



	UNIVERSITAT DE VALÈNCIA REGISTRE GENERAL ENTRADA
	- 7 JUN 2010
N.º	52176
HORA	13.11
OFICINA AUXILIAR MÚM. 14	

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

D. Rubén Artero Allepuz, Doctor en Biología y Profesor Titular del Departamento de Genética de la Universidad de Valencia, y D^a M^a Mar Orzáez Calatayud, Doctora en Bioquímica e Investigadora del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia,

CERTIFICAN: que D^a Amparo García López, Licenciada en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo original titulado

Búsqueda de supresores químicos de la toxicidad de las expansiones CTG en Drosophila

para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas y,

AUTORIZAN: su presentación en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología para tal fin.

Para que conste, y en cumplimiento de la legislación, firman el presente certificado en

Valencia, a 28 de mayo de 2010.

Dr. Rubén Artero Allepuz

Dra. M^a Mar Orzáez Calatayud



UMI Number: U603068

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603068

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

***A mis padres,
a mi hermano***

Agradecimientos

Nunca antes, durante todos estos años, había sido tan difícil enfrentarme al papel en blanco, hay tantas cosas que no se pueden poner en palabras. Supongo que este momento simboliza el cierre de una etapa. Una etapa que me ha hecho crecer no sólo como científica, sino sobre todo como persona, y que representa los años más bonitos de mi vida. A lo largo de este tiempo me he encontrado con gente increíble en el camino, a quienes no olvidaré nunca. Sin vosotros esta experiencia no habría sido lo mismo.

Por eso quiero agradecer...

En primer lugar, a mi familia, en especial a mis padres y a mi hermano, por ser lo que más quiero en este mundo. Por haberme apoyado siempre en los momentos duros y por haber compartido conmigo también los buenos. Gracias no sólo por haber estado conmigo durante este periodo, sino por 29 años haciéndome feliz. Todo lo que consiga en la vida os lo deberé siempre a vosotros. Gracias también a Maje, por ser como una hermana. A mis tíos y primos, a mi abuela y a mi abuelo (aunque ya no estés, sé que estarías orgulloso). A todos, por tantos buenos ratos juntos.

Gracias a los miembros del laboratorio GMD, en especial a Rubén por haber creído en mí y haberme dado la oportunidad de hacer lo que siempre había soñado, por haber sido jefe y amigo. Gracias también a Nuria y a Manuel, por sus consejos y apoyo todos estos años. A mis compañeros, tanto a los que ya no están como a los que siguen, en especial a: Fabrice, porque hemos pasado por todo esto juntos desde el principio (te acuerdas de The Reason?). A M^a Carmen, por los días en los que cerrábamos los ojos y veíamos miles de larvitas. A Irmilla, por el 'PNAS' y por el kayak en Noruega. A Lidón, por ser mi madre científica. A Vero, por dejarme echarle la culpa (aunque en realidad era mía). A Yaiza, por nuestros ratos en el laboratorio a altas horas (y por echarme gotas). A Bea, por ayudarme con los ratones (sin ti me los habría llevado a casa) y por tantos buenos momentos (Würzburg, Praga...). A Juanma, me falta papel para darte las gracias... por enseñarme a clonar, a cocinar, por los microRNAs, por ayudarme con la tesis, por querer tanto a Mendel, por tantas cosas!. Gracias también a Robin, por la tarta de cumpleaños de limón, y a mis colaboradores, en especial a Diana por su gran ayuda de última hora. A todos vosotros, porque empezamos siendo compañeros y acabamos convirtiéndonos en grandes amigos.

Gracias al resto de compañeros del Departamento de Genética y a los miembros del PAS, por incontables buenas horas juntos, en especial a Camila, por nuestras tardes de chicas en el cine y por haberme protegido contra las orugas en Cerdeña. Gracias a todos vosotros el trabajo ha sido mucho más que eso, ojalá pudiese llevaros siempre conmigo.

A todos los miembros del laboratorio de péptidos y proteínas del CIPF, en especial a Mar y a Quique por haberme dado la oportunidad de trabajar en vuestro laboratorio y haberme enseñado tantas (tantas!) cosas. A Susana, por ser amiga además de compañera, y a Ana G. por haber tenido que sufrir innumerables síntesis de mis péptidos. Mil gracias!

Gracias también a Juan Pablo, por haberme dado la gran oportunidad de continuar esta andadura y abrir una nueva etapa en mi vida, espero no defraudarte. A mis nuevos compañeros, por haberme ayudado tanto desde que llegué: Iñaki, Emile, John, Sarah, Rose y en especial a Miguel Angel, por ser, además, el mejor compañero de piso que se puede tener.

A mis amigos de siempre, gracias por seguir ahí después de tantos años (y los que nos quedan!). Silvia, Teresa y Ampareles, gracias por todos esos veranos inolvidables en el Perelló. Gracias Silvia por el viaje a Londres y por tantas otras cosas. A Laura, por nuestras tardes en los Ases, por Muse (un día los veremos juntas). A Vero y a Javi, por haber sido mucho más que compañeros de carrera.

A todos aquéllos que me habéis ayudado a sacar adelante este trabajo. Habéis conseguido que esta experiencia no me haya decepcionado ni un solo minuto de todos estos años.

A todos.

Por todo.

Índice	
Introducción	1
1. La Distrofia Miotónica tipo 1: prevalencia y síntomas	3
2. Base genética de la Distrofia Miotónica: los loci DM1 y DM2	4
3. Anticipación genética e inestabilidad somática: mecanismos de expansión de las repeticiones CTG	9
4. Modelos del mecanismo molecular de patogénesis en la DM1	14
4.1. Modelo de haploinsuficiencia de <i>DMPK</i>	14
4.2. Modelo del efecto local sobre la cromatina	15
4.3. Ganancia de función tóxica del ARN	16
4.3.1. Secuestro de factores de transcripción	17
4.3.2. Secuestro de factores de <i>splicing</i> alternativo	18
4.3.3. Secuestro de microARNs	21
4.4. Modelo del silenciamiento de genes por generación de fragmentos de ARNi	22
5. Papel de las proteínas Muscleblind en el desarrollo de la DM1	25
5.1. MBNL1-3 son proteínas de dedos de zinc necesarias durante el desarrollo muscular	25
5.2. Función molecular de las proteínas Muscleblind en el metabolismo del ARN	28
5.3. Las proteínas Muscleblind y CUGBP1 regulan cambios en el <i>splicing</i> de manera antagonista durante el desarrollo	29
6. Implicación de Muscleblind en otras enfermedades causadas por expansión de repeticiones	32
7. Modelos animales de la DM1	33
7.1. Modelos en <i>C. elegans</i>	33
7.2. Modelos en <i>Drosophila</i>	33
7.3. Modelos en ratón	35
8. Tratamientos y terapias contra la DM1	37
9. Los rastreos de colecciones de compuestos como herramienta para la identificación de nuevas terapias	40
9.1. <i>Drosophila</i> como modelo para la búsqueda de fármacos	40
9.2. Las quimiotecas combinatorias de péptidos	42
Objetivos	45
Resultados	49
1. La expresión de repeticiones CTG en los Cuerpos de Seta de <i>Drosophila</i> es tóxica	51
2. La destrucción química de los MB suprime parcialmente la letalidad provocada por la expresión de repeticiones CTG	52

3. <i>mb1</i> modifica el fenotipo de letalidad inducido por la expresión de repeticiones CTG en los MB.....	54
4. Identificación de moléculas de actividad biológica conocida capaces de suprimir la toxicidad de repeticiones CTG en los MB de <i>Drosophila</i>	55
4.1. Rastreo de la quimioteca Prestwick.....	55
4.2. La expresión de repeticiones CTG en neuronas colinérgicas y dopaminérgicas es tóxica en <i>Drosophila</i>	58
4.3. Validación de los compuestos con actividad positiva.....	59
4.3.1. Las moléculas identificadas no afectan a la expresión de (CTG)480.....	59
4.3.2. Estudio del efecto en el ojo de las moléculas identificadas.....	60
5. Rastreo de una quimioteca combinatoria de hexapéptidos.....	61
5.1. Identificación del péptido p88 como supresor de la toxicidad de (CTG)480.....	61
5.2. Estudio de la toxicidad de p88.....	63
5.3. Todos los aminoácidos que forman p88 son críticos para su actividad.....	64
5.4. Validación de la actividad de p88 en otros tejidos.....	65
5.4.1. p88 mejora defectos histológicos causados por (CTG)480 en los músculos indirectos del vuelo.....	65
5.4.2. El péptido 88 no suprime la toxicidad de (CTG)480 en el ojo.....	66
6. La expresión endógena de p88 suprime fenotipos provocados por repeticiones CTG.....	67
7. Estudio del mecanismo de acción de p88.....	70
7.1. p88 no afecta a los niveles de expresión de (CTG)480.....	71
7.2. Estudio del efecto del péptido 88 sobre la unión de Mbl a repeticiones CUG.....	72
7.2.1. Expresión y purificación de los dedos de Zinc de Mbl.....	73
7.2.2. p88 se une a repeticiones CUG <i>in vitro</i>	74
7.3. p88 se une a repeticiones CUG con mayor afinidad que a otras secuencias.....	78
7.4. p88 provoca un cambio conformacional en las horquillas de doble cadena formadas por repeticiones CUG.....	81
8. Validación del efecto de p88 en un modelo de DM1 en ratón.....	83
8.1. Estudio de la toxicidad de p88 en mamíferos.....	83
8.2. p88 revierte los defectos de <i>splicing</i> de los transcritos <i>Serca1</i> y <i>Tnnt3</i> en ratones <i>HSA^{LR}</i>	85
8.2. p88 revierte defectos histológicos en el músculo de ratones <i>HSA^{LR}</i>	87
Discusión.....	89
1. La expresión de repeticiones largas del triplete CTG en el cerebro de <i>Drosophila</i> es tóxica.....	91
2. Optimización de un ensayo funcional en <i>Drosophila</i> para el rastreo de moléculas <i>in vivo</i>	93
3. Rastreo de moléculas de actividad conocida: Quimioteca Prestwick.....	95

3.1. Identificación de rutas fisiológicas relacionadas con la toxicidad de (CTG)480 en el cerebro de <i>Drosophila</i>	95
3.1.1. Inhibición de la excitación nerviosa.....	96
3.1.2. Inhibición de la síntesis de prostaglandinas.....	99
3.2. Especificidad de los compuestos identificados.....	100
4. Rastreo de una quimioteca combinatoria de hexapéptidos.....	101
4.1. Características de la quimioteca.....	101
4.2. Identificación de p88: un hexapéptido cuya secuencia alinea con Muscleblind.....	102
4.3. El efecto de p88 sobre la toxicidad de (CTG)480 es específico de secuencia.....	104
5. p88 suprime la toxicidad de las repeticiones CTG en el músculo de modelos de DM1 en <i>Drosophila</i> y ratón.....	105
6. Expresión endógena de p88 en <i>Drosophila</i>	108
7. Estudio del mecanismo de acción de p88.....	110
7.1. p88 no afecta a la expresión de (CTG)480.....	110
7.2. p88 se une a repeticiones CUG con mayor afinidad que a otros ácidos nucleicos	111
7.3. p88 desestabiliza las horquillas de repeticiones CUG.....	112
7.4. p88 no compete con Muscleblind <i>in vitro</i>	114
8. Toxicidad de p88.....	115
9. Potencial de p88 como molécula terapéutica.....	116
Conclusiones.....	119
Materiales y Métodos.....	123
I. Experimentos <i>in vitro</i>	125
1. Materiales.....	125
1.1. Cepas de <i>E. Coli</i>	125
1.2. Cebadores I.....	125
1.3. Kits.....	125
2. Métodos.....	125
2.1. Obtención de la proteína MbIZF.....	125
2.1.1. Clonación de MbIZF.....	125
2.1.1.1. Obtención de ADN genómico a partir de moscas de genotipo silvestre.....	126
2.1.1.2. Clonación de MbIZF en pBlueScript II SK (+/-) y subclonación en p11.....	126
2.1.2. Expresión de la proteína MbIZF.....	129
2.1.3. Purificación de la proteína MbIZF.....	130
2.1.4. Cambios de tampón de la proteína MbIZF.....	130
2.1.4.1. Mediante filtros concentradores.....	130
2.1.4.2. Mediante membranas de diálisis.....	131

2.1.4.3. Mediante columnas PD-10.....	131
2.2. Experimentos de Dicroísmo Circular.....	131
2.2.1. Dicroísmo Circular de proteínas.....	131
2.2.2. Dicroísmo Circular del ARN.....	131
2.2.2.1. Obtención <i>in vitro</i> del ARN CUG(60).....	131
A. Subclonación de CTG(60) en el vector pBlueScript II SK (+/-).....	131
B. Transcripción <i>in vitro</i> de CUG(60).....	132
1.2.2.2. Obtención de espectros	132
2.3. Cromatografía de exclusión molecular.....	132
2.4. Ensayos de Polarización de Fluorescencia (FP).....	132
2.4.1. Ensayo de FP entre la proteína MbIZF y FAM-CUG23.....	133
2.4.2. Ensayos de competencia con sonda no marcada.....	133
2.4.3. Ensayo de FP entre p88 y FAM-CUG23 y competencia con MbIZF.....	133
2.5. Ensayos de Retardo en Gel con sonda fluorescente.....	133
2.5.1. Ensayo de unión de la proteína MbIZF a repeticiones CUG.....	134
2.5.2. Ensayos de unión de p88.....	135
2.5.3. Ensayos de competencia.....	135
2.5.4. Eliminación de Histidinas por digestión con TEV.....	135
2.5.5. Entrecruzamiento con formaldehído.....	135
2.6. Ensayos de extinción de fluorescencia del Triptófano.....	135
2.7. Ensayos de extinción de fluorescencia de la 2-aminopurina.....	136
2.8. Preparación de electroforesis.....	136
2.8.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	136
2.8.2. Electroforesis y detección de proteínas en geles de poliacrilamida Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida.....	136
2.8.2.1. Electroforesis.....	136
2.8.2.2. Tinción con Coomassie.....	137
2.8.2.3. Tinción con plata.....	137
2.8.3. Electroforesis en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida	137
2.8.4. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida.....	138
2.8.5. Electroforesis horizontal no desnaturalizante de proteínas en geles de agarosa.....	138
II. Experimentos en <i>Drosophila melanogaster</i>	139
1. Materiales.....	139
1.1. Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i>	139
2.1.1. Cepas de referencia.....	139
2.1.2. Cepas balanceadoras.....	139

2.1.3. Cepas mutantes.....	139
2.1.4. Líneas UAS.....	139
2.1.5. Líneas Gal4.....	139
2.1.5. Líneas recombinantes.....	140
1.2. Cebadores II.....	140
1.3. Quimiotecas.....	140
1.4. Kits.....	140
2. Métodos.....	141
2.1. Destrucción química de los Cuerpos de Seta.....	141
2.1.1. Administración de Hidroxiurea.....	141
2.1.1. Disección de cerebros de adulto.....	141
2.2. Ensayos de toxicidad.....	141
2.2.1. Toxicidad del DMSO en medio nutritivo instantáneo.....	141
2.2.2. Toxicidad del DMSO en medio nutritivo casero.....	141
2.2.3. Toxicidad del p88 en medio nutritivo casero.....	141
2.3. Rastreo de quimiotecas.....	142
2.3.1. Quimioteca Prestwick.....	142
2.3.2. Quimioteca combinatoria de hexapéptidos.....	142
2.3.2.1. Rastreo primario.....	143
2.3.2.1. Deconvolución.....	143
2.3.2.3. Rastreo de alaninas.....	143
2.4. Cuantificación del efecto de los compuestos sobre la expresión de transgenes.....	143
2.4.1. Cuantificación de la actividad β -Galactosidasa.....	143
2.4.2. Cuantificación de la cantidad de luciferasa.....	144
2.4.3. Cuantificación de los niveles de transcritos (CUG)480 mediante RT-PCR.....	144
2.4.3.1. Extracción de ARN total.....	145
2.4.3.2. Tratamiento con DNasa I y retrotranscripción.....	145
2.4.3.3. Amplificación por PCR del terminador del SV40.....	145
2.5. Análisis morfológico de los ojos.....	146
2.5.1. Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido.....	146
2.5.2. Análisis bajo la lupa y cuantificación del tamaño del ojo.....	146
2.6. Análisis histológico de secciones semifinas de ojo y músculo.....	146
2.7. Generación de moscas transgénicas UAS-p88.....	147
2.7.1. Clonación de p88 en pUAST.....	147
2.7.2. Microinyección y generación de stocks.....	148
2.8. Preparación de medios de cultivo estándar de <i>Drosophila melanogaster</i>	149
III. Experimentos en ratón.....	150

1. Materiales.....	151
1.1. Cepas de ratón.....	151
1.2. Cebadores III.....	151
2. Métodos.....	151
2.1. Anestesia e Inyección de compuestos.....	151
2.2. Eutanasia.....	151
2.3. Ensayos de toxicidad de p88 en ratones salvajes.....	151
2.3.1. Análisis histomorfológico de músculo.....	151
2.3.2. Análisis de sangre.....	151
2.4. Ensayo del efecto de p88 en ratones <i>HSA^{LR}</i>	152
2.4.1. Análisis del <i>splicing</i> alternativo de los transcritos de <i>Serca1</i> y <i>Tnnt3</i>	152
2.4.1.1. Extracción de ARN de músculo y obtención de cDNA.....	152
2.4.1.2. Amplificación por PCR y cuantificación.....	152
2.4.2. Estudio del efecto de p88 a nivel histológico.....	153
Apéndice 1.....	155
Apéndice 2.....	156
Bibliografía.....	157
Anexo.....	171

Introducción

Introducción

1. La Distrofia Miotónica tipo 1: prevalencia y síntomas

La Distrofia Miotónica tipo 1 o enfermedad de Steinert (DM1, OMIM #160900) fue descrita por primera vez en 1909 por el médico alemán Hans Steinert (1875-1911). Se trata de una enfermedad rara, es decir, afecta a menos de 1 cada 2.000 ciudadanos en Europa. No obstante, es el tipo de distrofia muscular más frecuente en la población adulta, afectando tanto a mujeres como a hombres en la misma proporción. Según la Oficina de Enfermedades Raras (ORD) del NIH, la prevalencia mundial de la DM1 es de aproximadamente 1 en 8.000 individuos. En Europa, la prevalencia es de entorno a 1 en 20.000 (datos de la red Europea de enfermedades raras Orphanet), mientras que ésta es menor en los países orientales y apenas hay casos en los pueblos africanos. Sin embargo, es probable que estas cifras sean una subestima de la prevalencia real al ser usuales las formas subclínicas.

La Distrofia Miotónica es una enfermedad neuromuscular cuyos síntomas definitorios afectan principalmente al músculo (Gagnon *et al.*, 2007; Harper, 2001). Estos incluyen miotonía, debilidad y degeneración muscular progresiva (Tabla I1), fundamentalmente a nivel distal en las extremidades inferiores y en los músculos faciales. La miotonía es el principal síntoma distintivo de la DM1 y consiste en la dificultad para relajar la musculatura tras una contracción voluntaria aún después de que el estímulo del músculo haya cesado, dando lugar a una contracción prolongada. Este fenómeno se debe a un defecto en la membrana de las fibras musculares que las mantiene hiperexcitadas. Existen dos posibles causas para dicha hiperexcitación: una reducción en la conductancia del cloro a nivel de la membrana celular o un fallo en la inactivación de canales de sodio. No obstante, el principal motivo de minusvalía de los pacientes no es la miotonía sino la debilidad muscular, la cual les incapacita para llevar a cabo tareas cotidianas. La causa de esta debilidad radica en una degeneración muscular progresiva, lo que se conoce como distrofia. En las primeras fases de la enfermedad, este síntoma afecta tan sólo a la musculatura distal de las extremidades. Sin embargo, conforme avanza, la musculatura proximal puede verse también comprometida. A nivel histológico, es característico de la DM1 la presencia de núcleos centrales en las fibras musculares, así como un aumento en la cantidad de colágeno presente en la matriz extracelular que rodea al tejido. En la mayoría de los pacientes se da, además, hipotrofia de las fibras musculares de tipo I y de manera menos común éstas pueden también sufrir atrofia.

La mayoría de los pacientes con DM1 padece trastornos cardiovasculares, siendo ésta la principal causa de mortalidad. Es frecuente el prolapso de la válvula mitral, así como arritmias

cardíacas causadas por defectos en la conducción de las fibras musculares del corazón. Estas últimas pueden llegar a ser graves y en ocasiones provocar la muerte súbita de los pacientes.

Junto al músculo, el sistema nervioso central (SNC) es otro de los tejidos más afectados por la enfermedad. El cerebro de los pacientes sufre una reducción en su volumen, atrofia cortical y lesiones en la sustancia blanca, aunque hasta la fecha no se ha establecido la relación entre estos defectos y los síntomas neurológicos que presentan los pacientes. Entre dichos síntomas destacan la excesiva somnolencia diurna, déficits cognitivos y trastornos en el comportamiento (Gagnon *et al.*, 2007; Harper, 2001; Tabla I1).

A pesar de que se define como una enfermedad neuromuscular, la DM1 presenta un cuadro clínico multisistémico. Los síntomas de la enfermedad implican a prácticamente todos los órganos y sistemas, siendo las manifestaciones clínicas muy variables entre pacientes. Éstas incluyen cataratas iridiscentes (las cuales aparecen en todos los casos), trastornos digestivos, resistencia a la insulina, calvicie frontal en los varones o esterilidad, entre otras (Gagnon *et al.*, 2007; Harper, 2001; Tabla I1). A nivel serológico, los pacientes muestran altos niveles de creatina kinasa (CK) en sangre, así como bajos niveles de inmunoglobulina G y M (IgG e IgM), causados por un catabolismo acelerado de las mismas (Jensen *et al.*, 1971). Además, también se detectan en sangre marcadores relacionados con el estrés oxidativo, tales como la superóxido dismutasa (SOD) cuyos niveles superan los de los individuos control en un 40% (Toscano *et al.*, 2005).

Tabla I1. Principales síntomas de la Distrofia Miotónica tipo 1

Síntomas Neuromusculares

Miotonía

Debilidad y desgaste progresivo en la musculatura distal

Debilidad de los músculos faciales

Dolor muscular

Síntomas multisistémicos

Arritmias cardíacas

Trastornos digestivos

Resistencia a la insulina

Reducción de las capacidades cognitivas

Excesiva somnolencia diurna

Cataratas

2. Base genética de la Distrofia Miotónica: los loci DM1 y DM2

La Distrofia Miotónica es una enfermedad genética, con un patrón de herencia autosómico dominante, penetrancia alta y expresividad variable. A pesar de su carácter autosómico, en la

mayoría de los casos es la madre la que transmite la enfermedad, siendo los síntomas menos graves cuando la herencia es paterna. En 1992, Brook *et al.* describieron que la base genética de la DM1 radica en la existencia de una mutación dinámica en la región 3' no traducida (3'UTR) del gen *proteína quinasa de la distrofia miotónica* (DMPK, Entrez #1760), localizada en la región cromosómica 19q13.2-q13.3 (Fig. I1) (Brook *et al.*, 1992). Dicha mutación consiste en una expansión anormal de repeticiones del trinucleótido CTG, que en la población sana aparece en número variable de entre 5-35 copias, mientras que en los pacientes se encuentra en número >>50. El número de tripletes CTG correlaciona con la gravedad de los síntomas y edad a la que éstos aparecen (Tabla I2). Así, para los casos en los que el número de repeticiones oscila entre 50 y unos pocos cientos se habla de DM1 de inicio adulto, donde las primeras manifestaciones clínicas suelen aparecer en la segunda década de vida. Para los casos en los que el número de repeticiones es mayor, alcanzando incluso los miles de copias, la patología se manifiesta ya desde el nacimiento en forma de DM congénita (DMC o enfermedad de Thomsen), siendo ésta la variante más grave de la enfermedad, con síntomas como retraso mental, trastornos respiratorios y problemas en la diferenciación muscular, entre otros.

