

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

UN MODELO EN DROSOPHILA DEL MECANISMO DE
PATOGENESIS DE LAS EXPANSIONES CTG EN LA
DISTROFIA MIOTÓNICA

LIDÓN MONFERRER SALES

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 8 de Juny de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Ginés Morata Pérez
- D^a. Perla Kaliman
- D. Adolfo López de Munain Arregui
- D. Francesc Palau Martínez
- D. Manuel Pérez Alonso

Va ser dirigida per:

D. Rubén D. Artero Allepuz


©Copyright: Servei de Publicacions
Lidón Monferrer Sales

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6933-3

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT  E VALÈNCIA

**UN MODELO EN *Drosophila* DEL MECANISMO DE
PATOGENESIS DE LAS EXPANSIONES CTG EN LA
DISTROFIA MIOTÓNICA**

MEMORIA PRESENTADA POR Dña. LIDÓN MONFERRER SALES
PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS POR LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

VALENCIA, ENERO DE 2007

Dr. D. RUBÉN D. ARTERO ALLEPUZ, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia

CERTIFICA: que Dña. LIDÓN MONFERRER SALES, licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación recogido en esta memoria bajo el título “Un modelo en *Drosophila* del mecanismo de patogénesis de las expansiones CTG en la Distrofia Miotónica”, para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas y

AUTORIZA: su presentación en el Departamento de Genética de la facultad de Ciencias Biológicas para tal fin.

Para que conste, y en cumplimiento de la legislación vigente, firma el presente certificado en Burjassot a 23 de enero de 2007.

Fdo. Dr. D. Rubén D. Artero Allepuz

A Néstor
A mi madre

Agradecimientos

A Manuel por haber sido mi primer contacto con el mundo de la investigación y haberme ofrecido esta maravillosa oportunidad.

A Rubén por haber confiado en mí desde el principio, por haber sido mi maestro y por haberme enseñado todo lo que sé de ciencia, muchas gracias.

A la MDA (*Muscular Dystrophy Association*) por haber destinado parte de sus fondos en financiarme durante cuatro años.

A Nuria, Silvia, Verónica, Use y Jessica por ayudarme en esos momentos que siempre se dan en la realización de un trabajo de este tipo. A Fabrice y a Yaiza por aquella época en la que estaban siempre dispuestos a ayudarme.

A las de Distrofia, Maya por su apoyo emocional, Marta por sus conversaciones de todo tipo, Amparo por considerarme su madre científica y Juanma por contagiarme su alegría y ser mi diseñador gráfico de última hora.

A M^a Carmen e Irma por haber cuidado durante estos meses de ausencia a “mis hijas” y a los alumnos colaboradores, en especial a Miquel por su ayuda en esta última etapa.

A todos los compañeros de los demás laboratorios que también han sido compañeros de “taper”, por las comidas tan amenas que hemos tenido y en especial a Ivette por la amistad que ha surgido desde que nos conocimos.

Al personal de administración y servicios del departamento, Carmen, Javi, Fede, Jose Carlos, Nuria, Begoña y Pilar por hacernos el trabajo más fácil.

A Chema del Hospital La Fe por las muestras de pacientes.

A ojosnegros por haberme facilitado el trabajo desde casa por un módico precio.

A mi segunda familia por hacerme sentir como una hija y hermana mayor.

A mi extensa familia y muy especialmente a mi madre y hermanas porque sin ellas no sé si podría haber llegado hasta aquí.

Y por último a Néstor, por todo.

Gracias a todos

Índice

Introducción.....	1
1. Presentación clínica y etiología de la Distrofia Miotónica	3
2. El <i>locus</i> de la DM1	6
3. Mecanismo de patogénesis	7
4. Defectos moleculares en DM1	13
5. Proteínas implicadas en la patogénesis de DM	17
5.1. CUG-Binding Protein.....	18
5.2. Proteínas de la familia Muscleblind.....	19
5.2.1. Muscleblind como factor de corte y empalme alternativo	23
5.2.2. Localización subcelular de transcritos.....	25
5.3. Reubicación de factores de transcripción (“RNA <i>leaching</i> ”)	26
5.4. Otras proteínas potencialmente implicadas en el mecanismo de patogénesis de las expansiones CTG	27
6. Un modelo integrado del mecanismo de patogénesis de la DM1	28
7. Genes humanos <i>MBNL</i> e isoformas de <i>muscleblind</i> de <i>Drosophila</i>	30
7.1. Genes humanos <i>MBNL</i>	30
7.2. Corte y empalme alternativo en <i>muscleblind</i>	31
7.3. Comparación entre los genes <i>muscleblind</i> de <i>Drosophila</i> y humanos	34
8. Estructura de las expansiones CUG y su posible implicación en el silenciamiento de <i>MBNL</i>	35
9. Inestabilidad y expansión de las repeticiones CTG	36
9.1. Inestabilidad en la línea germinal.....	36
9.2. Inestabilidad en células somáticas.....	36
9.3. Factores que afectan a la inestabilidad.....	37
10. Estrategias Terapéuticas	41
10.1. Uso de inhibidores del mecanismo de inestabilidad somática de las repeticiones.....	41
10.2. Uso de inhibidores de efectos aguas abajo	42
11. Modelos para estudiar la toxicidad de los RNAs con expansiones largas de CUGs en DM1.....	43
11.1. Modelos murinos.....	44
11.2. Modelos invertebrados (<i>Drosophila</i>)	45
Objetivos.....	47

Material y Métodos	51
1. MATERIAL	53
1.1. Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i>	53
1.1.1. Líneas utilizadas en el experimento de complementación funcional <i>in vivo</i>	53
1.1.2. Líneas transgénicas que contienen las repeticiones CTG	54
1.1.3. Líneas GAL4 ensayadas para la expresión del transgén <i>UAS-CTG</i>	54
1.1.4. Líneas utilizadas para la obtención del recombinante <i>sevenless-(CTG)₄₈₀</i>	55
1.1.5. Líneas utilizadas para la interacción genética de <i>muscleblind</i> con el fenotipo de expresión de (CTG) ₄₈₀ en los precursores del ojo	55
1.1.6. Líneas utilizadas en los rastreos de modificadores genéticos dominantes del fenotipo de expresión (CTG) ₄₈₀ en el ojo	55
1.1.7. Líneas utilizadas para la detección de las inclusiones nucleares	56
1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	56
1.3. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
1.4. Clones de cDNA de <i>D. melanogaster</i>	57
1.5. Vectores	57
1.5.1. Vectores de clonación	57
1.5.2. Vectores de expresión	57
1.6. Cebadores	58
1.7. Kits	58
1.8. Equipos	58
2. MÉTODOS	59
2.1. Obtención de líneas transgénicas	59
2.1.1. Clonación	59
2.1.2. Transformación de la línea germinal de <i>D. melanogaster</i>	60
2.2. Hibridación <i>in situ</i> en embriones de <i>D. melanogaster</i>	63
2.2.1. Marcaje de sondas de RNA	63
2.2.2. Fijación de los embriones	64
2.2.3. Hibridación	65
2.3. Experimentos de complementación funcional <i>in vivo</i>	66
2.3.1. Generación de stock “ <i>UAS</i> ” para experimento de rescate	68

2.3.2.	Generación de un stock “GAL4” para experimento de rescate	68
2.3.3.	Cuantificación experimento de rescate	69
2.4.	Preparación de cutículas <i>D. melanogaster</i>	70
2.5.	Detección de inclusiones nucleares por choque térmico	71
2.5.1.	Criosecciones.....	71
2.5.2.	Hibridación <i>in situ</i>	71
2.6.	Estudio histológico de la musculatura adulta de <i>D. melanogaster</i>	72
2.6.1.	Tejidos embebidos en parafina	72
2.6.2.	Tejidos embebidos en resina	73
2.6.3.	Tinción con anti-kettin en larvas de <i>D. melanogaster</i>	74
2.7.	Estudio de la fertilidad.....	75
2.8.	Análisis microscópico de retinas en adultos de <i>D. melanogaster</i>	76
2.8.1.	Tejidos embebidos en resina	76
2.9.	Expresión de las (CTG) ₄₈₀ en el SNC	76
2.10.	Estudio de la interacción genética con <i>muscleblind</i>	77
2.10.1.	Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido	77
2.11.	Rastreo genético de modificadores dominantes del fenotipo ojo rugoso	78
2.12.	Ensayo del doble híbrido en <i>S. cerevisiae</i>	78
2.12.1.	Clonación	78
2.12.2.	Transformación	78
2.12.3.	Ensayo de interacción.....	79
2.13.	RT-PCR.....	80
2.13.1.	Extracción de RNA total de <i>D. melanogaster</i>	81
2.13.2.	Reacción de RT- PCR.....	81
Resultados	83	
1.	Estudio de la homología funcional entre los genes <i>muscleblind</i> humanos y de <i>Drosophila melanogaster</i>	85
1.1.	Análisis bioinformático de las secuencias MuscleblindC y MBNL1 _{KIAA0428}	85
1.1.1.	Conservación de residuos aromáticos críticos para el reconocimiento de RNAs de manera específica de secuencia	87
1.1.2.	Conservación de sitios de fosforilación	88
1.1.3.	Conservación de sitios de sumolización	88

Índice

1.1.4.	Otros motivos	89
1.2.	Experimentos de complementación funcional <i>in vivo</i>	90
2.	Generación de un modelo de DM1 en <i>Drosophila</i>	98
2.1.	Obtención de moscas transgénicas	98
2.2.	Expresión de los transgenes <i>UAS-(CTG)₆₀</i> y <i>UAS-(CTG)₄₈₀</i>	103
2.3.	La expresión de RNAs (CUG) ₄₈₀ en <i>Drosophila</i> reproduce aspectos de la DM1	105
2.3.1.	Detección de inclusiones nucleares	105
2.3.2.	Defectos musculares a nivel histológico	110
2.3.3.	Defectos en el procesado del transcrito de la <i>α-actinina</i>	115
2.3.4.	La expresión de RNAs CUG en el ojo de <i>Drosophila</i> es sensible a la dosis génica de <i>muscleblind</i>	117
3.	La expresión de RNAs CUG es tóxica en tejidos nerviosos	120
3.1.	Análisis del fenotipo de expresión de repeticiones CUG en la retina de <i>Drosophila</i>	120
3.2.	Análisis del fenotipo de expresión de repeticiones CUG en el cerebro de <i>Drosophila</i>	123
4.	Búsqueda de mutaciones que modifican un fenotipo de toxicidad a las repeticiones CUG.....	125
4.1.	Identificación de mutaciones que interaccionan predominantemente con la expresión de RNAs (CUG) ₄₈₀ en el ojo de <i>Drosophila</i>	126
4.2.	Análisis de los genes que presentan interacción genética dominante con la expresión de RNAs CUG en el ojo de <i>Drosophila</i>	130
4.2.1.	Factores de transcripción reguladores	131
4.2.2.	Reguladores de la estructura de la cromatina.....	133
4.2.3.	Adhesión celular.....	136
4.2.4.	Apoptosis	141
4.2.5.	Metabolismo del RNA: componentes asociados al EJC	147
4.2.6.	Análisis de genes candidatos a participar en la toxicidad de CUGs.....	151
5.	Un mecanismo adicional en la patogénesis de la DM1: el RNAi	153
Discusión		159
1.	Análisis de la complementación funcional <i>in vivo</i> de las proteínas Muscleblind	161

1.1.	El rescate del fenotipo mutante <i>muscleblind</i> es parcial	161
1.2.	Las isoformas proteicas de Muscleblind tienen funciones distintas.....	162
1.3.	Una tirosina relevante en la regulación de Muscleblind	163
2.	Generación de un modelo DM1 en <i>Drosophila</i>	164
2.1.	Las repeticiones CUG interrumpidas se comportan como las continuas.....	164
2.2.	Umbral de toxicidad de repeticiones CUG en <i>Drosophila</i>	165
2.3.	Análisis de los <i>foci</i> ribonucleares	166
2.4.	Análisis de la implicación de <i>muscleblind</i> en los defectos producidos por la expresión de RNAs CUG	167
2.5.	Correlación entre síntomas de pacientes y defectos macroscópicos en moscas DM1	169
3.	La expresión de RNAs CUG afecta a varios procesos celulares.....	170
3.1.	La expresión de RNAs CUG puede alterar la adhesión celular	172
3.2.	La expresión de RNAs CUG activa la muerte celular	176
3.3.	Implicación de factores asociados a EJC en la ruta de patogénesis DM1.....	178
4.	Los RNAs CUG modifican el metabolismo de los transcritos <i>mb/C</i>	180
Conclusiones.....		183
Bibliografía.....		187

Introducción

En las últimas décadas la investigación biomédica ha proporcionado grandes avances en el conocimiento de la base genética de numerosas enfermedades hereditarias. Sin embargo, estos avances todavía están lejos de proporcionar un tratamiento eficaz para las mismas, en la mayoría de los casos porque se desconoce el mecanismo por el que una mutación en un gen desencadena toda la serie de síntomas que el paciente manifiesta. Este problema general de entender el mecanismo de patogénesis de las enfermedades hereditarias se está abordando recientemente desde un nuevo punto de vista. A los tradicionales modelos murinos de enfermedades se unen ahora modelos desarrollados en organismos multicelulares sencillos, pero muy adecuados para el análisis genético, tales como el nematodo *C. elegans* y el insecto *D. melanogaster*. Los modelos más sofisticados desarrollados hasta la fecha son los que reproducen enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, o el efecto de la hipoxia sobre las neuronas (para revisiones recientes véase Bier, 2005; Driscoll M Fau - Gerstbrein y Gerstbrein, 2003). Una vez establecido un fenotipo que reproduce los aspectos relevantes de la enfermedad humana, este fenotipo se puede utilizar para cribados de mutaciones modificadoras dominantes, los cuales proporcionan nuevos componentes en la ruta de patogénesis. De manera análoga, se pueden utilizar metodologías de genética química para cribados de compuestos que fenocopien el efecto de estos modificadores, y proporcionen compuestos candidatos para tratamientos paliativos potenciales. Finalmente, los genes identificados se pueden caracterizar molecularmente, se pueden identificar sus homólogos en vertebrados y se pueden ordenar en rutas que describan sus relaciones causa-efecto con vistas a una futura terapia curativa (por ejemplo terapia celular). En este trabajo decidimos realizar un abordaje de este tipo y generar un modelo de Distrofia Miotónica tipo 1 en *Drosophila*.

1. Presentación clínica y etiología de la Distrofia Miotónica

La Distrofia¹ Miotónica (DM) fue descrita por primera vez en 1909 por el médico alemán Hans Steinert. Bajo el calificativo de Distrofia Miotónica se pueden englobar al menos dos tipos de enfermedades de herencia autosómica dominante y con una presentación clínica muy variable pues afectan de un modo u otro a casi todos los órganos y sistemas del organismo (revisado en Harper, 2001; Ranum y Day, 2004a;

¹**Distrofia muscular:** estado patológico que conduce a la degradación de la masa muscular independientemente de su inervación.

Introducción

Ranum y Day, 2004b). Algunos síntomas característicos son miotonía (retraso en el relajamiento del músculo esquelético después de una contracción voluntaria), debilidad muscular, un tipo específico de cataratas, degeneración de la retina, aparición de resistencia a tratamientos con insulina y arritmias cardíacas, entre otras manifestaciones patológicas. La Tabla 1.1 recoge de forma resumida la clínica de los dos tipos descritos de Distrofia Miotónica, la de tipo 1 (DM1, un 98% de los casos de distrofia miotónica) y la de tipo 2 (DM2, un 2% de los casos, en este trabajo DM hace referencia indistintamente a los dos tipos). Puede apreciarse el solapamiento casi total en los síntomas. Existen sin embargo algunas diferencias como que el grupo de músculos afectados son proximales en DM2 y distales en DM1, la miotonía y los síntomas en el Sistema Nervioso Central (SNC) son más graves en DM1, y no existe la forma congénita en DM2 la cual se caracteriza por retraso mental, malformaciones congénitas (incluyendo alteraciones en la diferenciación muscular) e hipotonía (Ranum y Day, 2004a). En la actualidad, todos los tratamientos disponibles son sintomáticos a pesar de ser la DM1 la distrofia muscular más común en adultos, con una prevalencia global de 1 cada 8500 individuos (Ranum y Cooper, 2006).

Características clínicas		DM2	DM1
<i>Características músculo esquelético</i>			
Dolor muscular		++	ND
Miotonía	examen físico	+++	+++
	EMG	+++	+++
Debilidad	global	+++	+++
	facial	+	++
	cuello	+++	+++
	hombro	+	+
	dedos	++	+++
	cadera	+++	+
<i>Características multisistémicas</i>			
Cardíacas	Arritmias ventriculares	+	++
	defectos de conducción en el nódulo atrioventricular	+	++
Cataratas	examen o historial	+++	+++
<i>Características serológicas</i>			
	↑ CK	+++	+++
	↓ IgG	++	++
	↓ IgM	+	+/-
	↓ Testosterona	+	++
	↑ FSH	++	++
	insensibilidad insulina	+++	++

Tabla 1.1. Síntomas característicos de la distrofia miotónica tipo 1 y 2. Puede apreciarse un gran solapamiento entre ambas a nivel clínico. Una de las diferencias entre la DM1 y la DM2 es la ausencia de una forma congénita en la DM2, con las consiguientes anomalías musculoesqueléticas y craneofaciales. En la Tabla se indica con símbolos (+) la frecuencia de los distintos síntomas para ambos tipos de DM. Para DM1 (+++) común; (++) fácilmente reconocible y/o común a lo largo del desarrollo de la enfermedad; (+) reconocible pero no común. Para el caso de la DM2 la simbología está basada en un estudio sobre 234 pacientes (21-78 años) de manera que, en algún momento de la enfermedad, (+++) indica que >75% lo presentan; (++) >50% y (+)>20%. ND o (+/-) significa que no hay datos disponibles. ↑ y ↓ indican niveles altos y bajos, respectivamente. CK, creatina kinasa; FSH, hormona folículo estimulante y EMG, electromiograma. Tabla tomada de Ranum y Day, 2004a.

La mutación responsable de la DM1 se ha localizado en una expansión del trinucleótido CTG en la región 3' no traducida (UTR) del gen *Proteína Kinasa de DM* (*DMPK*, localizado citogenéticamente en 19q13.3), la cual puede llegar a las 3000 repeticiones en los pacientes y que en la población normal es polimórfica entre 5 y 37 copias (Buxton et al., 1992; Harley et al., 1992; Brook et al., 1992; Fu et al., 1992; Mahadevan et al., 1992). La mutación responsable de la DM2, en cambio, se ha localizado en el primer intrón del gen *ZNF9* (localizado en el cromosoma 3q21), y consiste en una expansión del tetranucleótido CCTG (Liquori et al., 2001). La presentación clínica de DM2, similar a la de DM1 aunque se deba a mutaciones en diferentes *loci*, sugiere fuertemente que comparten una etiología molecular común. La aparición de los síntomas es más precoz a mayor expansión y la gravedad depende subsidiariamente del mayor tiempo de evolución (Tabla 1.2).

Repeticiones	Síntomas clínicos
5-35	-
50-100	Cataratas
150-1000	Miotonía
	Atrofia muscular progresiva
	Cardiomiopatía
	Cataratas
	Resistencia a la insulina
>1000	Hipotonía
	Retraso mental grave
	Alteración del desarrollo muscular

Tabla 1.2. Correlación entre el grado de expansión del trinucleótido CTG y la gravedad de los síntomas que desarrollan los pacientes con DM1. Los casos de aparición temprana acompañados por retraso mental se conocen como DM congénita.

Cuando las expansiones del trinucleótido CTG alcanzan el rango mutagénico (aproximadamente 50 repeticiones), muestran inestabilidad somática y germinal, siendo las expansiones más frecuentes que las contracciones en las sucesivas

Introducción

transmisiones. Esta inestabilidad somática conduce a que el enfermo sea un mosaico genético para el número de repeticiones. La variabilidad de alelos en tejido germinal y el sesgo de selección hacia los alelos mutantes pueden conducir al fenómeno de la anticipación genética, es decir, que la enfermedad se agrava y que los síntomas aparecen más pronto en generaciones sucesivas. En la DM1 los alelos transmitidos por vía materna son más propensos a sufrir expansiones mayores en términos absolutos. En términos relativos esta tendencia es mayor en los alelos paternos en los primeros tramos de inestabilidad (hasta 100 repeticiones) y luego esta tendencia se invierte y son los alelos maternos los que sufren un mayor crecimiento.

2. El *locus* de la DM1

El gen humano *DMPK* contiene 15 exones (Shaw et al., 1993) que codifican para una proteína con actividad serina treonina kinasa (Timchenko et al., 1995). *DMPK* regula la fosforilación y la localización intracelular, entre otras, del factor general de corte y empalme CUG-binding protein 1 (CUG-BP1). En pacientes con DM1 y en ratones mutantes homocigotos para *Dmpk* los niveles de expresión de *DMPK* decrecen y alteran el estado de la fosforilación de CUG-BP1 facilitando la localización nuclear de CUG-BP1 (Roberts et al., 1997). *DMPK* se localiza abundantemente en el retículo sarcoplásmico de los cardiomiocitos y también fosforila a la proteína fosfolamban (PLN), siendo la hipofosforilación de PLN debida a la pérdida de *DMPK* en pacientes con DM1 un aspecto importante en la disfunción ventricular característica de DM1 (Kaliman et al., 2005).

Flanqueando el microsatélite CTG en el exón 15 de *DMPK* se localizan dos sitios de unión para la proteína con motivos dedo de zinc CTCF que pertenecen a un elemento aislante entre los genes *DMPK* y el gen adyacente aguas abajo *SIX5* (Figura 2.1) (Filippova et al., 2001). Los elementos aislantes son secuencias que inhiben las interacciones promotor-*enhancer* cuando se colocan entre ellos o protegen un transgén de su silenciamiento epigenético cuando se colocan a ambos lados del mismo. El islote CpG que abarca la región del microsatélite CTG está metilada en los casos de DM1 congénita al contrario de lo que ocurre en pacientes con DM1 común y en la población sana. La metilación del islote CpG inhibe la unión de las proteínas CTCF y esto parece resultar en una pérdida de actividad como elemento aislante. En DM1 congénita los niveles de los transcritos *DMPK* en el músculo esquelético están aumentados mientras que en DM1 adulta están disminuidos. Estas diferencias

parecen ser debidas al efecto de la metilación del *locus* DM1 y por tanto el aumento de su expresión en DM congénita por la pérdida de la actividad del elemento aislante (Cho y Tapscott, 2006) que coloca bajo la influencia de un *enhancer* de *SIX5* a *DMPK*. Estos sitios de unión de proteínas tipo CTCF están asociados con las repeticiones CTG/CAG en otros *loci* genómicos. Por lo tanto, el papel general de las repeticiones CTG/CAG podría ser un componente de elementos aislantes en múltiples sitios del genoma humano (Figura 2.1).

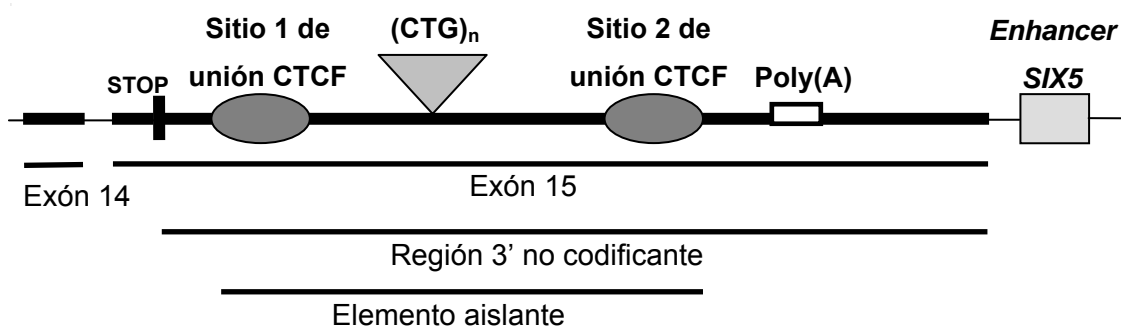


Figura 2.1. Locus de la DM1. El gen *DMPK* se localiza en el cromosoma 19q13.3 y contiene 15 exones. Las repeticiones CTG se localizan en el exón 15 en la región 3' UTR. El sitio de poliadenilación se encuentra a menos de 300 pb del codón de inicio del gen *SIX5*. Los dos sitios de unión CTCF flanquean las repeticiones CTG formando un elemento aislante entre *DMPK* y *SIX5*.

3. Mecanismo de patogénesis

La DM1 es el resultado de la expansión de repeticiones inestables de trinucleótidos tal y como ocurre en otras enfermedades neurológicas (Tabla 3.1). Estas enfermedades debidas a expansiones de microsatélites inestables pueden ser clasificadas en dos grandes subclases basándose en la localización de las repeticiones:

1. Enfermedades debidas a expansión de repeticiones dentro de regiones codificantes, por ejemplo la ataxia espinocerebelar 1 (SCA1) y la enfermedad de Huntington.
2. Enfermedades debidas a expansión de repeticiones no codificantes (localizadas en regiones no traducidas), por ejemplo las distrofias miotónicas y la ataxia espinocerebelar 8 (SCA8).

En muchos casos estas enfermedades siguen un patrón de herencia familiar dominante, el cual se explica bien en el caso de las expansiones que afectan a exones

Introducción

codificantes porque se puede proponer que la proteína mutante adquiere una nueva función que resulta tóxica para la célula. Ejemplos de este tipo de mecanismo son los de la enfermedad de Huntington o de la SCA1, ambas debidas a una expansión del triplete CAG en sus respectivos genes, que traducen proteínas alteradas portadoras de regiones de poliglutaminas. Tomando la enfermedad de Huntington como modelo (Everett y Wood, 2004), se acepta actualmente que las expansiones de poliglutaminas en la proteína Huntingtina unen anormalmente dos proteínas implicadas en la regulación de la transcripción de distintos genes: las proteínas CBP y TAF130. Esta unión aberrante provoca una alteración en el perfil transcripcional de la célula que es desencadenante de la patogénesis de estas expansiones. Otro tipo de expansión es la repetición GCG la cual codifica polialaninas. Este tipo de expansión ocurre en la enfermedad neuromuscular distrofia muscular oculofaríngea (OPMD).

El mecanismo molecular de patogénesis de enfermedades con herencia dominante y expansiones en regiones no codificantes, en especial la DM, ha sido durante mucho tiempo controvertida. Un efecto tóxico en la célula del tipo expansiones de poliglutaminas (como ocurre en la enfermedad de Huntington) explicaría la herencia dominante pero en este caso está descartada. Como alternativa se han formulado varias hipótesis siendo la más aceptada actualmente la que propone un mecanismo de ganancia de función a nivel de RNA o comportamiento de los RNAs portadores de estas expansiones no codificantes como RNAs “tóxicos” para la célula.

Tabla 3.1. Resumen de enfermedades hereditarias asociadas a repeticiones inestables. AR, receptor de andrógeno; DMPK, *Myotonic dystrophy protein kinase*; CACNA1A, subunidad α 1A de canal de calcio dependiente de voltaje. PPP2R2B subunidad reguladora específica de cerebro de la fosfatasa PP2A; ZNF9, proteína con dedos de zinc 9; KLHL1AS, Kelch-like 1 antisense; G F, ganancia de función, P F, pérdida de función y N-t, amino terminal; C-t, carboxilo terminal; NC, no codificante; tabla modificada de Cummings y Zoghbi, 2000; Machuca-Tzili et al., 2005.

Enfermedad	Locus	Gen	Proteína	Unidad de repetición	Localización de la repetición	Nº repeticiones		Mecanismo
						Normal	Patológico	
Distrofia Miotónica tipo 1	DM1	<i>DMPK</i>	DMPK	CTG	3' UTR NC	5-37	50-1000	G F RNA
Distrofia Miotónica tipo 2	DM2	<i>ZNF9</i>	ZNF9	CCTG	Intrón 1 NC	104-176	75-11000	G F RNA
Ataxia de Friedreich	FRDA	<i>X25</i>	Frataxina	GAA	Intrón NC	6-32	200-1700	P F gen
Síndrome del X frágil I	FMR1 (FRAXA)	<i>FMR1</i>	FMR-1	CGG	5' UTR NC	6-53	230-2000	P F gen
Síndrome del X frágil asociado a ataxia tremor	FXTAS	<i>FMR1</i>	FMR-1	CGG	5' UTR NC	6-53	55-200	G F RNA ¿?
Síndrome del X Frágil II	FMR2 (FRAXE)	<i>AFF2</i>	FMR-2	GCC	5' UTR NC	4-39	200-900	P F gen
Ataxia espinocerebelar 8	SCA8	<i>KLHL1AS</i>	Ninguna	CTG	Extremo 3' NC	19-92	100-127	G F RNA/ P F antisentido
Ataxia espinocerebelar 12	SCA12	<i>PPP2R2B</i>	PPP2R2B	CAG	5' UTR promotor NC	7-45	55-78	P F ¿?
Ataxia espinocerebelar 10	SCA10	<i>ATXN10</i>	Ataxina 10	ATTCT	Intrón NC	10-22	800-4500	P F ¿?
Atrofia dentatorubral	DRPLA	<i>DRPLA</i>	Atrofina1	CAG	Codificante N-t	3-35	49-88	G F proteína
Huntington	HD	<i>HD</i>	Huntingtina	CAG	Codificante N-t	10-34	40-121	G F proteína
Huntington tipo 2	HDL2	<i>JPH3</i>	Junctofilina 3	CTG		8-28	44-57	G F RNA¿?
Atrofia muscular espinobulbar	SBMA	<i>AR</i>	AR	CAG	Codificante N-t	9-36	38-62	G F proteína

Ataxia espinocerebelar 2	SCA2	ATXN2	Ataxina 2	CAG	Codificante N-t	13-33	32-200	G F proteina
Ataxia espinocerebelar 3 de Machado-Joseph (MJD)	SCA3	ATXN3	Ataxina 3	CAG	Codificante C-t	13-44	55-84	G F proteina
Ataxia espinocerebelar 6	SCA6	CACNA1A	CACNA1A	CAG	Codificante C-t	4-18	21-33	G F proteina
Ataxia espinocerebelar 7	SCA7	ATXN7	Ataxina 7	CAG	Codificante N-t	4-35	37-306	G F proteina

Las evidencias que apuntan al mecanismo de ganancia de función del RNA para la patogénesis de la DM son numerosas y se discuten en detalle a continuación:

1. Localización subcelular de los transcritos mutantes

Estudios de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*) han demostrado que los transcritos del alelo mutante *DMPK* se acumulan en el núcleo formando *foci* (Taneja et al., 1995). Los transcritos del alelo *DMPK* normal no se acumulan en *foci* por lo que, al no ser *DMPK* un *loci* haploinsuficiente (véase más abajo), se propuso un efecto dominante en *trans* de estos transcritos mutantes que podría resultar de una inhibición general de las funciones nucleares. Además, estudios subcelulares confirman que los transcritos del gen *DMPK* mutante están retenidos en el núcleo en asociación con la matriz nuclear (Figura 3.1) (Davis et al., 1997; Hamshere et al., 1997).

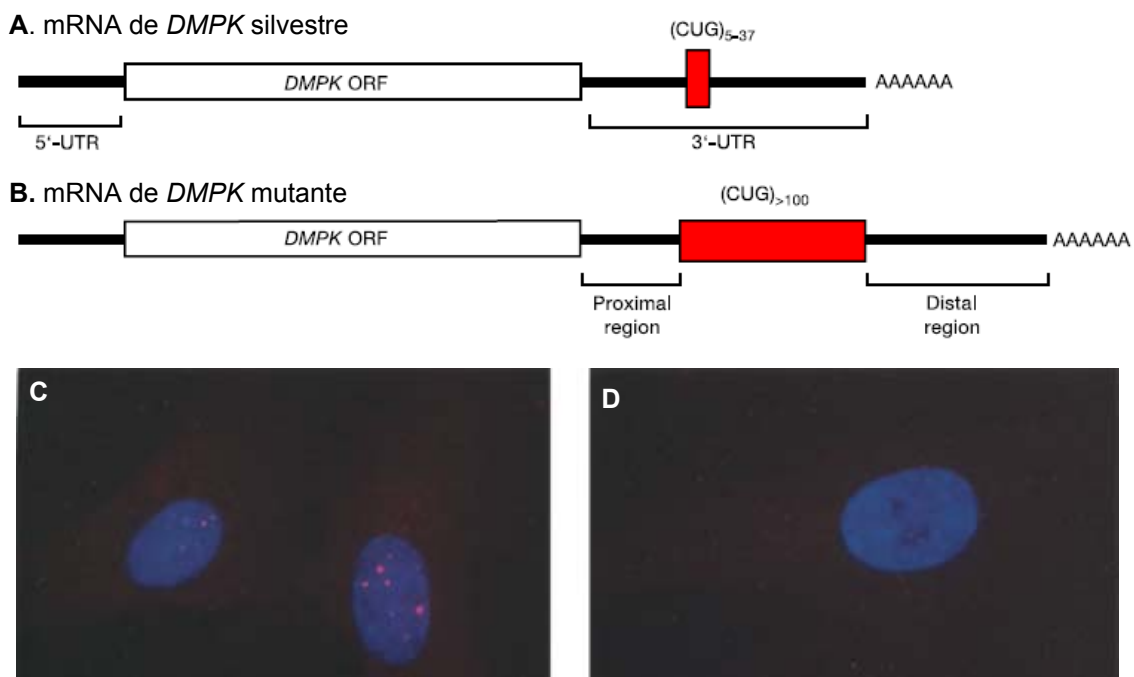


Figura 3.1. Los transcritos *DMPK* mutantes se acumulan en el núcleo de fibroblastos de pacientes con DM1. (A) Los transcritos *DMPK* silvestres contienen entre 5-37 repeticiones CUG en su región 3'-UTR. (B) Los mRNAs mutantes contienen entre cientos y miles de repeticiones CUG. También se indica en estos transcritos la región proximal (239 nucleótidos) y la región distal (484 nucleótidos). Figura tomada de Amack et al., 2004. (C) Hibridación con una sonda CAG marcada con el fluoróforo Cy3 en fibroblastos con DM1 y (D) normales. Con DAPI (azul) se tiñen los núcleos. Imagen procedente de Taneja et al., 1995.

2. Knockout para el gen *Dmpk*

Los ratones *knockout* para el gen *Dmpk* reproducen anomalías en la conductancia atrioventricular característico de pacientes con DM1 y pérdida de fuerza en la musculatura esquelética, pero esta situación no reproduce el patrón de herencia dominante de la enfermedad ni los síntomas definitorios de la DM como es la miotonía (Berul et al., 2000; Reddy et al., 1996). También se testó la hipótesis de que la expresión de los genes adyacentes a *DMPK* pudiera estar afectada en presencia de expansiones largas de tripletes CTG. Se comprobó en ratones heterocigotos para un *knockout* del gen *SIX5*, que se localiza 1 kb aguas abajo del *locus DMPK* (Tapscott y Thornton, 2001), que exhibían cataratas que no eran del tipo iridiscente como ocurre en DM1 (Klesert et al., 2000; Sarkar et al., 2000). Por lo tanto, la pérdida de función de *Dmpk* o *Six5* no reproduce los síntomas definitorios de DM1 en ratones.

3. Las mutaciones DM1 y DM2 se localizan en entornos genómicos diferentes

El hecho de que la expansión del tetranucleótido CCTG (DM2) en un gen no relacionado con *DMPK* produzca una enfermedad muy similar a DM1 descarta que la pérdida de función de *DMPK*, *ZNF9* o de los genes vecinos (como *SIX5*) sea responsable de las principales características de las DMs y sugiere fuertemente un mecanismo común (Liquori et al., 2001).

4. Las expansiones CTGs son tóxicas *per se*

Un apoyo decisivo para la hipótesis de que los RNAs portadores de expansiones CUG resultan tóxicos para la célula que los expresa procede del trabajo de Mankodi y col. (2000) en el que se expresa una expansión de trinucleótidos CUG en un mRNA heterólogo, el gen de la actina de músculo, en ratones transgénicos. Este modelo murino expresa expansiones largas de repeticiones CTG y en sus núcleos celulares se detecta el RNA formando agregados. Muestran defectos en el músculo esquelético y miotonía característicos de DM1 (Mankodi et al., 2000). Por lo tanto este modelo demuestra que las expansiones de repeticiones CTG son suficientes para provocar DM1, independientemente del gen *DMPK*, cuando se expresan en el contexto de un RNA heterólogo y sugiere que esta expansión del triplete CUG confiere una función nueva (tóxica) al RNA posiblemente alterando los niveles funcionales de algunas proteínas nucleares. Estas proteínas pueden estar implicadas en diversas funciones

como la transcripción de genes, el procesado alternativo de algunos transcritos o el transporte de RNA mensajeros, entre otras.

5. Se han aislado y caracterizado proteínas de unión a las expansiones CUG

Se ha descrito que los transcritos CUG quedan retenidos en el núcleo y secuestran proteínas. Se ha encontrado que las proteínas Muscleblind-like (MBNL) se unen a las expansiones CUG (Miller et al., 2000) y se ha observado que su falta de función reproduce los aspectos más definitorios de la DM (Kanadia et al., 2003a) (véase *Apartado 5.2 de Introducción*). Además, el patrón de expresión de los genes *MBNL* solapa ampliamente con el de *DMPK*, lo cual es un requerimiento necesario para su implicación en el mecanismo de patogénesis de la enfermedad (Kanadia et al., 2003b).

Recientemente se ha propuesto que este mecanismo de ganancia de función a nivel de RNA también explicaría al menos parte de la sintomatología de otras enfermedades debidas a expansiones de microsatélites no codificantes como el *fragile X tremor ataxia syndrome* (FXTAS), donde MBNL1 también se ha detectado en las inclusiones ribonucleares, las ataxias espinocerebelares tipo 8 (SCA8), donde *muscleblind* ha interactuado genéticamente con un fenotipo obtenido en un modelo de SCA8 en *Drosophila*, SCA 10 y SCA12 y la enfermedad de Huntington tipo 2 (HDL2) (Hagerman y Hagerman, 2004; Holmes et al., 2001; Holmes et al., 2003; Lin y Ashizawa, 2003; Oostra y Willemsen, 2003; Ranum y Day, 2004a).

4. Defectos moleculares en DM1

Una característica molecular definitoria de la DM es el procesado alternativo anormal de algunos RNA mensajeros (Tabla 4.1). Así, la transición de un patrón de procesado alternativo embrionario/fetal a uno adulto falla en los pacientes con DM originando ausencia de proteínas concretas o la presencia de proteínas anormales o con actividad subóptima. Estas alteraciones en el patrón de procesado alternativo parecen ser las responsables de síntomas concretos de los pacientes.

Receptor de la insulina (IR)

Un síntoma característico tanto en la DM1 como en la DM2 es la resistencia a insulina (Moxley et al., 1978) que predispone a los pacientes a padecer diabetes. Se ha demostrado que el corte y empalme alternativo del mensajero del *IR* está alterado detectándose una isoforma fetal en el músculo esquelético de DM1. Esta alteración se traduce en una disminución de la capacidad señalizadora del receptor de la insulina desencadenando una baja respuesta metabólica a la misma (Figura 4.1) (Seino et al., 1989; Savkur et al., 2001). Estos resultados se han reproducido para la DM2 (Savkur et al., 2001) sugiriendo que ambas enfermedades comparten la misma ruta de patogénesis. Se han identificado varias proteínas que se unen al pre-mRNA de *IR* para regular el procesado específico del exón 11 tales como CUGBP1 (Savkur et al., 2001) MBNL1-3 (Ho et al., 2004; Dansithong et al., 2005) y hnRNP H (Paul et al., 2006).

Canal de cloro específico de músculo (CIC-1)

Una característica de la DM1 y la DM2 es la miotonía. El músculo esquelético tiene reducida la conductancia transmembrana del cloro. La proteína CIC-1 es el canal de cloro predominante en el músculo esquelético adulto y su función es esencial para mantener la estabilidad eléctrica de la membrana en dicho tejido. En los pacientes el procesado de los mensajeros *CIC-1* da lugar en adultos a una proteína truncada. En la población sana esta variante truncada tan sólo está presente en el feto, mientras que en los pacientes se mantiene a lo largo del desarrollo. Esta isoforma fetal se debe a que en el mRNA maduro se incluye el exón 7a que contiene un codón de parada prematuro estando sujetos estos mRNAs a degradación vía *non-sense mediated decay* (NMD) (Nagamitsu et al., 2000) (Figura 4.1). Esta pérdida de función del gen *CIC-1* es suficiente para generar miotonía (Charlet et al., 2002b; Mankodi et al., 2001).

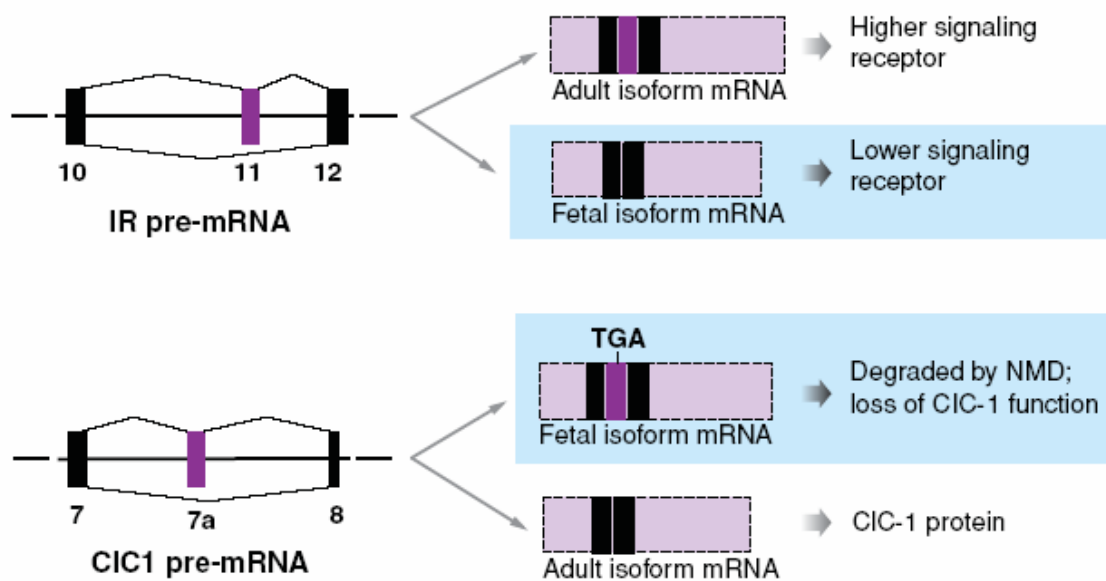


Figura 4.1. Mantenimiento en pacientes con DM1 de un patrón de procesamiento “fetal” en diferentes pre-RNA mensajeros. El procesamiento de los pre-mRNA está regulado según el momento del desarrollo del organismo. El transcrito del gen *IR* y del *CIC-1* tiene alterada la regulación del procesamiento predominando las formas fetales (fondo azul) en el músculo esquelético de adultos con DM, excluyendo el exón 11 para el gen *IR* e incluyendo el exón 7a para el *CIC-1*. El patrón fetal del *IR* se debe a la expresión de una isoforma con más baja capacidad de señalización que la isoforma adulta. El exón 7a del *CIC-1* contiene un codón de parada prematuro originando un transcrito que se degrada por la ruta NMD. Esta pérdida de expresión proteica de *CIC-1* en el músculo esquelético adulto es suficiente para generar miotonía. Esquema de Ranum y Cooper, 2006.

troponinas T: cTNT (TNNT2) y TNNT3

Las troponinas están implicadas en la contracción del músculo estriado porque cuando llega un potencial de acción a la fibra muscular se estimula la liberación de calcio que se une a la troponina y modifica la posición de la tropomiosina, permitiéndose la contracción muscular.

La troponina T cardiaca (cTNT) se detecta principalmente en el músculo esquelético inmaduro y en el corazón. El procesamiento del transcrito de la *cTNT* en pacientes está alterado porque se produce una inclusión del exón 5 en el músculo estriado de DM1 (Philips et al., 1998). Esta alteración quizá contribuya al desarrollo de la patología cardiaca que sufren los pacientes con DM1.

La troponina T del músculo esquelético (TNNT3) tiene el procesamiento de los transcritos alterado en pacientes DM1 porque en adultos se detecta una isoforma fetal (Kanadia et al., 2003a).

Introducción

tau

También se han descrito en el SNC de pacientes y de modelos murinos alteraciones en el procesado del pre-mRNA de *tau* (Sergeant et al., 2001; Seznec et al., 2001). Tau pertenece a la familia de las proteínas de unión a microtúbulos. Estas proteínas se expresan fundamentalmente en neuronas y su función esencial es regular la red de microtúbulos celulares. Se ha demostrado que en cerebros de pacientes con DM1 se produce una reducción de las isoformas que contienen los exones que sufren procesado alternativo (Sergeant et al., 2001; Jiang et al., 2004).

N-Methyl-D-aspartate y APP

El receptor de *N-Methyl-D-aspartate* (NMDA) subunidad NR1 tiene incrementada la inclusión del exón 5 y la proteína precursora amiloide (APP) tiene disminuida la inclusión del exón 7. Estas isoformas fetales predominan en cerebros con DM1 (Jiang et al., 2004). El gen *NMDA* pertenece a la familia de los receptores de glutamato que son los receptores de neurotransmisores excitatorios más comunes en el cerebro de los mamíferos. La clase de los receptores NMDA se ha relacionado con la función del aprendizaje y el funcionamiento normal de los potenciales de larga duración en el hipocampo. La APP es una proteína de membrana y es el componente principal de las placas que se observan en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Estas proteínas pueden ser importantes en el desarrollo intelectual de los pacientes y en la somnolencia característica de DM1.

myotubularin-related 1 (MTMR1)

MTMR1 es un miembro de una gran familia de fosfatasas. El procesado alternativo del gen *MTMR1* muestra una disminución en la isoforma específica de músculo y la detección de un transcrito anormal en cultivos diferenciados de mioblastos con DM1 y en tejido muscular de pacientes con DM1 congénita. El procesado alterado del mRNA de *MTMR*, al producir una pérdida de la isoforma específica de músculo, podría contribuir a defectos miogénicos en DM1 congénita (Buj-Bello et al., 2002).

SERCA y RyR

La *ATPasa dependiente de calcio* (*SERCA*) y el receptor de la rianodina (*RyR*) están implicados en mecanismos de homeostasis intracelular de calcio durante procesos de relajación/contracción muscular. Ambos genes presentan alteraciones en el procesado alternativo originando variantes neonatales en músculo esquelético de pacientes con

DM1, relacionándose con los niveles anormalmente altos de calcio que muestran los cultivos de mioblastos de pacientes DM1 (Kimura et al., 2005). Estas proteínas son importantes en la homeostasis del calcio porque SERCA está implicada en la captación desde el citoplasma al lumen del retículo sarcoplasmático en los procesos de contracción muscular y RyR en la liberación de calcio al citoplasma en los procesos de relajación muscular. Estos defectos en estos transcritos podrían ser los causantes del desgaste y de la degeneración muscular que muestran los pacientes DM1.

Gene	Exon/Intron	Tissue	DM pattern	References
Cardiac troponin T (TNNT2)	Exon 5	Heart	Exon inclusion	Philips et al. 1998
Insulin receptor (IR)	Exon 11	Skeletal muscle	Exon exclusion	Savkur et al. 2001, 2004
Chloride channel (CLCN-1)	Intron 2	Skeletal muscle	Intron retention	Charlet et al. 2002, Mankodi et al. 2002
Chloride channel (CLCN-1)	Exon 7a	Skeletal muscle	Exon inclusion	Charlet et al. 2002, Mankodi et al. 2002
Tau (MAPT)	Exons 2 and 3	Brain	Exon exclusion	Jiang et al. 2004a, Sergeant et al. 2001
Tau (MAPT)	Exon 10	Brain	Exon exclusion	Jiang et al. 2004b
Myotubularin-related protein 1 (MTMR1)	Exons 2.1 and 2.3	Skeletal muscle/heart	Exon exclusion	Buj-Bello et al. 2002, Ho et al. 2005a
Fast skeletal troponin T (TNNT3)	Fetal exon	Skeletal muscle	Exon inclusion	Kanadia et al. 2003
N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1)	Exon 5	Brain	Exon inclusion	Jiang et al. 2004a
Amyloid precursor protein (APP)	Exon 7	Brain	Exon exclusion	Jiang et al. 2004a
Ryanodine receptor (RyR)	Exon 70 (AS I)	Skeletal muscle	Exon exclusion	Kimura et al. 2005
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase 1 (SERCA1)	Exon 22	Skeletal muscle	Exon exclusion	Kimura et al. 2005
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase 2 (SERCA2)	Intron 19	Skeletal muscle	Intron retention	Kimura et al. 2005

Tabla 4.1. Procesado alternativo alterado en la Distrofia Miotónica. Tabla tomada de Ranum y Cooper, 2006.

Recientemente se han descrito algunos sucesos más en el procesado alterado de pre-mRNAs y se estima que afecte en la DM hasta centenares de transcritos.

5. Proteínas implicadas en la patogénesis de DM

Los estudios moleculares han empezado a revelar el mecanismo por el que los transcritos portadores de repeticiones CUG (o CCUG) son patogénicos. La mayoría de estas evidencias indican que la interacción aberrante de distintas proteínas de unión al RNA con estos transcritos provoca efectos pleiotrópicos sobre el metabolismo de

Introducción

distintos pre-mRNAs diana, los cuales son responsables últimos de muchos de los síntomas de los pacientes (para ejemplos de la implicación de alteraciones en el procesado de los transcritos en enfermedades humanas véase Faustino y Cooper, 2003). De este modo, los RNAs portadores de expansiones largas adquirirían una función nueva, tóxica, para la célula de modo análogo a la toxicidad que adquieren las proteínas portadoras de poliglutaminas. Se han identificado varias proteínas de unión a repeticiones CUG que detallamos a continuación:

5.1. CUG-Binding Protein

CUG-Binding Protein (CUG-BP1) es un miembro de una familia de seis genes que codifican proteínas que regulan varios pasos del proceso post-transcripcional, incluyendo el procesado alternativo, el editado del RNA, la iniciación de la traducción y la estabilidad del RNA mensajero (Anant et al., 2001; Ladd et al., 2001, Mukhopadhyay et al., 2003, Paillard et al., 1998; Timchenko et al., 1999). Esta familia se conoce como CUG-BP y *ETR-3-like factors* (CELF) o *Bruno-like proteins* (Brunol) (Good et al., 2000). CUG-BP1 puede regular la traducción de p21, C/EBP β LIP y MEF2A (Timchenko et al., 2001; Timchenko et al., 2004). Las proteínas p21 y MEF2A son relevantes en la DM porque participan en la diferenciación del músculo esquelético. Se ha propuesto que CUG-BP1 es el sustrato de la fosforilación normal para la DMPK kinasa (Roberts et al., 1997) y que la pérdida de la actividad DMPK en células con DM1 conduciría a una acumulación de CUG-BP1 hipofosforilada en el núcleo disminuyendo la traducción de la proteína p21 (revisado en Nykamp y Swanson, 2004; Amack y Mahadevan, 2004).

CUG-BP1 también regula el procesado alternativo de transcritos específicos como son *cTNT*, *IR* y *CIC-1* uniéndose a los motivos ricos en UG en intrones adyacentes al sitio de corte y empalme alternativo de estos transcritos (Charlet et al., 2002a; Philips et al., 1998; Savkur et al., 2001). CUG-BP1 se une al RNA de cadena sencilla de la base de las horquillas de doble cadena que forman las expansiones de CUGs pero no se une proporcionalmente a la longitud de las repeticiones (Timchenko et al., 1996). Tampoco colocaliza con el RNA con repeticiones CUG o CCUG en los *foci* nucleares (Michalowski et al., 1999; Fardaei et al., 2001; Jiang et al., 2004). Pero aún así estudios funcionales indican que el nivel basal de la proteína CUG-BP1 está elevado en el músculo estriado DM1 donde la regulación del procesado de sus transcritos diana está alterado (Philips et al., 1998; Savkur et al., 2001; Timchenko et

al., 2001; Charlet et al., 2002a; Dansithong et al., 2005). En ratones que sobreexpresan CUG-BP1 en el corazón y en el músculo esquelético, simulando las condiciones de DM1, se produce un retorno a las formas fetales de los transcritos *cTNT*, *CIC-1* y *MTMR1* (Ho et al., 2005a). En cambio otros estudios muestran que los defectos en el procesado de los transcritos no es debido a la expresión de CUG-BP1 porque en pacientes con DM2 y en ratones que expresan CUG, que en ambos casos los niveles CUG-BP1 no están aumentados, igualmente se observan defectos en el procesado (Lin et al., 2006). Además se ha observado que la disminución de CUG-BP1 mediante siRNA no reestablece el patrón normal del procesado de transcritos en mioblastos DM1 (Dansithong et al., 2005). Recientemente se ha descrito que en ratones que sobreexpresan un mRNA *DMPK* 3'UTR normal también están incrementados los niveles de proteína CUG-BP1 en músculo esquelético, como ocurre en pacientes con DM1, observándose características típicas de DM1 como son la miotonía, anormalidades en la conducción cardíaca, histopatología y defectos del procesado de RNA en ausencia de inclusiones nucleares (Mahadevan Ms Fau - Yadava et al., 2006). Según estos datos los elementos de secuencia requeridos para la toxicidad y la inducción de niveles altos de CUG-BP1 probablemente no existan en las repeticiones *per se* sino en los transcritos normales de *DMPK* aunque todavía se desconozca su mecanismo. En este mecanismo probablemente no participen las proteínas Muscleblind porque a pesar de que se secuestran en los núcleos de pacientes DM1 y DM2 solamente se aumentan los niveles de CUG-BP1 en DM1.

5.2. Proteínas de la familia Muscleblind

Las proteínas codificadas por los tres genes humanos *MBNL* (en este trabajo *MBNL* hace referencia a los tres genes humanos indistintamente); *MBNL1*, *MBNL2* y *MBNL3* (Fardaei et al., 2002) son homólogos de la proteína Muscleblind requerida para el desarrollo del músculo y células fotorreceptoras en *Drosophila* (Artero et al., 1998; Begemann et al., 1997). Las proteínas MBNL contienen cuatro motivos de dedos de zinc del tipo Cys₃His por los cuales se unen a ácidos nucleicos. El RNA con >20 repeticiones CUG forma horquillas de RNA de doble cadena conteniendo los pares de bases G-C y los residuos U desparejados (Michalowski et al., 1999; Napierala y Krzyzosiak, 1997). MBNL tiene una fuerte afinidad por este RNA de doble cadena con repeticiones CUG *in vitro* (Figura 5.1) y colocaliza con los *foci* nucleares que contienen

Introducción

RNA con repeticiones CUG y CCUG en células con DM (Figura 5.2) (Michalowski et al., 1999; Miller et al., 2000; Fardaei et al., 2001; Mankodi et al., 2003).

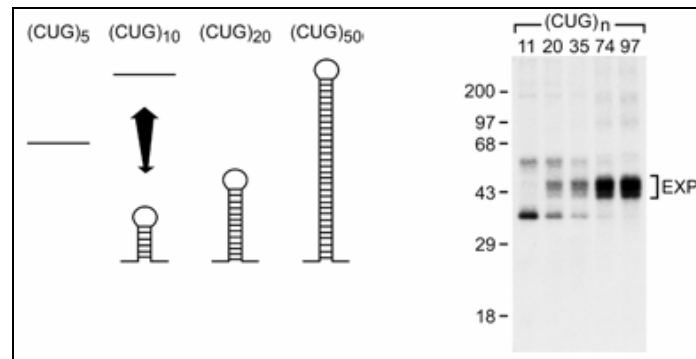


Figura 5.1. Las expansiones CUG unen proteínas de la familia Muscleblind. A la izquierda se representa que las repeticiones superiores a 20 copias se pliegan espontáneamente en una estructura secundaria en horquilla mientras que las repeticiones de menos de 10 copias están principalmente en una conformación de cadena sencilla. A la derecha se muestra un retardo en gel con el resultado de un ensayo de entrecruzamiento con luz ultravioleta en el que se demuestra que la proteína MBNL1 (marcada como EXP) se une a la secuencia CUG y que esta unión es proporcional al número de repeticiones CUG. Figura tomada de Miller et al., 2000.

Los experimentos *in vitro*, además, indican que la interacción de MBNL con las expansiones es directa pues se detecta *in vitro* con RNA CUG y proteínas MBNL traducidas *in vitro*. La unión de MBNL a los transcritos con repeticiones CUG se correlaciona positivamente con la longitud de la expansión (Miller et al., 2000).



Figura 5.2. Las proteínas MBNL colocalizan con los transcritos *DMPK* (DM1) y *ZNF9* (DM2) mutantes en núcleos de células DM. En rojo se detectan los transcritos CUG (izquierda) y CCUG (derecha) con sondas CAG y CAGG, respectivamente. En verde se observan las proteínas MBNL y en amarillo la colocalización de ambas señales en núcleos (azul) de mioblastos DM1 y DM2, respectivamente. Imagen tomada de Mankodi et al., 2003.

Varias evidencias indican que hay una relación causal entre la pérdida de función de MBNL debido a su secuestro aberrante por las expansiones y la alteración del procesamiento de transcritos en DM. Se han obtenido fenotipos en organismos de

experimentación que reproducen aspectos de la DM1 como es el caso del *knockout* del exón 3 de *Mbn1* en ratón. Este modelo presenta varios síntomas de DM como son las cataratas de tipo iridiscentes, cambios histológicos en el músculo esquelético con características anormales (como el incremento en los núcleos con una posición central aberrante), miotonía (detectada por electromiograma) y el procesado alterado de algunos transcritos relacionados con la miotonía en especial el del *canal de cloro tipo 1* (Figura 5.3) (Kanadia et al., 2003a).

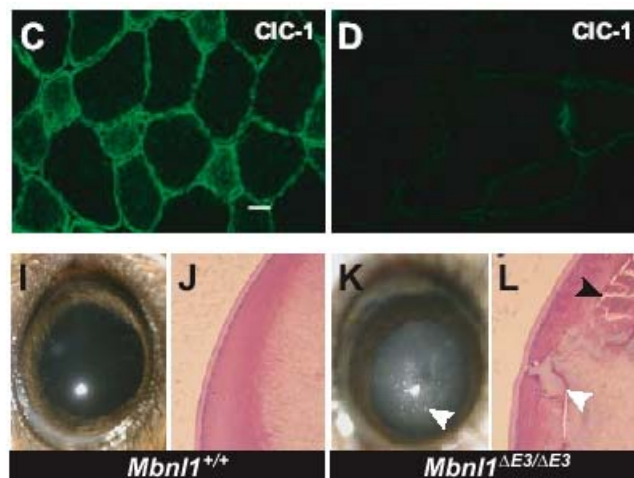


Figura 5.3. Los ratones *knockout Mbn1* desarrollan miotonía, defectos de corte y empalme alternativos en transcritos específicos y cataratas equivalentes a las de los pacientes con DM1. El corte y empalme alternativo de los transcritos del *canal de cloro 1* da lugar a una isoforma específica de músculo que se detecta en cortes de tejido normal (C) pero que está fuertemente reducida en los ratones *knockout* (D). Los ratones mutantes para *Mbn1* también desarrollan cataratas que tanto externamente (K), como internamente (L), son semejantes a las desarrolladas por los pacientes con DM1. Las imágenes (I) y (J) son controles. Figura tomada de Kanadia et al., 2003a.

Estudios en *Drosophila* también relacionan la pérdida de función *muscleblind* con los defectos encontrados en DM. Las bandas Z son estructuras electrodensas que forman parte del sarcómero donde se insertan los filamentos de actina. Los embriones mutantes para *muscleblind* muestran ausencia de bandas Z, como ha sido descrito en los pacientes con DM1 (Klinkerfuss, 1967; Ludatscher et al., 1978), y presentan signos ultraestructurales de hipercontracción muscular (ausencia de las bandas I) (Artero et al., 1998). También se ha detectado en embriones mutantes *muscleblind* una alteración en el procesado del transcrito de la α -actinina. Es una proteína que se localiza en los discos Z y une filamentos de actina. Se detectó un desplazamiento hacia la isoforma adulta no muscular α -actnA en embriones *muscleblind* (Vicente et al.,

Introducción

2007; Machuca-Tzili et al., 2006). Estos fenotipos sugieren un defecto equivalente a la miotonía humana. La eliminación genética de la función *muscleblind* durante el desarrollo del ojo adulto de *Drosophila* interfiere con la diferenciación terminal de los fotorreceptores porque los rabdómeros, apilamientos de membranas fotosensibles, no se extienden apico-basalmente (Figura 5.4) (Begemann et al., 1997). En algunos pacientes con DM1 se ha descrito degeneración de células fotorreceptoras en la retina (Harper, 2001).

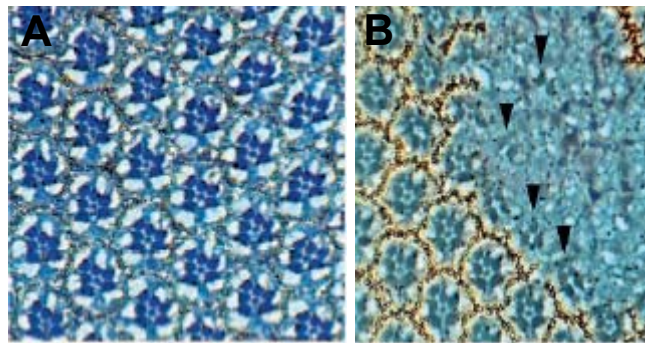


Figura 5.4. Defectos en la diferenciación terminal de los fotorreceptores del ojo adulto de *Drosophila* en clones mutantes *muscleblind*. Se muestran secciones tangenciales de clones mutantes *muscleblind* en el ojo de *Drosophila*. (A) Control y (B) alelo *mb^{E27}*, nótese la ausencia de rabdómeros (cabeza de flecha) en el tejido mutante *muscleblind* marcado por la ausencia de pigmento. Figura tomada de Begemann et al., 1997.

En un modelo de patogénesis en el que las proteínas MBNL son secuestradas por las expansiones CUG cabe esperar que la expresión del gen *DMPK* y de los genes *MBNL* solape al menos en los tejidos afectados en los pacientes. Se ha visto que *DMPK* se expresa en músculo cardíaco, esquelético y con menos intensidad en músculo liso (Lam et al., 2000). En cuanto a *MBNL1* su expresión es muy fuerte en el músculo esquelético y corazón, en cambio *MBNL2* tiene una expresión similar en todos los tejidos examinados. Por lo que respecta a *MBNL3* sólo se detecta en placenta con una débil expresión en el corazón (Miller et al., 2000; Fardaei et al., 2002). Se ha estudiado el patrón de expresión de los genes *Dmpk* y *Mbni* en ratón. *Mbni1* se expresa abundantemente en músculo liso y estriado (Jansen et al., 1992; Kanadia et al., 2003b). En el caso de *Mbni2* es muy parecido al patrón del gen humano (Fardaei et al., 2002) mientras que la expresión de *Mbni3* es muy baja en todos los tejidos examinados (Kanadia et al., 2003b). La expresión de *Dmpk* es más pronunciada en los músculos de la lengua, tórax, espalda, diafragma e intestinos

(Jansen et al., 1996). Los genes *Mbnl1* y *Mbnl2* también se expresan en la lengua y en las regiones mandibulares y maxilares (Kanadia et al., 2003b).

Se han descrito dos funciones moleculares para las proteínas Muscleblind, como factor de corte y empalme alternativo y como regulador de la localización subcelular de transcritos, los cuales detallamos a continuación.

