridad <sup>116</sup>.

Durante esta investigación se encontró una importante y significativa correlación de las variantes A > G en el RNA de pacientes con cáncer de mama, con la expresión de ADAR1, sin observar una correlación entre la expresión y las variantes detectadas con las otras isoformas de ADAR, similar a lo reportado por otros autores <sup>115,168</sup>. Además de encontrar un aumento en el número de variantes A > G en los UTRs de las muestras tumorales, comparado al número de variantes A > G en las muestras controles de la cohorte TCGA. De manera relevante, los resultados de la presente investigación muestran que existe una significancia clínica tras correlacionar el número de ediciones en los UTRs con la sobrevida de estos pacientes. Contrario a los resultados encontrados por Paz-Yaacov y colaboradores (2015), trabajo que centró sus esfuerzos en el análisis de variantes del mRNA pesquisadas en regiones codificantes, donde no se observa una correlación significativa entre el incremento del número de variantes atribuibles a ADAR1 y la sobrevida de los pacientes. Así, nuestros resultados muestran que pacientes con cáncer de mama con un mayor número de ediciones y/o expresión de ADAR1, presentan una sobrevida significativamente menor que pacientes que presentan una baja expresión y/o presentan un bajo número de variantes A > G en los 571 UTRs analizados. Además, los pacientes con un mayor número de ediciones, presentan una mayor tasa de mutaciones y alteraciones cromosómicas en su genoma, respecto a pacientes con baja expresión o bajo número de ediciones, como fue descrito con anterioridad. Finalmente, resultados similares se pueden observar al analizar la recurrencia de la enfermedad (*Disease free survival*) seleccionando sólo aquellos pacientes que no recibieron tratamiento durante el seguimiento de esta cohorte (datos no mostrados).

Durante el año 2016, fue publicado el primer trabajo que intenta correlacionar cambios en la expresión en el mRNAs editados por ADAR con el número de variantes encontradas en pacientes con cáncer <sup>120</sup>. Esta tesis doctoral busca explicar cómo las ediciones modulan la expresión de los mRNAs, que sufren esta modificación nucleotídica, a través de la creación o destrucción de sitios de interacción de miRNAs los que finalmente producen cambios en la expresión debido a este mecanismo. Este trabajo encuentra una significativa correlación entre el número de ediciones y la expresión de algunos mRNAs que sufren edición, identificando 2 miRNAs relevantes para la regulación de MDM2. En este mismo sentido, los resultados observados arrojan una correlación entre la expresión y la edición de algunos mRNAs, entre los que se incluyen el mRNA de ATM y GINS4. Estos mRNAs sufren cambios en su expresión - y una disminución significativa del número de variantes A > G - en las células ZR-751 SHADAR, lo cual podría suponer que la presencia de ediciones en los UTRs de estos mRNAs podría estar relacionado con un proceso regulatorio post transcripcional. No obstante, otros mecanismos plausibles podrían explicar los cambios de expresión, más allá del mecanismo propuesto por Zhang y colaboradores (2016), entre los cuales se podrían destacar: cambios de estabilidad mediado por un incremento o disminución de la interacción de distintos complejos proteicos o cambios en la población de mRNAs, debido a la desregulación del procesamiento del mensajero “canónico”, teniendo como resultado mRNAs mal procesados que decaen rápidamente o cambios en sus 3' UTRs debido al proceso de poliadenilación alternativa, como ha sido reportado recientemente

137

En resumen, los resultados de esta investigación indican que células de cáncer de mama con una menor expresión de ADAR1 presentan una menor actividad transduccional de la vía de señalización de respuesta al daño del DNA. Además, ADAR1 está relacionado a la actividad proliferativa de estos modelos celulares, suponiendo una desregulación del ciclo celular tras la alteración de la expresión de este gen, que de igual manera promueve la apoptosis celular en los modelos *knock down* de ADAR1 utilizados. Por otro lado, los resultados encontrados señalan que existe un enriquecimiento significativo de mRNAs editados asociados a los procesos celulares de la respuesta al daño del DNA, replicación celular y proliferación, los cuales se ven afectados tras inhibir la expresión de ADAR1, modificando de manera significativa su estabilidad y/o expresión. Así, la disminución de ediciones en los mRNAs editados promueve cambios en la estabilidad del mRNA blanco, mediante distintos mecanismos aun por dilucidar.

Finalmente, destacar que la expresión de ADAR1 y el número de ediciones en pacientes con cáncer de mama posee una significancia clínica, pacientes con una mayor expresión de esta enzima o número de variantes (ediciones) en sus UTRs presentan una menor supervivencia así como una mayor recurrencia de la enfermedad. Sugiriendo a este proceso post-transcripcional como un novedoso mecanismo asociado a la progresión tumoral.



## 10. Conclusiones.

- En el presente trabajo se describe que la expresión de ADAR1 juega un papel relevante en la regulación de la estabilidad de mRNAs blanco asociados a la respuesta al daño del DNA, control del ciclo celular y regulación de la transcripción en células de cáncer de mama, donde mRNAs involucrados en la respuesta al daño del DNA, replicación y ciclo celular presentan una disminución significativa en su estabilidad y mRNAs asociados a la apoptosis y NMD incrementan su estabilidad tras la inhibición de la expresión de ADAR1.

- ADAR1 participaría en la regulación de la respuesta al daño al DNA en células de cáncer de mama mediante la alteración de la estabilidad de los transcritos relacionados a esta vía de señalización o a un mecanismo indirecto aun por dilucidar.

- La expresión de ADAR1 en células de cáncer de mama ZR-751 y cáncer cervico uterino HeLa, es importante para la proliferación celular, al promover la expresión de genes blanco relacionados con la progresión del ciclo celular. Encontrando que células *knock down* para ADAR1 presentan una menor proliferación y viabilidad, así como una apoptosis aumentada respecto a células controles. Adicionalmente, células ZR-751 *knock down* para ADAR1 presentan una mayor proporción de células en fase S, pudiendo explicarse este fenómeno a diferencias en el proceso replicativo tras la inhibición de la expresión de ADAR1.

- Pacientes con cáncer de mama evidencian un mayor número de variantes A > G en sus UTRs en comparación a muestras de pacientes controles. Lo que además posee una implicancia clínica, ya que pacientes con cáncer, con un número aumentando de variantes A > G en sus UTRs, presentan una sobrevida significativamente menor a aquellos pacientes con bajos niveles de expresión y/o variantes A > G en los UTRs analizados.

## **Presentaciones en congresos.**

### **A-to-I ADAR1 transcriptome editing in breast cancer disease.**

Sagredo, A Eduardo<sup>2</sup>., Sagredo, Alfredo I<sup>2</sup>., Blanco, Alejandro<sup>2</sup>., Morales, Fernanda<sup>2</sup>., Verdugo, Ricardo<sup>2</sup>., Olivier, Harismendy<sup>1</sup>., Marcelain, Katherine<sup>2</sup>., Armisen, Ricardo<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Moore's Cancer Center, Medical School, University of California San Diego. <sup>2</sup>Centro de Investigación y Tratamiento del Cáncer, Facultad de Medicina, Universidad De Chile. <sup>3</sup>Pfizer Chile, Center of Excellence in Precision Medicine.

The double stranded RNA-specific adenosine deaminase (ADAR1) catalyzes the deamination of adenosine in pre-mRNAs, non-coding RNAs and mature mRNAs resulting in important stability, function and expression changes of its targets. Editing unbalance has been demonstrated in several diseases, including cancer, where increased editing levels are strongly correlated with the progression of the disease. However, the expression and activity of ADAR1 in breast cancer is not well characterized. Gene expression data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) cohort, which includes 1214 breast cancer samples, was analyzed and a novel strategy to call single nucleotide changes in the RNA, in order to evaluate the editing changes present in these patients was implemented. In addition, the expression levels of ADAR1 and the editing levels of ADAR1 targets were measured using RT-qPCR and RESSqPCR in three breast cancer cell lines (MCF10A, MCF7 and ZR-751). The analysis of expression data from TCGA showed a significant overexpression of ADAR1 in tumors compared to normal samples. These changes also correlated with the editing and expression levels of ADAR1 in the breast cancer cell lines analyzed. In addition, the bioinformatics analysis revealed a significant enrichment of A > G transition in the tumor compared to normal samples, showing significant editing changes in mRNAs associated to the DNA replication and cell cycle process. Impending work is needed to elucidate the function of the editing changes mediated by ADAR1 and their relation with the breast cancer progression.

Supported By FONDECYT 1151446 And CORFO 13CEE2-21602.

## **Trabajos en preparación:**

### **A-to-I ADAR1 UTRs transcriptome editing in breast cancer disease.**

Sagredo, Eduardo A<sup>2,3</sup>., Blanco, Alejandro<sup>3</sup>., Sagredo, Alfredo I<sup>2</sup>., Verdugo, Ricardo<sup>2</sup>., Olivier, Harismendy<sup>1</sup>., Marcelain, Katherine<sup>2</sup>., Armisen, Ricardo<sup>3</sup>.,

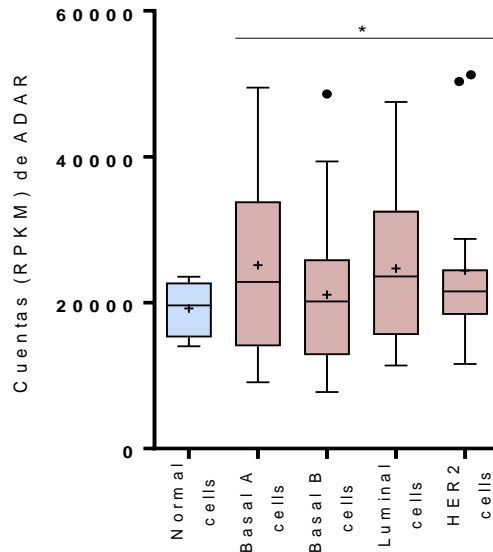
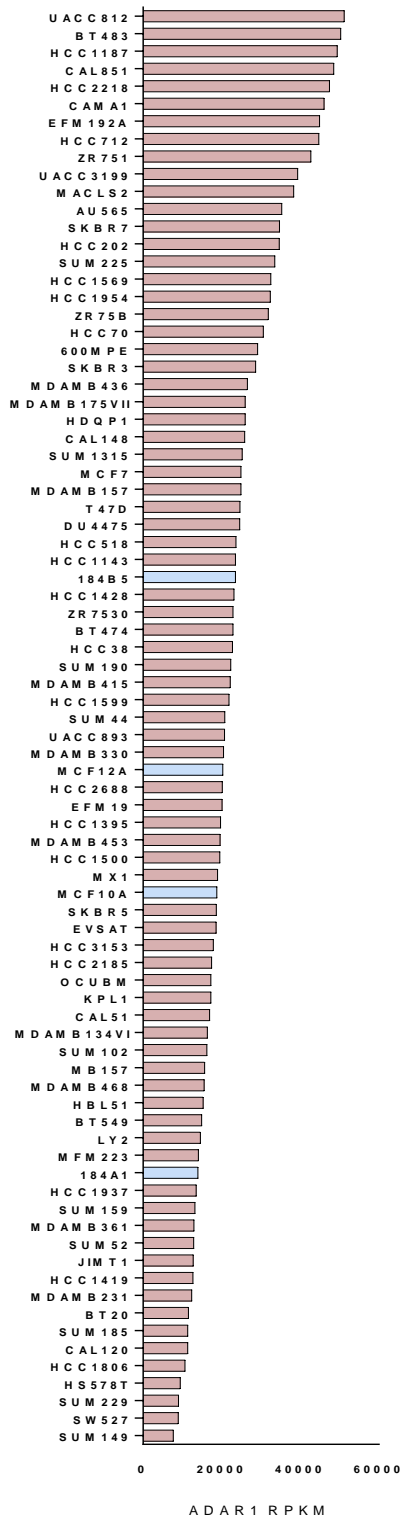
<sup>1</sup>Moore's Cancer Center, Medical School, University of California San Diego. <sup>2</sup>Centro de Investigación y Tratamiento del Cáncer, Facultad de Medicina, Universidad De Chile. <sup>3</sup>Pfizer Chile, Center of Excellence in Precision Medicine.