Tabla I2. Correlación entre el número de repeticiones CTG y síntomas en la DM1

Repeticiones	Síntomas clínicos	Edad de aparición
5-35	-	-
50-100	Cataratas Miotonía leve	20-70 años
150-1000	Cataratas Miotonía Cardiopatía Atrofia muscular progresiva Resistencia a la insulina	10-30 años
>1000 ⁽¹⁾	Hipotonía Retraso mental grave Defectos en el desarrollo de la musculatura Problemas respiratorios	0-10 años

⁽¹⁾ Distrofia Miotónica Congénita (DMC)

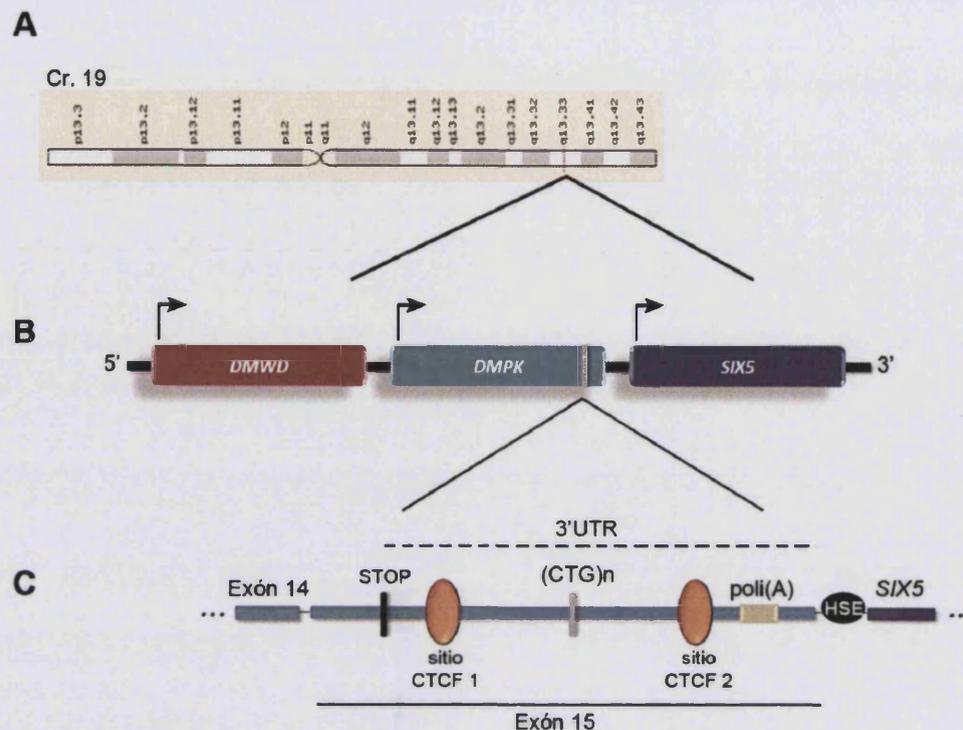


Figura I1. Esquema del locus DM1. El gen *DMPK* se localiza en el cromosoma 19q13.3 (A) flanqueado por los genes *DMWD* y *SIX5* (B). El exón 15 de *DMPK* contiene una secuencia de repeticiones CTG que forma parte de la región 3'UTR del gen. A ambos lados de las repeticiones CTG existen dos sitios de unión de la proteína CTCF, formando parte de un elemento aislador de la cromatina. A tan sólo 300 pb del sitio de poliadenilación (poliA) de *DMPK* se encuentra el codón de inicio de *SIX5*. Entre ambos se localiza un sitio HSE que funciona como activador de la transcripción de *SIX5* (C). En condiciones patológicas, en las que el número de repeticiones es muy alto, la proteína CTCF no puede acceder a sus sitios de unión debido a cambios locales en la estructura de la cromatina. Esto activa la transcripción de la cadena no codificante de *DMPK* por efecto del sitio HSE de *SIX5*.

El gen *DMPK* está formado por 15 exones (Shaw *et al.*, 1993), siendo el exón 15 donde se localizan las repeticiones CTG (Fig. I1). Flanqueando los tripletes, existen dos sitios de unión para la proteína de dedos de zinc CTCF (factor de unión a CCCTC), formando en conjunto lo que se conoce como un elemento aislador de la cromatina. En el locus DM1, el elemento aislador bloquea el efecto de una región intensificadora HSE (del inglés *hypersensitive site enhancer*) del gen adyacente *SIX5* sobre la expresión de *DMPK*. En los casos de DMC, donde el número de repeticiones CTG es muy alto, éstas forman lo que se denomina islotes CpG. Los islotes CpG en DMC están hipermetilados, lo cual altera la conformación local de la cromatina, impidiendo la unión de la proteína CTCF al elemento aislador en el alelo mutante pero no en el salvaje (Cho *et al.*, 2005). Se ha sugerido que esto podría activar la transcripción de *DMPK* por efecto del sitio HSE del gen *SIX5* durante la embriogénesis (Cho & Tapscott, 2007), momento en el cual *SIX5* es más activo (Klesert *et al.*, 2000), dando lugar a niveles elevados de ARNm *DMPK*. En experimentos en cultivo celular y modelos en ratón se ha visto que un incremento en los niveles de expresión de *DMPK* causa defectos en la diferenciación de las células

musculares típicos de DMC. Sin embargo, los niveles de *DMPK* en fetos con DMC están reducidos (Furling *et al.*, 2003). En cambio, en células de pacientes de DMC en cultivo se han encontrado transcritos antisentido del gen *DMPK* (ie, transcritos complementarios a la cadena no codificante). Estos transcritos no codifican ninguna proteína con tramos poliglutamina a pesar de ser portadores de repeticiones CAG (Cho *et al.*, 2005), sino que son procesados para generar fragmentos de ARN de 21 nt que median la metilación de histonas en la cromatina local. Esto sugiere que el papel protector de los sitios CTCF frente al sitio HSE de *SIX5* en condiciones no patológicas es evitar que el gen *DMPK* se transcriba bidireccionalmente. Este fenómeno no ocurre en los casos de DM1 de inicio adulto ni en la población sana, donde el número de repeticiones CTG es menor y los sitios de unión de CTCF no están hipermetilados. Los sitios CTCF se han visto asociados a repeticiones CTG/CAG en otros loci en el genoma (como el locus *SCA8*, donde también se ha detectado expresión bidireccional del gen), lo que sugiere un papel común al conjunto formado por ambos como elementos aisladores en el genoma humano (Cho *et al.*, 2005; Filippova *et al.*, 2001; Moseley *et al.*, 2006).

Los transcritos del gen *DMPK* sufren *splicing* alternativo y codifican una serie de isoformas con actividad serina/treonina kinasa cuya función exacta se desconoce (Timchenko *et al.*, 1995). Las proteínas *DMPK* son homólogas de las kinasas MRCK (o kinasa de unión a Cdc42 relacionada con distrofia miotónica) y ROK/ROCK (o kinasa de Rho) (Kaliman & Llagostera, 2008), las cuales son importantes en la reorganización del citoesqueleto, tráfico intracelular y metabolismo de proteínas en la célula, entre otros. Además, se ha descrito que *DMPK* fosforila a la proteína CUGBP1 *in vitro* (Roberts *et al.*, 1997). CUGBP1 es un factor de unión al ARN implicado en un amplio rango de procesos biológicos como *splicing* alternativo, iniciación de la traducción y degradación del ARN (ver apartado 5.3 de la Introducción). Una incorrecta fosforilación podría ser la causa de la deslocalización intracelular de CUGBP1 observada en pacientes de DM1 y en ratones *knockout* para *Dmpk* (Roberts *et al.*, 1997). Al menos dos isoformas *DMPK* han sido detectadas, la más abundante tiene un peso molecular de aproximadamente 80 kDa y se expresa casi exclusivamente en el músculo esquelético, mientras que una segunda isoforma de 71 kDa se expresa en las células Purkinje del corazón (Maeda *et al.*, 1995). En el corazón, *DMPK* se encuentra en grandes cantidades en el retículo sarcoplásmico (Kaliman *et al.*, 2005) donde colocaliza con fosfolamban (con quien además interacciona físicamente y a quien posiblemente fosforila) y el receptor de la rianodina, lo que sugiere una función de *DMPK* en el metabolismo del calcio en los cardiomiocitos. Esto podría explicar la disfunción ventricular que sufren los pacientes. Por último, *DMPK* parece ser un regulador positivo de la actividad de la insulina en el músculo esquelético (Llagostera *et al.*, 2007). De manera interesante, la señalización por insulina en este tejido, pero no en otros donde *DMPK* no se expresa, es deficiente en los pacientes. No obstante, el papel de las

proteínas DMPK en el desarrollo de la enfermedad sigue siendo en la actualidad objeto de estudio.

En 1994, Thornton *et al.* describieron tres casos de pacientes con manifestaciones clínicas típicas de la DM1 pero con un número no patológico de repeticiones CTG en el gen *DMPK* (Thornton, Griggs *et al.*, 1994). En el año 2001, Liquori *et al.* encontraron una segunda mutación localizada en el cromosoma 3q21.3 (Liquori *et al.*, 2001). Ésta consistía en una expansión de repeticiones CCTG en el intrón 1 del gen *ZNF9* (*proteína de dedos de zinc 9*, Entrez #7555). A la patología causada por esta segunda mutación se le dio el nombre de DM2 o PROMM (OMIM #602668) y constituye el 2% de todos los casos diagnosticados como Distrofia Miotónica, con una prevalencia en Europa de 1 en 100.000. El rango patológico de repeticiones CCTG en DM2 oscila entre 75 y 11.000, con una media de aproximadamente 5.000. En general, los síntomas de la DM1 y la DM2 son similares, aunque éstos suelen ser más leves en los pacientes de DM2, la cual carece de forma congénita. La principal diferencia entre ambas enfermedades radica en que mientras la DM2 afecta principalmente a la musculatura proximal, la DM1 se manifiesta predominantemente sobre la musculatura distal.

El gen *ZNF9* está formado por 5 exones. El intrón 1 del gen contiene un motivo complejo formado por tres tramos repetitivos compuestos en condiciones no patológicas por la siguiente secuencia: (TG)_{n₁₄₋₂₅}(TCTG)_{n₄₋₁₁}(CCTG)_{n₁₁₋₂₆}, (Fig. I2). El tamaño de cada una de estas repeticiones es polimórfico, aunque sólo las repeticiones CCTG pueden expandirse y causar DM2. La secuencia CCTG, además, suele tener interrupciones puntuales (entre 0 y 2) que pueden dar lugar a GCTC y/o TCTG tanto en la población sana como en los pacientes (Liquori *et al.*, 2001).

ZNF9 codifica dos isoformas distintas por *splicing* alternativo (*ZNF9-α* y *ZNF9-β*). Ambas isoformas tienen un peso molecular de aproximadamente 19 kDa y contienen 7 dedos de zinc del tipo CCHC altamente conservados. Las proteínas *ZNF9* se expresan en varios tejidos, aunque predominan en el músculo esquelético y corazón (W. Chen *et al.*, 2007). La función de dichas proteínas es desconocida, pero se piensa que podrían regular la traducción de transcritos que codifican componentes ribosómicos (como la proteína RPS17) y otros factores implicados en la síntesis de proteínas (como las proteínas PABP1, eEF1A y eEF2), ya que se sabe que *ZNF9* interacciona con la región 5'UTR de sus mensajeros. Además, la sobreexpresión de *ZNF9* en mioblastos de pacientes en cultivo corrige la reducción en la tasa de síntesis proteica observada en DM2 (Huichalaf *et al.*, 2009).

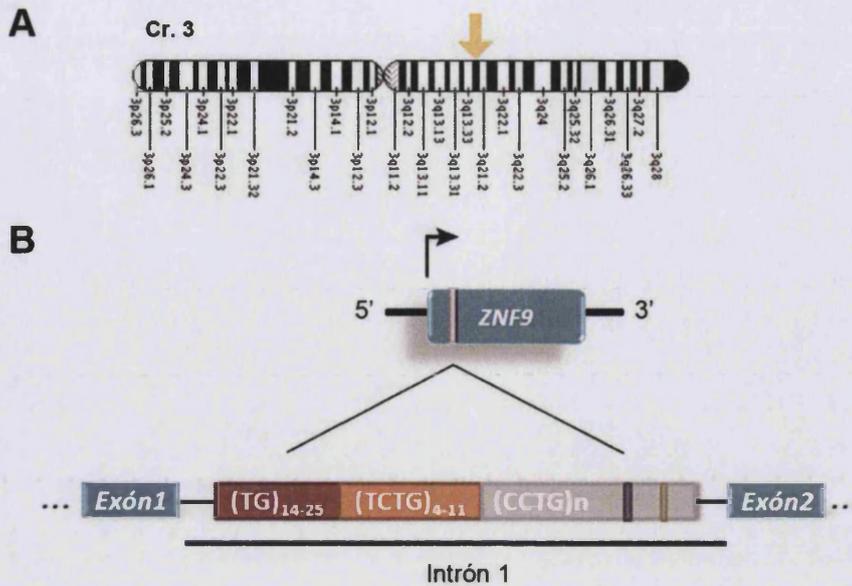


Figura I2. Esquema del locus DM2. (A) El gen *ZNF9* se localiza en la banda cromosómica 3q21. (B) El primer intrón del gen contiene un motivo complejo formado por repeticiones en tándem de la secuencia (TG)_n (TCTG)_n (CCTG)_n. En la población sana el número de repeticiones CCTC oscila entre 11 y 26, mientras que en los pacientes de DM2 varía entre 75 y 11.000.

3. Anticipación genética e inestabilidad somática: mecanismos de expansión de las repeticiones CTG

La expansión de secuencias repetitivas cortas en genes concretos es la causa de al menos 40 enfermedades humanas (Pearson *et al.*, 2005), 17 de las cuales se han asociado con repeticiones de tripletes CTG/CAG (Fig. 13). En la DM1, el número de repeticiones CTG, y por consiguiente la gravedad de los síntomas, aumenta de generación en generación. Asimismo, la edad de aparición, que es altamente variable, desciende con las sucesivas generaciones. Este fenómeno se conoce como anticipación genética y ocurre por la inestabilidad de secuencias repetitivas cortas en las células de la línea germinal de los progenitores. Así, durante la gametogénesis el número de tripletes puede aumentar o, en ocasiones, disminuir. Un ligero aumento en el tamaño de las repeticiones puede no llegar a provocar la enfermedad en los descendientes. Sin embargo, con el paso de las generaciones, éste puede superar el valor umbral patológico. En el caso de la DM1, los alelos portadores de 100 repeticiones o menos suelen generarse en la línea germinal masculina. Los alelos de 200-600 repeticiones pueden generarse en la madre y en ocasiones también en el padre, pero los alelos de >600 repeticiones tan sólo se heredan por vía materna, lo cual explica que las formas más graves de la enfermedad se transmitan exclusivamente a través de la madre (Dean *et al.*, 2006; Pearson, 2003). Por el contrario, en el caso de las enfermedades causadas por repeticiones CAG, como la enfermedad de Huntington (HD, OMIM #143100), es en la línea germinal masculina donde

se genera el mayor número de repeticiones. La causa por la cual esto ocurre no se conoce con certeza. Se ha propuesto que las repeticiones se vuelven inestables debido a fallos relacionados con la recombinación meiótica, replicación y reparación del ADN durante la gametogénesis, en puntos que difieren entre la línea germinal masculina y femenina (De Temmerman *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 1994; Martorell *et al.*, 1997; Pearson *et al.*, 2005).

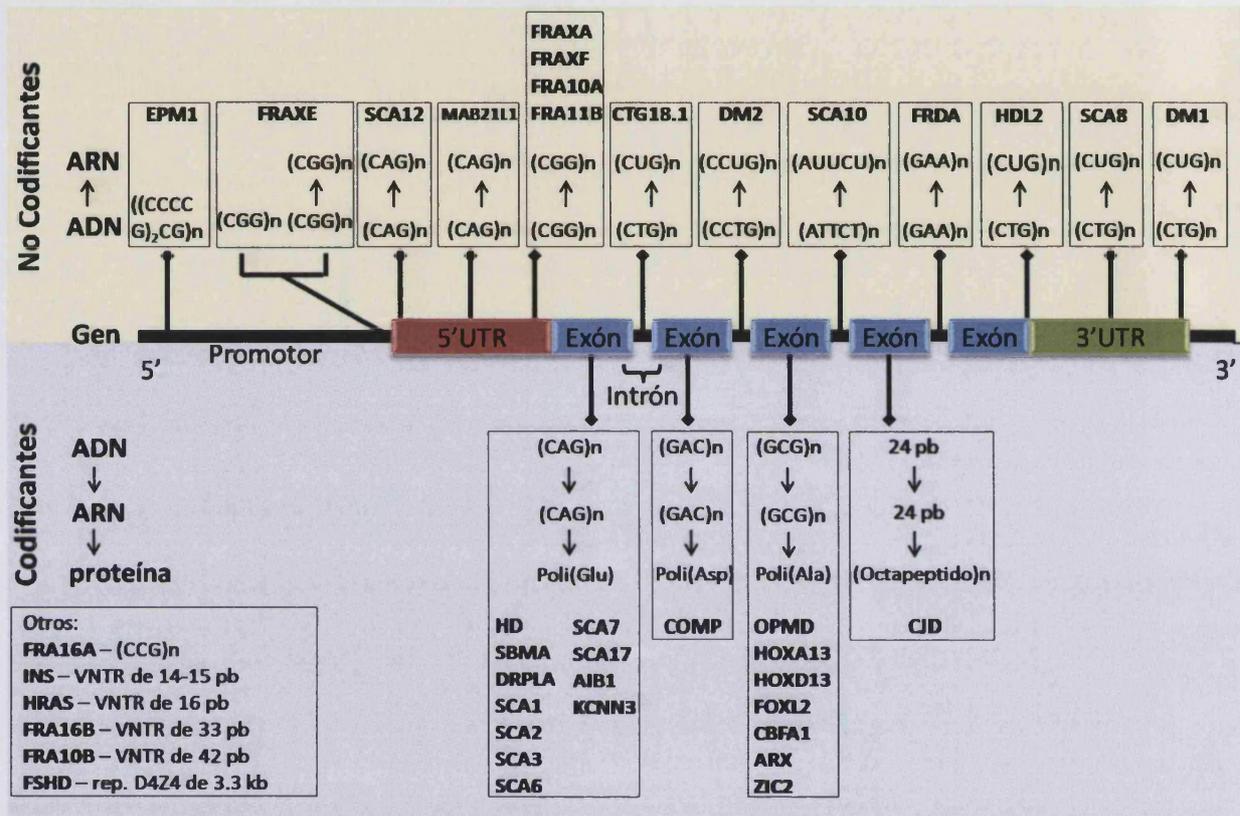


Figura 13. Localización génica de los distintos tipos de repeticiones asociadas a patologías en humanos. Las expansiones de repeticiones pueden encontrarse tanto en regiones no codificantes (parte superior de la figura), como en regiones codificantes (parte inferior). Para cada caso se muestra la secuencia de ARN, ADN y aminoácidos que se repite, así como el nombre de la patología que originan (en negrita). El recuadro 'Otros' incluye repeticiones para las cuales no se ha determinado su localización génica. CJD, enfermedad de Creutzfeld-Jakob; DRPLA, Atrofia Dentatorubral-pallidolusiana; EPM1, Epilepsia Progresiva Monoclónica; FDRA, Ataxia de Friederich; FRA/FRAX, diferentes sitios frágiles; FSHD, Distrofia Muscular Facioescapulohumeral; HD, enfermedad de Huntington; HDL2, enfermedad de Huntington tipo 2; DM, Distrofia Miotónica; OPMD, Distrofia Muscular Oculofaríngea; SBMA, Atrofia Muscular Espinobulbar; SCA, Ataxia Espinocerebelar; VNTR, repeticiones en tándem de número variable.

El fenómeno de anticipación genética no ocurre en todos los casos de enfermedades causadas por expansión de repeticiones. En la DM2 el número de repeticiones CCTG no correlaciona con la gravedad de los síntomas, por lo que los cambios intergeneracionales en la longitud de la expansión no afectan al grado de manifestación de la enfermedad. La Atrofia Muscular Espinobulbar (SBMA, OMIM #313200) o enfermedad de Kennedy es una enfermedad

recesiva ligada al cromosoma X causada por una expansión de repeticiones CAG en el gen *receptor de andrógenos* (AR), y tampoco sufre anticipación genética (La Spada *et al.*, 1992). El hecho de que existan drásticas diferencias en la tasa de inestabilidad intergeneracional de repeticiones CTG/CAG en función del locus en el que éstas se encuentren sugiere la existencia de elementos actuando en cis sobre el ADN.

Además de la inestabilidad de las repeticiones en la línea germinal existe en los pacientes lo que se conoce como inestabilidad somática, es decir, el número de tripletes puede aumentar en las células de un mismo individuo a lo largo de su vida, lo que hace que los síntomas empeoren con el tiempo. Este fenómeno comienza durante la semana trece de gestación y se mantiene prácticamente toda la vida del individuo (Martorell *et al.*, 1997). Además, el tamaño de las repeticiones también difiere de manera notable de unos tejidos a otros en un mismo paciente. Los tejidos que sufren mayor inestabilidad son el sistema linfático, hígado, páncreas, riñón, cerebro, músculo esquelético y corazón (Kinoshita *et al.*, 1996; Lavedan *et al.*, 1993; Shelbourne *et al.*, 1992). En el caso de la DM1 el músculo esquelético es el tejido más afectado, pudiendo un paciente adulto presentar un número de repeticiones 1.000-2.000 veces mayor en las fibras musculares que en sus leucocitos (Thornton, Johnson *et al.*, 1994). En contraste con la DM1, los pacientes de Huntington tienen pocas diferencias en el número de repeticiones entre tejidos. Asimismo, apenas se ha visto inestabilidad en células en cultivo de pacientes con SBMA, HD, o Síndrome del X Frágil (FRAXA, OMIM #300624) (Benitez *et al.*, 1995; Spiegel *et al.*, 1996; Wohrle *et al.*, 1996). Por tanto, en el caso de la inestabilidad somática existen tanto factores en trans dependientes de elementos espacio-temporales concretos como factores en cis específicos de gen.

El mecanismo molecular por el cual las repeticiones se vuelven inestables a partir de un umbral y comienzan a expandirse es en la actualidad objeto de debate. Hasta la fecha se ha llevado a cabo una gran cantidad de estudios en diferentes sistemas modelo como bacterias, levaduras, moscas, células de mamífero o ratón, con resultados dispares. El efecto de los factores en cis sobre la inestabilidad de microsatélites es uno de los procesos más estudiados. En cuatro de los loci asociados a enfermedades para las que se sabe que ocurre anticipación genética existen sitios CTCF adyacentes a las repeticiones. La Ataxia Espinocerebelar 7 (OMIM #164500) está causada por una expansión de repeticiones CAG en la zona codificante del gen *ataxin-7* (ATXN7, Entrez #6314). Al igual que en la DM1, las repeticiones CAG en la SCA7 forman parte de un elemento aislador de la cromatina junto a sitios de unión de CTCF que las flanquean. En 2003, Libby *et al.* descubrieron que mutando los sitios CTCF del locus SCA7 en modelos en ratón aumentaba tanto la inestabilidad somática como germinal. Además, este efecto se potenciaba si se favorecía la hipermetilación de los islotes CpG, demostrando que existe un papel epigenético en ambos mecanismos de inestabilidad (Libby *et al.*, 2003).