5.2.1. Muscleblind como factor de corte y empalme alternativo

Los *knockout* para *Mbnl1* en ratón así como los mutantes *muscleblind* en moscas muestran defectos en la diferenciación terminal del músculo con alteración en el procesamiento de transcritos musculares específicos (Kanadia et al., 2003a; Lin et al., 2006; Machuca-Tzili et al., 2006; Vicente et al., 2007).

Se ha demostrado que las proteínas MBNL regulan el procesamiento alternativo de dos pre-mRNAs que están alterados en DM, *IR* y *cTNT*. Estos dos transcritos también están regulados por las proteínas CELF. Los efectos de MBNL en los exones alternativos de *cTNT* y de *IR* son opuestos al patrón de procesamiento inducido por las proteínas CELF, implicando una relación antagonista entre estas dos familias de proteínas. Además se ha identificado la secuencia intrónica YGCU(U/G)Y que es reconocida por MBNL1 para regular el procesamiento del transcrito *cTNT* (Figura 6.1 C) (Ho et al., 2004).

En experimentos con ratones se ha descrito que *Mbnl1* tiene una función en la remodelación postnatal del músculo esquelético pero no *Mbnl2*. Procesa los cambios de formas fetales y adultas incluyendo o excluyendo exones específicos del desarrollo del músculo esquelético de varios pre-mRNAs como son *cTNT*, *TNNT3*, *ZASP* (que codifica para una proteína que se localiza en los discos Z), *IR*, *MTMR1*, *Serca1*, *CIC-1* y *RyR* (Lin et al., 2006). Entre los transcritos que *Mbnl1* regula están también sus propios transcritos y los de *Mbnl2*. Estos mRNAs tienen incrementada la inclusión del exón 7 (isoforma fetal) siendo por tanto *Mbnl1* un regulador de su propio procesamiento (Lin et al., 2006).

Vista la falta de expresión de *MBNL3* en tejidos musculares maduros no sorprende que *MBNL3* inhiba la diferenciación muscular, en cambio la expresión de *MBNL1* se detecta en tejidos musculares maduros y se ve activada en la inducción de la diferenciación de mioblastos en cultivo celular de ratón (Miller et al., 2000; Squillace et al., 2002). El mecanismo molecular por el cual *MBNL3* previene la diferenciación del

Introducción

músculo es probable que sea porque esté involucrado en la regulación del procesamiento de los transcritos específicos de músculo ya que las tres proteínas MBNL regulan de manera similar el procesamiento de los minigenes humanos de *cTNT* y del *IR* en cultivos de músculo esquelético (Figura 5.5) (Ho et al., 2004).

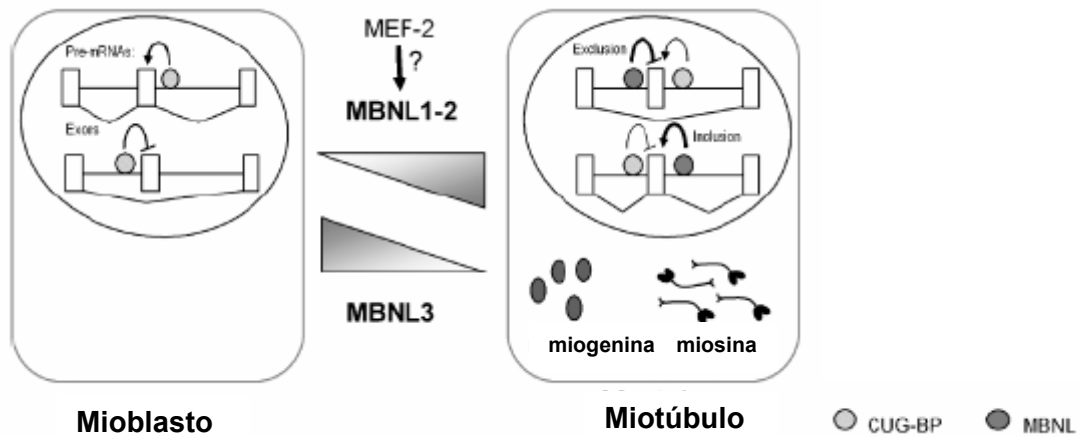


Figura 5.5. Las proteínas Muscleblind regulan el procesamiento alternativo de transcritos implicados en la diferenciación terminal celular. MBNL1 (y probablemente MBNL2) actúa como un factor promiogénico y MBNL3 como antimiógenico. En *Drosophila* Mef2 (*myocyte-specific enhancer factor 2*) regula la expresión de *muscleblind* en el mesodermo. Es probable que sus ortólogos en mamíferos, las proteínas MEF-2, también regulen los genes *MBNL1* y *MBNL2*. MBNL3 inhibe la cadena pesada de la miosina, la cual es un marcador del músculo terminal. Los triángulos representan los cambios en la expresión génica. Las proteínas MBNL y CUG-BP actúan como antagonistas en el uso de exones alternativos específicos. Figura tomada de Pascual et al., 2006.

Como hemos comentado en experimentos de cultivo celular de músculo esquelético se observó que las proteínas MBNL1-2 eran capaces de procesar los transcritos de *cTNT* y de *IR* (Ho et al., 2004) en cambio, en un *knockdown* de *Mbnl2* no se vieron alterados estos transcritos (Lin et al., 2006). Estos datos sugieren que *MBNL1* es suficiente para explicar las alteraciones en el procesamiento de estos transcritos en el músculo esquelético adulto con DM1. Pero esta explicación no es congruente con la observación de que MBNL1 se secuestra más en células DM2 que en DM1 y en cambio la degeneración muscular es más grave en DM1 que en DM2. Estas observaciones apuntan a que *MBNL1* no es el único responsable de estas alteraciones en el procesamiento de transcritos específicos. Probablemente sean varios los componentes alterados en la regulación del procesamiento de transcritos específicos.

El transcrito del gen del *canal de cloro tipo 1* está alterado en el *knockout* de *Mbnl1* o en la expresión de CUG aunque no se sabe exactamente qué ruta molecular causa esta anomalía (Kanadia et al., 2003a). El hecho de que esté alterado en el *knockout* de *Mbnl1* apoya que MBNL1 no requiere la respuesta de CUGBP1. Es probable que MBNL1 se una al transcrito de *CIC-1* y regule su procesado. Por el momento se conocen ocho transcritos cuya regulación depende de MBNL1 aunque sólo se conoce la secuencia de unión de MBNL1 al transcrito *cTNT* (Ho et al., 2004).

5.2.2. Localización subcelular de transcritos

Se ha descrito que MBNL2 tiene un papel importante en la localización del mRNA de la *integrina $\alpha 3$* en el citoplasma de células humanas. Las integrinas son heterodímeros de subunidades α y β integradas en la membrana de las células que se localizan principalmente en adhesiones focales. Tienen un papel crucial para la unión entre células, la migración y la transducción de señales desde la matriz extracelular al interior celular. MBNL2 es una proteína citoplasmática que colocaliza parcialmente con la quinasa de adhesión focal (FAK). Una gran parte de placas que contienen FAK están marcadas positivamente para la MBNL2 y el mRNA de la *integrina $\alpha 3$* , sugiriendo que MBNL2 conduce al mRNA de la *integrina $\alpha 3$* a sitios de adhesión. Se ha identificado la secuencia específica, también llamada *zipcode* (ACACCC), que es esencial para que se localice correctamente el mRNA de la *integrina $\alpha 3$* . Se ha visto que este *zipcode* y la proteína MBNL2 constituyen una unidad funcional para la localización del mRNA y su posterior traducción (Figura 5.6) (Adereth et al., 2005).

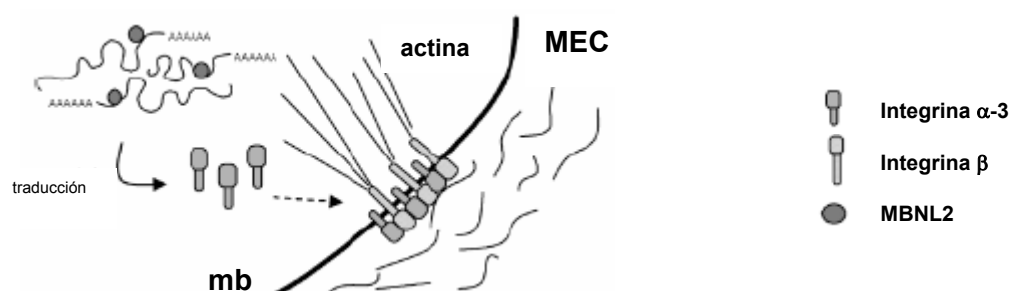


Figura 5.6. La proteína MBNL2 regula la localización subcelular de transcritos específicos. MBNL2 se une a la región 3' no traducida del transcrito de la *integrina α -3*. MEC, matriz extracelular; mb, membrana. Figura tomada de Pascual et al., 2006.

Introducción

Las dos funciones de las proteínas de la familia Muscleblind que se conocen, como factor de corte y empalme alternativo y localización subcelular de transcritos, pueden estar estrechamente relacionadas. Un ejemplo lo proporciona el gen *oskar*, ya que el procesado del primer intrón de sus transcritos determina la localización de sus RNAs en el polo posterior del oocito de *Drosophila*, lo cual es esencial para el desarrollo del embrión (Hachet y Ephrussi, 2004). De manera semejante podría ocurrir que el procesado anormal en algunos transcritos que se observa en pacientes con DM1 podría producir una localización anormal dentro de la célula contribuyendo al desarrollo de la DM1.

Esta conexión entre las proteínas Muscleblind y las integrinas no es nueva. Los mutantes de pérdida de función de *muscleblind* en *Drosophila* presentan fenotipos de ausencia de matriz tendinosa en los sitios de anclaje de algunos músculos, un proceso en que se sabe que participan las integrinas, las cuales median uniones celulares para el ensamblaje de la matriz tendinosa (revisado en Brower, 2003). Por otro lado los mutantes *muscleblind* presentan falta de bandas Z en los músculos somáticos (Artero et al., 1998), un fenotipo mutante parecido al de las integrinas α_{PS2} y β_{Ps} (Volk et al., 1990). Los fotorreceptores no diferencian rabdómeros normales en clones mutantes *muscleblind* (Begemann et al., 1997). Este fenotipo es comparable a los defectos de organización de los rabdómeros observados en mutantes para integrinas (Zusman et al., 1993). Además se observan defectos similares en la disposición de las venas de las alas o la aparición de ampollas en las alas en clones mitóticos en los que se ha eliminado genéticamente la función de integrinas o de *muscleblind* (Prokopenko et al., 2000).

5.3. Reubicación de factores de transcripción (“RNA leaching”)

Se ha descrito la reubicación de factores de transcripción desde la cromatina hacia complejos ribonucleoproteicos (RNP) (“RNA leaching”) en un modelo en cultivo celular de miocitos a partir de individuos normales y pacientes DM1 (Ebralidze et al., 2004). En este trabajo se describe que los RNAs con repeticiones CUG secuestran hasta el 90% de algunos factores de transcripción de la cromatina activa. Varios genes reducen su expresión como consecuencia de este secuestro como son Specificity protein 1 (Sp1), transductores de señal y activadores de la transcripción de la familia STAT1 y

STAT3 y el receptor gamma del ácido retinoico (RAR γ) entre otros (Ebralidze et al., 2004). Sin embargo, la relevancia de estas observaciones no está todavía clara. Se ha propuesto que esta redistribución de factores de transcripción contribuya de una manera independiente del secuestro de Muscleblind a algunos síntomas de la DM (Pascual et al., 2006). Así, el promotor del gen del *canal de cloro tipo 1 (CLC1)* contiene sitios consenso de unión para la proteína Sp1, siendo esta proteína uno de los factores de transcripción más afectados por la unión al RNA mutante (Figura 6.1 D). Por lo tanto, la disminución de Sp1 podría contribuir a la reducción de la transcripción del gen *CLC1* vista en células con DM1 que junto con la reducción en la concentración efectiva de los factores de corte y empalme MBNL, tendrían un efecto sinérgico sobre la expresión de un canal de cloro funcional en la musculatura esquelética de los pacientes con DM (Figura 6.1 C).

5.4. Otras proteínas potencialmente implicadas en el mecanismo de patogénesis de las expansiones CTG

Además de localizarse las proteínas CUG-BP1 en la base de las horquillas CUG y MBNL en las repeticiones CUG de los transcritos mutantes *DMPK*, hay estudios que sugieren que no son las únicas proteínas que quedan retenidas por estos RNA mensajeros mutantes.

En un modelo en *Drosophila* para la SCA8, enfermedad en la que también está implicada la expresión de transcritos con la expansión CUG, Staufén, Split ends y CG3249 interaccionaron genéticamente con el fenotipo ojo rugoso producido por la expresión de un transgén *UAS-SCA8(CTG)₁₁₂*. Es probable que estas proteínas se unan a las secuencias CUG expandidas *in vivo* (Figura 6.1 D) (Mutsuddi et al., 2004).

Componentes adicionales de los *foci* DM1 son las proteínas de unión a RNA, NonA (el ortólogo de PSF/p54^{nrb} de *Drosophila*) porque colocalizaron con los *foci* de RNAs CUG en un modelo en *Drosophila* que expresaba un transgén *UAS-(CTG)₁₆₂* (Figura 6.1 B) (Houseley et al., 2005), y hnRNP F y hnRNP H que colocalizaron con los *foci* nucleares de neuronas de pacientes con DM1 (Figura 6.1 D) (Jiang et al., 2004; Kim et al., 2005).

6. Un modelo integrado del mecanismo de patogénesis de la DM1

La Figura 6.1 representa un modelo integrado de la implicación de todas las proteínas que se conoce que participan en la patogénesis de la DM1 mediada por el RNA con repeticiones CUG.

Los transcritos con más de 20 repeticiones forman una estructura de doble cadena imperfecta donde las proteínas MBNL se unen específicamente reconociendo la secuencia de tipo CHG (H= A, U o C) (Kino et al., 2004). Aunque tanto las repeticiones CUG como CAG formen *foci* de RNA que colocalizan con la proteína MBNL1, sólo las repeticiones CUG alteran el procesado alternativo de los pre-mRNAs *cTNT* e *IR*, siendo dos sucesos separables la formación de *foci* de RNA y el procesado anormal de transcritos mediados por MBNL1 (Ho et al., 2005b). La separación de estos dos sucesos se ha visto apoyado por la reciente descripción de que los ratones deficientes para *Mbnl1* tienen alterado el procesado de transcritos específicos de músculo esquelético. En cambio, las proteínas MBNL2 que también son secuestradas por las expansiones CUG no alteran el procesado de transcritos en experimentos realizados en ratones deficientes para el gen *Mbnl2* (Lin et al., 2006). Estos datos apoyan que *MBNL2* más bien es responsable de la localización citoplasmática de los transcritos para su correcta traducción que de su procesado (Adereth et al., 2005). Por lo tanto las proteínas MBNL1 juegan un papel importante en la regulación de transcritos específicos junto con la proteína CUG-BP1 provocando una serie de síntomas específicos (Figura 6.1 C).

En un modelo de DM1 en *Drosophila* se observó que NonA colocaliza con los *foci* ribonucleares (Houseley et al., 2005). Esta proteína tiene en mamíferos los ortólogos PSF y p54^{nrb} que se asocian con la matriz 3 y median la unión de RNAs de doble cadena a la matriz nuclear (Figura 6.1 B) (Zhang y Carmichael, 2001). Este hecho proporciona una potencial unión física entre los RNA expandidos con repeticiones CUG y una red proteica nuclear inmóvil, la matriz nuclear.

Recientemente se ha hipotetizado que las horquillas CUG podrían ser una fuente de microRNAs y/o RNAs pequeños interferentes que silenciarían los genes que contuvieran repeticiones CTG siendo *MBNL1* uno de ellos (Figura 6.1 E), (véase *Apartado 8 de Introducción*) (Malinina, 2005).

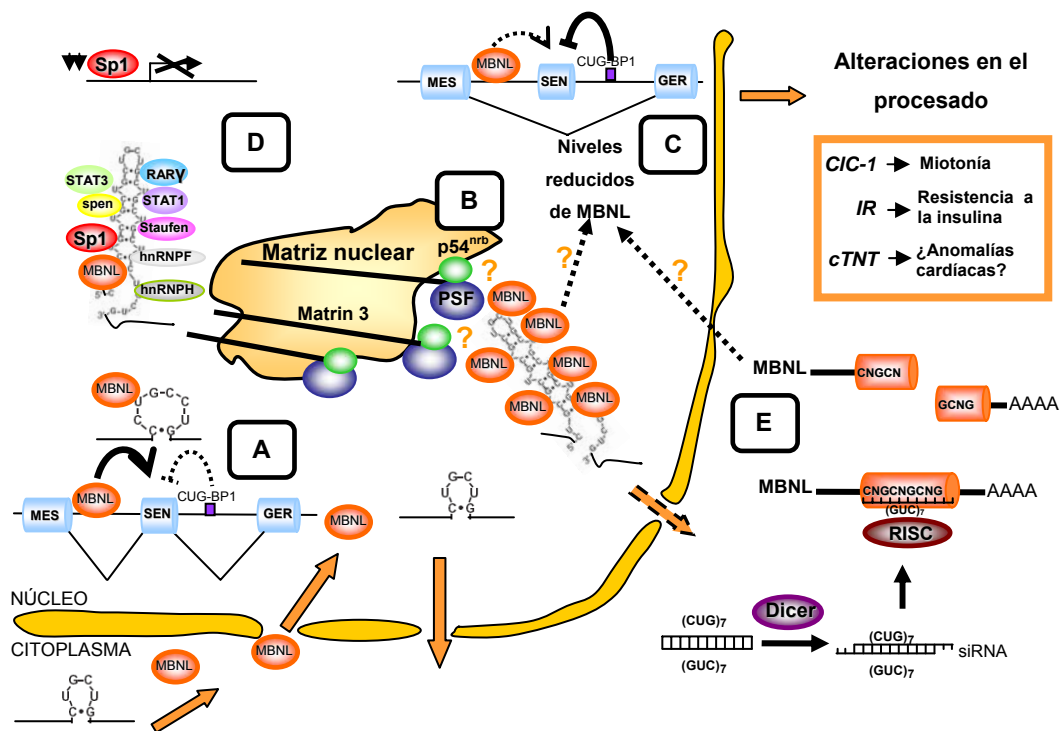


Figura 6.1. Modelo integrado de las proteínas implicadas en la patogénesis mediada por RNAs CUG. (A) MBNL1 y CUG-BP1 regulan el procesamiento alternativo en DM1 por unión a sitios específicos dentro de determinados pre-mRNA. (B) Los transcritos de más de 20 repeticiones forman una estructura de doble cadena imperfecta donde la proteína MBNL1 se une específicamente (Kino et al., 2004). Estos transcritos *DMPK* mutantes probablemente quedan retenidos en el núcleo a través de las proteínas PSF y p54^{nrb} que se asocian con la matrin 3 y median la unión de los RNA de doble cadena a la matriz nuclear (Zhang y Carmichael, 2001). (C) El secuestro de MBNL1 y el aumento de proteínas CUG-BP conducen a un procesamiento alterado en los transcritos diana *cTNT*, *IR* y *CLC1* (Ho et al., 2004; Kanadia et al., 2003a). (D) Se ha estudiado la composición de los focos ribonucleares y además de secuestrar MBNL también colocalizan otros factores nucleares y factores de transcripción específicos como la proteína Sp1 que tiene como diana transcripcional la expresión del gen *canal de cloro*. (E) Las horquillas CUG pueden ser una fuente de micro RNAs y/o RNAs pequeños interferentes que silenciarían los genes que contienen las repeticiones CUG como, por ejemplo, *MBNL1* (Malinina, 2005). Figura modificada de Pascual et al., 2006.

El secuestro de las proteínas MBNL por parte de transcritos mutantes portadores de expansiones de repeticiones ofrece un mecanismo de patogénesis común para distintas enfermedades:

En pacientes con FXTAS se ha detectado a MBNL1 en las inclusiones intranucleares ubiquitin-positivas de las células astrogiales (Iwahashi et al., 2006). Este hallazgo sugiere que existe un posible paralelismo entre ambas enfermedades.

Introducción

Origina la posibilidad de que los niveles alterados de MBNL1 o de otras proteínas encontradas en las inclusiones contribuyan a las alteraciones típicas del SNC de FXTAS y de DM1.

Evidencias genéticas en *Drosophila* implican a las proteínas Muscleblind en la *Ataxia Spinocerebellar* tipo 8 (SCA8), una enfermedad dominante causada por la expansión de la repetición CUG en transcritos SCA8 no codificantes. Se detectó a un mutante por pérdida de función de *muscleblind* como un potenciador dominante del fenotipo ojo rugoso producido por la expresión del transgén SCA8 en la retina (Mutsuddi et al., 2004).

Así pues, las proteínas Muscleblind probablemente sean relevantes en todas las patologías humanas causadas por expansiones de repeticiones no codificantes del tipo CHHG o CHG (H= A, U, C), si solapan sus patrones de expresión, a las cuales se sabe que se unen aberrantemente en un ensayo de tres híbridos en levaduras (Kino et al., 2004), ofreciendo de este modo una diana común para terapias potenciales en las distintas rutas de patogénesis de estas enfermedades.

7. Genes humanos *MBNL* e isoformas de *muscleblind* de *Drosophila*

7.1. Genes humanos *MBNL*

En la descripción inicial del gen *muscleblind* de *Drosophila*, se indicó la existencia de genes homólogos en *C.elegans* y en vertebrados (Begemann et al., 1997). Como hemos comentado, en humanos se han descrito tres genes *muscleblind-like* (genéricamente *MBNL*). La característica estructural definitoria de las proteínas Muscleblind tanto en *Drosophila* como en humanos es la presencia de, al menos, un dedo de zinc del tipo Cys₃His. Este motivo proteico, también nombrado como CCCH, consiste en tres residuos de cisteína y uno de histidina con un espaciado entre los residuos característico y se identificó originariamente en la familia de proteínas TIS11/NUP475/TTP (Gomperts et al., 1990). Los miembros de esta familia juegan un papel relevante en distintos aspectos del metabolismo del RNA, como es la transcripción, la estabilidad de los mensajeros y el procesado para *MBNL1* tal y como hemos tratado anteriormente.

El gen *MBNL1* se localiza en el cromosoma 3q25, el gen *MBNL2* en 13q31 y el gen *MBNL3* en Xp25. Los tres *loci* se extienden varias kilobases sobrepasando las 100 kb en el caso de *MBNL1* y *MBNL2*. El análisis de los ESTs y cDNAs disponibles en las bases públicas muestra que los tres genes humanos están sujetos a un complejo patrón de procesamiento alternativo que afecta principalmente a los exones del extremo 3' de cada uno de los *loci*. Actualmente, existen nueve mensajeros completos secuenciados para *MBNL1*, tres para *MBNL2* y cuatro para *MBNL3* que representan diferentes isoformas proteicas. Las funciones descritas para cada uno de los genes humanos se han comentado en el *Apartado 5.2 de Introducción*.

7.2. Corte y empalme alternativo en *muscleblind*

El análisis de la unidad de transcripción *muscleblind* en *Drosophila* revela una organización genómica compleja (Figura 7.1) (Artero et al., 1998; Begemann et al., 1997). Se han descrito 10 exones distribuidos a lo largo de 110 kb de DNA genómico. El tamaño de los exones oscila entre 42 y 2181 pb. Destaca la presencia de uno de los intrones más grandes descritos en el genoma de *Drosophila* que abarca 75 kb (García-Casado, 2002). El transcrito *muscleblind* primario sigue un patrón de maduración complejo, dando lugar al menos a cuatro mRNAs por procesamiento alternativo. Estos cuatro mRNAs, denominados *mbIA*, *mbIB*, *mbIC* y *mbID* comparten la secuencia 5'-UTR y los primeros dos exones (incluyendo el ATG y el extremo N-terminal de las proteínas codificadas) pero se diferencian en sus porciones 3' dando lugar a cuatro ORFs de diferentes longitudes que codifican para proteínas con distintos extremos C-terminales. Los transcritos *mbIA*, *mbIB* y *mbIC* contienen tres ORFs de 203, 316 y 243 aminoácidos respectivamente, y comparten los primeros 179 residuos N-terminales (Figura 7.1). El transcrito representado por *mbID* también contiene una ORF que comparte los primeros 63 aminoácidos con las otras isoformas de Muscleblind, pero debido al uso del exón 3, el cual contiene codones de parada, sólo codifica para un pequeño péptido de 84 aminoácidos. Las isoformas MbIA, MbIB y MbIC contienen dos copias del dedo de zinc tipo Cys3His. Un motivo muy semejante se encuentra en las proteínas Tristetrapolin de ratón (TTP, también conocidas como TIS11 y NUP475) y *pharynx and intestine in excess protein 1* (PIE-1) en *C. elegans*. La isoforma corta, MbID, sólo contiene un dedo de zinc completo por lo que su función podría ser reguladora, actuando como una forma dominante negativa que es capaz de interactuar con las dianas normales de Muscleblind pero de una forma improductiva.

Introducción

El patrón de expresión de *muscleblind* en embrión se detecta en el ectodermo y mesodermo pero se desconoce la expresión específica de cada variante proteica. La expresión en el ectodermo está restringida en el SNC a un grupo repetido de células y órgano de *Bolwig* que contiene los fotorreceptores larvarios. La expresión mesodérmica se detecta en la musculatura somática, visceral, faríngea así como en la musculatura que sirve de sostén para el corazón (*alary muscles*).

Un perfil de expresión mediante PCR semicuantitativa para cada una de las cuatro isoformas retrotranscritas (RT-PCR), indica que la expresión de las isoformas de *muscleblind* está regulada a lo largo del desarrollo. Los transcritos *mbIC* son los más ampliamente expresados desde embriones tempranos hasta moscas adultas (Vicente et al., 2007).

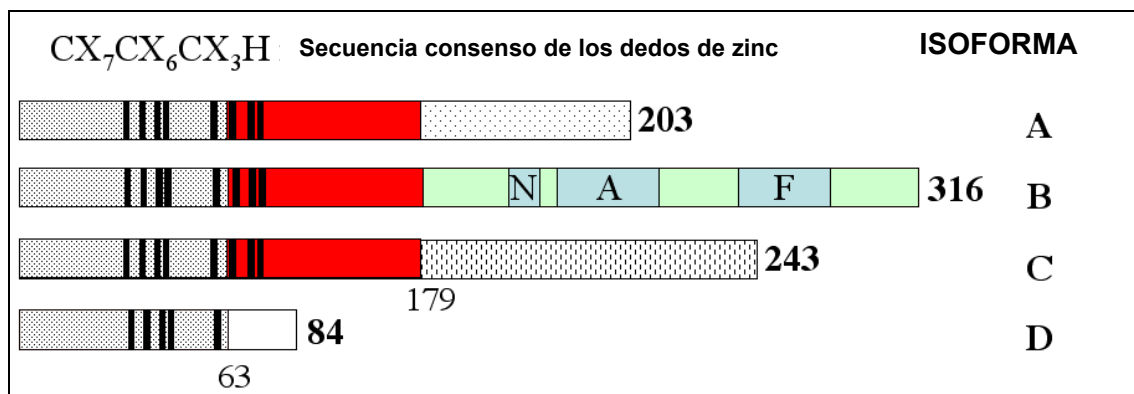
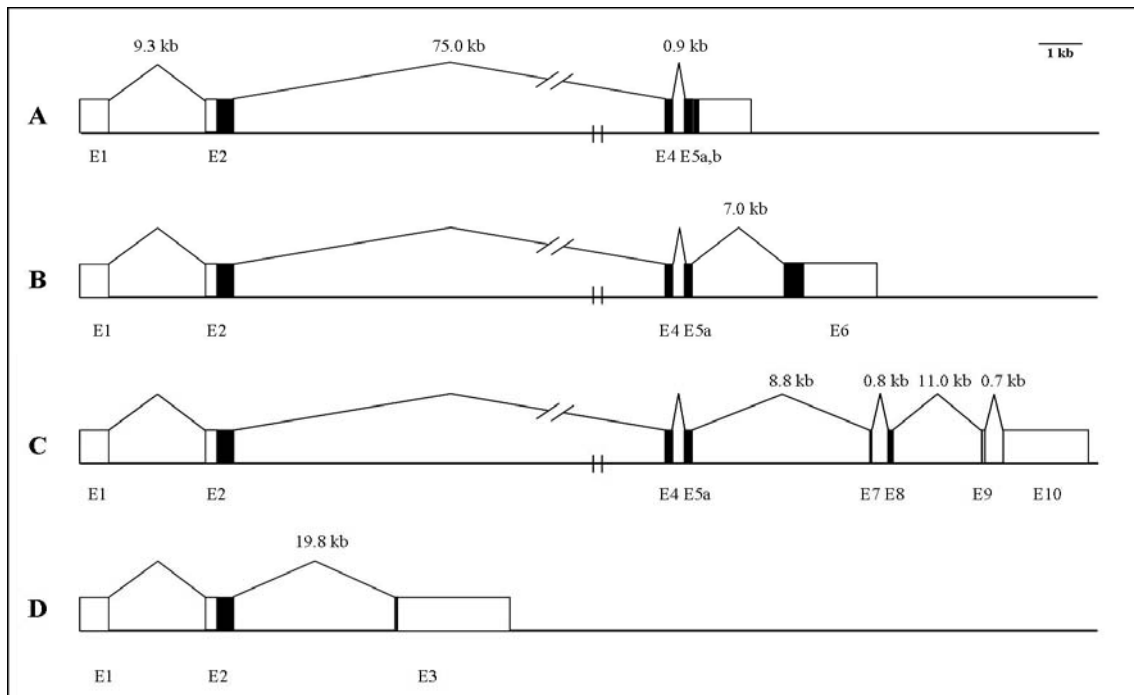


Figura 7.1. Estructura del gen *muscleblind* de *Drosophila* y las isoformas proteicas generadas por corte y empalme alternativo. En el panel superior se muestra la estructura de cada una de las variantes de procesado (*mbIA-D*). La línea horizontal indica la extensión del DNA genómico. Las cajas denotan exones y las líneas que las unen intrones. En negro, región codificante. Figura dibujada a escala excepto los intrones (barritas verticales). Figura tomada de Begemann et al., 1997 y modificada por García-Casado, 2002. En el panel inferior se muestran las cuatro isoformas proteicas. Las regiones comunes se indican con la misma trama y los dedos de zinc con cuatro líneas verticales (indicadoras de los residuos CCCH conservados). MblB contiene tres regiones de baja complejidad ricas en glutamina (N), alanina (A) y fenilalanina (F).

7.3. Comparación entre los genes *muscleblind* de *Drosophila* y humanos

Las proteínas Muscleblind constituyen una nueva familia de proteínas CCCH. En protóstomos, existe un solo gen *muscleblind* y éste se caracteriza por poseer dos dedos de zinc del tipo CX₇CX₆CX₃H. En deuteróstomos existen tres genes *muscleblind* y se caracterizan por tener cuatro dedos de zinc siendo el primero y tercero idénticos al de protóstomos y el segundo y cuarto del tipo CX₇CX₄CX₃H (Pascual et al., 2006).

El mayor porcentaje de identidad nucleotídica se da entre los cDNAs de los genes *MBNL1* y *MBNL3* con un 57% siendo el menor entre *MBNL2* y *MBNL3* con un 41% (mejor alineamiento global entre las secuencia de nucleótidos de las regiones codificantes). Respecto a los cDNAs de *muscleblind* en *Drosophila*, la mayor identidad nucleotídica se da entre la región codificante de la isoforma *mbIC* y el gen humano *MBNL2* con un 50%. La mayor identidad de secuencia entre las proteínas Muscleblind humanas se da entre la proteína *MBNL1* y *MBNL2* con un 77% siendo la menor entre la proteína *MBNL1* y *MBNL3* con un 68%. Respecto a *Drosophila*, todas las proteínas humanas tienen porcentajes de identidad similares; el mayor de ellos es entre *MBNL1* y la isoforma *MblB* con un 33% de identidad y un 42% de similaridad (Figura 7.2)

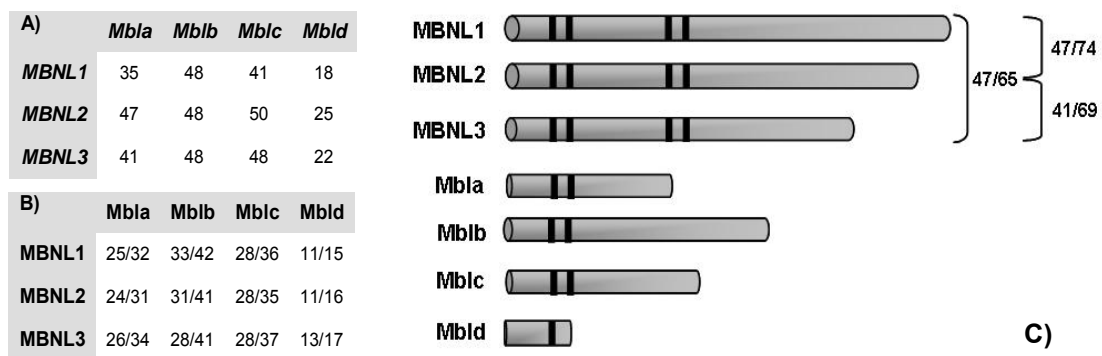


Figura 7.2. Comparaciones de secuencia entre *muscleblind* y *MBNL1-3*. (A) Se indica el porcentaje de identidad nucleotídica entre las regiones codificantes de los cDNAs de *muscleblindA-D* y de *MBNL1* (AJ308400), *MBNL2* (AF061261) y *MBNL3* (AK002178). (B) Se indica el porcentaje de identidad/similaridad entre las proteínas *MBNL1-3* y las isoformas de *Muscleblind*. *MBNL1-3* tienen, respecto a las distintas isoformas de *muscleblind*, porcentajes de identidad similares tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos. La isoforma de *mbI* que presenta una identidad tanto nucleotídica como aminoacídica más alta con los tres genes humanos es *mbIB*. (C) Las proteínas *MBNL1-3* poseen cuatro dedos de zinc (barras negras) mientras que *Mbl* de *Drosophila* contiene sólo dos. Se indica el porcentaje de identidad de secuencia entre los cDNA y las respectivas proteínas de *MBNL1-3*. Figura tomada de Pascual M. 2005.

8. Estructura de las expansiones CUG y su posible implicación en el silenciamiento de *MBNL*

Se ha cristalizado y obtenido la estructura tridimensional de las horquillas de doble cadena CUG mediante rayos X. La estructura de la hélice formada por las CUG es muy similar al RNA de estructura tipo A con la única excepción de las bases U-U desparejadas (Mooers et al., 2005). Estas bases U-U proporcionan a la molécula una zona electronegativa en el surco menor que está expuesta al agua. El surco menor muestra un patrón repetido de potenciales electrostáticos positivos y negativos distintos al patrón de potencial electrostático encontrado en el surco menor de un RNA de doble cadena sin bases U-U desparejadas (Figura 8.1). Este característico patrón electrostático se ha propuesto que podría proporcionar un sitio de unión específico para las proteínas Muscblind. Las proteínas MBNL podrían reconocer directamente las bases U-U a través del surco menor porque el mayor es relativamente inaccesible.

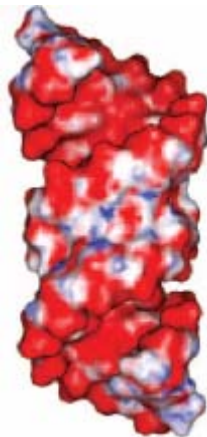


Figura 8.1. Superficie electrostática de (CUG)₆. El surco menor muestra un patrón repetido de potenciales electrostáticos positivos (**azul**) y negativos (**rojo**). El surco mayor tiene un potencial electrostático negativo más bien homogéneo. Figura tomada de Mooers et al., 2005.

Se ha sugerido que las repeticiones CUG, las cuales adoptan una estructura muy similar al A-RNA *in vivo*, podrían ser dianas de la maquinaria del RNA de interferencia (RNAi) generando RNAs pequeños interferentes o micro RNAs que degradarían o bloquearían la traducción de transcritos con secuencias similares (Malinina, 2005). Dado que las proteínas MBNL1 contienen una región rica en alaninas codificada en el mRNA por codones del tipo (GCN)₇, y que estos son parcialmente complementarios con la secuencia (CUG)_n de las repeticiones (excepto para cuatro uracilos), la maquinaria de interferencia de RNA podría reconocer y degradar los transcritos *MBNL1* contribuyendo a silenciar la expresión del gen *MBNL1* (Figura 6.1

E) (Malinina, 2005). Este proceso actuaría sinérgicamente con la reducción en la concentración efectiva de MBLN debido al secuestro por unión a las expansiones CUG, de una manera semejante a como el secuestro de Sp1 puede contribuir a reducir la expresión efectiva de *CIC1*.

9. Inestabilidad y expansión de las repeticiones CTG

Las enfermedades debidas a expansiones de microsatélites presentan anticipación genética (Harper et al., 1992). El incremento en el número de repeticiones inestables CTG es más probable que ocurra durante las divisiones mitóticas embrionarias en la formación de los tejidos somáticos durante el desarrollo embrionario y en la línea germinal femenina, y en las divisiones mitóticas en adultos en la línea germinal masculina (Jansen et al., 1994).

9.1. Inestabilidad en la línea germinal

Dentro de la línea germinal masculina el mayor grado de inestabilidad se da durante la espermatogénesis encontrándose ejemplos en los que se detectan más repeticiones en los espermatozoides de los padres que en las células sanguíneas de sus descendientes (De Temmerman et al., 2004). Las expansiones pequeñas, incluso no patogénicas como son entre 19 y 37 repeticiones, tienden a ser más inestables cuando se transmiten vía paterna. Algunos autores proponen que esta transmisión paterna de pequeños incrementos en la longitud del microsatélite permite la máxima diseminación de futuros alelos mutantes de la enfermedad y por eso se mantiene en la población la mutación DM1 (Dean et al., 2006). En cambio, expansiones largas como las vistas en pacientes con DM1 congénita son transmitidas por la madre afectada y ya han sido expandidas en los oocitos antes de la fecundación, de modo que la expansión inicial de las CTG ocurre antes de acabar la segunda meiosis de la ovogénesis (De Temmerman et al., 2004). En conclusión, el comportamiento del alelo *DMPK (CTG)_n* es diferente cuando se transmite vía materna o paterna (Dean et al., 2006).

9.2. Inestabilidad en células somáticas

Además de ocurrir cambios intergeneracionales de la longitud de los microsatélites inestables CTG, ocurren incrementos en el tamaño del microsatélite en las células

somáticas durante toda la vida del individuo (Jansen et al., 1994). Esta inestabilidad somática se refiere a que los pacientes muestran diferente número de repeticiones en sus células. Se ha medido un incremento de unas 50-80 repeticiones por año (Monckton et al., 1995; Martorell et al., 1998). El primer suceso de inestabilidad somática ocurre alrededor de la décima semana de gestación y luego esta inestabilidad continúa durante la vida del adulto aunque no es tan fuerte como el primer suceso. Este hecho explica que la longitud de las repeticiones en pacientes se vea incrementada con la edad así como la progresión de los síntomas. Diversos estudios han mostrado que hay una importante inestabilidad de repeticiones CTG en DM1 en un amplio rango de tejidos, como son el sistema linfático, hígado, páncreas, riñón, cerebro y corazón entre otros (Jansen et al., 1994; Lavedan et al., 1993; Shelbourne et al., 1992; Kinoshita et al., 1996). El músculo esquelético es el principal tejido afectado en DM1 presentando unas 1000 o 2000 repeticiones más que en los leucocitos del mismo paciente (Thornton et al., 1994). Un alto grado de inestabilidad en músculo de pacientes con DM1 contrasta con el músculo que muestra muy baja inestabilidad en pacientes con Huntington. Por lo tanto estas variaciones en el patrón de inestabilidad de repeticiones indican que intervienen factores en *trans* específicos de tejido o de célula y elementos en *cis* específicos de gen (revisado en Pearson et al., 2005).

9.3. Factores que afectan a la inestabilidad

Los elementos en *cis* que pueden afectar a la inestabilidad de las CUG pueden ser internos y externos. Entre los internos encontramos la secuencia de la repetición, su longitud (34 repeticiones es el umbral de inestabilidad) y pureza, es decir la existencia de interrupciones en las repeticiones las cuales pueden alterar significativamente este proceso. Entre los externos encontramos la secuencia flanqueante, la disposición de los nucleosomas, la metilación de islotes CpG y el origen de la replicación (revisado en Cleary y Pearson, 2003). Así, secuencias idénticas de microsatélites pueden mostrar diferente grado de inestabilidad en diferentes *loci* y la regulación de la metilación CpG a través de la exposición de inhibidores de la metilación, afecta directa o indirectamente a la inestabilidad de las CTG, (véase *Apartado 2 de Introducción*) (revisado en Pearson et al., 2005).

Los elementos en *cis* internos están intrínsecamente relacionados con las estructuras secundarias que pueden formar las expansiones, las cuales son

Introducción

necesarias para el mecanismo de expansión de las mismas. Estas estructuras contienen varios pares de bases no emparejadas pero son tan estables como las estructuras perfectas (Figura 9.1) (revisado en Mirkin, 2006).

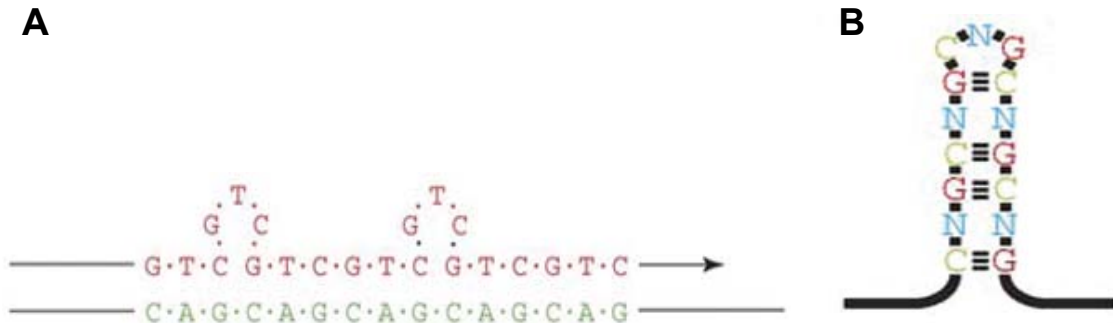


Figura 9.1. Formación de estructuras secundarias de DNA por repeticiones (CTG)_n. (A) El deslizamiento de la DNA polimerasa durante la replicación produce estructuras inusuales en la hebra de DNA recién sintetizada. (B) Se muestra una horquilla imperfecta compuesta por repeticiones (CNG)_n. Imagen procedente de la revisión de Mirkin, 2006.

El principal suceso que provoca la formación de estas estructuras de DNA inusuales en el DNA genómico es cuando se separan por completo las dos hebras de DNA durante la **replicación**. Durante la progresión de la horquilla de replicación, una porción de la hebra molde retrasada, llamada la zona de inicio de *Okazaki*, permanece temporalmente como cadena sencilla para asegurar la síntesis coordinada de las dos hebras de DNA, la líder y la retrasada. Según un modelo inicial las expansiones se contraen o expanden en función de que las repeticiones CTG se localicen respectivamente en la cadena molde de la cadena retrasada o en la cadena retrasada misma (Figura 9.2). Sin embargo, distintas observaciones sugieren que la formación de una estructura secundaria estable en la cadena retrasada en síntesis que explique la expansión de los microsatélites está asociada con el bloqueo de la horquilla de replicación en la posición del microsatélite y la posterior reanudación de la síntesis.

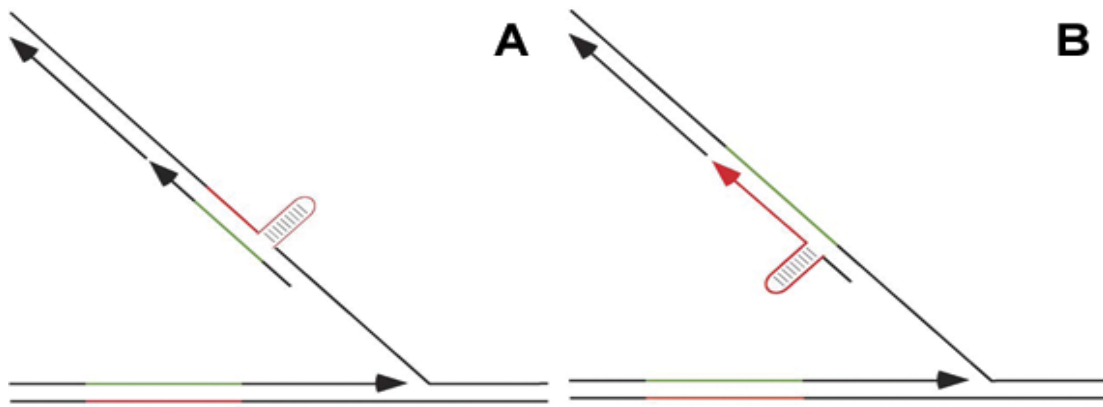


Figura 9.2. Modelo de la hebra retrasada de la expansión de las repeticiones. (A) Las repeticiones expansibles pueden plegarse en estructuras secundarias inusuales cuando se va sintetizando la hebra retrasada, en este caso las repeticiones frecuentemente se contraen. (B) Cuando las repeticiones (CTG)_n están en la hebra nueva retrasada se detectan expansiones. La zona de las repeticiones se representa de color rojo y su complementaria en verde. Figuras procedentes de la revisión de Mirkin, 2006.

Este modelo se basa en el atasco de la horquilla de replicación y su reanudación cuando replica la región con repeticiones. Cuando la DNA polimerasa está en la hebra líder y pasa por una zona de repeticiones potencialmente expansibles, parte de la hebra molde para la cadena retrasada es exclusivamente repetitiva y puede originar en esta hebra un plegamiento en una estructura secundaria estable (Figura 9.3 B). Este plegamiento bloquea a la DNA polimerasa de la hebra retrasada y como la síntesis de la hebra líder y retrasada están coordinadas, la horquilla de replicación se suelta y salta el obstáculo de dos maneras. Primero, la replicación continúa saltándose un fragmento de *Okazaki*, dejando un hueco en la hebra recién sintetizada alrededor de la repetición (Figura 9.3 C). Después de rellenar el hueco se produciría una contracción si la polimerasa de la hebra retrasada salta la región que contiene la estructura secundaria de su molde (Figura 9.3 D). Segundo, el atasco de la replicación puede producir en la horquilla un cambio de rumbo. Esta horquilla bloqueada por la repetición expansible produce la formación de una bifurcación de cuatro caminos seguido por la extensión de repeticiones en el extremo 3' de la hebra líder (Figura 9.3 E). Esta hebra sencilla con una cola repetitiva se pliega en una estructura secundaria (Figura 9.3 F). Para reanudar la replicación, esta horquilla vuelve atrás y si la estructura repetitiva se mantiene, las repeticiones extra se añadirán a la hebra líder (Figura 9.3 G).

Introducción

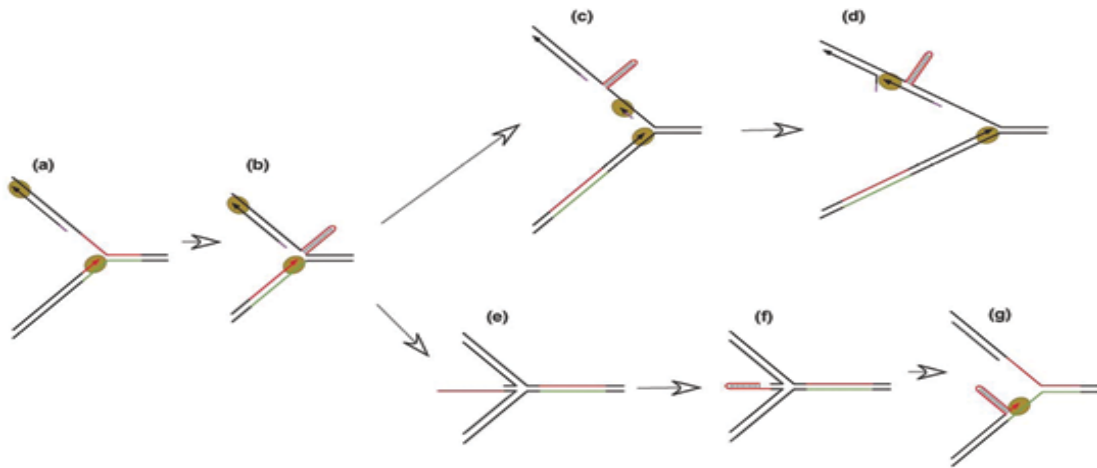


Figura 9.3. Modelo de la inestabilidad de las repeticiones generada durante el atasco y la reanudación de la horquilla de replicación. (A) Entrada de la DNA polimerasa a la zona de repeticiones de la hebra líder. (B) Formación de una estructura inusual en la hebra molde retrasada y atasco de la polimerasa de la hebra retrasada. (C) Continuación de la replicación en el fragmento de *Okazaki*. (D) Contracción de la expansión debido al salto de la polimerasa de la hebra retrasada en la zona de la estructura secundaria de su hebra molde. (E) Generación de una horquilla formando una estructura como una pata de gallina con una hebra sencilla y repetitiva extendiéndose en el extremo 3'. (F) La zona extendida y repetitiva se pliega formando una horquilla. (G) Se reanuda la replicación retrocediendo las expansiones de repeticiones de la hebra líder. La hebra propensa a formar estructuras está marcada en rojo, su complementaria en verde. Los círculos dorados representan las DNA polimerasas. Representación procedente de la revisión de Mirkin, 2006.

El modelo anterior explica bien la inestabilidad de algunos microsatélites en células en proliferación, pero no en tejidos fundamentalmente postmitóticos tales como el músculo esquelético y cardíaco o el cerebro de pacientes con DM en los que también se detectan expansiones de repeticiones CTG (Thornton et al., 1994; Kennedy et al., 2003). Radicales libres de oxígeno u otros agentes ambientales pueden generar mellas o huecos dentro de regiones repetitivas (Figura 9.4). En estos tejidos podrían ser los sistemas de reparación de lesiones del DNA los responsables de la inestabilidad de las repeticiones. En el proceso de la síntesis de DNA para reparar el hueco, la hebra de DNA no molde puede desplazarse formando una lengüeta. Esta lengüeta normalmente se eliminará por la endonucleasa FEN-1, la cual se une en el extremo 5', migra hasta su unión con la doble cadena de DNA y parte la lengüeta. Si esta lengüeta contiene la secuencia repetitiva, puede plegarse en una estructura en horquilla inhibiendo la unión de FEN-1. Una vez acabada la síntesis de reparación del DNA, se forman las hebras intermedias estables (Gordenin et al., 1997).

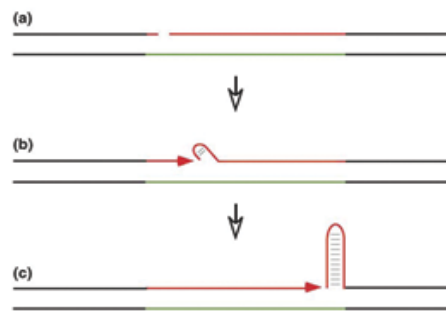


Figura 9.4. Modelo de expansión de repeticiones en células que no se dividen. (A) Radicales libres generan unas pequeñas mellas en la hebra. (B) FEN-1 no se puede unir a la estructura en forma de lengüeta generada durante la reparación del DNA. (C) Se forman hebras deslizadas de DNA estables una vez finalizada la síntesis de DNA. En rojo se representa la hebra con tendencia a formar la estructura, su hebra complementaria se muestra en verde. Representación procedente de la revisión de Mirkin, 2006.

En resumen, estas estructuras que aparentemente desconciertan a la maquinaria de los principales procesos genéticos como son la replicación del DNA y la reparación, conducen a la inestabilidad de los microsatélites (CTG)_n a partir de un umbral.

10. Estrategias Terapéuticas

La inestabilidad de las repeticiones es la característica común de más de 40 enfermedades neurológicas, neurodegenerativas y neuromusculares. Por lo tanto es evidente que el fenómeno de expansión de repeticiones tiene unas amplias implicaciones biológicas y médicas. La formación de estructuras inusuales por DNA repetitivo parece ser la clave de todos los procesos. Todavía no hay tratamientos efectivos para la DM. Los sucesos moleculares que producen la expansión son muy complejos y el escaso conocimiento de dianas aguas abajo de la cascada patogénica, aún no han permitido el desarrollo de estrategias terapéuticas exitosas, pero se barajan al menos dos estrategias potencialmente terapéuticas.

10.1. Uso de inhibidores del mecanismo de inestabilidad somática de las repeticiones

Un tipo de estrategia que tenga como diana la mutación a nivel de DNA *per se* ha sido motivo de numerosos estudios. Se han descrito algunos modelos que reducen la tasa

Introducción

de expansión somática como medida terapéutica. La introducción de alelos nulos del gen *Msh2* suprime la expansión somática en el *striatum* de un ratón con Huntington (Wheeler et al., 2003) y en ratones con expansiones CTG y heterocigotos para *Msh3* muestran que este alelo es suficiente para que disminuya la tasa de expansión (Foiry et al., 2006).

Hay estrategias que apuntan a interferir con la ruta de expansión expresando proteínas que median las delecciones o alelos dominantes negativos que interfieren con expansiones. Los modificadores químicos que actúan en *trans* también podrían afectar a las tasas de expansión de repeticiones. De modo que el desarrollo de estrategias terapéuticas apunta a suprimir las expansiones somáticas mediante pequeñas moléculas que modifiquen la tasa de expansión. Algunas de estas drogas pueden afectar la integridad genómica e inducir mutaciones en los genes *Msh3* disminuyendo el tamaño del microsatélite, pero es extremadamente baja la frecuencia de este tipo de mutaciones para modificar las expansiones en una alta proporción de células capaces de tener la eficacia clínica necesaria. Hay algunas drogas como la citosina arabinosida, bromuro de etidio, peróxido de hidrógeno, aspirina y 5-azacitidina que disminuyen la tasa de expansión somática de las repeticiones CTG en cultivo celular. Estos resultados, aunque esperanzadores, se presentan por el momento inviables porque algunos de estos compuestos son altamente genotóxicos e inducen mutaciones en los individuos que pueden transmitirse de una generación a la siguiente (Gomes-Pereira y Monckton, 2004).

Se han demostrado efectos potencialmente terapéuticos al eliminar la región de repeticiones expandida en el extremo 3' del transcrito *DMPK in vitro* e *in vivo* mediante la utilización de ribozimas (Phylactou et al., 1998). Además se ha utilizado el RNAi contra el alelo *DMPK* mutado en células DM1 para silenciar el gen a nivel post-transcripcional (Langlois et al., 2005).

10.2. Uso de inhibidores de efectos aguas abajo

Otro tipo de estrategia terapéutica podría ser el tratamiento dirigido a compensar efectos aguas abajo de la expansión, los cuales serían más específicos de cada enfermedad. Se utilizan los tratamientos con drogas para aliviar los síntomas pero éstos sólo son paliativos ya que las enfermedades debidas a expansiones son de naturaleza degenerativa. Aunque recientemente se ha descrito que en las enfermedades debidas al mecanismo del RNA dominante como es el caso de la DM

muchos de los síntomas reflejan más bien un déficit en la función que una degeneración celular, siendo por lo tanto reversibles algunos de los síntomas. En moscas y ratones transgénicos que expresan CUG, la expresión de *MBNL1* previene la degeneración muscular (Haro et al., 2006) y revierte el procesado erróneo de transcritos y la miotonía desarrollada (Kanadia et al., 2006), respectivamente.

Uno de los tratamientos en la DM1 se ha centrado en paliar los síntomas de la miotonía. No se ha encontrado ningún compuesto capaz de compensar la falta de la conductancia al cloro. Algunos compuestos como el mexilitil, quinidina, fenitoína, procainamida o carbamazepina, que inhiben la entrada de sodio necesario para el inicio y conducción de impulsos, se administran en la actualidad a los pacientes con el fin de paliar este síntoma. No obstante, los efectos secundarios que presentan cuestionan la mejora en la calidad de vida de los enfermos, ya que disminuyen la fuerza muscular, y es precisamente la debilidad muscular la causa principal de minusvalía de estos pacientes. Otro inhibidor de canales de sodio es el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), se ha ensayado en pacientes en los que parece disminuir con éxito la miotonía sin aumentar la debilidad muscular (Nakazora y Kurihara, 2005). Sin embargo, debido a que su uso como terapia para la DM1 es relativamente reciente, todavía están por confirmar sus efectos a largo plazo.

Otro tipo de tratamiento se ha centrado en paliar los efectos de la degeneración muscular. En algunos casos se administra Creatinina junto con DHEAS para tratar este síntoma, aunque la respuesta suele ser pobre o nula. Otros fármacos probados en pacientes engloban antidepresivos tricíclicos, benzodiazepinas, antagonistas del ión calcio, taurina o prednisona lamentablemente con resultados contradictorios (revisado en Trip J Fau - Drost et al., 2006).

Con todo esto, y pese a los múltiples esfuerzos, no existe en la actualidad una terapia eficaz con la que combatir la Distrofia Miotónica.

11. Modelos para estudiar la toxicidad de los RNAs con expansiones largas de CUGs en DM1.

Dada la evidente limitación que existe con la experimentación en humanos se han ido generando durante décadas organismos modelo para descubrir mecanismos moleculares y celulares básicos afectados en DM1. La aplicación del análisis genético

Introducción

en organismos modelo proporciona una herramienta poderosa y económica para esclarecer la ruta de patogénesis de las enfermedades humanas. Además de permitir la búsqueda de compuestos activos potencialmente terapéuticos debido a sus características semejantes a humanos de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET) de una molécula capaz de suprimir el proceso celular alterado.

Para abordar la DM1 se han generado una serie de modelos murinos y de *Drosophila* que expresan expansiones largas de CUGs para estudiar su toxicidad.

11.1. Modelos murinos

Modelo de Mankodi y colaboradores, 2000: se trata de un ratón transgénico que expresa 250 repeticiones CTG insertadas en la región 3'-UTR de la α -actinina muscular. Este ratón expresa la expansión en el músculo esquelético por la activación del promotor del gen de la *actina esquelética humana* (HSA). El RNA se localiza en *foci* nucleares y además muestra varias características vistas en músculo esquelético con DM, tales como la miotonía, histopatologías como las masas sarcoplásmicas, cambios en la localización del núcleo de las miofibras y fibras anilladas (Figura 11.1) (Mankodi et al., 2000) (Tabla 11.1A).

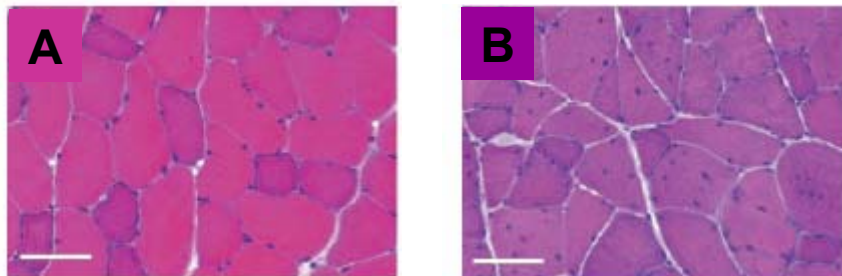


Figura 11.1. Núcleos centrales y variabilidad en el tamaño de las fibras musculares de ratones con DM1. Se muestra una sección transversal del músculo vasto teñida con hematoxilina y eosina. (A) Ratón control y (B) ratón que expresa RNAs con 250 repeticiones CUG. Se observa los núcleos centrales y la variabilidad en el tamaño de las fibras. Imagen procedente de Mankodi et al., 2000.

Modelo de Seznec y colaboradores, 2001: el ratón transgénico contiene un fragmento de 45 kb de DNA genómico con 300 repeticiones CTG que incluye el gen *DMPK*. Las repeticiones se expresan dentro de su contexto natural dirigiéndose la expresión por el promotor *DMPK*. Estos ratones muestran miotonía, anomalías histológicas en el músculo esquelético y alteraciones en la expresión de las isoformas

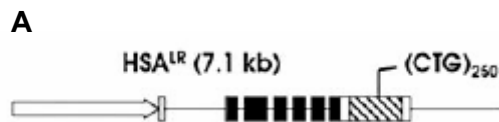
de Tau en el cerebro de modo similar a como se ha observado en pacientes con DM1 (Seznec et al., 2001) (Tabla 11.1B).

11.2. Modelos invertebrados (*Drosophila*)

Modelo de Houseley y colaboradores, 2005: se trata de moscas transgénicas que expresan la región 3'-UTR del gen *DMPK* con una expansión de 162 repeticiones CTG fusionada al gen reportero GFP. Se detectan *foci* ribonucleares de transcritos CUG en los cuales colocalizan las proteínas Muscleblind de *Drosophila* en células musculares. Los *foci* ribonucleares no se observan en todos los tipos celulares y *muscleblind* no es ni necesario ni suficiente para su formación. La expresión de las 162 repeticiones CUG no muestran fenotipos patológicos, sugiriendo que ni los RNAs portadores de (CUG)₁₆₂ ni los *foci* ribonucleares son directamente tóxicos (Houseley et al., 2005) (Tabla 11.1C).

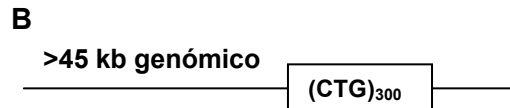
Modelo de Haro y colaboradores, 2006: se trata de moscas transgénicas que expresan 480 repeticiones CTG interrumpidas bajo el control del sistema *GAL4/UAS*. Se detectan *foci* ribonucleares en los que colocaliza MBNL1. Se produce una desorganización y fusión de los omatidios, una pérdida de la estructura de las fibras musculares y la aparición de vacuolas. La expresión de las proteínas MBNL1 o CUG-BP1 mediante transgenes, o la reducción de la dosis de *muscleblind*, modifica los fenotipos degenerativos producidos por las (CUG)₄₈₀ (Haro et al., 2006) (Tabla 11.1D).

Introducción



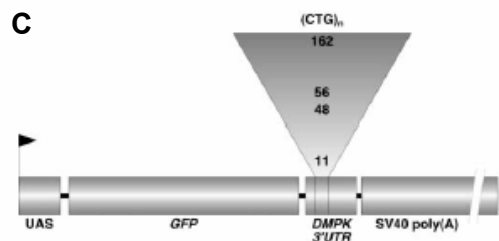
Miotonía, miopatía: cambios en la localización del núcleo de las miofibras y fibras anilladas. Defectos en el procesado de genes específicos del músculo esquelético

(Mankodi et al., 2000; Lin et al., 2006)



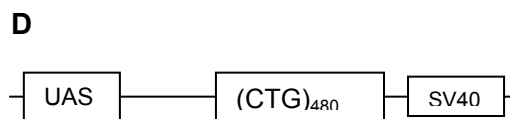
Miotonía, *foci* nucleares en mioblastos, alteración del procesado del transcrito *tau*

(Seznec et al., 2001)



Foci nucleares y colocalización con Muscleblind

(Houseley et al., 2005)



Foci nucleares y colocalización con MBNL1. Degeneración muscular y desorganización de la retina

(Haro et al., 2006)

Tabla 11.1. Modelos murinos y de *Drosophila* que expresan expansiones largas de CUGs. Se representa el transgén insertado en ratón (**A** y **B**) y en *Drosophila* (**C** y **D**) con sus respectivos defectos analizados.

A pesar del creciente número de publicaciones referentes a la DM1 en estos últimos años, todavía se desconoce la ruta patogénica al tratarse de una enfermedad compleja en el que intervienen diversos componentes. Uno de los aspectos más destacados es la existencia de proteínas que quedan retenidas en los RNAs tóxicos. El estudio de la función de estas proteínas permite averiguar si su secuestro es suficiente para desencadenar la DM1 o si además son necesarias otras alteraciones moleculares. Mediante la generación de un modelo de DM1 en *Drosophila* que expresa RNAs que contienen expansiones largas de repeticiones CUGs pretendemos reproducir aspectos de la enfermedad y analizar los procesos celulares afectados. De este modo nos proponemos diseccionar la ruta de patogénesis y en definitiva avanzar en el conocimiento de la DM1.