### **ADAR promotes breast cancer progression through the regulation of cell cycle and DNA repair related genes**

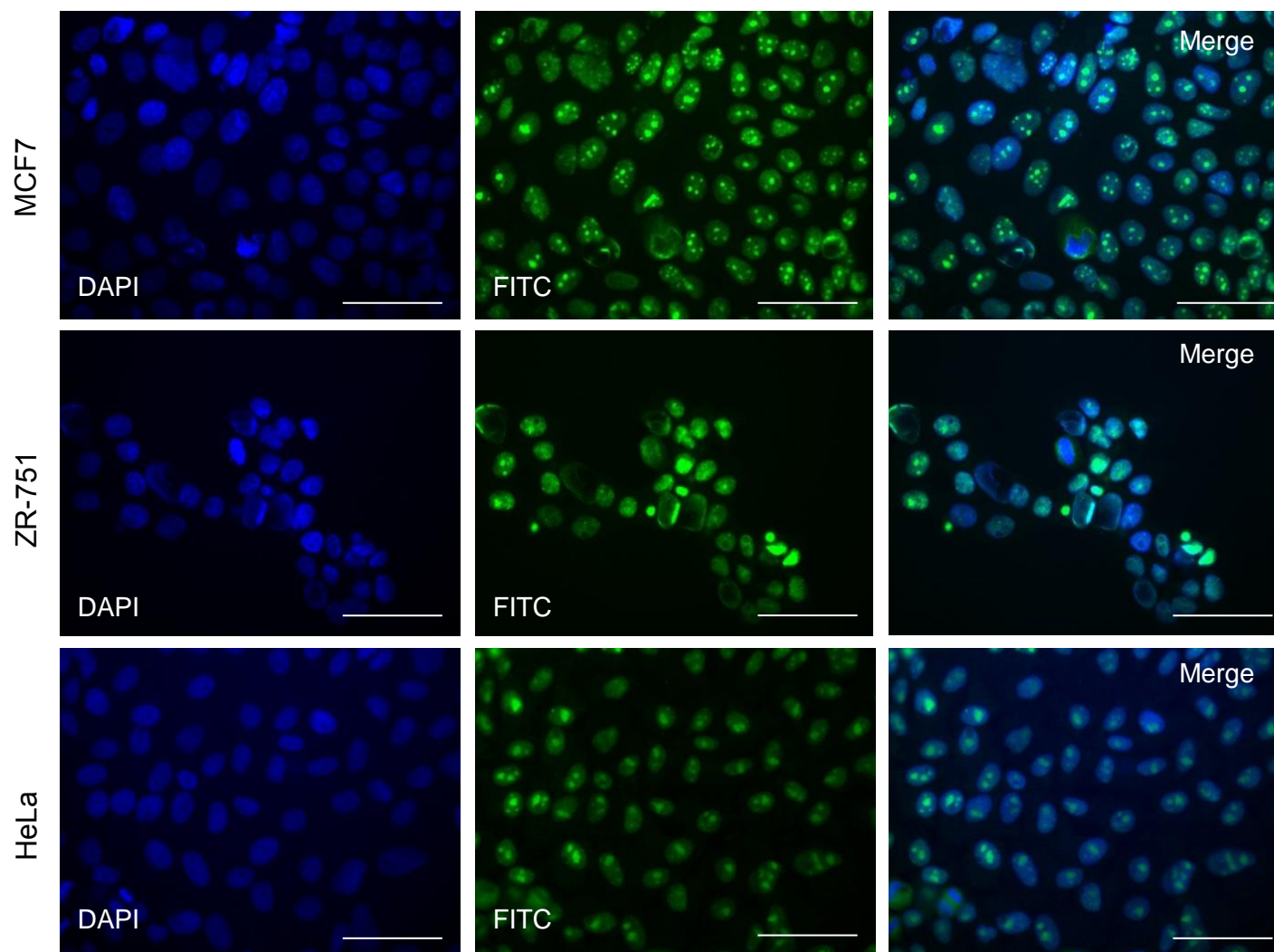
Sagredo, Eduardo A<sup>1,2</sup>., Sagredo, Alfredo I<sup>1</sup>., Blanco, Alejandro<sup>2</sup>., Marcelain, Katherine<sup>1</sup>., Armisen, Ricardo<sup>2</sup>.,

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Tratamiento del Cáncer, Facultad de Medicina, Universidad De Chile. <sup>2</sup>Pfizer Chile, Center of Excellence in Precision Medicine.

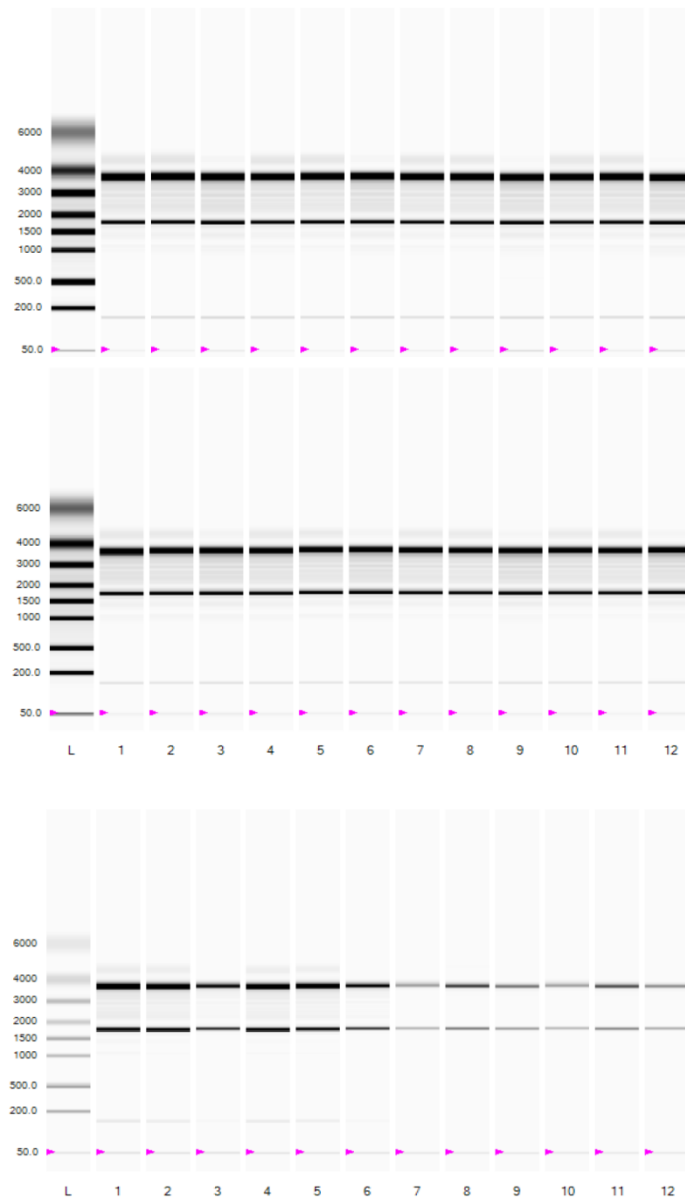
## 11. Anexos.



**Figura Anexa número 1. Expresión de ADAR1 en líneas celulares de mama.** A) Distribución de la expresión de ADAR1 en las 83 distintas líneas celulares de mama presentes en el proyecto PRJNA297219. B) veces de cambio de ADAR1 para las distintos tipos moleculares (PAM50) de cáncer de mama, respecto a líneas celulares controles (inmortalizadas). En azul se muestran las líneas celulares inmortalizadas, en rojo las líneas celulares tumorales. T-Test de 2 vías. \* < 0.05. Cuentas de RNA en escala RPKM o lecturas por millón de lecturas alineadas.