Otros mecanismos que se han relacionado con la expansión de repeticiones implican a procesos como la replicación, la transcripción, la recombinación y la reparación del ADN. Dichos procesos se verían afectados por la formación de estructuras inusuales en el ADN a nivel de las repeticiones (Fig. I4).

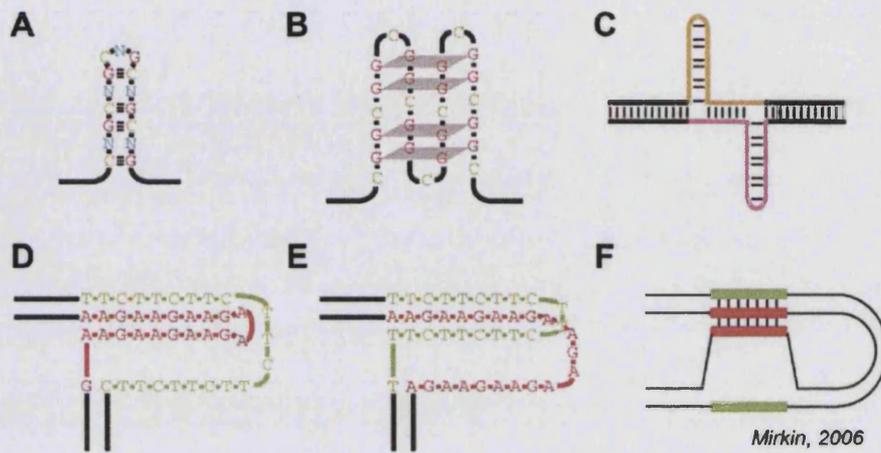


Figura I4. Posibles estructuras adoptadas por las repeticiones. (A) Horquillas imperfectas formadas por repeticiones (CNG) n . (B) Cuartetos de guanina compuestos por repeticiones (CGG) n . (C) Deslizamiento de las cadenas del ADN. (D-F) Posibles triplexes formados a partir de repeticiones (GAA) n .

En 2006, Mirkin formuló un modelo en el que sugería que la inestabilidad tiene lugar durante la síntesis de la cadena retrasada en la replicación. Esta hipótesis propone que la presencia de repeticiones da lugar a deslizamientos entre las hebras de ADN. Cuando esto ocurra en un fragmento de Okazaki en síntesis dará lugar a una cadena con un número mayor de repeticiones que la original (Fig. I5A), mientras que si ocurre en la hebra molde la molécula resultante tendrá un número de tripletes menor (Fig. I5B). La replicación y la reparación del ADN son dos procesos estrechamente relacionados. El sistema MMR de reparación del ADN (del inglés, *mismatch repair*) corrige errores durante la replicación. Se sabe que una falta de actividad MMR incrementa la tasa de mutación, siendo la inestabilidad de microsatélites una característica de la deficiencia de este sistema. Las proteínas con actividad MMR MSH2 y MSH3 forman el denominado complejo MutS β , implicado en la reparación de inserciones y deleciones. Las proteínas de este complejo se unen a horquillas de repeticiones, lo que bloquea su actividad ATPasa, comprometiendo su función reparadora (Owen *et al.*, 2005; Tome *et al.*, 2009). Lopez *et al.* demostraron en *Drosophila* la importancia de estas proteínas *in vivo*, utilizando una cepa mutante para el gen *msh2*. La descendencia de estas moscas mostraba expansiones de regiones repetitivas del genoma de *Drosophila* en tan sólo una generación (Lopez *et al.*, 2002). Otros modelos proponen, sin embargo, que los procesos de reparación del ADN contribuyen de manera activa a la inestabilidad de los tripletes (revisado en (Lahue & Slater, 2003). La idea de los mecanismos de reparación como agentes promutágenos, aunque contraintuitiva, posee apoyo experimental. Tomé *et al.* cruzaron ratones modelo de DM1 (portadores de repeticiones CTG-CAG) con ratones mutantes *Msh2* (en los que la proteína Msh2 mantenía su capacidad de unión al ADN pero carecía de actividad

ATPasa). En la descendencia de estos animales no se observaron expansiones, sugiriendo que para que las repeticiones se expandan es necesario un sistema MMR funcional.

La inestabilidad somática no es exclusiva de células en división, sino que se ha observado también en tejidos postmitóticos como el cerebro o el músculo esquelético. En este caso, el mecanismo de expansión implicaría la formación de estructuras secundarias durante procesos de reparación del ADN asociados al mantenimiento del genoma (Mirkin, 2006) (Fig. 15C). Existen, además, estudios que indican que la transcripción del ADN a ARN juega un papel crítico en la inestabilidad de repeticiones *in vivo*, aportando una base mecánica adicional para la inestabilidad observada en neuronas y células musculares. En un modelo de Ataxia Espinocerebelar 3 (SCA3, OMIM #109150) en *Drosophila*, Jung y Bonini demostraron la aparición de expansiones intergeneracionales al activar la expresión de las repeticiones CAG en la línea germinal (Jung & Bonini, 2007). Dichas expansiones no se detectaban en la descendencia de moscas en las que el transgén no se transcribía. Además, los autores demostraron la implicación del sistema de reparación por escisión de nucleótidos acoplado a transcripción TC-NER (del inglés *transcription-coupled nucleotide excision repair*), al observar que la tasa de expansión era menor en un fondo mutante para la endonucleasa Mus201.

En conjunto, los datos disponibles hasta la fecha sugieren que tanto la inestabilidad somática como germinal dependen de factores en cis que afectan de manera distinta a genes diferentes, así como de factores en trans específicos de tejido. En este contexto, los mecanismos de reparación del ADN jugarían un papel crítico en la generación de expansiones durante procesos celulares como la replicación, la transcripción y el mantenimiento del genoma.

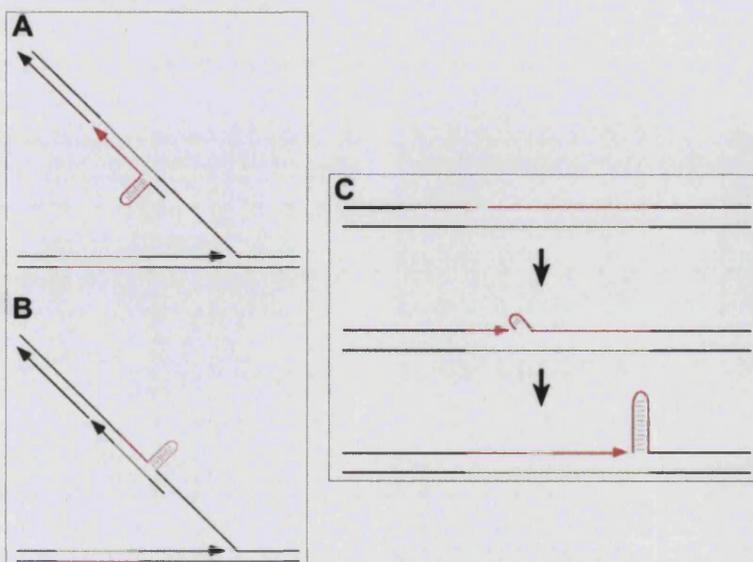


Figura 15. Posibles mecanismos de inestabilidad de las repeticiones. En células en replicación la formación de horquillas en la cadena retrasada en síntesis daría lugar a expansiones de la secuencia repetida (A). Por el contrario, la presencia de horquillas en la cadena molde originaría contracciones (B). Para el caso de tejidos donde no ocurre replicación, radicales oxidantes y otros agentes podrían generar lesiones en el ADN (C, arriba). Si esto ocurriese en una región de repeticiones éstas podrían deslizarse para formar una horquilla (C, medio) que originaría una expansión cuando la cadena fuese reparada (C, abajo). Figura tomada de (Mirkin, 2006).

4. Modelos del mecanismo molecular de patogénesis en la DM1

De las 40 mutaciones patológicas diferentes debidas a expansiones de microsatélites, al menos 15 se encuentran en regiones no codificantes de genes (Fig. I3). El mecanismo molecular por el cual una mutación en una secuencia no traducida de un gen es capaz de originar patologías tan complejas como la DM1, en la mayoría de casos de forma dominante, sigue siendo en la actualidad objeto de debate. En los últimos años, se han propuesto una serie de hipótesis, no necesariamente excluyentes, las cuales se discuten a continuación y se resumen en la Fig. I10.

4.1. Modelo de haploinsuficiencia de DMPK

Los transcritos *DMPK* mutantes, procesados y poliadenilados, son retenidos en el núcleo formando grandes inclusiones ribonucleares (Taneja *et al.*, 1995) (Fig. I6A-B). Estos transcritos no entran en los denominados *speckles* o motas nucleares (compartimentos no membranosos implicados en el procesado y posterior exportación de mensajeros al citoplasma), sino que se acumulan formando agregados en su periferia (Holt *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007) (Fig. I6C-D). El bloqueo en el transporte de los mensajeros mutantes al citoplasma ocurre en la DM1 pero no en DM2, ya que en la DM2 las repeticiones CCTG se encuentran en un intrón. Este intrón es procesado y retenido en el núcleo formando inclusiones al igual que en la DM1, pero los transcritos *ZNF9* maduros son exportados al citoplasma y traducidos con normalidad (Botta *et al.*, 2006; Margolis *et al.*, 2006). En la DM2, el intrón retenido se distribuye de manera uniforme en el nucleoplasma y no se acumula alrededor de los *speckles*. Sin embargo, los síntomas de la DM1 y la DM2 son muy similares, por lo que el hecho de que los transcritos *DMPK* mutantes se localicen en su periferia no parece contribuir de manera significativa al desarrollo de la patología.

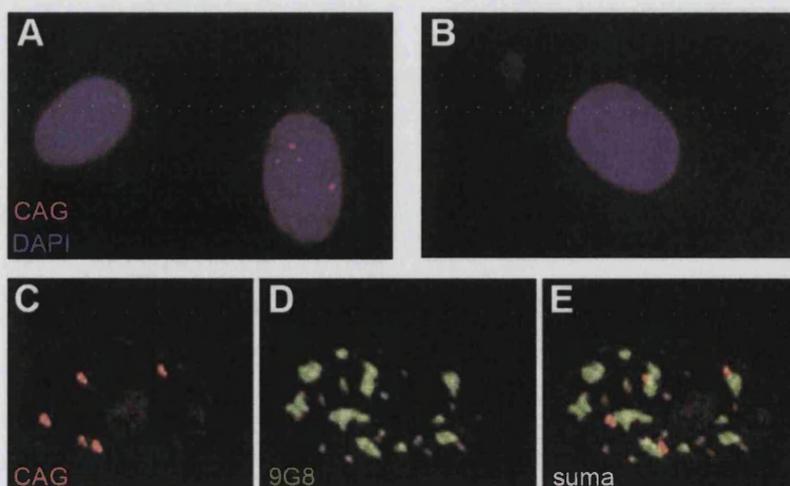


Figura I6. Los transcritos *DMPK* mutantes forman inclusiones nucleares. (A-B) Los transcritos *DMPK* se acumulan en el núcleo de fibroblastos de pacientes de DM1 (A) pero no en los individuos sanos (B). (C-D) Mioblastos de pacientes con DM1 en los que los transcritos *DMPK* se detectan en la periferia de los *speckles*, marcados éstos con un anticuerpo específico contra el factor de *splicing* 9G8. Imágenes A-B tomadas de Taneja *et al.*, 1995. Imágenes C-E tomadas de Holt *et al.*, 2007.

No obstante, el bloqueo en el transporte al citoplasma de los transcritos *DMPK* mutantes llevó a proponer que una disminución en los niveles de *DMPK* podría ser la causa de al menos parte de los síntomas en la DM1. La mayoría de estudios iniciales mostraban niveles de ARNm y proteína reducidos tanto en pacientes como en células en cultivo (Fu *et al.*, 1993; Koga *et al.*, 1994; Novelli *et al.*, 1993; Salvatori *et al.*, 2005). Sin embargo, estudios posteriores pusieron de manifiesto una situación más compleja. En 1995, Krahe *et al.* detectaron niveles del alelo mutante reducidos respecto al alelo salvaje en el músculo esquelético y líneas celulares de pacientes, de manera proporcional al tamaño de las repeticiones. Sin embargo, esta reducción sólo afectaba a los transcritos procesados y no a los transcritos inmaduros, sugiriendo un efecto de las repeticiones CUG a nivel post-transcripcional (Krahe *et al.*, 1995). Ya que los transcritos *DMPK* mutantes maduros se acumulan en agregados en el núcleo, algunos autores argumentan que su detección se ve dificultada, lo cual explicaría los bajos niveles observados. Utilizando nuevos reactivos más específicos, Narang *et al.* encontraron no sólo que los niveles de proteína *DMPK* no están reducidos en los pacientes de DM1, sino que ésta se detecta 1.2-1.6 veces más que en los individuos sanos, mientras que en DMC los niveles están sólo ligeramente disminuidos (Narang *et al.*, 2000). En conjunto, estos datos argumentan en contra de la haploinsuficiencia de *DMPK* como posible causa de la enfermedad.

Por otro lado, los ratones *knockout* de *Dmpk* tan sólo padecen miopatía tardía muy suave que no es característica de la DM1 (Jansen *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996), así como defectos en la conducción cardíaca (Berul *et al.*, 2000; Pall *et al.*, 2003) e intolerancia a la glucosa (Llagostera *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que *DMPK* podría contribuir a la sintomatología cardíaca y la resistencia a la insulina típicas de la DM1, pero una reducción en la función de este gen no es la causa principal del cuadro multisistémico de los pacientes. De acuerdo con esta idea, no se han encontrado mutaciones puntuales en el gen *DMPK* responsables de la DM1.

4.2. Modelo del efecto local sobre la cromatina

El gen *DMPK* se encuentra flanqueado en 3' y 5' por los genes *SIX5* (Entrez #147912) y *DMWD* (Entrez #1762), respectivamente (Fig. 11). Algunos trabajos muestran que la expresión de ambos genes está reducida en los pacientes de DM1, probablemente debido a cambios en la estructura local de la cromatina originados por la expansión de repeticiones CTG (Alwazzan *et al.*, 1999; Klesert *et al.*, 1997; Thornton *et al.*, 1997; Westerlaken *et al.*, 2003). Esto llevó a sugerir que el efecto sobre la expresión de genes vecinos podría contribuir a explicar síntomas de la enfermedad independientes de *DMPK*.

En los pacientes de DM1, la expresión del alelo de *SIX5* adyacente al alelo mutante de *DMPK* está reducida un 20-60%, pero no así la expresión del alelo contiguo al alelo *DMPK*

salvaje (Thornton *et al.*, 1997). El gen *SIX5* es miembro de la familia de genes *SIX*, los cuales codifican proteínas que contienen un dominio *SIX* junto a un homeodominio. Los genes *SIX* son homólogos del gen *sine oculis (so)* de *Drosophila*, implicado en el desarrollo del ojo en mosca. Al igual que su homólogo en *Drosophila*, *SIX5* también se expresa en estructuras oculares, como la cornea, el epitelio de la lente y los fotorreceptores de la retina, entre otros. Los ratones *knockout* de *Six5* desarrollan cataratas, además de problemas en la conducción cardíaca y atrofia testicular (Sarkar *et al.*, 2000). Originalmente, se propuso que la falta de *SIX5* podría ser responsable de las cataratas observadas en los pacientes. No obstante, éstos desarrollan un tipo de catarata muy característico denominado subcapular posterior, el cual otorga un aspecto iridiscente al ojo cuando se ilumina con una lámpara. El tipo de cataratas desarrollado por los ratones *knockout* de *Six5* no coincide con el desarrollado por los pacientes de DM1.

El gen *DMWD* se expresa predominantemente en los testículos y el cerebro. En los pacientes de DM1 los niveles de transcritos *DMWD* están reducidos, lo cual se ha relacionado con síntomas como la esterilidad y los defectos neurológicos (Westerlaken *et al.*, 2003). Sin embargo, esta reducción tan sólo afecta a la fracción citoplásmica y no a la nuclear. Esto indica que la transcripción del gen no está alterada, descartando un efecto de la cromatina sobre su expresión (Alwazzan *et al.*, 1999). Puesto que los sitios de terminación de la transcripción del gen *DMWD* no han sido mapeados con exactitud, se ha propuesto que *DMWD* y *DMPK* podrían transcribirse como un único transcrito fusionado, incluyendo éste parte de las repeticiones CUG. De esta manera, los transcritos *DMWD* quedarían retenidos en el núcleo, al igual que *DMPK* (Alwazzan *et al.*, 1999).

4.3. Ganancia de función tóxica del ARN

El hecho de que existan patologías causadas por la expansión de repeticiones en regiones no codificantes de genes distintos que originan síntomas similares (p.e., DM1 y DM2) llevó a proponer un mecanismo común a todas ellas basado en una posible toxicidad del ARN. Según esta hipótesis, los ARNs portadores de repeticiones podrían interferir con el procesado de sus propios transcritos, de transcritos diferentes o con proteínas de unión al ARN, lo que se conoce como ganancia de función del ARN. Un apoyo decisivo para esta hipótesis proviene del trabajo de Mankodi *et al.* en ratones transgénicos, los cuales expresando una expansión del trinucleótido CUG en un ARNm heterólogo consiguieron que estos animales desarrollasen miotonía y defectos musculares típicos de la DM1, demostrando que las repeticiones CUG ejercen un efecto tóxico por sí mismas (Mankodi *et al.*, 2000). Posteriormente, otros modelos generados en *Drosophila* confirmaron la toxicidad de las repeticiones CUG independientemente de *DMPK* (de Haro *et al.*, 2006; Garcia-Lopez *et al.*, 2008).

En el núcleo, los ARNs portadores de repeticiones CUG se pliegan formando una estructura en horquilla capaz de unir y secuestrar factores de unión al ARN de doble cadena, formando grandes inclusiones ribonucleoproteicas (Michalowski *et al.*, 1999; Mooers *et al.*, 2005). Hasta la fecha, se ha descrito que las repeticiones CUG interfieren con la actividad de un número creciente de proteínas nucleares, las cuales incluyen factores de transcripción y factores de *splicing* alternativo, así como con microARNs en el citoplasma.

4.3.1. Secuestro de factores de transcripción

El secuestro de factores nucleares impide a dichas proteínas realizar sus funciones normales en la célula. Se han aislado y caracterizado varias proteínas capaces de unirse a horquillas CUG de doble cadena tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre ellas destacan factores de transcripción como la proteína de especificidad 1 (Sp1), el receptor gamma del ácido retinoico (RAR γ) o los miembros de la familia de transductores de señal y activadores de la transcripción STAT1 y STAT3 (Ebraldze *et al.*, 2004). Algunos de estos factores pueden llegar a sufrir un secuestro de hasta el 90% en células en cultivo, lo cual les impide activar la transcripción de sus genes diana, disminuyendo así su expresión. Entre dichos genes se encuentra el *canal de cloro tipo 1 (CLC-1)* específico de músculo, diana del factor de transcripción Sp1. Este gen codifica un canal de cloro que se localiza en la membrana de las fibras musculares, participando en la propagación de potenciales de acción. La falta de CLC-1 es la responsable de la miotonía en los pacientes, tanto en la DM1 como en DM2.

Otros factores de transcripción alterados en la DM1 son NKX2-5 y MyoD (Amack *et al.*, 2002; Yadava *et al.*, 2008). Estas proteínas están relacionadas con el desarrollo y conducción cardíaca, y con la diferenciación de mioblastos, respectivamente. Los niveles de NKX2-5 están aumentados en los pacientes, mientras que MyoD está reducida. El motivo por el cual los niveles de estos factores de transcripción están desregulados, así como su relación con la formación de horquillas CUG, se desconoce.

Hasta la fecha varios trabajos han demostrado que las repeticiones CUG afectan a la expresión de un gran número de genes (Tabla I3). Utilizando *microarrays* de ratón, varios autores han detectado al menos 175 transcritos musculares alterados por la expresión de transcritos CUG expandidos (Du *et al.*; Osborne *et al.*, 2009). Botta *et al.* analizaron los perfiles de expresión de 96 genes relacionados con la función nerviosa a partir de biopsias de pacientes de DM1 y DM2. Al menos seis de estos genes presentaban niveles alterados en ambos casos, lo cual apoya la idea de un mecanismo de patogénesis común a ambas enfermedades (Botta *et al.*, 2007). Sin embargo, para muchos de estos genes se desconoce si existe una relación entre el secuestro de factores de transcripción descrito para la DM1 y los cambios observados en sus niveles de expresión.

Tabla 13. Ejemplos de genes con expresión reducida por expresión de expansiones CUG

Gen	Función	Ref.
<i>serina peptidasa HtrA 1</i>	Señalización por IGF	(Osborne et al., 2009)
<i>Caspasa 12</i>	Apoptosis	(Osborne et al., 2009)
<i>Dickkopf homólogo 3</i>	Señalización por Wnt	(Osborne et al., 2009)
<i>Solute carrier family 38, member 4</i>	Transportador de aminoácidos	(Osborne et al., 2009)
<i>Mindbomb homólogo 1</i>	Señalización por Notch	(Osborne et al., 2009)
<i>Gdap1</i>	Fisión mitocondrial	(Osborne et al., 2009)
<i>Gremlin 2 homólogo</i>	Señalización por BMP	(Osborne et al., 2009)
<i>Tiam1</i>	Función de microtúbulos, receptor	(Osborne et al., 2009)
<i>Fosfolipasa A2, grupo VII</i>	Respuesta inflamatoria	(Osborne et al., 2009)
<i>canal de potasio Kcnab1</i>	Canal iónico	(Osborne et al., 2009)
<i>CLC-1</i>	Canal iónico	(Ebralidze et al., 2004)
<i>Sp1</i>	Factor transcripción	(Ebralidze et al., 2004)
<i>Sp3</i>	Factor transcripción	(Ebralidze et al., 2004)
<i>RARγ</i>	Factor transcripción	(Ebralidze et al., 2004)
<i>SIX5</i>	Factor de transcripción	(Thornton et al., 1997)
<i>MyoD</i>	Diferenciación de mioblastos	(Amack et al., 2002)

4.3.2. Secuestro de factores de splicing alternativo

Además de factores de transcripción, las repeticiones CUG (y CCUG) secuestran factores que participan en el *splicing* alternativo de mensajeros. Entre éstos se encuentran las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares hnRNP F y hnRNP H (Jiang *et al.*, 2004; D. H. Kim *et al.*, 2005), así como las proteínas de la familia Muscleblind MBNL1-3 (del inglés *Muscleblind-like proteins 1-3*) (Fardaei *et al.*, 2002; Kino *et al.*, 2004; Mankodi *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2000) (Fig. 17).