Objetivos

Un número creciente de enfermedades genéticas humanas se debe a la expansión de microsatélites no codificantes. Entre estas enfermedades destaca la distrofia miotónica de tipo 1 (DM1) porque es una enfermedad degenerativa relativamente frecuente (1/8500) para la que no existe actualmente un tratamiento efectivo y porque su mecanismo de patogénesis es distinto de los conocidos previamente al implicar un RNA tóxico para la célula. Esto, junto con la participación de las proteínas Muscleblind en el mecanismo de patogénesis (inicialmente descritas en nuestro laboratorio en 1998), nos llevó a plantear como objetivo general de esta tesis generar un modelo en *Drosophila* para enfermedades en las que la expansión del microsatélite CTG fuera relevante y en especial para la DM1.

Objetivos específicos dentro de éste general han sido:

- 1. Demostrar que el gen *muscleblind* de *Drosophila* y el gen *MBNL1* humano son homólogos funcionales.** Un modelo basado en secuestrar la proteína Muscleblind endógena con RNAs portadores de repeticiones CUG sólo sería relevante desde el punto de vista biomédico si la proteína de *Drosophila* y la humana realizan funciones equivalentes.
- 2. Generar moscas transgénicas capaces de expresar RNAs con expansiones largas de repeticiones CUG.** Utilizando el sistema *GAL4/UAS* podemos expresar los transcritos mutantes en distintos tejidos de *Drosophila*.
- 3. Comprobar que las moscas modelo reproducen aspectos moleculares, celulares y macroscópicos característicos de la enfermedad.** En concreto se conocen alteraciones en el procesado de transcritos musculares específicos y la presencia de inclusiones nucleares en las que colocaliza Muscleblind que se pueden utilizar como fenotipos semejantes a DM en moscas.
- 4. Rastreo genético.** Una vez establecido el modelo se puede utilizar un fenotipo adecuado para buscar modificadores dominantes del mismo. Estas mutaciones identifican genes potencialmente relacionados con el mecanismo de patogénesis de la enfermedad.
- 5. Comprobar la hipótesis de que las expansiones de CUGs pueden ser una fuente de siRNA o miRNAs.** De ser así, estos RNAs podrían silenciar post-transcripcionalmente la expresión de *muscleblind* y con ello contribuir a las alteraciones moleculares características de la enfermedad.

Material y Métodos

1. MATERIAL

1.1. Cepas de *Drosophila melanogaster*

Oregon-R, cepa silvestre

*white*¹¹¹⁸

*yellow*¹ *white*¹¹¹⁸

1.1.1. Líneas utilizadas en el experimento de complementación funcional

in vivo

Genotipo

y w; Gla / CyO y⁺
w; mbf^{E27} / *CyO*
y w; mbf^{E16} / *CyO*
y w; mbf^{E27} / *CyO y*⁺
y w; mbf^{E16} / *CyO y*⁺
w; UAS-MBNL1(KC1) / TM3
y w; Gla / CyO y⁺; *UAS-MBNL1*
y w; mbf^{E27} / *CyO y*⁺; *UAS-MBNL1*
y w; mbf^{E16} / *CyO y*⁺; *UAS-MBNL1*
y w; twist-GAL4; Dmef2-GAL4
w; daughterless-GAL4
wg^{sp-1} / *CyO; Ki / TM3 ftzlacZ Sb*
y w; mbf^{E27} / *CyO y*⁺; *Dmef2-GAL4*
y w; mbf^{E27} / *CyO y*⁺; *daughterless-GAL4*
w; UAS-mbIA / TM3
w; UAS-mbIB / TM3
w; UAS-mbIC / TM3
y w; Gla / CyO y⁺; *UAS-mbIA*
y w; Gla / CyO y⁺; *UAS-mbIB*
y w; Gla / CyO y⁺; *UAS-mbIC*
y w; mbf^{E27} / *CyO y*⁺; *UAS-mbIA*
y w; mbf^{E16} / *CyO y*⁺; *UAS-mbIA*
y w; mbf^{E27} / *CyO y*⁺; *UAS-mbIB*
y w; mbf^{E16} / *CyO y*⁺; *UAS-mbIB*
y w; mbf^{E27} / *CyO y*⁺; *UAS-mbIC*
y w; mbf^{E16} / *CyO y*⁺; *UAS-mbIC*

Laboratorio y filiación

M. Baylies, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
 (Begemann et al., 1997)
 (Begemann et al., 1997)
 Stock generado en este trabajo
 Stock generado en este trabajo
 (Garcia-Casado et al., 2002)
 Stock generado en este trabajo
 Stock generado en este trabajo
 Stock generado en este trabajo
 M. Baylies, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
 Bloomington Stock Center
 M. Baylies, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
 Stock generado en este trabajo
 Stock generado en este trabajo
 (Garcia-Casado et al., 2002)
 Línea generada en este trabajo
 (Garcia-Casado et al., 2002)
 Stock generado en este trabajo
 Stock generado en este trabajo
 Stock generado en este trabajo
 Stock generado en este trabajo
 Stock generado en este trabajo
 Stock generado en este trabajo
 Stock generado en este trabajo
 Stock generado en este trabajo

1.1.2. Líneas transgénicas que contienen las repeticiones CTG

Genotipo	Laboratorio y filiación
<i>y w; UAS-(CTG)₆₀ 1.2</i>	Línea generada en este trabajo
<i>y w; UAS-(CTG)₆₀ 2.2</i>	Línea generada en este trabajo
<i>y w; UAS-(CTG)₆₀ 4.5</i>	Línea generada en este trabajo
<i>y w; UAS-(CTG)₆₀ 8.1</i>	Línea generada en este trabajo
<i>y w; UAS-(CTG)₆₀ 9.2</i>	Línea generada en este trabajo
<i>y w; UAS-(CTG)₄₈₀ 1.1</i>	Línea generada en este trabajo
<i>y w; UAS-(CTG)₄₈₀ 2.2</i>	Línea generada en este trabajo
<i>y w; UAS-(CTG)₄₈₀ 3.3</i>	Línea generada en este trabajo
<i>y w; UAS-(CTG)₄₈₀ 6.4</i>	Línea generada en este trabajo
<i>y w; UAS-(CTG)₄₈₀ 8.2</i>	Línea generada en este trabajo
<i>y w; UAS-(CTG)₄₈₀ 9.2</i>	Línea generada en este trabajo
<i>y w; UAS-(CTG)₄₈₀ 13.1</i>	Línea generada en este trabajo

1.1.3. Líneas GAL4 ensayadas para la expresión del transgén UAS-CTG

Genotipo	Laboratorio y filiación
<i>w; T80-GAL4 / CyO</i>	Bloomington Stock Center
<i>w; daughterless-GAL4</i>	Bloomington Stock Center

Expresión en músculo

Genotipo	Laboratorio y filiación
<i>y w; twist-GAL4; Dmef2-GAL4</i>	M. Baylies, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
<i>sdSG29.1-GAL4</i>	J.C. Sparrow, University of York
<i>Act88F-GAL4</i>	D.M. Standiford, University of Pennsylvania
<i>1151-GAL4</i>	J.C. Sparrow, University of York
<i>Mhc-GAL4; ry⁻</i>	D. Graham, University of California

Expresión en ojo

Genotipo	Laboratorio y filiación
<i>eyeless-GAL4</i>	Bloomington Stock Center
<i>sevenless-GAL4 K25</i>	M. Mlodzik, New York University School of Medicine
<i>GMR-GAL4 / CyO</i>	A. Ferrús, Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Expresión en sistema nervioso

Genotipo	Laboratorio y filiación
<i>elav C155- GAL4</i>	Bloomington Stock Center
<i>045Y- GAL4</i>	D. Armstrong, University of Edinburgh

103Y- GAL4	D. Armstrong, University of Edinburgh
238Y-GAL4	D. Armstrong, University of Edinburgh
OK107-GAL4	Bloomington Stock Center

Estas líneas dirigen la expresión a los *corpora pedunculata*.

Expresión en los ovarios

Genotipo	Laboratorio y filiación
<i>y w 185-GAL4</i>	Bloomington Stock Center
<i>w c323a-GAL4</i>	Bloomington Stock Center
<i>y w 179-GAL4</i>	Bloomington Stock Center

Estas líneas dirigen la expresión a las células foliculares.

1.1.4. Líneas utilizadas para la obtención del recombinante *sevenless-(CTG)₄₈₀*

Genotipo	Laboratorio y filiación
<i>y w; UAS-(CTG)₄₈₀ 1.1</i>	Línea obtenida en este trabajo
<i>sevenless-GAL4</i>	M. Mlodzik, New York University School of Medicine
<i>w; TM3 / TM6b</i>	Bloomington Stock Center

1.1.5. Líneas utilizadas para la interacción genética de *muscleblind* con el fenotipo de expresión de *(CTG)₄₈₀* en los precursores del ojo

Genotipo	Laboratorio y filiación
<i>w; lf / CyO, ftz-lacZ; MKRS / TM6B</i>	Bloomington Stock Center
<i>y w; sevenless-GAL4-UAS-(CTG)₄₈₀1.1/TM3</i>	Línea obtenida en este trabajo
<i>w; mbf^{E27} / CyO</i>	(Begemann et al., 1997)
<i>mbf^{k07103} / CyO</i>	(Begemann et al., 1997)

1.1.6. Líneas utilizadas en los rastreos de modificadores genéticos dominantes del fenotipo de expresión *(CTG)₄₈₀* en el ojo

Colecciones de inserciones del elemento P en los cromosomas 2 y 3 del Bloomington Stock Center.

Genotipo	Laboratorio y filiación
<i>Df(1)nonA</i>	Bloomington Stock Center
<i>nonA^{dissf0993}</i>	P. Kyriacou, University of Leicester
<i>Ally⁰²²⁶⁷ / TM3, ry^{RK} Sb¹ Ser¹</i>	Bloomington Stock Center
<i>Jumu^{L-70}</i>	Yang X, National University of Singapore
<i>staufen^{ry9} / CyO; ry⁵⁰⁶</i>	Bloomington Stock Center

Material y Métodos

<i>cap and collar</i> ⁰³⁹²¹ / <i>TM3, ry^{RK} Sb¹ Ser¹</i>	Bloomington Stock Center
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; <i>tsunagi</i> ^{EP567} / <i>SM5</i>	Bloomington Stock Center
<i>y</i> ¹ ; <i>mago</i> ^{KG03119} ; <i>ry</i> ⁵⁰⁶	Bloomington Stock Center
<i>thread</i> ⁵ / <i>TM6C</i>	H. Steller, The Rockefeller University
<i>thread</i> ⁴ / <i>TM6C, Sb</i> ¹	Bloomington Stock Center
<i>diap1</i> ^{6-3s}	H. Steller, The Rockefeller University
<i>y w; l(2)k02205 / CyO</i>	Bloomington Stock Center
<i>gmr-diap2</i>	Bloomington Stock Center
<i>UAS-p35</i>	Bloomington Stock Center
<i>cap and collar</i> ⁰³⁹²¹	Bloomington Stock Center
<i>cap and collar</i> ^{EP3258}	Szeged <i>Drosophila</i> stock centre
<i>cap and collar</i> ^{EP3633}	Szeged <i>Drosophila</i> stock centre
<i>Dek</i> ^{EP1132}	Szeged <i>Drosophila</i> stock centre
<i>mb1</i> ^{E27} / <i>CyO; sev-GAL4-UAS-(CTG)₄₈₀ / TM3</i>	Línea obtenida en este trabajo

1.1.7. Líneas utilizadas para la detección de las inclusiones nucleares

Genotipo	Laboratorio y filiación
<i>w; heat shock-GAL4 / CyO</i>	Bloomington Stock Center
<i>y w; mb1</i> ^{E27} / <i>CyO y⁺; UAS-mb1C:GFP</i>	(Pascual, 2005)
<i>y w; UAS-(CTG)₄₈₀ 1.1</i>	Línea generada en este trabajo

1.2. Cepas de *Escherichia coli*

Cepa XL-1 blue: es la cepa que utilizamos para la transformación y crecimiento de plásmidos. El genotipo es *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)].

Cepa SURE: (Greener, 1990) es la cepa que utilizamos para la transformación del plásmido que contiene el inserto de 480 repeticiones del triplete CTG. El genotipo es *e14-(McrA-) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvrC* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr) Amy Camr]

1.3. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa AH 109: derivada de la cepa PJ69-2^a (James et al., 1996) MATa, *trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS -GAL2TATA-ADE2, URA3: MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1.*

1.4. Clones de cDNA de *D. melanogaster*

LD24793: clon de cDNA del transcrito *Aly* de *Drosophila*. Suministrado por *Berkeley Drosophila Genome Project*. Lo utilizamos para el ensayo de los dos híbridos en levadura.

1.5. Vectores

1.5.1. Vectores de clonación

pBluescript II SK+: es un vector derivado del pUC19. Es un fagómido que contiene un sitio de clonación múltiple SK flanqueado por los promotores de las RNA polimerasas T3 y T7. Contiene el fragmento N-terminal del gen *lacZ* y el gen de resistencia al antibiótico ampicilina. Este vector lo utilizamos para la transcripción *in vitro* de RNA marcado con digoxigenina.

pP(UAST) (Brand y Perrimon, 1993): vector derivado del pCaSpeR3 que incluye los extremos del elemento P de *Drosophila* (Thummel et al., 1988). Contiene cinco sitios de unión para la proteína GAL4, el inicio de la transcripción, un sitio de clonación múltiple, un terminador de la transcripción del SV40 y el gen *miniwhite*. Se ha utilizado en la clonación de fragmentos de DNA para la transformación en la línea germinal de *Drosophila*.

1.5.2. Vectores de expresión

pGBKT7 (Clontech Laboratories): es un vector que expresa la proteína fusionada al dominio de unión al DNA GAL4 (DNA-BD). Se expresa de manera constitutiva gracias al promotor ADH1. Además contiene el promotor T7, el epítipo c-Myc, el gen de resistencia al antibiótico kanamicina para *E. coli* y el marcador nutricional *trp1* para seleccionar en levaduras.

pACT2 (Clontech Laboratories): es un vector que expresa la proteína de interés fusionada al dominio de activación GAL4 (GAL4 AD). Contiene el promotor constitutivo ADH1, el epítipo hemaglutinina (HA), el gen de resistencia a la ampicilina para *E. coli* y el marcador nutricional *leu2* para seleccionar en levaduras.

1.6. Cebadores

Nombre	Secuencia 5'-3'	Diana	Aplicación
PUASTDIR	CACCACAGAAGTAAGGTTCC	pUAST	Secuenciación
PUASTREV	CTGCAACTACTGAAATCTGCC	pUAST	Secuenciación
Exon5dir	TTATCCATCGCCATCGTC	<i>α-actinina</i>	RT-PCR
Exon10rev	TTGAAGTTGGTCTCCAGC	<i>α-actinina</i>	RT-PCR
Cy3 CAG	Cy3-(CAG) ₁₀	transcritos CUG	<i>In situ</i>
Plac1	CACCCAAGGCTCTGCTCCCACAAT	pUAST	Secuenciación
Pry1	CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAAT	pUAST	Secuenciación
Pry2	CTTGCCGACGGGACCACCTTATGTTATT	pUAST	Secuenciación
Pwht1	GTAACGCTAATCACTCCGAACAGGTCAC	pUAST	Secuenciación
CUG1	CCTTGTAGCCGGGAATTCTGCT	<i>DMPK 3'UTR</i>	PCR
CUG2	ATGGTCTGGGATCCCCCAGCA	<i>DMPK 3'UTR</i>	PCR
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGCGA	pGBKT7	Secuenciación
Alydir	TATGAATTCATGGTGGACAAAATTGAAA	Aly	PCR
Alyrev	TATCTGCAGTTAGATCTTCATGTCGTTG	Aly	PCR
mbldir10	GTTCCCTACCCTTCCTTA	<i>muscleblind</i>	RT-PCR
mbldirE7	CGGTTGGTTCATTTTACT	<i>muscleblind</i>	RT-PCR
mbrevE11	CAAGTTGCTGGTGCCGTT	<i>muscleblind</i>	RT-PCR
rp49dir	ATGACCATCCGCCAGCATAC	<i>rp49</i>	RT-PCR
rp49rev	ATGTGGCGGGTGCGCTTGTTT	<i>rp49</i>	RT-PCR

1.7. Kits

Kit	Proveedor
GenoPure Plasmid Midi Kit	Roche
Vectastain® Elite ABC kit	Vector Lab
DIG RNA Labeling kit	Roche
GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences

1.8. Equipos

Equipo	Modelo	Marca
Criostato	CM 1510S	Leica
Microscopio fluorescencia	DM LB2	Leica
Microscopio electrónico de barrido	S2500	Hitachi
Microtomo	HM330	Microm
Nutator®		Clay Adams® Brand
PCR Mastercycler gradient		Eppendorf

Centrífuga	J2-21 M/E	Beckman
Lupa	MZ APO	Leica
Ultramicrotomo	Ultracut E	Reichert-Jung
Espectrofotómetro Spectronic	GENESYS5	Milton Roy
Cabina de flujo laminar		Esco

2. MÉTODOS

2.1. Obtención de líneas transgénicas

2.1.1. Clonación

Todas las construcciones que utilizamos para la transformación de la línea germinal de *Drosophila* las subclonamos en un vector adecuado como es el pUAST (Brand y Perrimon, 1993).

Para el caso del cDNA del transcrito de la variante B del gen *muscleblind* (*mbIB*) que estaba clonado en el vector pBlueScript, lo liberamos con los enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* para clonarlo en el vector pUAST que previamente linearizamos con los mismos enzimas de restricción.

El transcrito de la variante *mbID* también clonado en pBlueScript lo liberamos con *NotI* y *XhoI* para su posterior subclonación en pUAST previamente digerido con ambos enzimas.

La construcción de 60 repeticiones del triplete CTG provino del fragmento 3'-UTR del gen *Proteína Kinasa de la Distrofia Miotónica* (*DMPK*), clonado en el vector pSP72 (Promega) (Miller et al., 2000). Liberamos solamente la secuencia que contenía las 60 repeticiones del trinucleótido CTG con los enzimas *EcoRI* y *BamHI* y lo clonamos en el vector pUAST linearizado con ambos enzimas.

La secuencia que contiene 480 repeticiones del trinucleótido CTG (Philips et al., 1998) provino de unos minigenes DM (Distrofia Miotónica) sintéticos que contienen 24 copias de los oligonucleótidos de doble cadena 5'-TCGA(CTG)₂₀C-3' y 5'-TCGAG(CAG)₂₀-3'. Cada oligonucleótido contiene 20 repeticiones del trinucleótidos CTG flanqueados por sitios de restricción compatibles (*Sall* y *XhoI*). Se clonaron en pUAST en un sitio *XhoI*.

Transformación en *E. coli*

La transformación de las células competentes (cepa XL1-Blue) la realizamos por el método del choque térmico. Éste consistió en añadir 5 µl de la reacción de ligación a 100 µl de las células, incubamos en hielo 20 min y aplicamos un choque térmico a 37 °C de 2 min. A continuación añadimos 800 µl de medio de cultivo LB y lo incubamos a 37 °C durante 1 h. Posteriormente lo sembramos en placas de LB que contenían el antibiótico al que el plásmido confiere resistencia y las incubamos a 37 °C durante toda la noche.

La construcción que contenía 480 repeticiones del trinucleótido CTG era inestable en las células convencionales por lo tanto transformamos en células de la cepa SURE (Greener, 1990) siguiendo las recomendaciones del fabricante (*SURE*[®] 2 *supercompetent cells*, Stratagene). Utilizamos estas células porque hay insertos que al introducirse a las células bacterianas son capaces de formar estructuras secundarias y terciarias no estándar que acaban siendo eliminadas. Estas bacterias se caracterizan porque contienen mutaciones que inactivan las rutas que catalizan estos sucesos de expulsión.

Medio de cultivo LB: Para un volumen de 1 l, 10 g de NaCl, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y autoclavar. En el caso de medio sólido añadir 15 g de agar y después del autoclavado se añade el antibiótico.

Extracción de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico a pequeña escala para analizar las clonaciones la realizamos siguiendo el método de lisis alcalina descrito en Sambrook y Russell (2001). La extracción de DNA plasmídico a media escala la realizamos utilizando el *Genopure Plasmid Midi Kit* (Roche). En las extracciones de DNA plasmídico con kit seguimos las instrucciones del fabricante. Finalmente estimamos la cantidad de DNA corriendo un gel de agarosa al 0.8 %. Todas las construcciones las comprobamos mediante digestiones con enzimas de restricción y secuenciación.

2.1.2. Transformación de la línea germinal de *D. melanogaster*

Las líneas transgénicas las generamos utilizando la técnica de transformación mediada por elementos P (Spradling y Rubin, 1982). Microinyectamos embriones de 0 a 45 min de la cepa $y^1 w^{1118}$ con una solución de microinyección.

La solución de inyección la mezclamos en un tubo con 20 μg de la construcción a inyectar y 5 μg de plásmido ayudante que codifica la transposasa necesaria para la inserción en el genoma. Añadimos H_2O miliQ hasta un volumen de 100 μl y precipitamos con etanol y NaAc 3 M pH 5,2 (24:1) durante toda la noche a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Después de una centrifugación a 14000 rpm durante 15 min lavamos dos veces el precipitado con etanol al 70 % y NaCl 0.2 M frío. Hicimos un último lavado con sólo etanol al 70 % y secamos el precipitado a temperatura ambiente. Finalmente resuspendimos en 50 μl de tampón de inyección y lo comprobamos en un gel de agarosa, obteniéndose 2-3 bandas de alto peso molecular.

Tampón de microinyección: 5 mM KCl y 0.1 mM tampón fosfato pH 7.8. Se prepararon unas soluciones *stock* 0.1 M de ambos reactivos.

A. En el caso del KCl, se disolvió 0.37 g en 50 ml de H_2O miliQ.

B. En el caso del tampón fosfato pH 7.8 se mezclaron 89.6 ml de Na_2HPO_4 1 M y 10.4 ml de NaH_2PO_4 1 M, que a su vez se prepararon disolviendo en H_2O miliQ 1.278 g en 90 ml y 0.172 g en 10 ml respectivamente. Luego los 100 ml mezclados se diluyeron hasta un litro. Para 10 ml de tampón de inyección, se tomaron 500 μl de 0.1M KCl y 10 μl de tampón fosfato 0.1M pH 7.8. Al final el tampón se succionó en una jeringa y se pasó por un filtro de 0.2 μm de diámetro.

Cruces

Los embriones microinyectados son mosaicos en la línea germinal para la inserción. Cuando llegaron a adultos los cruzamos con moscas $y^1 w^{1118}$ y de la descendencia algunos eran transformantes, los seleccionamos por el color rojo de los ojos, ya que la inserción contiene el gen *miniwhite*.

Cada mosca transformante obtenida la cruzamos con $y^1 w^{1118}$ para establecer el stock y posteriormente las cruzamos entre ellas con el fin de obtener líneas homocigotas para la inserción.

Mapeo de los transgenes CTG

Mediante **cruces genéticos** podemos localizar en qué cromosoma se insertó el transgén del siguiente modo.

P	♂ ojos rojos (w^+)	X	♀ w ; TM3 <i>e</i> /TM6b <i>e</i>
F₁	La inserción está en el cromosoma X si:		♀ ojos rojos ♂ ojos blancos
F₁ X F₁			
F₂	La inserción no está en el cromosoma 3 si:		♀ y ♂ ojos rojos y ebony
	La inserción está en el cromosoma 3 si:		♀ y ♂ ojos rojos no ebony

Material y Métodos

Para localizar precisamente las inserciones utilizamos la técnica de **PCR inversa**. Extrajimos el DNA genómico de unas 30 moscas homogeneizándolas en 200 μ l de Tampón A hasta que sólo hubiera cutículas. Las incubamos en un baño a 65 °C durante 30 min y añadimos 800 μ l de solución KAc/LiCl incubándose en hielo 10 min. Tras el centrifugado a 12000 g durante 15 min añadimos al sobrenadante 600 μ l de isopropanol y después de volver a centrifugar lavamos el precipitado con etanol al 70 % y lo secamos a temperatura ambiente. Resuspendimos en 400 μ l de TE (pH 7.6-8) y extrajimos el DNA con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) en una segunda ronda de purificación. Finalmente precipitamos el DNA con etanol absoluto y AcNa 3 M 1/10 del volumen final. El DNA resuspendido en 150 μ l de agua libre de RNasa se comprobó en un gel de agarosa al 0.8 %. Para una descripción detallada véase www.fruitfly.org/about/methods/pcr.inverse.html

Tampón A: Tris-HCl 100 mM pH 7.5, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM y SDS 0.5 %.

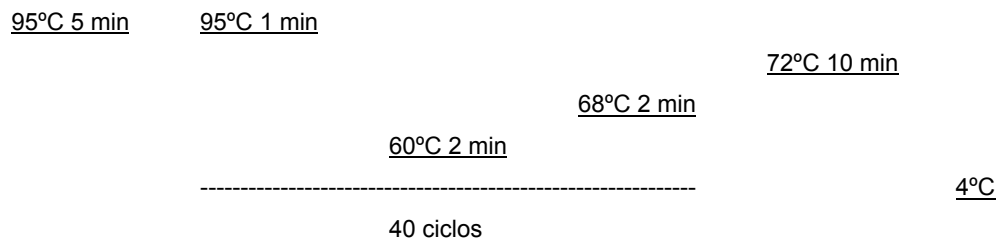
Solución KAc/LiCl: 1 parte de KAc 5 M y 2.5 partes de LiCl 6 M.

Digerimos el DNA genómico con enzimas de corte frecuente como por ejemplo *Sau3AI* y *HinP1*, incubamos durante 2.5 h a 37 °C y posteriormente inactivamos los enzimas a 65 °C durante 20 min.

Después de comprobar 10 μ l de cada digestión en un gel de agarosa al 0.8 % ligamos el DNA genómico digerido en un volumen de reacción grande, de 400 μ l, para favorecer la ligación intermolecular frente a la intramolecular. La ligación la incubamos a 4 °C durante toda la noche, posteriormente precipitamos con NaCl y etanol y resuspendimos en 40 μ l de H₂O miliQ.

Preparamos la reacción de PCR inversa y la sometimos a las siguientes condiciones:

DNA ligado	10 μ l
2 mM cada dNTP	2.0 μ l
10 μ M cebador directo	1.0 μ l
10 μ M cebador reverso	1.0 μ l
Tampón 10X	5.0 μ l
H ₂ O	Completar hasta 50 μ l
Taq polimerasa (2 U)	0.4 μ l



Comprobamos 5 μ l de PCR en un gel de agarosa al 1.5 % y purificamos el producto de PCR con el *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences). Finalmente lo secuenciamos utilizando un cebador que estaba en el extremo del elemento P, como por ejemplo Plac1 ó Sp1 entre otros.

2.2. Hibridación *in situ* en embriones de *D. melanogaster*

Debido a que con esta técnica se detectan moléculas de RNA es conveniente trabajar en condiciones libres de RNasas.

2.2.1. Marcaje de sondas de RNA

El marcaje de sondas de RNA lo realizamos mediante la transcripción de un clon de cDNA, por lo que es necesario clonar el fragmento a marcar en un vector que contenga un promotor para la RNA polimerasa (como por ejemplo la T3, T7 o SP6). Además es necesario linearizar este plásmido para determinar el punto donde debe finalizar la transcripción, siendo el inicial el promotor de la RNA polimerasa elegida.

Marcamos una sonda que incluía la zona común de los tres transcritos *mbIA*, *mbIB* y *mbIC* con digoxigenina. Como control negativo obtuvimos la antisonda (secuencia idéntica a la del transcrito). El marcaje lo hicimos utilizando el *DIG RNA Labeling Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Estas sondas las empleamos para detectar los RNA mensajeros de *muscleblind* que eran sobreexpresados en embriones de *Drosophila*.

Tras la reacción de marcaje, cuantificamos la cantidad aproximada de RNA marcado mediante la detección de diluciones de la reacción de marcaje y RNA control del kit en un filtro, siguiendo el método descrito en el manual de usuario de la casa comercial Roche, pero con modificaciones en lo que respecta a las concentraciones ensayadas.

Material y Métodos

La sonda marcada la fragmentamos para que pudiera penetrar más eficientemente en los tejidos, para ello añadimos 20 µl de tampón carbonato 2X y la incubamos a 65 °C durante 20 min porque en un pH alcalino y a una temperatura alta se degrada el RNA. Este paso es crítico ya que si el pH o el tiempo aumentan la sonda se puede degradar demasiado. Detuvimos la reacción con 50 µl de acetato de sodio 0.2 M pH 6.0 y precipitamos la sonda con 15 µl de LiCl 4 M, 5 µl tRNA 10 µg/ µl y 360 µl de etanol absoluto frío. Lavamos el precipitado con etanol al 70 % y lo resuspendimos en 75 µl de solución de hibridación.

Tampón carbonato 2X: Na₂CO₃ 120 mM y NaHCO₃ 80 mM, pH 10,2.

Solución de hibridación: formamida desionizada al 50 % (JT Baker), SSC 5X (Roche), DNA de esperma de salmón sonicado 100 µg/ml (Sigma), heparina 50 µg/ml (Sigma) y Tween[®] 20 al 0,1 % (Merck).

Sonda	vector	RNA polimerasa	Enzima de restricción
<i>muscleblind</i> (zona común)	pBluescript	T7 polimerasa	<i>EcoRI</i>
Antisonda	pBluescript	T3 polimerasa	<i>XhoI</i>

2.2.2. Fijación de los embriones

Recogimos huevos de la placa de puesta con un pincel y agua y los dejamos en un tamiz. Decorionizamos con lejía comercial al 50 % durante 3 min y lavamos los restos de lejía con abundante agua corriente. Transferimos los embriones con un pincel a un tubo *ependorf* con paraformaldehído 4 % y heptano (1:1) y la fijación la realizamos en agitación a 250 rpm y a temperatura ambiente durante 20 min. Eliminamos la fase inferior, correspondiente al fijador, y desvitelinizamos con un volumen de metanol al 100 %. Agitamos fuertemente con la mano durante 30 s y eliminamos ambas fases para volver a añadir heptano y metanol 100 % (1:1). Agitamos fuertemente durante 30 s para dar una segunda oportunidad a los embriones que antes no se habían desvitelinizado. Eliminamos todo el líquido y añadimos metanol. Los embriones se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Placas de puesta: para 10 placas, H₂O 175 ml, agar 3 g, etanol 4.5 ml y ácido acético 1.5 ml.

Paraformaldehído: 4 % (peso/ vol) paraformaldehído (Sigma) en PBS pH 7.0.

PBS: Solución stock 10X (Roche).

2.2.3. Hibridación

Pretratamientos

- Lavamos dos veces los embriones fijados con metanol al 100 %.
- Incubamos con una mezcla de paraformaldehído al 4 % y metanol al 100 % (1:1) durante 5 min en agitación.
- Incubamos con paraformaldehído al 4 % en PBT 1X-01 % durante 25 min en agitación.
- Realizamos tres lavados con PBT (uno rápido, uno de 10 min y otro rápido).
- Incubamos con PBT con proteinasa K a 50 µg/ml durante 2.5 min y agitación suave. El tiempo de incubación es crítico.
- Detuvimos la digestión con proteinasa K mediante dos lavados de 1 min cada uno con glicina 2 mg/ml en PBT.
- Realizamos tres lavados con PBT, dos rápidos y uno de 5 min.
- Incubamos con paraformaldehído al 4 % en PBT durante 25 min y en agitación.
- Realizamos tres lavados con PBT, uno rápido, uno de 10 min y otro rápido.

Hibridación

- Lavamos los embriones con PBT y tampón de hibridación (1:1) durante 10 min y en agitación.
- Realizamos un lavado rápido con tampón de hibridación.
- Prehibridamos con 1 ml de solución de hibridación a 55 °C durante 1-2 h en agitación.
- Hibridamos en un volumen de 75 µl de solución de hibridación con 5 ng de sonda desnaturalizada. La sonda se desnaturaliza incubándola a 80 °C durante 5 min y enfriándola rápidamente en hielo.
- Incubamos en un baño de agua a 55 °C durante toda la noche sin agitación.
- Al mismo tiempo preabsorbimos el anticuerpo. Lavamos el equivalente a 50 µl de embriones almacenados en metanol con metanol nuevo; realizamos 3 lavados rápidos con PBT y uno de 5 min; añadimos suficiente anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, en PBT-0,1 % BSA, para luego usarlo a una concentración final de 1:2000; incubamos a 4 °C durante toda la noche en agitación.

Lavados y Detección

- Realizamos dos lavados rápidos con 500 µl de tampón de hibridación.

Material y Métodos

- Lavamos 2 veces con 1 ml de tampón de hibridación durante 1 h cada uno a 55 °C sin agitación.
- Hicimos dos lavados con solución de hibridación y PBT (1:1) durante 15 min a temperatura ambiente y sin agitación.
- Realizamos tres lavados con PBT, uno rápido, uno de 10 min y otro rápido.
- Incubamos con PBT-0,1 % BSA entre 15 y 30 min en agitación.
- Incubamos con anticuerpo anti-digoxigenina preabsorbido en PBT-0,1 % BSA a una concentración 1:2000 a temperatura ambiente durante 1 h en agitación.
- Realizamos tres lavados con PBT, dos rápidos, uno de 1 h y otro rápido.
- Transferimos los embriones a una placa multipocillo y los lavamos con solución de detección durante 5 min sin agitación.
- Preparamos la siguiente mezcla de detección: 9 µl de NBT en 1 ml de Genius-3, mezclamos bien y agregamos 7 µl de X-fosfato.
- Añadimos la solución a los embriones y mantuvimos en oscuridad sin agitación, verificando periódicamente la aparición de la señal.
- Detuvimos la reacción realizando varios lavados con PBT.
- Montamos los embriones en glicerol al 80 % para su observación al microscopio óptico.

Paraformaldehído: 4 % (peso/ vol) paraformaldehído (Sigma) en PBS.

PBST1X-01 %: PBS y Tween[®] 20 al 0,1 % (Merck).

Proteinasa K: (Roche).

Glicina: (JT Baker).

Solución de hibridación: formamida desionizada al 50 % (JT Baker), SSC 5X de solución stock 20X (Roche), DNA de esperma de salmón sonicado 100 µg/ml (Sigma), heparina 50 µg/ml (Sigma) y Tween[®] 20 al 0,1 % (Merck).

BSA: (Roche, *Bovine serum albumin fraction V*)

Anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina: (Roche)

Genius 3: 100 mM Tris pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl

Solución de detección: Genius 3 y 0.1 % Tween[®] 20.

NBT y BCIP(X-fostato) para fosfatasa alcalina (Roche).

2.3. Experimentos de complementación funcional *in vivo*

Para comprobar si las proteínas MbIA, MbIB y MbIC de *Drosophila* tienen la misma función, así como si el gen humano *MBNL1* es el homólogo funcional del gen *muscleblind*, utilizamos el sistema *GAL4/UAS*.

El sistema *GAL4/UAS* permite expresar un gen en *Drosophila* de una manera dirigida en el espacio y en el tiempo. Por un lado se genera una línea que contenga el gen que queremos expresar clonado aguas abajo de la secuencia *UAS* (*upstream activation sequence*) diana del factor de transcripción *GAL4*. Por otro lado tenemos una línea que expresa bajo la secuencia reguladora de un determinado gen el factor de transcripción *GAL4*. Al cruzar ambas líneas *GAL4* se expresa en uno o unos determinados tejidos y se une a su secuencia diana *UAS* activando la expresión del gen de interés con ese patrón de expresión (Figura 2.1).

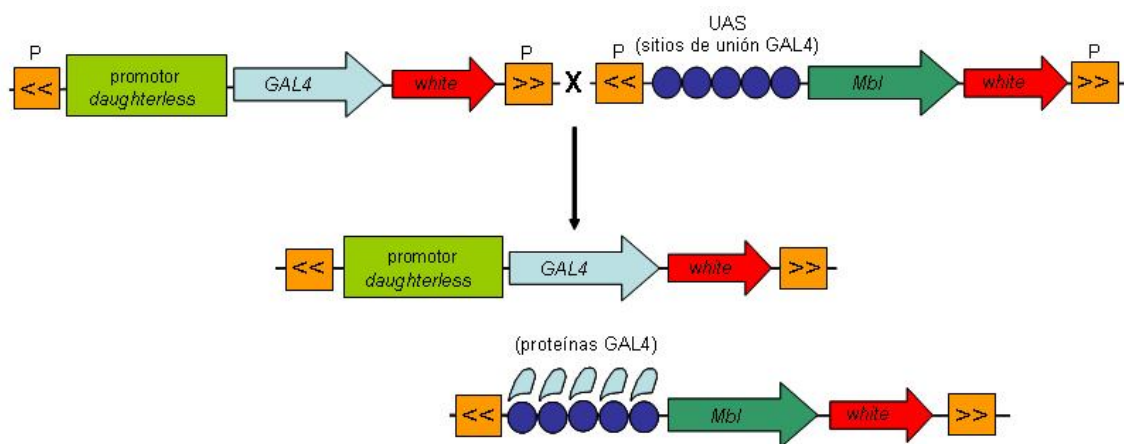


Figura 2.1. Esquema representativo de la expresión de un gen de interés mediante el sistema *GAL4/UAS*. La secuencia *GAL4* codifica para un activador transcripcional de levadura que en la línea representada fue fusionada con el promotor del gen *daughterless* de expresión ubicua. La construcción se introduce en el genoma de *Drosophila* con un elemento P artificial marcado con el gen *miniwhite* de *Drosophila*. La línea que expresa la proteína *GAL4* se cruza con líneas que llevan el gen de interés, en este caso *mbIA*, *mbIB*, *mbIC* y *MBNL1*. Estos transgenes están subclonados aguas abajo de los cinco sitios de unión *GAL4*, los *UAS* (círculos). Estas construcciones también son introducidas dentro del genoma de *Drosophila* flanqueadas por las repeticiones invertidas del elemento transponible P llevando el marcador genético del gen *miniwhite*. En la progenie del cruce, la unión de *GAL4* a *UAS* activa la transcripción del gen diana sólo en las células y tejidos donde se expresa el factor de transcripción *GAL4*.

En estos experimentos fue necesario disponer de cepas de moscas que contuvieran una construcción *UAS-mbIA*, *-mbIB*, *-mbIC* y *-MBNL1* en un fondo genético heterocigoto para la mutación *muscleblind*. Así como cepas que expresaran *GAL4* con el patrón adecuado también en un fondo heterocigoto para la mutación *mbI*. Utilizamos dos líneas *GAL4*, una con la secuencia reguladora del gen *Dmef2*,

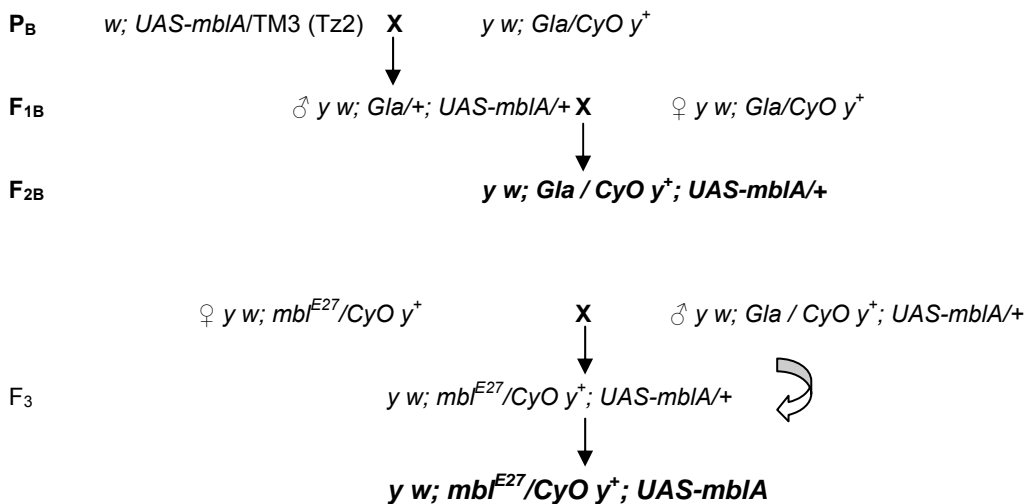
Material y Métodos

expresándose en toda la musculatura embrionaria y otra línea *GAL4* con el promotor del gen *daughterless*, de expresión general en el embrión.

Cruzamos las líneas *UAS* con las *GAL4* generándose, entre otros, embriones mutantes *mbI* en los que se expresaba el gen humano *MBNL1* o alguno de los tres transcritos de *mbI* de *Drosophila* en el sistema muscular o en todo el embrión según la línea *GAL4* utilizada. Si ocurría rescate, una posibilidad era que los embriones mutantes llegaran a nacer como larvas de primer estadio. Para genotipar las larvas, las cepas *UAS* y *GAL4* anteriores se sintetizaron en un fondo genético *yellow* y con la mutación *mbI* equilibrada con un cromosoma *CyO* y^+ , de manera que sólo las larvas homocigotas para la mutación *mbI* (no tienen el cromosoma equilibrador marcado con y^+) tenían las mandíbulas amarillas, a diferencia de las y^+ que son pigmentadas (Monferrer y Artero, 2006).

2.3.1. Generación de stock “*UAS*” para experimento de rescate

Disponíamos de cuatro líneas *UAS-mbIA*, *mbIB*, *mbIC* y *MBNL1* localizadas en el cromosoma 3 de *Drosophila* (García-Casado et al., 2002).

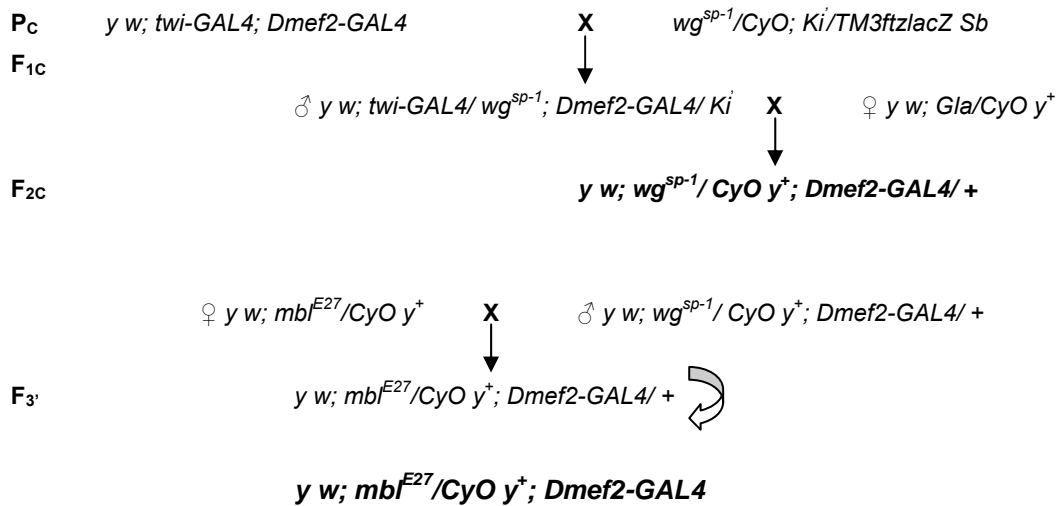


Por autocruzamiento se establece una línea *UAS* homocigota para el transgén y heterocigoto para *mbI*.

2.3.2. Generación de un stock “*GAL4*” para experimento de rescate

Partíamos de una línea con dos construcciones *GAL4* diferentes aunque sólo una de ellas nos interesaba. El cromosoma 2 contenía *twist-GAL4* y el cromosoma 3 *Dmef2-*

GAL4, la de nuestro interés, todo ello en un fondo genético $y^1 w^{1118}$. Para el caso de la expresión general en el embrión partíamos de un stock *daughterless-GAL4* en el cromosoma 3 y en un fondo genético *white*¹¹¹⁸.



Por autocruzamiento se establece una línea homocigota para *GAL4* y heterocigota para *mbI*.

2.3.3. Cuantificación experimento de rescate

Para llevar a cabo el experimento de rescate cruzamos hembras vírgenes del stock *GAL4* y machos del stock *UAS* llevando diferentes alelos *muscleblind*, mbI^{E16} y mbI^{E27} para que complementaran en el caso que contuvieran otra mutación letal en el cromosoma 2. Cruzamos aproximadamente 40 hembras vírgenes y 20 machos en un sistema de recogida de huevos a 25 °C. Tras un periodo de habituación de 24 horas procedimos a un cambio de placa cada 20 h aproximadamente. Los huevos, de edad comprendida entre 0 y 20 h, los colocamos en una nueva placa en grupos de 5 para facilitar el recuento. Pasadas aproximadamente 24 h desde que una placa había sido puesta empezamos a contar las larvas de primer estadio nacidas clasificándolas como normales si poseían mandíbulas negras (fenotipo silvestre) o como rescatadas si poseían mandíbulas amarillas (fenotipo *yellow*). El número de larvas emergidas lo anotamos diariamente. Cada placa la observamos al menos 2 días y el experimento duró 7 días.

Los fenotipos que observamos en la descendencia los dividimos en tres clases: larvas heterocigotas con mandíbulas negras, larvas mutantes *muscleblind* rescatadas

Material y Métodos

con mandíbulas amarillas y embriones que no eclosionaron, constituidos por huevos no fecundados u embriones homocigotos para el equilibrador o para la mutación *muscleblind*, en los cuales no se ha rescatado la letalidad.

Puesto que se espera en la descendencia dos terceras partes de las larvas heterocigotas para la mutación así como un tercio para las mutantes rescatadas si el rescate fuera completo, contabilizamos el grado de rescate como larvas heterocigotas para la mutación *muscleblind*. Así pues la mitad de las larvas heterocigotas contadas son las larvas mutantes rescatadas esperadas. Con este dato y contando el número de larvas rescatadas observadas calculamos el porcentaje de rescate.

Obtuvimos intervalos de confianza para todos los rescates y para comparar dos proporciones (grados de rescate) aplicamos el test estadístico exacto de *Fisher*. Ambos cálculos los hicimos a través de la página electrónica <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>.

En resumen, en estos experimentos generamos los siguientes genotipos relevantes;

y w; mbl^{E16} / mbl^{E27}; UAS-mblA/ da-GAL4

y w; mbl^{E16} / mbl^{E27}; UAS-mblB/ da-GAL4

y w; mbl^{E16} / mbl^{E27}; UAS-mblC/ da-GAL4

y w; mbl^{E16} / mbl^{E27}; UAS-mblC/ Dmef2-GAL4

y w; mbl^{E16} / mbl^{E27}; UAS-MBNL1/ da-GAL4

y w; mbl^{E16} / mbl^{E27}; UAS-MBNL1/ Dmef2-GAL4

El alelo letal *mb^{E27}* y *mb^{E16}* fue generado por escisión imprecisa de la inserción del elemento *P l(2)k05507* y *l(2)01038*, respectivamente (Begemann et al., 1997; Artero et al., 1998).

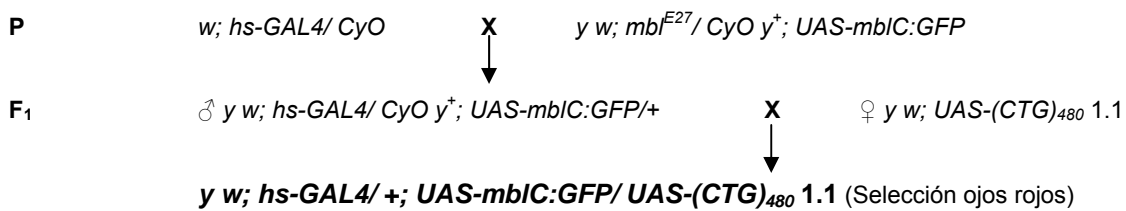
2.4. Preparación de cutículas *D. melanogaster*

Recogimos embriones de aproximadamente 22 h de vida y los decorionizamos con lejía comercial al 50 % durante 3 min. Después lavamos con agua y desvitelinizamos en heptano: metanol (1:1) en agitación durante 30 s. Lavamos 2 ó 3 veces con metanol y sustituimos el metanol por PBT 0.3 % tritón X-100. A continuación distribuimos los embriones sobre un portaobjetos y eliminamos el tritón X-100, sin que los embriones se secan. Añadimos 2 ó 3 gotas de medio de Hoyer: ácido láctico (1:1) y lo cubrimos con un cubreobjetos. Finalmente los incubamos a 70 °C durante toda la noche. Realizamos las observaciones con microscopía óptica de campo oscuro.

Medio Hoyer's: disolver 30 g de goma arábica (Sigma) en 50 ml de H₂O, añadir 200 g de cloralhidrato en pequeñas cantidades para que se vaya disolviendo; añadir 20 g de glicerol, centrifugar a 10000 rpm durante 30 min y filtrar.

2.5. Detección de inclusiones nucleares por choque térmico

Dirigimos la expresión simultánea de la proteína de fusión MbC:GFP y las repeticiones CUG con una línea *heat-shock*-GAL4 con los siguientes cruces genéticos:



Pusimos las moscas con el genotipo de interés en un baño a 37 °C durante 1 h. Observamos la expresión de mbIC:GFP y (CTG)₄₈₀ a las 2 h de dar el choque térmico.

2.5.1. Crio secciones

Sumergimos la mosca en un molde con OCT y la orientamos dentro del molde evitando que se formaran burbujas de aire. Dejamos el molde a -20 °C hasta que se congelara el OCT. Se puede almacenar a -80 °C. Cortamos las secciones a 12 μm con el criomicrotomo y las extendimos en portaobjetos gelatinizados.

2.5.2. Hibridación *in situ*

Fijamos las secciones con paraformaldehído al 4 % durante 15 min, a continuación realizamos tres lavados con PBS 1X durante 5 min cada uno. Prehibridamos durante 10 min e hibridamos (sonda Cy3-CAG a 50 fm/μl) a 37 °C durante toda la noche. Las secciones las lavamos dos veces con SSC 2X y con SSC 0.5X durante 15 min cada lavado a 37 °C y las montamos con Dako añadiendo DAPI a una concentración de 100 ng/ml.

OCT: solución de sacarosa (Leica Microsystems).

Portaobjetos gelatinizados: Calentar 100 ml de agua a 60-70 °C y añadir 0.14 g de cromo potasio sulfato (Merck) y 0.45 g de gelatina (Merck). Diluir a 1:5 con agua.

Paraformaldehído: 4 % (peso/ vol) paraformaldehído (Sigma) en PBS.

Material y Métodos

Solución de prehibridación: formamida desionizada 40 % y SSC 2X

Solución de hibridación: formamida desionizada 40 % (Merck), SSC 2X (Roche), DNA de esperma de salmón sonificado 1 mg/ml (Sigma), heparina 50µg/ml (Sigma), BSA 2 % (Roche, *Bovine serum albumin fraction V*) y tRNA de *E. coli* 1 mg/ml (Roche)

Formamida desionizada: 5 g de resina (BioRad) libre de RNasa en 100 ml formamida durante 1 h en agitación.

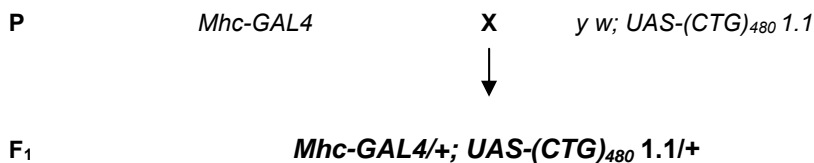
PBS: solución stock 10X de Roche.

SSC: solución stock 10X de Roche.

Dako: medio de montaje para fluorescencia (DakoCytomation).

2.6. Estudio histológico de la musculatura adulta de *D. melanogaster*

Dirigimos la expresión de las repeticiones CTG de modo general en la musculatura mediante el siguiente cruce:



2.6.1. Tejidos embebidos en parafina

Preparación de las muestras

Lavamos las moscas en PBS 1X durante 10 min, fijamos en paraformaldehído 4 % en PBS durante 30 min y lavamos en PBT (triton X-100 0.3 %) durante 10 min, todo en agitación.

Deshidratamos las moscas con tres lavados de 1 h cada uno con etanol al 70 %, 96 % y 100 %. El lavado de 70 % se puede alargar durante toda la noche.

Lavamos en etanol absoluto dos veces para eliminar completamente el agua e hicimos un lavado de 7 min con tolueno. Eliminamos el tolueno y pusimos en parafina a 60 °C durante toda la noche. Cambiamos la parafina y dejamos durante unas 3 h. Colocamos la muestra en el molde, en la orientación deseada y dejamos con parafina a temperatura ambiente hasta que se solidificara. Lo desmoldamos y en un microtomo hicimos unas primeras secciones a 10 µm, las colocamos en portaobjetos gelatinizados y con gotas de agua, les añadimos azul de toluidina y una vez secos a

40 °C miramos al microscopio si estaban bien orientados. A las siguientes secciones no les añadimos azul de toluidina y las secamos a 40 °C.

Desparafinamos los portaobjetos en baños de xilol durante 15 min, de etanol al 100 %, 96 % y 70 % y de agua durante 5 min cada uno.

Tinción con hematoxilina eosina

Teñimos con hematoxilina de Mayer durante 10-15 min. Tras un lavado en agua de 5 min los bañamos en eosina durante 5 min, los volvimos a lavar en agua durante 5 min y los deshidratamos en baños de etanol al 70 %, 96 % y 100 % durante 5 min cada uno. Finalmente pusimos los portaobjetos en un baño con xilol durante 10-15 min y los montamos en DPX.

Paraformaldehído: 4 % (peso/ vol) paraformaldehído (Sigma) en PBS (Roche).

PBT1X-0.3 %: tritón X-100 (Roche) en PBS 1X (Roche).

Hematoxilina de Mayer: (Panreac).

Eosina amarillenta: 1 % (peso/vol) eosina (Panreac) en H₂O.

DPX: (Fluka).

2.6.2. Tejidos embebidos en resina

Este protocolo lo realizamos siguiendo las instrucciones descritas en Tomlinson y Ready (1987). Mezclamos 2 ml de tampón 1 con 2 ml de tetraóxido de osmio. Dormimos las moscas y les cortamos la cabeza y parte del abdomen. Transferimos los tórax en un tubo *ependorf* con 200 µl del tampón 1 en hielo. Añadimos 200 µl de tampón 1: tetraóxido de osmio (en campana) y dejamos 30 minutos en hielo. Eliminamos todo el líquido y añadimos 200 µl tampón 1: tetraóxido de osmio, los dejamos durante 1 ó 2 h en hielo. Eliminamos todo y deshidratamos con 500 µl de los alcoholes al 30 %, 50 % y 70 % durante 5 min cada uno en hielo y con los alcoholes 90 % y 100% durante 5 min a temperatura ambiente. Deshidratamos con óxido de propileno dos veces durante 10 min y añadimos el mismo volumen de óxido de propileno: resina dejándolo toda la noche. Eliminamos el óxido de propileno: resina y añadimos resina pura dejándolo al menos 4 h (en campana). Colocamos los tórax en los moldes orientándolos y rellenando los moldes con resina. Lo dejamos toda la noche a 70 °C, desmoldamos y cortamos en secciones de 1.5 µm en un ultramicrotomo con cuchilla de diamante. Las secciones las colocamos en portas gelatinizados y las observamos al microscopio óptico.

Material y Métodos

Tampón 1: ¼ de glutaraldehído al 8 %, ¼ de H₂O, ¼ de Na₂HPO₄ a 0.2 M (autoclavado) y ¼ de NaH₂PO₄ a 0.2 M (autoclavado).

Glutaraldehído 8%: (Fluka).

Tetraóxido de Osmio: (Polysciences Inc.)

Óxido de propileno: (Fluka)

Resina epoxi Durcupan blanda: mezclar resina (Fluka), endurecedor (Fluka), acelerador (Fluka), y plastificante (Fluka).

2.6.3. Tinción con anti-kettin en larvas de *D. melanogaster*

Preparación de las muestras

Colocamos una larva de tercer estadio sobre una placa de silicona, la lavamos con PBS y la secamos bien. La fijamos con un alfiler por cada extremo e hicimos un corte pequeño transversal con la tijera en el extremo posterior. A partir de este punto cortamos longitudinalmente haciendo “tienda de campaña”, para minimizar el daño tisular. Con un alfiler buscamos el borde del corte, abrimos la larva y fijamos el alfiler. Repetimos la maniobra hasta dejar la larva fijada con dos alfileres por cada lateral, lo más cerca posible de los extremos. Lavamos bien con PBS y la secamos. Cubrimos la larva con unas gotas de paraformaldehído al 4 % y la dejamos 1 h a 4 °C. Paramos la fijación con PBT y con unas pinzas afiladas retiramos vísceras y traqueas hasta dejar el músculo lo más limpio posible. Lavamos 3 veces durante 5 min con PBT en agitación.

Tinción con anti-Kettin

Lavamos 2 veces con 100 µl/larva de solución de bloqueo durante 5 min y luego un lavado de 1 h a temperatura ambiente en agitación. Añadimos la solución de tinción de anticuerpo 1º a una dilución final 1/200 e incubamos a 4 °C toda la noche en agitación suave o a temperatura ambiente durante 2 h. Lavamos 3 veces durante 15 min con 100 µl/larva de PBT en agitación y tubo horizontal y añadimos la solución de tinción de anticuerpo 2º a una dilución final de 1/200, incubamos 1 h a temperatura ambiente en agitación y tubo horizontal.

Retiramos el PBT de las larvas y añadimos la solución ABC (preparada 30 min antes) dejando en agitación 30 min a temperatura ambiente. Hicimos dos lavados de 10 min cada uno con PBS. Añadimos a las larvas el sustrato de la peroxidasa, la solución DAB e incubamos a 4 °C durante 20 min, bajo la lupa añadimos 10 µl de H₂O₂ 0,06 % y esperamos hasta que apareciera el color. Cuando estuvo bien teñida

paramos la reacción lavando con PBS 3 veces durante 5 min. Montamos en glicerol 80 % bajo un cubre elevado con tiras de celo. La observamos al microscopio óptico.

Paraformaldehído: 4 % (peso/ vol) paraformaldehído (Sigma) en PBS (Roche).

PBT1X-0.3 %: 0.3% tritón X-100 (Roche) en PBS 1X (Roche).

Solución de Bloqueo: suero de cabra 5 % y BSA 2 % (peso/ vol) (Roche) en PBT1X-0.3 % (vol/vol).

Solución de tinción de anticuerpo primario (1/200): anticuerpo anti-Kettin en solución de bloqueo.

Solución de tinción de anticuerpo secundario (1/200): anticuerpo anti-rata biotinilado en PBT1X-0.3 %.

ABC: 10 µl de solución A (Avidina), 10 µl de B (Biotina) de Vectastain® Elite ABC kit (Vector Lab) en 1 ml de PBS 1X.

Solución DAB: 20 µl DAB en 400 µl de PBT 1X

H₂O₂: 0.06 % H₂O₂ (Baker) en H₂O

Glicerol: 80 % glicerol (Baker) en H₂O

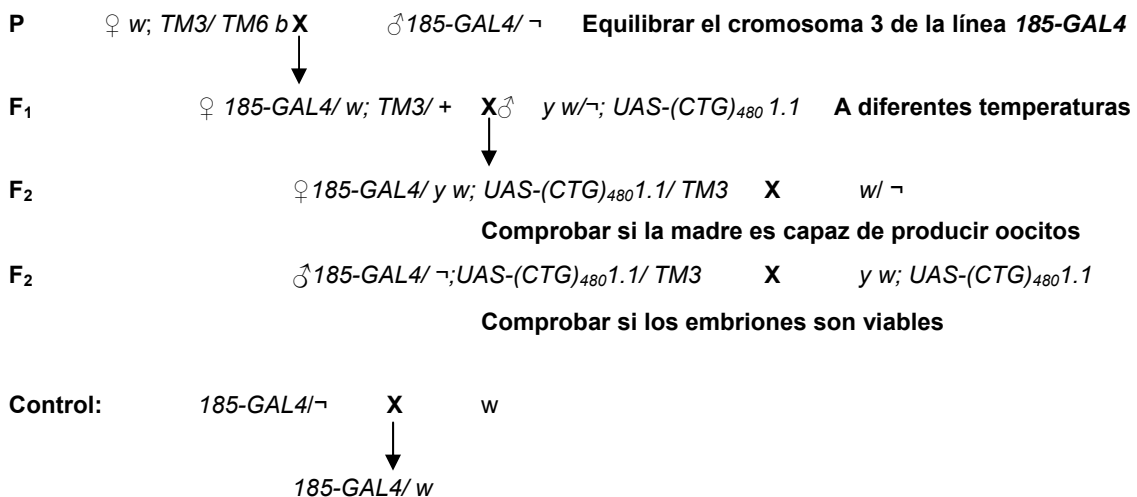
Alfileres de alambre: (ref: TGW0515).

Pinzas finas: (Fine Science).

Silicona Rhodorsil: (VWR Internacional).

2.7. Estudio de la fertilidad

Dirigimos la expresión de las repeticiones CTG en las células foliculares mediante el siguiente cruce:



Las siguientes líneas GAL4 que utilizamos también dirigen la expresión a las células foliculares:

y w 185-GAL4

w c323a-GAL4

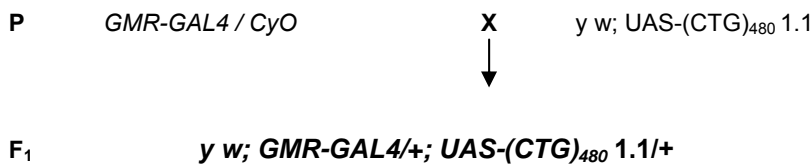
y w 179-GAL4

Material y Métodos

En cada cruce pusimos 2 machos y 3 hembras y lo cultivamos a 25 y 29 °C. Contamos la descendencia de 5 réplicas de cada uno de los cruces durante 6 días.

2.8. Análisis microscópico de retinas en adultos de *D. melanogaster*

Dirigimos la expresión de las repeticiones CTG en el ojo adulto mediante el siguiente cruce:

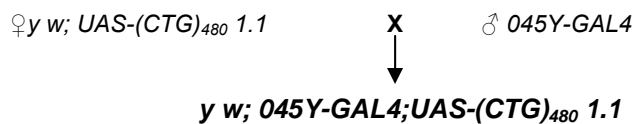


2.8.1. Tejidos embebidos en resina

Utilizamos el mismo protocolo que el del *Apartado 2.6.2* pero en este caso dormimos las moscas y las colocamos de lado, con el ojo que nos interesaba hacia arriba. Cortamos con un bisturí la cabeza y el ojo que estaba en la parte inferior para facilitar la entrada del fijador. Las secciones las observamos al microscopio óptico de contraste de fases.