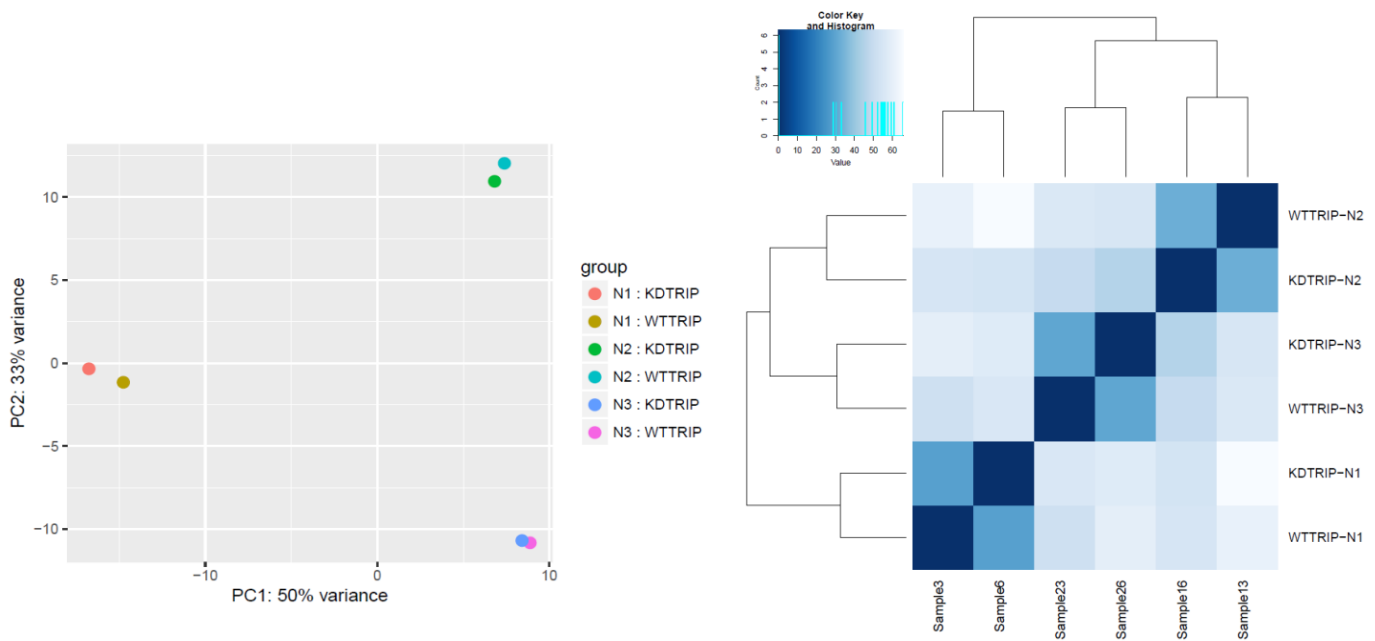
**Figura Anexa número 2. Expresión endógena de ADAR1 en modelos celulares incluidos en el estudio.** Imágenes representativas de la expresión de ADAR1 endógena en los modelos MCF7, ZR-751 y HeLa, utilizados en este estudio (60X), barra de escala corresponde a 40  $\mu$ m.



**Figura Anexa número 3. Control de calidad de los RNAs totales incluidos en experimentos de secuenciación de RNA, continuación.** A) Electroferograma digital de las muestras incluidas en los experimentos de RNAseq. Se muestra el patrón de bandeo característico del RNA ribosomal (rRNA) 28S (banda superior) y el rRNA 18S (banda inferior de cada electroferograma digital) para las distintas réplicas biológicas incluidas.

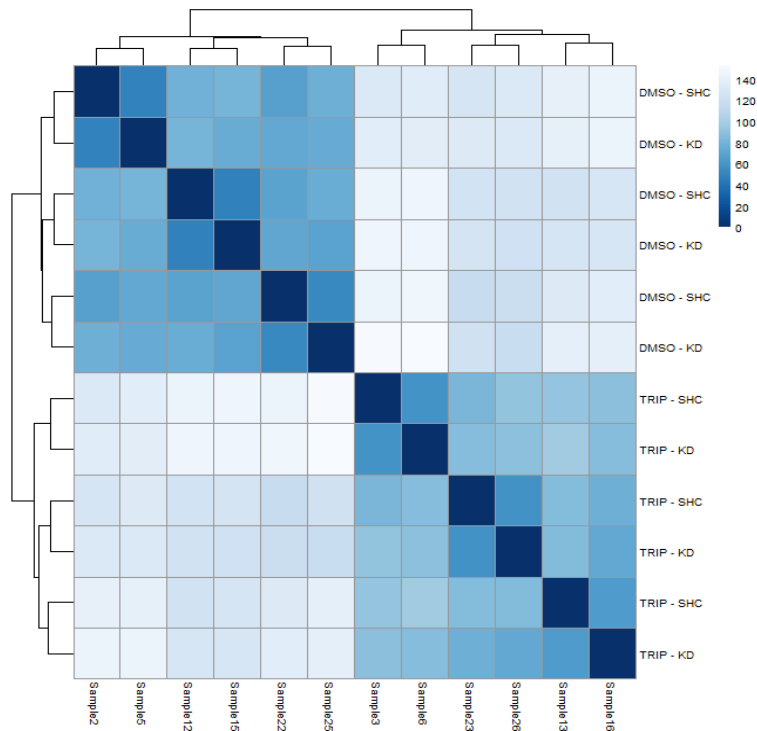
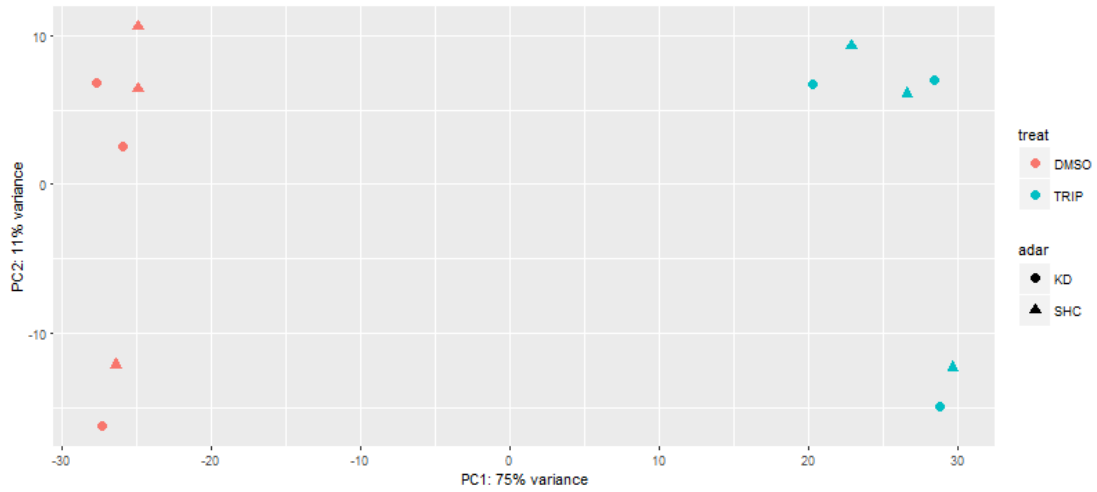
ID de la muestra	Lecturas	Largo	GC%
N1			
Sample6_CHKPEI85216060133	42193312	100	48
Sample5_CHKPEI85216060132	44825044	100	47
Sample4_CHKPEI85216060131	43976654	100	48
Sample3_CHKPEI85216060130	39986407	100	49
Sample2_CHKPEI85216060129	48072295	100	49
Sample1_CHKPEI85216060128	45883057	100	50
N2			
Sample16_CHKPEI85216060139	39916651	100	46
Sample15_CHKPEI85216060138	43969633	100	46
Sample14_CHKPEI85216060137	37962724	100	46
Sample13_CHKPEI85216060136	44982926	100	46
Sample12_CHKPEI85216060135	45225485	100	46
Sample11_CHKPEI85216060134	39320526	100	45
N3			
Sample26_CHKPEI85216060145	47935660	100	46
Sample25_CHKPEI85216060144	39439761	100	47
Sample24_CHKPEI85216060143	41415252	100	46
Sample23_CHKPEI85216060142	38304912	100	47
Sample22_CHKPEI85216060141	39351130	100	46
Sample21_CHKPEI85216060140	46334211	100	46

**Tabla Anexa 1. Control de calidad del RNAseq: Número de lecturas de cada una de las muestras secuenciadas.** A) Tabla resumen con la codificación de cada una de las muestras así como el número de lecturas, largo de los amplicones secuenciados y el porcentaje promedio de la composición de GC de cada una de las muestras.

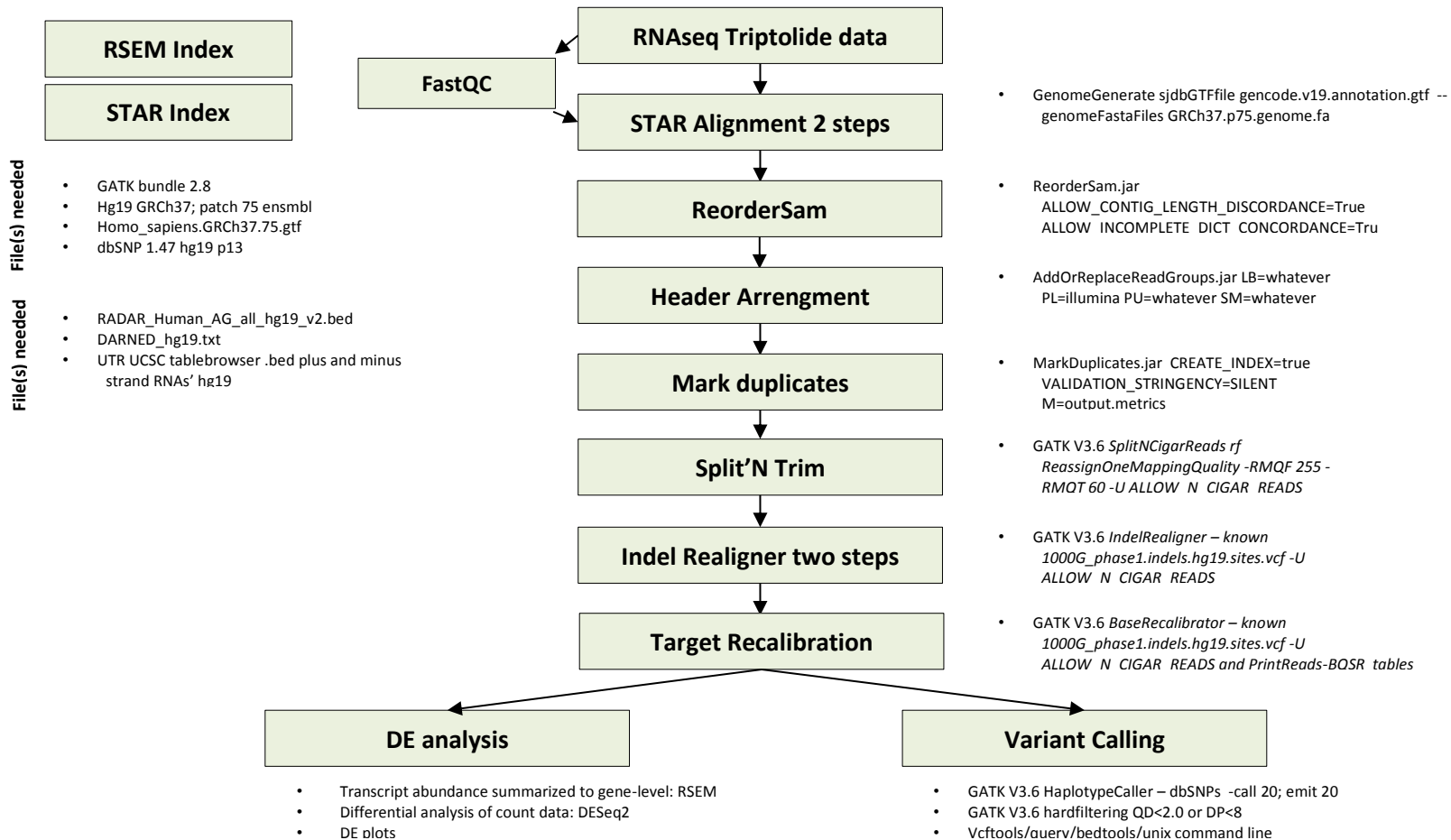


**Figura Anexa número 4. Análisis de componente principal de las muestras secuenciadas.** Análisis de componente principal de las muestras secuenciadas, utilizando aquellas muestras controles y *knock down* para ADAR1 indistintamente si tuvieran DMSO o no fueran tratadas.