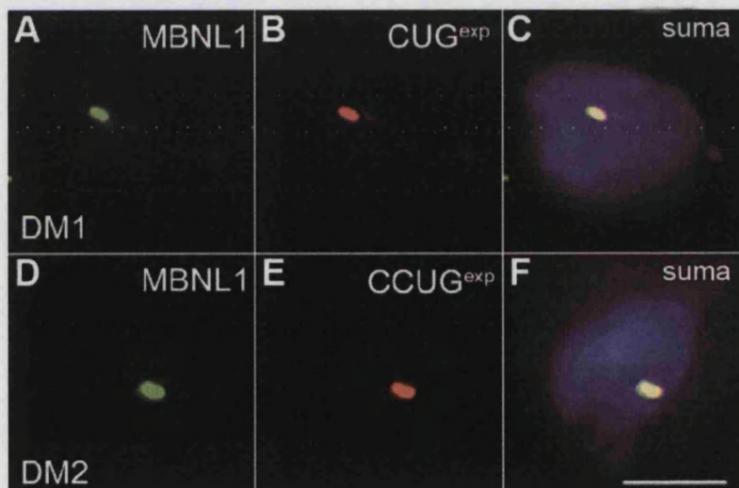


Figura 17. Secuestro de MBNL1 en inclusiones nucleares de repeticiones CUG. La figura muestra secciones transversales de músculo esquelético de pacientes con DM1 (A-C) y DM2 (D-F). En ambos casos la proteína MBNL1 se muestra en verde (A, D) y los ARN CUG expandidos en rojo (B, E). Ambas señales colocalizan en el núcleo (C, F; amarillo), contrastado con DAPI (azul). Figura tomada de (Osborne & Thornton, 2006).

Debido a este secuestro, los pacientes presentan alteraciones en el procesado alternativo de al menos 156 transcritos (Tabla I4 y Du *et al.*, 2009), lo que llevó a acuñar el término de *esplíceopatía*, para el cual la Distrofia Miotónica es el primer ejemplo descrito. Todos los sucesos de *splicing* alterados que se han encontrado hasta la fecha consisten en la presencia de variantes propias de estadios embrionarios del desarrollo en lugar de las isoformas adultas (Lin *et al.*, 2006). Uno de los transcritos más estudiado es el del *canal de cloro tipo 1, CLC-1*. Durante el procesado de estos mensajeros en los pacientes éstos incorporan el exón 7a, el cual contiene un codón de parada prematuro que da lugar a una proteína truncada (Charlet-B *et al.*, 2002; Mankodi *et al.*, 2002). En la población sana esta variante truncada tan sólo está presente en el feto, mientras que en los pacientes se mantiene a lo largo de toda la vida. La proteína CLC-1 truncada no sólo no es funcional, sino que se ha propuesto que actúa como una forma dominante negativa sobre las formas procesadas correctamente. Además, los transcritos que incluyen el exón 7a están sujetos a degradación por la vía NMD (del inglés *nonsense-mediated mRNA decay*). Este hecho, sumado a la disminución en la tasa de transcripción del gen observada por Ebralidze *et al.*, provoca una reducción en la conductancia al cloro, causando una despolarización y desestabilización de los potenciales de membrana en las fibras musculares, lo que desencadena miotonía. Otros transcritos alterados en la DM1 son los del gen del *receptor de la insulina, IR*, cuyo procesado alternativo en el músculo de los pacientes da lugar a la inclusión del exón 11. Las formas que incluyen el exón 11 codifican una proteína que recibe el nombre de IR-B, mientras que las formas que lo excluyen se denominan IR-A. La isoforma IR-B es una variante atípica poco señalizadora, que en la población sana deja de expresarse progresivamente con la edad, a la vez que la isoforma IR-A aumenta. En los pacientes, la falta de señalización causada por la presencia de la isoforma IR-B es la responsable de la resistencia a insulina (Savkur *et al.*, 2001). La ATPasa dependiente de calcio SERCA y el receptor de la rianodina, RyR, son proteínas implicadas en mecanismos de homeostasis intracelular de calcio durante procesos de relajación/contracción muscular. Al igual que en los casos anteriores, ambas presentan un patrón de *splicing* fetal en los pacientes adultos (Kimura *et al.*, 2005), lo que podría explicar el desgaste y la degeneración muscular. Por último, los mensajeros de la *troponina T cardíaca (TNNT2)* sufren una alteración similar por inclusión del exón fetal 5, pudiendo ser ésta la causa de los problemas cardíacos en los pacientes (Philips *et al.*, 1998).

Tabla I4. Ejemplos de transcritos con procesado alternativo desregulado en la DM1 y DM2

Transcrito	Exón	DM1	DM2	<i>Mbnl1</i> ^{-/-}	Ref.
Músculo esquelético					
<i>APL</i>	ex 5a, 5b	+	+	+	(Lin et al., 2006)
<i>CAPN3</i>	ex 16	+	+	+	(Lin et al., 2006)
<i>CLN1</i>	int 2, ex 7a, 8a	+	+	+	(Charlet et al., 2002; Mankodi et al., 2002; Salvatori et al., 2009)
<i>FHOS</i>	ex 11a	+	+	+	(Lin et al., 2006)
<i>GFAT1</i>	ex 10	+	-	+	(Lin et al., 2006)
<i>IR</i>	ex 11	+	+	N.D.	(Savkur et al., 2001; Savkur et al., 2004)
<i>MBNL1</i>	ex 7	+	+	+	(Lin et al., 2006)
<i>MBNL2</i>	ex 7	+	+	+	(Lin et al., 2006)
<i>MTMR1</i>	ex 2.1, 2.2	+	N.D.	N.D.	(Buj-Bello et al., 2002)
<i>NRAP</i>	ex 12	+	+	+	(Lin et al., 2006)
<i>RYR1</i>	ex 70	+	N.D.	N.D.	(Kimura et al., 2005)
<i>SERCA1</i>	ex 22	+	+	+	(Kimura et al., 2005; Lin et al., 2006)
<i>z-Titin</i>	ex Zr4, Zr5	+	+	+	(Lin et al., 2006)
<i>m-Titin</i>	M-line ex5	+	+	+	(Lin et al., 2006)
<i>TNNT3</i>	ex fetal	+	+	N.D.	(Kanadia, Johnstone et al., 2003; Salvatori et al., 2009)
<i>ZASP</i>	ex 11	+	+	+	(Lin et al., 2006)
Corazón					
<i>TNNT2</i>	ex 5	+	N.D.	N.D.	(Philips et al., 1998)
<i>ZASP</i>	ex 11	+	+	+	(Mankodi et al., 2001)
<i>m-Titin</i>	M-line ex 5	+	+	+	(Mankodi et al., 2001)
<i>KCNAB1</i>	ex 2	+	N.D.	N.D.	(Mankodi et al., 2001)
<i>ALP</i>	ex 5	+	N.D.	N.D.	(Mankodi et al., 2001)
<i>ANK2</i>	ex 21	+	N.D.	-	(Orengo et al., 2008)
<i>CAPZB</i>	ex 8	+	N.D.	-	(Orengo et al., 2008)
<i>FXR1</i>	ex 15, 16	+	N.D.	-	(Orengo et al., 2008)
Cerebro					
<i>TAU</i>	ex 2, 10	+	+	N.D.	(Jiang et al., 2004; Maurage et al., 2005; Sergeant et al., 2001)
<i>APP</i>	ex 7	+	N.D.	N.D.	(Jiang et al., 2004)
<i>NMDAR1</i>	ex 5	+	N.D.	N.D.	(Jiang et al., 2004)

N.D., no determinado

De los 156 transcritos alterados en la DM1, al menos 128 están también desregulados en ratones *knockout* de *Mbnl1* (Du et al.; Kanadia, Johnstone et al., 2003; Lin et al., 2006) (Tabla I4), sugiriendo que el secuestro y subsiguiente pérdida de función de MBNL1 juega un papel crucial en la enfermedad. El trabajo de Kanadia et al. en dichos ratones demostró el papel clave de las proteínas MBNL en el desarrollo de la DM1. Los autores describieron que estos animales presentan cataratas del tipo iridiscente, sufren miotonía y defectos histológicos a nivel muscular (Kanadia, Johnstone et al., 2003). Los ratones *knockout* de *Mbnl2* también desarrollan miotonía (por un procesado incorrecto de los transcritos *Cln-1*) y otras alteraciones musculares típicas de la DM1 (Hao et al., 2008). Además, la sobreexpresión de *Mbnl1* en

ratones modelo que expresan 250 repeticiones CTG revierte los defectos en el procesado de al menos 4 transcritos (*Serca1*, *Clcn1*, *Tnnt3* y *ZASP*), así como la miotonía (Kanadia *et al.*, 2006). En *Drosophila*, los embriones mutantes *mb1* presentan desorganización de las bandas Z de los sarcómeros, hipercontracción del abdomen (Artero *et al.*, 1998) y alteraciones en el procesado alternativo de transcritos como *ZASP*, *troponina T (tnT)* y la α -*actinina* (Machuca-Tzili *et al.*, 2006; Vicente-Crespo *et al.*, 2008). Del mismo modo, la sobreexpresión de MBNL1 en moscas modelo que expresan 480 repeticiones CTG suprime fenotipos provocados por las repeticiones (de Haro *et al.*, 2006; Garcia-Lopez *et al.*, 2008). Todos estos resultados supusieron un giro de 180° en el estudio de la DM1, a partir del cual las proteínas Muscleblind se han considerado un elemento determinante en el desarrollo de la enfermedad.

Otros posibles componentes de las inclusiones ribonucleares en la DM1 son las proteínas de unión al ARN NonA, Staufén y Split ends, las cuales se han visto asociadas a repeticiones en modelos en mosca (Houseley *et al.*, 2005; Mutsuddi *et al.*, 2004).

En conjunto, el secuestro de proteínas nucleares como factores de transcripción y factores de *splicing* aporta una explicación plausible al efecto multisistémico de la enfermedad, así como al desarrollo de síntomas comunes entre la DM1 y la DM2. Posteriormente a que la hipótesis de la ganancia de función tóxica del ARN fuese propuesta para la Distrofia Miotónica, se ha demostrado la existencia de un mecanismo de patogénesis similar para otras enfermedades como FXTAS, SCA3, SCA8, SCA 10, SCA 12 y HDL2 (Daughters *et al.*, 2009; L. B. Li *et al.*, 2008; Ranum & Cooper, 2006; Rudnicki *et al.*, 2007).

4.3.3. Secuestro de microARNs

Recientemente se ha sugerido que los mensajeros con expansiones de repeticiones CUG podrían también secuestrar microARNs en el citoplasma, proporcionando así un mecanismo adicional por el cual las repeticiones interferirían en la regulación de la expresión de otros genes (Hon & Zhang, 2007). Los microARNs son moléculas de ARN pequeñas de 21-25 nt. Éstos funcionan como represores post-transcripcionales, regulando la expresión de genes concretos al unirse a secuencias de aproximadamente 7 nt en la región 3'UTR de sus transcritos diana. Esta región es complementaria a una zona situada en el extremo 5' de los microARNs denominada región *seed* o semilla. La región semilla de al menos seis microARNs (*mir-15a*, *mir-15b*, *mir 16*, *mir-103*, *mir-107*, *mir-214* y *mir-195*) contiene múltiples sitios de unión putativos a repeticiones CUG de manera solapante (Fig. I8). De manera interesante, se ha descrito que los microARNs *mir-107* y *mir-103* se expresan en corazón, cerebro y músculo esquelético de ratón (Babak *et al.*, 2004), tejidos ampliamente afectados en la DM1.

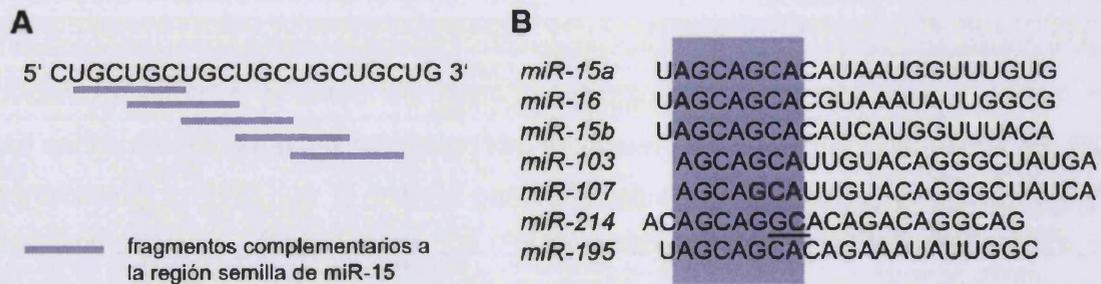


Figura 18. Secuestro de microARNs por las repeticiones CUG. (A) Diagrama que muestra como una secuencia de 7 repeticiones CUG podría dar lugar a 5 sitios de unión a microARNs con regiones semilla ricas en CAG. (B) microARNs que contienen regiones semilla ricas en CAG, la unión de los cuales a repeticiones CUG ha sido predicha mediante herramientas bioinformáticas. Sólo la región semilla del microARN miR-214 tendría desapareamientos con las secuencias CUG (subrayado). Figura modificada de Hon & Zhang, 2007.

El secuestro de microARNs específicos por parte de las repeticiones CUG podría tener dos consecuencias potencialmente patológicas. En primer lugar, alteraría la estequiometría de microARNs libres en la célula, afectando a la expresión de sus transcritos dianas. Por otro lado, estarían reclutando al complejo RISC, afectando de manera inespecífica a otros transcritos en la célula. Sin embargo, hasta la fecha todavía no existen evidencias que demuestren que esto ocurre *in vivo*.

4.4. Modelo del silenciamiento de genes por generación de fragmentos de siRNA

Las repeticiones CUG de los mensajeros *DMPK* adquieren en el núcleo una estructura de ARN en horquilla de doble hebra antiparalela muy similar a la forma A del ARN (Fig. 19), excepto por los desapareamientos U-U (Michalowski *et al.*, 1999; Mooers *et al.*, 2005). En 2005, Malinina propuso que los transcritos portadores de horquillas de ARN de doble cadena formadas por repeticiones (CNG)_n podrían ser procesados por la ruta del ARN interferente, generando fragmentos de ARN interferente pequeños (siRNA o microARN) y silenciando la expresión de genes portadores de secuencias (CNG)_n complementarias con $n \geq 7$ (Malinina, 2005). La proteína MBNL1 contiene un tramo de 7 alaninas codificado por la secuencia GCAGCUGCUGCAGCUGCUGCA. Esta secuencia es parcialmente complementaria a las repeticiones CUG, por lo que los transcritos de *MBNL1* podrían sufrir silenciamiento. Asimismo, todas aquellas proteínas con tramos poli-Glutamina (poliQ) codificados por tripletes CAG serían también potenciales dianas para su silenciamiento.

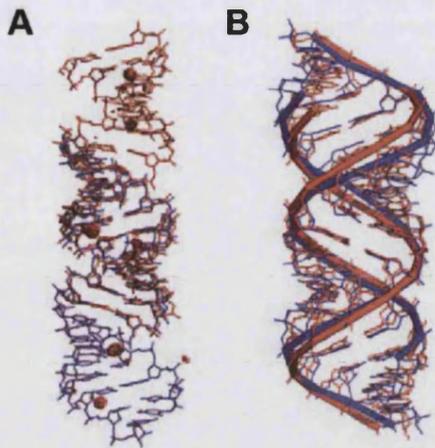


Figura 19. Estructura de las repeticiones CUG. (A) Representación esquemática de la resolución del cristal de un ARN de 18 pb que contiene 6 repeticiones CUG ((CUG)₆). Este ARN forma una hélice de doble cadena antiparalela con apareamientos C-G y desapareamientos U-U. La estructura de esta horquilla tiene una alta similitud con la estructura del ARN-A, tal y como se observa en la figura B donde se muestra una superposición de ambas ((CUG)₆ en azul y ARN-A en rojo). Figura tomada de (Mooers *et al.*, 2005).

En 2007, esta hipótesis fue ensayada por primera vez en cultivo celular e *in vitro*, utilizando oligonucleótidos con las repeticiones causantes de DM1 ((CUG)_n), HD ((CAG)_n) y SCA1 ((CAG)_n). Los autores demostraron que dichos ARNs podían ser procesados por la ribonucleasa Dicer, y que los fragmentos de siRNA generados causaban una disminución en los niveles de oligonucleótidos de secuencia complementaria (Krol *et al.*, 2007). Hasta la fecha, no obstante, los resultados obtenidos en ratón parecen descartar que esto ocurra *in vivo* (Osborne *et al.*, 2009).

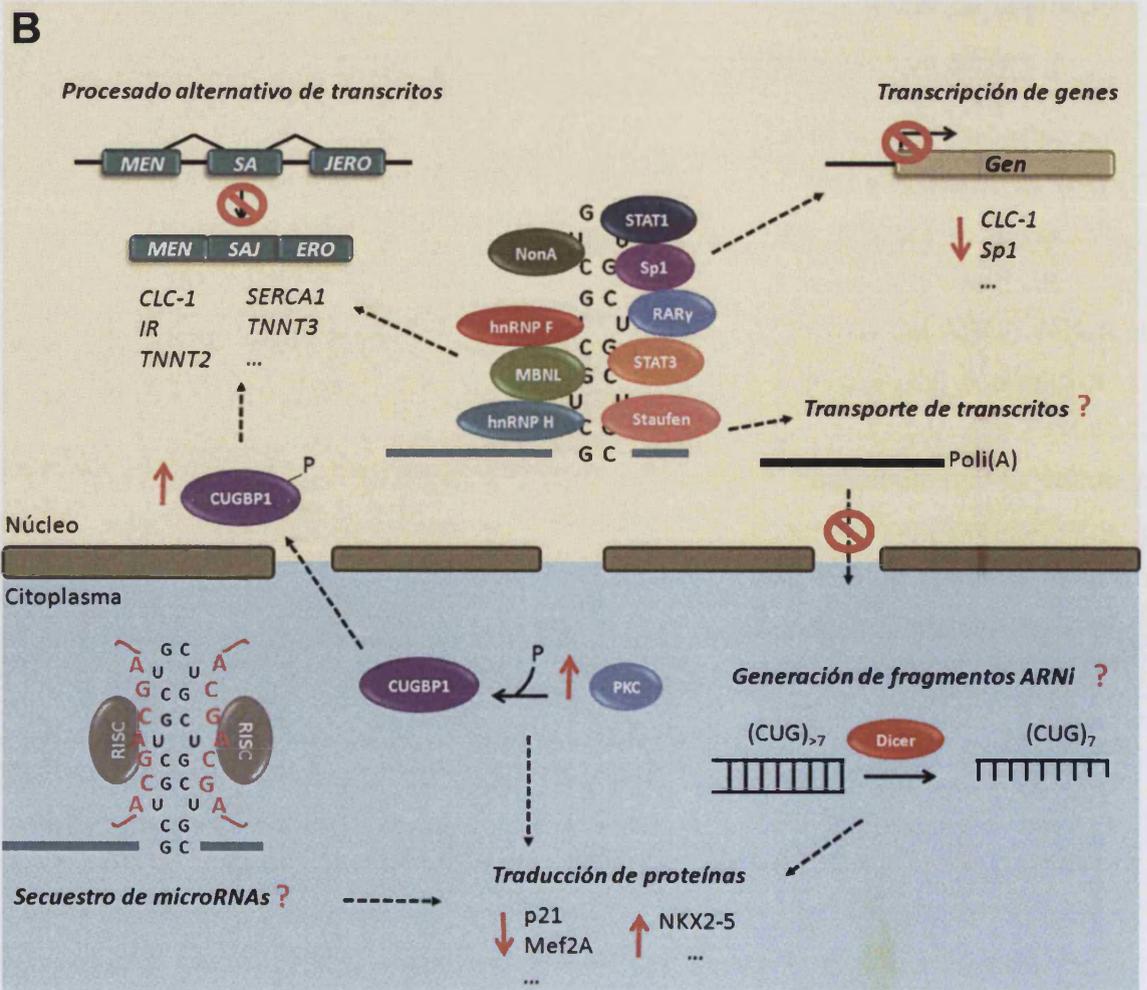
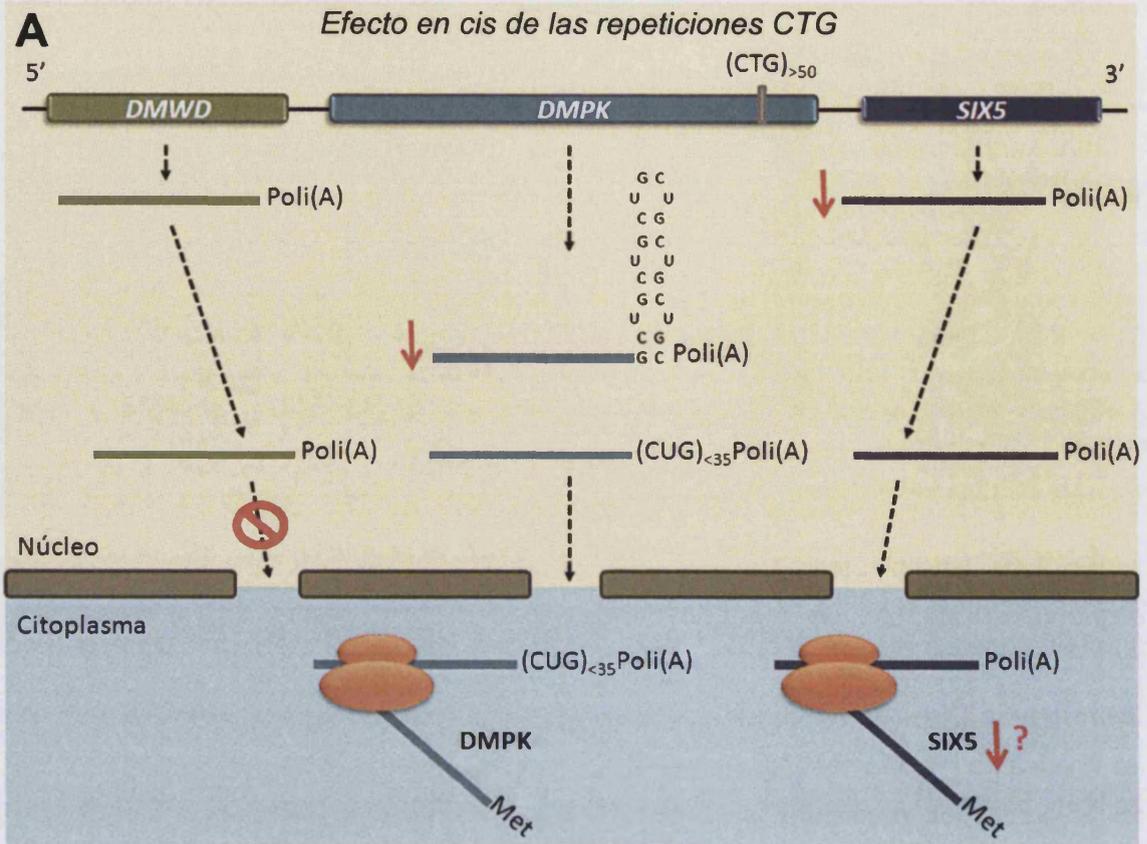


Figura 110. Modelo molecular de patogénesis de la DM1. (A) Efectos en cis de la mutación DM1. La DM1 tiene su base en una expansión de repeticiones CTG en una región no traducida del gen *DMPK*. La presencia de repeticiones altera la estructura local de la cromatina, lo cual afecta a la transcripción del gen vecino *SIX5*. Los transcritos de otro gen adyacente a *DMPK*, *DMWD*, quedan retenidos en el núcleo posiblemente fusionados a los transcritos *DMPK* mutantes. (B) Efectos en trans de la mutación DM1. Las expansiones CUG en los transcritos *DMPK* mutantes se pliegan formando un ARN de doble cadena que secuestra factores de transcripción (STAT1, STAT3, Sp1 y RAR γ), factores de *splicing* (MBNL, hnRNPH y hnRNPF) y otras proteínas relacionadas con el metabolismo del ARN (Staufen y NonA). Los transcritos mutantes en el citoplasma podrían secuestrar microARNs de manera proporcional al número de tripletes CUG. Por otro lado, ellos mismos podrían ser una fuente potencial de siRNAs al ser procesados por Dicer. Los niveles de otro factor de *splicing*, la proteína CUGBP1, están aumentados en el núcleo debido a su hiperfosforilación por PKC en el citoplasma y subsiguiente estabilización y translocación al núcleo. Este incremento parece ser independiente del número de repeticiones CUG y respondería a cambios en los niveles de *DMPK* (ver apartados 5.2 y 7.3 de la Introducción). Las proteínas CUGBP1 y MBNL1 son factores de *splicing* antagonistas, cuyo equilibrio regula la transición de patrones de procesado fetal a adulto.