2.9. Expresión de las (CTG)₄₈₀ en el SNC

Dirigimos la expresión de las repeticiones CTG en los *corpora pedunculata* mediante el siguiente cruce:



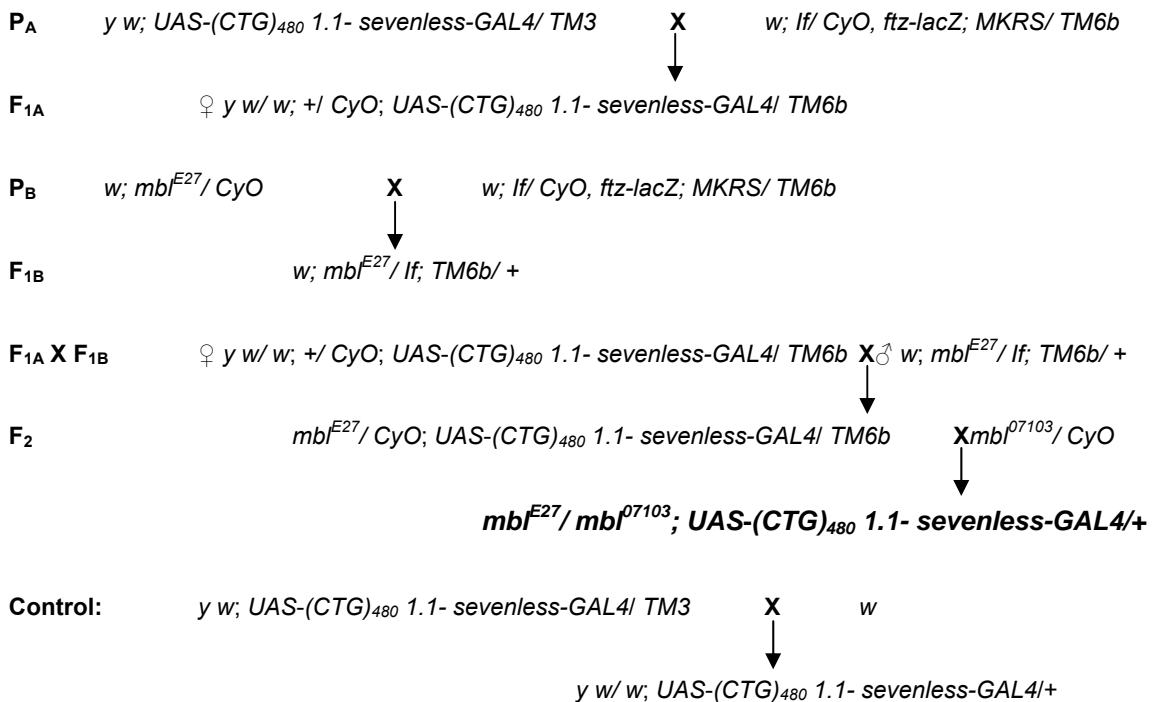
Los cruces se hicieron a 21 °C, 25 °C y 29 °C con las siguientes líneas que dirigen la expresión a los *corpora pedunculata*:

045Y- GAL4
103Y- GAL4
238Y-GAL4
OK107-GAL4

De la descendencia observamos si la expresión de CTG en los *corpora pedunculata* provocaba algún fenotipo y contamos el número de descendientes que nacían.

2.10. Estudio de la interacción genética con *muscleblind*

Dirigimos la expresión de las repeticiones CTG en el ojo adulto de *Drosophila* mediante el siguiente cruce:



2.10.1. Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido

Utilizamos el Método de secado por punto crítico (Sullivan et. al., 2000). Fijamos moscas enteras en solución de fijación durante 2 h y luego las lavamos en agua, las deshidratamos mediante alcoholes al 25 %, 50 % y 75 % a temperatura ambiente durante 12 h cada uno y dos incubaciones con etanol absoluto en iguales condiciones. Hicimos el secado por el método del punto crítico en el cual el estado líquido pasa directamente a la fase gaseosa evitando que se deforme la muestra y la sombreamos con oro- paladio.

Material y Métodos

Solución de fijación: 800 µl paraformaldehído 4 % (peso/ vol) (Sigma), 625 µl glutaraldehído 8 % (vol/ vol) (Fluka), 575 µl PBS 1X (Roche) y una gota de tritón X-100 0.2 % (vol/ vol) (Roche).

2.11. Rastreo genético de modificadores dominantes del fenotipo ojo rugoso

Utilizamos hembras del recombinante *y w; UAS-(CTG)₄₈₀ 1.1- sevenless-Gal4/ TM3* para cruzar con machos de líneas procedentes de colecciones de inserciones letales del elemento P en el cromosoma 2 y 3, así como cepas mutantes para genes que eran de nuestro interés. Los cruces los realizamos normalmente a 25 °C e hicimos un cruce control en paralelo cruzando las hembras recombinantes con machos *white*.

2.12. Ensayo del doble híbrido en *S. cerevisiae*

2.12.1. Clonación

Para ensayar si Aly y Mbl interaccionan físicamente, clonamos cDNAs en pauta en vectores de expresión de levaduras. Para el gen *muscleblind* utilizamos diferentes construcciones: la pauta de lectura de MblA, MblB, MblC, MblD, la zona común de las cuatro isoformas proteicas y los dedos de zinc. Estas seis construcciones las clonamos en el vector pACT2, (Clontech Laboratories) (construcciones cedidas por Marta Vicente).

Para la proteína Aly clonamos un cDNA (LD24793) en pauta en el vector pGBKT7 (Clontech Laboratories). La estrategia de clonación fue diseñar unos cebadores que flanquearan la pauta de lectura de *Aly*, en estos cebadores además añadimos un adaptador que contenía una secuencia diana de corte para el enzima *EcoRI* en el caso del cebador directo (*Alydir*) y *PstI* en el reverso (*Alyrev*). Tras una amplificación del fragmento de la pauta de lectura de *Aly* utilizando la DNA polimerasa *Pwo* (Roche), digerimos el producto de PCR con *EcoRI* y *PstI* y lo ligamos en el vector pGBKT7 que previamente linearizamos con ambos enzimas.

2.12.2. Transformación

La transformación de levaduras la hicimos siguiendo el siguiente protocolo (Ito et al., 1983). Crecimos la cepa AH 109 en 5 ml de medio YPAD y la incubamos a 30 °C

durante toda la noche. Inoculamos 100 ml de medio YPD con el preinóculo y lo dejamos crecer hasta una densidad óptica de 0.5- 0.7 a 600 nm.

Una vez crecido centrifugamos a 5000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y lo lavamos en 20 ml de H₂O estéril, volvimos a centrifugar en iguales condiciones y resuspendimos en 500 µl de LiAc/ TE (1X). A 10 µg de DNA añadimos 10 µl de DNA de salmón (10 mg/ ml) y 50 µl de células de levadura. Posteriormente añadimos 30 µl de TE 10X, 30 µl de LiAc 10X y 240 µl de PEG 50 %. Incubamos durante 30 min a 30 °C con agitación, dimos un choque térmico a 42 °C durante 15 min y centrifugamos a 6000 rpm durante 1 min para recuperar el sedimento de células y resuspenderlas en 100 µl de H₂O estéril.

Sembramos 50 µl en placas sin el aminoácido correspondiente para la prototrofia del plásmido transformado.

2.12.3. Ensayo de interacción

La posible interacción entre Mbl y Aly la realizamos por cotransformación con ambas construcciones en las levaduras de la cepa AH 109. Las levaduras transformadas las sembramos en placas con medio selectivo SD sin adenina, histidina, triptófano y leucina y en medio SD menos restrictivo, es decir sin histidina, triptófano y leucina. De este modo seleccionamos las levaduras que contenían ambos plásmidos. Si Mbl y Aly interaccionaban físicamente, se reconstituiría el factor GAL4 que activaría la expresión de los genes reporteros que son el que codifica para la prototrofia de la adenina y el de la histidina. Por lo tanto estas levaduras serían capaces de crecer en los medios selectivos mencionados arriba (Figura 2.2).

Como control negativo empleamos IRP1 (*iron regulatory protein 1*) clonado en pACT2 obtenido del laboratorio del Profesor M. Wickens (SenGupta et al., 1996) y los dos vectores vacíos, pACT2 y pGBKT7 (*Clontech Laboratorios*).

Material y Métodos

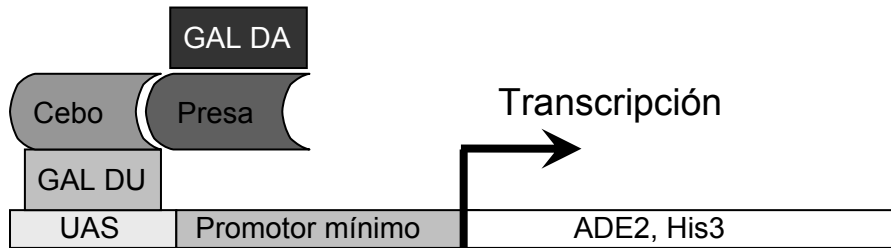


Figura 2.2. Esquema de la interacción entre el cebo y la presa. Si el cebo y la presa interactúan, se reconstituye el factor de transcripción GAL4 (DU: dominio de unión; DA: dominio de activación), éste se une a las secuencias UAS activándose la expresión de genes que confieren prototrofia para la adenina y a la histidina.

Cepa AH109: derivada de la cepa PJ69-2^a (James et al., 1996) MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS -GAL2TATA-ADE2, URA3: MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1.

Medio YPAD: añadir 2 g de extracto de levadura (Pronadisa), 4 g de peptona (Pronadisa) y 4 g de glucosa (Baker) a 100 ml de medio, si es medio sólido añadir 1.6 g de agar (Inter. Genic). Autoclavar y suplementar con adenina

LiAc/TE (1X)

DNA de salmón sonicado (10 mg/ml)

TE 10X

LiAc 10X

Polyethylene glycol: 50 % (Sigma).

DO supplement -Ade/-His/-Leu/-Trp: 0.60 g DO supplement (BD Biosciences) y 26.7 g medio SD en 1 L de H₂O.

Medio SD (synthetic complete drop out): añadir 0.66 g de base nitrogenada para levaduras (Pronadisa), 2 g de glucosa y 10 ml de DO supplement -Ade/-His/-Leu/-Trp a 100ml de medio. Ajustar el pH a 5.6 con NaOH y 1.6 g de agar. Se autoclava y se suplementa con adenina en el caso de medio sólido SD menos restrictivo.

2.13. RT-PCR

Dirigimos la expresión de las repeticiones CTG de modo general en la musculatura mediante el siguiente cruce:



También empleamos la línea $y^w; UAS-(CTG)_{60}$

Control: $y w; UAS-(CTG)_{480} 1.1$ \times $w; +/+$
 \downarrow
 $y w/w; UAS-(CTG)_{480} 1.1/+$

2.13.1. Extracción de RNA total de *D. melanogaster*

Homogeneizamos 50 moscas en 1 ml de TriReagent y los homogenizados estuvieron 5 min a temperatura ambiente. Añadimos 200 μ l de cloroformo y agitamos en el vórtex durante 15 s. Dejamos reposar 5 min a temperatura ambiente y centrifugamos la mezcla a 12000 g durante 15 min a 4 °C. Transferimos la fase acuosa a un tubo nuevo y añadimos 500 μ l de isopropanol. Dejamos en reposo 5 min a temperatura ambiente y centrifugamos a 12000 g durante 10 min a 4 °C. Eliminamos el sobrenadante y lavamos el precipitado de RNA con 1 ml de etanol al 75 % mezclándolo en el vórtex. Centrifugamos a 7500 g durante 5 min a 4 °C y eliminamos el sobrenadante. Secamos el precipitado al aire durante 10 min y lo resuspendimos en 50 μ l de H₂O libre de RNasas.

TriReagent: (Sigma).

2.13.2. Reacción de RT- PCR

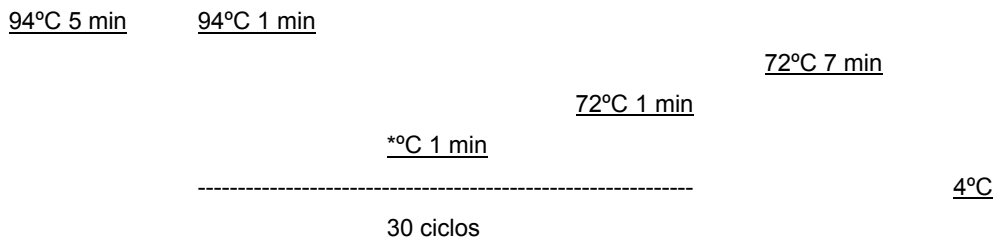
Preparamos la reacción de retrotranscripción y lo sometimos a las siguientes condiciones:

RNA	1 μ g
10 mM cada dNTP	2.0 μ l
hexanucleótidos	2.0 μ l
MgCl ₂	4.0 μ l
Tampón 5 X	4.0 μ l
Inhibidor RNAsa	1.0 μ l
H ₂ O	Completar hasta 20 μ l
AMV retrotranscriptasa	0.8 μ l
	<u>99°C 5 min</u>
	<u>42°C 60 min</u>
	<u>25°C 10 min</u>
	<u>4°C</u>

Material y Métodos

Para la reacción de PCR:

cDNA	4 µl	1 µl (dilución 1/100) para la reacción de control de carga (rp49)
25 mM cada dNTP	0.5 µl	
20 µM cebador dir	0.5 µl	
20 µM cebador rev	0.5 µl	
Tampón 10 X	2.0 µl	
Netzyme	0.6 µl	
H ₂ O	Completar hasta 20 µl	



*65°C para los cebadores Rp49dir y Rp49rev

53°C para los cebadores mblidirE7 y mblrevE11

55°C para los cebadores mblidir10 y mblrevE11

La cuantificación de las bandas se realizó mediante el programa informático *1-D MANAGER*.

Resultados

1. Estudio de la homología funcional entre los genes *muscleblind* humanos y de *Drosophila melanogaster*

La secuenciación de genomas completos desvela la homología de secuencia que existe entre los genes de organismos evolutivamente distantes como pueden ser *Drosophila* y el hombre. Aunque existe normalmente una buena correlación entre conservación de secuencia y de función, se conocen ejemplos en los que dos homólogos de secuencia realizan funciones totalmente distintas. La generación de un modelo en *Drosophila* para la enfermedad humana Distrofia Miotónica tipo I requiere comprobar si la proteína Muscleblind de *Drosophila* y sus homólogas de secuencia en humanos realizan funciones equivalentes. El gen *MBNL1* (*muscleblind-like*) humano codifica para uno de los componentes principales de la ruta de patogénesis de la DM1 ya que MBNL1 se une aberrantemente a los transcritos *DMPK* mutados provocando una falta de función de *MBNL1* (Miller et al., 2000; Kanadia et al., 2003a). Puesto que un modelo de DM1 basado en expresar RNAs con expansiones de repeticiones CUG secuestraría la proteína Muscleblind endógena, este modelo sólo puede reproducir la patología humana si la proteína de la mosca realiza una función molecular equivalente a la humana. Para comprobar esta conservación funcional realizamos inicialmente un estudio de conservación de motivos entre las secuencias humana y de *Drosophila* para posteriormente realizar un experimento de complementación funcional, o rescate, de la mutación *muscleblind* con el gen humano.

1.1. Análisis bioinformático de las secuencias MuscleblindC y MBNL1_{KIAA0428}

El gen *muscleblind* de *Drosophila* transcribe un largo pre-mRNA que por procesado alternativo da lugar al menos a cuatro isoformas denominadas *mbIA*, *mbIB*, *mbIC* y *mbID*. Las proteínas correspondientes comparten gran parte de su extremo N-t pero difieren en el C-t (véase *Apartado 7 de Introducción*). Las búsquedas de secuencias homólogas con la secuencia *muscleblind* de *Drosophila* revelaron la existencia de tres ortólogos humanos *muscleblind-like*, *MBNL1*, *MBNL2* y *MBNL3* que por procesado alternativo originan hasta 9, 3 y 6 isoformas proteicas, respectivamente (Fardaei et al.,

Resultados

2002; Kino et al., 2004, revisado en Pascual et al., 2006). Aunque la mayor identidad nucleotídica se da entre la región codificante de la isoforma *mb1C* y el gen *MBNL2*, con un 50% (Pascual, 2005), distintos datos preliminares sugerían que la isoforma Mb1C y MBNL1 podrían realizar una función molecular semejante, entre ellos:

- La isoforma Mb1C se puede reconocer en distintas especies de Dípteros mientras que las otras no están aparentemente conservadas sugiriendo que esta isoforma es la que realiza una función más importante en la mosca (Pascual, 2005).

- Los transcritos *MBNL1* se expresan principalmente en el músculo esquelético en diferenciación, proponiéndose que *MBNL1* regula, como *muscleblind*, la diferenciación terminal del músculo (revisado en Pascual et al., 2006). *MuscleblindC* es la única isoforma que se detecta en adulto (Vicente et al., 2007).

Alineamos las secuencias proteicas de MBNL1 y Mb1C y analizamos los motivos conservados (Figura 1.1), los cuales se discuten en detalle en los siguientes apartados.

```

MBNL1kiaa0428 1  --NLNMAVSVTPIRDTKWLTLEVCREFQRGTCsrpdTECKFAHPSKSCQVENGRVIACFD
MblC          1  MANVVNMNSLLNGKDSRWLQLEVCREFQRNKCsrdTECKFAHPPANVEVQNGKVTACYD
                *:      *:      :*:** *****.*** *****. . :*:** * **:*

MBNL1Kiaa0428 59  SLKGRCSREN--CKYLHPPPHLktqlEINGRNLIQQKNMAMLAQQMQLANAMMPGAPLQ
MblC          61  SIKGRCNRDKPPCKYFHPPQHLKDQLLINGRNHLALKN---ALMQMgia----pgqPVI
                *:****.**:  ***:** * * * **:* :  * * * * : * * * :

MBNL1Kiaa0428 117  PVPMFVAP-SLATNASAAAFNPYLGPVSPSLVPAEILPTAPMLVTGNPGVPVPAAAAAA
MblC          114  SgqvpavATNPYLTgipansYSPYY--TTGHLVPALLGDP---VTSQLGPVVPQTVQVA
                . : ** . * . * : ** . : * * * : * . * * : * * * . *

MBNL1Kiaa0428 176  AQKLMRTDRLEVCREYQRGNCNRGENDCRFAHPADStmidTNDNTVTVCMDYIKGRCSRE
MblC          169  QQKIPRSDRLEMDVKTVGSFYFDN-----
                **: * : * * * : : . .

MBNL1Kiaa0428 236  KCKYFHPPAHLQAKIKAAQYQVNQAAAAQAAATAAAMgipqavLPPLPKRPALEKTNGAT
MblC          193  -----FQFSGMVPFKRPAAEKSG--I
                * * * * * * * :

MBNL1Kiaa0428 296  AVFNTGIFQYQQALANMQLQQHTAFLPPVPMVHgatpatVSAATTSATSVPFAATATANQ
MblC          212  PVYQPGATAYQQLMQPYVPVSFTGHPPGVPRF-----
                .*:.* * * * : . * . * * * .

MBNL1Kiaa0428 356  IPIISAEHLTSHKYVTQM
MblC          -----

```


Figura 1.1. Alineamiento entre las secuencias proteicas de MuscleblindC y MBNL1 (KIAA0428 cDNA NM_021038). Se comparan las secuencias de aminoácidos y se señalan los residuos idénticos con un **asterisco**, los cambios conservativos con **dos puntos** y los menos conservativos con **un punto**. Las regiones sin conservación significativa se representan con **guiones**. Los dedos de zinc se muestran con **cajas**. Los sitios de fosforilación para la caseína kinasa 2 se representan en **letras minúsculas**. Los sitios de fosforilación de la proteína kinasa C se muestran en **mayúsculas y en negrita**. Los sitios N-miristilación se representan en letra **minúscula y en negrita**. Los sitios de sumolización se muestran con **doble subrayado**. El sitio de fosforilación de la tirosina kinasa se representa en **subrayado** y los residuos aromáticos conservados se muestran en **rojo**. Figura publicada en Monferrer y Artero, 2006.

1.1.1. Conservación de residuos aromáticos críticos para el reconocimiento de RNAs de manera específica de secuencia

El motivo proteico dedo de zinc presente en las proteínas Mbl consiste en tres residuos de cisteína y uno de histidina y se identificó por primera vez en la familia de proteínas TIS11/NUP475/TTP (Gomperts et al., 1990). Los motivos CCCH coordinan átomos de zinc y en el caso de las proteínas TIS11 se unen a secuencias ricas en AU en la región 3'-UTR de algunos mRNAs, conocidas como secuencias ARE, intercalándose residuos de tirosina y fenilalanina conservados a los dinucleótidos UU y AU de la secuencia ARE, respectivamente (Figura 1.2) (Hudson et al., 2004; revisado en Brown, 2005).

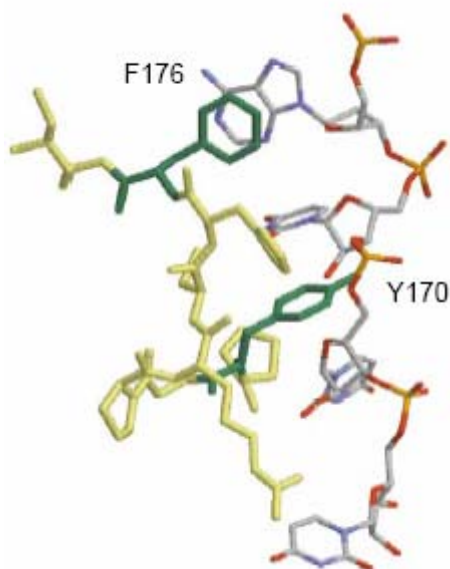


Figura 1.2. El dominio CCCH de TIS11d se une a la secuencia UAUU. La tirosina en posición 170 y la fenilalanina en 176 se intercalan entre el dinucleótido U-U y AU, respectivamente, quedando estabilizado por interacciones semejantes al apilamiento entre bases nitrogenadas en el DNA. El dominio CCCH tiene conservado los residuos aromáticos (verde). La alta afinidad de unión depende de los residuos aromáticos (verde) U8-Tyr170-U9 y U6-Phe176-A7. Figura tomada de Brown, 2005.

Las proteínas Muscleblind contienen cuatro residuos aromáticos conservados, dos fenilalaninas dentro de la secuencia del primer dedo de zinc, una fenilalanina-

Resultados

tirosina (en humanos y mosca, respectivamente) y una tirosina en el segundo dedo de zinc (Figura 1.1). Estos residuos aromáticos también están presentes en la proteína TIS11d-ARE, pudiendo ser estos residuos candidatos para mediar la especificidad de secuencia de la unión de Muscleblind a sus dianas de RNA. La conservación de estos residuos aromáticos entre MBNL1 y MbIC sugiere que pueden unirse a las mismas dianas.

1.1.2. Conservación de sitios de fosforilación

Dentro de los dedos de zinc también hemos encontrado conservados los sitios de fosforilación para la caseína kinasa 2 (CK2) (residuos 31-34, 80-83 y 212-215 en la proteína humana) y los sitios de fosforilación de la proteína kinasa C (PKC) (residuos 59-61; 182-184 y 366-368 en MBNL1) (Figura 1.1). Además de estar conservados entre MbIC y MBNL1 también se detectan en proteínas Muscleblind de organismos evolutivamente distantes (Figura 1.3). Estos sitios de fosforilación podrían tener relevancia en la regulación de la actividad como factor de corte y empalme de Muscleblind porque recientemente se ha descrito que la actividad de la CK2 directamente activa la función de RNPS1 como factor del procesado de pre-mRNAs (Trembley et al., 2005).

1.1.3. Conservación de sitios de sumolización

Los sitios de sumolización (residuos 283-286 en la proteína humana y 201-204 en MbIC) se encuentran conservados en ambas proteínas (Figura 1.1). La sumolización consiste en la unión covalente de una proteína similar a la ubiquitina denominada SUMO (*Small Ubiquitin-related MOdifier*) a lisinas específicas de las correspondientes proteínas diana. La sumolización participa en una serie de procesos celulares como el transporte nuclear, la regulación transcripcional, la apoptosis, la localización subcelular y la estabilidad de las proteínas (Muller et al., 2001). Por lo tanto la conservación de este sitio SUMO sugiere que esta modificación en las proteínas Muscleblind puede ser relevante para explicar que Muscleblind C y MBNL1 se localicen en el núcleo y las demás isoformas proteicas se localicen predominantemente en el citoplasma.

1.1.4. Otros motivos

Las proteínas Muscleblind también tienen conservadas regiones ricas en alaninas, fenilalanina y prolinas aunque se desconoce su relevancia funcional. Los dominios ricos en prolinas se han asociado con las interacciones proteína-proteína (Kay et al., 2000). El dominio WW se localiza mayoritariamente en la región rica en prolinas. Este dominio interviene en la interacción con proteínas con motivos que contienen fosfoserina o fosfotreonina. Este dominio se asocia frecuentemente con proteínas que participan en procesos de transducción de señales. Transductores de señal que contiene este dominio WW podrían interaccionar con los sitios diana serina fosforilada o treonina fosforilada en proteínas Muscleblind para inhibir o activar su actividad como reguladores del procesado alternativo. Todas estas regiones también están conservadas en otros organismos sugiriendo que son secuencias importantes para la función de la proteína (Figura 1.3).

Específico de proteína humana es el sitio de fosforilación de la tirosina kinasa (residuos 63-71; 231-239). Tampoco los sitios de N-miristilación, que consiste en añadir un grupo acilo al amino terminal de la glicina, están claramente conservados. Pueden encontrarse en ambas proteínas aunque en distintas posiciones (residuos 106-111; 115-120; 128-133 en MuscleblindC y los residuos 273-278 y 329-334 en MBNL1) (Figura 1.1). Esta modificación se ha demostrado que es relevante para la localización subcelular de algunas proteínas y para la estabilización de la estructura proteica.

Resultados

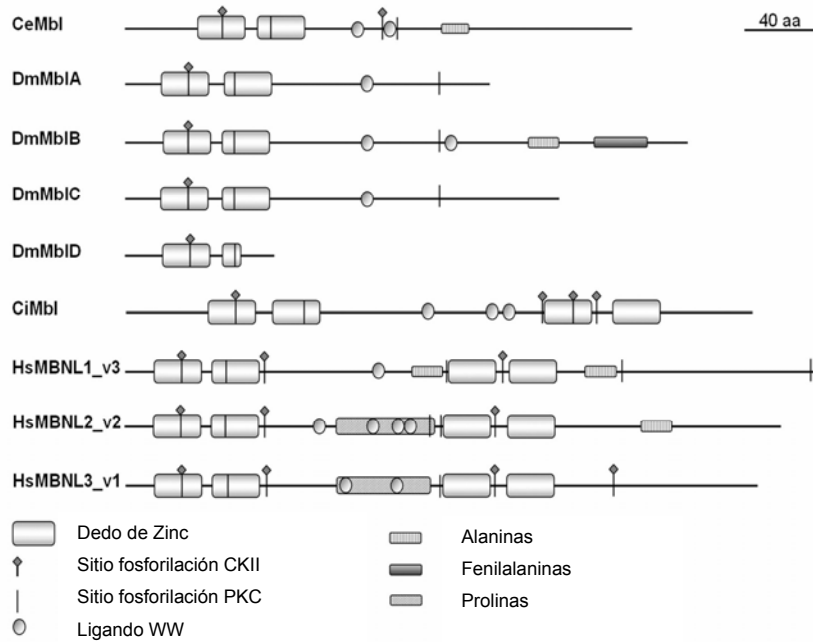


Figura 1.3. Representación de los motivos encontrados en las proteínas Muscblind de distintos organismos. Se muestra como una línea horizontal las proteínas Muscblind de *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Ciona intestinales* (Ci) y *Homo sapiens* (Hs). Figura publicada en Pascual et al., 2006.

El análisis detallado de las secuencias de MbIC y de MBNL1_{KIAA0428} nos reveló la conservación de distintos residuos críticos para el reconocimiento específico de secuencia de RNAs diana así como de distintos motivos para la modificación post-traducciona de ambas proteínas. Estos resultados eran congruentes con una conservación de la función de ambas proteínas.

1.2. Experimentos de complementación funcional *in vivo*

Tras encontrar conservados distintos motivos y elementos estructurales entre las proteínas MbIC y MBNL1 llevamos a cabo un experimento de rescate del fenotipo mutante de *muscleblind* con el gen humano como test genético para demostrar la conservación funcional. Rescates semejantes con las isoformas MbIA, MbIB y MbIC nos sirvieron como control positivo del experimento y nos permitieron comprobar si las isoformas proteicas de Muscblind eran redundantes en este ensayo o mostraban distintas actividades.

Para llevar a cabo este experimento disponíamos en el laboratorio de líneas que contenían los transgenes *UAS-mblA*, *UAS-mblC* y *UAS-MBNL1* (cDNA KIAA0428, proteína NM_021038) (Garcia-Casado et al., 2002). Para obtener líneas transgénicas *UAS-mblB*, clonamos el cDNA *mblB* en el vector pUAST y transformamos la línea germinal de *Drosophila*. Obtuvimos 10 líneas transgénicas y analizamos la expresión del transgén en ojo adulto de *Drosophila* con líneas *GAL4* produciendo un fenotipo de ojo rugoso. La expresión fue similar en todos ellos, presentaron la misma intensidad de rugosidad, de modo que escogimos la línea 2.1 para realizar el experimento de rescate.

En este experimento de rescate empleamos el sistema *GAL4/UAS* para dirigir la expresión de distintos transgenes en un fondo mutante *muscleblind*. Utilizamos dos alelos de falta de función de *muscleblind*, los alelos letales *mbl^{E27}* y *mbl^{E16}* (Begemann et al., 1997; Artero et al., 1998). Los embriones mutantes *muscleblind* mueren como larvas de primer estadio completamente formadas pero incapaces de eclosionar. Este es un fenotipo en el que se puede detectar una mejoría con facilidad simplemente contando el número de embriones capaces de eclosionar. En estos experimentos colocamos en *trans* los dos alelos mutantes por pérdida de función *mbl^{E27}* y *mbl^{E16}* para evitar que una segunda mutación en uno de los cromosomas mutantes enmascarara un posible rescate de la letalidad.

La línea *GAL4* utilizada para el rescate debe reproducir el patrón endógeno de *muscleblind* en la medida de lo posible. Puesto que no existe ninguna línea que se exprese exactamente igual que *muscleblind*, utilizamos la línea *daughterless-GAL4* (*da-GAL4*) de expresión generalizada en el embrión asegurándonos de este modo que distintos tejidos que expresan *muscleblind*, tanto de origen ectodérmico (SNC, órgano de *Bolwig* que contiene los fotorreceptores larvarios) como mesodérmico (musculatura somática, visceral, faríngea, y músculos que sirven de sostén para el corazón conocidos como "*alary muscles*") expresaban el transgén correspondiente. Por lo tanto la expresión de *UAS-mblA*, *UAS-mblB*, *UAS-mblC* y *UAS-MBNL1* en embriones mutantes *muscleblind* se hizo de forma generalizada utilizando la línea *da-GAL4* (tal como se describe en el *Apartado 2.3 de Material y Métodos* y en la Figura 1.4) cuantificando qué transgén proporcionaba mayor rescate por el porcentaje de embriones mutantes que fueran capaces de eclosionar como larvas de primer estadio.

Resultados

$y^1w^{1118}; mbl^{E27}/CyO y^+$; *da-GAL4* X $y^1w^{1118}; mbl^{E16}/CyO y^+$; *UAS-mblA, B, C* ó *MBNL1*



$y^1w^{1118}; mbl^{E27}/mbl^{E16}; da-GAL4/UAS-mblA, B, C ó *MBNL1*$

$y^1w^{1118}; mbl^{E27}/CyO y^+$; *da-GAL4/UAS-mblA, B, C* ó *MBNL1*

$y^1w^{1118}; mbl^{E16}/CyO y^+$; *da-GAL4/UAS-mblA, B, C* ó *MBNL1*

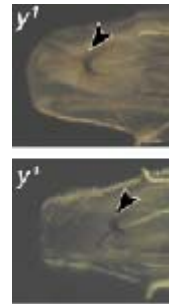


Figura 1.4. Esquema de los cruces realizados en los experimentos de rescate. Se cruzaron cepas homocigotas para los transgenes indicados por otras homocigotas para *da-GAL4* en fondos heterocigotos para una mutación *muscleblind* y con un cromosoma equilibrador especial que permitía el genotipado visual de las larvas. Los genotipos de las larvas heterocigotas y mutantes para *muscleblind* se distinguen por la pigmentación de las mandíbulas. El cromosoma equilibrador *CyO* contiene una copia silvestre del gen *yellow* proporcionando un color negro en las mandíbulas, mientras que las larvas mutantes homocigotas muestran las mandíbulas amarillas por el fondo genético mutante *yellow* (y^1). En el panel de la derecha se muestran ejemplos de mandíbulas amarillas (y^1) y negras (y^+).

Control previo al experimento de rescate: análisis de los alelos mutantes *muscleblind*

Nos propusimos cuantificar el fenotipo de letalidad embrionaria producida por la pérdida de función *muscleblind*. Analizamos embriones del stock mbl^{E27} equilibrado con el cromosoma *CyO* y^+ y detectamos un 1% de larvas mutantes que habían conseguido eclosionar. Simultáneamente analizamos la combinación de los dos alelos mutantes por pérdida de función mbl^{E27} y mbl^{E16} y no detectamos ninguna larva mutante. Estos datos nos sugirieron que el alelo mbl^{E16} era más fuerte que mbl^{E27} .

Comprobada la letalidad embrionaria del heterocigoto compuesto para *muscleblind* (mbl^{E27}/mbl^{E16}) procedimos a comprobar si los distintos transgenes se expresaban en niveles equivalentes.

Control previo al experimento de rescate: efecto de posición sobre los transgenes

El lugar de inserción en el genoma de los transgenes puede conducir a efectos de posición que alteren la accesibilidad de la maquinaria transcripcional a los mismos. Para comprobar si existen diferencias en el grado de expresión de los transgenes los expresamos en el compartimiento posterior de los segmentos embrionarios según el patrón de expresión de la línea *engrailed-GAL4* porque manifiesta un patrón distinto del endógeno, y por tanto fácil de cuantificar. En estos embriones detectamos los transcritos *mbIA*, *mbIB* y *mbIC* con una sonda complementaria a la región codificante para la zona común de las tres isoformas para que detectara todas ellas con la misma eficiencia. De estos experimentos de expresión ectópica e hibridación *in situ* concluimos que los tres transgenes se expresaban con igual intensidad (Figura 1.5).

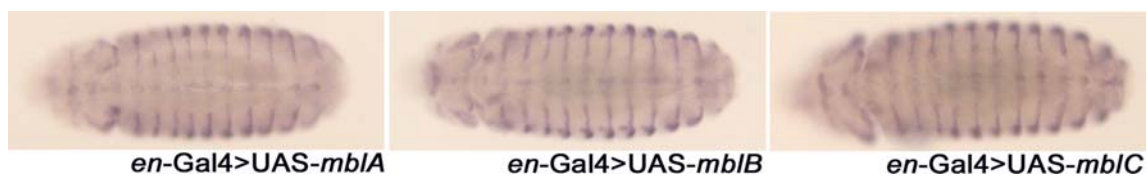


Figura 1.5. Expresión equivalente de los transgenes UAS-*mbIA*, UAS-*mbIB* y UAS-*mbIC*.

Hibridaciones *in situ* en embriones de *D. melanogaster* con una sonda anti-sentido del gen *muscleblind*. En los tres genotipos se observa un patrón en bandas compatible con el patrón del gen *engrailed* prácticamente de igual intensidad con el mismo tiempo de revelado de la señal. En el control negativo la sonda con sentido del gen *muscleblind* no reveló ninguna señal (dato no mostrado).

Una vez descartados efectos de posición sobre los transgenes que interfirieran con su capacidad de rescate del fenotipo de letalidad embrionaria de *muscleblind*, calculamos el porcentaje de rescate para la expresión generalizada de cada uno de ellos en el embrión. En estos experimentos encontramos que la expresión de *mbIA* en embriones mutantes era capaz de rescatar la letalidad embrionaria en un 27.2 % de los embriones mutantes, *mbIB* en un 8.9 %, la expresión de *mbIC* rescataba en un 71.4 % y el gen humano en un 78.1 % (Figura 1.6).

Resultados

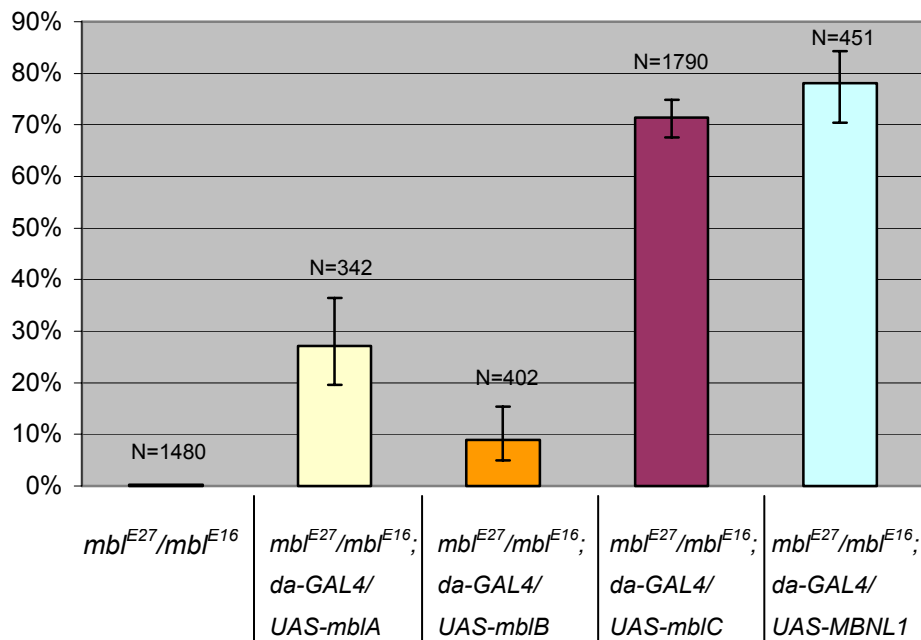


Figura 1.6. Las proteínas MuscblindC y MBNL1 son las que más rescatan el fenotipo mutante *muscblind*. Se representa en el eje de las ordenadas el porcentaje de larvas mutantes rescatadas con los genotipos indicados en el eje de las abscisas. También se muestra un control heterocigoto compuesto (mbl^{E27}/mbl^{E16}) que consiste en un recuento en paralelo del número de larvas que emergen en la misma combinación de alelos *muscblind* mutantes sin ningún aporte de las proteínas MblA, MblB, MblC y MBNL1. Para calcular los intervalos de confianza utilizamos valores de n que son el número esperado de mutantes y valores de k que representan el número de mutantes que nacieron. Los valores n fueron 114, 134, 596 y 150, y los valores k 31, 12, 423 y 117 para *mblA*, *mblB*, *mblC* y *MBNL1*, respectivamente. **N** indica el número total de embriones contabilizados.

En estas condiciones experimentales MblC y MBNL1 fueron las proteínas que más rescataron el fenotipo mutante, destacando que la proteína humana fuera más eficiente en este rescate que una isoforma del propio gen *muscblind*.

Calculamos los intervalos de confianza al 95% en todos los rescates de las isoformas proteicas de Muscblind y de MBNL1 (Figura 1.6), y pudimos concluir que las diferencias entre MblC y MBNL1 no eran estadísticamente significativas pero en cambio, había diferencias significativas entre las distintas isoformas de *Drosophila*. De modo que las distintas isoformas de *muscblind* se comportaron de distinto modo en este ensayo funcional *in vivo*. Esto sugiere que, aunque su función sea parcialmente redundante (todas rescatan), en condiciones normales podrían realizar funciones distintas.

MbIC y MBNL1 eran las proteínas que más rescataban y según los intervalos de confianza podíamos asegurar con un 95% de fiabilidad que no había diferencias entre ellas. Aún así aplicamos un segundo test estadístico con los datos de rescate de estas dos proteínas. Aplicamos el test exacto de *Fisher* para examinar si había asociación entre el genotipo y grado de rescate. Vimos que no existía relación estadísticamente significativa ($p=0.48$) entre el genotipo de las moscas y el porcentaje de rescate. La diferencia que observamos en el grado de rescate entre MbIC y MBNL1 probablemente se debía al azar.

Como medida independiente del rescate utilizamos el fenotipo de hipercontracción abdominal característico de larvas mutantes *muscleblind* observando la cutícula de los embriones de *Drosophila*. Las cutículas diferencian un patrón de bandas ventral de unas estructuras quitinosas llamadas *dentículos* que nos sirven como marcadores morfológicos del grado de contracción del abdomen, lo que, a su vez, resulta un indicador del grado de contracción de la musculatura subyacente. Este fenotipo mejoró sensiblemente con la expresión de la proteína MuscleblindC y MBNL1 (Figura 1.7). Además, como confirmación de la recuperación de la función locomotora de las larvas transferimos larvas rescatadas a una placa de puesta nueva para observar su comportamiento. Aunque las larvas rescatadas con MuscleblindC y MBNL1 se desplazaban, recorrían distancias menores y eran notablemente menos activas que las larvas heterocigotas. Estudiamos la longevidad de las larvas rescatadas y observamos que morían aproximadamente a las 50 horas de eclosionar sin mudar al segundo estadio larvario.

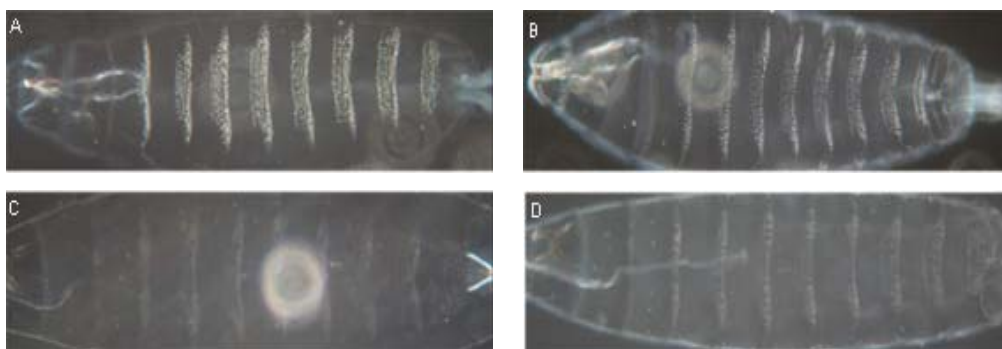


Figura 1.7. La expresión de MuscleblindC y MBNL1 rescata el fenotipo de hipercontracción abdominal de los mutantes *muscleblind*. Se muestran preparaciones de cutículas de (A) larvas silvestres, (B) $y^1w^{1118}; mb^{E27}/mb^{E16}$, (C) $y^1w^{1118}; mb^{E27}/mb^{E16}; da-GAL4/UAS-mbIC$ y (D) $y^1w^{1118}; mb^{E27}/mb^{E16}; da-GAL4/UAS-MBNL1$. Obsérvese la disposición regular de los dentículos en las larvas silvestres. En el abdomen hipercontraído de los embriones mb^{E27}/mb^{E16} los dentículos se muestran más juntos, mientras que en los embriones rescatados los dentículos se disponen casi normalmente.

Resultados

Los datos que obtuvimos indicaban que el aporte de las proteínas Muscleblind de *Drosophila* y humana de manera ubicua en el embrión era capaz de rescatar el fenotipo mutante *muscleblind*. Muscleblind se expresa normalmente en dos tejidos fundamentalmente: SNC y sistema muscular. Nos propusimos comprobar si la expresión de los transgenes *UAS-muscleblindC* y *UAS-MBNL1* solamente en el sistema muscular sería suficiente para rescatar la letalidad. Si este rescate fuera igual de eficiente que la expresión general, nos indicaría que la expresión de *muscleblind* en el SNC no es necesaria para la viabilidad del embrión, mientras que si el rescate fuera menor, pero significativamente distinto de cero, indicaría que tanto la expresión en el SNC como en el sistema muscular es necesaria para un rescate completo, pero la expresión en este último tejido es suficiente para recuperar la viabilidad de los embriones. Para este fin expresamos las proteínas que más rescataban, MuscleblindC y MBNL1, en la musculatura embrionaria utilizando el patrón de expresión del gen *Dmef2*. Realizamos los cruces correspondientes utilizando la línea *Dmef2-GAL4* (Figura 1.8).

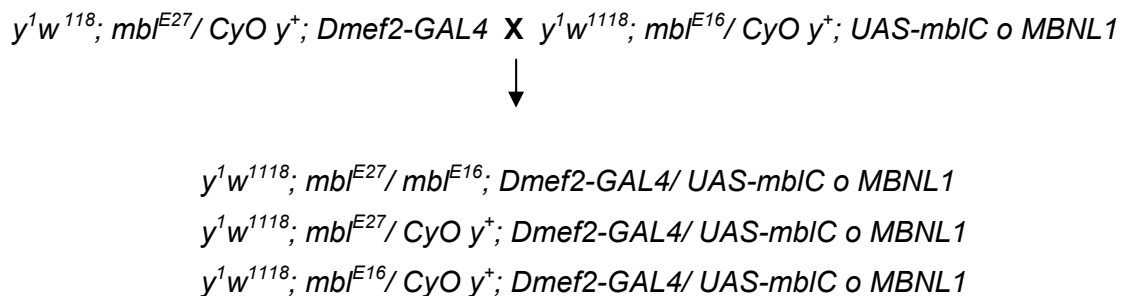


Figura 1.8. Esquema de los cruces realizados para la expresión de MuscleblindC y MBNL1 en la musculatura embrionaria. Se cruzó una cepa homocigota para *Dmef2* en un fondo heterocigoto para *muscleblind* y con un cromosoma equilibrador que nos permitía el genotipado visual de las larvas, con otra línea homocigota para los transgenes *UAS-mbIC* o *UAS-MBNL1* en un fondo equivalente. De la descendencia interesaba el genotipo heterocigoto compuesto para *muscleblind* (mbf^{E27}/mbf^{E16}) que expresa *UAS-muscleblindC* o *UAS-MBNL1* en músculo.

Contamos el número de larvas con mandíbulas amarillas, mutantes *muscleblind* viables, y calculamos el porcentaje de rescate. Los resultados que obtuvimos fueron que un 9.1 % de los embriones eran capaces de eclosionar cuando expresábamos MbIC en el sistema muscular mientras que un 17.8 % lo era cuando hubo un aporte de la proteína MBNL1 en las mismas condiciones experimentales

(Figura 1.9). De modo que encontramos una diferencia de aproximadamente un 60% entre la expresión generalizada de las dos proteínas a la exclusivamente muscular.

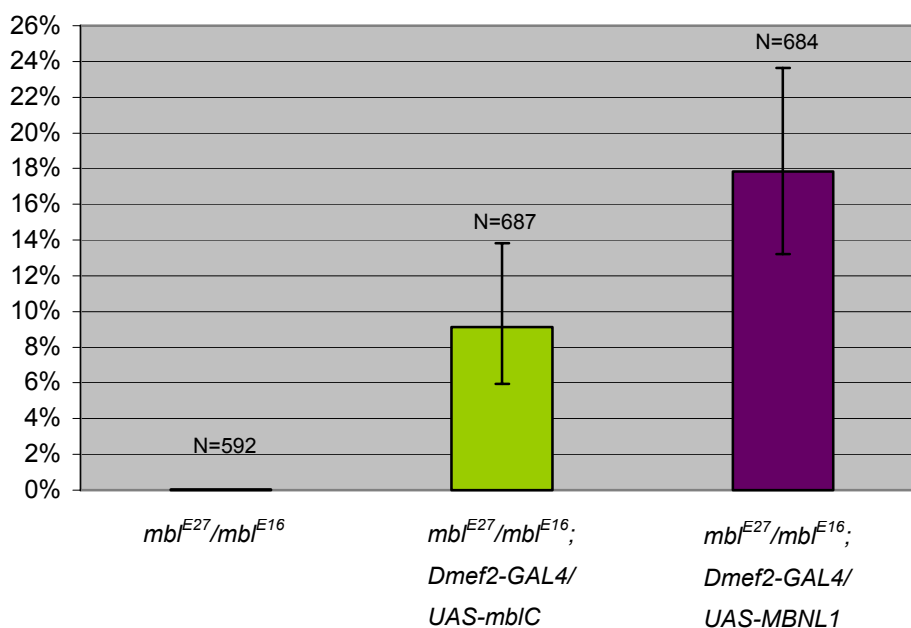


Figura 1.9. La expresión artificial de MbIC y MBNL1 en la musculatura embrionaria mediante el sistema GAL4/UAS es capaz de rescatar la letalidad. Se representa en ordenadas el porcentaje de larvas mutantes rescatadas con los genotipos indicados en el eje de las abscisas. También se muestra un control (mbf^{E27}/mbf^{E16}) que consiste en un recuento del número de larvas que emergen en la misma combinación mutante para *muscleblind* sin ningún aporte de las proteínas MbIC y MBNL1. Se representan los intervalos de confianza, el valor N representa el número total de embriones contabilizados, n es el número esperado de mutantes (229 y 228 para MbIC y MBNL1, respectivamente) y k es el número de mutantes que nacieron (21 y 49 para MbIC y MBNL1, respectivamente). Según los datos no hay diferencias significativas entre el rescate de MbIC y de MBNL1.

Calculamos los intervalos de confianza y pudimos asegurar al 95% de fiabilidad que no había diferencias significativas en el grado de rescate entre *MuscleblindC* y MBNL1 cuando se expresaban en el músculo, de modo semejante a cuando se expresaban de forma generalizada con *daughterless-GAL4*.

Estos datos muestran, por un lado, que *Muscleblind* es requerido tanto en el SNC como en la musculatura pues detectamos una reducción importante en la viabilidad de los embriones mutantes *muscleblind* cuando la expresión se restringe al sistema muscular respecto de cuando el aporte exógeno es general (de un 71.4% a un 9.1%). Por otro lado, muestran que la expresión en el músculo controlada por las regiones reguladoras del gen *Dmef2* es suficiente para que algunos embriones mutantes puedan ahora eclosionar, lo que sugiere que la falta de función de

Resultados

muscleblind en los músculos es una de las causas primarias de la incapacidad de los embriones mutantes *muscleblind* para nacer.

En su conjunto estos datos demuestran que existe conservación funcional entre las proteínas Muscleblind de *Drosophila* y humanas y sugieren que las distintas isoformas de Muscleblind podrían realizar distintas funciones moleculares al menos en embriones. Puesto que pretendíamos generar un modelo de DM1 en *Drosophila* basado en expresar RNAs mutantes portadores de expansiones largas de repeticiones CUG, y estos RNAs tóxicos unen aberrantemente las proteínas MBNL humanas provocando una falta de función parcial de las mismas responsable de muchos de los síntomas de la enfermedad, sólo si las proteínas Muscleblind de *Drosophila* y las humanas realizan funciones equivalentes podremos reproducir la enfermedad humana en la mosca secuestrando sus proteínas Muscleblind endógenas. Una vez demostrada esta conservación funcional con un test genético exigente como es rescatar la viabilidad de embriones mutantes *muscleblind* con el gen humano procedimos a generar moscas transgénicas que expresaban RNAs con expansiones CUGs.

2. Generación de un modelo de DM1 en *Drosophila*

Mediante mecanismos que todavía no están totalmente esclarecidos, la expresión de transcritos que contienen expansiones de repeticiones CUG no codificantes conduce a alteraciones en el procesado de transcritos específicos que explican varios de los síntomas de la DM1. Para esclarecer la patogénesis de la DM1, transformamos la línea germinal de *Drosophila* con transgenes que expresaran RNAs no traducibles con expansiones CUG bajo el control del sistema *GAL4/UAS*. De este modo pretendíamos reproducir aspectos de la DM1 al expresar estos transgenes en tejidos específicos para posteriormente identificar genes que pudieran estar implicados en la ruta de patogénesis de esta enfermedad o de otras debidas a expansiones del mismo tipo.

2.1. Obtención de moscas transgénicas

Disponíamos de un clon que contenía el extremo 3'UTR del gen *DMPK* mutado con 54 repeticiones CTG (Miller et al., 2000). Mediante la digestión con enzimas de restricción liberamos las 54 repeticiones CTG y las clonamos en el vector pUAST de *Drosophila* (Figura 2.1A). Al comprobar mediante el patrón de corte de distintos enzimas de

restricción y secuenciación comprobamos que el número de repeticiones CTG había aumentado a 60 (Figura 2.1B). Estas secuencias ricas en CG son muy inestables en las células bacterianas pudiéndose producir deleciones o expansiones. Esta secuencia de 60 repeticiones CTG está en el límite de resultar patogénica en humanos.

La obtención de un inserto que contuviera una expansión larga de repeticiones CTG que estuviera dentro del rango patogénico fue más complicada. Intentamos clonar las expansiones de repeticiones CTG procedentes de DNA de pacientes con DM1 (muestras procedentes del *Hospital La Fe de Valencia*), pero dada la naturaleza repetitiva de las secuencias no fue posible. Decidimos utilizar una construcción ya descrita que contenía 480 repeticiones CTG aunque interrumpidas por regiones pequeñas con otras secuencias cada 20 repeticiones CTG (Figura 2.1C) (Philips et al., 1998).

Los dos transgenes que generamos para este modelo, *UAS-(CTG)₆₀* y *UAS-(CTG)₄₈₀* activan su expresión en un determinado momento y tejido.

UAS de los cinco sitios de unión de la proteína GAL4 (**círculos en A y letra en azul en B y C**). Las 480 repeticiones CTG están formadas por secuencias 5'-TCGA(CTG)₂₀C-3' repetitivas. Se indican las secuencias que interrumpen las repeticiones en **letra minúscula verde en (C)**. También se representa la caja TATA (**flecha negra en A y letra gris oscuro en B y C**), el terminador SV40 (**línea negra vertical en A y letra gris claro en B y C**) y el gen *miniwhite* como marcador fenotípico (**flecha roja en A**). Esta construcción está flanqueada por repeticiones terminales invertidas del elemento P (**cajas naranjas en A**) que posibilitan su inserción en el genoma.

Las clonaciones de las repeticiones del trinucleótido (CTG)₆₀ y (CTG)₄₈₀ en el vector pUAST las comprobamos mediante el patrón de corte de distintos enzimas de restricción y secuenciación (Figura 2.1B y C). Microinyectamos las construcciones del triplete CTG en la línea germinal de embriones de *Drosophila*. Estos embriones microinyectados eran mosaicos para la inserción del elemento P y algunos individuos de la descendencia F₁ serían transgénicos si la inserción ocurría en la línea germinal. Se seleccionaron por la pigmentación de los ojos porque la inserción contenía como marcador fenotípico el gen *miniwhite*.

Línea transformante	Cromosoma	Posición génica	Secuencia PCR inversa
<i>y w</i> ; UAS-(CTG) ₆₀ 1.2	2		
<i>y w</i> ; UAS-(CTG) ₆₀ 2.2	2		
<i>y w</i> ; UAS-(CTG) ₆₀ 4.5	X		
<i>y w</i> ; UAS-(CTG) ₆₀ 8.1	2		
<i>y w</i> ; UAS-(CTG) ₆₀ 9.2	2		
<i>y w</i> ; UAS-(CTG) ₄₈₀ 1.1	3		
<i>y w</i> ; UAS-(CTG) ₄₈₀ 2.2	2 (53F8)	Gst S1	CTTCAGGCGTTTGACTGCGT
<i>y w</i> ; UAS-(CTG) ₄₈₀ 3.3	2		
<i>y w</i> ; UAS-(CTG) ₄₈₀ 6.4	3 (93F14)	pit	TGCAnAAGGTGCGACCCTAT
<i>y w</i> ; UAS-(CTG) ₄₈₀ 7.1	X		
<i>y w</i> ; UAS-(CTG) ₄₈₀ 8.2	2		
<i>y w</i> ; UAS-(CTG) ₄₈₀ 9.2	X (1E4)	CG3638	GGCTCTGTCGCTGTCAGAAA
<i>y w</i> ; UAS-(CTG) ₄₈₀ 10.1	-		
<i>y w</i> ; UAS-(CTG) ₄₈₀ 13.1	-		

Tabla 2.1. Mapeo de los lugares de inserción de los transgenes utilizados en este estudio. Se indica el número de la línea transformante: el primer número indica el transformante original del que procede y el segundo número, el suceso de inserción. También se indica el cromosoma donde se ha producido la inserción, así como el nombre del gen donde se ha insertado en las líneas 2.2, 6.4 y 9.2. Se incluyen los primeros 20 nucleótidos de la secuencia obtenida por PCR inversa.

Obtuvimos seis líneas transgénicas de la construcción UAS-(CTG)₆₀ y nueve de la construcción UAS-(CTG)₄₈₀. Mediante técnicas genéticas estándar (véase *Apartado 2.1.2 de Material y Métodos*) localizamos en qué cromosoma se habían insertado los

2.2. Expresión de los transgenes *UAS-(CTG)₆₀* y *UAS-(CTG)₄₈₀*

Tras obtener distintas líneas de moscas con los transgenes *UAS-(CTG)₆₀* y *UAS-(CTG)₄₈₀* procedimos a expresar estas repeticiones en distintos tejidos de la mosca empleando un conjunto de líneas *GAL4* (Tabla 2.2).

Nº transformante	<i>t80-GAL4</i>		<i>sev-GAL4</i>		<i>gmr-GAL4</i>			<i>Mhc-GAL4</i>		
	21	25 °C	19	25 29 °C	21	25	29 °C	21	25	29 °C
1.1	SI		SI		SI	SI		SI	SI	SI
2.2	SI	SI	SI	SI				SI	SI	
3.3	SI		SI							
6.4	NO		SI							
7.1	SI		NO		NO					
8.2										
9.2				SI						SI
10.1										NO
13.1				SI						

Tabla 2.2. Los transformantes muestran fenotipos al expresar *UAS-(CTG)₄₈₀* en distintos tejidos.

Se indica el número de transformante que contiene la construcción *UAS-(CTG)₄₈₀*. La expresión fue dirigida por *t80-GAL4* en los discos imaginales, *sev-GAL4* y *GMR-GAL4* en el ojo y *Mhc-GAL4* en músculo general. Se indica la temperatura a la que se realizaron los cruces.

La expresión de la construcción *UAS-(CTG)₆₀* no produjo ningún fenotipo incluso expresándola a 29 °C. Estos resultados eran congruentes con otros previos pues se ha descrito que en moscas transgénicas que expresan 162 repeticiones CTG tampoco se detecta ningún fenotipo (Houseley et al., 2005).

Escogimos la línea 1.1 que contenía la construcción *UAS-(CTG)₄₈₀* para analizar qué fenotipos producía la expresión de las expansiones con diferentes líneas *GAL4* que se expresaban en tejidos donde se observan defectos en pacientes con DM1 (Tabla 2.3).

Resultados

<i>da-GAL4</i>	No se detectó ningún fenotipo
<i>ey-GAL4</i>	No se detectó ningún fenotipo
<i>sev-GAL4</i>	Fenotipo de ojos rugosos
<i>gmr-GAL4</i>	Fenotipo de ojos rugosos (Figura 2.4)
<i>t80-GAL4</i>	Fenotipo de alas extendidas, moscas incapaces de volar
<i>sd-SG29.1-GAL4</i>	Fenotipo de alas plegadas
<i>Mhc-GAL4</i>	Fenotipo de alas hacia arriba, moscas incapaces de volar (Figura 2.3)
<i>Act88F-GAL4</i>	No se detectó ningún fenotipo
<i>Dmef-GAL4</i>	Fenotipo de comportamiento, moscas nerviosas
<i>elav-GAL4</i>	No se detectó ningún fenotipo
<i>cardioblast-GAL4</i>	No se detectó ningún fenotipo

Tabla 2.3. Fenotipos producidos por la expresión de $UAS-(CTG)_{480}$ en diferentes tejidos. Se indican las líneas *GAL4* ensayadas que dirigen la expresión de las repeticiones CTG y su correspondiente efecto. El tejido en el que se expresa cada línea *GAL4* está detallado en el *Apartado 1.1 de Material y Métodos*. El transformante ensayado fue el 1.1 a la temperatura de 25 °C.

Expresamos el transgén $UAS-(CTG)_{480}$ en el músculo con el patrón de expresión de la cadena pesada de la Miosina (*Mhc*, *myosin heavy chain*) y observamos que las moscas presentaban un fenotipo de alas hacia arriba siendo incapaces de volar (Figura 2.3). En cambio si que podían caminar y saltar, y la fertilidad y longevidad no se vio alterada de manera significativa al expresar las repeticiones en este patrón muscular.

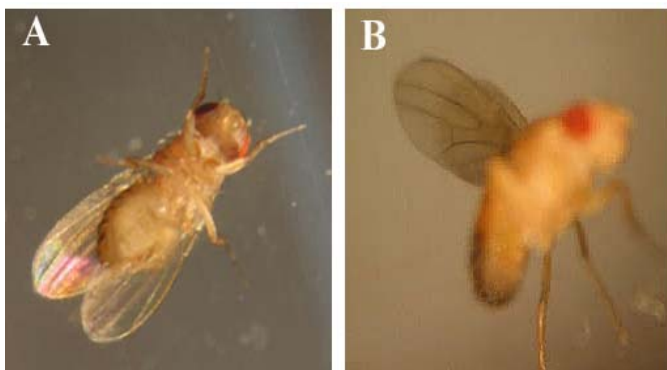


Figura 2.3. La expresión de $(CTG)_{480}$ en el músculo produce un fenotipo de alas hacia arriba. (A) Moscas control y *w; Mhc-GAL4/+*. (B) Moscas que expresan RNAs $(CUG)_{480}$ con el genotipo *w; Mhc-GAL4/UAS-(CTG)_{480} 1.1*. Experimento realizado a 25 °C.

El ojo adulto de la mosca es compuesto y está formado por unos 800 ojos sencillos u omatidios. El ojo adulto procede del disco imaginal ojo-antena de la larva. Expresamos 480 repeticiones del triplete CTG en el disco imaginal de ojo-antena bajo

el control de *gmr* (*glass multiple reporter*). Este promotor está compuesto por cinco sitios de unión para el factor de transcripción GLASS derivado del gen *rhodopsin 1* (Moses y Rubin, 1991). Con esta línea se potencia la expresión de las repeticiones CTG en todos los tipos celulares que forman la retina, produciendo un fenotipo de ojo rugoso por la desorganización de los omatidios y una reducción del tamaño del ojo (Figura 2.4).

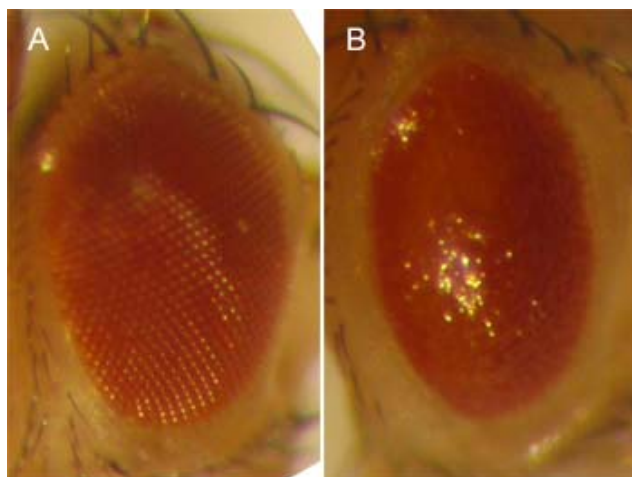


Figura 2.4. La expresión de $(CTG)_{480}$ en la retina produce un fenotipo de ojo rugoso. (A) Moscas control *gmr-GAL4/+*. (B) Moscas que expresan RNAs $(CUG)_{480}$ en las células de la retina *gmr-GAL4/+*; *UAS-(CTG)_{480} 1.1/+*. Se observa además de la desorganización de los omatidios una reducción del tamaño del ojo. Experimento realizado a 25 °C

La existencia de fenotipos visibles nos estaba indicando que los RNAs con repeticiones CUG que estábamos expresando resultaban tóxicos para la mosca. Procedimos entonces a confirmar si estos fenotipos mostraban características que reproducían aspectos de la enfermedad humana.

2.3. La expresión de RNAs $(CUG)_{480}$ en *Drosophila* reproduce aspectos de la DM1

2.3.1. Detección de inclusiones nucleares

En músculo esquelético, tejido neuronal (cerebro) y cardíaco de pacientes con DM1 se observan *foci* nucleares discretos compuestos por RNA con expansiones CUG (Taneja et al., 1995; Jiang et al., 2004; Mankodi et al., 2005). Debido a que estas inclusiones ribonucleares son características de DM1, pretendimos inicialmente detectarlas en nuestras moscas modelo (Figura 2.5).