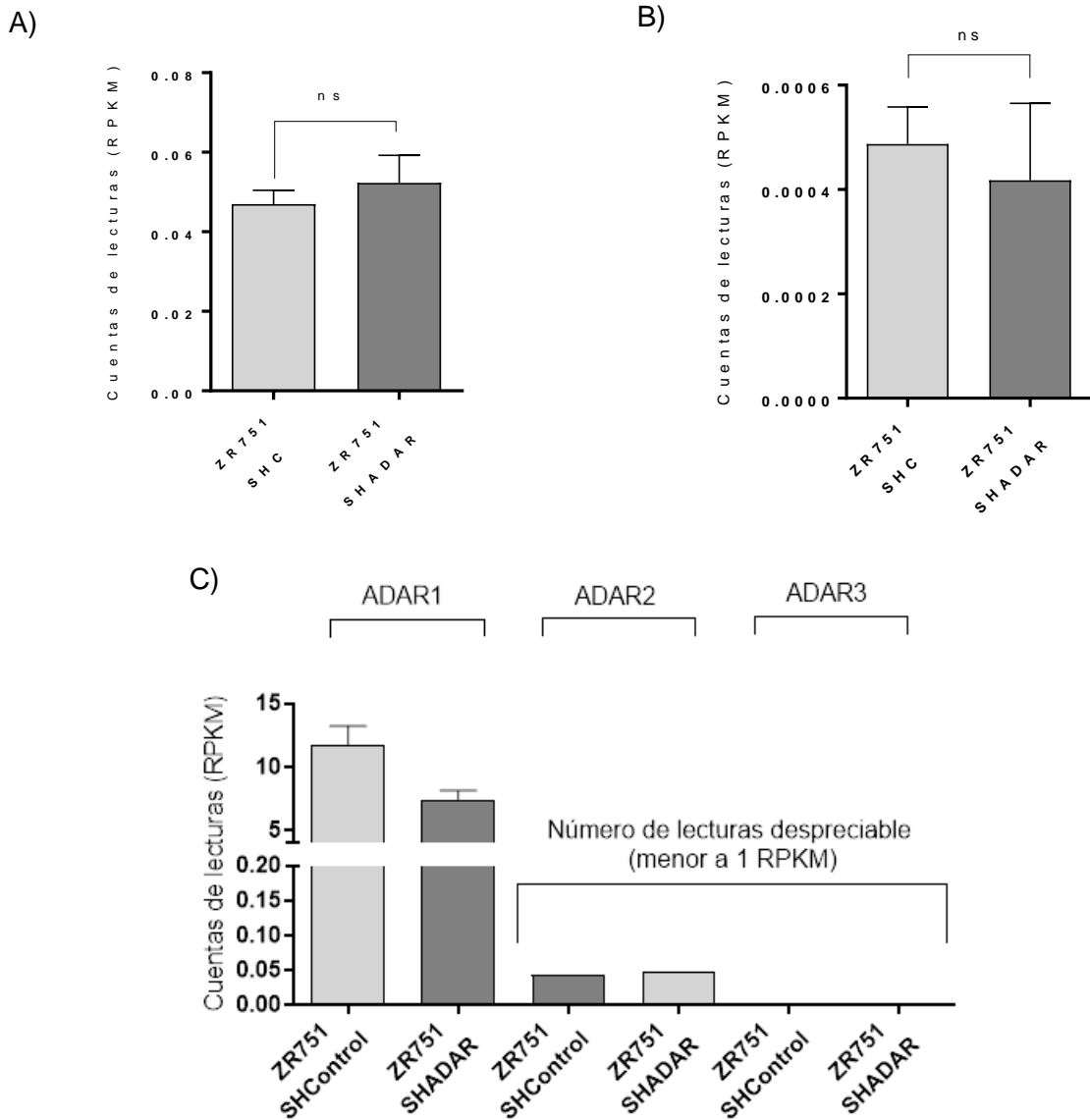


**Figura Anexa número 5. Análisis de componente principal de las muestras tratadas con el inhibidor de la RNA polimerasa II Triptolide.** Análisis de componente principal de las muestras secuenciadas tratadas con el inhibidor Triptolide. Incluyendo las muestras tratadas con el vehiculo DMSO.



**Figura Anexa número 6. Diagrama de flujo para el procesamiento y obtención de resultados asociado al RNAseq secuenciado.**

A) Figura resumen para el procesamiento de las muestras de RNAseq. Brevemente, los archivos fueron analizados utilizando FastQC, alineados utilizando STAR y procesados en el flujo como se describe. Además, se muestran las características principales de los comandos utilizados.

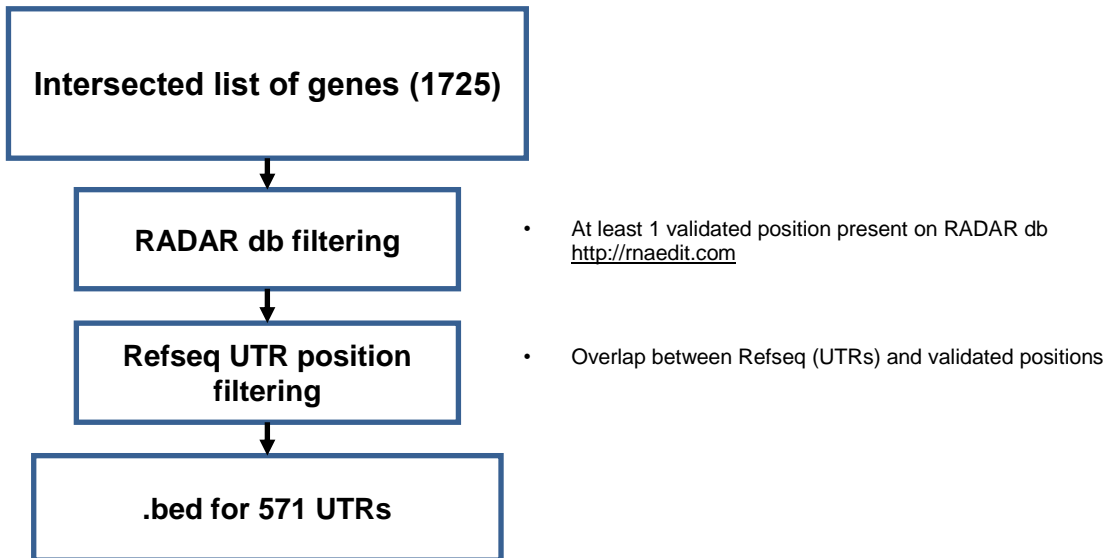


**Figura Anexa número 7. Análisis de cuentas o lecturas individual para las isoformas de ADAR2 y ADAR3.** A) Número de cuentas (RPKM) encontradas en las muestras ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR secuenciadas, para el transcrito de ADAR2. B) Número de cuentas (RPKM) encontradas en las muestras ZR-751 SHC y ZR-751 SHADAR secuenciadas, para el transcrito de ADAR3. N:6 T-test de dos vías, ns: sin diferencias significativas. C) Comparación de lecturas encontradas para las isoformas de ADAR, como se puede apreciar el número de lecturas encontradas para ADAR2 y ADAR3 es despreciable, de acuerdo a las recomendaciones del software de análisis DESeq2 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>).

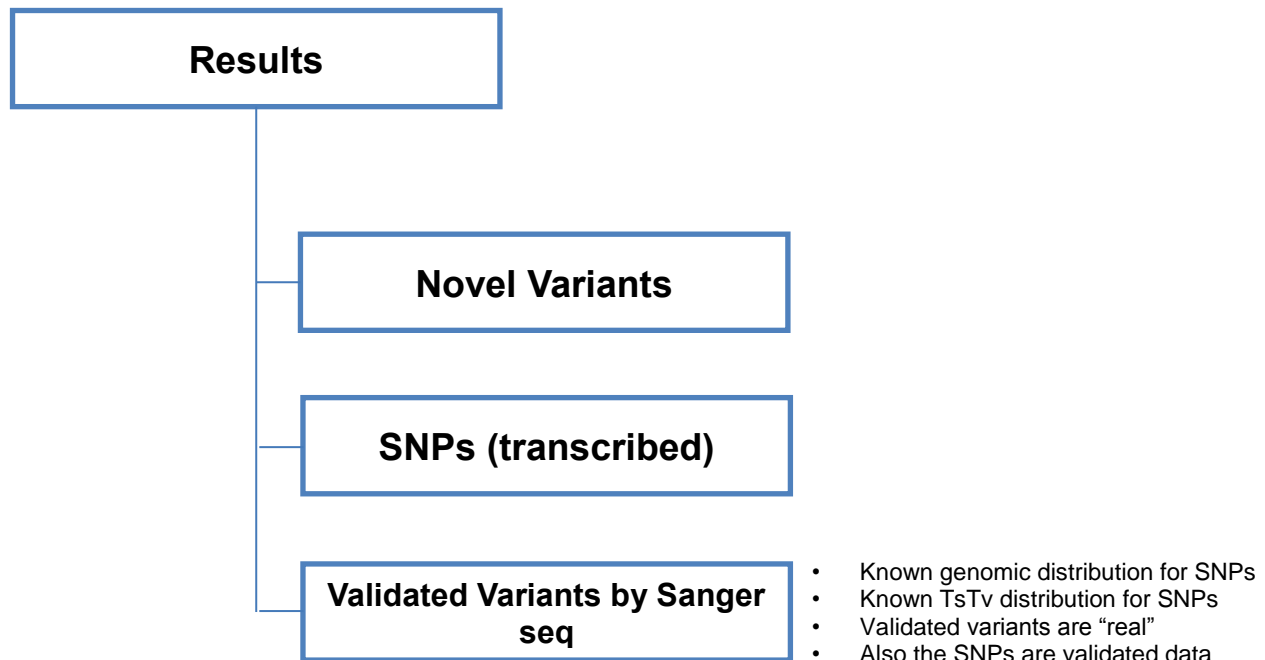
<b>GOTerm</b>	<b>Term PValue Bonferroni step down</b>
Generic Transcription Pathway	1.00E-17
Class B/2 (Secretin family receptors)	1.70E-12
Transcriptional Regulation by TP53	3.90E-08
Deadenylation-dependent mRNA decay	3.90E-08
TP53 Regulates Transcription of Cell Cycle Genes	3.90E-08
Signalling by NGF	2.40E-07
Cell Cycle	1.90E-06
HDR through Single Strand Annealing (SSA)	6.90E-05
DNA Double-Strand Break Repair	7.30E-05
Fanconi Anemia Pathway	7.30E-05
DNA Repair	7.30E-05
Activation of ATR in response to replication stress	2.30E-05

**Tabla Anexa número 2. Descripción de vías de señalización diferencialmente editadas en células ZR-751 SHC y ZR-751-SHADAR.** Tabla resumen de vías de señalización (Reactome db) enriquecidas tras el análisis de número diferencial de variantes.