5. Papel de las proteínas Muscleblind en el desarrollo de la DM1

5.1. MBNL1-3 son proteínas de dedos de zinc necesarias durante el desarrollo muscular

Las proteínas Muscleblind (Mbl) fueron descritas por primera vez en *Drosophila melanogaster* en nuestro laboratorio hace más de una década (Artero *et al.*, 1998; Begemann *et al.*, 1997). Posteriormente, se han descrito proteínas Mbl en diferentes organismos desde nematodos (*Caenorhabditis elegans*) hasta vertebrados. En invertebrados existe un solo gen *mbl* (Pascual *et al.*, 2006), el cual codifica en *Drosophila* al menos 7 isoformas diferentes (Mbl A-G, Fig. 111B). En humanos, al igual que en la mayoría de vertebrados, existen 3 genes parálogos diferentes (*MBNL1*, *MBNL2*, and *MBNL3*, del inglés *Muscleblind like*), cada uno de los cuales codifica a su vez al menos 9, 3 y 6 isoformas distintas respectivamente (Fardaei *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2000; Pascual *et al.*, 2006).

Todos los miembros de la familia Muscleblind se caracterizan por la presencia en su extremo Nt de dominios de dedos de zinc del tipo CCCH (Pascual *et al.*, 2006). Estos dominios se encuentran altamente conservados en todas las proteínas Mbl de metazoos, tanto en protóstomos (los cuales contienen dos motivos en tándem) como deuteróstomos (con cuatro motivos en tándem). El hecho de que los organismos deuteróstomos posean cuatro motivos hizo sugerir en un primer momento que el primer par de dedos pudo sufrir una duplicación a lo largo de la evolución durante la especiación de vertebrados. Sin embargo, posteriormente se han detectado en *Drosophila* nuevas isoformas Mbl que contienen 4 dedos de zinc (Fernandez-Costa y Artero, 2010), indicando que el segundo par pudo haberse perdido en invertebrados.

Los dominios de dedos de zinc funcionan como módulos de interacción que unen ADN, ARN, proteínas u otras moléculas pequeñas. Éstos pueden coordinar uno o más iones de zinc, lo cual es crítico tanto para su función como para la estabilidad de su estructura secundaria. El estudio de los cuatro dedos de zinc de MBNL1 (MBNL¹⁻²⁸⁰) mediante espectroscopía de dicroísmo circular llevó a determinar que la mayor parte de la proteína carece de estructura

secundaria, a excepción de una pequeña porción que podría contener láminas β (Warf & Berglund, 2007). Los autores demostraron, además, que la integridad de los dedos de zinc de MBNL1 es imprescindible para la unión de la proteína al ARN, ya que la sustitución de cualquiera de los residuos de cisteína por otro aminoácido inhibe la interacción. El estudio de la unión de MBNL1 a secuencias (CUG) $_n$, así como a los transcritos *TNNT2* y *TNNT3*, ha llevado a determinar que el mecanismo de reconocimiento de esta proteína a sus dianas es dependiente de la presencia de desapareamientos pirimidina-pirimidina y de la localización de los pares C-G y G-C en la horquilla, indicando que MBNL1 reconoce motivos estructurales en el ARN (Goers *et al.*, 2008; Warf & Berglund, 2007; Yuan *et al.*, 2007). Mediante estudios de deleciones en los transcritos *TNNT2* humanos y de pollo, se definió un motivo de unión a MBNL1 formado por la secuencia YGCU(U/G)Y, donde Y=U o C. Además, utilizando la técnica de generación de aptámeros SELEX (del inglés *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*, (Tuerk & Gold, 1990)), se identificó una secuencia consenso de unión para la proteína Mbl de *Drosophila* (AGUCU), a la cual se une con mayor afinidad que a las repeticiones CUG. Por último, además de a moléculas de ARN de doble cadena, tanto los dedos de zinc de MBNL1 humano como de Mbl de *Drosophila* pueden unir secuencias de ARN de cadena sencilla (Goers *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2004) y al ADN (Kino *et al.*, 2004).

Recientemente se ha resuelto la estructura en cristal de los dominios de dedos de zinc 3 (ZnF3) y 4 (ZnF4) de MBNL1, tanto en su forma libre como unidos al ARN. Estos dedos se unen respectivamente a tramos GC y GCU en secuencias del tipo r(CG CUGU). Esta unión ocurre de manera específica mediante puentes de hidrógeno e induce la formación de horquillas de ARN en las que cada dedo se dispone de manera antiparalela respecto al otro (Teplova & Patel, 2008) (Fig. I11A). La estructura en solución de los 4 dedos de zinc de la proteína MBNL2 también ha sido resuelta. En este caso, cada par de dedos da lugar a una estructura similar a la descrita para los dedos ZnF3 y ZnF4 de MBNL1, formando ambos pares una estructura simétrica entre sí (He *et al.*, 2009).

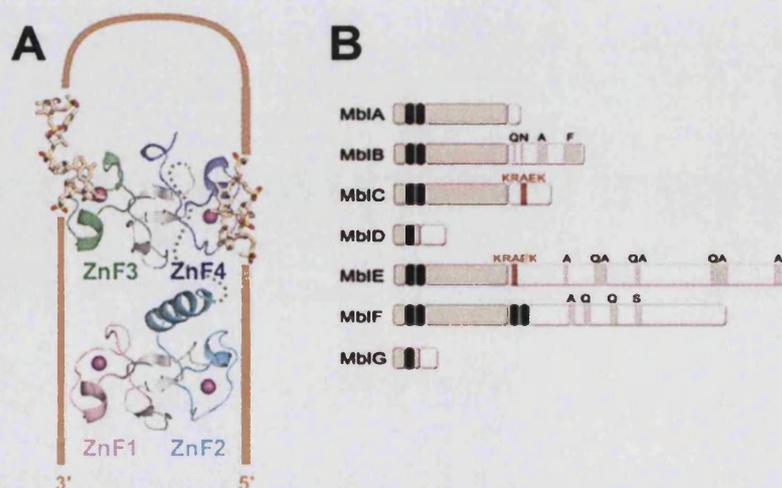


Figura I11. Motivos de las proteínas Muscblind. (A) Esquema que muestra la unión de los dedos de zinc 3 (ZnF3) y 4 (ZnF4) de MBNL1 a un ARN de secuencia r(CG CUGU). ZnF3 y ZnF4 se disponen de manera antiparalela en el interior de la hebra, uniéndose a tramos GC y GCU respectivamente. (B) Isoformas Mbl de *Drosophila* descritas hasta la fecha, donde se señala la localización de los dedos de zinc, así como de otros motivos conservados.

Además de los dedos de zinc, las proteínas Muscleblind tienen conservado un dominio de seis aminoácidos en el extremo Ct denominado KRAEK (Pascual *et al.*, 2006; Fernandez-Costa y Artero, 2010) (Fig. I11B). Aunque originalmente se sospechó que se trataba de un sitio de sumolización de la proteína, más tarde se demostró que, al menos en *Drosophila*, esta secuencia está implicada en la localización subcelular diferencial de las isoformas Mbl (Fernandez-Costa y Artero, 2010). Así, la presencia del motivo KRAEK en el extremo Ct de la proteína favorece su transporte al núcleo. Se ha descrito que este motivo no es necesario para la actividad de MblC como factor de *splicing in vitro*. Sin embargo, la presencia de mutaciones puntuales en esta región causa un incremento en la muerte celular en la línea de células embrionarias S2 de *Drosophila* en cultivo, posiblemente debido a una acumulación tóxica de la proteína en el citoplasma (Vicente-Crespo *et al.*, 2008).

En *Drosophila*, *mbl* se expresa a partir de la segunda mitad de la embriogénesis en la musculatura somática, faríngea y visceral, en el cordón nervioso ventral, en los fotorreceptores de la larva (Artero *et al.*, 1998; Begemann *et al.*, 1997) y en el cerebro y ojos de moscas adultas, entre otros tejidos (www.flyatlas.com). En humanos y en ratón, *MBNL1* se expresa mayoritariamente en el músculo y corazón, mientras que *MBNL2* está presente en niveles similares en todos los tejidos. *MBNL3* se encuentra principalmente en la placenta, y en menor medida también en el corazón, hígado, riñón y páncreas, aunque no lo hace en el músculo esquelético (Fardaei *et al.*, 2002; Kanadia, Johnstone *et al.*, 2003; Kanadia, Urbinati *et al.*, 2003). Por último, *Dmpk* y *Mbnl1* presentan un patrón de expresión solapante durante el desarrollo de las extremidades y del sistema nervioso en ratón, así como en los músculos del diafragma y la lengua (Kanadia, Johnstone *et al.*, 2003). Además de tener un patrón de expresión distinto, las proteínas MBNL1-3 tienen funciones diferentes. Así, algunos trabajos han implicado a MBNL1 como promotor de la diferenciación muscular, ya que su actividad aumenta cuando se induce la diferenciación a miotubos en mioblastos C2C12 de ratón en cultivo celular (Adereth *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2000; Squillace *et al.*, 2002). Sin embargo, otros autores afirman que su papel promotor en el desarrollo muscular vendría dado al mantenerse su expresión constante durante el proceso diferenciación, al menos en mioblastos humanos (Holt *et al.*, 2009; K. S. Lee *et al.*, 2007). Los niveles de MBNL3 se reducen durante la diferenciación de mioblastos C2C12, y la sobreexpresión de esta proteína inhibe la expresión de genes específicos del desarrollo muscular como la *miogenina* o la *cadena pesada de la miosina (Mhc)* (K. S. Lee *et al.*, 2007). Estos resultados han llevado a sugerir que la disminución de MBNL3 podría ser un marcador de la entrada en diferenciación de las células musculares, aunque otros autores argumentan que la proteína no se detecta en ningún momento del desarrollo en secciones de músculo esquelético humano (Holt *et al.*, 2009). Por último, aunque existen trabajos que describen que no hay cambios en los niveles de MBNL2 durante la miogénesis, otros han descrito una disminución de la proteína al comienzo de la

diferenciación de mioblastos, manteniéndose su expresión tan sólo en las fibras en regeneración (Holt *et al.*, 2009). Los estudios *in vivo* en organismos modelo han confirmado que las proteínas Mbl desempeñan un papel crucial en el correcto desarrollo del músculo. En *Drosophila*, los mutantes *mbl* mueren como larva de primer estadio (L1) en el interior del huevo, al ser éstas incapaces de abrir el corion y eclosionar. A nivel ultraestructural, en estos individuos las bandas Z de los sarcómeros musculares se muestran desordenadas con pérdida de bandas I, lo cual es típico de músculos en estado hipercontraído. Por otro lado, la matriz tendinosa que media la unión del músculo a la epidermis está reducida en las larvas mutantes (Artero *et al.*, 1998). Además, el único regulador transcripcional de *mbl* descrito hasta la fecha es la proteína Mef2 (del inglés *myocyte enhancing factor*), la cual es un activador clave durante la miogénesis.

5.2. Función molecular de las proteínas Muscleblind en el metabolismo del ARN

Hasta hace tan sólo unos años, apenas se disponía de información acerca de la función molecular de las proteínas Muscleblind. Sin embargo, en menos de una década se ha logrado avanzar enormemente en el estudio del papel de estas proteínas en la célula. Se sabe que MBNL2 participa en la localización subcelular de transcritos como la β -actina y la integrina $\alpha 3$ desde el núcleo a las adhesiones focales en la periferia celular para su traducción (Adereth *et al.*, 2005). No obstante, la función más estudiada de las proteínas MBNL es su papel como factores de *splicing* alternativo específicos de tejido en el músculo esquelético, corazón y sistema nervioso. Estos factores regulan el procesado de transcritos que codifican proteínas estructurales del sarcómero (ZASP, Titina, Actinina y Troponina), de adhesión celular y citoesqueleto (proteína LIM 1 de unión a Actina, Nrap y Fibronectina), o de excitación y contracción muscular (Serca1, CLC-1 y RyR) y señalización (IR, Sorbs1 y MTMR1), entre otras (Tabla I4). Además, MBNL1 se une de manera directa al menos a tres de estos transcritos: *SERCA1*, *TNNT2* y *TNNT3* (Hino *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2004; Warf & Berglund, 2007). Algunas de estas dianas están conservadas en distintos organismos a lo largo de la evolución. Así, los mutantes del gen *mbl* en *Drosophila* tienen defectos en el *splicing* de los transcritos *ZASP* y *Troponina T (tnT)* (Machuca-Tzili *et al.*, 2006; Vicente-Crespo *et al.*, 2008). Por otro lado, los dedos de zinc de las proteínas Muscleblind de *Drosophila* pueden unirse de manera específica a los transcritos *TNNT2* humanos y la proteína MblC de mosca es capaz de promover el *splicing* del exón fetal F en los transcritos *Tnnt3* de ratón (Goers *et al.*, 2008; Vicente-Crespo *et al.*, 2008), indicando que los mecanismos de reconocimiento de las proteínas Muscleblind son similares en organismos diferentes (Warf and Berglund, 2007; Goers *et al.*, 2007 and Yuan *et al.*, 2008). Además, la expresión de MBNL1 en embriones mutantes *mbl* de *Drosophila* rescata fenotipos provocados por la falta de función del gen endógeno, demostrando que las proteínas Mbl humanas y de *Drosophila* son intercambiables funcionalmente (Monferrer & Artero, 2006).

Las proteínas Muscleblind pueden desempeñar un papel tanto activador como represor del *splicing* alternativo de exones específicos (Du *et al.*). El estudio del exón 5 de la *TNNT2* dio lugar a un modelo de represión en el cual MBNL1 se une a estructuras en horquilla cerca del sitio 3' de *splicing* del intrón 4 (Warf & Berglund, 2007) (Fig. 112). MBNL1 estabilizaría esta estructura, impidiendo su reconocimiento por parte de otras proteínas de la maquinaria de *splicing*. La unión de U2AF65 al ARN es el primer paso para el reclutamiento de dicha maquinaria. Esta proteína se une al intrón 4 de los transcritos *TNNT2* cuando éste se encuentra en forma de cadena sencilla, pero no cuando lo hace en doble cadena. De esta manera, MBNL1 y U2AF65 se unirían al ARN de manera competitiva, por lo que la unión de MBNL1 desencadenaría en la inhibición de la inclusión del exón 5 (Warf, Diegel *et al.*, 2009).

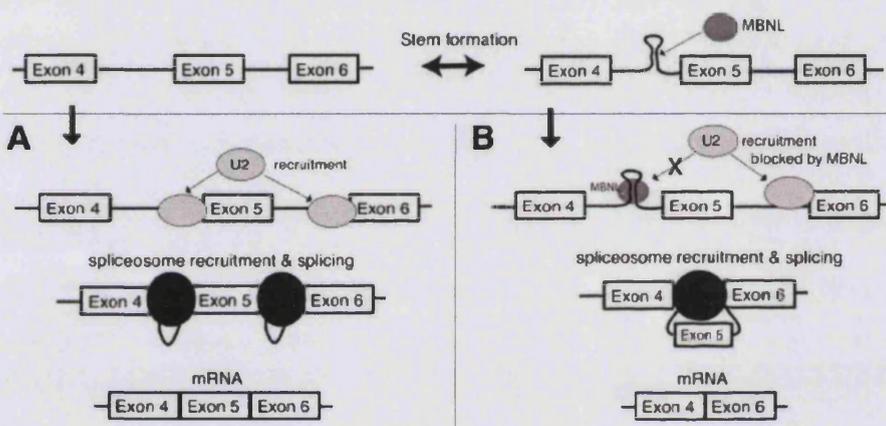


Figura. 112. Modelo del papel represor de MBNL1 sobre el *splicing* del exón 5 en los transcritos *TNNT2*. (A) Si no se forma la horquilla, la maquinaria de *splicing* reconoce el sitio de unión en el intrón 4 y el exón 5 se incluye en los transcritos maduros. (B) Si la horquilla se forma y MBNL1 se une, la maquinaria de *splicing* no se recluta y el exón 5 no se incluye. Figura tomada de Warf y Berglund, 2007..

5.3. Las proteínas Muscleblind y CUGBP1 regulan cambios en el *splicing* de manera antagonista durante el desarrollo

En su papel regulador del *splicing* alternativo, la proteína MBNL1 antagoniza la acción de otro factor de *splicing* miembro de la familia de proteínas CELF (CELF1-6, del inglés *CUGBP and ETR-3-like factor*): CUGBP1 (del inglés *CUG Binding Protein 1*, también llamada CELF1 o BRUNOL2). Las proteínas CELF contienen tres dominios de unión al ARN del tipo RRM (del inglés *RNA recognition motif*) y un *linker* o dominio de divergencia que difiere entre las distintas proteínas CELF. A diferencia de MBNL1, CUGBP1 no se une a horquillas CUG de manera estable y no forma inclusiones nucleares en los pacientes (Jiang *et al.*, 2004; Mankodi *et al.*, 2005). Por el contrario, en la DM1 los niveles de CUGBP1 están aumentados en mioblastos, músculo esquelético y corazón en un orden de 3-5 veces (Savkur *et al.*, 2001; Timchenko *et al.*, 2001). El aumento de CUGBP1 se debe a su hiperfosforilación por la proteína quinasa C (PKC), cuya actividad está incrementada en los pacientes (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007). La hiperfosforilación de CUGBP1 por PKC tiene dos consecuencias principales: su estabilización en las células y un cambio de localización subcelular del citoplasma al núcleo.

Entre las funciones de la proteína CUGBP1 destacan su papel como regulador del *splicing* alternativo y como regulador positivo de la traducción de proteínas como p21, C/EBPbeta y Mef2A en el músculo esquelético (Timchenko *et al.*, 2004; Timchenko *et al.*, 1999). La sobreexpresión de Cugbp1 en ratón causa distrofia muscular, un incremento en el número de fibras musculares de tipo I y un retraso en el desarrollo muscular, además de cambios en el patrón de *splicing* de una serie de transcritos como *IR*, *CLC-1* y *TNNT2*. (Timchenko *et al.*, 2004).

El balance entre las proteínas MBNL1 y CUGBP1 regula la inclusión o exclusión de exones alternativos en determinados pre-mensajeros, por lo que el desequilibrio entre ambas actividades en los pacientes origina alteraciones en el procesado alternativo de un gran número de transcritos (Ho *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006; Philips *et al.*, 1998; Savkur *et al.*, 2001). Un ejemplo es el exón 5 de la troponina cardíaca *TNNT2*. Mientras MBNL1 reprime su inclusión en los transcritos maduros, CUGBP1 la promueve (Ho *et al.*, 2004). MBNL1 y las proteínas CELF reconocen regiones distintas en los mensajeros inmaduros, por lo que el antagonismo entre ambas proteínas no se debe a competencia por el sitio de reconocimiento (Ho *et al.*, 2004; Philips *et al.*, 1998). La regulación de la inclusión del exón 11 del receptor de la insulina *IR* es otro ejemplo sujeto al antagonismo entre MBNL1 y CUGBP1, aunque en este caso MBNL1 promueve la inclusión del exón 11, mientras que CUGBP1 induce su exclusión (Ho *et al.*, 2004). La proteína hnRNP H, otro factor de *splicing* secuestrado por las repeticiones CUG en la DM1, juega también un papel en la regulación del procesado de los transcritos *IR*. La sobreexpresión de hnRNP H en mioblastos da lugar a exclusión del exón, al igual que CUGBP1. Además, se ha demostrado que hnRNP H y CUGBP1 interactúan físicamente y que esta interacción no está mediada por la presencia de ARN (Paul *et al.*, 2006). La cotransfección de MBNL1 y hnRNP H en mioblastos reduce la acción de la segunda sobre el exón 11 de *IR*, pero la transfección de MBNL1 no tiene el mismo efecto en mioblastos en los que hnRNP H no se sobreexpresa, lo que sugiere que MBNL1 podría reprimir a hnRNP H vía una interacción física entre ambas proteínas.

En condiciones no patológicas, la expresión de CUGBP1 en el corazón disminuye de manera dramática durante el desarrollo hasta niveles apenas detectables en individuos adultos. Asimismo, tras el nacimiento la localización subcelular de Mbnl1 cambia de citoplásmica (estadio P2 en ratón) a nuclear (estadio P5-P20) (Kalsotra *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2006) (Fig. I13A). Durante este periodo, el músculo sufre una serie de remodelaciones que implican cambios en los programas transcripcionales y post-transcripcionales de las células. Parte de dichos cambios comprenden transiciones en el patrón de *splicing* alternativo de una serie de transcritos. Kalsotra *et al.* llevaron a cabo un estudio exhaustivo acerca de los cambios en los patrones de *splicing* que ocurren en ratón durante el desarrollo del corazón (Kalsotra *et al.*, 2008). En este estudio los autores describen transiciones en el *splicing* de 63 transcritos, 48 de

las cuales también ocurren en pollo. El análisis de las secuencias flanqueantes de los exones implicados reveló que los intrones adyacentes a los exones alternativos sujetos a cambios están enriquecidos en motivos de unión a proteínas CELF (UGUGU/GUGUG) y a MBNL1 (UGCGC). Los autores estudiaron 44 de las 63 transiciones identificadas también en ratones *knockout* de *Mbnl1* (*Mbnl1*^{-/-}) y en ratones transgénicos *Cugbp1*, y encontraron que 5 de estos cambios no ocurrían correctamente en los primeros animales, 13 estaban alterados en los segundos y 6 en ambos de manera antagonista (Tabla I5). Estos resultados demuestran la importancia de las proteínas CELF y MBNL1 durante el desarrollo muscular, y proporcionan una explicación a la presencia de variantes de *splicing* embrionarias de transcritos musculares en los pacientes de DM1 adultos (Fig. I13B).

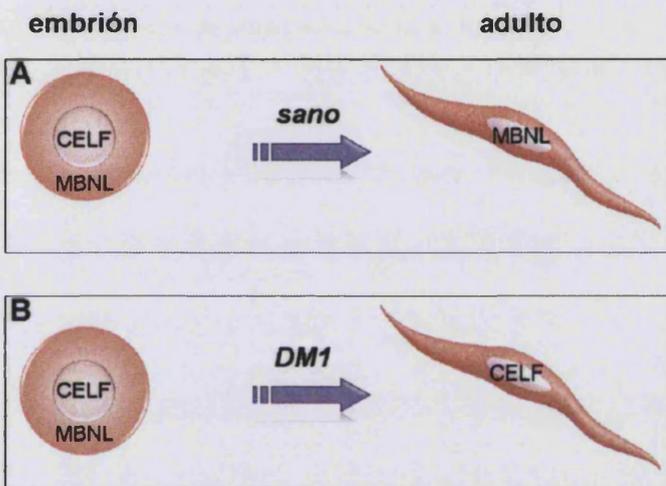


Figura I13. Cambios en la localización celular de CUGBP1 y MBNL1 durante el desarrollo. (A) En estadios tempranos, la proteína MBNL1 se localiza principalmente en el citoplasma, mientras que CUGBP1 lo hace en el núcleo. Conforme el desarrollo avanza, los niveles de CUGBP1 se reducen hasta 10 veces y MBNL1 aumentan en un orden de 4 veces, además de pasar a localizarse en el núcleo. (B) En los pacientes de DM1, los niveles de CUGBP1 en el núcleo de individuos adultos están aumentados. Asimismo, MBNL1 está secuestrada en inclusiones por lo que su función en el núcleo está comprometida. De esta manera, la distribución de ambas proteínas en pacientes presenta un patrón embrionario.