Resultados

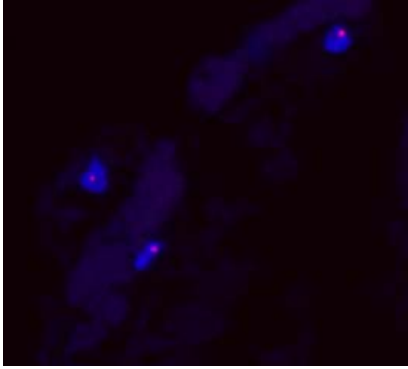


Figura 2.5. Los RNAs (CUG)₄₈₀ forman *foci* ribonucleares.

Se presentan secciones de 5 μm de larvas L3 de *Drosophila* embebidas en parafina que expresan (CTG)₄₈₀ en el tejido muscular (*Mhc-GAL4*). Se detectan los agregados ribonucleares (**rojo**) en los núcleos (**azul**) de las células musculares. Los *foci* ribonucleares se detectaron usando una sonda Cy3-(CAG)₁₀ y los núcleos se tificaron con DAPI.

Expresamos los RNAs que contienen (CUG)₄₈₀ en el músculo de *Drosophila* y visualizamos *foci* ribonucleares. Normalmente detectamos un único *foci* en cada núcleo de las células musculares de larvas L3. Este tipo de señal no descartaba que estuviéramos detectando los *foci* de la transcripción del transgén porque la línea que utilizamos solamente contenía una inserción del *UAS-(CTG)₄₈₀*. Para descartar esta posibilidad buscamos ejemplos en los que se detectara más de un *foci* nuclear en nuestras secciones. Detectamos núcleos de células que contenían más de un *foci*, eliminando pues esta sospecha (Figura 2.6).

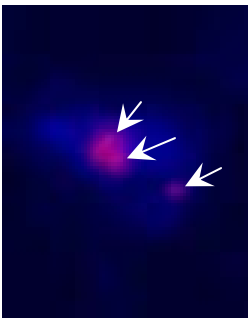


Figura 2.6. Visualización de más de un *foci* ribonuclear por núcleo.

Se muestra una sección de 5 μm de grosor de una larva L3 de *Drosophila* embebida en parafina que expresa (CTG)₄₈₀ en los músculos (*Mhc-GAL4*). Inclusiones nucleares de los transcritos (CUG)₄₈₀ detectados con una sonda Cy3-(CAG)₁₀ (**flechas**). El núcleo está contrastado con DAPI (**azul**).

En el caso de (CTG)₆₀ no analizamos si en las células que expresaban esa construcción se observaban agregados ribonucleares porque en un modelo de DM1 que expresa (CTG)₅₆ en *Drosophila* no se detectaron estos *foci* nucleares (Houseley et al., 2005).

Con la detección de los RNAs que contienen 480 repeticiones CUG en los núcleos de las células musculares en inclusiones similares a las de los pacientes con DM1, mostramos que la formación de *foci* ribonucleares también ocurre en *Drosophila*. A estas horquillas de doble cadena CUG se sabe que se unen las proteínas MBNL (Miller et al., 2000), de modo que nuestro siguiente objetivo fue comprobar si en los *foci* ribonucleares de este modelo se detectaban las proteínas Muscleblind.

Para detectar esta colocalización entre Muscleblind y las inclusiones ribonucleares necesitábamos un anticuerpo que reconociera la proteína Muscleblind. Previamente a este trabajo existía un anticuerpo producido por Begemann y col. (1998) pero se agotó. En nuestro laboratorio se generó un anticuerpo inmunopurificado, α -MbIC_{UK331}, contra el péptido CUK-333 que cubre los últimos 13 aminoácidos compartidos por las isoformas MbIA, MbIB y MbIC. Pero mediante Western blot e inmunohistoquímica no se consiguió detectar la proteína Muscleblind con este anticuerpo a pesar de modificar gran cantidad de parámetros (Pascual, 2005).

Disponíamos de moscas transgénicas capaces de expresar la proteína de fusión MbIC:GFP (*green fluorescent protein*) gracias al sistema GAL4/UAS. La fusión de la etiqueta GFP a la proteína no afectó su actividad *in vivo* porque la expresión de UAS-mbIC:GFP con *da-GAL4* además de emitir fluorescencia, confirmando que el DNA de la construcción insertada era capaz de transcribirse y traducirse correctamente, rescató la letalidad en embriones mutantes *muscleblind* igual como lo hacía la proteína MbIC (Pascual, 2005). Utilizamos estas moscas para visualizar directamente la proteína MbIC por la fluorescencia emitida y detectar así si había colocalización entre MbIC y las inclusiones ribonucleares formadas por el trinucleótido CUG, típicas de mioblastos con DM1.

La expresión de UAS-(CTG)₄₈₀ y UAS-mbIC: GFP se llevó a cabo bajo el control de la línea *heat-shock-GAL4* que contiene el promotor del gen *hsp70* (*heat shock protein*). En adultos expresamos ambas construcciones aplicándoles un choque térmico de 37 °C durante 1 hora. A los 2 días, embebimos las moscas en parafina e hicimos secciones del tórax de estas moscas y detectamos los transcritos CUG con una sonda (CAG)₁₀ marcada con el fluoróforo Cy3. Como la proteína MbIC fusionada a GFP no la detectamos directamente en el canal verde del microscopio de fluorescencia, hicimos uso de un anticuerpo anti-GFP. Probamos diferentes concentraciones recomendadas por el fabricante pero no detectamos señal específica. De hecho, en moscas que no expresaban MbIC:GFP se observaba señal verde que por lo tanto consideramos inespecífica (Figura 2.7).

Resultados

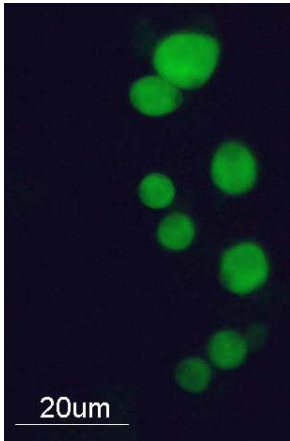


Figura 2.7. Observación de señales verdes inespecíficas utilizando el anticuerpo anti-GFP. Se muestra una sección de 5 μm de grosor de tejido adulto de *Drosophila* embebido en parafina que expresa $(\text{CTG})_{480}$ en todos los tejidos (*heat-shock-GAL4*). Se detectan señales verdes de gran tamaño.

La técnica de la inclusión en parafina puede interferir con el reconocimiento de determinados antígenos por parte de los anticuerpos debido a la incubación del tejido a una temperatura de 60 °C. Como alternativa a la técnica de la inclusión en parafina utilizamos secciones obtenidas mediante congelación. De modo que expresamos *UAS-(CTG)₄₈₀* y *UAS-mblC: GFP* mediante la línea *heat-shock-GAL4* con un choque térmico de 37 °C durante 1 hora. A las 24 h, congelamos las moscas en una solución de sacarosa y crioseccionamos el tórax de estas moscas. Detectamos los transcritos CUG con una sonda $(\text{CAG})_{10}$ marcada con el fluoróforo Cy3 y la proteína MblC fusionada a *GFP* la detectamos directamente en el canal verde del microscopio de fluorescencia. Encontramos que ambas señales solapaban confirmando que las proteínas MblC: GFP colocalizaban con los transcritos CUG. Al teñir con DAPI observamos que estos complejos quedaban retenidos en el núcleo (Figura 2.8).

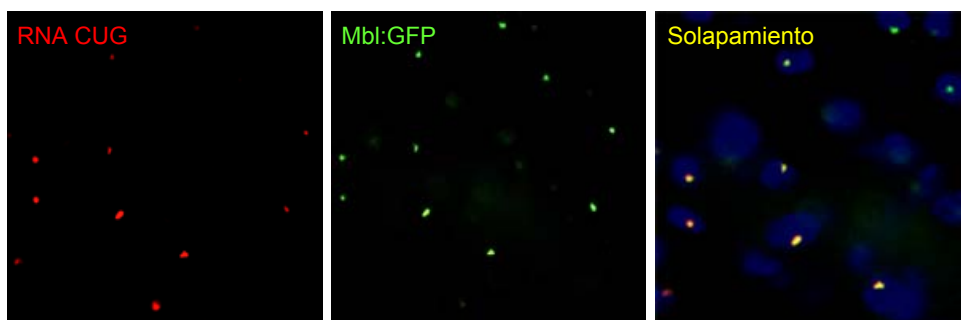


Figura 2.8. Los RNA $(\text{CUG})_{480}$ forman *foci* ribonucleares con los que colocaliza Muscleblind. Se muestran criosecciones de tórax de 12 μm de grosor que expresan ubicuamente $(\text{CTG})_{480}$ y MblC-GFP. Se detectan *foci* ribonucleares (**rojo**) en los núcleos de las células musculares. La proteína MblC fusionada a GFP forma agregados nucleares (**verde**). El RNA $(\text{CUG})_{480}$ (**rojo**) y MblC: GFP (**verde**) colocalizan (**amarillo**) en los núcleos musculares (**azul**). Los *foci* ribonucleares se detectaron usando una sonda Cy3-(CAG)_{10} , MblC: GFP directamente en el canal verde y los núcleos se tificaron con DAPI.

Para confirmar la especificidad de las señales realizamos varios controles:

- En moscas que expresaban los dos transgenes *UAS-mbIC:GFP* y *UAS-(CTG)₄₈₀* no añadimos a las criosecciones la sonda que detectaba las CUG y, como esperábamos, no observamos señales rojas en los núcleos (Figura 2.9A). En el canal verde si que observamos que la señal correspondiente a la expresión de MbIC:GFP estaba en el núcleo (Figura 2.9B).
- En moscas que expresaban únicamente el transgén *UAS-(CTG)₄₈₀* observamos en el canal rojo los RNAs CUG (Figura 2.9C). En el canal verde no detectamos ninguna señal demostrando que la señal roja no era tan intensa como para pasar al otro canal (Figura 2.9D).

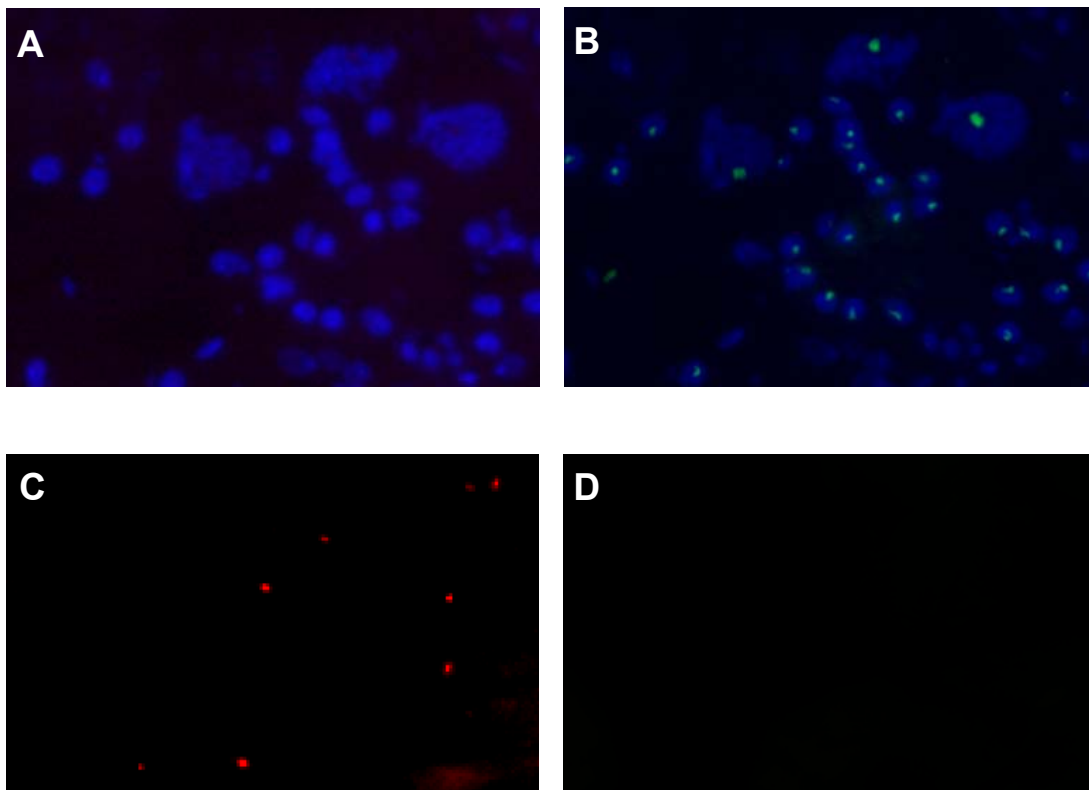


Figura 2.9. Los controles realizados confirmaron la colocalización de los *foci* ribonucleares y la proteína MbIC:GFP. Se muestran criosecciones de tórax de 12 μm de grosor que expresan ubicuamente (CTG)₄₈₀ y MbIC:GFP en (A y B) y sólo (CTG)₄₈₀ en (C y D). (A) Las secciones no se incubaron con la sonda Cy3-(CAG)₁₀ no detectándose puntos rojos en los núcleos. (B) En el canal verde se observaron agregados nucleares de color verde correspondiendo a la proteína MbIC:GFP. Los núcleos se tiñeron con DAPI. (C) En el canal rojo se detectaron los RNAs CUG y en (D) no se detectó señal verde al no expresar MbIC:GFP demostrando que la señal roja no traspasa al canal verde.

Resultados

Reprodujimos los mismos datos en los siete experimentos que repetimos. De ellos pudimos comprobar que en la mayoría de los casos se detectaba una señal verde por núcleo aunque también se observaban pequeños agregados nucleares de proteína MbIC:GFP. Por cada sección detectamos entre 40 y 50 núcleos que contenían MbIC:GFP y *foci* de RNA (CUG)₄₈₀. En muy pocos casos se observaba una célula que acumulaba los transcritos CUG sin secuestro de MbIC:GFP.

Localización subcelular de MbIC:GFP

Decidimos detectar la localización natural de las proteínas MbIC:GFP en células que no expresaran simultáneamente las expansiones CUG. De modo que expresamos la proteína de fusión en moscas que contuvieran únicamente el transgén *UAS-mbIC:GFP*. Criosectionamos las moscas y detectamos directamente al microscopio de fluorescencia la emisión de la proteína MbIC:GFP. Detectamos que MbIC:GFP se localizaba en los núcleos en forma de grandes agregados aunque no co-expresáramos los transcritos CUG (Figura 2.10).

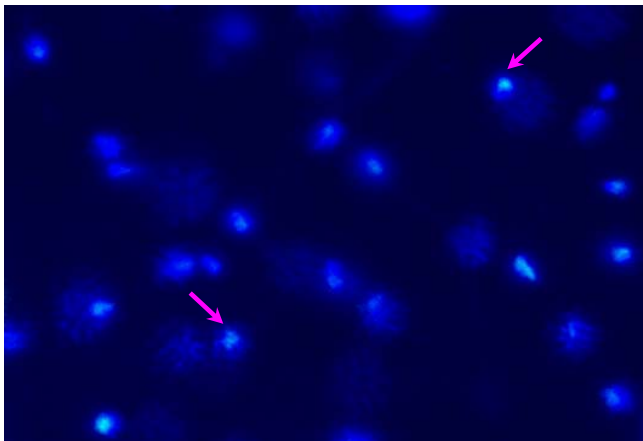


Figura 2.10. MbIC: GFP se localiza en los núcleos de células en forma de grandes agregados. Se muestran criosectiones de 12 μm de grosor de tórax de moscas que expresan ubicuamente MbI: GFP en un fondo silvestre. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul). MbIC:GFP se detecta por el canal verde. Su localización nuclear se señala con flechas.

De estos datos podemos concluir que MbIC de forma natural es una proteína de localización nuclear en adultos.

2.3.2. Defectos musculares a nivel histológico

Los pacientes con DM1 presentan defectos en el empaquetamiento de las fibras musculares, los núcleos están centralizados, existen variaciones en el diámetro de las fibras tipo 1 (fibra lenta para la contracción) y muestran degeneración muscular (Harper, 2001). En los modelos de DM1 en ratón también se reproducen estos defectos de centralización nuclear y heterogeneidad en el tamaño de las miofibras

(Figura 11.1 *Apartado 11.1 de Introducción*) (Mankodi et al., 2000; Seznec et al., 2001).

En el adulto de *Drosophila* la mayor parte del tórax está ocupada por una serie de músculos que están especializados en el vuelo. En el tórax se encuentran los músculos directos (DFM) e indirectos de vuelo (IFM). Los IFM se dividen en músculos dorso-longitudinales (DLM) y dorso-ventrales (DVM) y son los encargados de producir el batido de las alas que permite a la mosca volar al actuar sobre el exoesqueleto del insecto. Por cada hemisegmento se localizan seis músculos DLM y siete DVM (Figura 2.11). Los IFM están muy organizados y son muy sensibles a alteraciones causadas por mutaciones en proteínas musculares. Las mutaciones que afectan a estos músculos son fáciles de detectar fenotípicamente porque los mutantes son incapaces de volar.

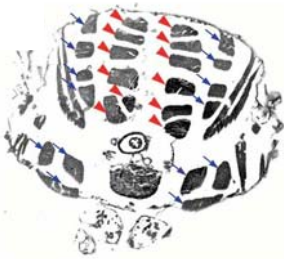


Figura 2.11. Músculos indirectos de vuelo. Sección transversal de tórax de *Drosophila*. Los músculos indirectos de vuelo se dividen en seis músculos dorso-longitudinales (**flecha roja**) y siete músculos dorso-ventrales (**flecha azul**) por hemisegmento. Imagen procedente de Bernard et al., 2003.

Con el fin de comprobar si podíamos detectar alteraciones histológicas semejantes a las descritas para pacientes con DM1 o modelos murinos de esta enfermedad, expresamos el transgén *UAS-(CTG)₄₈₀* en toda la musculatura de *Drosophila* con el patrón de expresión de la cadena pesada de la Miosina. Estas moscas desarrollan un fenotipo característico de "alas hacia arriba" que impide a las moscas volar (Figura 2.3). Este fenotipo podía deberse a defectos en los músculos implicados en el vuelo por lo que decidimos utilizar un método clásico para analizar la estructura del músculo como es teñir las secciones con hematoxilina y eosina. Embebimos las moscas en parafina para posteriormente seccionar transversalmente el tórax de estas moscas y teñir. En una primera aproximación estos experimentos no revelaron defectos significativos en los paquetes musculares (Figura 2.12).

Resultados

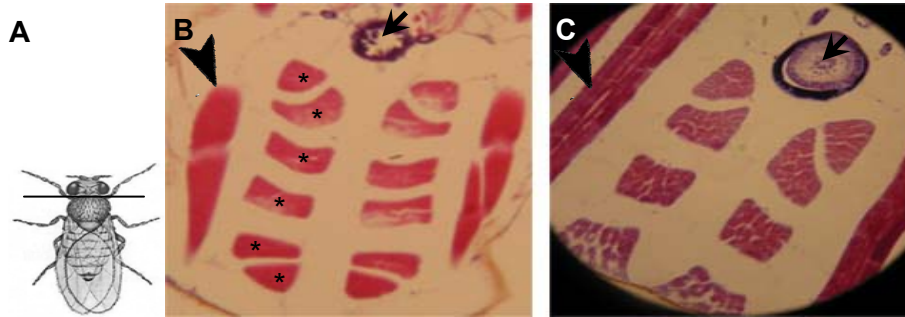


Figura 2.12. La tinción con hematoxilina y eosina de secciones de tórax que expresan las $(CTG)_{480}$ en el músculo no revelaron defectos. (A) Esquema de la orientación de las secciones torácicas. Secciones de 12 μm de grosor procedentes de moscas embebidas en parafina. (B) Moscas control con el genotipo $w; Mhc-GAL4/ +$. (C) Moscas que expresan la expansión $(CTG)_{480}$ con el genotipo $w; Mhc-GAL4/ UAS-(CTG)_{480} 1.1$. En la sección se observa el esófago (flechas), los seis músculos dorso-longitudinales (asteriscos) y los músculos dorso-ventrales (cabeza de flecha). Cruces realizados a 29 °C.

Un análisis detallado de estas tinciones con hematoxilina reveló que en los músculos dorso-longitudinales la localización del núcleo era periférica (normal) pero el empaquetamiento de la fibra muscular no era compacto, presentaba una estructura laxa como ocurre en los pacientes con DM1 (Harper, 2001) (Figura 2.13).

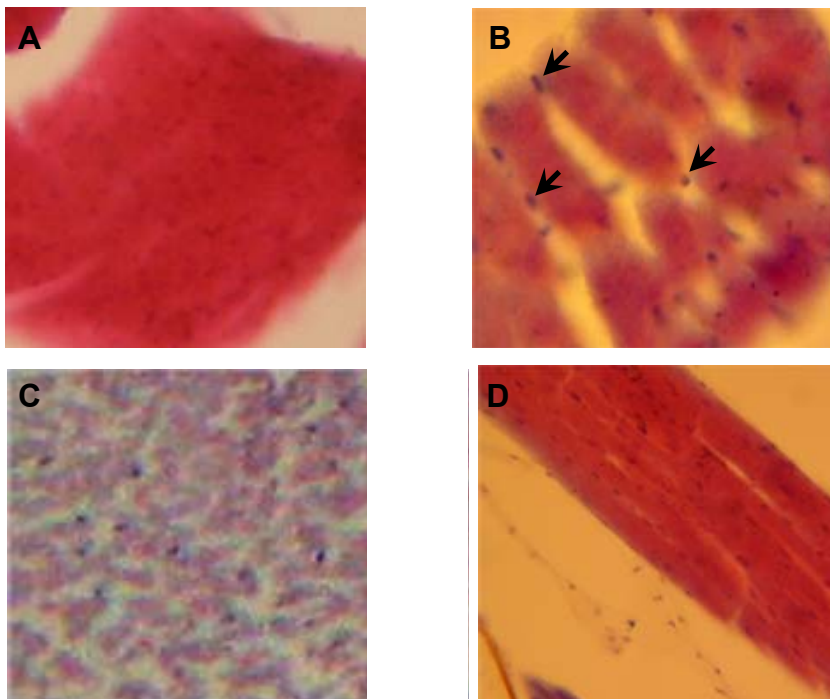


Figura 2.13 Los núcleos de las fibras musculares de *Drosophila* se localizan en la periferia de las miofibras. Sección transversal de un paquete muscular (**A, B y C**) y sección longitudinal (**D**) de 12 μm de grosor de músculos teñidos con hematoxilina-eosina. (**A**) Moscas control con el genotipo *w; Mhc-GAL4* muestran una masa muscular compacta. (**B**) Moscas con el genotipo *y w; Mhc-GAL4/ UAS-(CTG)₄₈₀ 1.1* muestran los núcleos en la periferia del paquete muscular (**flechas**) y una compactación laxa. (**C**) En moscas *y w; Mhc-GAL4/ UAS-(CTG)₄₈₀ 1.1* se observa que algunos músculos dorso-longitudinales muestran mayor desorganización de las fibras musculares, compárese con la compactación muscular que muestra la fotografía A. (**D**) Sección longitudinal de moscas con genotipo *y w; Mhc-GAL4/ UAS-(CTG)₄₈₀ 1.1* aparentemente no se observan defectos. Cruces realizados a 29 °C.

Decidimos utilizar una técnica histológica de mayor resolución para analizar los paquetes musculares de las moscas que expresaban (CUG)₄₈₀. Incluimos las moscas en resina epoxi y seccionamos los tórax de moscas jóvenes que estaban expresando tanto RNAs (CUG)₄₈₀ como RNAs (CUG)₆₀ en los músculos torácicos. En estas tinciones observamos que los músculos que expresaban RNAs con 60 repeticiones CUG no mostraban defectos (Figura 2.14B) en cambio en moscas que expresaban 480 repeticiones CUG se observaban vacuolas en los paquetes musculares (Figura 2.14C).

Otro aspecto definitorio de la DM es su carácter degenerativo. Comprobamos si la expresión continuada de RNAs (CUG)₆₀ o RNA (CUG)₄₈₀ en la musculatura provocaba un aumento en los defectos histológicos encontrados comparando secciones torácicas de moscas de 2-3 días de edad con moscas de 38 días. En estas tinciones observamos un aumento en el tamaño de las vacuolas así como una disminución en el tamaño de los músculos dorso-longitudinales de los músculos indirectos del vuelo, siendo ambas señales típicas de músculos distróficos (Harper, 2001). También encontramos en moscas envejecidas que algunos músculos dorso-longitudinales estaban completamente ausentes (Figura 2.14F). Estos defectos solamente se detectaron cuando se expresaban los RNA (CUG)₄₈₀. No vimos defectos en moscas envejecidas que expresaban (CUG)₆₀ (Figura 2.14E). Todos estos defectos se reprodujeron en un total de quince individuos analizados.

Resultados

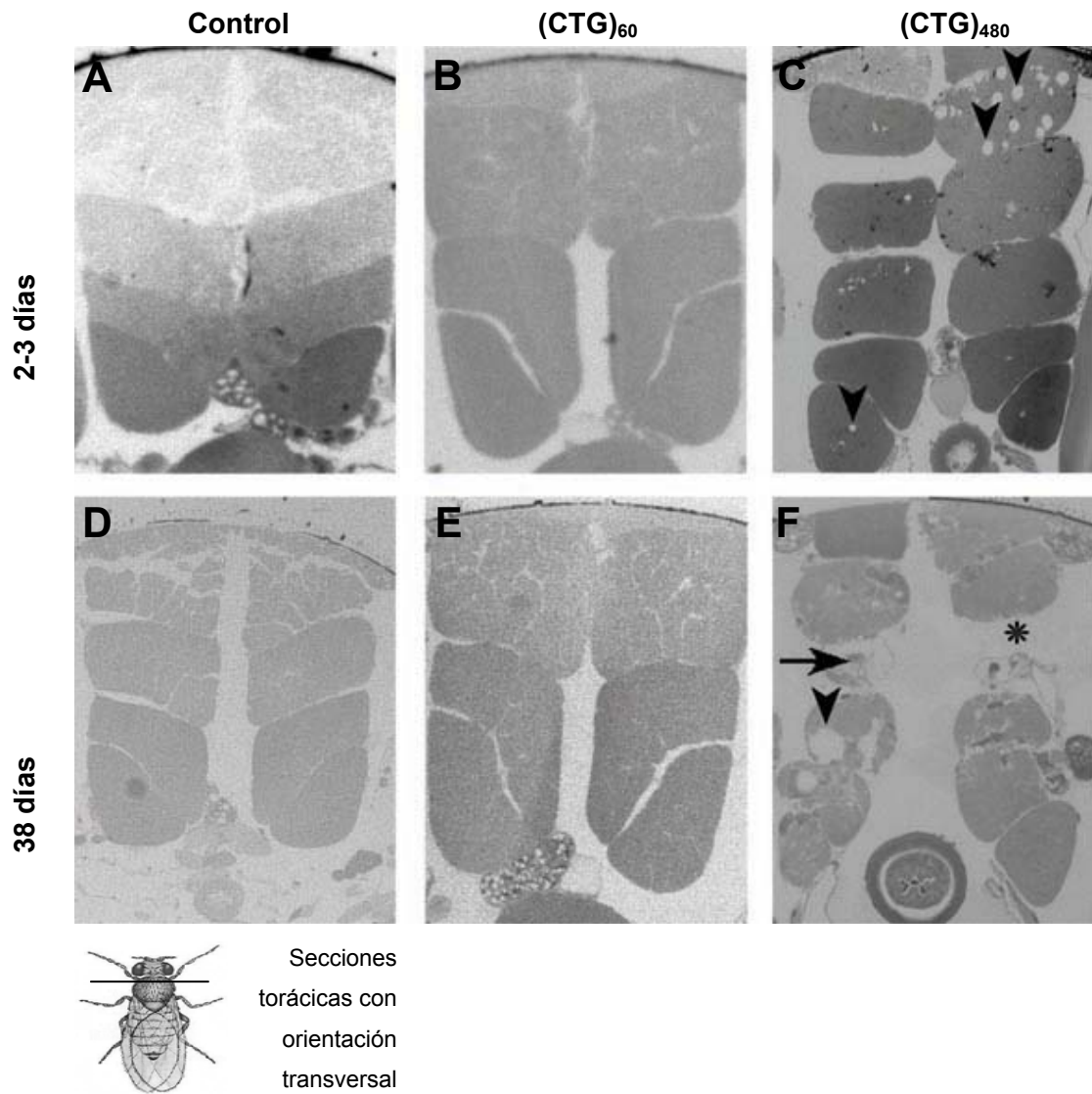


Figura 2.14. Defectos musculares en moscas que expresan RNAs (CUG)₆₀ y RNAs (CUG)₄₈₀. Secciones de tórax de moscas con los siguientes genotipos; (A, D) *UAS-(CTG)₄₈₀*, (B, E) *Mhc-GAL4/UAS-(CTG)₆₀* y (C, F) *Mhc-GAL4/UAS-(CTG)₄₈₀*. Secciones de moscas de 2-3 días (A, B, C) o de 38 días de edad (D, E, F). Solamente se detectan defectos en las moscas que expresan las (CTG)₄₈₀ (C, F). Se observan músculos con vacuolas (**cabeza de flecha**) y en moscas envejecidas (F) se observa una reducción de la masa muscular (**flecha**) e incluso ausencia de algún músculo dorso-longitudinal (**asterisco**). Los cruces y el envejecimiento de las moscas se realizaron a 25 °C.

La DM puede definirse genéticamente como una falta de función de *MBNL* provocada por la expresión de RNAs mutantes con expansiones largas de repeticiones CUG. Así, las proteínas de la familia Muscleblind colocalizan con *foci* ribonucleares de RNAs CUG, se unen a estos RNAs *in vitro* y los mutantes de falta de función de *muscleblind* y *MBNL1* reproducen aspectos definitorios de la enfermedad (Artero et al.,

1998; Miller et al., 2000; Kanadia et al., 2003a; Machuca-Tzili et al., 2006; Vicente et al., 2007). Si la expresión de RNAs CUG en los tejidos de la mosca reproducía la DM esperábamos poder detectar fenotipos descritos en los mutantes *muscleblind* de *Drosophila*. Uno de estos fenotipos musculares es la desorganización de las bandas Z de los sarcómeros. Esta alteración puede observarse en microscopia óptica con una tinción con un anticuerpo anti-Kettin, una proteína mayoritaria de las bandas Z, a baja resolución o bien mediante un análisis ultraestructural en microscopia electrónica. En un primer análisis expresamos las expansiones (CTG)₄₈₀ en músculo utilizando las líneas *GAL4 Dmef2-GAL4* y *Mhc-GAL4* a 29 °C. Diseccionamos larvas de tercer estadio y con un anticuerpo anti-Kettin detectamos un patrón bandeado en los músculos larvarios semejante al de los controles silvestres (dato no mostrado). Estas tinciones descartaban defectos importantes en las bandas Z pero nuestros resultados con el procesado de los transcritos primarios de otra proteína de las bandas Z, la α -actinina, sugieren que en efecto las bandas Z están afectadas en las moscas modelo. Los defectos que provoquen la expresión de RNAs CUG pueden ser sólo detectables con técnicas de alta resolución como la microscopia electrónica.

2.3.3. Defectos en el procesado del transcrito de la α -actinina

Estudios en paralelo con los nuestros en el laboratorio habían identificado los transcritos primarios de la α -actinina como una diana de la actividad de *muscleblind*. En embriones mutantes para *muscleblind* el procesado alternativo del transcrito de la α -actinina estaba alterado (Vicente et al., 2007; Machuca-Tzili et al., 2006). Tal como hemos justificado más arriba, esperábamos que nuestras moscas que expresaban (CUG)₄₈₀ mostraran fenotipos semejantes a los de los mutantes de falta de función de *muscleblind*. Por ello, analizamos en estas moscas si esta diana de *muscleblind* también estaba alterada cuando expresábamos RNAs (CUG)₄₈₀.

El gen de la α -actinina origina tres isoformas, se detecta la isoforma α -actnA en adultos pero no es muscular, la isoforma α -actnB en músculo de adultos y la isoforma α -actnC en músculo larval (Figura 2.15B) (Roulier et al., 1992). En embriones mutantes *muscleblind* se observa una reducción de la isoforma α -actnC y un aumento de las isoformas α -actnA y α -actnB (Vicente et al., 2007).

Para llevar a cabo este experimento expresamos los RNAs (CUG)₄₈₀ con las líneas *da-GAL4* y *Mhc-GAL4* que dirigen la expresión de forma general y en el músculo, respectivamente. Extrajimos el RNA de embriones con esos dos genotipos y

Resultados

como control de silvestres OregonR y *y w*. Hicimos una PCR sobre cDNA y obtuvimos un fragmento de los transcritos α -actnA, α -actnB y α -actnC, digerimos el producto de PCR con una enzima de restricción para poder discernir en el producto de PCR el fragmento de la isoforma α -actnA y el de la α -actnB ya que ambos contienen el mismo número de pares de bases. De esta manera pudimos observar las tres isoformas de la α -actinina en embriones que expresaban las (CTG)₄₈₀ (Figura 2.15C; experimento realizado en colaboración con Marta Vicente).

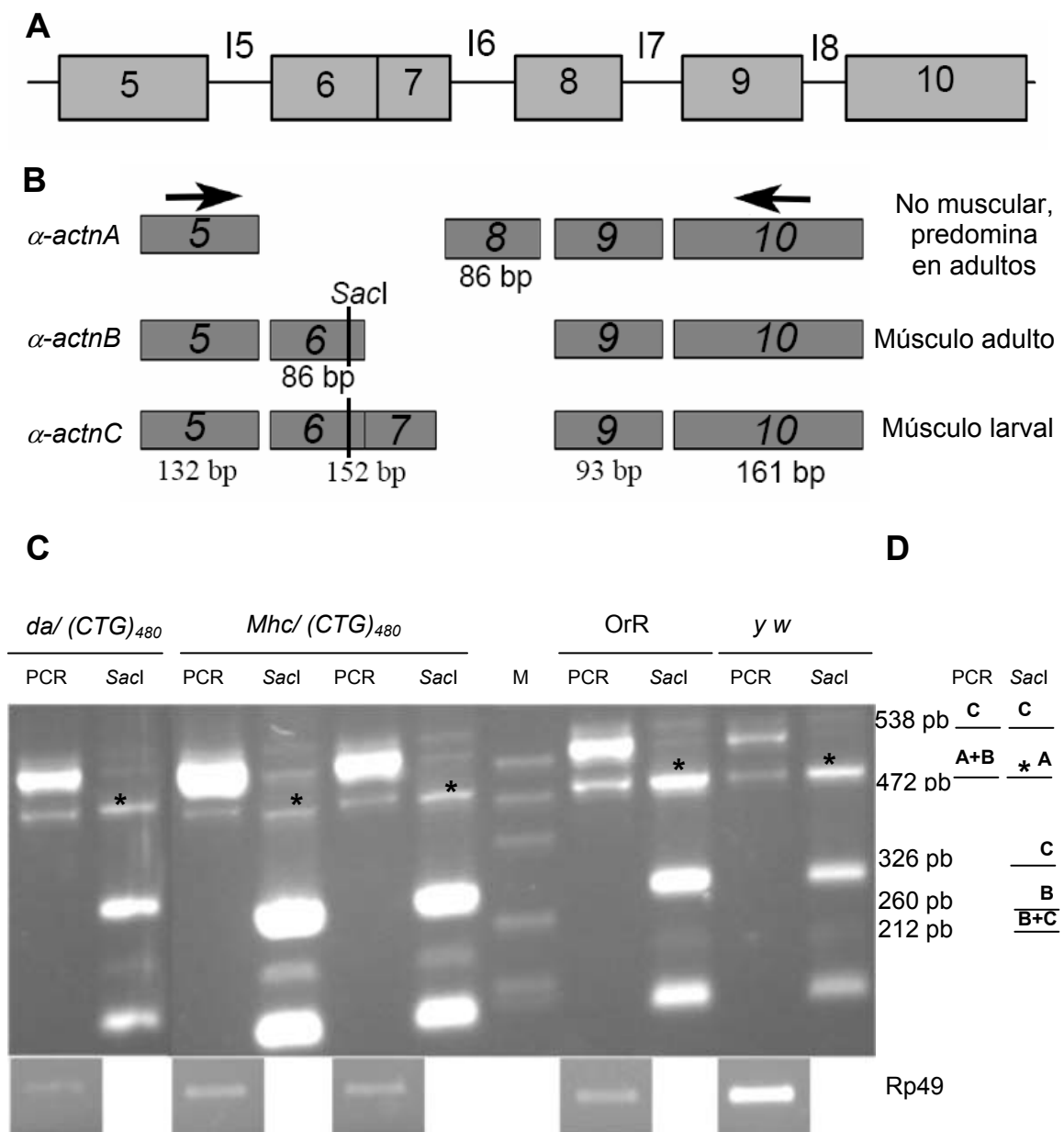


Figura 2.15. Defectos en el procesado alternativo del pre-mRNA de la α -actinina. (A) se representa la estructura genómica del gen de la α -actinina, las líneas representan intrones y las cajas exones. (B) El procesado alternativo del pre-mRNA de la α -actinina origina tres transcritos maduros denominados α -actnA -B y -C. Los cebadores utilizados para amplificar los exones específicos de cada isoforma se representan con flechas. La expresión específica de tejido y estadio se indica a la derecha. Los tamaños se indican en pares de bases (pb) debajo de cada exón. (C) Se muestra la electroforesis de los productos de RT-PCR y sus correspondientes digestiones con *SacI* necesarias para revelar todas las isoformas de la α -actinina de embriones que expresan las (CTG)₄₈₀ con *da-GAL4* y con *Mhc-GAL4* así como moscas control OregonR y *y w*. Para la expresión con *Mhc-GAL4* se utilizaron dos transformantes *UAS-(CTG)₄₈₀* diferentes 1.1 y 2.2 de izquierda a derecha, respectivamente. Los embriones que expresaban las expansiones mostraron una disminución en los niveles de la isoforma α -actnA (asterisco) con un aumento de los niveles de las otras isoformas especialmente la α -actnC para la expresión en músculo. Los cruces se realizaron a 25 °C. (D) Se representa un esquema del patrón de bandas de los productos de PCR que se obtiene por movilidad electroforética y las digestiones con *SacI*. Los transcritos de *rp49* se utilizaron como control de carga. Experimento realizado en colaboración con Marta Vicente.

Con este experimento observamos que los niveles de la isoforma α -actnA se vieron disminuidos en embriones que expresaban RNAs (CTG)₄₈₀ comparándolo con embriones que no expresaban el transgén. Esta disminución se vio relacionada con un aumento de la isoforma α -actnC para el caso de la expresión en el sistema muscular, aunque no estaba tan clara esta correlación para la expresión en todo el embrión. Sorprendentemente en estos experimentos no encontramos una alteración en el procesado de la α -actinina en el mismo sentido que en los mutantes *muscleblind* donde se observa una reducción de la isoforma α -actnC y un aumento de la α -actnA y α -actnB. Esto sugeriría que además del secuestro de MbIC por parte de las repeticiones, éstas podrían estar interfiriendo con otros factores nucleares. Las repeticiones CUG aumentan los niveles de proteína CUG-BP1 en células COS7 (Timchenko et al., 2001) y un aumento semejante en el homólogo en *Drosophila* podría contribuir a la desregulación en el procesado de la α -actinina.

2.3.4. La expresión de RNAs CUG en el ojo de *Drosophila* es sensible a la dosis génica de *muscleblind*

La expresión de RNAs (CUG)₄₈₀ en el ojo en desarrollo de *Drosophila* bajo el control de la línea *sevenless-GAL4*, de expresión en las células misteriosas, los precursores de los fotorreceptores R3, R4, R7 y células cono (Dickson y Hafen, 1993) conduce a un fenotipo de ojo ligeramente rugoso. Este fenotipo nos ofrecía la posibilidad de testar

Resultados

la hipótesis de que las repeticiones CUG estuvieran interfiriendo genéticamente con la función del gen *muscleblind*. Si, en efecto, la función *muscleblind* estaba reducida, este fenotipo rugoso debería ser sensible a la dosis génica del gen *muscleblind* endógeno. Esto es, al introducir una copia mutante de *muscleblind* en un fondo genético en el que se estén expresando las repeticiones debería potenciar el fenotipo, mientras que un aporte extra de proteína Muscleblind debería suprimirlo.

Para realizar este experimento generamos cromosomas recombinantes que contuvieran tanto el transgén *UAS-(CTG)₄₈₀* como *sevenless-GAL4* en el cromosoma 3 y ensayamos si este fenotipo era modificado al introducir alelos mutantes de *muscleblind* (Figura 2.16). Los dos alelos utilizados fueron *mbi^{k07103}* y *mbi^{E27}*. Mientras *mbi^{E27}* es un hipomorfo fuerte (Begemann et al., 1997), *mbi^{k07103}* es una inserción que parece afectar a la función de *muscleblind* en menor medida (Kania et al., 1995). La combinación de ambos alelos, *mbi^{E27}* y *mbi^{k07103}* no es letal en estadio embrionario pero originan moscas hipomorfas para la función de *muscleblind*, observándose defectos en las alas, presencia de ampollas por errores en la aposición de las dos láminas del ala, defectos en la disposición de las venas del ala, así como ausencia de tarsos en las patas. En ningún caso, sin embargo, se observan defectos en los ojos (Prokopenko et al., 2000; Vicente, comunicación personal).

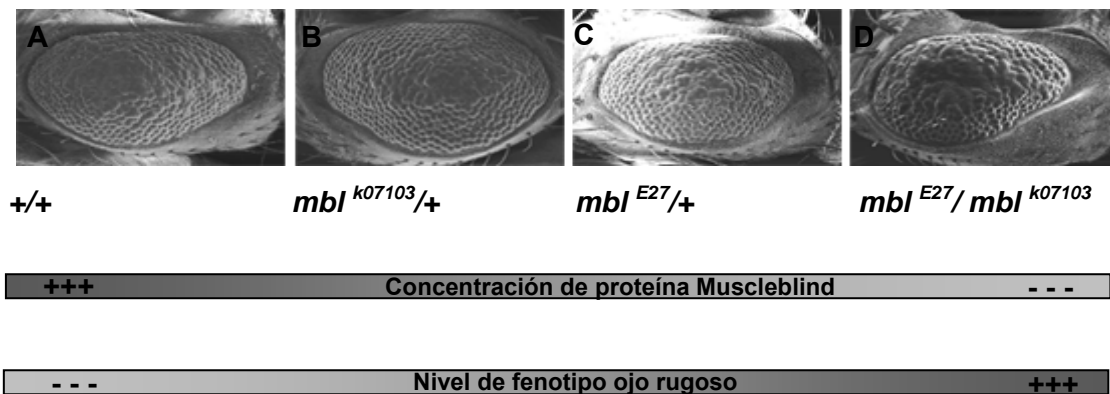


Figura 2.16. *muscleblind* modifica el fenotipo de ojo rugoso por expresión de $(CTG)_{480}$ bajo el control de *sevenless-GAL4*. Se muestran ojos visualizados por microscopía electrónica de barrido. (A) *sev-GAL4>UAS-(CTG)₄₈₀*, (B) *mbi^{k07103}/+; sev-GAL4>UAS-(CTG)₄₈₀* (C) *mbi^{E27}/+; sev-GAL4>UAS-(CTG)₄₈₀*, y (D) *mbi^{E27}/mbi^{k07103}; sev-GAL4>UAS-(CTG)₄₈₀*. La reducción de la dosis de *muscleblind* con el alelo *mbi^{E27}* potencia ligeramente (C) mientras que con el alelo *mbi^{k07103}* apenas modifica el fenotipo (B). La combinación de dos alelos mutantes *muscleblind* (heterocigoto compuesto) empeora el fenotipo (D). Nótese el aumento en la rugosidad y la reducción del tamaño del ojo. Todos los ojos proceden de individuos del mismo sexo. La temperatura del experimento fue de 17 °C. Debajo de cada micrografía se indica la combinación de alelos *muscleblind* de moscas que simultáneamente expresan las repeticiones

(CTG)₄₈₀ en el ojo. En la barra superior se representa la hipotética concentración de proteína Muscleblind que existe en cada genotipo, de izquierda a derecha de más a menos proteína. En la barra inferior se representa el nivel de fenotipo ojo rugoso que muestra cada caso, de izquierda a derecha de menos a más fenotipo, indicado con signos (+++) y (---).

La introducción de un alelo *mbI*^{k07103} no modificó sustancialmente el fenotipo (Figura 2.16B) pero el alelo por falta de función *mbI*^{E27} potenció ligeramente el ojo rugoso por expresión de las repeticiones CTG (Figura 2.16C). La reducción adicional de la función de *muscleblind* en el heterocigoto compuesto *mbI*^{E27}/*mbI*^{k07103} empeoró notablemente el fenotipo (Figura 2.16D).

También realizamos un experimento complementario intentando suprimir el fenotipo proporcionando proteína Muscleblind extra. En moscas que expresaban RNAs (CTG)₄₈₀ en ojo aportamos más proteína Muscleblind expresando el transgén *UAS-mbIA* porque era un cDNA procedente de disco imaginal de ojo. Según las predicciones este fenotipo debería mejorar ya que se está compensando el secuestro de Muscleblind. El experimento lo realizamos tanto a 17 como a 25 °C y en ambos casos no vimos una modificación evidente del fenotipo (Figura 2.17).

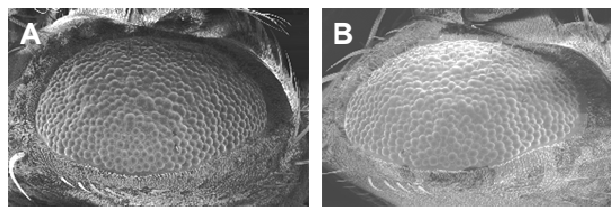


Figura 2.17. La sobreexpresión de *muscleblind* no modifica el fenotipo ojo rugoso producido por la expresión (CTG)₄₈₀ en el ojo. Se muestran ojos visualizados por microscopía electrónica de barrido. (A) *sev-GAL4>UAS-(CTG)₄₈₀* y (B) *sev-GAL4>-UAS-(CTG)₄₈₀ / UAS-mbIA*. La temperatura del experimento fue de 25 °C.

En resumen, hemos detectado inclusiones nucleares de transcritos CUG, colocalización de Muscleblind en esos *foci* ribonucleares y degeneración de la estructura muscular, alteraciones equivalentes a las que se observan en pacientes con DM1. Recientemente se han publicado datos de un modelo en *Drosophila* semejante al nuestro que confirma de manera independiente estas mismas alteraciones características de pacientes (Haro et al., 2006). El hecho de que *muscleblind* tenga un RNA diana, el pre-mRNA de la α -actinina, y que moscas que expresan RNAs (CUG)₄₈₀

Resultados

muestran alteraciones en la regulación del procesado de la α -actinina, sugieren que la expresión de estas expansiones CTG reproducen defectos moleculares específicos también presentes en pacientes con DM1. La interacción genética con la dosis de *muscleblind* en el fenotipo de ojo rugoso contribuye a establecer las bases de nuestro modelo ya que este gen es una pieza clave en esta compleja enfermedad.

3. La expresión de RNAs CUG es tóxica en tejidos nerviosos

Desde estudios muy tempranos sobre la enfermedad DM1 se viene reconociendo que el sistema nervioso central (SNC) está involucrado en la patogénesis, sobre todo cuando el comienzo de la enfermedad ocurre en edades muy tempranas. Las evidencias que sugieren esta implicación del SNC en la DM1 son la somnolencia, lesiones en la materia blanca, trastornos de comportamiento y en los casos más graves retraso mental (distrofia miotónica congénita). Dado que la expresión de RNAs CUG es tóxica en tejidos nerviosos, decidimos expresar las expansiones en ese tipo de tejidos en *Drosophila* y buscar defectos que se asemejaran a los descritos en pacientes con DM1. Los tejidos en los que se suelen modelar problemas neurológicos en *Drosophila* son la retina y el cerebro de la mosca.

3.1. Análisis del fenotipo de expresión de repeticiones CUG en la retina de *Drosophila*

Los pacientes con DM1 tienen afectada la retina, la córnea, los músculos oculares y del párpado y se ha descrito degeneración pigmentaria de la retina (Harper, 2001). En modelos de enfermedades humanas neurodegenerativas, la expresión de genes mutantes (por ejemplo la huntingtina con expansiones) mediante el sistema *GAL4/UAS* en la retina produce neurodegeneración. En un modelo de ataxia espinocerebelar 8, por expresión de transcritos con expansiones CTG no codificantes, se genera un fenotipo ocular que potencia predominantemente *muscleblind* (Mutsuddi et al., 2004). Estas observaciones nos condujeron a pensar que la expresión de las repeticiones CTG en la retina en desarrollo de la mosca podría dar lugar a un fenotipo fácilmente analizable y relevante para entender la toxicidad para las neuronas de los RNAs CUG.

En el *Apartado 2.2 de Resultados* comentamos el fenotipo de ojo rugoso obtenido debido a la expresión de los RNAs (CUG)₄₈₀ en el disco imaginal de ojo-antena al utilizar la línea *gmr-GAL4* de expresión general en todos los tipos celulares que forman la retina (Figura 2.4). Estudiamos los defectos celulares responsables de esta morfología externa seccionando los ojos de estas moscas previamente embebidos en resina. La orientación de las secciones fue tangencial y frontal (Figura 3.1).

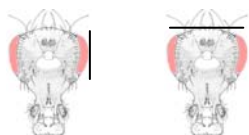


Figura 3.1. Representación esquemática de la orientación de las cabezas para seccionar. A la izquierda se muestra la orientación tangencial. A la derecha la orientación frontal.

En las secciones tangenciales de moscas que no expresaban los RNAs (CUG)₄₈₀ el análisis reveló una organización celular uniforme de los omatidios (Figura 3.2A). Cada omatidio contiene ocho neuronas fotorreceptoras, cuatro células cono y dos células pigmentarias primarias. Estas catorce células están rodeadas por células pigmentarias secundarias y terciarias aislando la unidad óptica. La expresión de RNAs (CUG)₄₈₀ mostró graves defectos en la organización de los fotorreceptores, siendo difícil la detección de los rabdómeros y de los omatidios. Solamente se pudieron discernir algunas células pigmentarias pero sin poder delimitar cada omatidio (Figura 3.2B).

Las secciones frontales nos desvelaron en el caso control, es decir, moscas que no expresan los RNAs CUGs, que los rabdómeros se extendían hasta la zona más basal donde se encuentra la membrana fenestrada. Esta membrana fenestrada está formada por las células pigmentarias. Debajo de la membrana fenestrada se localiza la membrana basal que sirve de sostén para las células subretinales que se localizan por debajo de esta membrana o lámina basal y de las células de los omatidios (Figura 3.2C). En cambio en ojos procedentes de moscas que están expresando los RNAs (CUG)₄₈₀ no se visualiza la disposición de los rabdómeros desde la zona basal a la apical. La membrana fenestrada está presente pero no de manera continua. La lámina basal parece estar reducida y las células subretinales no parecen adherirse a esta membrana basal (Figura 3.2D). Estos resultados fueron reproducibles en las muestras que analizamos que fueron cinco ojos para cada genotipo y para cada tipo de orientación.

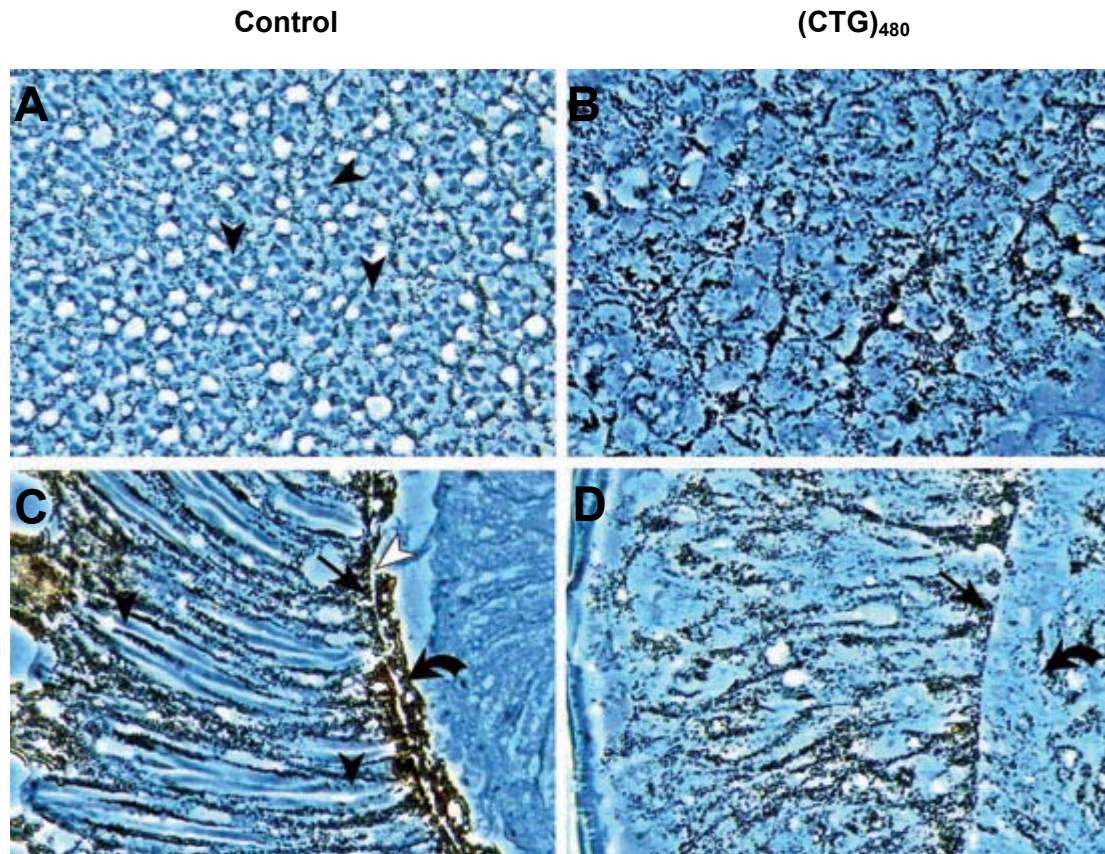


Figura 3.2. La expresión de $(CTG)_{480}$ provoca defectos importantes en la retina. Se muestran secciones de $2\ \mu\text{m}$ de grosor de ojos de adulto de 2-3 días de edad. (A, B) Secciones orientadas tangencialmente y (C, D) secciones orientadas frontalmente. (A) Las moscas control con genotipo *gmr-GAL4/+* muestran una retina organizada, cada flecha señala un cluster de siete fotorreceptores visibles por cada omatidio. (B) Las moscas con genotipo *gmr-GAL4/+; UAS-(CTG)₄₈₀ 1.1/+* presentan una pérdida y desorganización de los fotorreceptores. (C) Las secciones frontales nos muestran en las moscas control *gmr-GAL4/+* los rabdomeros extendiéndose desde la parte apical a la basal (**cabeza de flecha negra**), la membrana fenestrada (**flecha**) y la lámina basal (**cabeza de flecha blanca**) a la que se adhieren las células subretinales (**flecha doblada**) y las células de los omatidios. (D) Las moscas *gmr-GAL4/+; UAS-(CTG)₄₈₀ 1.1/+* muestran una retina deteriorada donde la membrana fenestrada está desorganizada (**flecha**) al igual que la capa de células subretinales (**flecha doblada**). Los cruces para la expresión se realizaron a $25\ ^\circ\text{C}$. Las micrografías se tomaron a 630 aumentos.

A continuación nos propusimos estudiar si había neurodegeneración asociada a la expresión continuada de RNAs $(CTG)_{480}$. Para ello dejamos envejecer moscas que expresaban $(CTG)_{480}$ bajo el control de *gmr-GAL4* durante 38 días y comparamos con controles de la misma edad. Debido a que el fenotipo era muy fuerte, no pudimos concluir si la expresión continuada de estos RNAs producía neurodegeneración (dato no mostrado).

3.2. Análisis del fenotipo de expresión de repeticiones CUG en el cerebro de *Drosophila*

Tratándose la DM de una enfermedad neuromuscular, en distintos momentos durante este estudio expresamos con diferentes líneas *GAL4* los RNAs (CUG)₄₈₀ en el tejido muscular. Una de estas líneas fue *Dmef2-GAL4*, la cual es una línea específica de músculo. Estudiamos la descendencia que era heterocigota para el alelo mutante *muscleblind* (*mb^{E27}*) y expresaba el transgén *UAS-(CTG)₄₈₀* con el patrón de la línea *Dmef2-GAL4* a 25 °C de temperatura. Encontramos que presentaba un comportamiento distinto a las moscas control. Observamos que las moscas se movían más. Trazamos una línea en el centro de un tubo y las moscas que expresaban las repeticiones CUG traspasaban esta línea mucho más frecuentemente que las moscas control (dato no mostrado). Utilizamos dos controles, moscas con el genotipo *yw* y moscas que expresaban los RNAs (CUG)₄₈₀ con *Dmef2-GAL4*.

Por el comportamiento de las moscas, pensamos que podría tratarse de un fenotipo neurológico más que muscular y revisamos la información disponible sobre el patrón de expresión del gen *Dmef2* en adultos. La expresión se ha descrito en un solo tipo celular nervioso: las células *Kenyon* (Schulz et al., 1996) de una estructura cerebral denominada cuerpos de seta, un grupo de unas 5000 neuronas que están involucradas en el aprendizaje olfativo y en la memoria (Zars et al., 2000). Para comprobar nuestra predicción de que el origen de este fenotipo podía estar en la expresión de las repeticiones en los cuerpos de seta, utilizamos varias líneas específicas de esta estructura cerebral para expresar los RNAs (CUG)₄₈₀ en los cuerpos de seta de la mosca. Esta expresión produjo un fenotipo de letalidad pupal (Figura 3.3).

Resultados



Figura 3.3. Fenotipo de letalidad pupal producido por la expresión de la expansión (CTG)₄₈₀ en el cerebro de *Drosophila*. El genotipo de las moscas era *238Y-GAL4/+; UAS-(CTG)₄₈₀ 1.1/+*. Esta línea *GAL4* se expresa en los cuerpos de seta del cerebro de *Drosophila*. (A) Las moscas morían en estadio de pupa porque eran incapaces de hacer los movimientos necesarios para emerger. (B) Si se le abre el pupario con ayuda de unas pinzas sale del interior una mosca perfectamente formada y viable. (C) Se muestra la localización de las estructuras cuerpos de seta en el cerebro teñidos con β -galactosidasa. La temperatura del cruce fue de 25 °C.

Esta letalidad era sensible a la temperatura porque el sistema *GAL4/UAS* lo es y a mayor temperatura se expresa más el transgén, detectándose un fenotipo con una penetrancia completa a 29 °C y una viabilidad de los individuos que expresan el transgén *UAS-(CTG)₄₈₀* del 0%. Si la expresión se realizaba a 19 °C la viabilidad era del 100 % (Figura 3.4). Como control interno teníamos a los machos de la descendencia ya que la línea *238-GAL4* utilizada estaba en el cromosoma X. De modo que partiendo de machos con esta inserción sólo las hembras de la descendencia recibían el cromosoma *238-GAL4*. Esta línea *GAL4* dirigía su expresión a los cuerpos de seta del cerebro de *Drosophila*.

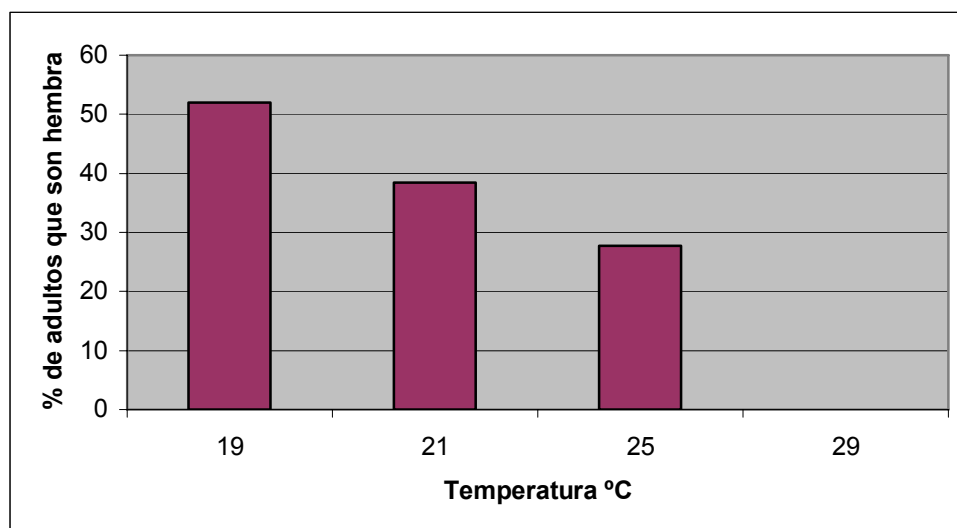


Figura 3.4. La expresión de la expansión (CTG)₄₈₀ en los cuerpos de seta es sensible a la temperatura. El genotipo de las hembras es *238Y-GAL4/+; UAS-(CTG)₄₈₀ 1.1/+*. El número de hembras que emergen es cero a 29 °C y si disminuimos la temperatura a 19 °C este número asciende al 50% de los adultos, tal como se espera en un cultivo normal.

La expresión de los RNAs (CUG)₄₈₀ en tejidos nerviosos como fueron la retina y el cerebro de *Drosophila* revelaron defectos en ambos tejidos. La expresión en la retina produjo una acentuada desorganización del tejido así como defectos en las membranas que forman la retina. La identificación de mutaciones en genes implicados en la adhesión celular como modificadores del fenotipo ojo rugoso (véase *Apartado 4.2.3 de Resultados*) nos sugería que el defecto encontrado en estas membranas de la retina podía estar relacionado con una alteración en las adhesiones celulares. Esta alteración probablemente también tenga lugar en pacientes con DM1.

No pudimos utilizar este fenotipo de letalidad pupal para un rastreo genético de modificadores que proporcionara candidatos a intervenir en la ruta de patogénesis de la DM1 porque el recombinante que expresa las expansiones en los cuerpos de seta no se puede mantener al ser letal. Necesitábamos pues, otro fenotipo que pudiera ser modificado mejorándolo o empeorándolo según la dosis génica del gen a ensayar.

4. Búsqueda de mutaciones que modifican un fenotipo de toxicidad a las repeticiones CUG

Al comprobar que nuestro modelo reproducía aspectos críticos de la enfermedad DM1, como son la detección de *foci* ribonucleares que colocalizan con *Muscleblind*, los defectos en el procesado de transcritos específicos como es la α -*actinina*, la degeneración muscular y el deterioro de la retina, disponíamos de una herramienta genética útil para hacer una búsqueda de modificadores dominantes que pudieran estar relacionados con la toxicidad a CUGs incluyendo potenciales dianas directas o indirectas de *muscleblind*.

Decidimos hacer la búsqueda de modificadores genéticos en moscas que presentaban un fenotipo de ojo rugoso al expresar el transgén *UAS-(CTG)₄₈₀* bajo el patrón de *sevenless-GAL4* (Figura 4.1). *sevenless* es un receptor de tipo tirosina kinasa que especifica el destino celular del fotorreceptor R3, R4, R7 y células como en

Resultados

cada omatidio (Dickson y Hafen, 1993). La expresión en esos tipos celulares producía un ojo rugoso debido a una desorganización de los omatidios y de las quetas mecanosensoras del ojo adulto. Además de esta alteración se observaba un tamaño menor al que presentaban los ojos control (Figura 4.1). Por ambos criterios morfológicos sería fácil detectar tanto mejora como agravamiento del fenotipo. Por otro lado, este fenotipo era sensible a cambios de dosis génica de otros genes. Es el caso de la dosis génica de *muscleblind* que potenciaba ligeramente la toxicidad de las repeticiones CUG al introducir un alelo hipomórfico fuerte o más en el heterocigoto compuesto (Figura 2.16).