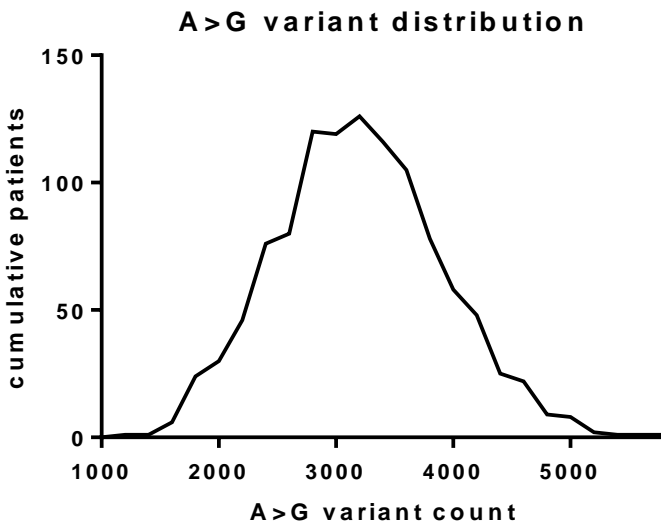
A)



B)



**Figura Anexa número 8. Flujo de trabajo para la inclusión de regiones a analizar en análisis de variantes en RNA de la cohorte BRCA TCGA.** A) Se describen los criterios de inclusión para la selección de regiones a analizar en el análisis bioinformático de variantes en RNA. En B) se desglosa como fueron separadas las variantes encontradas, dependiendo si correspondían a posiciones genómicas atribuibles a SNPs (dbSNP v1.38), información previamente validada por Sanger, en el trabajo de Wang y colaboradores y Variantes nuevas, encontradas en el análisis de variantes.

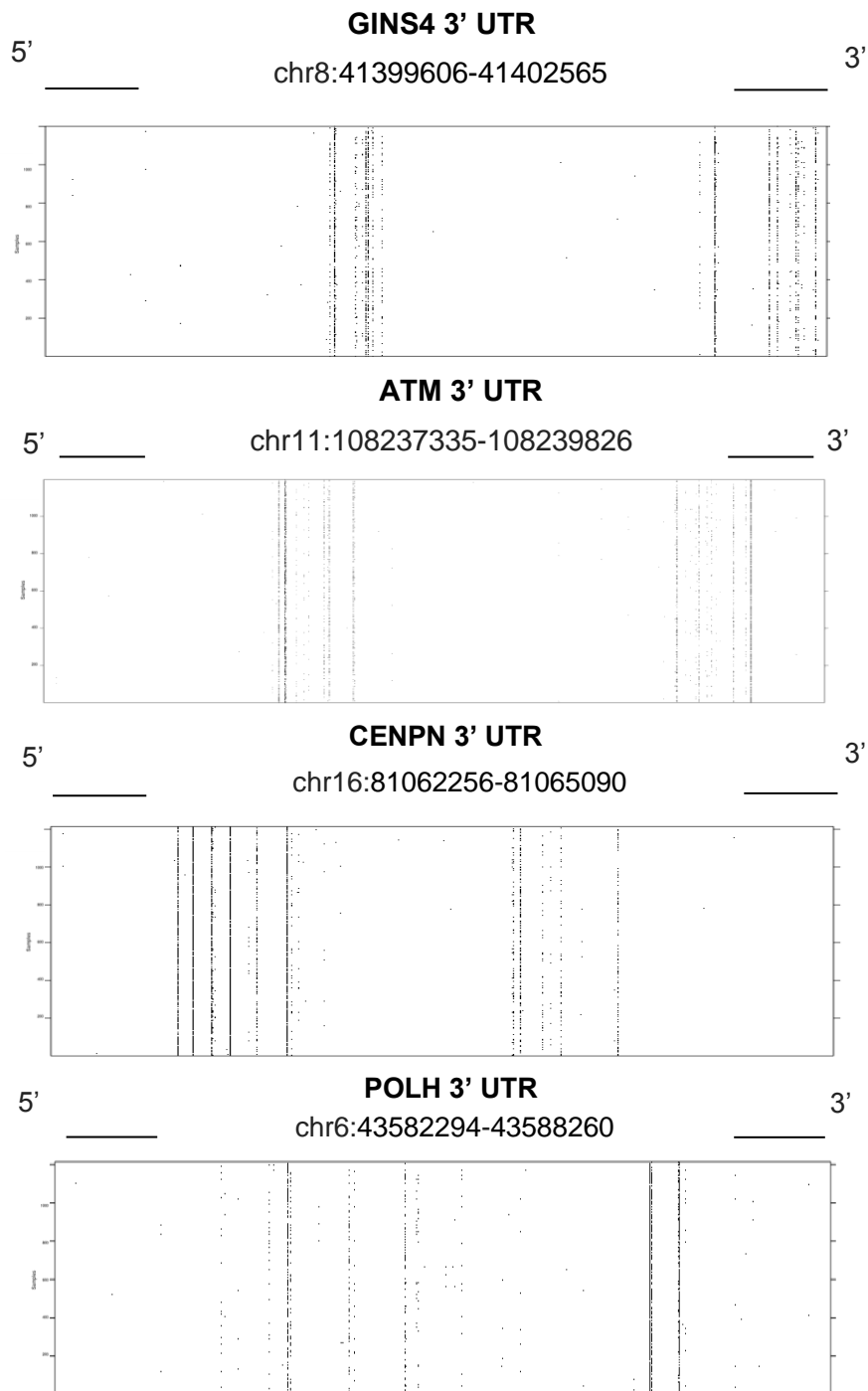


Bin Center	# Número de pacientes
1000	0
1200	1
1400	1
1600	6
1800	24
2000	30
2200	46
2400	76
2600	80
2800	120
3000	119
3200	126
3400	116
3600	105
3800	78
4000	58
4200	48
4400	25
4600	22
4800	9
5000	8
5200	2
5400	1
5600	1
5800	1

**Figura Anexa número 9. Distribución número de variantes A por G presentes en muestras tumorales.**

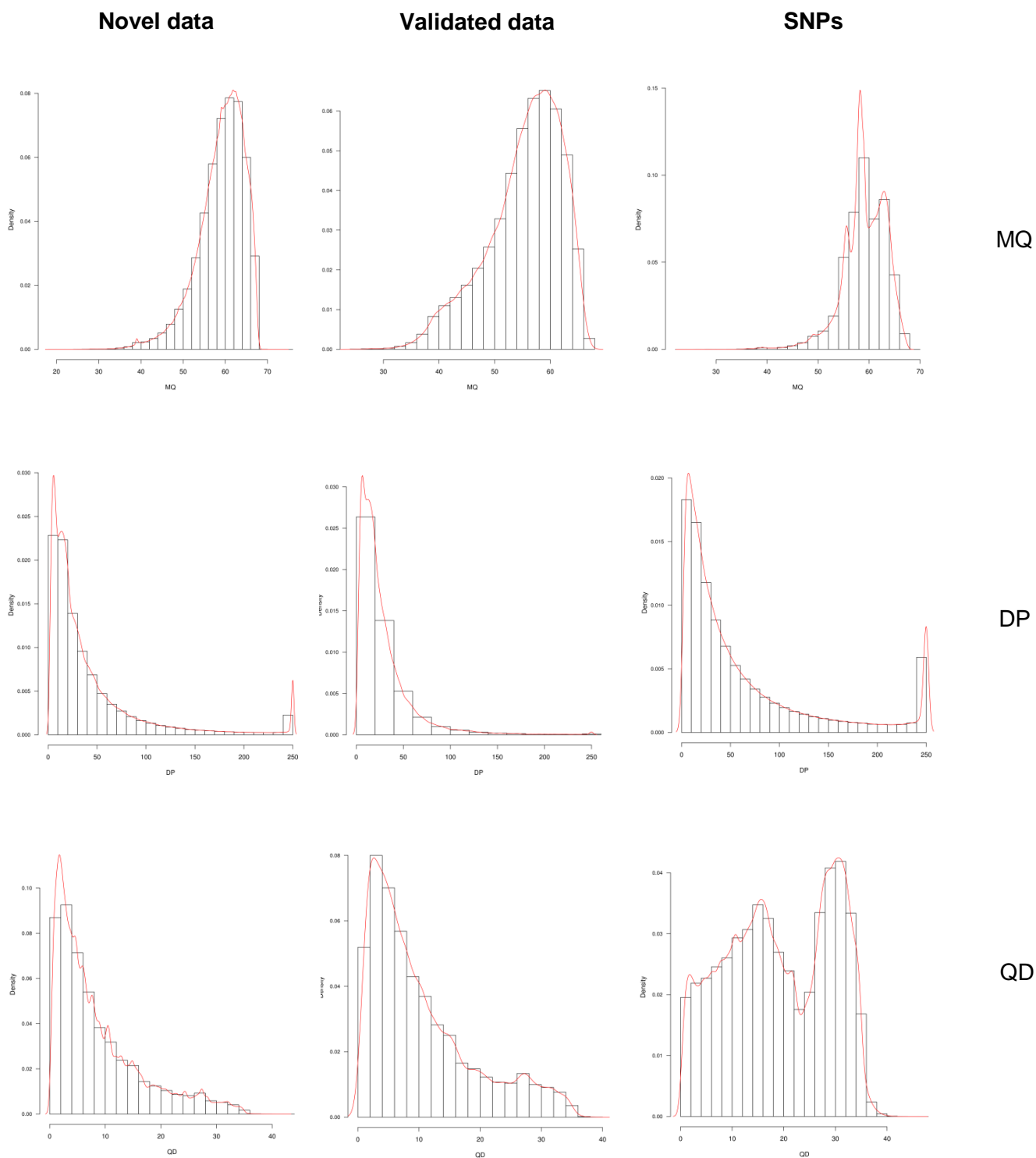
<b>GENE SYMBOL</b>	<b>REFSEQ ID</b>	<b>UTR</b>	<b>Número de variantes promedio en muestras normales</b>	<b>Número de variantes promedio en muestras tumorales</b>
<b>VHL</b>	NM_000551	3 UTR	29.342	53.331
<b>POLH</b>	NM_006502	3 UTR	29.810	50.390
<b>GNL3L</b>	NM_001184819	3 UTR	38.558	56.552
<b>PRR11</b>	NM_018304	3 UTR	5.801	19.7153
<b>PDDC1</b>	NM_182612	3 UTR	48.108	61.093
<b>CENPN</b>	NM_001100624	3 UTR	12.576	24.537
<b>ZNF264</b>	NM_003417	3 UTR	12.810	24.413
<b>GINS4</b>	NM_032336	3 UTR	6.504	17.163
<b>ATM</b>	NM_000051	3 UTR	7.207	9.463

**Tabla Anexa número 3. Variantes encontradas en 3'UTRs.** Resumen con el número de variantes encontradas (A > G) en los UTRs más editados (con mayor número de A > G respecto a número de ediciones/variantes en pacientes controles).