Tabla I5. Cambios en el *splicing* regulados por *Mbnl1* y *Cugbp1* en el desarrollo del corazón

	Transcrito	Exón		Transcrito	Exón
Regulados por <i>Mbnl1</i>	<i>Tnnt2</i>	e5	Regulados por <i>Cugbp1</i>	<i>Sorbs1</i>	e6
	<i>Sorbs1</i>	e23		<i>c10orf97</i>	e5
	<i>Ldb3B</i>	e8		<i>Atp2b1</i>	e21
	<i>Mbnl1</i>	e5		<i>Mfn2</i>	e3
	<i>Fn1</i>	e33		<i>Kif1b</i>	e13
Regulados por ambos de modo antagonista	<i>2900002H16</i>	e4	<i>Kif1b</i>	e14-3'ss	
	<i>Rik</i>		<i>Fxr1h</i>	e15	
	<i>Ablim1</i>	e9	<i>Ank2</i>	e21	
	<i>Mbnl2</i>	e8	<i>Capzb</i>	e8	
	<i>H2afy</i>	ME e6	<i>Tmem134</i>	e5	
	<i>Actn4</i>	ME e5	<i>Mtmr3</i>	e16	
	<i>Xpo7</i>	e4-5'ss	<i>Ppfibp</i>	e4	
			<i>Fox-2</i>	e13	

Tabla basada en datos de Kalsotra et al., 2008.

6. Implicación de Muscleblind en otras enfermedades causadas por expansión de repeticiones

Además de en la DM1 y DM2, el secuestro de MBNL ocurre también en otros trastornos genéticos causados por expansión de repeticiones. La enfermedad de Huntington tipo 2 (HDL2, OMIM #606438) tiene su origen en la expansión de repeticiones CTG en un exón alternativo del gen *juntofilina-3* (*JPH3*, Entrez #57338). Al igual que en la Distrofia Miotónica, en los pacientes de HDL2 MBNL1 colocaliza con los ARN patológicos en el núcleo de células del córtex y otras regiones cerebrales (Rudnicki *et al.*, 2007). La ataxia espinocerebelar tipo 8 (SCA8, OMIM #603680) es otra enfermedad neurodegenerativa causada por la expansión de tripletes CTG en una región no codificante del gen *SCA8*. Mutsuddi *et al.* generaron un modelo de SCA8 en *Drosophila*, el cual presentaba fenotipos típicos de la enfermedad, incluyendo neurodegeneración en células de la retina. Utilizando este modelo, los autores llevaron a cabo un rastreo genético e identificaron a *mb1* como modificador de la toxicidad de las repeticiones en los transcritos *SCA8* (Mutsuddi *et al.*, 2004). Recientemente, Daughters *et al.* han descrito que MBNL1 colocaliza en inclusiones ribonucleares con repeticiones CUG en el cerebro de pacientes de SCA8. Además, los ratones modelo presentan defectos en el *splicing* de la diana de MBNL1 *GAT4/Gabt4* y la falta de *Mbnl1* potencia los déficits motores de estos animales (Daughters *et al.*, 2009).

La ataxia espinocerebelar 3 (SCA3, OMIM #109150), o enfermedad de Machado-Joseph, está causada por la expansión de repeticiones CAG en una región codificante del gen *SCA3*, dando lugar a tramos poliglutamina en la secuencia final de la proteína. Tradicionalmente, se ha aceptado que las proteínas con expansiones de tramos poliglutamina son el componente tóxico en las llamadas enfermedades poliQ (de las cuales existen al menos 11, Fig. I3). Sin embargo, recientemente Li *et al.* han descrito que *mb1* modifica fenotipos de neurodegeneración en un modelo de SCA3 en *Drosophila* (L. B. Li *et al.*, 2008). Además, los autores han demostrado que la expresión de un transgén formado por repeticiones CAACAG, las cuales codifican glutaminas pero no forman horquillas de ARN de doble cadena, no es tóxica en mosca. Por el contrario, la expresión de secuencias CAG de longitud patogénica en transcritos sin ORF da lugar a fenotipos patológicos. Estos resultados son la primera evidencia *in vivo* de que las enfermedades poliQ podrían tener un componente tóxico de ganancia de función del ARN en el cual las proteínas Muscleblind jugarían un papel. Se sabe que MBNL1 puede unirse a repeticiones CAG tanto *in vitro* como en cultivo celular, formando en el segundo caso inclusiones nucleares con los ARNs tóxicos (Ho *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta la fecha no se han descrito defectos de *splicing* asociados a ninguna enfermedad poliQ, lo cual indica que la presencia de MBNL1 en inclusiones de ARN en los pacientes no es suficiente para provocar su falta de función como factor de *splicing*.

7. Modelos animales de la DM1

El uso de animales modelo para el estudio de la DM1 en los últimos años ha ayudado a reconstruir los mecanismos de patogénesis por los cuales una mutación en un único gen puede desencadenar una enfermedad tan compleja, así como a diseccionar los distintos componentes implicados y asociarlos a síntomas concretos. En la última década se han generado modelos animales tanto en invertebrados como en vertebrados. De entre los primeros destacan los modelos en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y en la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*, mientras que los segundos se han desarrollado principalmente en roedores. *C. elegans* y *Drosophila* presentan la ventaja de disponer de una gran cantidad de herramientas debido a su extenso uso como modelos de experimentación en genética y biología del desarrollo, además de unas condiciones de cultivo compatibles con la búsqueda sistemática de moléculas y/o genes capaces de interactuar con el proceso celular en estudio. Los modelos en ratón, sin embargo, aportan un entorno fisiológico más cercano a humanos.

7.1. Modelos en *C. elegans*

C. elegans está formado por menos de 1000 células somáticas y posee un cuerpo transparente que permite la observación directa de fenotipos. En estos animales, la expresión de repeticiones CTG fusionadas a transcritos de la proteína GFP causa desde defectos musculares leves hasta letalidad, en función del tamaño de las repeticiones (K. Y. Chen *et al.*, 2007). En *C. elegans* existe un solo gen *muscleblind* (*CeMbl*) a partir del cual se originan dos isoformas por *splicing* alternativo: CeMBL-A y CeMBL-B. Estas proteínas se expresan tanto en larva como en adulto. Sin embargo, el silenciamiento de *CeMbl* por ARNi da lugar a fenotipos musculares por desorganización de los cuerpos densos (estructuras homólogas a las bandas Z de los sarcómeros) tan sólo en estadios adultos (L. C. Wang *et al.*, 2008). Asimismo, el homólogo de *CUGBP1* en *C. elegans*, *etr-1*, es necesario para el correcto desarrollo del músculo, y su inactivación causa parálisis corporal, entre otros defectos (Milne & Hodgkin, 1999).

7.2. Modelos en *Drosophila*

En el año 2005, Houseley *et al.* generaron el primer modelo en *Drosophila* de DM1. Dicho modelo se basaba en la expresión inducible de 162 repeticiones CUG en la región 3'UTR de transcritos GFP utilizando el sistema de expresión ectópica de transgenes Gal4/UAS (Brand & Perrimon, 1993). Al igual que en pacientes, Mbl colocalizaba en agregados nucleares con los ARNs de secuencia CUG. El número de dichas inclusiones, así como su intensidad, alcanzaban su máximo 8 horas tras la inducción de la expresión y desaparecían a los 2-4 días (dependiendo del tipo celular) una vez ésta había cesado. Estos resultados indican que las inclusiones nucleares son estructuras dinámicas y transitorias, y que su formación es un

proceso relativamente lento que requiere de factores específicos de tipo celular. Además, los autores demostraron que Mbl no es suficiente para la formación de inclusiones de ARN en el núcleo, ya que la sobreexpresión de *mbIA* o *mbIC* favorecía su aparición en unas células pero no en otras (Houseley *et al.*, 2005). En este modelo, la expresión de repeticiones no causaba ningún fenotipo, demostrando por primera vez que la formación de agregados nucleares, incluyendo el secuestro de Mbl, no es tóxica *per se*. Por otro lado, en nuestro laboratorio se generaron moscas que expresan 60 repeticiones CTG en un transcrito sin ORF. En estas moscas los ARN patológicos no forman inclusiones nucleares ni secuestran Mbl. No obstante, el *splicing* de los transcritos diana de Mbl *ZASP* y *troponina T (tnT)* está alterado (García-López *et al.*, 2008; Machuca-Tzili *et al.*, 2006; Vicente-Crespo *et al.*, 2008). En conjunto, estos datos apoyan la idea de que la formación de inclusiones **no** es una condición necesaria ni suficiente para causar fenotipos patológicos, al menos en *Drosophila*. En nuestro laboratorio (y otros grupos en paralelo), se describió que la expresión de expansiones largas de repeticiones CTG (CTG480) reproduce varios aspectos de la enfermedad en humanos, incluyendo el secuestro de MblC, alteraciones en el procesado de *tnT* y *ZASP*, degeneración progresiva de los músculos indirectos del vuelo (IFMs) y neurodegeneración de los fotorreceptores del ojo, entre otros fenotipos (Fig. 114) (de Haro *et al.*, 2006; García-López *et al.*, 2008). Estas moscas se utilizaron para llevar a cabo un rastreo genético en busca de genes capaces de modificar fenotipos provocados por las repeticiones CTG. En este trabajo se identificaron 15 modificadores genéticos, los cuales afectaban a procesos celulares hasta la fecha no relacionados con la DM1, incluyendo apoptosis o cambios en la matriz extracelular, además de genes implicados en la remodelación de la cromatina o el transporte de ARN mensajeros (García-López *et al.*, 2008). Posteriormente, parte de estos genes se han visto afectados en un modelo de DM1 en ratón (Du *et al.*).

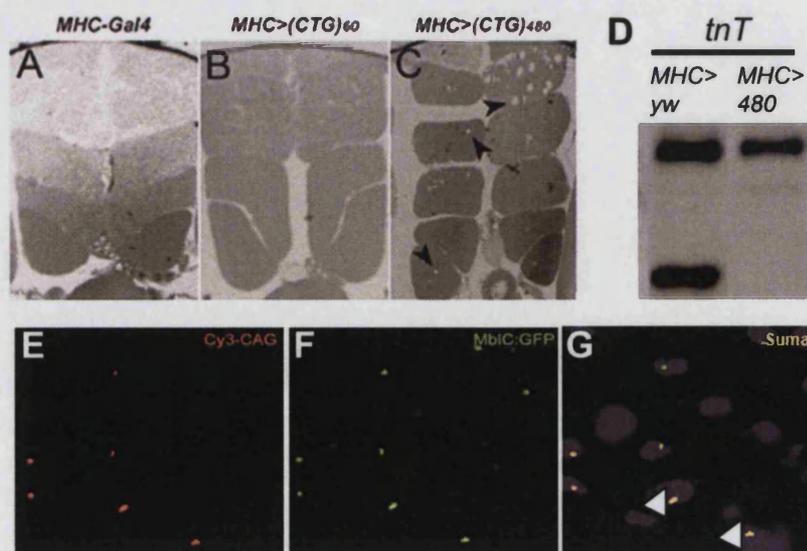


Figura 114. Fenotipos de la DM1 reproducidos en *Drosophila*. La expresión de repeticiones CTG en los músculos indirectos del vuelo (IFMs) causa degeneración y desorganización de los paquetes musculares (A-C, las flechas negras indican pérdida de fibras). Además, el procesado alternativo de la *tnT* está alterado (D). CUG480 secuestra a MblC formando agregados nucleares (E-G, flechas blancas). Imágenes tomadas de García-López *et al.*, 2008.

7.3. Modelos en ratón

En 2000, Mankodi *et al.* generaron un modelo de DM1 en ratón basado en la expresión de 250 repeticiones en la región 3'UTR del gen de la *actina* humana (*HSA^{LR}*) (Mankodi *et al.*, 2000). Estos animales desarrollaban miotonía y miopatía musculares entre otros fenotipos, los cuales eran reversibles por sobreexpresión de *Mbn1* (Kanadia *et al.*, 2006). A pesar de que este modelo proporcionó la primera evidencia *in vivo* a favor de la hipótesis de una ganancia de función tóxica del ARN y del papel clave de las proteínas Muscleblind, no reproducía algunas de las características típicas de la DM1, como la inestabilidad somática e intergeneracional o la debilidad y el desgaste muscular. Además, en estos ratones los niveles de la proteína Cugbp1 no estaban aumentados. Un grupo independiente generó un modelo que expresaba un transgén de 300 repeticiones CTG en su contexto humano (>45 kb). Estos ratones, reproducían aspectos clínicos de la enfermedad en el músculo y sistema nervioso central, y presentaban variaciones en el tamaño de las repeticiones en distintos tejidos (Seznec *et al.*, 2000), mostrando la tasa de inestabilidad intergeneracional más alta descrita en ratones (~90% de la descendencia), con incrementos de 9-20 repeticiones por generación. Alcanzado un valor de ~450 repeticiones CTG, estos animales comenzaron a sufrir expansiones dramáticas, alcanzando tamaños de más de 1000 repeticiones (Gomes-Pereira *et al.*, 2007). Orengo *et al.* generaron un modelo inducible de 960 repeticiones CTG en el contexto del exón 15 del gen *DMPK* humano. En estos ratones, la proteína Cugbp1 estaba aumentada. Además, los animales presentaban defectos de *splicing* similares a los pacientes de DM1, tres de los cuales (*Capzb*, *Fxr1* y *Ank2*) no ocurrían en ratones *knockout* de *Mbn1* ni en los ratones *HSA^{LR}*. Por último, este modelo reproducía el desgaste muscular típico de la DM1, hasta la fecha no descrito en ningún otro modelo. Estos resultados sugieren, por tanto, que este síntoma tiene su origen en alteraciones en los niveles de CUGBP1 y es independiente de MBNL1 (Orengo *et al.*, 2008). 6 horas después de la inducción de la expresión de las repeticiones en estos ratones, los autores detectaron una activación de la proteína kinasa K (PKC) (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007). Esta activación promovía la hiperfosforilación de Cugbp1 y su subsiguiente estabilización, causando en última instancia el aumento en la cantidad de proteína observada en los ratones. El tratamiento con el inhibidor de PKC Ro-31-8220 disminuía los niveles de proteína Cugbp1, así como también suprimía los problemas cardíacos y los defectos de *splicing* en el corazón dependientes de Cugbp1, pero no los regulados por Mbn1 (G. S. Wang *et al.*, 2009). Mahadevan *et al.*, desarrollaron un modelo inducible de 200 repeticiones CTG y 5 repeticiones CTG (control) fusionadas al extremo 3'UTR de *DMPK*. Sorprendentemente, la inducción de la expresión de 200 repeticiones CTG no causaba fenotipos, mientras que sí lo hacía en los ratones control (5 repeticiones). Estos síntomas incluían miotonía, defectos en la conducción cardíaca y alteraciones en el *splicing* de los transcritos *Clcn1* y *Tnnt3*. En estos ratones las repeticiones no formaban inclusiones nucleares ni secuestraban a Mbn1

(Mahadevan *et al.*, 2006). Sin embargo, los autores encontraron que los ratones con 5 repeticiones expresaban el transgén en niveles muy superiores a los animales con 200 tripletes y argumentan que niveles anormalmente altos de repeticiones cortas pueden llegar a tener un efecto similar a la expresión de repeticiones largas. En los modelos de Orengo y Mahadevan, las repeticiones CTG se expresan junto a la región 3'UTR de *DMPK*, mientras que en los ratones *HSA^{LR}* dicha porción del gen no está presente. Tal y como se ha comentado, los niveles de *Cugbp1* están elevados en los dos primeros modelos, pero no en el tercero. De manera interesante, sólo los pacientes de DM1, pero no DM2, tienen altos niveles de CUGBP1. De este modo, los resultados en ratón apoyan que el incremento de CUGBP1 podría depender de *DMPK*.

En conjunto, en tan sólo una década el estudio de la DM1 en modelos animales ha permitido demostrar la existencia de un mecanismo de ganancia de función tóxica de los ARN portadores de repeticiones CUG expandidas, así como el papel clave de la proteína MBNL1 en el desarrollo de la enfermedad, el cual es independiente de su colocalización con los ARN tóxicos en el núcleo, y ha identificado síntomas dependientes de la proteína CUGBP1, la cual a su vez responde a cambios en los niveles de *DMPK*.

8. Tratamientos y terapias contra la DM1

A pesar de que la Distrofia Miotónica fue descrita por primera vez en 1909, todavía no se dispone de una terapia eficaz. Todos los tratamientos que se aplican son paliativos y ayudan a frenar el desarrollo de síntomas, pero en ningún caso evitan su aparición. En la actualidad no existe ningún compuesto capaz de revertir la falta de la conductancia al cloro para reducir la miotonía. Algunos compuestos, como el mexilitil, quinidina, fenitoína, procainamida o carbamazepina, que inhiben la entrada de sodio necesario para el inicio y propagación de impulsos, se administran a los pacientes con el fin de tratar este síntoma. En ocasiones, dichas moléculas se utilizan a su vez como tratamiento para las arritmias cardíacas (Kurihara, 2005), por lo que dado el riesgo que implican por su efecto sobre la función cardíaca es preferible evitar su uso como antimiotónicos. Además, muchos de estos tratamientos disminuyen la fuerza muscular. Otro inhibidor de canales de sodio, el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), se ha ensayado en pacientes en los que parece disminuir con éxito la miotonía y los problemas cardíacos, sin potenciar la debilidad muscular (Nakazora & Kurihara, 2005; Sugino *et al.*, 1998). El DHEAS es una hormona esteroidea presente de manera abundante en el suero y cuyos niveles disminuyen con la edad. En los pacientes de DM1 esta hormona está reducida hasta un 60% (Carter & Steinbeck, 1985). Sin embargo, la dosis efectiva del DHEAS es muy

alta, por lo que ha de administrarse por vía intravenosa, lo cual supone un inconveniente para su uso como tratamiento crónico. En algunos casos se administra creatinina junto con DHEAS para incrementar la fuerza muscular. Sin embargo, a pesar de que los primeros ensayos clínicos con creatinina en pacientes mostraron resultados prometedores, los estudios posteriores no son tan positivos (Tarnopolsky *et al.*, 2004). Otros fármacos ensayados para tratar la miotonía comprenden antidepresivos tricíclicos, benzodiazepinas, antagonistas del ión calcio, taurina o prednisona, con resultados contradictorios (Trip *et al.*, 2006).

Ante la necesidad de encontrar nuevas terapias eficaces que abarquen el mayor número de síntomas posible, en los últimos años se han llevado a cabo múltiples estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (Tabla I6). La expresión de 250 repeticiones CTG fusionadas al reportero luciferasa en un modelo celular de la línea neuronal PC12 causa toxicidad a dos niveles: en cis, afectando a la cantidad de transcritos reporteros, y en trans, dando lugar en última instancia a la muerte de las células (Furuya *et al.*, 2005). Utilizando este modelo, los autores rastrearon 235 moléculas de naturaleza flavonoide y encontraron que los compuestos naringenina, ononina y la xantina eran capaces de reducir ambos tipos de toxicidad. Otros ensayos en células de pacientes en cultivo identificaron moléculas capaces de disminuir la tasa de expansión somática de las repeticiones CTG (Gomes-Pereira & Monckton, 2004). No obstante, estos tratamientos incluyen compuestos altamente genotóxicos, como el bromuro de etidio o el peróxido de hidrógeno, cuya administración en pacientes es inviable. Jung y Bonini observaron que alimentando a moscas modelo de SCA3 con el inhibidor de las proteínas histona deacetilasas (HDAC) tricostatina A (TSA) la tasa de inestabilidad intergeneracional de las repeticiones se reducía (Jung & Bonini, 2007), aunque en este caso la toxicidad venía dada por repeticiones CAG.

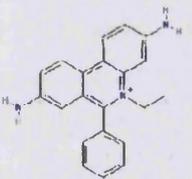
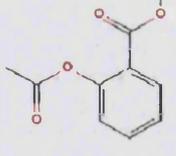
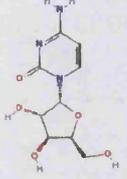
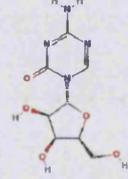
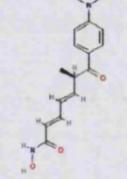
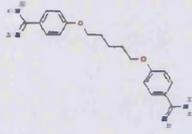
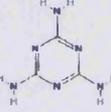
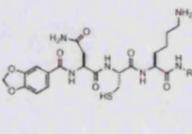
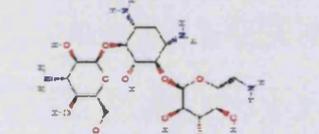
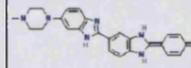
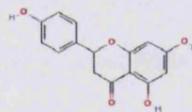
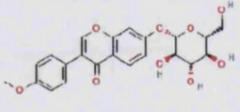
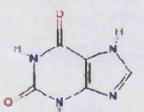
Basándose en la idea de que el secuestro y subsiguiente pérdida de función de las proteínas Muscleblind es el principal desencadenante de la enfermedad, algunos autores han desarrollado estrategias para encontrar moléculas que inhiban la interacción entre MBNL1 y las repeticiones CUG (Tabla I6). Gareiss *et al.* identificaron los primeros ejemplos de compuestos capaces de inhibir dicha interacción *in vitro* utilizando una aproximación de química combinatoria dinámica. Los autores rastrearon una quimioteca de un tamaño teórico de 11.325 compuestos usando un modelo de ensayo competitivo, y encontraron cuatro moléculas de secuencia muy similar ((Quin/Pip)-(Asn/Pro)-Cys-Lys) capaces de desplazar a MBNL1 en la unión a las repeticiones (Gareiss *et al.*, 2008). En 2009, Warf *et al.* utilizaron un ensayo de retardo en gel para rastrear una pequeña colección de 26 compuestos con capacidad conocida de unión a ácidos nucleicos con estructura secundaria. Los antibióticos pentamidina y neomicina B, así como el bromuro de etidio y el naranja de tiazol, inhibieron la unión de MBNL1 a las repeticiones CUG. Además, la pentamidina revertía los defectos de *splicing* de los

transcritos *IR* y *TNNT2* en células HeLa en cultivo, y reducía en un 21% la formación de inclusiones nucleares que contenían MBNL1. En ratones modelo de DM1, la pentamidina mejoró de manera discreta el *splicing* del *Ctcf-1* y *Serca1*, aunque sin una respuesta a dosis clara. De este modo, la pentamidina se convirtió en el primer ejemplo de molécula identificada *in vitro* con un efecto terapéutico potencial sobre las repeticiones CUG *in vivo*. No obstante, los autores encontraron que este compuesto podía afectar al procesado de otros transcritos diana de MBNL1 en ausencia de repeticiones, lo que podría contrarrestar su valor terapéutico a largo plazo (Warf, Nakamori *et al.*, 2009). Arambula *et al.*, mediante un diseño racional de fármacos, desarrollaron una molécula basada en la estructura tridimensional de las repeticiones CTG y/o CUG, cuya diana fuesen los desapareamientos T-T o U-U (Arambula *et al.*, 2009). A pesar de que ya se conocían moléculas pequeñas capaces de unirse a G-G, C-C o A-A (X. Li *et al.*, 2007), hasta la fecha no se había encontrado ningún compuesto que se uniese a T-T o U-U de manera selectiva. Los autores identificaron que el ligando formado por triaminotriazina (el cual interacciona con desapareamientos T-T y U-U) más el agente intercalante acridina se unía a repeticiones CTG y CUG de manera específica e inhibía la unión de los dedos de zinc de MBNL1 a CUG. Siguiendo la misma estrategia, Pushechnikov *et al.* diseñaron un pentámero del compuesto Hoechst 33258 capaz de unirse a repeticiones CUG y CAG e inhibir la formación de complejos ARN-MBNL1 en ambos casos (Pushechnikov *et al.*, 2009). En el mismo laboratorio se desarrolló en paralelo un ligando con alta afinidad por moléculas de ARN con dos desapareamientos internos ricos en pirimidinas, como los formados por las repeticiones CCUG en la DM2. Este compuesto consistía en tres módulos de 6'-N-5-hexinoato de kanamicina A unidos a un esqueleto peptóide y separados entre sí por cuatro monómeros espaciadores (M. M. Lee, Pushechnikov *et al.*, 2009). Reducir el número de espaciadores de cuatro a dos convertía a esta molécula en un ligando con mayor afinidad por repeticiones CUG que CCUG (M. M. Lee, Childs-Disney *et al.*, 2009).