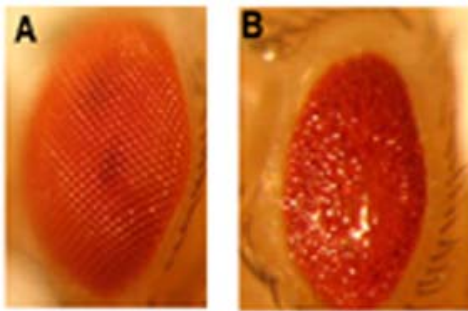


Figura 4.1. La expresión de $(CTG)_{480}$ dirigida por *sevenless* produce un fenotipo de ojo rugoso. (A) Moscas control con el genotipo *sev-GAL4/+*. (B) Moscas *sev-GAL4/ UAS- (CTG)_{480} 1.1* que muestran un fenotipo de ojo rugoso y una reducción en el tamaño del ojo. Cruces realizados a 25 °C.

4.1. Identificación de mutaciones que interaccionan predominantemente con la expresión de RNAs $(CUG)_{480}$ en el ojo de *Drosophila*

Generamos cromosomas recombinantes que contuvieran las dos inserciones, *UAS-(CTG)_{480}* y *sevenless-GAL4* en el cromosoma 3. Las 3 líneas recombinantes que escogimos eran sensibles a la temperatura, por lo que a 29 °C presentaban un fenotipo de ojo muy rugoso. En condiciones experimentales normales la temperatura de cultivo fue de 25 °C.

En primer lugar nos planteamos realizar un rastreo piloto para comprobar si el fenotipo de ojo rugoso era modificable. Para este rastreo empleamos una colección de deleciones que cubría aproximadamente el 55 % del genoma de *Drosophila* (colección de deleciones de *Bloomington Drosophila Research Center*). Esta colección estaba constituida por un total de 80 deleciones del cromosoma 2 y 86 del cromosoma 3. Identificamos 26 deleciones que modificaban visiblemente el fenotipo pero sólo actuaban como modificadores fuertes 6 potenciando y 3 suprimiendo (Tabla 4.1).

Deficiencia	Modificador	Localización citogenética	Genes candidatos
<i>Df (2L) 23C;23E3-6</i>	Potenciador	23C;23E3-6	<i>glait</i>
<i>Df (2L) BSC5, w/ SM6a</i>	Potenciador	26B01-02; 26D01-02	<i>chickadea</i> , <i>slowmo</i> , <i>Ddr</i> , <i>Pez</i> , <i>pickpocket7</i> , <i>Tiggrin</i>
<i>Df(2R) PC4/ CyO</i>	Potenciador	55A; 55F	<i>scribbler</i> , <i>GstE1-10</i>
<i>Df(3L) M21, kni p/ In T33 f19</i>	Potenciador	62F; 63D	<i>karst</i>
<i>Df(3L) AC1, roe p /TM3, Sb</i>	Potenciador	67A2; 67D7-13	<i>lamininB2</i>
<i>Df(3L) st-f13, Ki roe p/TM6B, Tb</i>	Potenciador	72C1-D1; 73A3-4	
<i>Df(2L)J-H/SM5</i>	Supresor	27C2-9; 28B3-4	<i>nop5</i> , <i>X16</i>
<i>In (2R) bw Cy/ In Gla, Gla</i>	Supresor	41A-B; 42A2-3	<i>Tpnc4</i> , <i>dream</i>
<i>Df(3L) rdgC-co2, th st in kni p/ TM6C, cu Sb Tb ca</i>	Supresor	77A1; 77D1	<i>rdgC</i> , <i>presenilin</i>

Tabla 4.1. Regiones del cromosoma 2 y 3 que interaccionaron genéticamente con *sev-GAL4> UAS-(CTG)₄₈₀*. En la primera columna se muestra el nombre de la deficiencia. En la segunda columna se muestra para cada línea en qué sentido se modifica el fenotipo. La columna Localización citogenética indica la región delecionada para cada línea. En la última columna se muestran algunos de los genes incluidos en las deleciones que interaccionaron que nos parecieron interesantes por diferentes motivos: en **rojo** los que codifican para componentes estructurales del citoesqueleto o están asociados a ellos, en **verde** los factores de transcripción, en **azul** los implicados en adhesión celular y en **naranja** los relacionados en la contracción muscular.

Estas interacciones no fueron analizadas en más profundidad porque el objetivo de este rastreo era comprobar que el fenotipo de *sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀* era modificable para realizar un rastreo a gran escala con inserciones letales de elementos P.

Realizamos un rastreo genético cruzando hembras *sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀* con líneas que contenían un elemento P insertado en los cromosomas 2 (498 líneas) o 3 (174 líneas) (Figura 4.2).

Resultados

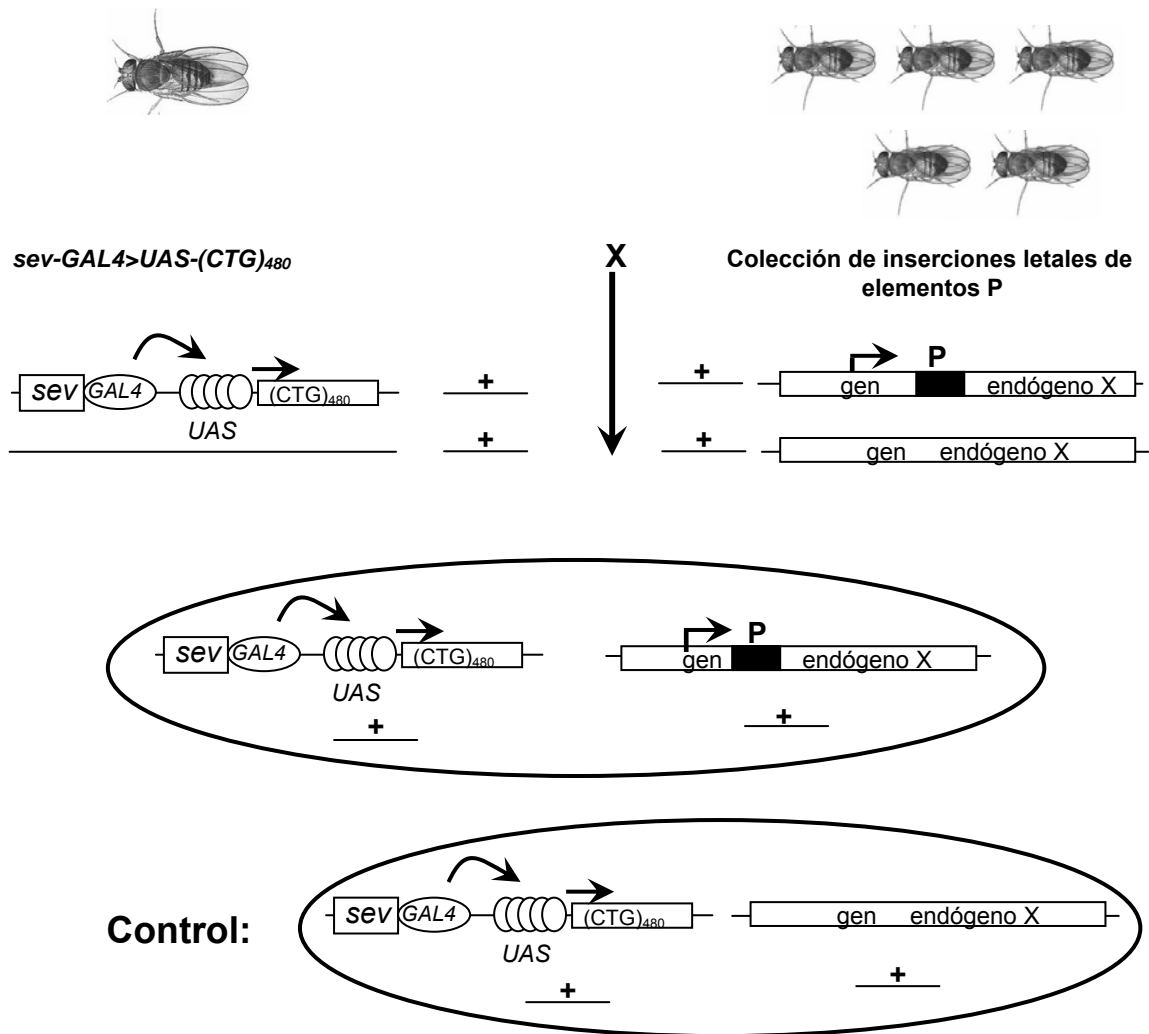


Figura 4.2. Esquema del rastreo realizado para buscar mutaciones que modifiquen el fenotipo de ojo rugoso por expresión de RNAs CUG. La línea recombinante $sev-GAL4 > UAS-(CTG)_{480}$ expresa el transgén $UAS-(CTG)_{480}$ por la unión del factor de transcripción *GAL4* a las secuencias *UAS*. Su expresión se dirige al ojo determinado por la línea *sev-GAL4*. Esta línea recombinante se cruzó con la colección de inserciones de elementos P. Cada línea tiene insertado un elemento P en el genoma que interrumpe la función de un determinado gen según la línea utilizada. En la descendencia el fenotipo ojo rugoso debido a la expresión de $(CTG)_{480}$ puede verse modificado por la reducción en la dosis génica de *X* (expresión reducida a aproximadamente el 50% del normal). Este fenotipo se compara con el fenotipo ojo rugoso producido por la expresión $(CTG)_{480}$ *per se*, con el gen *X* silvestre.

En la descendencia de los cruces comprobamos si estas inserciones P letales eran capaces de modificar de forma dominante el fenotipo de ojo rugoso. Así identificamos 13 líneas que interaccionaron; 3 intensificaban el fenotipo y 10 lo suprimían. Además estudiamos una serie de genes candidatos que revelaron 2 potenciadores más, *Aly* y *seven-up*. Los genes afectados por estas mutaciones pudimos agruparlos en 5 procesos celulares aunque en algunos casos no pudimos

asignar la mutación a un gen o la proteína codificada es de función desconocida. (Tabla 4.2)

Línea P	Modificador	Gen	Función
Factores de transcripción reguladores			
<i>l(3)j5E7</i>	Supresor	<i>cap-n-collar</i>	Factor de transcripción de tipo cremallera de leucina básico. Las larvas mutantes <i>cnc</i> no tienen estructuras labrales
<i>svp¹</i>	Potenciador	<i>seven up</i>	Pertenece a la superfamilia del receptor nuclear de la hormona esteroide, requerida para la identidad de los subtipos R3/4 y R1/6
Reguladores de la estructura de la cromatina			
<i>l(2)k16102</i>	Supresor	<i>Nurf-38</i>	Factor remodelador de la cromatina
<i>l(3)j8B6</i>	Supresor	<i>jumeaux</i>	Un supresor de la variegación por efecto de posición con dominios forkhead/winged. Implicado en el desarrollo del ojo y las quetas
<i>jumu^{L70}</i>	Supresor	<i>jumeaux</i>	
Adhesión celular			
<i>l(3)j8E8</i>	Supresor	<i>fear-of-intimacy</i>	Proteína con dominio transmembrana de la familia FICL que controla la migración de las células gliales
<i>l(2)k08011</i>	Supresor	<i>coro</i>	Proteína de unión a actina posiblemente implicada en la organización y biogénesis del citoesqueleto
<i>l(2)k00236</i>	Potenciador	<i>viking</i>	Cadena 2 α del colágeno de tipo IV (componente de membranas basales)
Apoptosis			
<i>l(2)k09905</i>	Supresor	<i>spinster</i>	Proteína transmembrana expresada en la glía. Los mutantes muestran un exceso de supervivencia neuronal
<i>thread⁴</i>	Potenciador	<i>thread</i>	Proteína Ubiquitin ligasa, inhibe la activación de las caspasas
<i>l(3)j1D8</i>	Supresor	<i>Csk</i>	Regulador de la proliferación celular y apoptosis
Complejo EJC			
<i>l(2)k09907</i>	Potenciador	<i>Dek</i>	Asociado al complejo de unión de exones (EJC)
<i>Aly⁰²²⁶⁷</i>	Potenciador	<i>Aly</i>	Proteína asociada a EJC que participa en la exportación de transcritos
Miscelánea			
<i>l(2)k10502</i>	Potenciador	<i>CG4589</i>	Elemento P insertado en <i>CG4589</i> , dominio de unión a calcio
<i>l(2)k00808</i>	Supresor	<i>mAcR-60C</i> o <i>Plkk1</i>	Probablemente muta los genes <i>mAcR-60C</i> o <i>Plkk1</i>
<i>l(2)k05911</i>	Supresor	<i>CG6043</i>	Elemento P insertado en <i>CG6043</i> . Desconocido

Resultados

Tabla 4.2. Modificadores genéticos del fenotipo ojo rugoso provocado por sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀. Se utilizó una colección de líneas letales por inserción del elemento P y varios alelos mutantes de genes candidatos. Se identificaron 13 modificadores como potenciadores o supresores que modificaban el fenotipo ojo rugoso. La columna de Función se ha tomado de los informes de cada gen disponibles en la bibliografía. Los genes se agruparon por clases funcionales.

4.2. Análisis de los genes que presentan interacción genética dominante con la expresión de RNAs CUG en el ojo de *Drosophila*

En primer lugar identificamos el *locus* al que afectaba la inserción P de las líneas que interaccionaron. Para ello realizamos comparaciones con el algoritmo Blastn de las secuencias disponibles adyacentes al punto de inserción del elemento P de cada línea con el DNA genómico de *D. melanogaster* (Figura 4.3).



Figura 4.3. Esquema de los Blastn realizados para localizar el posible locus afectado por las inserciones. (A) La línea *I(2)k09905* probablemente afecta al locus del gen *spinster* y (B) la *I(2)k08011* al locus del gen *coro*. Imagen obtenida en la base de datos de *Drosophila* (<http://www.flybase.org>).

En segundo lugar los genes que interaccionaron decidimos agruparlos en cinco categorías en función del proceso celular en el que estuvieran actuando para ayudarnos a entender a qué posibles rutas podían estar relacionados;

- Factores de transcripción reguladores
- Reguladores de la estructura de la cromatina
- Adhesión celular
- Apoptosis
- Metabolismo del RNA: *Exon Junction Complex* (EJC)

En los casos en los que fue posible utilizamos mutaciones independientes del mismo gen para confirmar la interacción.

Hubo un grupo de líneas que no las pudimos catalogar por su función específica porque no había información disponible del gen al que mutaban. Estas líneas las agrupamos bajo la categoría miscelánea.

4.2.1. Factores de transcripción reguladores

En esta categoría funcional identificamos la mutación *j5E7* que se asociaba al gen *cap and collar* (*cnc*). Utilizamos varios alelos de *cnc*: *cnc*⁰³⁹²¹ es un alelo de falta de función junto con *cnc*^{j5E7}; *cnc*^{EP3258} y *cnc*^{EP3633} son alelos con la inserción del elemento EP en la región 5'UTR de la isoforma *cncC* (Ruden 2002, comunicación personal a *FlyBase*) (Figura 4.4).

Resultados

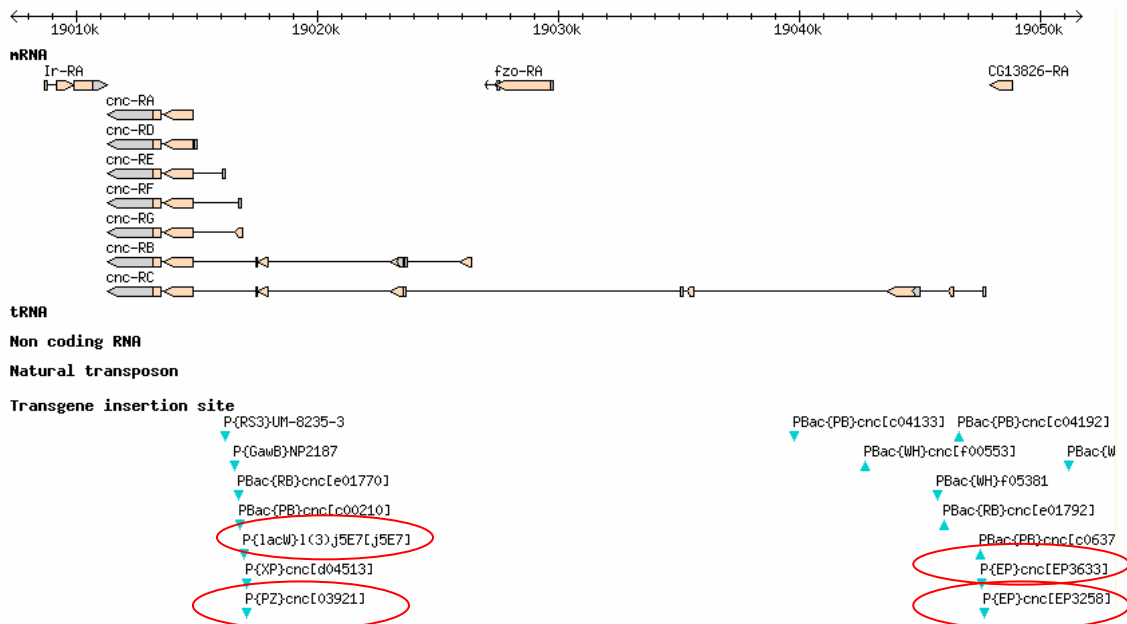


Figura 4.4. Región genómica de *cnc* y las inserciones de elementos transponibles. Se muestran las posiciones de las inserciones de elementos transponibles P y EP ensayados (círculo rojo), así como los transcritos derivados de *cnc*. Las regiones codificantes se muestran en naranja, las no codificantes en gris y el intrón se representa con una línea horizontal. Imagen obtenida en la base de datos de *Drosophila* (<http://www.flybase.org>).

El alelo *cnc*⁰³⁹²¹ suprimió el fenotipo de ojo rugoso de manera semejante a *cnc*^{j5E7}. En cambio, las otras dos inserciones del elemento EP no lo modificaron sugiriendo que la posible falta de función de la isoforma *cncC* no era suficiente para modificar el fenotipo. El hecho de que los alelos *cnc*^{j5E7} y *cnc*⁰³⁹²¹ por falta de función supriman el fenotipo apoyaba que se tratara de una interacción específica (Tabla 4.3).

Alelos	Tipo de alelo	Modificador
<i>cnc</i> ^{j5E7}	Inserción elemento P: falta de función	Supresor
<i>cnc</i> ⁰³⁹²¹	Inserción elemento P: falta de función	Supresor
<i>cnc</i> ^{EP3258}	Inserción elemento EP: falta de función de <i>cncC</i>	No modifica
<i>cnc</i> ^{EP3633}	Inserción elemento EP: falta de función de <i>cncC</i>	No modifica

Tabla 4.3. Alelos de *cnc* ensayados en la modificación del fenotipo de RNAs CUG. En la columna de la izquierda se muestran los alelos utilizados, en la columna central se indica el tipo de elemento transponible insertado y en la derecha se indica la interacción entre el alelo y la expresión de CUGs.

cnc está involucrado en la determinación de los ejes en el oocito y en la identidad de los dos segmentos faríngeos, mandibular y labral (Mohler et al., 1995; Guichet et al., 2001). Es un gen homeótico selector que codifica para una proteína que contiene una región básica conservada. Esta región es la cremallera de leucinas básicas (bZIP) que participa en la dimerización y la unión a DNA. Dentro de la familia de las proteínas bZIP, además de Cnc se encuentran otras subfamilias como CREB/CREM y PAR (revisado en Hai y Hartman, 2001; Haas et al., 1995) que se han visto involucradas en la homeostasis de neurotransmisores, en la detoxificación y metabolismo de drogas y en la activación de la expresión de un gen involucrado en apoptosis (Gachon et al., 2006); Benito et al., 2006). La subfamilia Cnc contiene al factor de transcripción bZIP que está estrechamente relacionado con el factor de transcripción NF-E2 (subunidad p45) el cual contiene un dominio denominado *cnc* en la proteína p45 (Figura 4.5). Esta proteína regula la síntesis de hemoglobina en mamíferos. La interrupción de la subunidad p45 impide la diferenciación de los eritrocitos de ratón (Andrews et al., 1993).



Figura 4.5. La subunidad p45 del factor de transcripción NF-E2 contiene un motivo *cnc*. El dominio *cnc* incluye el segmento bZIP y los aminoácidos adyacentes. Imagen tomada de Andrews, 1998.

La escasa información acerca de la expresión en tejidos adultos y función del gen *cnc* no permite sugerir una relación clara entre el mecanismo de patogénesis de las expansiones CTG y el gen *cnc* (véase *Apartado 3 de Discusión*).

4.2.2. Reguladores de la estructura de la cromatina

En esta categoría agrupamos los genes *jumeaux* y *Nurf-38*.

jumeaux

Según la base de datos de *Drosophila* (<http://www.flybase.org>) el elemento P *j8B6* se inserta en el primer intrón del gen *jumu*, posiblemente afectando la función de este gen (Figura 4.6). Este alelo se identificó como un supresor del fenotipo de expresión de la expansión (CTG)₄₈₀ en ojo.

Resultados

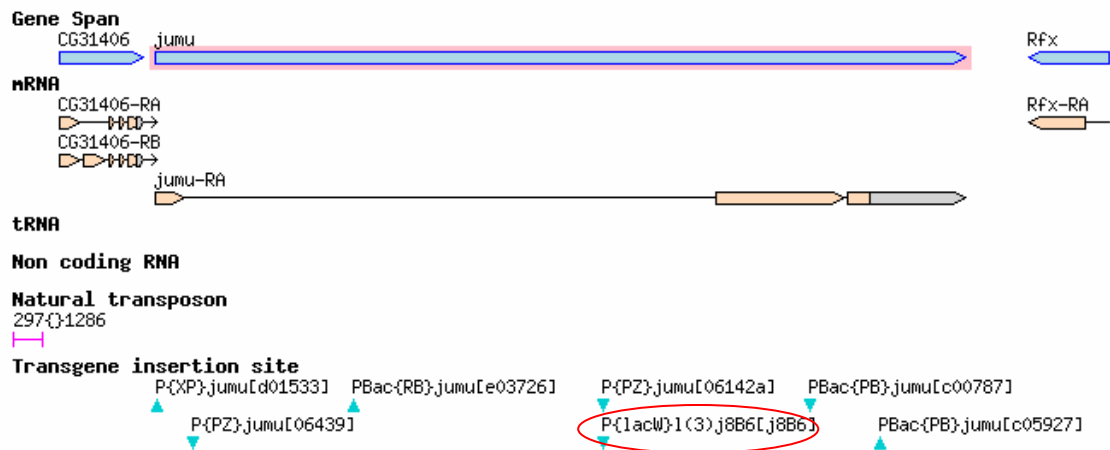


Figura 4.6. Región genómica de *jumu* y la inserción del elemento transponible utilizado. Se muestra la posición de la inserción del elemento transponible P ensayado (círculo rojo). El gen *jumu* sólo presenta un transcrito. Las regiones codificantes se muestran en naranja, las no codificantes en gris y el intrón se representa con una línea horizontal. Imagen obtenida en la base de datos de *Drosophila* (<http://www.flybase.org>).

En un rastreo genético de modificadores del fenotipo de ojo rugoso producido por la sobreexpresión de *mbIC* en ojo se identificó el alelo *jumu*^{L70} como un supresor de este fenotipo (Pascual, 2005). Probamos este alelo con el recombinante *sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀* y observamos que el alelo *jumu*^{L70} suprimía el fenotipo con respecto a sus hermanos que recibían el cromosoma *TM3* pero no con respecto a controles externos. Como el cromosoma equilibrador *TM3* aumenta en ocasiones los fenotipos de manera inespecífica no podemos confirmar la interacción entre *jumu*^{L70} y la expresión de RNAs (CUG)₄₈₀ en ojo. Sin embargo, trabajos independientes en el laboratorio confirmaron que un alelo de *jumu*, *jumu*⁴³¹², interaccionaba suprimiendo el fenotipo producido tanto por la expresión de *mbIC* como por la de la expansión (CTG)₄₈₀ en ojo (Pascual, 2005). De modo que conocíamos dos alelos de falta de función de *jumu*, *jumu*^{L70} y *jumu*⁴³¹² que suprimían predominantemente el fenotipo de ojos rugosos producido por la expresión del transgén *UAS-mbIC* y *UAS-(CTG)₄₈₀* (Tabla 4.4). El hecho de que observáramos interacción del gen *jumu* en la expresión de los dos transgenes y que *jumu* no interaccionara con otros fenotipos sensibilizados (Muñoz-Descalzo, comunicación personal) nos indica que se trata de una interacción específica.

Alelos	sev-GAL4 UAS- <i>mbIC</i>	sev-GAL4 UAS-(CTG) ₄₈₀
<i>jumu</i> ^{j8B6}	-	Supresor
<i>jumu</i> ^{L70}	Supresor	¿Supresor?
<i>jumu</i> ⁴³¹²	Supresor	Supresor

Tabla 4.4. Alelos de *jumu* ensayados en la expresión de RNAs (CUG)₄₈₀. En la columna de la izquierda se muestran los alelos utilizados, en la columna central se indica el sentido de la modificación del ojo rugoso producido por la sobreexpresión de *mbIC* y en la columna de la izquierda se indica como modificaba cada alelo el fenotipo inducido por la expresión de (CTG)₄₈₀.

El gen *jumu* codifica una proteína que tiene dominios de unión a DNA del tipo FKH/WH (*Forkhead/ winged-helix family*) normalmente asociados a proteínas que actúan como factores de transcripción como Foxp3, Foxg1 y Foxn4 entre otros. Esta proteína actúa como supresor dominante del fenotipo de variegación por efecto de posición (PEV) y se acumula en *loci* específicos de eucromatina. Su efecto sobre el PEV junto con la localización en los cromosomas politénicos sugiere que *jumu* tiene una función como remodelador de la cromatina en el establecimiento y/o mantenimiento de su estructura (Strodicke et al., 2000).

La interacción sugiere que es específica debido a:

- Se realizó un ensayo de dos híbridos entre más de 4500 proteínas de *Drosophila* y se presentó un mapa de las interacciones proteicas. *muscleblind* fue uno de los cDNAs ensayados que interaccionó con *jumu* aunque la interacción fue débil (Giot et al., 2003).

- El patrón de expresión de *jumu* solapa con el de *muscleblind* en los tejidos de disco de imaginal de ojo, SNC y SNP (Strodicke et al., 2000).

- Se observó un solapamiento parcial entre las señales de MbIC y Jumu en los cromosomas politénicos (Pascual, 2005).

- El alelo por falta de función *jumu*⁴³¹² interaccionó génicamente con la sobreexpresión de *mbIC* suprimiendo el fenotipo de ojo rugoso (Pascual, 2005).

Todos estos datos sugerían que Muscleblind y Jumu podrían estar relacionados funcionalmente de una manera directa y que la posible relación entre *jumu* y la expresión de las repeticiones CTG fuera a través de las proteínas Muscleblind. Sin embargo, en un ensayo de coimmunoprecipitación se observó que Jumu y MbIC:GFP no interaccionaban físicamente (Pascual, 2005).

Resultados

Nucleosome remodeling factor (*Nurf-38*)

Identificamos en el rastreo de modificadores dominantes del fenotipo ojo rugoso al alelo *Nurf-38*^{k16102} como supresor (Figura 4.7).

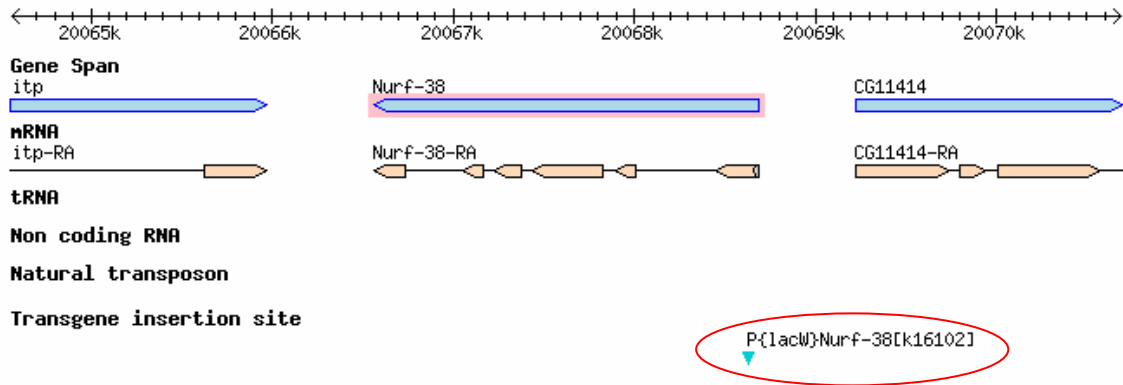


Figura 4.7. Región genómica de *Nurf-38* y la inserción del elemento transponible utilizado. Se muestra la posición de la inserción del elemento transponible P ensayado (círculo rojo). El gen *Nurf-38* sólo presenta un transcrito. Las regiones codificantes se muestran en naranja y el intrón se representa con una línea horizontal. Imagen obtenida en la base de datos de *Drosophila* (<http://www.flybase.org>).

Nurf es un complejo de cuatro polipéptidos que median la unión dependiente de ATP del factor GAGA a varios promotores *heat-shock*. *Nurf-38* es una subunidad (polipéptido) del complejo NURF que codifica para una pirofosfatasa inorgánica (PPasa), un enzima esencial para dirigir reacciones biosintéticas críticas como la transcripción, replicación y reparación del DNA. Experimentos *in vitro* demuestran que *Nurf38* tiene un papel estructural o de regulador en el complejo NURF el cual facilita, junto con el complejo SWI/SNF, la unión de los factores de transcripción al DNA nucleosomal sin expulsar a las histonas asociadas (revisado en Devine et al., 1999).

No pudimos confirmar con ningún otro alelo de *Nurf-38* la interacción porque no existen mutantes para este gen salvo el ensayo, aunque el hecho de que en otros dos rastreos independientes realizados en el laboratorio no se encontrara interacción con *Nurf-38* sugiere que la interacción era específica.

4.2.3. Adhesión celular

En esta categoría agrupamos a los genes *viking*, *coro* y *foi* porque son genes relacionados con la matriz extracelular, citoesqueleto y migración celular, respectivamente.

viking

Identificamos en el rastreo de modificadores dominantes del fenotipo ojo rugoso al alelo *viking*^{k00236} como potenciador fuerte (Figura 4.8). *viking* codifica para la cadena α -2 del colágeno tipo IV. Las cadenas α -1 y α -2 forman parte de las membranas basales en *Drosophila* y actúan como estabilizadoras de las interacciones célula-matriz (Borchiellini et al., 1996). Utilizamos el alelo *l(2)01209*, que pertenece al *locus* de *viking* (Halsell y Kiehart, 1998), para comprobar la relevancia de esta interacción, pero no hubo ninguna modificación del fenotipo. Se ha descrito que los alelos de *viking* muestran complementación interalélica (Wilk et al., 2004) como ocurre entre los alelos *viking*⁰¹²⁰⁹ y *viking*^{k00236}. El hecho de que fueran mutaciones que pertenecieran a diferentes grupos de complementación podría explicar que no hubiera interacción entre este alelo *viking*^{k00236} con el fenotipo ojo rugoso.

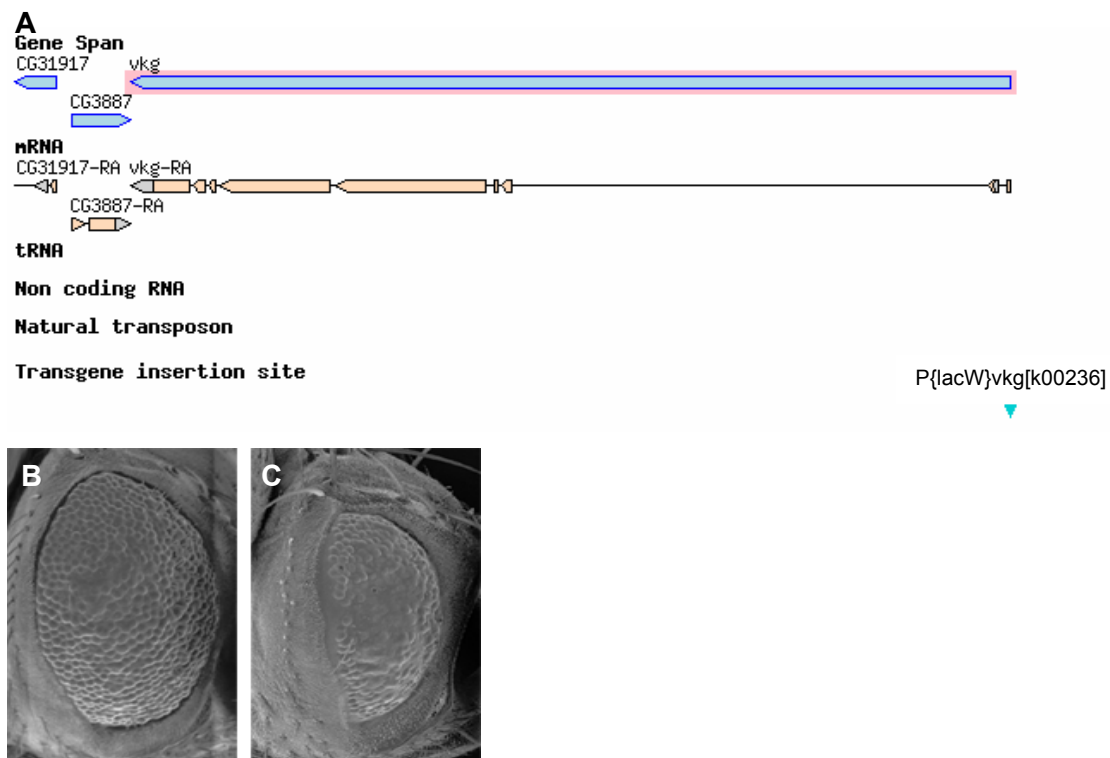


Figura 4.8. El alelo *viking*^{k00236} potencia el fenotipo ojo rugoso. (A) Región genómica de *viking* y la inserción del elemento transponible utilizado. Se muestra la posición de la inserción del elemento transponible P ensayado (triángulo azul). El gen *viking* sólo presenta un transcrito. Las regiones codificantes se muestran en naranja y el intrón se representa con una línea horizontal. Imagen obtenida en la base de datos de *Drosophila* (<http://www.flybase.org>). (B y C) Se muestran ojos visualizados por microscopía electrónica de barrido. (B) Control con genotipo *sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀/+*. (C) *vkg*^{k00236}/*+*; *sev-GAL4 -UAS-(CTG)₄₈₀*. La reducción de la dosis de *viking* potencia la rugosidad y reduce el tamaño del ojo. La temperatura del cruce fue 25 °C.

Resultados

En trabajos independientes en el laboratorio se identificó la delección (2L) sc19-8, que incluye entre otros al gen *viking*, como supresor del fenotipo de ojo rugoso producido por la sobreexpresión de *mb1C* en ojo. Estos resultados a priori pueden ser relevantes porque con la expresión de (CTG)₄₈₀ se potenciaba el fenotipo y con la sobreexpresión de *mb1C*, proteína que se retiene en los *foci* ribonucleares, se ve suprimido el fenotipo ojo rugoso.

coro

La mutación *l(2)k08011* afecta al gen *coro* (Figura 4.9) y se identificó como supresora del fenotipo de expresión de la expansión (CTG)₄₈₀ en ojo.

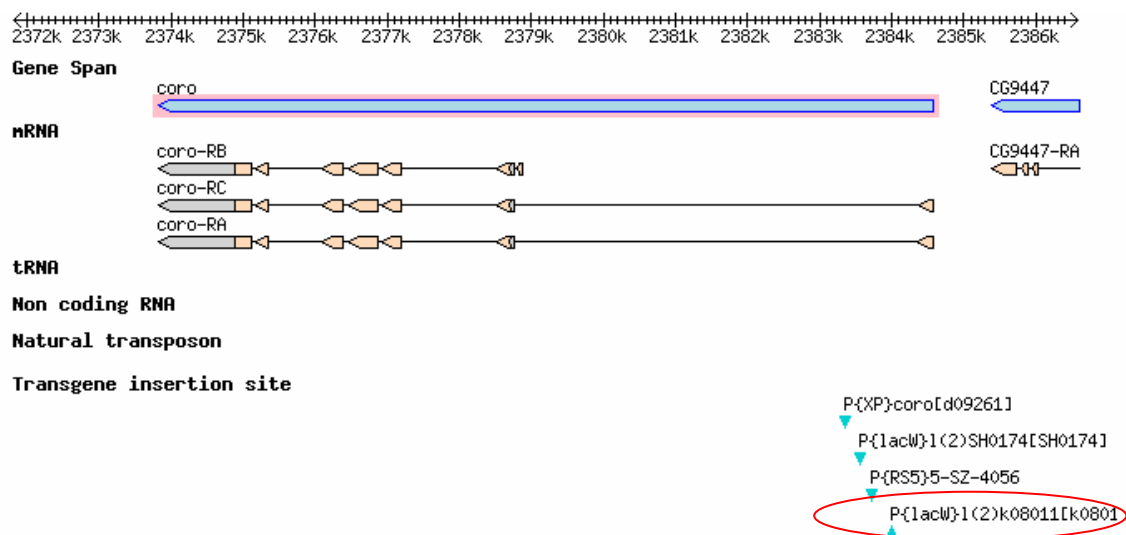


Figura 4.9. Región genómica de *coro* y la inserción del elemento transponible utilizado. Se muestra la posición de la inserción del elemento transponible P ensayado (círculo rojo). El gen *coro* produce tres variantes de procesado. Las regiones codificantes se muestran en naranja y el intrón se representa con una línea horizontal. Imagen obtenida en la base de datos de *Drosophila* (<http://www.flybase.org>).

coro codifica para el homólogo en *Drosophila* de la proteína de unión a F-actina denominada coronina y éstas son reguladores del citoesqueleto de actina, se unen a los filamentos de actina y están implicados en modular la dinámica de la actina (revisado en Uetrecht y Bear, 2006). La interacción con este gen es relevante porque estos procesos en los que participa *coro* también ocurren en la formación y desarrollo del ojo en *Drosophila*. Además *coro* se expresa en las neuronas fotorreceptoras en el disco de ojo. Alelos viables de *coro* producen una variedad de fenotipos como es el

caso de una organización inapropiada de los omatidios en el desarrollo del ojo (revisado en Rybakin y Clemen, 2005).

fear-of-intimacy

Identificamos en el rastreo de modificadores dominantes del fenotipo ojo rugoso al alelo *foi*^{j8E8} como supresor (Figura 4.10).

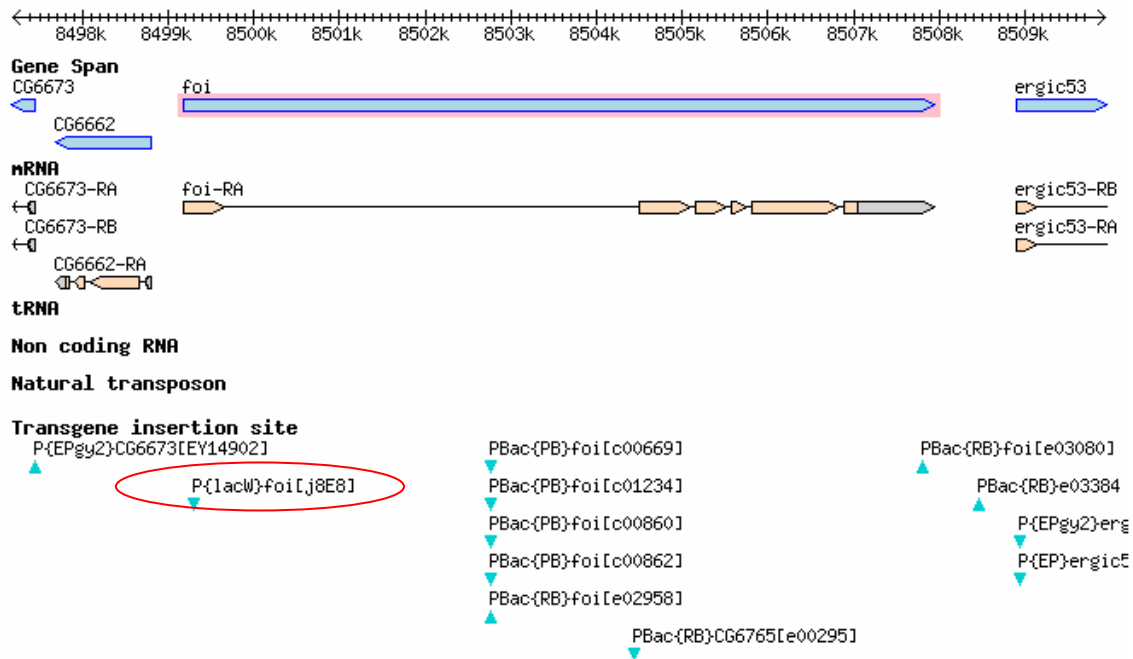


Figura 4.10. Región genómica de *foi* y la inserción del elemento transponible utilizado. Se muestra la posición de la inserción del elemento transponible P ensayado (círculo rojo). El gen *foi* sólo genera un transcrito. Las regiones codificantes se muestran en naranja, las no codificantes en gris y el intrón se representa con una línea horizontal. Imagen obtenida en la base de datos de *Drosophila* (<http://www.flybase.org>).

fear-of-intimacy (*foi*) codifica para una proteína transmembrana que se requiere para la migración celular. En el sistema nervioso periférico larval, los axones de los fotorreceptores se proyectan a través del tallo óptico del cerebro. Las células gliales nacen en los lóbulos ópticos y migran a través del tallo óptico hacia las células fotorreceptoras (Choi y Benzer, 1994). Las células de la glía se guían por señales liberadas desde células fotorreceptoras en desarrollo en el disco de ojo y guían a los axones de los fotorreceptores para que éstos puedan entrar al tallo óptico (Rangarajan et al., 1999). La inducción de clones en ojo mutantes para *foi* produce un fenotipo ojo rugoso debido a la falta de comunicación entre los dos tipos de células que

Resultados

interaccionan resultando en un parada prematura en la migración o en una migración hacia una diana inapropiada (Pielage et al., 2004).

Según nuestro resultado, la reducción de la función de *foi* modifica el fenotipo producido por la expresión de $(CTG)_{480}$ sugiriendo que este fenotipo de ojo rugoso podría presentar algún defecto en la migración de las células fotorreceptoras. Analizamos secciones frontales de ojo de moscas que expresaban las expansiones con *gmr-GAL4* (Figura 4.11).

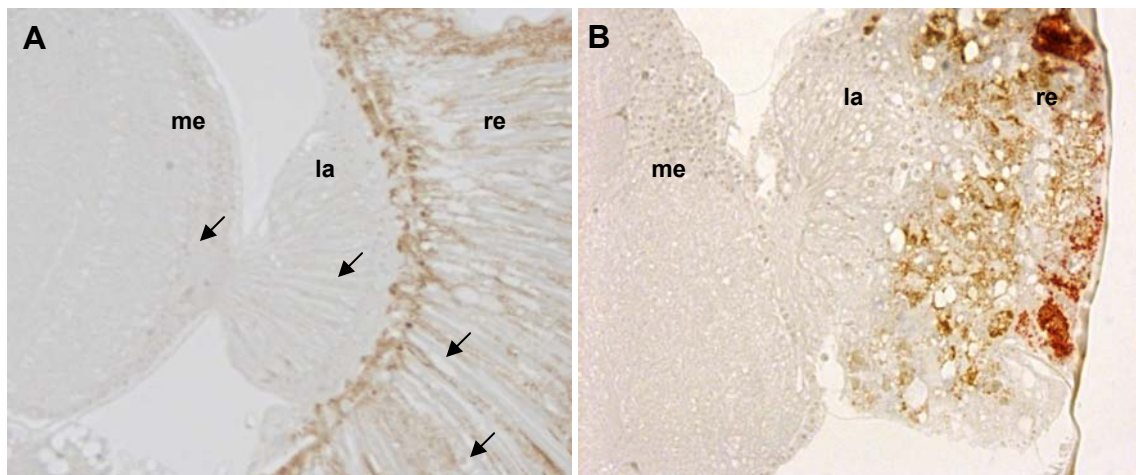


Figura 4.11. Análisis de la migración de los fotorreceptores en moscas que expresan $(CTG)_{480}$ en ojo. Se muestran secciones frontales de ojos de 2 μm de grosor. **(A)** Moscas control con el genotipo *gmr-GAL4*. Se observan los fotorreceptores en la retina (**re**) (**flechas**) y sus proyecciones axonales (**flechas**) hacia la lámina (**la**) y la médula (**me**). **(B)** Moscas con el genotipo *gmr-GAL4/+; UAS-(CTG)₄₈₀ 1.1/+*. Se puede distinguir la retina, lámina y médula pero no podemos visualizar los fotorreceptores.

Según nuestras observaciones no podemos asegurar que haya defectos en la migración de las células fotorreceptoras en moscas que expresan las repeticiones $(CTG)_{480}$ en ojo porque las secciones muestran un deterioro en la retina que no permite discernir los fotorreceptores.

La detección de mutaciones de genes implicados en procesos de adhesión celular como es la interacción con *viking*, sugiere que en este modelo de DM1 en *Drosophila* la adhesión de las células del disco de ojo está alterada (Figura 3.2 *Apartado de Resultados*). Las mutaciones de genes implicados en la migración celular como es *coro* y *foi*, sugieren que como los defectos en la migración celular pueden ser debidos a alteraciones en las adhesiones celulares, el fenotipo ojo rugoso producido

por la expresión de (CTG)₄₈₀ sea debido en parte a un defecto en las adhesiones celulares. Las moléculas de adhesión celular inhiben la apoptosis en células que están unidas al sustrato por la activación de rutas de señalización que promueven la supervivencia e inactivan las que promueven la apoptosis. La pérdida de unión de una célula a la matriz extracelular por una alteración en las uniones celulares puede producir que la célula entre en apoptosis pudiendo ser que el fenotipo de ojo rugoso se deba en parte a la falta de células y desorganización desencadenando que las células entren en muerte celular programada.

4.2.4. Apoptosis

spinster

Identificamos en el rastreo de modificadores dominantes del fenotipo ojo rugoso al alelo *spinster*^{k09905} como supresor (Figura 4.12).

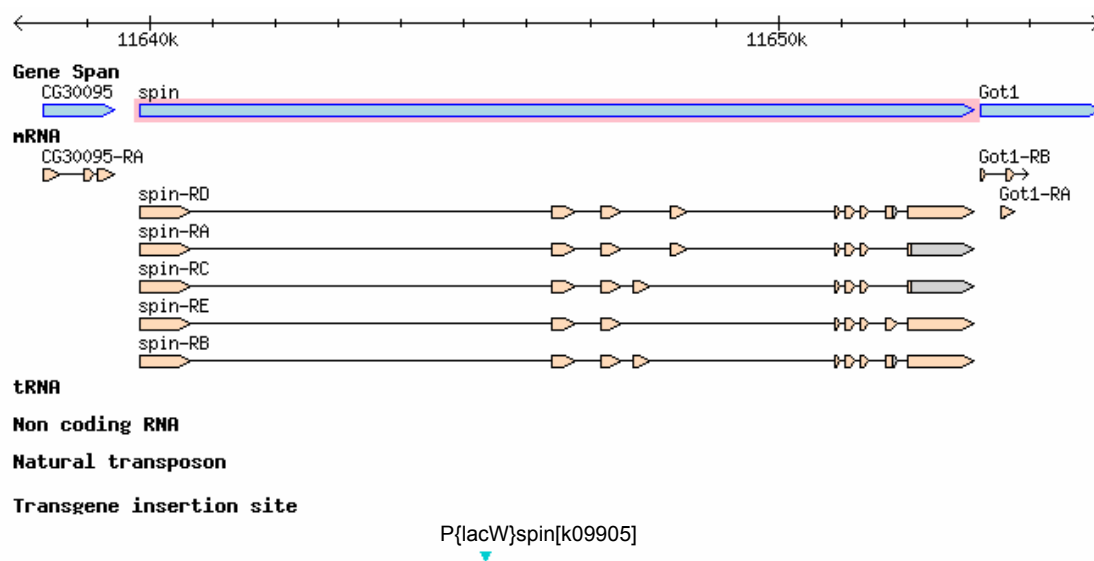


Figura 4.12. Región genómica de *spin* y la inserción del elemento transponible ensayado. Se muestra la posición de la inserción del elemento P transponible utilizado (triángulo azul), así como los cinco transcritos derivados de *spin*. Las regiones codificantes se muestran en naranja, las no codificantes en gris y el intrón se representa con una línea horizontal. Imagen obtenida en la base de datos de *Drosophila* (<http://www.flybase.org>).

El gen *spinster* (*spin*) se expresa principalmente en un subgrupo de la superficie de las células gliales en el sistema nervioso y en las células foliculares de los ovarios. El producto de este gen media las señales apoptóticas desde las células foliculares a las células nodriza o desde la glía a las neuronas. En los mutantes *spin* se

Resultados

ve interferida la muerte celular programada de estas células de modo que al haber células innecesarias se produce una degeneración de oocitos en los ovarios y de neuronas en el SNC (Nakano et al., 2001). Sugerimos que la expresión de las expansiones en el ojo podía producir un fenotipo de ojo rugoso debido en parte a la entrada de células en apoptosis y que una reducción de la función del gen *spin* interfiere en la apoptosis suprimiéndose el fenotipo de ojo rugoso.

C-terminal Src kinasa

Se identificó al alelo *j1D8* del gen *C-terminal Src kinasa* (*Csk*) como supresor (Figura 4.13). Este alelo era el único que existía para este gen de modo que no pudimos ensayar con más mutantes.

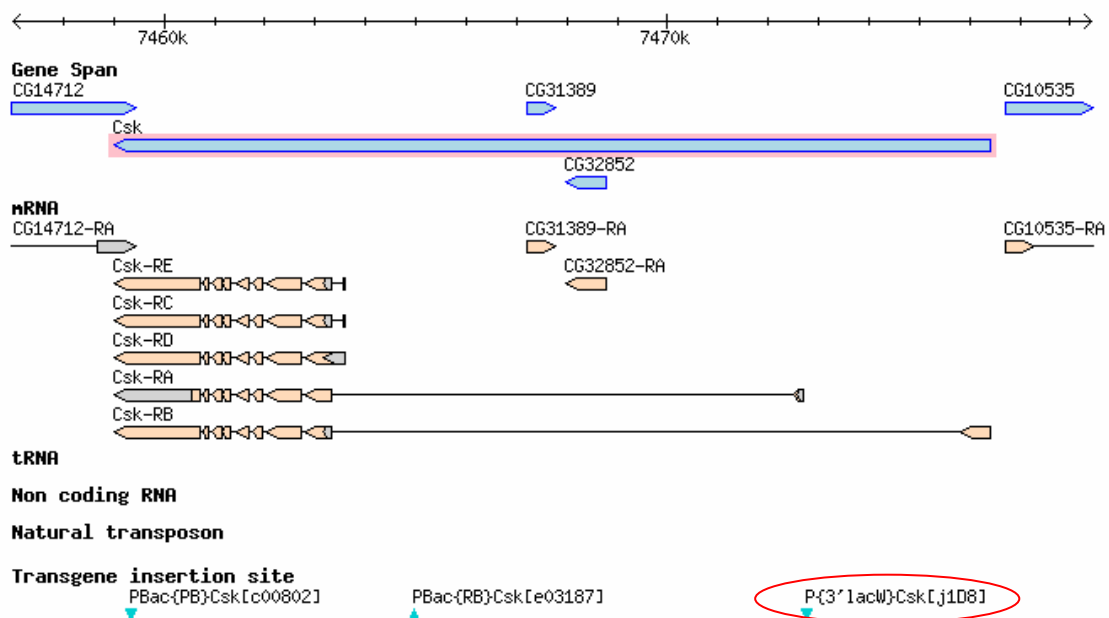


Figura 4.13. Región genómica de *Csk* y la inserción del elemento transponible ensayado. Se muestra la posición de la inserción del elemento P transponible utilizado (círculo rojo), así como los cinco transcritos derivados de *Csk*. Las regiones codificantes se muestran en naranja, las no codificantes en gris y el intrón se representa con una línea horizontal. Imagen obtenida en la base de datos de *Drosophila* (<http://www.flybase.org>).

Se ha descrito que el bloqueo de *Csk* provoca una desorganización en la estructura de la retina incrementándose el número de células como resultado del aumento de la proliferación celular y de la reducción de la apoptosis. Esta pérdida de *Csk* produce una activación de *Src* (*non-receptor tyrosine kinase*) que suprime la apoptosis inducida por la expresión de *reaper* y *hid*. La estructura desorganizada de la

retina se debe a fallos en el mantenimiento de la posición correcta provocado por el fallo en la adhesión celular porque *Src* decrece la adhesión dependiente de E-cadherina (Martin, 2006).

Con estos datos teníamos evidencias genéticas de que el fenotipo ojo rugoso era modificado por genes relacionados con la adhesión celular, la proliferación celular y la apoptosis. Habíamos visto una supresión del fenotipo de ojo rugoso probablemente por la interferencia con la apoptosis cuando se reducía a la mitad la función del gen *spinster*, también era suprimido este fenotipo con la disminución de la dosis de *Csk*. La interacción de estos genes relacionados con la proliferación celular y la apoptosis nos llevo a ensayar con más alelos de genes implicados en apoptosis.

La apoptosis o la muerte celular programada es un mecanismo regulado genéticamente que juega un papel importante en el desarrollo y homeostasis en vertebrados e invertebrados. Múltiples rutas de señalización conducen finalmente a la activación de las caspasas que son proteasas que actúan sobre sustratos celulares claves que desencadenan el ordenado proceso de muerte celular. En *Drosophila* se ha descubierto el papel regulador clave de tres genes, *reaper*, *head involution defective (hid)* y *grim*, en la activación de la apoptosis. REAPER, HID y GRIM inducen a la apoptosis por unión directa e inhibición de la función de DIAP1. DIAP1 interacciona con las caspasas para prevenir su activación y la consecuente muerte celular (Goyal et al., 2000) (Figura 4.14). En *Drosophila* hay descritas siete caspasas que han sido identificadas como Dcp-1, Dredd/Dcp2, Drice, Dronc, Decay, Strica/Dream y Damm/Daydream. El dominio BIR1 de Diap1 permite la unión e inhibición a la caspasa efectora DRICE, y el dominio BIR2 une e inhibe a Dronc (revisado en Twomey y McCarthy, 2005) (Figura 4.15).

Resultados

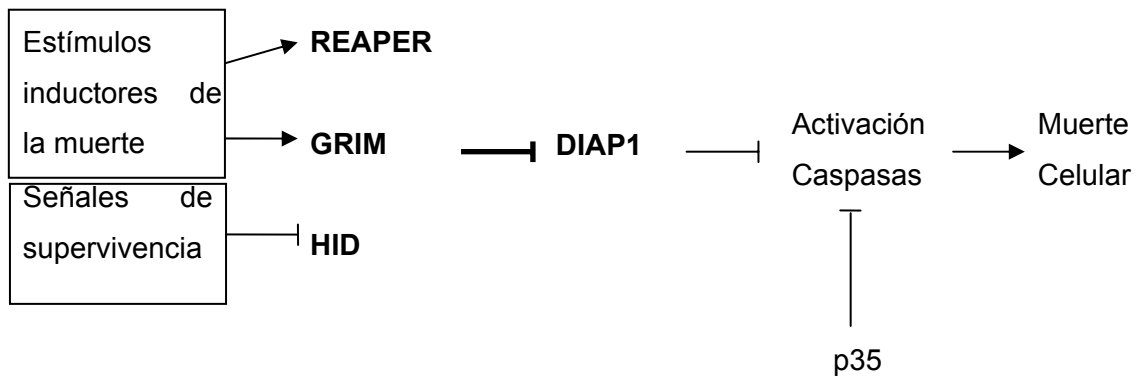


Figura 4.14. Modelo simplificado de la regulación de la muerte celular en *Drosophila*. DIAP1 se une a las pro-caspasas para evitar la activación de las caspasas. REAPER, GRIM y HID se unen a DIAP1 para inactivar a DIAP1 y así activar las caspasas y la apoptosis. p35 es un inhibidor general de caspasas descrito por primera vez en baculovirus. Imagen tomada de Goyal et al., 2000.

Cruzamos las moscas *sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀* con líneas mutantes para el gen *diap1* también llamado *thread*, en concreto los alelos *diap1^{6-3s}* (mutante por ganancia de función), *thread⁴* y *thread⁵* (por pérdida de función) y dos alelos de *diap2*, que codifica para una proteína relacionada con *diap1*, *diap2^{k02205}* (mutante por falta de función) y *gmr-diap2* (de sobreexpresión) (Figura 4.15).

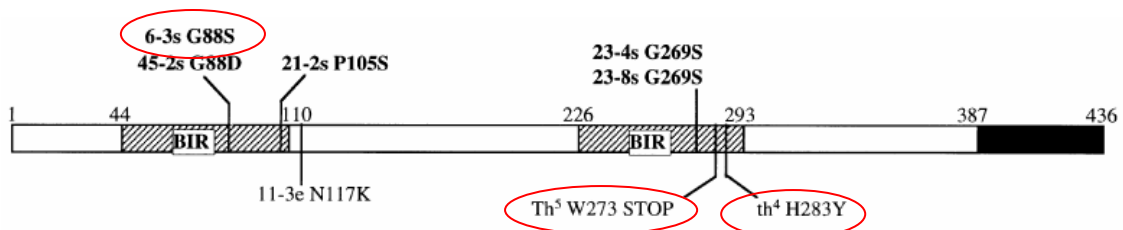


Figura 4.15. Representación esquemática de los mutantes *diap1*. Se representa la proteína DIAP1 en una caja, con los dominios BIR1 y BIR2 y el dominio RING en negro. Los mutantes ensayados se indican en un círculo rojo. La figura está dibujada a escala. Figura tomada de Goyal et al., 2000.

El alelo *thread⁴* que es mutante por pérdida de función potenció mucho el fenotipo ojo rugoso observándose una reducción en el tamaño del ojo (Figura 4.16), mientras que *gmr-diap2* suprimió el fenotipo (dato no mostrado).

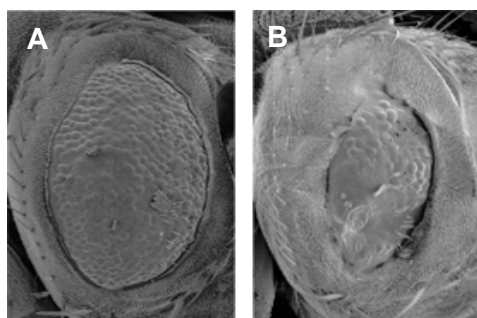


Figura 4.16. Mutantes de *diap1* modifican el fenotipo ojo rugoso producido por *sev-GAL4>UAS-(CTG)₄₈₀*. Se muestran ojos visualizados por microscopía electrónica de barrido. **(A)** Moscas control con el genotipo *sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀ /+* control. **(B)** *sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀ / thread⁴*. Cruce realizado a 25 °C.

Los otros alelos ensayados no interaccionaron con el fenotipo ojo rugoso (Tabla 4.5).

Alelos	Tipo de alelo	Modificador
<i>diap1^{6-3s}</i>	ganancia de función	No modifica
<i>thread⁴</i>	pérdida de función	Potenciador
<i>thread⁵</i>	pérdida de función	No modifica
<i>diap2^{k02205}</i>	mutante letal	No modifica
<i>gmr-diap2</i>	ganancia de función	Supresor
<i>UAS-p35</i>	ganancia de función	letal en estadio de pupa/ no modificación

Tabla 4.5. Alelos de genes anti-apoptóticos ensayados en el fenotipo de expresión de RNAs (CUG)₄₈₀ en el ojo. En la columna de la izquierda se muestran los alelos utilizados, en la columna central se indica el tipo de alelo y en la derecha la interacción entre el alelo y la expresión de (CTG)₄₈₀.

thread⁴ es un mutante por pérdida de función en el cual se produce un cambio de un aminoácido muy conservado en el dominio BIR2 de la proteína DIAP1. A pesar de que la mutación en el dominio BIR2 no afecte a la capacidad de unión de REAPER y HID al menos *in vitro*, probablemente la mutación afecte a la incapacidad de inhibir caspasas (Goyal et al., 2000) siendo por tanto responsable del agravamiento del fenotipo ojo rugoso.

La supresión del fenotipo al sobreexpresar *diap2* bajo el control de *gmr* nos indicó que este fenotipo de expresión de (CTG)₄₈₀ era en parte debido a que las células estaban sensibilizadas a apoptosis y no a que la expresión de las CTGs resultará simplemente tóxica.

El gen *p35* codifica para la subunidad de una citoquina, este producto es un sustrato inhibidor de la apoptosis (Figura 4.14). Decidimos utilizar una línea que

Resultados

expresara *p35* en moscas *sev-GAL4>UAS-(CTG)₄₈₀*. Con este cruce pretendíamos comprobar si el fenotipo ojo rugoso se veía modificado. Habíamos visto que la reducción de la función de un gen antiapoptótico (*diap1*) producía un empeoramiento del fenotipo ojo rugoso correlacionándose con un ojo más reducido posiblemente por entrada de las células en apoptosis. En este caso al expresar un inhibidor de la apoptosis esperábamos ver una mejora del fenotipo. Debido a la línea de partida que disponíamos la descendencia se podía clasificar en tres grupos diferentes:

- *mbf^{E27}/ UAS-p35; sev (CTG)₄₈₀/ +*
- *UAS-p35/ CyO; sev (CTG)₄₈₀/ +*
- *mbf^{E27}/ CyO; sev (CTG)₄₈₀/ +*

Observamos que la mayoría de la descendencia con los genotipos que expresaban *(CTG)₄₈₀* y *p35* se morían en estadio de pupa y los adultos que conseguían salir del pupario presentaban un ojo rugoso que no se podía asegurar si se había modificado respecto al control (*mbf^{E27}/ CyO; sev (CTG)₄₈₀/ +*) porque la expresión del transgén *(CTG)₄₈₀* producía un fenotipo considerablemente variable (Tabla 4.5 y Figura 4.17).

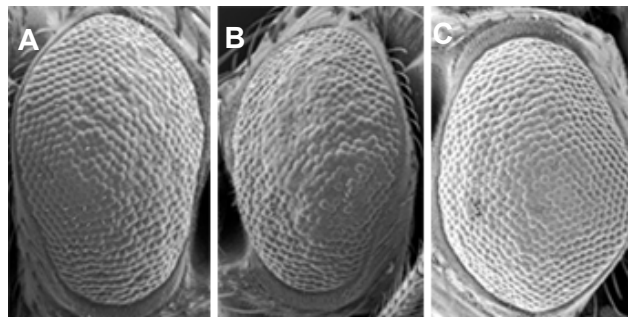


Figura 4.17. La expresión de *p35* y la disminución de *mbf* parece no modificar el fenotipo ojo rugoso (*sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀*. Se muestran ojos visualizados por microscopía electrónica de barrido. (A) *mbf^{E27}/ UAS-p35; sev (CTG)₄₈₀/ +*, (B) *UAS-p35/ CyO; sev (CTG)₄₈₀/ +* y (C) *mbf^{E27}/ CyO; sev>(CTG)₄₈₀/ +* como control. Los cruces se realizaron a 25°C.