**Figura anexa número 10. Distribución de variantes A por G encontradas en los 4 UTRs más editados en las muestras tumorales de la cohorte BRCA TCGA.** A) Distribución de variantes A > G a lo largo de la secuencia de los 3'UTRs de los transcritos GINS4, ATM, CENPN y POLH. Cada punto en la matriz representa la variante pesquisada a lo largo del UTR (abscisa, delimitado por el intervalo señalado) en las distintas muestras tumorales (1104) (ordenada).

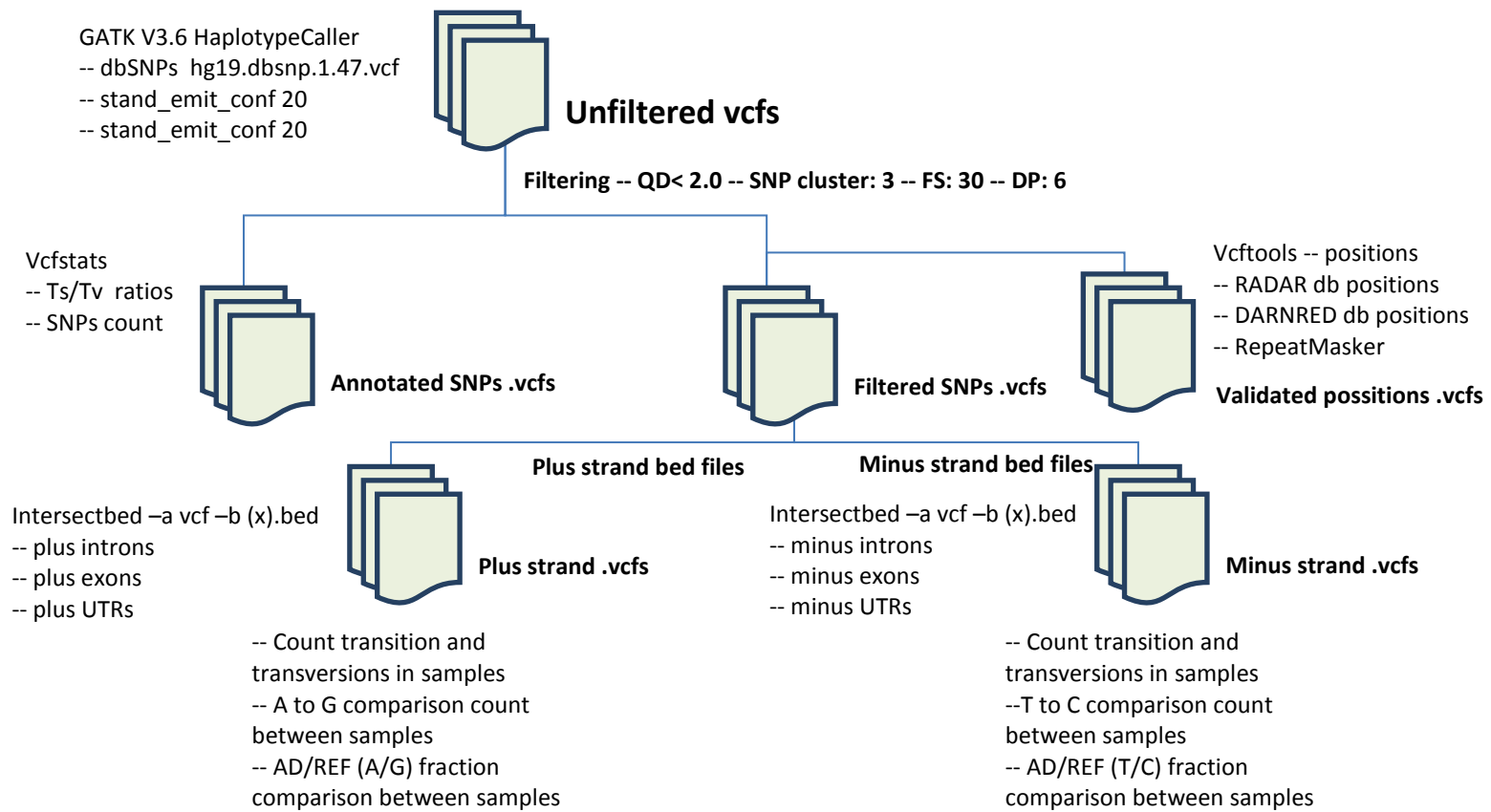




**Figura Anexa número 11. Distribución de parámetros encontrados en los distintos tipos de variantes encontradas en cohorte BRCA TCGA.**

<b>Cromosoma</b>	<b>Strand</b>	<b>UTR</b>	<b>Gene Symbol</b>
chr11	+	3UTR	ATM
chr3	-	3UTR	ATR
chr13	+	3UTR	BRCA2
chr1	+	5UTR	CDC42
chr1	-	3UTR	CENPL
chr16	+	3UTR	CENPN
chr11	+	3UTR	CHEK1
chr3	+	3UTR	FANCD2
chr20	+	3UTR	GINS1
chr8	+	3UTR	GINS4
chr21	-	5UTR	MCM3AP
chr20	+	3UTR	MCM8
chr12	+	3UTR	MDM2
chr1	+	3UTR	MDM4
chr1	+	3UTR	MED18
chr1	-	3UTR	ORC1
chr2	-	3UTR	ORC2
chr11	+	3UTR	POLA2
chr6	+	3UTR	POLH
chr2	+	3UTR	POLR1B
chr15	+	3UTR	RAD51
chr7	-	3UTR	RFC2
chr12	+	3UTR	TMPO
chr17	-	3UTR	TP53

**Figura Anexa número 12. Lista de genes asociada a Puntos de control y respuesta a daño de DNA, editada por ADAR1 en sus UTRs, de acuerdo a la intersección realizada.**



**Figura Anexa número 13. Diagrama de flujo para el llamado de variantes utilizado en el análisis de las líneas celulares del proyecto PRJNA297219**

## 12. Bibliografía.

1. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. & Jemal, A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.* **64**, 9–29 (2014).
2. Jemal, A., Bray, F. & Ferlay, J. Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin* **49**, 1,33–64 (1999).
3. Goss, P. E. *et al.* Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. *Lancet Oncol.* **14**, 391–436 (2013).
4. Prieto, M. & Programa, E. Epidemiología del cáncer de mama en Chile Epidemiology of breast cancer in Chile. *Rev. Med. Clin. Condes* **22**, 428–435 (2011).
5. Justo, N., Wilking, N., Jonsson, B., Luciani, S. & Cazap, E. A Review of Breast Cancer Care and Outcomes in Latin America. *Oncologist* **18**, 248–256 (2013).
6. SERRA C, I., MARTÍNEZ R, R., MIMICA S, X., CAVADA CH, G. & AGUAYO S, C. Cáncer de mama en Chile: Un aporte clínico y epidemiológico según un registro poblacional metropolitano: 1.485 pacientes. *Rev. Chil. cirugía* **61**, 507–514 (2009).
7. Weigelt, B., Peterse, J. L. & Van't Veer, L. J. Breast cancer metastasis: Markers and models. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 591–602 (2005).
8. Richie, R. C. & Swanson, J. O. Breast Cancer: A Review of the Literature. *J. Insur. Med. Copyr. J. Insur. Med. J Insur Med* **35**, 85–101 (2003).
9. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
10. Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 10869–10874 (2001).
11. Fan, C. *et al.* Concordance among Gene-Expression–Based Predictors for Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **355**, 560–569 (2006).
12. Jönsson, G. *et al.* Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics. *Breast Cancer Res.* **12**, R42 (2010).

13. Sotiriou, C. & Pusztai, L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **360**, 790–800 (2009).
14. Prat, A. & Perou, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* **5**, 5–23 (2011).
15. Vargo-Gogola, T. & Rosen, J. M. Modelling breast cancer: One size does not fit all. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 659–672 (2007).
16. Collu, G. M. & Brennan, K. Cooperation between Wnt and Notch signalling in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* **9**, 105 (2007).
17. Koboldt, D. C. *et al.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
18. Hanahan, D., Weinberg, R. a & Francisco, S. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
19. Mallette, F. A. & Ferbeyre, G. The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell Cycle* **6**, 1831–1836 (2007).
20. Jossen, R. & Bermejo, R. The DNA damage checkpoint response to replication stress: A game of forks. *Front. Genet.* **4**, 26 (2013).
21. Solimini, N. L., Luo, J. & Elledge, S. J. Non-Oncogene Addiction and the Stress Phenotype of Cancer Cells. *Cell* **130**, 986–988 (2007).
22. Allen, C., Ashley, A. K., Hromas, R. & Nickoloff, J. A. More forks on the road to replication stress recovery. *J. Mol. Cell Biol.* **3**, 4–12 (2011).
23. Luo, J., Solimini, N. L. & Elledge, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell* **136**, 823–837 (2009).
24. Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 220–228 (2010).
25. Carr, A. M. & Lambert, S. Replication stress-induced genome instability: The dark side of replication maintenance by homologous recombination. *J. Mol. Biol.* **425**, 4733–4744 (2013).
26. Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G. & Bartek, J. An oncogene-induced DNA damage

- model for cancer development. *Science* (80- ). **319**, 1352–1355 (2008).
27. Costantino, L. *et al.* Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells. *Science* (80- ). **343**, 88–91 (2014).
  28. Olcina, M. M. *et al.* Replication stress and chromatin context link ATM activation to a role in DNA replication. *Mol. Cell* **52**, 758–766 (2013).
  29. Burhans, W. C. & Weinberger, M. DNA replication stress, genome instability and aging. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7545–7556 (2007).
  30. Edenberg, E. R., Downey, M. & Toczyski, D. Polymerase stalling during replication, transcription and translation. *Curr. Biol.* **24**, R445–52 (2014).
  31. Zeman, M. K. & Cimprich, K. A. Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* **16**, 2–9 (2014).
  32. Sulli, G., Di Micco, R. & Di Fagagna, F. D. A. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nature Reviews Cancer* **12**, 709–720 (2012).
  33. Forment, J. V., Kaidi, A. & Jackson, S. P. Chromothripsis and cancer: Causes and consequences of chromosome shattering. *Nature Reviews Cancer* **12**, 663–670 (2012).
  34. Levine, A. J. & Oren, M. The first 30 years of p53: Growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 749–758 (2009).
  35. Vazquez, A. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 979–987 (2008).
  36. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
  37. Dalmay, T. & Edwards, D. R. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene* **25**, 6170–6175 (2006).
  38. Torti, D. & Trusolino, L. Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: Promises and perils. *EMBO Mol. Med.* **3**, 623–636 (2011).
  39. Shaheen, M., Allen, C., Nickoloff, J. A. & Hromas, R. Synthetic lethality: Exploiting the addiction of cancer to DNA repair. *Blood* **117**, 6074–6082 (2011).