Todas estas estrategias tienen dos ventajas principales: la proteína MBNL1 se libera, lo que revertiría un gran número de defectos de *splicing*. Además, al disiparse las inclusiones nucleares habría más transcritos *DMPK* libres en el citoplasma para traducirse. Sin embargo, la redistribución de los ARN mutantes podría tener un nuevo efecto tóxico. Aunque la formación de agregados de CUG y Mbnl1 en el citoplasma de cardiomiocitos no causa defectos en ratones (Dansithong *et al.*, 2008), otras proteínas podrían verse afectadas a corto o largo plazo. Además, las moléculas que interfieren con la unión entre MBNL1 y CUG podrían también inhibir la unión de MBNL1 a otros transcritos diana en el núcleo, tal y como se ha descrito en el caso de la pentamidina (Warf, Nakamori *et al.*, 2009), o interferir con otras proteínas con un mecanismo de unión al ARN similar a MBNL1. Por último, cualquier aproximación terapéutica basada en MBNL1 presenta la limitación de que no toda la toxicidad de las repeticiones CUG

se debe al secuestro de esta proteína. No obstante, algunos autores sugieren que esto podría solventarse con el uso de terapias combinadas con, por ejemplo, inhibidores de PKC, los cuales revierten fenotipos dependientes de Cugbp1 (Cooper, 2009; Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007).

Tabla I6. Compuestos con actividad descrita sobre las repeticiones CTG/CUG ⁽¹⁾

Moléculas que reducen la tasa de inestabilidad de las repeticiones					
Bromuro de Etidio	Peróxido de Hidrógeno	Ácido acetyl salicílico	AraC	5-azacitidina	Tricostatina A†
					
(Gomes-Pereira, 2004)	(GP, 2004)	(GP, 2004)	(GP, 2004)	(GP, 2004)	(Jung, 2007)
Moléculas que desplazan la unión de MBNL1 a repeticiones CUG					
Pentamidinat†	Triaminotriazina sobre acridina	(Quin/Pip)- (Asn/Pro)-Cys-Lys ⁽²⁾	Unidades 6'-N-5-hexionato kanamicina A sobre un esqueleto peptide	Pentámero de Hoechst 33258	
					
(Warf, Nakamori <i>et al.</i> , 2009)	(Arambula <i>et al.</i> , 2009)	(Gareiss <i>et al.</i> , 2008)	(M. M. Lee, Childs-Disney <i>et al.</i> , 2009)	(Pushechnikov <i>et al.</i> , 2009)	
Moléculas con mecanismo de acción desconocido					
Naringenina	Ononina	Xantina			
					
(Furuya <i>et al.</i> , 2005)	(Furuya <i>et al.</i> , 2005)	(Furuya <i>et al.</i> , 2005)			

Para aquellas moléculas de ensamblaje modular se muestra tan sólo la estructura de la unidad que se repite

(1) Estructuras obtenidas de PubChem a excepción del caso (2).

(2) Estructura obtenida de Gareiss *et al.*, 2009. De las cuatro combinaciones posibles tan sólo se muestra el ejemplo de Pip-Asn-Cys-Lys.

† Indica molécula ensayada *in vivo*.

La mayoría de enfermedades neuromusculares tienen su origen en mutaciones en un único gen y son, por tanto, buenas candidatas para el desarrollo de terapias génicas. Sin embargo, en el caso de la DM1 los tejidos involucrados son principalmente post-mitóticos, lo que supone un inconveniente frente a la mayoría de vectores virales. En este sentido, se ha propuesto que utilizar moléculas como los oligonucleótidos antisentido (ONAs) podría resultar ventajoso. Los oligonucleótidos antisentido no aportan una copia del gen, sino que modulan los productos de

un gen existente. En la actualidad, varias moléculas basadas en esta estrategia se encuentran ya en fase clínica (Bonetta, 2009). Un ejemplo es el caso de la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD, OMIM #300377), para la cual la empresa AVI Biopharma posee dos moléculas en fase preclínica en los Estados Unidos, una de las cuales se encuentra en fase clínica 1b/2 en el Reino Unido (www.avibio.com). En 2007, Wheeler *et al.* usaron ONAs específicos de los transcritos *Cln-1* en ratones modelo que expresan 250 repeticiones CTG, así como en ratones *knockout* de *Mbn1*, y estudiaron su efecto sobre el *splicing* del exón 7a. En ambos modelos una sola inyección en el músculo tibial anterior recuperó el patrón de *splicing* normal de los transcritos *Cln-1* durante al menos tres semanas, revirtiendo la miotonía (Wheeler *et al.*, 2007). Sin embargo, debido al amplio número de mensajeros cuyo procesado se encuentra alterado en los pacientes, deberían combinarse varios ONAs con dianas diferentes para tratar los distintos síntomas de una manera eficaz. Una alternativa al uso combinado de ONAs es utilizar oligonucleótidos antisentido que actúen a nivel de los transcritos *DMPK* con el fin de eliminar la fuente de toxicidad. Ya en 1996, Galderisi *et al.* intentaron inhibir la expresión de *DMPK* en células de pacientes en cultivo utilizando ONAs específicos. Sin embargo, esta aproximación no discriminaba entre transcritos mutantes y transcritos salvajes (Galderisi *et al.*, 1996). Disminuir la expresión total de *DMPK* podría resultar igualmente patológico dada la importancia de *DMPK* en la función cardíaca y el metabolismo de la insulina (Kaliman *et al.*, 2005; Llagostera *et al.*, 2007). Varios trabajos en 2009 utilizaron ONAs formados por repeticiones CAG (CAG7 o CAG25) con el fin de dirigir su efecto preferentemente sobre los transcritos con repeticiones CUG largas (Mulders *et al.*, 2009; Wheeler *et al.*, 2009). Estos oligos revirtieron los defectos de *splicing* del *Cln-1*, además de reducir hasta un 50% los niveles de transcritos CUG mutantes de manera específica, tanto en mioblastos en cultivo como en ratones modelo de DM1, probablemente debido a que la unión de secuencias cortas de repeticiones CAG a los ARNs tóxicos promueve el desplegamiento de la horquilla e impide el secuestro de proteínas como MBNL1.

En conjunto, en los últimos años se ha identificado un número creciente de moléculas con potencial terapéutico contra Distrofia Miotónica. Sin embargo, existen todavía muy pocos datos *in vivo* que validen el efecto terapéutico de las moléculas identificadas. Por esta razón, es necesario continuar y ampliar los esfuerzos por parte de la comunidad científica con el fin de encontrar fármacos eficaces que abarquen el mayor número de síntomas posibles.

9. Los rastreos de colecciones de compuestos como herramienta para la identificación de nuevas terapias

9.1. Drosophila como modelo para la búsqueda de fármacos

Drosophila se ha utilizado extensamente en prácticamente todas las áreas de la biología, incluyendo campos como la genética, neurobiología, bioquímica o biología del desarrollo, entre otros. En los últimos años, la gran cantidad de herramientas genéticas disponibles en la mosca ha ofrecido en muchos casos rutas alternativas atractivas para el estudio de mecanismos moleculares de enfermedades humanas. El 50% de los genes en el genoma de *Drosophila* está conservado respecto a organismos superiores y el 75% de los loci implicados en patologías tienen ortólogo en la mosca (Reiter *et al.*, 2001). Las enfermedades neurodegenerativas y neuromusculares han sido particularmente estudiadas en *Drosophila*, ya que éstas suelen estar causadas por la ganancia de función de un único gen. Dicho gen puede expresarse, sobreexpresarse o silenciarse en tejidos y momentos del desarrollo concretos en la mosca mediante la generación de líneas transgénicas y el uso del sistema Gal4/UAS (Brand & Perrimon, 1993; Duffy, 2002). Una estrategia ampliamente aplicada en *Drosophila* son los rastreos genéticos de modificadores dominantes, con el fin de identificar nuevos genes implicados en rutas y mecanismos celulares concretos. Estos rastreos han ayudado a identificar componentes patológicos en enfermedades como HD, SCA1, SCA3 y SCA8, Síndrome del X frágil o DM1 (Branco *et al.*, 2008; Cziko *et al.*, 2009; Fernandez-Funez *et al.*, 2000; Garcia-Lopez *et al.*, 2008; Mutsuddi *et al.*, 2004). Del mismo modo, los rastreos genéticos han contribuido a detectar proteínas con actividades potencialmente susceptibles de manipulación farmacológica, aportando nuevas dianas terapéuticas. Siguiendo dicha estrategia, diferentes autores identificaron genes modificadores implicados en el control de la transcripción en modelos en mosca de distintas enfermedades poliQ (Fernandez-Funez *et al.*, 2000; Kazemi-Esfarjani & Benzer, 2000), lo cual llevó a demostrar por primera vez *in vivo* que la actividad de las proteínas acetiltransferasas (AT) estaba reducida, mediante experimentos en *Drosophila* en los que se modificaba genética y farmacológicamente la actividad de sus antagonistas, las histona deacetilasas (HDAC) (Steffan *et al.*, 2001). Estos resultados dieron pie a sugerir terapias que potenciasen los mecanismos de transcripción en las células, las cuales han funcionado posteriormente en modelos mamíferos de enfermedades causadas por repeticiones CAG (Hockly *et al.*, 2003).

A pesar de la popularidad del uso de *Drosophila* en la búsqueda de modificadores genéticos, su utilización en búsquedas sistemáticas de compuestos con actividad terapéutica es un campo nuevo en crecimiento en la actualidad. El objetivo de la genética química es identificar compuestos que consigan interferir de manera específica con el producto de genes concretos. Los compuestos identificados de este modo proporcionan terapias potenciales para tratar enfermedades en las que sea necesario interferir con la actividad del gen en cuestión. En *Drosophila*, se han ensayado con éxito moléculas químicas bien de manera individual o utilizando colecciones a escala reducida. En 2006, Stilwell *et al.* administraron los compuestos

neuroactivos antiepilépticos fenitoína y nifedipina en un modelo de epilepsia en mosca (Stilwell *et al.*, 2006). Agrawal *et al.* usaron un modelo de Huntington para explorar el uso de terapias combinatorias de los fármacos SAHA, cistamina, rojo congo, Y-27632 y geldanamicina, con el fin de determinar efectos aditivos o sinérgicos al abordar varios mecanismos de acción conjuntamente (Agrawal *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta la fecha pocos artículos describen el uso de rastreos químicos a gran escala en *Drosophila*. En 2008, Chang *et al.* utilizaron una colección de 2000 compuestos de actividad biológica conocida utilizando un modelo de Síndrome del X frágil en *Drosophila*. Este trabajo llevó a los autores a identificar 9 moléculas, 3 de las cuales tenían efectos inhibitorios sobre el sistema GABAérgico (consistente con las alteraciones en los receptores GABA asociadas a la enfermedad), y a proponer, además, que los receptores colinérgicos muscarínicos podrían jugar un papel en el síndrome del X frágil (Chang *et al.*, 2008). En 2006, Jaklevic *et al.* llevaron a cabo un rastreo utilizando una quimioteca formada por 1990 moléculas y encontraron 3 fármacos capaces de potenciar el efecto del tratamiento por radiación en moscas modelo de cáncer (Jaklevic *et al.*, 2006).

En nuestro laboratorio disponemos de un modelo de DM1 en *Drosophila*, el cual expresa 480 repeticiones CTG mediante el sistema de expresión de transgenes Gal4/UAS (García-Lopez *et al.*, 2008). De manera similar a lo descrito en los ejemplos anteriores, este modelo podría constituir una herramienta adecuada para el rastreo colecciones de compuestos capaces de paliar la toxicidad causada por las expansiones CTG.

9.2. Las quimiotecas combinatorias de péptidos

El descubrimiento de moléculas nuevas es un proceso lento y complejo. Históricamente, los productos naturales, aislados a partir de plantas, animales o procesos de fermentación, han sido la principal fuente de compuestos biológicamente activos. Sin embargo, con la introducción de la química combinatoria (QC) en la investigación farmacéutica el número de moléculas de interés terapéutico se ha incrementado considerablemente, a la vez que se ha reducido el tiempo y coste asociados a su producción, dando lugar a la identificación de moléculas sintéticas capaces de interactuar con distintos componentes implicados en patologías. La QC se basa en el uso de colecciones o quimiotecas combinatorias, las cuales se caracterizan por contener todas las combinaciones posibles de una misma clase de molécula. Los primeros precedentes del uso de péptidos en química combinatoria datan de 1963, cuando el científico americano Bruce Merrifield, de la Universidad de Rockefeller (NY), desarrolló un sistema de fabricación de péptidos anclando la molécula peptídica a un soporte sólido durante el proceso de elaboración (Merrifield, 1963), trabajo por el cual recibió el Premio Nobel de Química en 1984. Sin embargo, hasta mediados de los años 80 esta tecnología todavía no estaba extendida y no fue hasta 1991 cuando en el laboratorio de Richard Houghten (Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, California) se obtuvo la primera quimioteca

soluble, formada por más de un millón de péptidos diferentes. Los primeros usos con fines biomédicos de estas colecciones consistían en la búsqueda de secuencias peptídicas con actividad bactericida. No obstante, con el paso del tiempo las quimiotecas combinatorias de péptidos se han empleado en un número creciente de aplicaciones, entre las que destaca la identificación de péptidos capaces de interferir con mecanismos implicados en el desarrollo de tumores, entre otros (Blondelle *et al.*, 1995; Denholt *et al.*, 2009; Houghten *et al.*, 1992; Houghten *et al.*, 1991; E. Y. Kim *et al.*, 2008).

A pesar del uso cada vez más extendido de las quimiotecas combinatorias de péptidos, no existen hasta la fecha precedentes de su aplicación *in vivo* en *Drosophila*. En la actualidad, el desarrollo de un nuevo fármaco supone un coste de más de 800 millones de dólares y una media de 15 años hasta la puesta en el mercado (Tufts Center for the Study of Drug Development, 2001). El 80% del gasto del desarrollo de fármacos se debe principalmente a abandono durante la fase preclínica, en la cual moléculas candidatas identificadas *in vitro* se ensayan en modelos animales. La eficacia terapéutica de una molécula depende no sólo de su capacidad para interferir en una etapa específica de una reacción enzimática, sino además de su comportamiento en cuanto a absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (propiedades ADMET) a nivel del organismo completo, parámetros que no se consideran en los ensayos *in vitro*. De este modo, la combinación de la QC y el uso de organismos modelo, como *Drosophila*, se presenta como una poderosa herramienta para el descubrimiento y validación de nuevos fármacos y dianas terapéuticas.

Objetivos



Objetivos

La mutación causante de la Distrofia Miotónica se identificó por primera vez en 1992, estableciéndose en 2001 el modelo de ganancia de función tóxica del ARN como principal causa de la enfermedad. A pesar de que no existe en la actualidad una terapia eficaz con la que combatir la DM1, en menos de 18 años ha tenido lugar un gran avance tanto en el entendimiento de los aspectos moleculares de la enfermedad, como en la búsqueda de moléculas activas contra alteraciones clave en su desarrollo. Particularmente interesante son los resultados obtenidos en un modelo inducible de DM1 en ratón, los cuales demostraron que el interrumpir la expresión de transcritos con repeticiones CTG en animales adultos puede revertir al menos algunos fenotipos patológicos (Mahadevan *et al.*, 2006). Esto indica que al menos parte de los síntomas de los pacientes no son irreversibles y podrían recuperarse de encontrarse un tratamiento capaz de neutralizar estos ARNs tóxicos.

Los organismos modelo invertebrados, por su bajo coste de mantenimiento y por proporcionar un entorno fisiológico complejo, permiten llevar a cabo identificación de compuestos biológicamente activos mediante cribado de colecciones de moléculas de bajo peso molecular capaces de interferir con un proceso celular alterado. En nuestro laboratorio disponemos de un modelo en *Drosophila* que expresa 480 repeticiones CTG mediante el sistema de expresión de transgenes Gal4/UAS (García-López *et al.*, 2008). Estas moscas reproducen los aspectos más relevantes de la enfermedad en humanos, incluyendo el secuestro de Mbl, por lo que constituyen un sistema adecuado para el rastreo colecciones de compuestos capaces de interferir con la toxicidad de las repeticiones CTG *in vivo*.

Teniendo en cuenta lo expuesto, en este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo 1. Utilizar un modelo de toxicidad de repeticiones CTG en *Drosophila* previamente generado en nuestro laboratorio (García-López *et al.*, 2008) para el rastreo de fármacos en formato de colecciones químicas, con el fin de identificar compuestos con actividad biológica relevante para tratar la DM1.

Objetivo 2. Determinar el mecanismo de acción por el cual las moléculas identificadas ejercen su efecto *in vivo* sobre la toxicidad de repeticiones CTG.

Objetivo 3. Validar la eficacia de las moléculas identificadas en *Drosophila* utilizando modelos vertebrados de DM1.

Resultados

Resultados

1. La expresión de repeticiones CTG en los Cuerpos de Seta de *Drosophila* es tóxica

Los Cuerpos de Seta de *Drosophila* (MB, del inglés *Mushroom Bodies*) forman junto a los lóbulos ópticos las estructuras de mayor tamaño del cerebro de la mosca (Fig. R1). Se trata de un órgano implicado en aprendizaje, memoria y comportamiento común a todos los artrópodos (Strausfeld y col., 1998). Los MB a menudo se comparan con el córtex frontal de vertebrados y un gran número de los genes implicados en su desarrollo temprano muestra homología con genes relacionados con el desarrollo de regiones del cerebro anterior (o prosencéfalo) en mamíferos. En *Drosophila*, los MB son una estructura bilateral y cada mitad está formada por tres lóbulos principales constituidos en su mayoría por axones (α/α' , γ y β/β'), y por un cáliz que contiene los somas o células Kenyon.

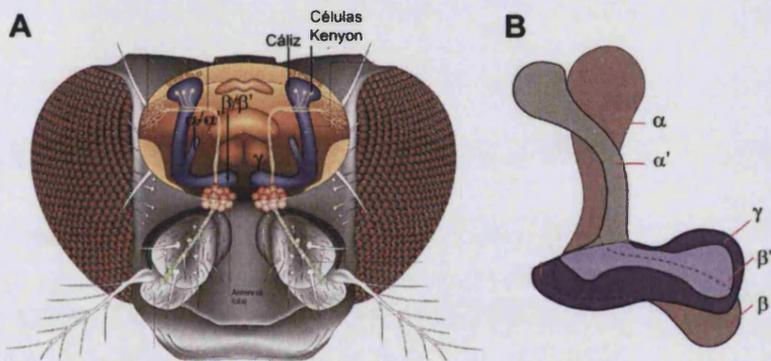
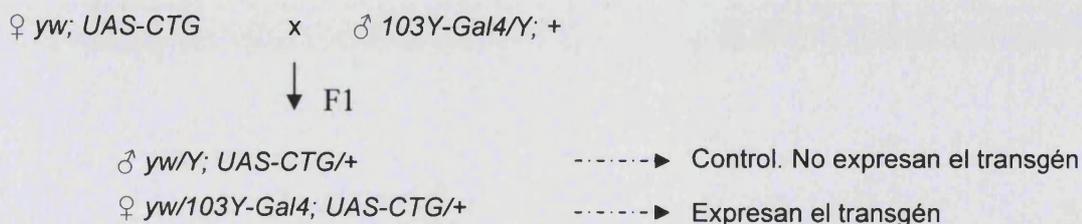


Figura R1. Estructura bilateral de los Cuerpos de Seta (MB) de *Drosophila*. Los MB están formados por un entramado de neuronas y glía que tienen su origen en 4 neuroblastos presentes ya en el embrión (A; figura modificada de (Heisenberg, 2003). (B) Esquema que muestra la estructura lobulada típica de los MB desde un plano anterior (figura tomada de Flybrain).

Dada la implicación del Sistema Nervioso Central (SNC) en la DM1, decidimos estudiar el efecto de la expresión de repeticiones CTG en el cerebro de la mosca usando una línea Gal4 específica de los MB (*103Y-Gal4*). Puesto que la construcción Gal4 en cuestión se encontraba insertada en el cromosoma X, si cruzábamos hembras *yw; +; UAS-CTG* por machos *103Y-Gal4/Y; +* tan sólo las hembras de la F1 expresarían el transgén con las repeticiones, mientras que los machos no lo harían y servirían como control, tal y como se muestra a continuación:



El sistema Gal4/UAS de expresión ectópica de transgenes en *Drosophila* es dependiente de temperatura (ver Apéndice 1), dando lugar a niveles mayores de expresión conforme la

temperatura aumenta (Duffy, 2002). La expresión de 480 repeticiones CTG, (CTG)480, en los MB provocaba un fenotipo de letalidad en estadio de pupa madura extremadamente sensible a cambios en la temperatura, con efectos significativos en el fenotipo para incrementos de tan sólo 1°C. Así, mientras la expresión de (CTG)480 entre 21°C y 27°C no causaba letalidad, ésta era del 94% a 29°C y del 56% a 28°C. El análisis estadístico de estos datos reveló que el 50% de la letalidad causada por (CTG)480 se alcanzaba a una temperatura de 27.9°C (Fig. R2A). La expresión de un transgén control portador de un número menor de repeticiones, (CTG)60, no resultó tóxica en ningún caso (Fig. R2A).

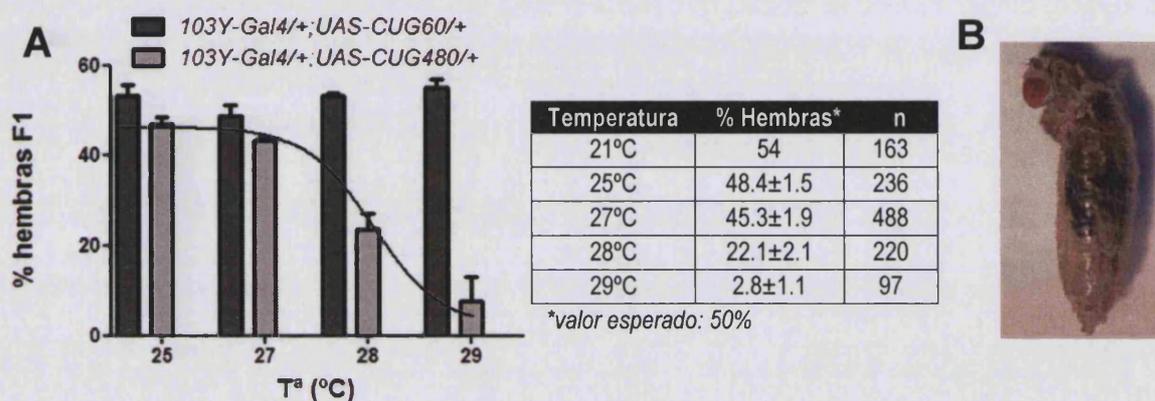


Figura R2. La expresión de (CTG)480 en los MB de *Drosophila* causa letalidad dependiente de temperatura. (A) La expresión de (CTG)480 en hembras *yw/103Y-Gal4; UAS-CTG/+* a 21°C, 25°C ó 27°C no causaba letalidad. A 28°C el porcentaje de hembras en la F1 era del 22%, mientras que a 29°C éste era del 2.8% frente a un valor esperado del 50% en todos los casos. El análisis de los datos mediante un test no lineal confirmó que el punto de inflexión de la curva (punto en el cual la letalidad es del 50%) correspondía a una temperatura de $27.89 \pm 0.29^\circ\text{C}$. La expresión de (CTG)60 no causó efecto sobre la viabilidad de las moscas a ninguna temperatura. (B) A 28°C un gran número de hembras aparecían muertas durante la eclosión de la pupa. Si se facilitaba la apertura del opérculo de manera manual emergía una mosca viable. Las barras en (A) representan valores promedio y su error estándar.