Como ya comentamos en el *Apartado 3.2 de Resultados* la expresión de las expansiones en los cuerpos de seta producía un fenotipo de letalidad en estadio de pupa sensible a la temperatura (Figura 3.3 y 3.4). Pretendimos comprobar si esta letalidad era debida a que las neuronas de los cuerpos de seta entraban en apoptosis. Para este experimento obtuvimos una descendencia que expresaba *(CTG)₄₈₀* y *p35* en los cuerpos de seta. Realizamos el cruce a 28 °C en el cual morían aproximadamente

un 82% de la descendencia de hembras (datos facilitados por Amparo García). Observamos que la expresión de los dos transgenes *UAS-(CTG)₄₈₀* y *UAS-p35* no suprimía el fenotipo de letalidad. Estos resultados nos indicaban que posiblemente este fenotipo de letalidad no era debido a apoptosis o quizá a apoptosis pero no inducida por caspasas (véase *Apartado 3.2 de Discusión*).

4.2.5. Metabolismo del RNA: componentes asociados al EJC

El alelo *Dek^{k09907}* se identificó como potenciador del fenotipo de ojo rugoso producido por *sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀*. Utilizamos un alelo de sobreexpresión de *Dek*, *Dek^{EP1132}* (Figura 4.18) y no fue capaz de modificar el fenotipo.

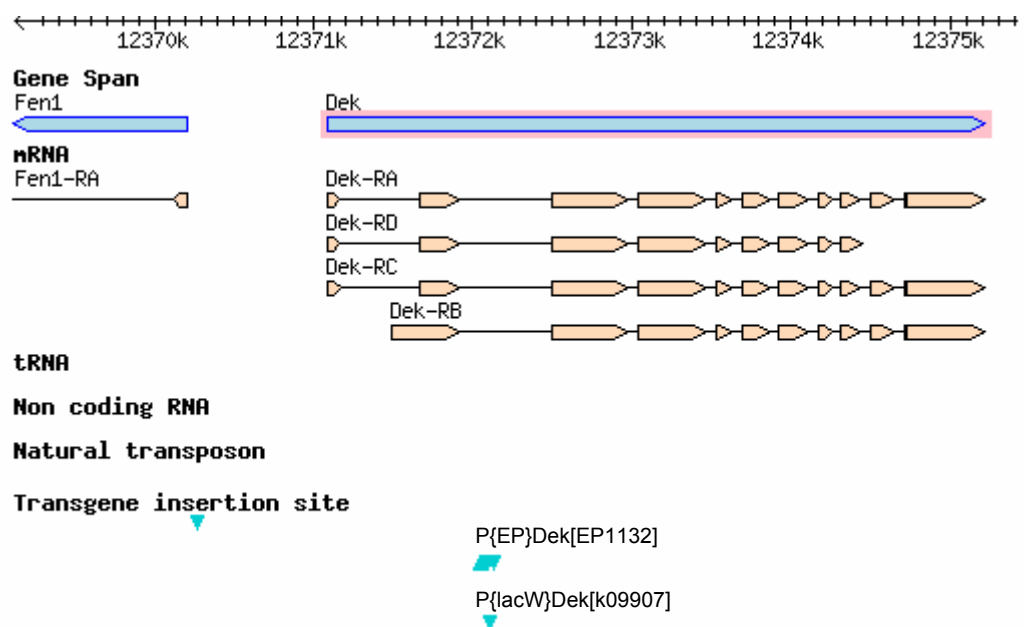


Figura 4.18. Región genómica de *Dek* y las inserciones de los elementos transponibles ensayados. Se muestra la posición de las dos inserciones utilizadas (triángulo azul), así como los cuatro transcritos derivados de *Dek*. Las regiones codificantes se muestran en naranja y el intrón se representa con una línea horizontal. Imagen obtenida en la base de datos de *Drosophila* (<http://www.flybase.org>).

Dek inicialmente se relacionó con el grupo de proteínas que forman el corazón del EJC (*Exon Junction Complex*) pero actualmente se considera como un componente asociado de este complejo (Reichert et al., 2002).

El EJC es un complejo macromolecular que se deposita a unos 25 nucleótidos aguas arriba del sitio de unión entre exones una vez se ha eliminado el intrón. Consiste en cuatro proteínas nucleares eIF4AIII, Y14, Mago y Barentsz (Stroupe et al.,

Resultados

2006) junto con toda una serie de proteínas asociadas transitoriamente con el complejo y que regulan funciones específicas del mismo tales como el procesado alternativo, la exportación de mRNAs, la localización citoplasmática, la traducción y la degradación de mensajeros erróneos por la vía *Non-sense Mediated Decay* (NMD). En estos últimos años ha habido diferentes propuestas sobre qué proteínas son genuinamente del EJC y cuales participan en cada uno de los procesos del metabolismo del RNA (Figura 4.19).

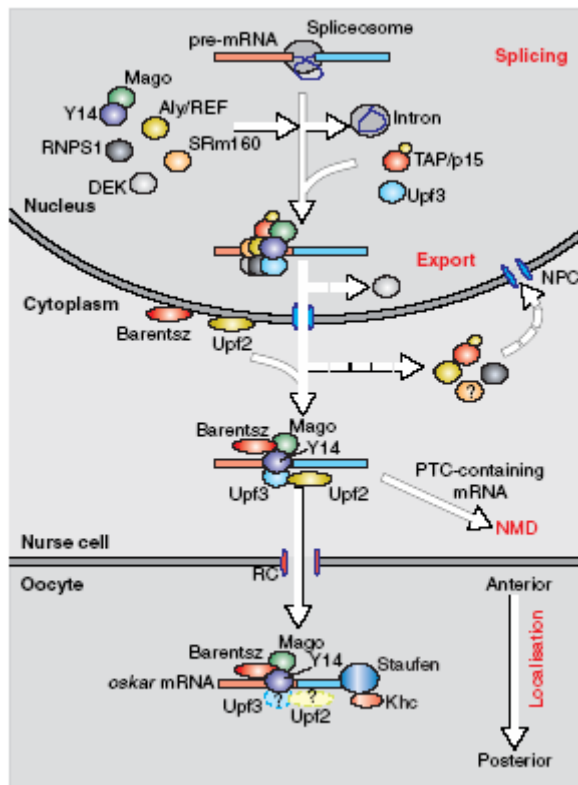


Figura 4.19. Representación esquemática de un modelo del ensamblaje y función del complejo de unión exón-exón (EJC) en *Drosophila*. Se depositan los componentes del EJC aguas arriba de la unión exón-exón del mRNA. Los componentes son Mago/Y14, RNPS1, DEK, Aly/REF, SRm160, TAP/p15 y Upf3. En el nucleoplasma este complejo permite el secuestro de Upf3 y el heterodímero receptor de exportación TAP/p15. Después de la translocación a través de los complejos del poro nuclear (NPC), varios componentes del mRNP exportado se disocian y se reutilizan en el núcleo. Y14, Mago y Upf3 permanecen unidos al mRNA. Los mRNAs que contienen un codón de parada prematuro (PTC) son degradados por el mecanismo *non-sense-mediated mRNA decay*. Imagen tomada de Palacios, 2002.

En trabajos independientes se identificó una mutación de *Aly*, *Aly*⁰²²⁶⁷, como un supresor del fenotipo ojo rugoso producido por la expresión de *mbIC* en el ojo bajo el control de *sev-GAL4* (Pascual, 2005). El producto de este gen participa en la ruta del metabolismo del RNA en concreto en el transporte de transcritos (Kataoka y Dreyfuss, 2004).

Decidimos ensayar en las moscas modelo la mutación *I(3)02267* del gen *Aly* porque participa en el mismo proceso celular que *Dek*. Como *Aly* suprimía el fenotipo producido por la expresión de *mbIC*, en nuestro ensayo esperábamos que al expresar las expansiones y por tanto se secuestrara Mbl *Aly* potenciara el fenotipo. Para este ensayo cruzamos el recombinante *sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀* con el alelo mutante

*Aly*⁰²²⁶⁷, el único alelo de *Aly* existente, y detectamos en la descendencia que la reducción de la función de *Aly*, en efecto, potenciaba el fenotipo de ojo rugoso (Figura 4.20).

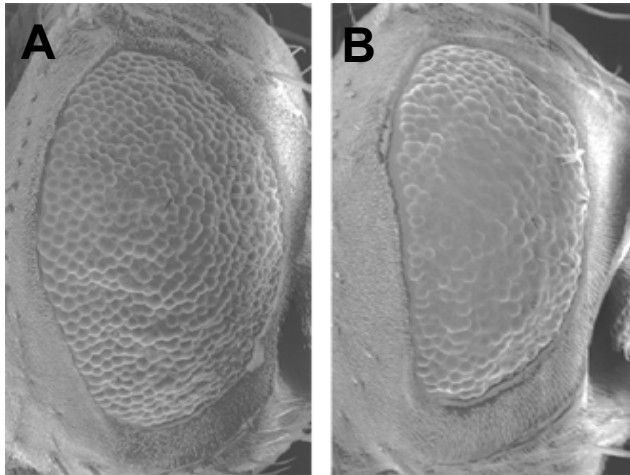


Figura 4.20. *Aly*⁰²²⁶⁷ potencia el fenotipo ojo rugoso producido por *sev-GAL4 UAS-(CTG)*₄₈₀. Se muestran ojos visualizados por microscopía electrónica de barrido. (A) Moscas control con el genotipo *sev-GAL4 UAS-(CTG)*₄₈₀/+ y (B) moscas *sev-GAL4 UAS-(CTG)*₄₈₀/*Aly*⁰²²⁶⁷.

Empleamos dos alelos de genes codificantes para componentes del EJC, *mago* y *tsunagi* (Y14) y así comprobar si también eran capaces de modificar el fenotipo de toxicidad a CUGs. Disponíamos de los únicos alelos de *mago* y *tsunagi*, *mago*^{KG03119} y *tsunagi*^{EP567} y observamos que el fenotipo de ojo rugoso no era modificado por estos mutantes. Estas dos proteínas interactúan entre sí porque forman heterodímeros para el procesado y la exportación del mRNA de *oskar* (Hachet y Ephrussi, 2004). El hecho de que ninguno de los dos alelos modificara el fenotipo sugiere que los componentes que forman el corazón del EJC no estaban relacionados con el fenotipo de expresión de las CTG en el ojo.

Nos planteamos averiguar si en este fenotipo de ojo rugoso estaba implicada la proteína *Aly* que se asocia a la exportación de transcritos (Kataoka y Dreyfuss, 2004). Como la reducción de la función de *Aly* suprimía el fenotipo de la sobreexpresión de MbIC y potenciaba el fenotipo de la expresión de CUGs, cabía la posibilidad de que esta interacción fuera a través de Muscleblind mismo. Nos planteamos comprobar si la interacción entre Muscleblind y *Aly* era física empleando el sistema del doble híbrido en levadura.

Comprobación de la interacción física entre *Aly* y Muscleblind

El estudio de la interacción entre Muscleblind y *Aly* se realizó por cotransformación en levaduras de dos vectores que contenían el cDNA de Muscleblind y de *Aly*. Las

Resultados

colonias se crecieron en medio selectivo de tal modo que sólo se detectaría crecimiento si existía interacción entre ambas proteínas.

En el vector que contiene el dominio de activación GAL4 clonamos en fase los cDNAs de MblA, MblB, MblC y MblD. Disponíamos del DNA que codifica la zona común a las cuatro variantes proteicas Mbl y los dedos de zinc (material proporcionado por Marta Vicente). Por otra parte clonamos en fase el cDNA de Aly en el vector que contiene el dominio de unión GAL4.

Sólo disponíamos de controles negativos, los cuales fueron dos tipos de vectores vacíos y el cDNA de *Iron Regulatory Protein 1* (IRP1) en el vector que contiene el dominio de activación GAL4. No se conocía ninguna proteína que interaccione con Muscblind de ahí la ausencia de controles positivos.

Tras la cotransformación de Aly como cebo con las presas descritas no obtuvimos interacción (Figura 4.21). Esto sugiere que Aly y las distintas variantes de Muscblind no interaccionan físicamente en estas condiciones experimentales. No obstante, cabe la posibilidad de que la interacción sea dependiente de RNA porque Aly es una proteína con dominios de unión a RNA del tipo RRM (*RNA Recognition Motif*) y Muscblind tiene motivos de dedos de zinc permitiendo su unión a ácidos nucleicos.

	pACT2(presa)							
	pACT2	MblA	MblB	MblC	MblD	Mbl ZC	Mbl DZ	IRP1
	Vacío (control -)							(control -)
pGBKT7(cebo)								
pGBKT7	-	-	-	-	-	-	-	-
Vacío (control -)								
Aly	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 4.21. Aly y las diferentes construcciones de Muscblind ensayadas en el sistema del doble híbrido en levadura. Se ensayaron las cuatro isoformas MblA-D, la zona común (MblZC) de las cuatro proteínas y los dedos de zinc (MblDZ) con la proteína Aly. Como controles negativos los vectores vacíos y la proteína Iron Regulatory Protein 1 (IRP1). El signo – indica que no creció ninguna colonia en medio selectivo.

4.2.6. Análisis de genes candidatos a participar en la toxicidad de CUGs

En trabajos descritos se han identificado genes implicados en la toxicidad de CUGs, comprobamos si podían ser candidatos a modificar nuestro fenotipo ojo rugoso producido por la expresión de CUGs.

- La base genética de la Ataxia espinocerebelar 8 (SCA8) consiste en una repetición del trinucleótido CTG en el mensajero no codificante del gen *SCA8*. Se ha propuesto un efecto tóxico de las repeticiones CTG en el contexto del transcrito *SCA8* semejante al que explica la DM. En un modelo de *SCA8* en *Drosophila*, la expresión del transgén *UAS-SCA8(CTG)₁₁₂* produjo un fenotipo de ojo rugoso. Este fenotipo fue modificado por los alelos de falta de función de *muscleblind*, *mbI^{k01212}*, *mbI^{k07103}*, *mbI^{E27}* y *mbI^{E16}* (Mutsuddi et al., 2004). Como *muscleblind* está implicado en la ruta de patogénesis de la DM1, decidimos comprobar si los alelos mutantes que modificaban el fenotipo producido por *SCA8* también interaccionaban.

Comprobamos que el alelo de pérdida de función *staufer^{ry9}* no modificaba el fenotipo de ojo rugoso producido por la expresión de *(CTG)₄₈₀* en ojo. En trabajos independientes se observó que *staufer^{ry9}* tampoco modificaba el fenotipo de ojo rugoso producido por la sobreexpresión de *mbI/C*. Tampoco lo hicieron otros genes como *lolal^{k02512}*, *Ate1^{k10809}* y *CG3249^{EP1440}* que sí que interaccionaron con el modelo de *SCA8* (Pascual, 2005).

- Se han descrito proteínas de unión a CUGs tales como hnRNP F y hnRNP H que se detectaron en los *foci* ribonucleoproteicos que contienen las expansiones CUG. Un caso especial lo representa el gen *no-on-transient-A (nonA)* en el que la proteína colocaliza parcialmente. La proteína NonA pertenece a la familia de las proteínas DBHS y este dominio permite la unión a DNA y RNA. Estas proteínas DBHS están involucradas en diferentes aspectos de la expresión génica, incluyendo el procesado de los pre-mRNA, la regulación transcripcional y la retención nuclear de los mRNAs. Recientemente se ha descrito que la falta de NonA produce una disminución en la exportación de algunos transcritos (Kozlova et al., 2006). Quisimos averiguar si NonA participa en el mecanismo de toxicidad a CUGs ensayando el efecto de reducir la dosis de NonA en nuestras moscas modelo.

Utilizamos dos alelos de *nonA*, una línea que deletionaba el gen y el único alelo disponible *nonA^{dissf0993}* para cruzarlo con las moscas modelo. En la descendencia no vimos ninguna modificación del fenotipo sugiriéndonos que NonA no es un factor clave en el mecanismo de toxicidad de CUGs.

Resultados

■ Cuando en células COS 7 se transfectan las expansiones CUG se observa un aumento de proteína CUG-BP1 (Timchenko et al., 2001). Los homólogos de secuencia de CUG-BP1 en *Drosophila* son *bruno* (*aret*), *bruno-2* y *bruno-3* (Ladd et al., 2001). Recientemente se ha propuesto que Bruno-3 es el homólogo funcional de CUG-BP1 (Delaunay J Fau - Le Mee et al., 2004). *bruno* se expresa en los testículos y ovarios y la proteína se une entre otros al mRNA de *oskar* para inhibir su traducción. La traducción de *oskar* regula el desarrollo posterior de los embriones. La pérdida total de *bruno* bloquea la oogénesis y la sobreexpresión causa graves defectos en la misma.

Nos propusimos analizar si la expresión de RNA (CUG)₄₈₀ en las células foliculares de *Drosophila* podía aumentar los niveles de Bruno y producir defectos en la oogénesis reflejándose en una reducción de fertilidad en las hembras. Utilizamos tres líneas *GAL4* que dirigían la expresión en las células foliculares y las cruzamos por la línea *UAS-(CTG)₄₈₀*.

En la realización de los cruces tuvimos en cuenta varios aspectos que abordamos en paralelo:

- Comprobar que la línea *GAL4* era específica de células foliculares. Para ello, del cruce parental entre hembras con la inserción *GAL4* y machos *UAS-(CTG)₄₈₀* (P) (véase *Apartado 2.7 de Material y Métodos*) escogimos los machos descendientes que contenían las inserciones *GAL4* y *UAS*, aunque de las tres líneas *GAL4* ensayadas dos fueron letales en machos y en la otra nacían pocos machos. Este dato nos indicó que las CUGs se expresaban en otro tejido que les producía letalidad. Concluimos por lo tanto que estas líneas no eran específicas de tejido.

- Analizar si las hembras descendientes del cruce (P) que expresan las CTG en las células foliculares eran fértiles. De las tres réplicas que se hicieron se obtuvieron por cada hembra y día fertilidades de 7.6, 8.53 y 5.13 individuos.

- Comparar esta descendencia con la obtenida por hembras *UAS* o *GAL4* cruzadas por machos *white*. Solamente funcionó una réplica y se obtuvieron 9.14 individuos por cada hembra y día.

Aunque el fallo de las réplicas del control no permite analizar estadísticamente los resultados, estas pruebas sugieren que existía una disminución en la fertilidad de las hembras que expresaban las expansiones en células foliculares.

■ En la ruta de patogénesis de la DM1 se produce una reducción de las proteínas Muscleblind por secuestro en las repeticiones CUG. Los alelos mutantes por

falta de función *mb1^{E27}* y *mb1⁰⁵⁵⁰⁷*, situación parcialmente equivalente a lo que ocurre en células con DM1, aparecieron como supresores del fenotipo ojo rugoso inducido por la expresión de *seven up* bajo el control de *sevenless-GAL4* (Begemann et al., 1997). Las moscas que expresaban las repeticiones CUG bajo el control de *sevenless* (*sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀*), que según nuestros datos tienen reducidas las proteínas Muscblind, las cruzamos con un alelo mutante letal para *seven up*. Con este cruce queríamos comprobar si *seven up* está relacionado con la toxicidad de RNAs (CUG)₄₈₀. Si CUG secuestra Muscblind esperamos que *svp* interaccionara predominantemente con un fenotipo de toxicidad a CUGs. Obtuvimos un fenotipo de ojo rugoso más defectuoso en la organización e incluso en el número de omatidios (Figura 4.22).

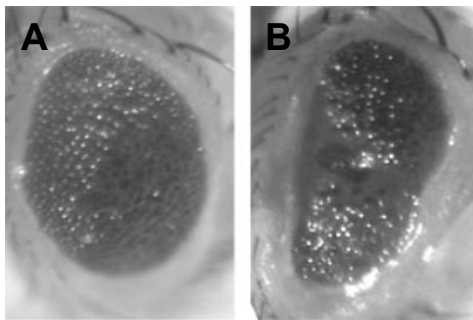


Figura 4.22. *svp* potencia el fenotipo ojo rugoso producido por *sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀* Ojos visualizados en la lupa. (A) Moscas control con el genotipo *sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀ /+*. (B) Moscas *sev-GAL4 UAS-(CTG)₄₈₀ / svp¹*, se observa un ojo que carece en algunas zonas de omatidios. Cruce realizado a 25 °C.

5. Un mecanismo adicional en la patogénesis de la DM1: el RNAi

Recientemente se ha propuesto una hipótesis en la cual la ruta del RNA de interferencia (RNAi) podría estar implicada en el mecanismo de patogénesis de enfermedades debidas a la expansión de repeticiones de trinucleótidos.

En el caso general de enfermedades debidas a una expansión de repeticiones de trinucleótidos (CGG, CCG, CTG y CAG) su transcripción promueve la formación de horquillas de RNA de doble cadena (dsRNA). Según esta hipótesis los dsRNA se convertirían en una fuente de microRNAs (miRNAs) y/o pequeños RNAs interferentes (siRNAs). Estos RNAs regulan negativamente la traducción o median el silenciamiento post-transcripcional del RNA de los genes que contienen regiones d(CN*G)_{>7} (N*=cualquier base nitrogenada complementaria a N) respectivamente. La eliminación de las proteínas codificadas por esos genes puede contribuir al inicio de la enfermedad debida a estas expansiones (Figura 5.1).

Resultados

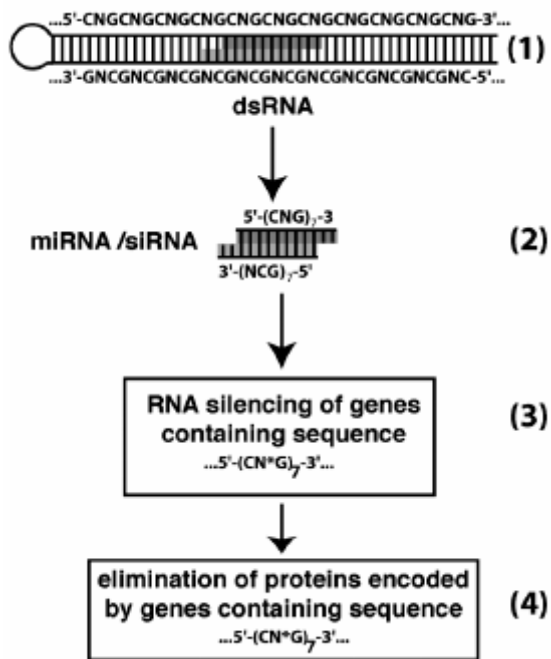


Figura 5.1. Mecanismo molecular hipotético que contribuiría en la patogénesis de enfermedades debidas a expansiones de repeticiones de trinucleótidos. (1) Las secuencias que contienen la expansión de trinucleótidos (CNG, N= T, G, C o A) al transcribirse generan horquillas de RNA de doble cadena (dsRNA) en las cuales las pares de bases N-N están flanqueadas y estabilizadas por dos pares de bases consecutivas tipo Watson-Crick C-G (Mooers et al., 2005). (2) Los dsRNA son una fuente de microRNAs (miRNAs) y/o RNAs pequeños interferentes (siRNAs). (3) Estos RNAs silencian los genes que contienen regiones d(CN*G)_{>7} (la longitud de los siRNA es de 21-26 nucleótidos, N* es complementario a N). (4) La expansión de repeticiones del triplete puede eliminar proteínas codificadas por esos genes y contribuir al inicio de la enfermedad. Figura tomada de Malinina, 2005.

En el caso de la DM1 la expansión del triplete es (CTG)_n que origina una secuencia cercana a (GCN)_n. La secuencia GCN codifica para alaninas (Ala). Hemos visto que el gen *MBNL1* es un componente muy importante en la ruta de patogénesis de la DM1 siendo su pérdida de función uno de los principales detonantes de la enfermedad (Kanadia et al., 2003a). La secuencia aminoacídica de MBNL1 contiene una región (Ala)₇ que es codificada por la secuencia nucleotídica GCNGCNGCNGCNGCNGCNGCN y estos transcritos podrían ser reconocidos por la maquinaria del RNAi que silenciaría el gen *MBNL1*. De modo que las expansiones CTG hipotéticamente también podrían afectar a los niveles de mRNA de *MBNL1* (Malinina, 2005).

Pretendimos observar en las moscas modelo si la maquinaria del RNAi contribuía en la patogénesis de la DM1. Según esta hipótesis la transcripción de estas

expansiones de repeticiones CTG formarían horquillas de dsRNA que se convertirían en siRNAs y/o miRNAs. Estos RNAs degradarían los transcritos de *mbI* por la región rica en CNG y/o inhibirían la traducción, respectivamente. Comprobamos si *muscleblind* contenía regiones ricas en CNG y observamos que las variantes *mbIB* y *mbIC* presentaban 15 y 10 repeticiones CNG, respectivamente. Decidimos analizar los transcritos de la isoforma *mbIC* porque esta variante se detectó en todos los estadios de *Drosophila* mientras que *mbIB* solamente se detectó en larva y pupa temprana dificultándonos la extracción del RNA (Vicente et al., 2007). Comprobamos los niveles de transcritos *mbIC* en moscas que expresaban las expansiones de repeticiones (CTG)₄₈₀ porque esperábamos que los siRNAs degradaran los transcritos *mbIC* por la región rica en CNG. Para detectar si se producía una disminución de los transcritos *mbIC* diseñamos tres oligonucleótidos que reconocieran la secuencia complementaria localizada en el exón 7, intrón 10 y exón 11 (Figura 5.2). Con la pareja de cebadores dirE7 y revE11 detectamos el RNA maduro que debe localizarse en el citoplasma, donde se encuentra la maquinaria del RNA interferente. Comprobamos si los niveles de RNA estaban disminuidos en moscas que expresaban las (CTG)₄₈₀. Como control utilizamos el cebador dirI10 y el revE11 permitiéndonos detectar los transcritos *mbIC* inmaduros, que se localizan en el núcleo. Este control indica si la disminución del transcrito maduro en moscas que expresan (CTG)₄₈₀ se debe al RNAi o a la reducción de la transcripción de *muscleblind* debido a la expresión de las (CTG)₄₈₀.

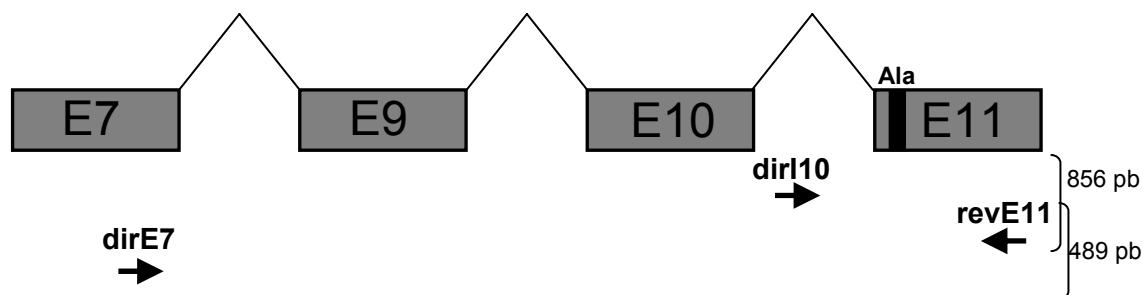


Figura 5.2. Localización de los cebadores para detectar los transcritos maduros e inmaduros de *mbIC*. La región rica en alaninas está codificada en el exón 11 (Ala). El cebador directo que se localiza en el exón 7 (dirE7) y el reverso en el exón 11 (revE11) al utilizarse juntos en una reacción de RT-PCR nos revela la cantidad de RNA maduro *mbIC* que se expresa en las moscas. En un gel de agarosa se detecta una banda de 489 pb. La utilización del cebador directo del intrón 10 (dirI10) y el reverso en el exón 11 (revE11) amplifica el RNA inmaduro de los transcritos *mbIC*. En un gel de agarosa se detecta una banda de 856 pb.

Hicimos una extracción de RNA de moscas de diferentes genotipos: expresando en músculo el transgén *UAS-(CTG)₄₈₀* y *UAS-(CTG)₆₀* y como control moscas *UAS-(CTG)₄₈₀*. Extrajimos el RNA de hembras porque los niveles de expresión

Resultados

de *muscleblind* eran distintos entre sexos. Hicimos una reacción de RT-PCR utilizando las dos parejas de cebadores en reacciones separadas.

Comprobamos mediante electroforesis en gel de agarosa los productos de la RT-PCR y cuantificamos cada una de las bandas (Figura 5.3).

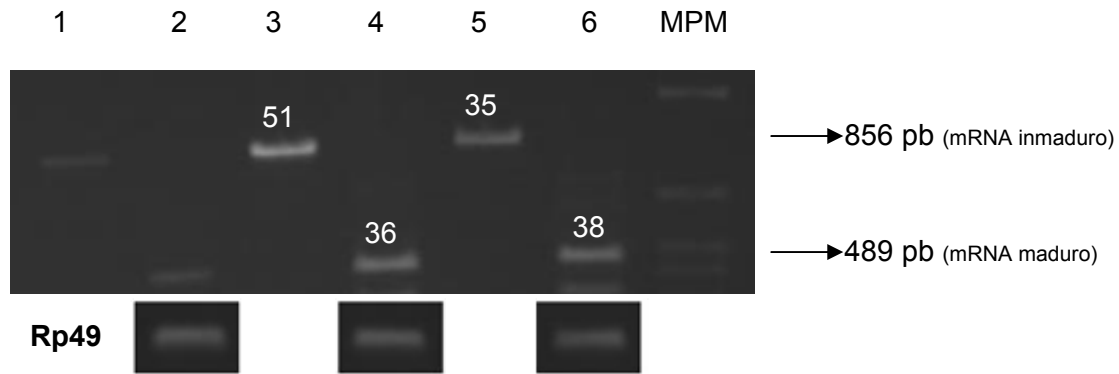


Figura 5.3. RT-PCR de *mbIC* a partir de RNA total de moscas. (1) *UAS-(CTG)₄₈₀* + con cebadores dir10-revE11, (2) *UAS-(CTG)₄₈₀* + con cebadores dirE7-revE11, (3) *Mhc-GAL4/+*; *UAS-(CTG)₆₀* + con cebadores dir10-revE11, (4) *Mhc-GAL4/+*; *UAS-(CTG)₆₀* + con cebadores dirE7-revE11, (5) *Mhc-GAL4/+*; *UAS-(CTG)₄₈₀* + con cebadores dir10-revE11 y (6) *Mhc-GAL4/+*; *UAS-(CTG)₄₈₀* + con cebadores dirE7-revE11). El marcador de peso molecular (MPM). Rp49 como control de carga. Cada banda muestra su correspondiente valor de intensidad.

Observamos diferencias entre la banda del mRNA inmaduro (carrera 3) y maduro (carrera 4) procedente de moscas que expresaban 60 repeticiones. En cambio, detectamos la misma intensidad de cDNA procedente de los transcritos inmaduros (carrera 5) que de los transcritos maduros (carrera 6) de *mbIC* de moscas que expresaban $(CTG)_{480}$. Según esta aproximación sugerimos que la expresión de *UAS-(CTG)₄₈₀* en músculo no interfería, vía la maquinaria RNAi, con los transcritos de al menos *mbIC*.

La comparación entre los dos genotipos no mostró diferencias entre los mRNA maduros (carrera 4 y 6) pero sí entre las bandas de mRNA inmaduro. Estas diferencias de intensidad entre la banda de mRNA inmaduro procedente de moscas que expresaban $(CTG)_{60}$ (intensidad 51) (carrera 3) y de moscas que expresaban $(CTG)_{480}$ (intensidad 35) (carrera 5) eran reproducibles (carreras 5 y 7 en Figura 5.4 con una intensidad de 94 y 74, respectivamente) con una amplificación equivalente de Rp49.

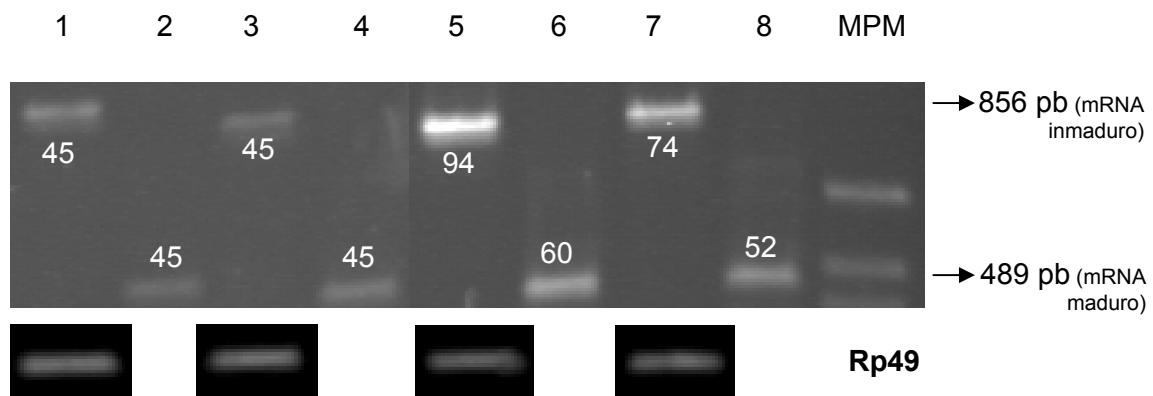


Figura 5.4. RT-PCR de *mbIC* a partir de RNA total de moscas. (1) *yw* con cebadores *dir10-revE11*, (2) *yw* con cebadores *dirE7-revE11*, (3) *UAS-(CTG)_{480/}* + con cebadores *dir10-revE11*, (4) *UAS-(CTG)_{480/}* + con cebadores *dirE7-revE11*, (5) *Mhc-GAL4/ +; UAS-(CTG)_{60/}* + con cebadores *dir10-revE11*, (6) *Mhc-GAL4/ +; UAS-(CTG)_{60/}* + con cebadores *dirE7-revE11*, (7) *Mhc-GAL4/ +; UAS-(CTG)_{480/}* + con cebadores *dir10-revE11* y (8) *Mhc-GAL4/ +; UAS-(CTG)_{480/}* + con cebadores *dirE7-revE11*. El marcador de peso molecular (MPM). Rp49 como control de carga. Cada banda muestra su correspondiente valor de intensidad.

En la Figura 5.4 se observa que en las moscas control (no expresan expansiones) las bandas del mRNA inmaduro (carreras 1 y 3) muestran igual intensidad (en torno a 45) que las bandas del mRNA maduro (carreras 2 y 4). Este dato demuestra que todos los transcritos inmaduros se procesan hasta convertirse en maduros. En cambio, las muestras que expresaban repeticiones mostraban diferencias de intensidad entre las bandas de mRNA inmaduro (carreras 5 y 7) y las de mRNA maduro (carreras 6 y 8).

De estos resultados pudimos concluir que en moscas que expresan las expansiones CTG no se puede afirmar que haya una interferencia clara pero sí un incremento en la cantidad de pre-mRNAs y mRNAs de *mbIC*. Sugerimos varias propuestas que expliquen estos efectos producidos al expresar RNAs CUG:

- Un incremento en la transcripción de *muscleblind*.
- Un incremento de la estabilidad de los transcritos *mbIC*.
- Una disminución en la exportación de los transcritos *mbIC* al citoplasma por un efecto directo o indirecto. (Véase *Apartado 4 de Discusión*).

Discusión

1. Análisis de la complementación funcional *in vivo* de las proteínas Muscleblind

1.1. El rescate del fenotipo mutante *muscleblind* es parcial

Se ha observado que ninguna de las tres isoformas de *Drosophila* ni el gen humano *MBNL1* rescata más allá del primer estadio larvario. Este rescate parcial puede ser debido a distintos motivos, entre ellos:

- Debe considerarse que *muscleblind* y el gen *MBNL1* poseen un patrón espacio-temporal de expresión, es decir, cada uno se expresa de forma natural en unos tejidos y en un momento del desarrollo determinado y no en otros. El patrón de expresión viene determinado por las regiones reguladoras de la transcripción y para el gen *muscleblind* no conocemos estas secuencias reguladoras. Este gen muestra un patrón de expresión complejo en el embrión, se expresa en el SNC en un grupo repetido de células y en los órganos de *Bolwig*. También se expresa en la musculatura somática, visceral, faríngea y en los *alary muscles*. En los experimentos de rescate la situación idónea sería expresar cada transgén con el patrón endógeno exacto y observar entonces el grado de rescate, pero al no conocer las regiones reguladoras de *muscleblind* utilizamos el patrón de expresión del gen *daughterless* que es general para asegurar la expresión en todas las células que normalmente expresan *muscleblind*, aunque pudiéramos tener problemas de expresión ectópica o de sobreexpresión. Puede que el transgén no se expresara suficientemente en las células que lo requerían y/o se expresara en células que no requieren la proteína Muscleblind, todo ello contribuiría a un rescate parcial.

- *muscleblind* por procesado alternativo origina cuatro transcritos que codifican para cuatro isoformas proteicas y el gen humano *MBNL1* genera nueve transcritos. La expresión de un transcrito o la combinación de algunos de ellos pueden ser necesarias en un tejido y en un momento del desarrollo dado. Al desconocer la expresión de tejido y desarrollo no podíamos reproducir adecuadamente la expresión endógena de *muscleblind* y *MBNL1*.

- Es posible que los genes *muscleblind* y *MBNL1* no realicen exactamente la misma función y que ni siquiera en una situación teórica ideal el rescate sería completo.

1.2. Las isoformas proteicas de *Muscleblind* tienen funciones distintas

La expresión ubicua de los transcritos *mbIA*, *mbIB* o *mbIC* en un fondo mutante *muscleblind* bajo el control de *da-GAL4* condujo a diferentes grados de rescate. Previo al experimento realizamos un control que demostraba que no había grandes efectos de posición en la expresión de los transgenes (véase Figura 1.5 *Apartado de Resultados*). Los resultados que obtuvimos indicaban que las diferencias de cada isoforma de *muscleblind* en la capacidad de rescatar son estadísticamente significativas (véase Figura 1.6 *Apartado de Resultados*), sugiriéndonos que las proteínas son funcionalmente distintas *in vivo*. Estos datos son congruentes con los obtenidos en experimentos que demostraban que la expresión ubicua de cada isoforma en moscas silvestres originaban fenotipos en adultos con distinta gravedad con igual intensidad de expresión (García-Casado et al., 2002) y que MbIC es la proteína más activa en regular el procesado de un minigen de la α -actinina en cultivo celular de las cuatro existentes en *Drosophila* (Vicente et al., 2007).

Proponemos que *mbIC* es la isoforma que realiza la mayor parte de la función de *muscleblind* por distintos motivos:

- La expresión generalizada de *mbIC* es suficiente para rescatar la mayoría de la función de *muscleblind* en los embriones porque nos proporcionó un rescate estadísticamente más elevado que *mbIA* y *mbIB*.

- Se ha descrito que MbIC es la proteína más activa en la regulación de procesado de un minigen de la α -actinina sugiriendo que MbIC es requerido para la adecuada composición proteica del sarcómero muscular (Vicente et al., 2007).

- Esta isoforma es la única que está conservada en distintas especies de Dípteros mientras que las otras no parecen estar conservadas (Pascual, 2005).

- *mbIC* es la isoforma que más ampliamente se expresa en los estadios del desarrollo. Muestra dos picos de expresión alrededor de la embriogénesis tardía (12-16 h) y en larva estadio tres y pupa temprana. Es la única isoforma que se detecta en adulto (Vicente et al., 2007).

En cambio *mbIA* rescató alrededor de un 30%, esta disminución respecto a la isoforma *mbIC* podía ser debida a que se expresa en menos estadios del desarrollo. Se han descrito dos picos de expresión alrededor de la embriogénesis tardía y pupa temprana. La expresión de *mbIB* también se reduce a pocos estadios del desarrollo,

concretamente en larvas tardías y en pupas tempranas (Vicente et al., 2007), *mbIB* apenas rescató un 9%. Esta drástica diferencia del grado de rescate entre las distintas isoformas proponemos que puede ser debido a que realizan funciones distintas y la base molecular de estas diferencias tiene que estar en la presencia o ausencia de motivos específicos de cada isoforma. MbIB contiene dos zonas ricas en alaninas y fenilalaninas que no contienen las otras dos proteínas aunque se desconoce su relevancia funcional. En este trabajo hemos visto que MbIC se localiza en los núcleos de las células adultas de *Drosophila* y se ha descrito que el sitio para la modificación de SUMO, que sólo lo conserva MbIC, regula la localización subcelular de proteínas entre otros procesos celulares. Es probable que exista algún motivo específico de isoforma que explique estas posibles diferencias funcionales pero que todavía no se ha identificado.

Los resultados que mostraron diferencias en el rescate entre las distintas isoformas de *muscleblind* junto con los datos descritos de expresión para cada una de ellas (Vicente et al., 2007) sugieren que cada una está especializada en desempeñar una función. Esta propuesta viene apoyada por los datos publicados que muestran que los distintos genes humanos tienen funciones distintas. El gen *MBNL1* es requerido para la transición del procesado de transcritos de tipo fetal a adulto (Lin et al., 2006). Esta función podría ser equivalente a la que realiza MbIC ya que se ha visto que regula el procesado de un minigen de la α -actinina (Vicente et al., 2007). *MBNL2* regula la localización del pre-mRNA de la *integrina 3 α* (Adereth et al., 2005). MbIA podría desempeñar esta función en *Drosophila* porque se detectó en el citoplasma de células humanas donde se regula la localización de transcritos y además mostró una baja actividad como factor del procesado del minigen de la α -actinina (Vicente et al., 2007). El gen *MBNL3* se ha descrito que inhibe la diferenciación del músculo en experimentos de cultivo celular (Squillace et al., 2002) pero todavía se desconoce qué proteína de *Drosophila* podría tener una función equivalente. La función de MbIB no está clara porque la sobreexpresión bajo *Mhc-GAL4* no produjo ningún fenotipo detectable (datos no mostrados) siendo aparentemente incapaz de inhibir la diferenciación muscular.

1.3. Una tirosina relevante en la regulación de Muscleblind

La familia de proteínas TIS11/NUP475/TTP contiene un motivo proteico de dedo de zinc CCCH similar al descrito en las proteínas Muscleblind. Las proteínas TIS11

Discusión

reconocen secuencias ricas en AU localizadas en la región 3' de algunos mRNAs. Son los residuos aromáticos conservados tirosina y fenilalanina los que se intercalan entre las bases nitrogenadas de los dinucleótidos UU y AU, respectivamente y estabilizan la interacción con los RNAs diana (véase Figura 1.2 *Apartado de Resultados*) (revisado en Brown, 2005). En la secuencia del segundo dedo de zinc de la familia de proteínas Muscleblind, se localiza una tirosina entre la cisteína y la histidina que está conservada (véase Figura 1.1 *Apartado de Resultados*). En esa misma posición es donde se localiza la fenilalanina de la proteína TIS11. Esta conservación de residuos aromáticos en posiciones críticas entre ambas proteínas nos sugiere que esta tirosina sea clave en la unión de Muscleblind a sus RNAs diana. Además, en la secuencia donde se localiza esta tirosina crítica existe una diana para la tirosina kinasa en la proteína MBNL1 que se ve interrumpida por dos prolinas en la proteína MblC (véase Figura 1.1 *Apartado de Resultados*). La adición de un residuo fosfato en esta tirosina por parte de la tirosina kinasa desfavorecería el apilamiento entre el anillo aromático de la tirosina y las bases nitrogenadas ofreciendo un mecanismo de regulación plausible para el control de la unión de Muscleblind a sus RNAs diana, y con ello ejercer su actividad como factor del procesado de transcritos.

2. Generación de un modelo DM1 en *Drosophila*

2.1. Las repeticiones CUG interrumpidas se comportan como las continuas

La clonación de expansiones largas de repeticiones CTG fue un aspecto complicado debido a la inestabilidad de este tipo de secuencias en células bacterianas. Disponíamos de DNA genómico de pacientes con DM1, pero la amplificación por PCR de la región expandida o la transformación en *E. coli* siempre fallaba. Se han descrito trabajos en los que se utilizaban expansiones largas de repeticiones CTG interrumpidas por pequeñas regiones con otras secuencias debido a que proceden de la “concatamerización” de fragmentos cortos CUG *in vitro*. Existía la posibilidad formal de que estas interrupciones en la secuencia repetitiva interfirieran de algún modo con el secuestro de las proteínas Mbl o secuestraran proteínas que en células de pacientes no ocurre. Sin embargo, pensamos que estas repeticiones interrumpidas

reproducen fielmente el mecanismo de toxicidad de las repeticiones CUG, entre otros por los siguientes motivos:

- Este tipo de repeticiones interrumpidas se han utilizado ampliamente en el estudio del mecanismo de patogénesis de la DM1 sin encontrar incongruencias. Por ejemplo se demostró que CUG-BP1 se unía al pre-mRNA de la *cTNT* y regulaba su procesado alternativo tal y como ocurre en pacientes con DM1 cuando se expresaban los transcritos que contienen repeticiones CUG interrumpidas en células musculares (Phillips et al., 1998).

- Los programas de predicción de estructuras secundarias mostraron básicamente la misma estructura que si se trataba de repeticiones puras (www.bioinfo.rpi.edu) (dato no mostrado).

- El fenotipo de expresión de CUGs en el ojo se vio modificado predominantemente al reducir la dosis de *muscleblind*, tal como era esperable.

- En células humanas se han expresado 960 repeticiones CTGs interrumpidas y se observó la formación de *foci* nucleares de los RNAs con CUGs y la colocalización con MBNL1 de modo equivalente a lo que ocurre en DM (Ho et al., 2005b).

2.2. Umbral de toxicidad de repeticiones CUG en *Drosophila*

Obtuvimos varias líneas transgénicas que contenían 60 y 480 repeticiones CTG. La expresión de 60 repeticiones CUG no resultó tóxica en ningún tejido en el que probamos; músculo, sistema nervioso y discos imaginales de *Drosophila*. Se ha descrito que la expresión de 162 repeticiones en 3'UTR de un mRNA codificante tampoco es patogénico (Houseley et al., 2005) pero en cambio, en ratón y en *C. elegans* 250 y 125 repeticiones CUG, respectivamente es suficiente para generar toxicidad (Mankodi et al., 2000; Chen et al., 2007). Esta respuesta diferencial al número de repeticiones CUG en los distintos organismos modelo sugiere que existen factores específicos de especie y de tejido que son relevantes en mediar la toxicidad de las repeticiones CUG.

Existía la remota posibilidad de que el fenotipo que estábamos observando al expresar 480 repeticiones CTG se debiera a la traducción anómala del transcrito con las expansiones CUG. En una determinada pauta de lectura la expresión podría dar lugar a poliglutaminas las cuales son tóxicas para las células (Marsh et al., 2000). Sin embargo, consideramos improbable que ocurriera la traducción de las expansiones porque en modelos de enfermedades debidas a poliglutaminas con 60 repeticiones

Discusión

CAG ya es suficiente para generar fenotipos. En nuestro caso con 60 repeticiones no detectamos ningún defecto (Jackson et al., 1998; Warrick et al., 1998).

En mamíferos las proteínas Msh están implicadas en la reparación del DNA dañado y se relacionan con la expansión o contracción que sufren las repeticiones. En ratones mutantes homocigotos para *msh3* no se observa inestabilidad (van den Broek et al., 2002). Esta falta de inestabilidad también se ha observado en moscas con expansiones CTG pudiéndose relacionar con que en el genoma de *Drosophila* no existen homólogos de *msh3*. La pérdida del heterodímero Msh2/Msh6 se ha visto que incrementa la inestabilidad (van den Broek et al., 2002) y parece ser que la proteína Msh6 solapa parte de la función de Msh3 y por tanto *msh6* que existe en *Drosophila* podría ser suficiente para proteger al genoma de daños. Estos datos junto con los resultados obtenidos a partir de un modelo en *Drosophila* para DM1 en el que no existen expansiones detectables de las repeticiones CTG (Houseley et al., 2005) indicaban que nuestras moscas modelo probablemente tampoco iban a presentar inestabilidad. Esta evidencia se veía apoyada con nuestras observaciones de que los fenotipos obtenidos al expresar las CUGs no cambiaban después de tres años. Si las repeticiones fueran inestables esperaríamos que el fenotipo se incrementara si se expandían las expansiones o disminuyera si se contraían, de modo que las moscas modelo no presentan variabilidad intergeneracional.

2.3. Análisis de los *foci* ribonucleares

Analizamos la formación de inclusiones nucleares en las moscas que contenían RNAs con (CUG)₄₈₀ porque en el caso de moscas que expresaban RNAs con (CUG)₆₀ ya se había descrito que no se detectaban (Houseley et al., 2005). Detectamos *foci* ribonucleares en células de moscas adultas que expresaban la expansión de 480 repeticiones CTG. En la mayoría de los casos se detectaba un único *foci* por núcleo. En otro modelo de DM1 en *Drosophila* también era habitual la detección de una única señal por núcleo (Haro et al., 2006). Además se ha descrito que en núcleos de células de músculo DM1 solo se detectan de uno a cinco *foci* por núcleo (Mankodi et al., 2001).

En algunas células detectamos exclusivamente *foci* nucleares de RNA CUG o de proteína MbIC:GFP (véase Figura 2.8 *Apartado de Resultados*). Estos resultados podrían deberse al tipo celular, si eran miocitos, neuronas, adipocitos o células

sanguíneas entre otras, podríamos detectar únicamente una señal. Se han descrito tejidos en los que se detecta Mbl y no se forman *foci* a pesar de que se expresen las repeticiones en todo el organismo y tejidos en los que no se detecta Mbl y sí que se observan *foci* (Houseley et al., 2005). La formación de *foci* probablemente requiera de otros factores específicos de célula.

Localización subcelular de Muscleblind en condiciones normales y patológicas:

Detectamos que MbIC:GFP se localizaba en los núcleos de células de adultos que únicamente expresaban el transgén *UAS-MbIC:GFP* (véase Figura 2.10 *Apartado de Resultados*). Estos datos fueron similares a unas observaciones descritas donde se detectó que en adultos silvestres y en adultos que expresaban sólo 11 repeticiones CTG, MbIC se localizó claramente en *foci* nucleares en ausencia de RNA con repeticiones expandidas (Houseley et al., 2005). Estos datos son apoyados por la observación de que MbIC se localiza de forma natural en el núcleo al contrario que MbIA que es predominantemente citoplasmática en células humanas (Vicente et al., 2007). En moscas que expresan 480 repeticiones CTG, MbIC:GFP no cambia de compartimiento subcelular. Hay evidencias que sugieren que MbIC se detecta normalmente en los *foci* ribonucleares porque MbIC se expresa en todos los estadios del desarrollo, en cambio, las demás isoformas sólo están presentes en larvas de tercer estadio (Vicente et al., 2007).

2.4. Análisis de la implicación de *muscleblind* en los defectos producidos por la expresión de RNAs CUG

En embriones mutantes *muscleblind* se observó un defecto en el procesado del transcrito de la α -actinina. Se vio disminuida la α -actnC (isoforma de músculo larval) y aumentada la α -actnA (isoforma no muscular y predominante en adulto). MbIC se requiere para la inclusión del exón 7, este exón lo contiene la isoforma α -actnC (Vicente et al., 2007). En el modelo DM1, según nuestra hipótesis de trabajo, la reducción de los niveles de proteína Muscleblind inducida por las repeticiones CUG, debería producir una alteración en el procesado de la α -actinina en la misma dirección que en los embriones mutantes *muscleblind*, en cambio observamos que se disminuía la α -actnA. Se desconoce el mecanismo que explique estas diferencias pero sugerimos que existen otros factores de procesado además de Muscleblind que

Discusión

podrían estar alterados por la expresión de RNAs (CUG)₄₈₀ y que contribuirían al fenotipo del procesado aberrante de la α -actinina. Los candidatos son las proteínas Bruno de *Drosophila* que son homólogas a la proteína humana CUG-BP1 (Delaunay J Fau - Le Mee et al., 2004) y hnRNP H porque ambas proteínas tienen aumentados sus niveles en mioblastos DM1 (Dansithong et al., 2005; Paul et al., 2006). Se ha descrito que CUG-BP1 activa el exón SM (*Smooth Muscle*) e inhibe el exón NM (*non-muscle*) del transcrito de la α -actinina en humanos (Gromak et al., 2003). CUG-BP1 es una proteína antagonista a MBNL1 en el procesado de transcritos específicos de al menos la *cTNT* y la *IR* (Philips et al., 1998; Savkur et al., 2001). Proponemos que en las moscas modelo al expresar las (CUG)₄₈₀ aumenta CUG-BP1 (Bruno3) y esta proteína inhibiría el exón 8 que sólo lo contiene la α -actnA, esta isoforma es no muscular, siendo congruente con lo que ocurre en células que expresan CUG. De este modo en nuestro modelo que expresa (CUG)₄₈₀ se observa una exclusión del exón 8 y por tanto una disminución de la α -actnA (Figura 2.1).

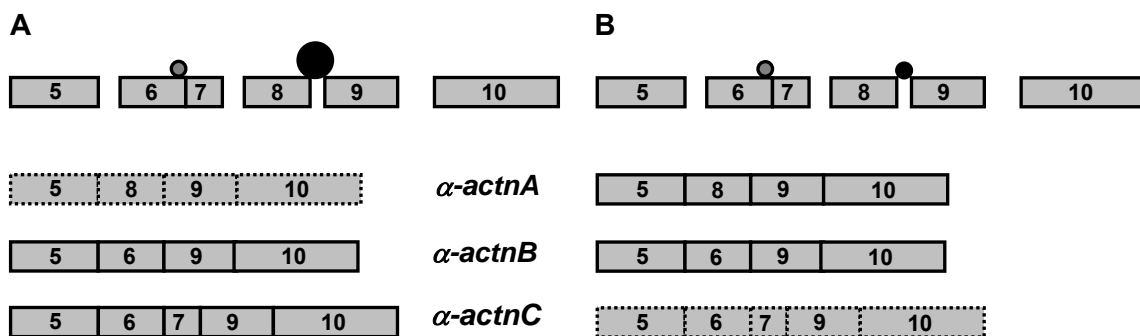


Figura 2.1. Modelo hipotético de las proteínas Mbl y CUG-BP1 (Bruno3) en el procesamiento de la α -actinina. (A) La proteína CUG-BP1 (círculo negro) aumenta sus niveles al expresarse las expansiones y excluye el exón 8 de la α -actinina. En las moscas modelo se observa una disminución de la α -actnA (cajas delimitadas por puntos) porque es la única isoforma que contiene el exón 8. (B) La proteína Mbl (círculo gris) incluye el exón 7. En embriones mutantes *muscleblind* la proteína Mbl se ve reducida disminuyéndose la α -actnC (cajas delimitadas por puntos) porque es la única isoforma que contiene el exón 7.

Recientemente se ha descrito que en ratones que expresan repeticiones CTG no presentan niveles elevados de proteína CUG-BP1 (Lin et al., 2006), resultados que contradicen a los datos obtenidos en cultivo celular donde las expansiones son las responsables del aumento de la misma (Timchenko et al., 2001). Según un trabajo publicado recientemente, el aumento de los niveles de la proteína CUG-BP1 se deben al alelo *DMPK* normal y no al expandido (Mahadevan Ms Fau - Yadava et al., 2006).

Teniendo en cuenta estos resultados, en nuestro modelo que expresa CTGs no se verían aumentados los niveles de CUG-BP1 (Bruno) y por tanto la alteración del procesado de la α -actinina se debería a Muscleblind y a otros factores que desconocemos.

Un resultado relevante para la búsqueda de genes que interaccionan con el fenotipo ojo rugoso era comprobar si la dosis génica de *muscleblind* modificaba la toxicidad inducida por RNAs (CUG)₄₈₀. Redujimos los niveles de proteína Muscleblind y observamos un empeoramiento del fenotipo siendo por tanto sensible a la reducción de la dosis de *muscleblind*, en cambio no fue sensible a un aumento de la misma. La expresión de un cDNA (*mbIA*) procedente de disco de ojo que no mejorara el fenotipo proponemos que pueda deberse a que la expresión de esta variante proteica no sea lo suficientemente elevada en ese tejido porque se ha descrito que su pico de expresión ocurre en pupa temprana y apenas se expresa en adulto (Vicente et al., 2007). Además, la expresión de CUGs no provoca un fenotipo similar al de falta de función de *muscleblind* en ojo, de modo que la expresión de RNAs (CUG)₄₈₀ afecta a más componentes aparte de secuestrar Muscleblind, siendo por tanto insuficiente la expresión de *muscleblind* para reestablecer en parte la morfología del ojo.

Si la expresión de los RNAs CUG provoca una inactivación funcional de *muscleblind*, era esperable que en este modelo interaccionaran alelos que ya habían interaccionado con mutantes *muscleblind*. Este resultado nos lo confirmó *sevenup*, porque se ha descrito que la sobreexpresión de este gen en ojo interaccionó con alelos por falta de función de *muscleblind* (Begemann et al., 1997). Analizamos el fenotipo producido por la expresión de CUG y era modificado por alelos de falta de función de *sevenup*. Este resultado apoya que el fenotipo ojo rugoso de las moscas modelo está relacionado con *muscleblind*.

2.5. Correlación entre síntomas de pacientes y defectos macroscópicos en moscas DM1

En DM1 se observa una activa degeneración y necrosis en músculos gravemente implicados en la enfermedad. Se visualiza un aumento de núcleos en el centro de las fibras musculares, característica típica para reconocer un músculo con DM1. Esta localización alterada de los núcleos ocurre en etapas muy tempranas del desarrollo de

Discusión

la enfermedad. Nosotros detectamos cambios en cuanto a la degeneración de los músculos y a una desorganización de las fibras musculares de los paquetes de los músculos dorso-longitudinales (véase Figura 2.13C *Apartado de Resultados*) característico en pacientes con DM1 (Harper, 2001) y en un modelo de DM1 en *Drosophila* (Haro et al., 2006).

En pacientes DM1 se ha detectado la existencia de anomalías en la retina. Se ha descrito una desorganización de la retina periférica, una degeneración en los pigmentos y una pérdida de fotorreceptores (Winchester et al., 1999; Harper, 2001). En *Drosophila* la expresión de *UAS-(CTG)₄₈₀* en todas las neuronas fotorreceptoras también mostró defectos en el ojo. Se observó una desorganización de los omatidios y de las quetas mecanosensoras del ojo adulto. Se hizo complicada la detección de las células fotorreceptoras y se observaron defectos en las membranas fenestrada, basal y de células subretinales. La alteración de este órgano inducido por la expresión de RNAs con CUG sugiere que varias proteínas de unión a RNA u otros factores requeridos para la formación del ojo son afectados por esta expresión.

3. La expresión de RNAs CUG afecta a varios procesos celulares

El fenotipo de ojo rugoso producido por la expresión de RNAs (CUG)₄₈₀ fue nuestra herramienta para hacer una búsqueda a gran escala de modificadores genéticos. Utilizamos una colección de inserciones de elementos P para el rastreo de modificadores dominantes porque el gen mutado que interacciona con nuestro fenotipo puede ser fácilmente identificado. Las colecciones de inserciones del elemento P afectan a un cuarto de los genes esenciales (Spradling et al., 1999) porque tienen preferencia por insertarse en unas determinadas zonas del genoma donde no están la mayoría de los genes. El problema que nos encontramos con este tipo de rastreos es que en ocasiones se hace complicada la comparación del fenotipo de ojo rugoso con el control porque existe cierta variabilidad. Esta variabilidad se debe al diferente fondo genético que muestran los distintos genotipos a comparar y al efecto que pueden producir los cromosomas equilibradores porque contienen marcadores genéticos que pueden modificar el fenotipo. Además en una misma línea transgénica el fenotipo ojo rugoso mostraba una penetrancia variable. Existe un precedente en un modelo de

SCA8 en *Drosophila* en el cual la expresión del transgén SCA8-(CTG)₁₁₂ también muestra variabilidad entre individuos demostrándose que no es debida a la inestabilidad de los transgenes o de los RNAs.

Durante el rastreo en busca de modificadores del fenotipo de expresión de UAS-(CTG)₄₈₀ en ojo aislamos diferentes tipos de genes. Los agrupamos en varias categorías según su función en los procesos celulares; factores de transcripción reguladores, reguladores de la estructura de la cromatina, adhesión celular, apoptosis y metabolismo del RNA.

En un primer análisis la relación entre *jumu* y la expresión de UAS-(CTG)₄₈₀ podría ser a través de la proteína Muscleblind por diversos motivos (véase *Apartado 4.2.2. de Resultados*). Pero unos resultados obtenidos en el laboratorio de manera independiente mostraron que Muscleblind no interaccionaba físicamente con Jumu en un ensayo de coimmunoprecipitación (Pascual, 2005). Con estos datos preliminares aún no podemos proponer una posible explicación a nuestros resultados.

La expresión de UAS-(CTG)₄₈₀ en ojo interaccionó con un alelo de falta de función de *cnc*. En adulto se han descrito defectos en ovarios de moscas mutantes para *cnc* pero no se conocen defectos en ojo, tampoco se ha descrito si se expresa en este órgano. *cnc* codifica para una proteína que contiene una región conservada denominada bZIP que es una cremallera de leucinas que participa en la homeostasis de neurotransmisores, en la detoxificación del metabolismo de drogas, en la activación de la expresión de BH3-only implicado en apoptosis y está estrechamente relacionada con el dominio *cnc* de la subunidad p45 que regula la síntesis de la hemoglobina en mamíferos (Gachon et al., 2006; Andrews, 1998; Kobayashi et al., 2002; Benito et al., 2006). Varios análisis identificaron a reguladores transcripcionales en *Drosophila* que estaban implicados en el linaje hematopoyético, muchos de los cuales eran similares a los ya descritos en la diferenciación del linaje sanguíneo en mamíferos. Los factores de transcripción Serpent (Srp), Lozenge (Lz) y Gcm (*glial cells missing*) entre otros, están implicados en la diferenciación de las células sanguíneas en *Drosophila* (revisado en Evans y Banerjee, 2003). Algunos de los factores de transcripción que participan en la hematopoyesis también están implicados en la especificación del destino celular en el ojo. Según estos datos proponemos que la falta de función de *cnc* afecta a algún factor de transcripción del linaje celular sanguíneo que también está implicado en el destino celular en el ojo modificando el fenotipo ojo rugoso producido

Discusión

por la expresión de RNAs (CUG)₄₈₀. Dado que en oocitos mutantes para *cnc* se ha descrito que está alterada la polaridad de los microtúbulos (Guichet et al., 2001) no descartamos la posible implicación de *cnc* en la adhesión celular, proceso que parece estar afectado en los tejidos donde se expresan los RNAs CUG.

3.1. La expresión de RNAs CUG puede alterar la adhesión celular

Los genes relacionados con las adhesiones celulares identificados en este trabajo fueron *viking*, *coro* y *fear-of-intimacy (foi)*. Las moléculas de adhesión celular son glicoproteínas ubicadas en la superficie celular siendo receptores celulares mediante los cuales se efectúan las interacciones específicas célula-célula. Además estas moléculas también se encuentran en la matriz tisular mediando las interacciones célula-matriz. La identificación de genes relacionados en el reconocimiento de las células nos pareció interesante porque existen indicios que sugieren que *muscleblind* está relacionado con la adhesión celular como se detalla a continuación:

- Se detectó que una combinación viable de alelos de falta de función de *muscleblind* presentaba ampollas en las alas (Prokopenko et al., 2000; Vicente, comunicación personal), defectos que se relacionan con fallos en el reconocimiento entre células del epitelio de la parte dorsal y ventral del ala (Figura 3.1).

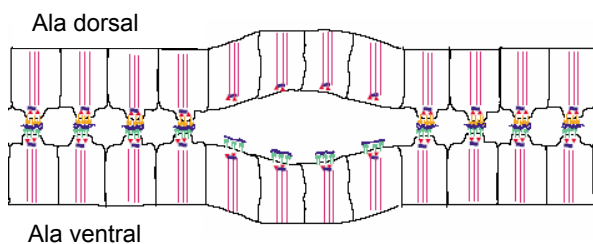


Figura 3.1. Fenotipo de ala asociado con las integrinas. La ausencia de integrinas dorsales forma una ampolla entre los dos epitelios del ala. Figura tomada de Brower, 2003.