40. Magdalou, I., Lopez, B. S., Pasero, P. & Lambert, S. A. E. The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Semin. Cell Dev. Biol.* **30**, 154–164 (2014).
41. Aguilera, A. & Gómez-González, B. Genome instability: A mechanistic view of its causes and consequences. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 204–217 (2008).
42. Remus, D. & Diffley, J. F. Eukaryotic DNA replication control: Lock and load, then fire. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 771–777 (2009).
43. Hills, S. A. & Diffley, J. F. X. DNA Replication and Oncogene-Induced Replicative Stress. *Curr. Biol.* **24**, R435–R444 (2014).
44. Horton, J. K. *et al.* Base Excision Repair Defects Invoke Hypersensitivity to PARP Inhibition. *Mol. Cancer Res.* **12**, 1128–1139 (2014).
45. Bartek, J., Lukas, C. & Lukas, J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 792–804 (2004).
46. Michl, P. *et al.* CUTL1 is a target of TGF $\beta$  signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* **7**, 521–532 (2005).
47. Curtin, N. J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 801–817 (2012).
48. Kunkel, T. A. & Erie, D. A. Dna Mismatch Repair. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 681–710 (2005).
49. Fu, D., Calvo, J. A. & Samson, L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature Reviews Cancer* **12**, 104–120 (2012).
50. Waters, L. S. *et al.* Eukaryotic Translesion Polymerases and Their Roles and Regulation in DNA Damage Tolerance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 134–154 (2009).
51. Ghosal, G. & Chen, J. DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. *Transl. Cancer Res.* **2**, 107–129 (2013).
52. Zhang, J. *et al.* Role of the translationally controlled tumor protein in DNA damage sensing and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E926–E933 (2012).
53. Diamant, N. *et al.* DNA damage bypass operates in the S and G2 phases of the cell cycle

- and exhibits differential mutagenicity. *Nucleic Acids Res.* **40**, 170–180 (2012).
54. Bavoux, C., Hoffmann, J. S. & Cazaux, C. Adaptation to DNA damage and stimulation of genetic instability: The double-edged sword mammalian DNA polymerase ?? in *Biochimie* **87**, 637–646 (2005).
  55. Petermann, E. & Helleday, T. Pathways of mammalian replication fork restart. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 683–687 (2010).
  56. Mirchandani, K. D., McCaffrey, R. M. & D'Andrea, A. D. The Fanconi anemia core complex is required for efficient point mutagenesis and Rev1 foci assembly. *DNA Repair (Amst)*. **7**, 902–911 (2008).
  57. D'Andrea, A. D. Susceptibility Pathways in Fanconi's Anemia and Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1909–1919 (2010).
  58. Chang, D. J. & Cimprich, K. A. DNA damage tolerance: When it's OK to make mistakes. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 82–90 (2009).
  59. Thompson, L. H. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **751**, 158–246 (2012).
  60. Silwal-Pandit, L. *et al.* TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. *Clin. Cancer Res.* **20**, 3569–3580 (2014).
  61. Creighton, C. J. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biol. Targets Ther.* **6**, 289–297 (2012).
  62. Koboldt, D. C. *et al.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
  63. Hoadley, K. A. *et al.* Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. *Cell* **158**, 929–944 (2014).
  64. Curtis, C. *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**, 346–352 (2012).
  65. Shah, S. P. *et al.* The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* **486**, 395–399 (2012).



66. Keegan, L. P., Gallo, A. & O'Connell, M. A. The many roles of an RNA editor. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 869–878 (2001).
67. Benne, R. *et al.* Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* **46**, 819–826 (1986).
68. Chen, S.-H. *et al.* Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* **238**, 363–366 (1987).
69. Nishikura, K. Functions and Regulation of RNA Editing by ADAR Deaminases. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 321–349 (2010).
70. Wulff, B. E., Sakurai, M. & Nishikura, K. Elucidating the inosinome: Global approaches to adenosine-to-inosine RNA editing. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 81–85 (2011).
71. Zheng, Y., Lorenzo, C. & Beal, P. A. DNA editing in DNA/RNA hybrids by adenosine deaminases that act on RNA. *Nucleic Acids Res.* **45**, 3369–3377 (2016).
72. Keegan, L. P. *et al.* Tuning of RNA editing by ADAR is required in *Drosophila*. *EMBO J.* **24**, 2183–2193 (2005).
73. Pinto, Y., Cohen, H. Y. & Levanon, E. Y. Mammalian conserved ADAR targets comprise only a small fragment of the human editosome. *Genome Biol.* **15**, R5 (2014).
74. Eggington, J. M., Greene, T. & Bass, B. L. Predicting sites of ADAR editing in double-stranded RNA. *Nat. Commun.* **2**, 319 (2011).
75. Nishikura, K. Editor meets silencer: Crosstalk between RNA editing and RNA interference. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 919–931 (2006).
76. Pfaller, C. K., Li, Z., George, C. X. & Samuel, C. E. Protein kinase PKR and RNA adenosine deaminase ADAR1: New roles for old players as modulators of the interferon response. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 573–582 (2011).
77. Tomaselli, S. *et al.* ADAR enzyme and miRNA story: A nucleotide that can make the difference. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 22796–22816 (2013).
78. George, C. X., John, L. & Samuel, C. E. An RNA Editor, Adenosine Deaminase Acting on Double-Stranded RNA (ADAR1). *J. Interf. Cytokine Res.* **34**, 437–446 (2014).

79. Morse, D. P. & Bass, B. L. Long RNA hairpins that contain inosine are present in *Caenorhabditis elegans* poly(A)<sup>+</sup> RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6048–6053 (1999).
80. Barbon, a & Barlati, S. Glutamate receptor RNA editing in health and disease. *Biochem. Biokhimiia* **76**, 882–9 (2011).
81. Higuchi, M. *et al.* RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: A base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell* **75**, 1361–1370 (1993).
82. Wu, D., Lamm, A. T. & Fire, A. Z. Competition between ADAR and RNAi pathways for an extensive class of RNA targets. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1094–1101 (2010).
83. Peng, Z. *et al.* Comprehensive analysis of RNA-Seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome. *Nat. Biotechnol.* **30**, 253–260 (2012).
84. Wang, I. X. *et al.* ADAR Regulates RNA Editing, Transcript Stability, and Gene Expression. *Cell Rep.* **5**, 849–860 (2013).
85. Ramaswami, G., Lin, W., Piskol, R., Tan, M. H. & Davis, C. Accurate identification of human Alu and non-Alu RNA editing sites. *Nat. Protoc.* **9**, 579–581 (2012).
86. Piskol, R., Ramaswami, G. & Li, J. B. Reliable identification of genomic variants from RNA-seq data. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 641–651 (2013).
87. Ru, P., Steele, R., Nerurkar, P. V., Phillips, N. & Ray, R. B. Bitter melon extract impairs prostate cancer cell-cycle progression and delays prostatic intraepithelial neoplasia in TRAMP model. *Cancer Prev. Res.* **4**, 2122–2130 (2011).
88. Keegan, L. P. *et al.* Functional conservation in human and *Drosophila* of Metazoan ADAR2 involved in RNA editing: Loss of ADAR1 in insects. *Nucleic Acids Res.* **39**, 7249–7262 (2011).
89. Ramaswami, G. *et al.* Identifying RNA editing sites using RNA sequencing data alone. *Nat. Methods* **10**, 128–132 (2013).
90. Piskol, R., Peng, Z., Wang, J. & Li, J. B. Lack of evidence for existence of noncanonical RNA editing. *Nat. Biotechnol.* **31**, 19–20 (2013).
91. Wang, I. X. *et al.* ADAR Regulates RNA Editing, Transcript Stability, and Gene

- Expression. *Cell Rep.* **5**, 849–860 (2013).
92. Jiang, Q. *et al.* ADAR1 promotes malignant progenitor reprogramming in chronic myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 1041–1046 (2013).
  93. Chan, T. H. M. *et al.* A disrupted RNA editing balance mediated by ADARs (Adenosine Deaminases that act on RNA) in human hepatocellular carcinoma. *Gut* **63**, 832–843 (2014).
  94. Nemlich, Y. *et al.* MicroRNA-mediated loss of ADAR1 in metastatic melanoma promotes tumor growth. *J. Clin. Invest.* **123**, 2703–2718 (2013).
  95. Qin, Y. R. *et al.* Adenosine-to-inosine RNA editing mediated by adars in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **74**, 840–851 (2014).
  96. Liu, W. *et al.* Genetic markers associated with early cancer-specific mortality following prostatectomy. *Cancer* **119**, 2405–2412 (2013).
  97. Avesson, L. & Barry, G. The emerging role of RNA and DNA editing in cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1845**, 308–316 (2014).
  98. Shah, S. P. *et al.* Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature* **461**, 809–813 (2009).
  99. Galeano, F., Tomaselli, S., Locatelli, F. & Gallo, A. A-to-I RNA editing: The ‘ADAR’ side of human cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 244–250 (2012).
  100. Gallo, A. & Locatelli, F. ADARs: Allies or enemies? The importance of A-to-I RNA editing in human disease: From cancer to HIV-1. *Biol. Rev.* **87**, 95–110 (2012).
  101. Zhang, F. & Rabinovici, R. Adenosine deaminase acting on RNA 1 accelerates cell cycle through increased translation and activity of cyclin-dependent kinase 2. *Shock* **27**, 214–219 (2007).
  102. Marcotte, R. *et al.* Functional Genomic Landscape of Human Breast Cancer Drivers, Vulnerabilities, and Resistance. *Cell* **164**, 293–309 (2016).
  103. Nikolova, T., Göder, A., Parpys, A. & Borgmann, K. in *Methods in Molecular Biology* **1510**, 103–113 (2017).
  104. Marcelain, K. & Hayman, M. J. The Ski oncoprotein is upregulated and localized at the