- MBNL2 regula la localización subcelular del transcrito de la *integrina $\alpha 3$* uniéndose a una región no traducida del extremo 3' del RNA mensajero. Su correcta localización es requerida para que al traducirse se formen las adhesiones focales en la célula (Adereth et al., 2005).

- El procesamiento del pre-mRNA de la *α -actinina* está alterado en embriones mutantes para la función de *muscleblind* (Vicente et al., 2007). Este gen codifica para una proteína necesaria para el anclaje con los microtúbulos de actina.

La expresión de RNAs (CUG)₄₈₀ produce unos defectos que se asemejan a los relacionados con la adhesión celular que se comentan a continuación:

- La expresión con una línea *GAL4 (sd-SG29.1)* específica de músculos indirectos del vuelo (IFM) produjo un fenotipo de alas pequeñas, plegadas y no fusionadas. Aunque la expresión fuera en IFM, las líneas pueden expresar en otros tejidos. Este fenotipo de separación de los epitelios dorsales y ventrales del ala es característico de alteraciones en la conexión entre células mediadas por integrinas específicas (Figura 3.1).

- La expresión de RNAs (CUG)₄₈₀ alteran el procesado de la *α-actinina* (véase Figura 2.15 *Apartado de Resultados*). Este defecto molecular sugiere que existe una relación entre la expresión de RNAs CUG y el mecanismo de adhesión celular porque la *α-actinina* se une a los filamentos de actina que son componentes del citoesqueleto.

Como hemos comentado la *integrina α3* humana es una diana molecular de *muscleblind*. Es un receptor transmembrana que une las moléculas de la matriz extracelular o proteínas de la superficie celular a los componentes del citoesqueleto. Cada integrina es un heterodímero de una unión no covalente entre la subunidad *α* y la subunidad *β* integradas en la membrana de las células. El gen *viking* fue identificado como modificador del fenotipo producido por la expresión de (CTG)₄₈₀ y codifica para la cadena *α-2* del colágeno tipo IV. Las cadenas *α-1* y *α-2* forman parte de las membranas basales en *Drosophila* y actúan como estabilizadoras de las interacciones célula-matriz (Borchiellini et al., 1996). Según estos resultados, una alteración en las integrinas como ocurre con la *integrina α3* debido a una ausencia de proteína MBNL2, podría afectar al reconocimiento de moléculas como es el colágeno tipo IV impidiéndose la unión entre células o entre célula y matriz. Sería interesante analizar la posible relación entre *viking* y el fenotipo de expresión de CUGs. Al existir precedentes de que *Muscleblind* regula el procesado de transcritos específicos, nos planteamos si podía estar regulando el procesado alternativo de *viking* y ser el responsable de estos posibles defectos de adhesión encontrados en moscas que expresan CUGs, pero datos preliminares indican que no existen variantes de *viking* (<http://www.flybase.org>). Alternativamente *muscleblind* podría estar regulando el procesado de otra proteína que participara en la estabilización de la membrana basal o que estuviera implicado en la exportación del transcrito de *viking* y que una alteración en los niveles de *Muscleblind* como puede ser la expresión de CUGs produjera una

Discusión

disminución de la exportación y por tanto una reducción en los niveles de proteína Viking.

Un posible elemento común entre las integrinas y las expansiones CUG es el factor de transcripción Sp1. Sp1 también es retenido por los RNAs que contienen CUGs (véase *Apartado 5.3 de Introducción*). Se ha descrito en humanos que Sp1 regula la transcripción de las subunidades $\alpha11$ y la $\alpha2$ de las *integrinas* (Lu et al., 2006; Zutter et al., 1997). Sp1 al ser retenido por los RNAs que contienen CUGs (véase *Apartado 5.3 de Introducción*) se disminuye la concentración de proteína funcional. Esta reducción repercute en la transcripción de estas subunidades α de las integrinas desencadenando defectos en la adhesión celular. Una posible aproximación para comprobar si las integrinas están afectadas en las moscas que expresan RNAs CUG sería analizar si en estas moscas que tienen alterados los niveles de proteína Muscleblind, presentan defectos en la localización subcelular de los transcritos codificantes para la *integrina* $\alpha1$, ortólogo en *Drosophila* de la *integrina* $\alpha3$, debido a la implicación de MBNL2 en regular su localización en células humanas (Adereth et al., 2005).

■ La expresión de RNAs (CUG)₄₈₀ en el ojo condujo a un fenotipo de ojo rugoso. La disección de ese fenotipo permitió observar una desorganización de la membrana fenestrada, basal y la capa de células subretinales (véase Figura 3.2 *Apartado de Resultados*). El ojo compuesto de *Drosophila* aunque se derive de una monocapa epitelial, las células de cada omatidio que lo componen están interconectadas en una red tridimensional de contactos célula-célula y célula-matriz extracelular. Estos contactos celulares son mediados por uniones adherentes que contribuyen a la estabilidad mecánica del epitelio. La formación de la retina sigue un patrón definido guiado por estas uniones que persisten en la retina del adulto (Cagan y Ready, 1989). Se ha propuesto que el mantenimiento de la organización de la retina requiere de integrinas (Zusman et al., 1993) (Figura 3.2).

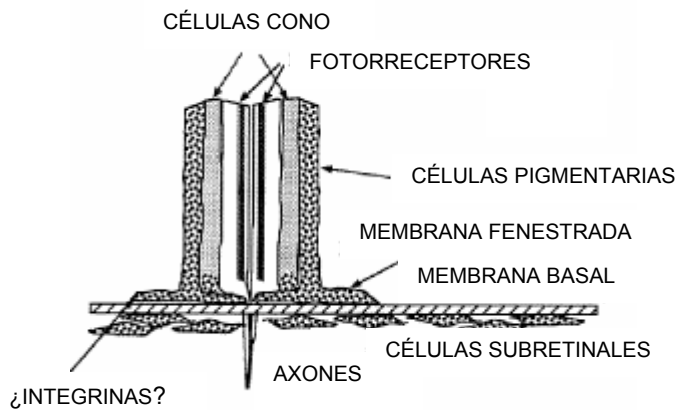


Figura 3.2. Modelo de la función de las integrinas en el desarrollo del ojo de *Drosophila*. Modelo que propone que las integrinas funcionan a lo largo de la superficie basal de la retina para mantener las células pigmentarias de la membrana fenestrada unidas a la lámina basal. Imagen tomada Zusman et al., 1993.

Para comprobar si los defectos encontrados en la retina se deben a alteraciones en moléculas de adhesión nos planteamos abordar este problema analizando si existen alteraciones en distintas moléculas de adhesión celular mediante tinciones en discos de ojo-antena de larvas de tercer estadio.

La expresión de RNAs (CUG)₄₈₀ en las células fotorreceptoras produjo una ausencia de éstas en las secciones analizadas. Estos datos sugieren que la expresión de estas expansiones resulta tóxica para estas células neuronales. Recientemente hemos detectado que la expresión elevada de RNAs (CUG)₄₈₀ en las células neuronales produce letalidad. Ambos resultados indican que las neuronas son células sensibles a la expresión de RNAs CUG provocándoles su muerte como ocurre con el síndrome del X frágil y las Ataxias espinocerebelares.

El gen *foi* también se identificó como modificador del fenotipo ojo rugoso y es requerido para la migración celular. La migración es un proceso integrado que comienza cuando una célula se convierte en polarizada en respuesta a una señal quimiotáctica o quimiocinética. Está involucrada la continua formación y desmontaje de las adhesiones. Se produce una extensión de una protuberancia en la dirección del movimiento, la formación de adhesiones que estabilizan el lamelipodio que se va proyectando, la translocación del cuerpo celular y el desmontaje de adhesiones con la célula que estaba unida. Se ha observado que la polimerización de la actina dirige la formación de la protuberancia, en cambio sobre la formación de adhesiones y el desmontaje todavía no se conoce el mecanismo. En este proceso celular participan las moléculas de adhesión celular. Se ha descrito que *foi* afecta a los niveles de RNA de la cadherina-E y a su regulación postranscripcional (Mathews et al., 2006). FOI es

Discusión

miembro de la familia ZIP de transportadores de Zinc. En principio el Zinc podría regular la actividad de proteínas de unión a RNA (dedos de zinc) como Muscleblind. Siendo que *foi* ha sido un gen candidato y que en las moscas que expresan RNAs CUG se observan defectos en la adhesión celular nos planteamos si estos defectos podían alterar la migración de los axones de los fotorreceptores. En una primera aproximación no se podía concluir que existieran defectos en la migración por la presencia de un fenotipo deteriorado (véase Figura 4.11 *Apartado de Resultados*). Nos planteamos abordar este tema suavizando la expresión de las expansiones para obtener un fenotipo menos deteriorado. Con la técnica de inmunohistoquímica pretendemos detectar los axones de los fotorreceptores con el anticuerpo específico mAb 24B10 y analizar los axones de los ocho fotorreceptores que se localizan en el primer neuropilo óptico, es decir en la lámina, y los axones del fotorreceptor siete y ocho en el segundo, en la médula, demostrando si en el fenotipo de ojo rugoso existen defectos en la migración celular.

- Como componente del citoesqueleto el gen *coro* también se identificó como modificador del fenotipo producido por la expresión de (CTG)₄₈₀. Coro regula el citoesqueleto de actina y el tráfico de vesículas. Mutantes para este gen muestran defectos en ojo como es la fusión de omatidios y pérdida de quetas entre los omatidios (Bharathi et al., 2004). Este dato sugiere que el fenotipo ojo rugoso producido por la expresión de RNAs CUG muestra alteraciones en la morfología celular probablemente debido a defectos en la prolongación de los filamentos de actina.

El fenotipo de ojo rugoso producido por la expresión de RNAs (CUG)₄₈₀ fue modificado por los genes *viking*, *foi* y *coro* que ponen de manifiesto la posible existencia de defectos en el reconocimiento entre células, en la migración celular y en los componentes del citoesqueleto. Las alteraciones detectadas en las membranas de la retina sugieren que existen defectos en el reconocimiento entre células produciendo una sensibilización de las mismas a apoptosis, aspecto que abordamos en el siguiente apartado.

3.2. La expresión de RNAs CUG activa la muerte celular

La apoptosis es un proceso del desarrollo fundamental para dar forma a los órganos, eliminar estructuras transitorias, ajustar el tamaño de las poblaciones de células que

están interaccionando o para eliminar células que son potencialmente dañinas o no funcionales (revisado en McCarthy, 2003). La expresión del transgén *UAS-(CTG)₄₈₀* en el ojo (*sev-GAL4*) presentó un fenotipo de ojo rugoso que fue modificado por mutaciones en los genes *spinster*, *thread* y *C-terminal Src kinasa (Csk)*. La determinación de que probablemente estas interacciones eran específicas vino reforzada por la supresión del fenotipo al sobreexpresar en los fotorreceptores el gen anti-apoptótico *diap2*, aunque sería relevante analizar si existen células apoptóticas utilizando la tinción TUNEL. Hemos comentado que la expresión de RNAs CUG en células nerviosas produce letalidad (véase *Apartado 3.1 de Discusión*), según estos datos aparentemente esta letalidad está regulada por los componentes que participan en la apoptosis. Proponemos que la pérdida de adhesión detectada al expresar las expansiones CTG es la responsable de la inducción de apoptosis, proceso conocido como *anoikis* (Giancotti y Ruoslahti, 1999). Aunque también es posible que la expresión de los RNAs CUG active la apoptosis independientemente del fenómeno de la adhesión al sustrato. Sería interesante realizar ensayos en células que no necesitan adherirse al sustrato que expresen RNAs CUG y analizar si las células entran en apoptosis.

Hemos observado que la expresión del inhibidor de caspasas *p35* en moscas que expresaban las expansiones en ojo no parecía modificar el fenotipo de ojo rugoso en los casos que se podían analizar, porque la expresión de ambos transgenes en la mayoría de la descendencia era letal en estadio de pupa. Esta letalidad podría deberse a un efecto sinérgico. El análisis de estos ojos debe complementarse con una tinción de naranja de acridina en ojos pupales de moscas que expresaran las expansiones y compararse con moscas que también expresaran *p35*. Esta insensibilidad a la expresión de *p35* podría explicarse porque:

- *p35* no se expresara lo suficiente. Aunque se ha descrito que la degeneración de la retina en *Drosophila* puede ser restaurada por *p35* (Davidson y Steller, 1998) existen al menos tres casos en los que *p35* no puede rescatar a las células de la apoptosis (revisado en Borner y Monney, 1999). Se ha sugerido que los niveles de expresión de *p35* son demasiado bajos para inhibir las caspasas en estos casos.

- *p35* no inhibe todas las caspasas de *Drosophila*. Se ha descrito que la caspasa iniciadora DRONC es resistente a la expresión de *p35*. DRONC no contiene un sitio activo típico de caspasa pudiendo ser que tenga un sustrato específico diferente al de las típicas caspasas (Meier et al., 2000). Este dato podría explicar que

Discusión

aunque se expresara *p35* si el fenotipo de ojo rugoso se debe en parte a apoptosis a través de DRONC se mostrara una insensibilidad a este inhibidor de caspasas.

■ La muerte celular programada sea independiente de caspasas. Se han descrito varios ejemplos de células que sobreviven a la activación de caspasas. Existen tres proteínas involucradas en apoptosis que son independientes de caspasas, son las proteínas AIF, Omi/HtrA2 y EndoG que están muy conservadas a lo largo de la evolución y se localizan en la mitocondria (revisado en Donovan y Cotter, 2004). El gen *spinster* también se identificó como modificador del fenotipo producido por la expresión de RNAs CUG en ojo. Codifica para una proteína transmembrana que se requiere para la muerte celular programada en el sistema nervioso y reproductivo. Se ha descrito que la proteína homóloga humana HSpin1 induce a la muerte celular autofágica independientemente de caspasas por la unión a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L (Yanagisawa et al., 2003).

Según los datos que disponemos sugieren que la expresión de repeticiones CTG aparentemente sensibiliza a las células a una muerte celular programada. La utilización de fármacos inhibidores de caspasas o de necrosis nos permitirá comprobar si las células están sensibilizadas a un tipo de muerte celular programada o a otro.

3.3. Implicación de factores asociados a EJC en la ruta de patogénesis DM1

El procesado alternativo de los transcritos, la exportación al citoplasma y su correcta localización subcelular para posteriormente traducirse, son procesos que están acoplados e interconectados en los cuales participa unas pocas proteínas denominadas *Exon Junction Complex* (EJC) que forman el núcleo del complejo junto con otras muchas que se asocian de un modo más lábil y transitorio durante distintas funciones específicas del mismo.

Encontramos que *Dek* y *Aly* potenciaban el fenotipo ojo rugoso. Para el primer caso no está muy clara su función en el EJC pero para *Aly* su producto está relacionado con la exportación de transcritos (Kataoka y Dreyfuss, 2004).

Dado que en nuestro modelo DM1 existe una interacción con proteínas del EJC y estas proteínas no se pueden unir a 20-24 nucleótidos aguas arriba de los exones tal y como lo hacen las proteínas EJC porque los RNAs CUG no contienen intrones, proponemos que la implicación del complejo EJC en la ruta de patogénesis de las repeticiones CUG puede ser mediante las proteínas Muscleblind por varios motivos:

- El alelo de *Aly* se identificó como supresor del fenotipo ojo rugoso producido por la expresión de *mb1C* en el ojo bajo el control de *sev-GAL4* (Pascual, 2005).

- MBNL2 transporta el mensajero de la *integrina* α -3 al citoplasma (Adereth et al., 2005). Se ha propuesto que además MBNL2 controla el procesado de este mRNA. Esta sugerencia viene apoyada porque aunque MBNL2 es una proteína citoplasmática, tiene capacidad para unirse a las repeticiones CUG en el núcleo, por lo tanto puede entrar al núcleo y participar en el procesado de transcritos específicos. Además se ha descrito que la sobreexpresión de los genes humanos *MBNL1*, *MBNL2* y *MBNL3* en células alteran el procesado de los minigenes *cTNT* e *IR* (Ho et al., 2004).

- Muscleblind se une al E6-E7 de la α -actinina, exones que contiene la α -actnC congruente con la observación de que en mutantes *muscleblind* el transcrito de la α -actnC se ve reducida (Vicente et al., 2007). Sería posible una relación entre el procesado y la correcta localización de los transcritos porque en la literatura hay descritos ejemplos. Es el caso de las proteínas Y14/Tsunagi y Mago del complejo EJC que participan en el procesado del mRNA de *oskar* y que es limitante para la localización del transcrito en la célula (Hachet y Ephrussi, 2004).

Todos estos datos nos llevaron a realizar un experimento que nos permitiera comprobar si existía una interacción física entre las proteínas Muscleblind y Aly. En el ensayo de dos híbridos en levadura observamos que no crecía ninguna colonia de modo que en las condiciones que hicimos el experimento no interaccionaban al menos físicamente. Alternativamente, la unión podría no ser directa sino mediada por un mRNA que no estuvieran codificados en el genoma de levadura. Se ha descrito que existe un homólogo de Aly en levadura denominado Yra1p (Portman et al., 1997); Preker y Guthrie, 2006) aunque se desconoce si comparte RNAs diana con Aly.

Los alelos utilizados de *mago* y *tsunagi* no interaccionaron con el fenotipo de ojo rugoso. Sería interesante realizar más ensayos para poder confirmar si existe relación entre el fenotipo producido por la expresión de RNAs CUG y las proteínas Mago y Tsunagi. Sugerimos la posibilidad de que la relación entre el EJC y el fenotipo sea mediante Muscleblind. Se ha descrito que tanto Muscleblind como las proteínas Mago y Tsunagi se requieren para la localización de transcritos específicos, la *integrina* α 3 y *oskar*, respectivamente. Nos planteamos realizar ensayos en el que podamos confirmar si existe o no una relación entre Muscleblind y las proteínas Mago y Tsunagi. Se ha descrito que estas dos proteínas junto con eIF4AIII, Barentsz y Upf3 se localizan en las células nodriza del embrión y se unen al mRNA de *oskar* para transportarlo al polo posterior del oocito. Sería interesante expresar UAS-Mb1C:GFP en

Discusión

embriones de *Drosophila* y si observamos que MbIC:GFP se localiza en el polo posterior del oocito junto con la detección de las proteínas Mago o Tsunagi nos indicaría que MbIC está implicado en la localización de transcritos (Figura 3.3).

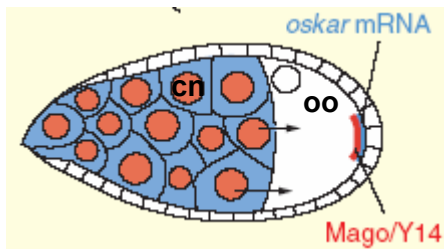


Figura 3.3. Transporte y localización del mRNA de *oskar*. La cámara del huevo de *Drosophila* está compuesta de 16 células germinales que son 15 células nodriza (cn) y un oocito (oo) rodeada por una capa de células somáticas foliculares. El transcrito de *oskar* se localiza en los núcleos de las células nodriza y finalmente es transportado desde la parte anterior al polo posterior del oocito por el heterodímero compuesto por las proteínas Mago y Tsunagi (Y14). Imagen tomada de Palacios, 2002.

4. Los RNAs CUG modifican el metabolismo de los transcritos *mbIC*

La posibilidad de que las horquillas de repeticiones CUG sufran algún tipo de corte que origine microRNAs y/o siRNA con capacidad interferente, ha llevado a sugerir que las repeticiones CUG podrían silenciar parcialmente la expresión del gen *MBNL1* en humanos (Malinina, 2005).

Nos propusimos comprobar esta hipótesis en el modelo DM1. Esperábamos que la expresión de repeticiones CUG en músculo, tejido donde se expresa *muscleblind*, redujera la concentración de transcritos *muscleblind* por activación de la interferencia de RNA. Observamos que las moscas que expresaban 60 y 480 CUGs presentaban más mRNA inmaduro que las moscas control que no expresaban expansiones (véase carreras 1,3, 5 y 7 Figura 5.4 *Apartado de Resultados*). Con este resultado proponemos varias alternativas no excluyentes:

- La expresión de repeticiones CUG incrementa la transcripción del gen *muscleblind*. Sugerimos que al expresar las CUGs se produce una disminución de la concentración de proteína libre Muscleblind que activa su transcripción para compensar esta disminución. Para explicar que la expresión de (CUG)₆₀ muestra más transcrito inmaduro que (CUG)₄₈₀ sugerimos que la expresión de (CUG)₄₈₀ produce más secuestro de Muscleblind que activación de su transcripción. Este dato es

congruente con la observación de que la expresión de (CUG)₆₀ no produzca fenotipo en cambio la de (CUG)₄₈₀ sí.

- La expresión de repeticiones CUG incrementa la estabilidad de los transcritos. Sugerimos que la expresión de CUGs produzca una alteración en los niveles de alguna proteína responsable de la estabilización de los transcritos de *muscleblind*.

La expresión del transgén *UAS-(CTG)₆₀* sí que produjo diferencias entre los niveles de transcritos *mbIC* inmaduros y maduros, en cambio con la expresión de *UAS-(CTG)₄₈₀* no podemos afirmar que haya diferencias claras (véase carreras 5 y 6 Figura 5.3 y carreras 7 y 8 Figura 5.4 *Apartado de Resultados*). Sugerimos varias alternativas:

- La expresión de las (CUG)₄₈₀ silenciará la transcripción del gen *muscleblind* pero al expresar las CUGs en el músculo, tejido donde se expresa *muscleblind*, y extraer el RNA del individuo completo para evitar degradación por RNasas, no se detectaran diferencias claras entre los niveles de pre-mRNAs y mRNAs *mbIC*.

- La expresión de CUGs afecta a los niveles de mRNAs *mbIC* por defectos en su procesado. Se ha descrito en ratones que Mbnl1 regula su propio procesado (Lin et al., 2006). Proponemos que la disminución de Muscleblind inducida por la expresión de CUGs altera su propio procesado disminuyéndose los niveles de mRNA *mbIC*. Una alteración en la exportación al citoplasma de mRNAs agravaría esta situación. El efecto sobre la exportación lo sugiere la implicación de *Aly* en los dos rastreos de modificadores dominantes del fenotipo ojo rugoso producido por la expresión de *UAS-(CUG)₄₈₀* y *UAS-mbIC*.

- Las expansiones CUG generan miRNAs que regulan la traducción de *muscleblind* en vez de la transcripción. Los miRNAs afectan a la traducción o estabilidad de los mRNAs diana. Sería interesante la obtención de un anticuerpo específico anti-Mbl para analizar si se produce una reducción de proteína Muscleblind.

- Recientemente se ha descrito que la alteración en el procesado de Tau en cerebro de pacientes con DM1 está asociada a una disminución significativa en la expresión de *MBNL1* en un ensayo de RT-PCR (Leroy et al., 2006). Este dato no descarta la hipótesis del RNAi, pudiendo ser posible que al menos parte de la reducción de los transcritos *MBNL1* se debiera a la activación de la maquinaria interferente inducida por las horquillas de RNA CUG.

Conclusiones

De este trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Mediante experimentos de complementación funcional *in vivo* hemos demostrado que existe conservación entre las proteínas Muscleblind de *Drosophila* y humanas.
2. En los experimentos de rescate del fenotipo mutante *muscleblind* las isoformas rescatan en distinto grado sugiriendo que podrían realizar diferentes funciones. Una causa primaria de letalidad en embriones mutantes *muscleblind* es un defecto en el sistema muscular, aunque la expresión de *muscleblind* en otros tejidos también es importante.
3. Hemos generado un modelo en *Drosophila* para la DM1 mediante la obtención de moscas transgénicas que expresan 60 y 480 repeticiones del trinucleótido CTG bajo el control del sistema binario *GAL4/UAS*. Las repeticiones CUG son tóxicas para distintos tipos celulares de *Drosophila*. Hemos obtenido fenotipos morfológicos, de comportamiento y letalidad expresando las repeticiones en células musculares y neuronas.
4. La expresión del transgén *UAS-(CTG)₄₈₀* reproduce defectos semejantes a los que se observan en pacientes con DM1. Hemos observado la formación de inclusiones ribonucleares de RNAs CUG, la colocalización de MbIC:GFP en estos *foci*, la degeneración muscular, la desorganización en las células de la retina, las alteraciones en el procesado alternativo del minigen de la α -actinina y la interacción genética con la falta de función de *muscleblind*.
5. Hemos realizado un rastreo de mutaciones capaces de modificar predominantemente el fenotipo de ojo rugoso producido por la expresión de *UAS-(CTG)₄₈₀*. Los genes que han interactuado se pueden agrupar en cinco categorías: factores de transcripción reguladores, factores remodeladores de la cromatina, adhesión celular, proteínas asociadas al complejo EJC y apoptosis, sugiriendo nuevos procesos celulares alterados por la expresión de repeticiones CUG.
6. La expresión de 60 y 480 repeticiones CTG aumenta los niveles de pre-mRNA y mRNA *mbIC* sugiriendo una nueva relación entre expresión de repeticiones CTG y regulación de transcritos *muscleblind*.

Bibliografía

- Adereth, Y., Dammai, V., Kose, N., Li, R., and Hsu, T. (2005). RNA-dependent integrin $\alpha 3$ protein localisation regulated by the Muscleblind-like protein MLP1. *Nature Cell Biology* **in press**.
- Amack, J. D., and Mahadevan, M. S. (2004). Myogenic defects in myotonic dystrophy. *Dev Biol* **265**, 294-301.
- Anant, S., Henderson, J. O., Mukhopadhyay, D., Navaratnam, N., Kennedy, S., Min, J., and Davidson, N. O. (2001). Novel role for RNA-binding protein CUGBP2 in mammalian RNA editing. CUGBP2 modulates C to U editing of apolipoprotein B mRNA by interacting with apobec-1 and ACF, the apobec-1 complementation factor. *J Biol Chem* **276**, 47338-51.
- Andrews, N. C. (1998). The NF-E2 transcription factor. *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 429-32.
- Andrews, N. C., Erdjument-Bromage, H., Davidson, M. B., Tempst, P., and Orkin, S. H. (1993). Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* **362**, 722-8.
- Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., Perez-Alonso, M., and Baylies, M. K. (1998). The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of Drosophila muscles and is regulated by Dmef2. *Dev Biol* **195**, 131-43.
- Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Perez-Alonso, M., and Mlodzik, M. (1997). muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in Drosophila, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* **124**, 4321-31.
- Benito, A., Gutierrez, O., Pipaon, C., Real, P.J., Gachon, F., Ritchie, A.E., Fernandez-Luna, J.L. (2006). A novel for proline- and acid-rich basic region leucine zipper (PAR bZIP) proteins in the transcriptional regulation of a BH3-only proapoptotic gene. *J Biol Chem* **281**, 38351-7.
- Bernard, F., Lalouette, A., Gullaud, M., Jeantet, A. Y., Cossard, R., Zider, A., Ferveur, J. F., and Silber, J. (2003). Control of apterous by vestigial drives indirect flight muscle development in Drosophila. *Dev Biol* **260**, 391-403.
- Berul, C. I., Maguire, C. T., Gehrman, J., and Reddy, S. (2000). Progressive atrioventricular conduction block in a mouse myotonic dystrophy model. *J Interv Card Electrophysiol* **4**, 351-8.
- Bharathi, V., Pallavi, S. K., Bajpai, R., Emerald, B. S., and Shashidhara, L. S. (2004). Genetic characterization of the Drosophila homologue of coronin. *J Cell Sci* **117**, 1911-22.
- Bier, E. (2005). Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* **6**, 9-23.
- Borchiellini, C., Coulon, J., and Le Parco, Y. (1996). The function of type IV collagen during Drosophila muscle development. *Mech Dev* **58**, 179-91.
- Borner, C., and Monney, L. (1999). Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* **6**, 497-507.
- Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J. P., Hudson, T., and et al. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* **69**, 385.
- Brower, D. L. (2003). Platelets with wings: the maturation of Drosophila integrin biology. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 607-13.

Bibliografía

- Brown, R. S. (2005). Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 94-8.
- Buj-Bello, A., Laugel, V., Messaddeq, N., Zahreddine, H., Laporte, J., Pellissier, J. F., and Mandel, J. L. (2002). The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15060-5.
- Buxton, J., Shelbourne, P., Davies, J., Jones, C., Van Tongeren, T., Aslanidis, C., de Jong, P., Jansen, G., Anvret, M., Riley, B., and et al. (1992). Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* **355**, 547-8.
- Cagan, R. L., and Ready, D. F. (1989). The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Dev Biol* **136**, 346-62.
- Cleary, J. D., and Pearson, C. E. (2003). The contribution of cis-elements to disease-associated repeat instability: clinical and experimental evidence. *Cytogenet Genome Res* **100**, 25-55.
- Cummings, C. J., and Zoghbi, H. Y. (2000). Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **1**, 281-328.
- Charlet, B. N., Logan, P., Singh, G., and Cooper, T. A. (2002a). Dynamic antagonism between ETR-3 and PTB regulates cell type-specific alternative splicing. *Mol Cell* **9**, 649-58.
- Charlet, B. N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. V., Grice, E. A., and Cooper, T. A. (2002b). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* **10**, 45-53.
- Chen, K. Y., Pan, H., Lin, M. J., Li, Y. Y., Wang, L. C., Wu, Y. C., and Hsiao, K. M. (2007). Length-dependent toxicity of untranslated CUG repeats on *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* **352**, 774-9.
- Cho, D. H., and Tapscott, S. J. (2006). Myotonic dystrophy: Emerging mechanisms for DM1 and DM2. *Biochim Biophys Acta JID - 0217513 EDAT- 2006/08/01 09:00 MHDA- 2006/08/01 09:00 PHST- 2006/04/03 [received] PHST- 2006/05/26 [revised] PHST- 2006/05/26 [accepted] AID - S0925-4439(06)00098-6 [pii] AID - 10.1016/j.bbadis.2006.05.013 [doi] PST - aheadofprint.*
- Choi, K. W., and Benzer, S. (1994). Migration of glia along photoreceptor axons in the developing *Drosophila* eye. *Neuron* **12**, 423-31.
- Dansithong, W., Paul, S., Comai, L., and Reddy, S. (2005). MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1. *J Biol Chem* **280**, 5773-80.
- Davidson, F. F., and Steller, H. (1998). Blocking apoptosis prevents blindness in *Drosophila* retinal degeneration mutants. *Nature* **391**, 587-91.
- Davis, B. M., McCurrach, M. E., Taneja, K. L., Singer, R. H., and Housman, D. E. (1997). Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7388-93.
- De Temmerman, N., Sermon, K., Seneca, S., De Rycke, M., Hilven, P., Lissens, W., Van Steirteghem, A., and Liebaers, I. (2004). Intergenerational instability of the expanded CTG repeat in the DMPK gene: studies in human gametes and preimplantation embryos. *Am J Hum Genet* **75**, 325-9.
- Dean, N. L., Tan, S. L., and Ao, A. (2006). Instability in the transmission of the myotonic dystrophy CTG repeat in human oocytes and preimplantation embryos. *Fertil Steril* **86**, 98-105.
- Delaunay J Fau - Le Mee, G., Le Mee G Fau - Ezzeddine, N., Ezzeddine N Fau - Labesse, G., Labesse G Fau - Terzian, C., Terzian C Fau - Capri, M., Capri M Fau - Ait-Ahmed, O., and Ait-Ahmed, O. (2004). The *Drosophila* Bruno paralogue Bru-3 specifically binds the EDEN. *Nucleic Acids Res* **32**, 3070-82.

- Devine, J. H., Hewetson, A., Lee, V. H., and Chilton, B. S. (1999). After chromatin is SWItched-on can it be RUSHed? *Mol Cell Endocrinol* **151**, 49-56.
- Dickson, B., and Hafen E. (1993). Genetic Dissection of Eye Development in *Drosophila* pp. 1327-1362 in *The Development of Drosophila*, edited by M. Bate y A. Martinez Arias. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
- Donovan, M., and Cotter, T. G. (2004). Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* **1644**, 133-47.
- Driscoll M Fau - Gerstbrein, B., and Gerstbrein, B. (2003). Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration. *Nat Rev Genet* **4**, 181-94.
- Ebralidze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebralidse, K., and Junghans, R. P. (2004). RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* **303**, 383-7.
- Evans, C. J., and Banerjee, U. (2003). Transcriptional regulation of hematopoiesis in *Drosophila*. *Blood Cells Mol Dis* **30**, 223-8.
- Everett, C. M., and Wood, N. W. (2004). Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain* **127**, 2385-405.
- Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J. D., and Hamshere, M. G. (2001). In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res* **29**, 2766-71.
- Fardaei, M., Rogers, M. T., Thorpe, H. M., Larkin, K., Hamshere, M. G., Harper, P. S., and Brook, J. D. (2002). Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* **11**, 805-14.
- Faustino, N. A., and Cooper, T. A. (2003). Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* **17**, 419-37.
- Filippova, G. N., Thienes, C. P., Penn, B. H., Cho, D. H., Hu, Y. J., Moore, J. M., Klesert, T. R., Lobanenkov, V. V., and Tapscott, S. J. (2001). CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat Genet* **28**, 335-43.
- Foiry, L., Dong, L., Savouret, C., Hubert, L., Riele, H. T., Junien, C., and Gourdon, G. (2006). Msh3 is a limiting factor in the formation of intergenerational CTG expansions in DM1 transgenic mice. *Hum Genet* **119**, 520-6.
- Fu, Y. H., Pizzuti, A., Fenwick, R. G., Jr., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P. W., Dubel, J., Nasser, G. A., Ashizawa, T., de Jong, P., and et al. (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* **255**, 1256-8.
- Gachon, F., Olela, F. F., Schaad, O., Descombes, P., and Schibler, U. (2006). The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab* **4**, 25-36.
- García-Casado, M. Z. (2002). Caracterización funcional del gen *muscleblind*: valoración de *Drosophila* como modelo para el estudio de la Distrofia Miotónica. *Tesis Doctoral*. Universidad de Valencia.
- García-Casado, M. Z., Artero, R. D., Paricio, N., Terol, J., and Perez-Alonso, M. (2002). Generation of GAL4-responsive muscleblind constructs. *Genesis* **34**, 111-114.
- Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-32.
- Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamodar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs, F., Williams, J., Neurath,

Bibliografía

- K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrolla, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong, J., Stanyon, C. A., Finley, R. L., Jr., White, K. P., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets, R. A., McKenna, M. P., Chant, J., and Rothberg, J. M. (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**, 1727-36.
- Gomes-Pereira, M., and Monckton, D. G. (2004). Chemically induced increases and decreases in the rate of expansion of a CAG*CTG triplet repeat. *Nucleic Acids Res* **32**, 2865-72.
- Gomperts, M., Pascall, J. C., and Brown, K. D. (1990). The nucleotide sequence of a cDNA encoding an EGF-inducible gene indicates the existence of a new family of mitogen-induced genes. *Oncogene* **5**, 1081-3.
- Good, P. J., Chen, Q., Warner, S. J., and Herring, D. C. (2000). A family of human RNA-binding proteins related to the *Drosophila* Bruno translational regulator. *J Biol Chem* **275**, 28583-92.
- Gordenin, D. A., Kunkel, T. A., and Resnick, M. A. (1997). Repeat expansion--all in a flap? *Nat Genet* **16**, 116-8.
- Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartweg, E., and Steller, H. (2000). Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *Embo J* **19**, 589-97.
- Greener, A. (1990). *Strategies* 3(1):5-6.
- Gromak, N., Matlin, A. J., Cooper, T. A., and Smith, C. W. (2003). Antagonistic regulation of alpha-actinin alternative splicing by CELF proteins and polypyrimidine tract binding protein. *Rna* **9**, 443-56.
- Guichet, A., Peri, F., and Roth, S. (2001). Stable anterior anchoring of the oocyte nucleus is required to establish dorsoventral polarity of the *Drosophila* egg. *Dev Biol* **237**, 93-106.
- Haas, N. B., Cantwell, C. A., Johnson, P. F., and Burch, J. B. (1995). DNA-binding specificity of the PAR basic leucine zipper protein VBP partially overlaps those of the C/EBP and CREB/ATF families and is influenced by domains that flank the core basic region. *Mol Cell Biol* **15**, 1923-32.
- Hachet, O., and Ephrussi, A. (2004). Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* **428**, 959-963.
- Hagerman, P. J., and Hagerman, R. J. (2004). The fragile-X premutation: a maturing perspective. *Am J Hum Genet* **74**, 805-16.
- Hai, T., and Hartman, M. G. (2001). The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* **273**, 1-11.
- Halsell, S. R., and Kiehart, D. P. (1998). Second-site noncomplementation identifies genomic regions required for *Drosophila* nonmuscle myosin function during morphogenesis. *Genetics* **148**, 1845-63.
- Hamshere, M. G., Newman, E. E., Alwazzan, M., Athwal, B. S., and Brook, J. D. (1997). Transcriptional abnormality in myotonic dystrophy affects DMPK but not neighboring genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7394-9.
- Harley, H. G., Rundle, S. A., Reardon, W., Myring, J., Crow, S., Brook, J. D., Harper, P. S., and Shaw, D. J. (1992). Unstable DNA sequence in myotonic dystrophy. *Lancet* **339**, 1125-8.
- Haro, M. D., Al-Ramahi, I., Gouyon, B. D., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N. A., Ashizawa, T., Cooper, T. A., and Botas, J. (2006). MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of Myotonic Dystrophy Type 1. *Hum Mol Genet*.
- Harper, P. (2001). "Myotonic dystrophy." Saunders, London.

- Harper, P. S., Harley, H. G., Reardon, W., and Shaw, D. J. (1992). Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem. *Am J Hum Genet* **51**, 10-6.
- Ho, T. H., Bundman, D., Armstrong, D. L., and Cooper, T. A. (2005a). Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* **14**, 1539-47.
- Ho, T. H., Charlet, B. N., Poulos, M. G., Singh, G., Swanson, M. S., and Cooper, T. A. (2004). Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *Embo J* **23**, 3103-12.
- Ho, T. H., Savkur, R. S., Poulos, M. G., Mancini, M. A., Swanson, M. S., and Cooper, T. A. (2005b). Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *J Cell Sci* **118**, 2923-33.
- Holmes, S. E., O'Hearn, E., and Margolis, R. L. (2003). Why is SCA12 different from other SCAs? *Cytogenet Genome Res* **100**, 189-97.
- Holmes, S. E., O'Hearn, E., Rosenblatt, A., Callahan, C., Hwang, H. S., Ingersoll-Ashworth, R. G., Fleisher, A., Stevanin, G., Brice, A., Potter, N. T., Ross, C. A., and Margolis, R. L. (2001). A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet* **29**, 377-8.
- Houseley, J. M., Wang, Z., Brock, G. J., Soloway, J., Artero, R., Perez-Alonso, M., O'Dell, K. M., and Monckton, D. G. (2005). Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to Drosophila. *Hum Mol Genet* **14**, 873-83.
- Hudson, B. P., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2004). Recognition of the mRNA AU-rich element by the zinc finger domain of TIS11d. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 257-64.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-8.
- Iwahashi, C. K., Yasui, D. H., An, H. J., Greco, C. M., Tassone, F., Nannen, K., Babineau, B., Lebrilla, C. B., Hagerman, R. J., and Hagerman, P. J. (2006). Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. *Brain* **129**, 256-71.
- Jackson, G. R., Salecker, I., Dong, X., Yao, X., Arnheim, N., Faber, P. W., MacDonald, M. E., and Zipursky, S. L. (1998). Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of Drosophila photoreceptor neurons. *Neuron* **21**, 633-42.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-36.
- Jansen, G., Groenen, P. J., Bachner, D., Jap, P. H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., van den Broek, W., Gohlsch, B., Pette, D., Plomp, J. J., Molenaar, P. C., Nederhoff, M. G., van Echteld, C. J., Dekker, M., Berns, A., Hameister, H., and Wieringa, B. (1996). Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet* **13**, 316-24.
- Jansen, G., Mahadevan, M., Amemiya, C., Wormskamp, N., Segers, B., Hendriks, W., O'Hoy, K., Baird, S., Sabourin, L., Lennon, G., and et al. (1992). Characterization of the myotonic dystrophy region predicts multiple protein isoform-encoding mRNAs. *Nat Genet* **1**, 261-6.
- Jansen, G., Willems, P., Coerwinkel, M., Nillesen, W., Smeets, H., Vits, L., Howeler, C., Brunner, H., and Wieringa, B. (1994). Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)_n repeat variation and selection against extreme expansion in sperm. *Am J Hum Genet* **54**, 575-85.
- Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T., and Thornton, C. A. (2004). Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA,

Bibliografía

- sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet* **13**, 3079-88.
- Kaliman, P., Catalucci, D., Lam, J. T., Kondo, R., Gutierrez, J. C., Reddy, S., Palacin, M., Zorzano, A., Chien, K. R., and Ruiz-Lozano, P. (2005). Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates phospholamban and regulates calcium uptake in cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **280**, 8016-21.
- Kanadia, R. N., Johnstone, K. A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C. A., Esson, D., Timmers, A. M., Hauswirth, W. W., and Swanson, M. S. (2003a). A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* **302**, 1978-80.
- Kanadia, R. N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S. G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A., and Swanson, M. S. (2006). Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11748-53.
- Kanadia, R. N., Urbinati, C. R., Crusselle, V. J., Luo, D., Lee, Y. J., Harrison, J. K., Oh, S. P., and Swanson, M. S. (2003b). Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3. *Gene Expr Patterns* **3**, 459-62.
- Kania, A., Salzberg, A., Bhat, M., D'Evelyn, D., He, Y., Kiss, I., and Bellen, H. J. (1995). P-element mutations affecting embryonic peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **139**, 1663-78.
- Kataoka, N., and Dreyfuss, G. (2004). A simple whole cell lysate system for in vitro splicing reveals a stepwise assembly of the exon-exon junction complex. *J Biol Chem* **279**, 7009-13.
- Kay, B. K., Williamson, M. P., and Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J* **14**, 231-41.
- Kennedy, L., Evans, E., Chen, C. M., Craven, L., Detloff, P. J., Ennis, M., and Shelbourne, P. F. (2003). Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* **12**, 3359-67.
- Kim, D. H., Langlois, M. A., Lee, K. B., Riggs, A. D., Puymirat, J., and Rossi, J. J. (2005). HnRNP H inhibits nuclear export of mRNA containing expanded CUG repeats and a distal branch point sequence. *Nucleic Acids Res* **33**, 3866-74.
- Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J. D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., Dirksen, R. T., Takahashi, M. P., Dulhunty, A. F., and Sakoda, S. (2005). Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* **14**, 2189-200.
- Kino, Y., Mori, D., Oma, Y., Takeshita, Y., Sasagawa, N., and Ishiura, S. (2004). Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Hum Mol Genet* **13**, 495-507.
- Kinoshita, M., Takahashi, R., Hasegawa, T., Komori, T., Nagasawa, R., Hirose, K., and Tanabe, H. (1996). (CTG)_n expansions in various tissues from a myotonic dystrophy patient. *Muscle Nerve* **19**, 240-2.
- Klesert, T. R., Cho, D. H., Clark, J. I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., Yuen, E. C., Soriano, P., and Tapscott, S. J. (2000). Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet* **25**, 105-9.
- Klinkerfuss, G. H. (1967). An electron microscopic study of myotonic dystrophy. *Arch Neurol* **16**, 181-93.
- Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* **110**, 191-202.

- Kozlova, N., Braga, J., Lundgren, J., Rino, J., Young, P., Carmo-Fonseca, M., and Visa, N. (2006). Studies on the role of NonA in mRNA biogenesis. *Exp Cell Res* **312**, 2619-30.
- Ladd, A. N., Charlet, N., and Cooper, T. A. (2001). The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol Cell Biol* **21**, 1285-96.
- Lam, L. T., Pham, Y. C., Nguyen, T. M., and Morris, G. E. (2000). Characterization of a monoclonal antibody panel shows that the myotonic dystrophy protein kinase, DMPK, is expressed almost exclusively in muscle and heart. *Hum Mol Genet* **9**, 2167-73.
- Langlois, M. A., Boniface, C., Wang, G., Alluin, J., Salvaterra, P. M., Puymirat, J., Rossi, J. J., and Lee, N. S. (2005). Cytoplasmic and nuclear retained DMPK mRNAs are targets for RNA interference in myotonic dystrophy cells. *J Biol Chem* **280**, 16949-54.
- Lavedan, C., Hofmann-Radvanyi, H., Shelbourne, P., Rabes, J. P., Duros, C., Savoy, D., Dehaupas, I., Luce, S., Johnson, K., and Junien, C. (1993). Myotonic dystrophy: size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *Am J Hum Genet* **52**, 875-83.
- Leroy, O., Dhaenens, C. M., Schraen-Maschke, S., Belarbi, K., Delacourte, A., Andreadis, A., Sablonniere, B., Buee, L., Sergeant, N., and Caillet-Boudin, M. L. (2006). ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I. *J Neurosci Res*.
- Lin, X., and Ashizawa, T. (2003). SCA10 and ATTCT repeat expansion: clinical features and molecular aspects. *Cytogenet Genome Res* **100**, 184-8.
- Lin, X., Miller, J. W., Mankodi, A., Kanadia, R. N., Yuan, Y., Moxley, R. T., Swanson, M. S., and Thornton, C. A. (2006). Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* **15**, 2087-97.
- Liquori, C. L., Ricker, K., Moseley, M. L., Jacobsen, J. F., Kress, W., Naylor, S. L., Day, J. W., and Ranum, L. P. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* **293**, 864-7.
- Lu, N., Heuchel, R., Barczyk, M., Zhang, W. M., and Gullberg, D. (2006). Tandem Sp1/Sp3 sites together with an Ets-1 site cooperate to mediate alpha11 integrin chain expression in mesenchymal cells. *Matrix Biol* **25**, 118-29.
- Ludatscher, R. M., Kerner, H., Amikam, S., and Gellei, B. (1978). Myotonia dystrophica with heart involvement: an electron microscopic study of skeletal, cardiac, and smooth muscle. *J Clin Pathol* **31**, 1057-64.
- Machuca-Tzili, L., Brook, D., and Hilton-Jones, D. (2005). Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve* **32**, 1-18.
- Machuca-Tzili, L., Thorpe, H., Robinson, T. E., Sewry, C., and Brook, J. D. (2006). Flies deficient in Muscleblind protein model features of myotonic. *Hum Genet JID - 7613873 EDAT- 2006/08/24 09:00 MHDA- 2006/08/24 09:00 PHST- 2006/03/24 [received] PHST- 2006/07/03 [accepted] PHST- 2006/08/23 [aheadofprint] AID - 10.1007/s00439-006-0228-8 [doi] PST - aheadofprint.*
- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., and et al. (1992). Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* **255**, 1253-5.
- Mahadevan Ms Fau - Yadava, R. S., Yadava Rs Fau - Yu, Q., Yu Q Fau - Balijepalli, S., Balijepalli S Fau - Frenzel-McCardell, C. D., Frenzel-McCardell Cd Fau - Bourne, T. D., Bourne Td Fau - Phillips, L. H., and Phillips, L. H. (2006). Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in. *Nat Genet* **38**, 1066-70.

Bibliografía

- Malinina, L. (2005). Possible involvement of the RNAi pathway in trinucleotide repeat expansion diseases. *J Biomol Struct Dyn* **23**, 233-5.
- Mankodi, A., Lin, X., Blaxall, B. C., Swanson, M. S., and Thornton, C. A. (2005). Nuclear RNA foci in the heart in myotonic dystrophy. *Circ Res* **97**, 1152-5.
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., and Thornton, C. A. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* **289**, 1769-73.
- Mankodi, A., Teng-Umnuay, P., Krym, M., Henderson, D., Swanson, M., and Thornton, C. A. (2003). Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Ann Neurol* **54**, 760-8.
- Mankodi, A., Urbinati, C. R., Yuan, Q. P., Moxley, R. T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M. S., and Thornton, C. A. (2001). Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet* **10**, 2165-70.
- Marsh, J. L., Walker, H., Theisen, H., Zhu, Y. Z., Fielder, T., Purcell, J., and Thompson, L. M. (2000). Expanded polyglutamine peptides alone are intrinsically cytotoxic and cause neurodegeneration in Drosophila. *Hum Mol Genet* **9**, 13-25.
- Martin, G. S. (2006). Fly Src: the Yin and Yang of tumor invasion and tumor suppression. *Cancer Cell* **9**, 4-6.
- Martorell, L., Monckton, D. G., Gamez, J., Johnson, K. J., Gich, I., Lopez de Munain, A., and Baiget, M. (1998). Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Hum Mol Genet* **7**, 307-12.
- Mathews, W. R., Ong, D., Milutinovich, A. B., and Van Doren, M. (2006). Zinc transport activity of Fear of Intimacy is essential for proper gonad morphogenesis and DE-cadherin expression. *Development* **133**, 1143-53.
- McCarthy, J. V. (2003). Apoptosis and development. *Essays Biochem* **39**, 11-24.
- Meier, P., Silke, J., Leivers, S. J., and Evan, G. I. (2000). The Drosophila caspase DRONC is regulated by DIAP1. *Embo J* **19**, 598-611.
- Michalowski, S., Miller, J. W., Urbinati, C. R., Paliouras, M., Swanson, M. S., and Griffith, J. (1999). Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein. *Nucleic Acids Res* **27**, 3534-42.
- Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umnuay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., and Swanson, M. S. (2000). Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *Embo J* **19**, 4439-48.
- Mirkin, S. M. (2006). DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders. *Curr Opin Struct Biol*.
- Mohler, J., Mahaffey, J. W., Deutsch, E., and Vani, K. (1995). Control of Drosophila head segment identity by the bZIP homeotic gene cnc. *Development* **121**, 237-47.
- Monckton, D. G., Wong, L. J., Ashizawa, T., and Caskey, C. T. (1995). Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Hum Mol Genet* **4**, 1-8.
- Monferrer, L., and Artero, R. (2006). An interspecific functional complementation test in Drosophila for introductory genetics laboratory courses. *J Hered* **97**, 67-73.
- Mooers, B. H., Logue, J. S., and Berglund, J. A. (2005). The structural basis of myotonic dystrophy from the crystal structure of CUG repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16626-31.

- Moses, K., and Rubin, G. M. (1991). Glass encodes a site-specific DNA-binding protein that is regulated in response to positional signals in the developing *Drosophila* eye. *Genes Dev* **5**, 583-93.
- Moxley, R. T., III, Griggs, R. C., Goldblatt, D., VanGelder, V., Herr, B. E., and Thiel, R. (1978). Decreased insulin sensitivity of forearm muscle in myotonic dystrophy. *J Clin Invest* **62**, 857-67.
- Mukhopadhyay, D., Houchen, C. W., Kennedy, S., Dieckgraefe, B. K., and Anant, S. (2003). Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein, CUGBP2. *Mol Cell* **11**, 113-26.
- Muller, S., Hoegel, C., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 202-10.
- Mutsuddi, M., Marshall, C. M., Benzow, K. A., Koob, M. D., and Rebay, I. (2004). The spinocerebellar ataxia 8 noncoding RNA causes neurodegeneration and associates with stau1 in *Drosophila*. *Curr Biol* **14**, 302-8.
- Nagamitsu, S., Matsuura, T., Khajavi, M., Armstrong, R., Gooch, C., Harati, Y., and Ashizawa, T. (2000). A "dystrophic" variant of autosomal recessive myotonia congenita caused by novel mutations in the CLCN1 gene. *Neurology* **55**, 1697-703.
- Nakano, Y., Fujitani, K., Kurihara, J., Ragan, J., Usui-Aoki, K., Shimoda, L., Lukacsovich, T., Suzuki, K., Sezaki, M., Sano, Y., Ueda, R., Awano, W., Kaneda, M., Umeda, M., and Yamamoto, D. (2001). Mutations in the novel membrane protein spinster interfere with programmed cell death and cause neural degeneration in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **21**, 3775-88.
- Nakazora, H., and Kurihara, T. (2005). The effect of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) on myotonia: intracellular studies. *Intern Med* **44**, 1247-51.
- Napierala, M., and Krzyzosiak, W. J. (1997). CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable "slippery" hairpins. *J Biol Chem* **272**, 31079-85.
- Nykamp, K. R., and Swanson, M. S. (2004). Toxic RNA in the nucleus: unstable microsatellite expression in neuromuscular disease. *Prog Mol Subcell Biol* **35**, 57-77.
- Oostra, B. A., and Willemsen, R. (2003). A fragile balance: FMR1 expression levels. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2**, R249-57.
- Paillard, L., Omilli, F., Legagneux, V., Bassez, T., Maniey, D., and Osborne, H. B. (1998). EDEN and EDEN-BP, a cis element and an associated factor that mediate sequence-specific mRNA deadenylation in *Xenopus* embryos. *Embo J* **17**, 278-87.
- Palacios, I. M. (2002). RNA processing: splicing and the cytoplasmic localisation of mRNA. *Curr Biol* **12**, R50-2.
- Pascual, M. (2005). Muscleblind, relevancia clínica y análisis de la función molecular en *Drosophila melanogaster*. *Tesis Doctoral*. Universidad de Valencia.
- Pascual, M., Vicente, M., Monferrer, L., and Artero, R. (2006). The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation* **74**, 65-80.
- Paul, S., Dansithong, W., Kim, D., Rossi, J., Webster, N. J., Comai, L., and Reddy, S. (2006). Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *Embo J* **25**, 4271-83.
- Pearson, C. E., Nichol Edamura, K., and Cleary, J. D. (2005). Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* **6**, 729-42.
- Philips, A. V., Timchenko, L. T., and Cooper, T. A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* **280**, 737-41.

Bibliografía

- Phylactou, L. A., Darrah, C., and Wood, M. J. (1998). Ribozyme-mediated trans-splicing of a trinucleotide repeat. *Nat Genet* **18**, 378-81.
- Pielage, J., Kippert, A., Zhu, M., and Klambt, C. (2004). The Drosophila transmembrane protein Fear-of-intimacy controls glial cell migration. *Dev Biol* **275**, 245-57.
- Portman, D. S., O'Connor, J. P., and Dreyfuss, G. (1997). YRA1, an essential *Saccharomyces cerevisiae* gene, encodes a novel nuclear protein with RNA annealing activity. *Rna* **3**, 527-37.
- Preker, P. J., and Guthrie, C. (2006). Autoregulation of the mRNA export factor Yra1p requires inefficient splicing of its pre-mRNA. *Rna* **12**, 994-1006.
- Prokopenko, S. N., He, Y., Lu, Y., and Bellen, H. J. (2000). Mutations affecting the development of the peripheral nervous system in Drosophila: a molecular screen for novel proteins. *Genetics* **156**, 1691-715.
- Rangarajan, R., Gong, Q., and Gaul, U. (1999). Migration and function of glia in the developing Drosophila eye. *Development* **126**, 3285-92.
- Ranum, L. P., and Cooper, T. A. (2006). RNA-Mediated Neuromuscular Disorders. *Annu Rev Neurosci*.
- Ranum, L. P., and Day, J. W. (2004a). Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet* **74**, 793-804.
- Ranum, L. P., and Day, J. W. (2004b). Pathogenic RNA repeats: an expanding role in genetic disease. *Trends Genet* **20**, 506-12.
- Reddy, S., Smith, D. B., Rich, M. M., Leferovich, J. M., Reilly, P., Davis, B. M., Tran, K., Rayburn, H., Bronson, R., Cros, D., Balice-Gordon, R. J., and Housman, D. (1996). Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet* **13**, 325-35.
- Reichert, V. L., Le Hir, H., Jurica, M. S., and Moore, M. J. (2002). 5' exon interactions within the human spliceosome establish a framework for exon junction complex structure and assembly. *Genes Dev* **16**, 2778-91.
- Roberts, R., Timchenko, N. A., Miller, J. W., Reddy, S., Caskey, C. T., Swanson, M. S., and Timchenko, L. T. (1997). Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13221-6.
- Roulier, E. M., Fyrberg, C., and Fyrberg, E. (1992). Perturbations of Drosophila alpha-actinin cause muscle paralysis, weakness, and atrophy but do not confer obvious nonmuscle phenotypes. *J Cell Biol* **116**, 911-22.
- Rybakin, V., and Clemen, C. S. (2005). Coronin proteins as multifunctional regulators of the cytoskeleton and membrane trafficking. *Bioessays* **27**, 625-32.
- Sambrook and Russell (2001). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.
- Sarkar, P. S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., Chai, Y., Stout, J. T., and Reddy, S. (2000). Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet* **25**, 110-4.
- Savkur, R. S., Philips, A. V., and Cooper, T. A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* **29**, 40-7.
- Schulz, R. A., Chromey, C., Lu, M. F., Zhao, B., and Olson, E. N. (1996). Expression of the D-MEF2 transcription in the Drosophila brain suggests a role in neuronal cell differentiation. *Oncogene* **12**, 1827-31.
- Seino S., Seino M., Nishi S., Bell G.I., (1989). Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*. **86**, 114-8.

- SenGupta, D. J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S., and Wickens, M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8496-501.
- Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C. A., Wattez, A., Vermersch, P., and Delacourte, A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* **10**, 2143-55.
- Seznec, H., Agbulut, O., Sergeant, N., Savouret, C., Ghestem, A., Tabti, N., Willer, J. C., Ourth, L., Duros, C., Brisson, E., Fouquet, C., Butler-Browne, G., Delacourte, A., Junien, C., and Gourdon, G. (2001). Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum Mol Genet* **10**, 2717-26.
- Shaw, D. J., McCurrach, M., Rundle, S. A., Harley, H. G., Crow, S. R., Sohn, R., Thirion, J. P., Hamshere, M. G., Buckler, A. J., Harper, P. S., and et al. (1993). Genomic organization and transcriptional units at the myotonic dystrophy locus. *Genomics* **18**, 673-9.
- Shelbourne, P., Winqvist, R., Kunert, E., Davies, J., Leisti, J., Thiele, H., Bachmann, H., Buxton, J., Williamson, B., and Johnson, K. (1992). Unstable DNA may be responsible for the incomplete penetrance of the myotonic dystrophy phenotype. *Hum Mol Genet* **1**, 467-73.
- Spradling, A. C., and Rubin, G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**, 341-7.
- Spradling, A. C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E. J., Laverty, T., Mozden, N., Misra, S., and Rubin, G. M. (1999). The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* **153**, 135-77.
- Squillace, R. M., Chenault, D. M., and Wang, E. H. (2002). Inhibition of muscle differentiation by the novel muscleblind-related protein CHCR. *Dev Biol* **250**, 218-30.
- Stroedicke, M., Karberg, S., and Korge, G. (2000). Domina (Dom), a new *Drosophila* member of the FKH/WH gene family, affects morphogenesis and is a suppressor of position-effect variegation. *Mech Dev* **96**, 67-78.
- Stroupe, M. E., Tange, T. O., Thomas, D. R., Moore, M. J., and Grigorieff, N. (2006). The three-dimensional architecture of the EJC core. *J Mol Biol* **360**, 743-9.
- Sullivan, W., Ashburner, M. and Hawley R. S. (2000). *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Taneja, K. L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., and Singer, R. H. (1995). Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol* **128**, 995-1002.
- Tapscott, S. J., and Thornton, C. A. (2001). Biomedicine. Reconstructing myotonic dystrophy. *Science* **293**, 816-7.
- Thornton, C. A., Johnson, K., and Moxley, R. T., 3rd. (1994). Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes. *Ann Neurol* **35**, 104-7.
- Thummel, C. S., Boulet, A. M., and Lipshitz, H. D. (1988). Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene* **74**, 445-56.
- Timchenko, L., Nastainczyk, W., Schneider, T., Patel, B., Hofmann, F., and Caskey, C. T. (1995). Full-length myotonin protein kinase (72 kDa) displays serine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5366-70.
- Timchenko, L. T., Timchenko, N. A., Caskey, C. T., and Roberts, R. (1996). Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* **5**, 115-21.

Bibliografía

- Timchenko, N. A., Iakova, P., Cai, Z. J., Smith, J. R., and Timchenko, L. T. (2001). Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol Cell Biol* **21**, 6927-38.
- Timchenko, N. A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z. J., Quan, L., and Timchenko, L. T. (2004). Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J Biol Chem* **279**, 13129-39.
- Timchenko, N. A., Welm, A. L., Lu, X., and Timchenko, L. T. (1999). CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms. *Nucleic Acids Res* **27**, 4517-25.
- Trembley, J. H., Tatsumi, S., Sakashita, E., Loyer, P., Slaughter, C. A., Suzuki, H., Endo, H., Kidd, V. J., and Mayeda, A. (2005). Activation of pre-mRNA splicing by human RNPS1 is regulated by CK2 phosphorylation. *Mol Cell Biol* **25**, 1446-57.
- Trip J Fau - Drost, G., Drost G Fau - van Engelen, B. G. M., van Engelen Bg Fau - Faber, C. G., and Faber, C. G. (2006). Drug treatment for myotonia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004762.
- Twomey, C., and McCarthy, J. V. (2005). Pathways of apoptosis and importance in development. *J Cell Mol Med* **9**, 345-59.
- Utrecht, A. C., and Bear, J. E. (2006). Coronins: the return of the crown. *Trends Cell Biol* **16**, 421-6.
- van den Broek, W. J., Nelen, M. R., Wansink, D. G., Coerwinkel, M. M., te Riele, H., Groenen, P. J., and Wieringa, B. (2002). Somatic expansion behaviour of the (CTG)_n repeat in myotonic dystrophy knock-in mice is differentially affected by Msh3 and Msh6 mismatch-repair proteins. *Hum Mol Genet* **11**, 191-8.
- Vicente, M., Monferrer, L., Poulos M.G., Houseley J., Monckton D.G., O'dell K.M., Swanson M.S., Artero R.D. (2007). Muscleblind isoforms are functionally distinct and regulate alpha-actinin splicing. *Differentiation*.
- Volk, T., Fessler, L. I., and Fessler, J. H. (1990). A role for integrin in the formation of sarcomeric cytoarchitecture. *Cell* **63**, 525-36.
- Warrick, J. M., Paulson, H. L., Gray-Board, G. L., Bui, Q. T., Fischbeck, K. H., Pittman, R. N., and Bonini, N. M. (1998). Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell* **93**, 939-49.
- Wheeler, V. C., Lebel, L. A., Vrbanac, V., Teed, A., te Riele, H., and MacDonald, M. E. (2003). Mismatch repair gene Msh2 modifies the timing of early disease in Hdh(Q111) striatum. *Hum Mol Genet* **12**, 273-81.
- Wilk, R., Pickup, A. T., Hamilton, J. K., Reed, B. H., and Lipshitz, H. D. (2004). Dose-sensitive autosomal modifiers identify candidate genes for tissue autonomous and tissue nonautonomous regulation by the *Drosophila* nuclear zinc-finger protein, hindsight. *Genetics* **168**, 281-300.
- Winchester, C. L., Ferrier, R. K., Sermoni, A., Clark, B. J., and Johnson, K. J. (1999). Characterization of the expression of DMPK and SIX5 in the human eye and implications for pathogenesis in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* **8**, 481-92.
- Yanagisawa, H., Miyashita, T., Nakano, Y., and Yamamoto, D. (2003). HSpin1, a transmembrane protein interacting with Bcl-2/Bcl-xL, induces a caspase-independent autophagic cell death. *Cell Death Differ* **10**, 798-807.
- Zars, T., Fischer, M., Schulz, R., and Heisenberg, M. (2000). Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* **288**, 672-5.
- Zhang, Z., and Carmichael, G. G. (2001). The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell* **106**, 465-75.
- Zusman, S., Grinblat, Y., Yee, G., Kafatos, F. C., and Hynes, R. O. (1993). Analyses of PS integrin functions during *Drosophila* development. *Development* **118**, 737-50.

Zutter, M. M., Ryan, E. E., and Painter, A. D. (1997). Binding of phosphorylated Sp1 protein to tandem Sp1 binding sites regulates alpha2 integrin gene core promoter activity. *Blood* **90**, 678-89.