- centrosomes and mitotic spindle during mitosis. *Oncogene* **24**, 4321–4329 (2005).
105. Armisén, R. *et al.* TRPM4 enhances cell proliferation through up-regulation of the  $\beta$ -catenin signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* **226**, 103–109 (2011).
  106. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 45e–45 (2001).
  107. Vispe, S. *et al.* Triptolide is an inhibitor of RNA polymerase I and II-dependent transcription leading predominantly to down-regulation of short-lived mRNA. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2780–2790 (2009).
  108. Titov, D. V. *et al.* XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 182–188 (2011).
  109. Duensing, A. & Duensing, S. Guilt by association? p53 and the development of aneuploidy in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 694–700 (2005).
  110. Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307–310 (2000).
  111. Niida, H. & Nakanishi, M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* **21**, 3–9 (2006).
  112. Troester, M. A. *et al.* Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer. *Cancer Res.* **64**, 4218–4226 (2004).
  113. Abbas, T. & Dutta, A. P21 in Cancer: Intricate Networks and Multiple Activities. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 400–414 (2009).
  114. Chen, L. *et al.* Recoding RNA editing of AZIN1 predisposes to hepatocellular carcinoma. *Nat. Med.* **19**, 209–216 (2013).
  115. Fumagalli, D. *et al.* Principles Governing A-to-I RNA Editing in the Breast Cancer Transcriptome. *Cell Rep.* **13**, 277–289 (2015).
  116. Han, L. *et al.* The Genomic Landscape and Clinical Relevance of A-to-I RNA Editing in Human Cancers. *Cancer Cell* **28**, 515–528 (2015).
  117. Bazak, L., Levanon, E. Y. & Eisenberg, E. Genome-wide analysis of Alu editability. *Nucleic Acids Res.* **42**, 6876–6884 (2014).

118. Ulbricht, R. J. & Emeson, R. B. One hundred million adenosine-to-inosine RNA editing sites: Hearing through the noise. *BioEssays* **36**, 730–735 (2014).
119. Jiang, Q. *et al.* ADAR1 promotes malignant progenitor reprogramming in chronic myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 1041–1046 (2013).
120. Zhang, L., Yang, C. S., Varelas, X. & Monti, S. Altered RNA editing in 3' UTR perturbs microRNA-mediated regulation of oncogenes and tumor-suppressors. *Sci. Rep.* **6**, 23226 (2016).
121. Lukong, K. E., Chang, K., Khandjian, E. W. & Richard, S. RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet.* **24**, 416–425 (2008).
122. Castello, A. *et al.* Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell* **149**, 1393–1406 (2012).
123. Castello, A., Fischer, B., Hentze, M. W. & Preiss, T. RNA-binding proteins in Mendelian disease. *Trends in Genetics* **29**, 318–327 (2013).
124. Wells, D. G. RNA-Binding Proteins: A Lesson in Repression. *J. Neurosci.* **26**, 7135–7138 (2006).
125. Solomon, O. *et al.* Global regulation of alternative splicing by adenosine deaminase acting on RNA (ADAR). *Rna* **19**, 591–604 (2013).
126. Fernandez, H. R., Kavi, H. H., Xie, W. & Birchler, J. A. Heterochromatin: On the ADAR radar? *Curr. Biol.* **15**, R132–4 (2005).
127. Ota, H. *et al.* ADAR1 forms a complex with dicer to promote MicroRNA processing and RNA-induced gene silencing. *Cell* **153**, 575–589 (2013).
128. Nik-Zainal, S. *et al.* Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell* **149**, 979–993 (2012).
129. Kanu, N. *et al.* DNA replication stress mediates APOBEC3 family mutagenesis in breast cancer. *Genome Biol.* **17**, 185 (2016).
130. Green, A. M. *et al.* APOBEC3A damages the cellular genome during DNA replication. *Cell Cycle* **15**, 998–1008 (2016).
131. Doria, M., Neri, F., Gallo, A., Farace, M. G. & Michienzi, A. Editing of HIV-1 RNA by the

- double-stranded RNA deaminase ADAR1 stimulates viral infection. *Nucleic Acids Res.* **37**, 5848–5858 (2009).
132. Deffit, S. N. & Hundley, H. A. To edit or not to edit: Regulation of ADAR editing specificity and efficiency. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **7**, 113–127 (2016).
  133. Wang, Q., Khillan, J., Gadue, P. & Nishikura, K. Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis. *Science (80-. )*. **290**, 1765–1768 (2000).
  134. Yang, Y., Zhou, X. & Jin, Y. ADAR-mediated RNA editing in non-coding RNA sequences. *Sci. China Life Sci.* **56**, 944–952 (2013).
  135. Rice, G. I. *et al.* Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature. *Nat. Genet.* **44**, 1243–1248 (2012).
  136. Fisher, A. J. & Beal, P. A. Effects of Aicardi-Goutières syndrome mutations predicted from ADAR-RNA structures. *RNA Biol.* **14**, 164–170 (2017).
  137. Bahn, J. H. *et al.* Genomic analysis of ADAR1 binding and its involvement in multiple RNA processing pathways. *Nat. Commun.* **6**, 6355 (2015).
  138. Zhang, L., Yang, C. S., Varelas, X. & Monti, S. Altered RNA editing in 3' UTR perturbs microRNA-mediated regulation of oncogenes and tumor-suppressors. *Sci. Rep.* **6**, 23226 (2016).
  139. Orlando, D. A. *et al.* Global control of cell-cycle transcription by coupled CDK and network oscillators. *Nature* **453**, 944–947 (2008).
  140. Sakurai, M. *et al.* ADAR1 controls apoptosis of stressed cells by inhibiting Staufen1-mediated mRNA decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 534–543 (2017).
  141. Hartner, J. C., Walkley, C. R., Lu, J. & Orkin, S. H. ADAR1 is essential for the maintenance of hematopoiesis and suppression of interferon signaling. *Nat. Immunol.* **10**, 109–115 (2009).
  142. Wang, Q. Stress-induced apoptosis associated with null mutation of ADAR1 RNA editing deaminase gene. *J. Biol. Chem.* **279**, 4952–4961 (2004).
  143. Qiu, W. *et al.* ADAR1 is essential for intestinal homeostasis and stem cell maintenance.

- Cell Death Dis.* **4**, e599 (2013).
144. Agranat, L., Raitskin, O., Sperling, J. & Sperling, R. The editing enzyme ADAR1 and the mRNA surveillance protein hUpf1 interact in the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 5028–5033 (2008).
  145. Ramaswami, G. *et al.* Accurate identification of human Alu and non-Alu RNA editing sites. *Nat. Methods* **9**, 579–581 (2012).
  146. Pestal, K. *et al.* Isoforms of RNA-Editing Enzyme ADAR1 Independently Control Nucleic Acid Sensor MDA5-Driven Autoimmunity and Multi-organ Development. *Immunity* **43**, 933–944 (2015).
  147. Liddicoat, B. J. *et al.* RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. *Science (80-. )*. **349**, 1115–1120 (2015).
  148. Guo, J. *et al.* Unraveling molecular effects of ADAR1 overexpression in HEK293T cells by label-free quantitative proteomics. *Cell Cycle* **15**, 1591–1601 (2016).
  149. Tubbs, A. & Nussenzweig, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell* **168**, 644–656 (2017).
  150. Haigis, K. M. & Sweet-Cordero, A. New insights into oncogenic stress. *Nat. Genet.* **43**, 177–178 (2011).
  151. Buisson, R., Lawrence, M. S., Benes, C. H. & Zou, L. APOBEC3A and APOBEC3B activities render cancer cells susceptible to ATR inhibition. *Cancer Res.* **77**, 4567–4578 (2017).
  152. Salter, J. D., Bennett, R. P. & Smith, H. C. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends in Biochemical Sciences* **41**, 578–594 (2016).
  153. Borde, V. & Lichten, M. A Timeless but timely connection between replication and recombination. *Cell* **158**, 697–698 (2014).
  154. Aladjem, M. I. Replication in context: Dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 588–600 (2007).
  155. Sclafani, R. A. & Holzen, T. M. Cell Cycle Regulation of DNA Replication. *Annu. Rev. Genet.* **41**, 237–280 (2007).

156. Lee, K. Y., Fu, H., Aladjem, M. I. & Myung, K. ATAD5 regulates the lifespan of DNA replication factories by modulating PCNA level on the chromatin. *J. Cell Biol.* **200**, 31–44 (2013).
157. Saltoglu, N. *et al.* Piperacillin/tazobactam versus imipenem/cilastatin for severe diabetic foot infections: A prospective, randomized clinical trial in a university hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 1252–1257 (2010).
158. Rohleder, F. *et al.* FANCM interacts with PCNA to promote replication traverse of DNA interstrand crosslinks. *Nucleic Acids Res.* **44**, 3219–3232 (2016).
159. Zhang, F. & Rabinovici, R. Adenosine deaminase acting on RNA 1 accelerates cell cycle through increased translation and activity of cyclin-dependent kinase 2. *Shock* **27**, 214–219 (2007).
160. Fu, Y. *et al.*  $\beta$ -Catenin as a potential key target for tumor suppression. *Int. J. Cancer* **129**, 1541–1551 (2011).
161. Chesire, D. R., Ewing, C. M., Gage, W. R. & Isaacs, W. B. In vitro evidence for complex modes of nuclear  $\beta$ -catenin signaling during prostate growth and tumorigenesis. *Oncogene* (2002). doi:10.1038/sj/onc/1205352
162. Clevers, H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* **127**, 469–480 (2006).
163. Gonzalez, D. M. & Medici, D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* **7**, re8 (2014).
164. Yang, C.-C. *et al.* ADAR1-mediated 3' UTR editing and expression control of antiapoptosis genes fine-tunes cellular apoptosis response. *Cell Death Dis.* **8**, e2833 (2017).
165. Patterson, J. B. & Samuel, C. E. 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 (1995).
166. Desterro, J. M. P. Dynamic association of RNA-editing enzymes with the nucleolus. *J. Cell Sci.* **116**, 1805–1818 (2003).
167. Paz-Yaacov, N. *et al.* Elevated RNA Editing Activity Is a Major Contributor to



Transcriptomic Diversity in Tumors. *Cell Rep.* **13**, 267–276 (2015).

168. Chan, T. H. M. *et al.* A disrupted RNA editing balance mediated by ADARs (Adenosine DeAminases that act on RNA) in human hepatocellular carcinoma. *Gut* **63**, 832–843 (2014).