A 28°C un alto porcentaje de hembras aparecían muertas con el cuerpo parcialmente fuera de la pupa (Fig. R2B). Esto sugería que los individuos podrían morir en el interior del pupario debido a que no lograban abrir con éxito el opérculo. Para comprobar esto, abrimos el pupario con ayuda de unas pinzas y extrajimos del interior moscas perfectamente formadas, viables y fértiles. Por tanto, la incapacidad de completar los movimientos necesarios llegado el momento de la eclosión hacía letal la expresión de (CTG)480 en el cerebro.

2. La destrucción química de los MB suprime parcialmente la letalidad provocada por la expresión de repeticiones CTG

De Belle y Heisenberg (1994) describieron que alimentar a larvas de primer estadio larvario (L1) con el fármaco citostático Hidroxiurea provoca una destrucción parcial de los MB al

impedir la proliferación de los neuroblastos que los originan al inicio del estadio larvario (de Belle & Heisenberg, 1994). Los autores describieron que los individuos sin MB alcanzan el estadio adulto y son perfectamente viables, sin más fenotipo que una reducción en su capacidad de aprendizaje. Esto sugiere que los MB no son un órgano imprescindible para la supervivencia de las moscas. No obstante, la expresión de repeticiones CTG en los MB resultaba letal. Esto podría deberse a varios motivos. Por un lado, se sabe que en ocasiones las líneas Gal4 dirigen la expresión de los transgenes a más de un solo tejido. Por esta razón, decidimos comprobar que la letalidad producida por (CTG)480 se debía a su expresión y consiguiente efecto tóxico en los MB, y no en otras células de la mosca. Para ello, utilizamos 6 líneas independientes descritas como específicas para los MB (www.fly-trap.org). Si la expresión de tripletes CTG en los MB era letal encontraríamos fenotipos semejantes en al menos alguna de dichas líneas. Las líneas *201Y-Gal4* y *H24-Gal4* no mostraron efectos significativos sobre la supervivencia de las moscas a 21°C, 25°C y 29°C, mientras que para las líneas *045Y-Gal4*, *238Y-Gal4*, *c739-Gal4* y *OK107-Gal4* observamos valores de supervivencia menores respecto a los controles. Esta reducción era proporcional a la temperatura (Fig. R3). La letalidad observada en las líneas *238Y* y *c739* ocurría, al igual que para la línea *103Y*, en estadio de pupa madura y la línea *c739* dio lugar a moscas incapaces de completar la eclosión de la pupa, tal y como se ha descrito para *103Y*. Todas las líneas utilizadas inician su expresión en los MB en estadio larvario a excepción de la línea *238Y*, cuya expresión comienza ya desde el embrión. Es precisamente esta línea de inicio más temprano la que mostraba un fenotipo de letalidad más fuerte. En conjunto, estos datos apoyan la idea de que los MB son la estructura de la mosca donde la presencia de repeticiones CTG resulta tóxica.

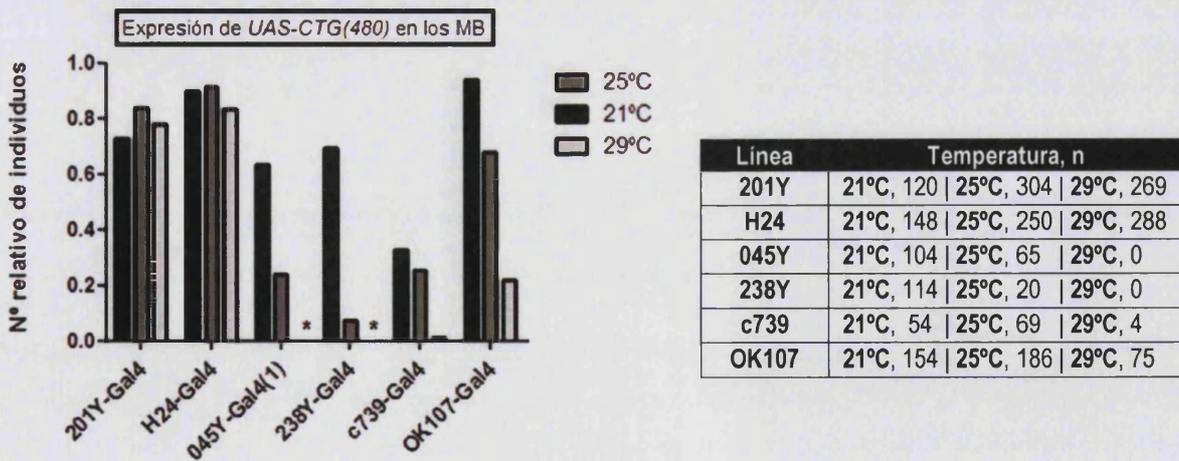


Figura R3. Expresión de las repeticiones CTG utilizando distintas líneas Gal4 específicas de los MB. La expresión de (CTG)480 con las líneas 201Y y H24 no afectó significativamente a la supervivencia de los individuos, mientras que la expresión con las líneas 045Y, 238Y, c739 y OK107 resultó tóxica de manera dependiente de temperatura. En todos los casos el número relativo de individuos corresponde al número total de descendientes procedentes de 3 cruces independientes normalizado respecto al valor del control en cada caso (ie., línea Gal4 empleada cruzada por moscas *w¹¹¹⁸*). * Indica letalidad del 100%.

La destrucción química de las neuronas que forman los MB en los experimentos de De Belle y Heisenberg conlleva una pérdida de la función de las mismas. Por tanto, cabía la posibilidad de que el efecto tóxico de las repeticiones CTG no se debiese a una pérdida de las células de los MB, sino a su incorrecto funcionamiento. De ser éste el caso, esperaríamos que el tratamiento con Hidroxiurea incrementase la viabilidad de las moscas, al estar eliminando parte de las neuronas cuya actividad se ve alterada de manera tóxica por la expresión de (CTG)480. Así, alimentamos a larvas L1 de genotipo *yw/103Y-Gal4; UAS-(CTG)480/+* y *yw/Y; UAS-(CTG)480/+* (control) con Hidroxiurea tal y como describieron los autores. Para comprobar que el tratamiento estaba funcionando, diseccionamos cerebros de moscas que expresaban la proteína fluorescente verde (GFP) de manera específica en los MB (*238Y-Gal4 UAS-GFP/+*) y que habían sido alimentadas con el fármaco. La mayoría de los cerebros diseccionados mostraba una desaparición casi total de los lóbulos β y α , mientras que algunos conservaban parte de los lóbulos γ (Fig. R4A-B). Esto coincide con lo descrito por los autores, pues las neuronas de los lóbulos gamma tienen origen embrionario y, por tanto, su formación es anterior al tratamiento. El porcentaje de hembras de genotipo *yw/103Y-Gal4; UAS-CTG₄₈₀/+* nacidas experimentó un incremento del 30% tras el tratamiento con Hidroxiurea (n=139), mejora considerable teniendo en cuenta que la desaparición de los MB no es total, sino que los lóbulos γ persisten (Fig. R4C).



Figura R4. Efecto del tratamiento con Hidroxiurea sobre la toxicidad de (CTG)480. (A) La expresión de la proteína GFP utilizando la línea *238Y-Gal4* pone de manifiesto la estructura tripartita de los MB (lóbulos α , γ y β). (B) Los individuos alimentados con Hidroxiurea carecían de lóbulos β y α , y poseían lóbulos γ desorganizados. (C) La pérdida de neuronas que expresaban (CTG)480 incrementó el número relativo de hembras nacidas en un 30%. Este número se calculó normalizando el número de hembras adultas eclosionadas respecto al número de machos tratados nacidos en el mismo tubo (control de toxicidad) y respecto al número de hembras nacidas no tratadas. Las barras en (C) representan valores promedio y su error estándar. * indica p -valor < 0.05 (test t).

3. *mb1* modifica el fenotipo de letalidad inducido por la expresión de repeticiones CTG en los MB

Para demostrar la relevancia del fenotipo de letalidad observado y su relación con la ruta de patogénesis de la DM1, ensayamos la interacción genética entre dicho fenotipo y la falta de función del gen *mb1*. Dado que las repeticiones CUG secuestran a Mbl en forma de agregados en el núcleo, la introducción en heterocigosis del alelo nulo *mb1^{E27}* (Begemann *et al.*, 1997) debería potenciar la letalidad inducida por los tripletes. En efecto, cuando las moscas que expresaban (CTG)480 en los MB eran además portadoras del alelo *mb1^{E27}* la letalidad se veía potenciada un orden de 6 veces (Fig. R5). Así, en el primer caso, de un total de 214 individuos nacidos tan sólo 32 eran hembras (lo que supone un 15% frente al 50% esperado), mientras que en el segundo caso tan sólo obtuvimos 5 hembras del genotipo de interés de un total de 368 moscas (1.3% frente a un 25% esperado). Cabe destacar que la presencia del alelo *mb1^{E27}* en heterocigosis no producía ningún fenotipo por sí sola.

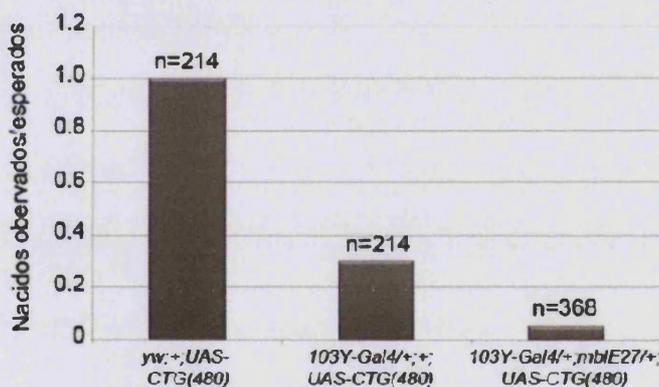


Figura R5. *mb1* potencia el fenotipo de letalidad provocado por la expresión de repeticiones (CTG)480. El número de hembras esperadas dividido por el número de hembras nacidas al expresar los tripletes es de 0.3 (32 observadas vs 107 esperadas). Este valor es de 0.05 (5 observadas y 92 esperadas) cuando además está presente el alelo *mb1^{E27}*. Para las moscas que no expresan (CTG)480 este valor es de entorno a 1.

4. Identificación de moléculas de actividad biológica conocida capaces de suprimir la toxicidad de repeticiones CTG en los MB de *Drosophila*

4.1. Rastreo de la quimioteca Prestwick

Con el fin de identificar moléculas capaces de suprimir *in vivo* la toxicidad provocada por (CTG)480 llevamos a cabo un rastreo químico utilizando una quimioteca formada por 880 compuestos de bajo peso molecular y actividad biológica conocida denominada PCL o Prestwick (www.prestwickchemical.com). El 90% de las moléculas que forman la quimioteca se encuentra disponible en el mercado, siendo el 10% restante alcaloides bioactivos o sustancias relacionadas. Para realizar dicho rastreo utilizamos el fenotipo de letalidad descrito por ser éste fácilmente cuantificable y susceptible de análisis estadístico.

Debido a que los compuestos de la quimioteca se hallaban disueltos en una solución que contenía dimetilsulfóxido (DMSO) el primer paso consistió en averiguar la concentración máxima de disolvente que las moscas eran capaces de tolerar. Así, alimentamos a larvas L1

macho de genotipo $yw/Y; UAS-CTG_{480}/+$ con comida comercial instantánea (ver Material y Métodos) en la que previamente habíamos añadido DMSO a diferentes concentraciones, y analizamos cuántos individuos alcanzaban el estadio adulto (Fig. R6). A concentraciones de DMSO mayores de 0.1% observamos un fuerte efecto tóxico, mientras que para valores de 0.1% o inferiores no se detectaron diferencias significativas respecto al control sin disolvente. Cabe destacar que este resultado es sólo aplicable al medio de cultivo y temperatura ensayados, ya que para diferentes medios nutritivos el porcentaje de DMSO tolerable puede variar considerablemente (ver apartado 4.2.1 de Resultados).

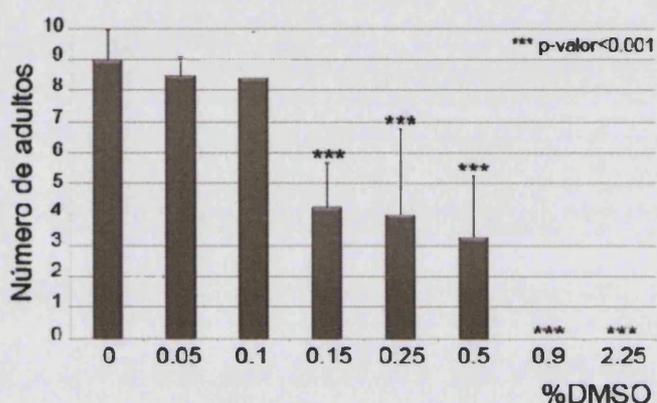
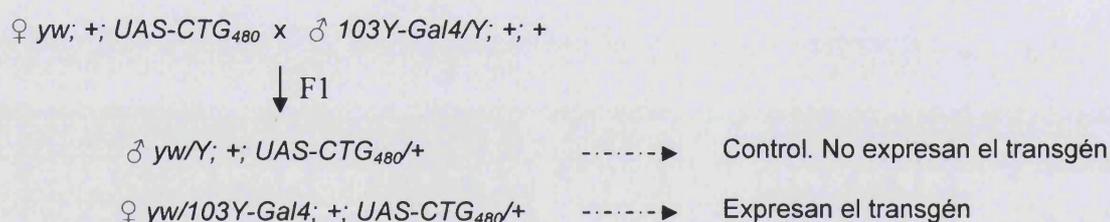


Figura R6. Estudio de la toxicidad del DMSO en medio comercial. Alimentamos 10 larvas L1 de genotipo $yw/Y; +; UAS-CTG_{480}/+$ por réplica con comida que contenía concentraciones crecientes de DMSO, con un total de hasta 5 réplicas. A partir de 0.1% el DMSO redujo la supervivencia de una manera dependiente de dosis. Las barras de la gráfica representan valores promedio y su desviación típica.

De esta manera, tomando 0.1% de DMSO como valor máximo de disolvente tolerable, llevamos a cabo un rastreo administrando 480 moléculas de la quimioteca en la comida a una concentración final de 5 μ M. Cada compuesto se ensayó por triplicado, con un total de 30 larvas L1 por réplica (10 machos y 20 hembras) descendientes del cruce:



De esta manera, el número de hembras nacidas tras el tratamiento servía como medida de la actividad del compuesto sobre el fenotipo de letalidad provocado por (CTG)480, mientras que el número de machos, que no expresan el transgén, servía como medida de toxicidad de las moléculas ensayadas. Además, el número de machos se usó como control a la hora de garantizar que los individuos de un tubo no se habían enfrentado a contaminación por hongos o bacterias y/o comida en mal estado, evitando así falsos negativos. De los 480 compuestos ensayados, 62 mostraron un incremento significativo en la viabilidad de las moscas (15.5% del total). Estos compuestos fueron sometidos a dos nuevas rondas de validación siguiendo el procedimiento descrito para el rastreo primario (n final= 90), tras las cuales 10 moléculas mostraron mejoras significativas respecto al control sin tratamiento (p-valor<0.01; Fig. R7 y

Tabla 1), lo que supone un 2.1% del total de moléculas ensayadas. 47 compuestos empeoraron el fenotipo (p -valor <0.05 ; 9.8% del total) y 5 resultaron tóxicos (número machos < 3 ; 1% del total).

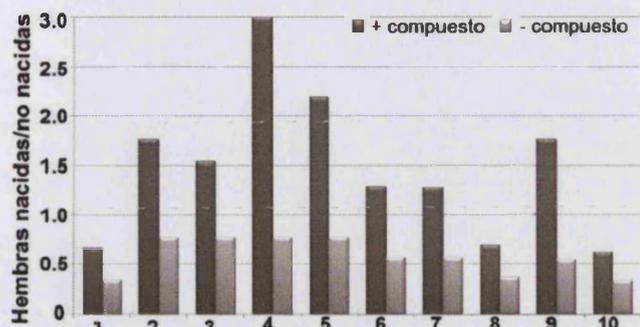
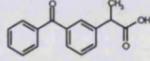
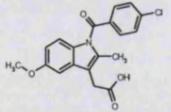
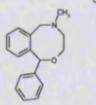
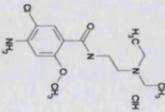
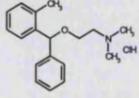
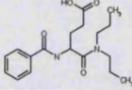


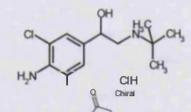
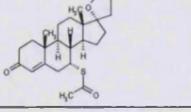
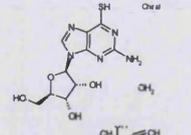
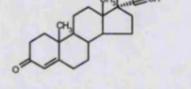
Figura R7. Supresores químicos de la toxicidad de (CTG)480 en los MB. (A) La relación entre hembras nacidas/no nacidas mide el grado de supervivencia de moscas *103Y-Gal4/+; UAS-(CTG)480* control (en gris claro) y tratadas (en gris oscuro). Los números en el eje de abcisas indican: 1, espironolactona; 2, metoclopramida; 3, ketoprofeno; 4, nefopam; 5, orfenadrina; 6, proglumida; 7, etisterona; 8, indometacina; 9, clenbuterol; 10, tioguanosina.

Los compuestos que empeoraron el fenotipo o aquéllos que resultaron tóxicos no parecían disponerse en categorías funcionales de manera clara, mientras que los compuestos positivos se pudieron agrupar fácilmente en cinco grupos de acuerdo a su mecanismo de acción (Tabla R1, asignaciones basadas en DrugBank y PubChem). Entre las dianas de estos fármacos destacaban inhibidores específicos de diferentes tipos neuronales (principalmente colinérgicos y dopaminérgicos), inhibidores de canales de sodio (implicados en la propagación de impulsos), e inhibidores de calcio (responsable de procesos como la liberación de neurotransmisores durante la sinapsis o la contracción muscular), así como inhibidores de ciclooxigenasas y antagonistas de histamina, entre otros.

Tabla R1. Supresores químicos del fenotipo de letalidad inducido por (CTG)480

Actividad Biológica	Nombre del compuesto	Estructura
Antiinflamatorios no esteroideos	Ketoprofeno*	
	Indometacina*	
Actividad sobre receptores dopaminérgicos e inhibidores de la captación de monoaminas	Nefopam hidrocloreto**	
	Metoclopramida monohidrocloreto**	
Inhibidores de receptores muscarínicos, histaminérgicos y colinérgicos	Orfenadrina dihidrocloreto**	
	Proglumida**	



Acción sobre el metabolismo del Na ⁺ y Ca ⁺²	Clenbuterol hidrocloreto**	
	Espironolactona*	
Otros	Tioguanosina*	
	Etisterona**	

* indica p-valor<0.01, ** indica p-valor<<0.001

4.2.1. La expresión de repeticiones CTG en neuronas colinérgicas y dopaminérgicas es tóxica en *Drosophila*

En los MB existen tres poblaciones mayoritarias de neuronas: dopaminérgicas, colinérgicas y gabaérgicas, siendo las dos primeras principalmente excitatorias y las últimas inhibitorias. Ya que parte de las moléculas identificadas como supresoras durante el rastreo actuaban sobre células dopaminérgicas y colinérgicas, decidimos estudiar genéticamente si ambos tipos neuronales eran sensibles al efecto tóxico de los tripletes CTG expresando (CTG)480 en diferentes poblaciones de neuronas por separado. La expresión en neuronas dopaminérgicas usando la línea *Ddc-Gal4* (H. Li *et al.*, 2000) redujo en un 82% la viabilidad de las moscas (34 individuos nacidos por tubo frente a 191 en el control *w¹¹¹⁸*) (Fig. R8A), mientras que la expresión en neuronas colinérgicas utilizando la línea *Cha-Gal4* (Salvaterra & Kitamoto, 2001) mostró una reducción del 68% (40 moscas nacidas por tubo frente a 118 en el control *w¹¹¹⁸*) (Fig. 8B). Estos resultados confirman la toxicidad de (CTG)480 en ambas poblaciones neuronales. Sin embargo, en ambos casos la letalidad no ocurría en estadio de pupa sino en algún momento más temprano del desarrollo.

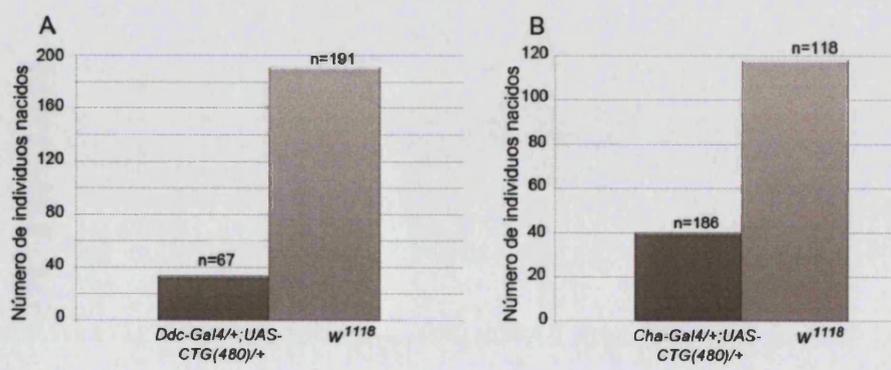


Figura R8. Las repeticiones CTG son tóxicas en distintas poblaciones neuronales. La expresión de (CTG)480 en neuronas dopaminérgicas (A) y colinérgicas (B) reduce la viabilidad de las moscas, demostrando que estas células son sensibles al efecto de las repeticiones.

4.3. Validación de los compuestos con actividad positiva

4.3.1. Las moléculas identificadas no afectan a la expresión de (CTG)480

Si los compuestos identificados durante el rastreo interfiriesen con el sistema de expresión ectópica Gal4/UAS podrían disminuir la transcripción de las repeticiones CTG, reduciendo así el fenotipo de letalidad de manera inespecífica. Frente a esta posibilidad, diseñamos un experimento en el que las 10 moléculas supresoras se administraron a individuos que expresaban la proteína reportera β -Galactosidasa en los MB (*103Y-Gal4/+;UAS-LacZ/+*). Si alguno de los compuestos disminuyese la expresión del transgén detectaríamos una reducción en la actividad de la proteína reportera, cuantificable mediante el seguimiento en el tiempo de una reacción colorimétrica con el sustrato específico de la β -Galactosidasa rojo clorofenol β -D-galactopiranosido (CPRG). Los valores de absorbancia obtenidos en cada caso se dividieron entre la cantidad de proteína total, cuantificada al principio del experimento para eliminar variaciones debidas a diferencias en el tamaño inicial de las moscas o al proceso de homogenización. Utilizando la pendiente de las rectas [*absorbancia*₅₇₄/*cantidad de proteína total*] vs *tiempo* resultantes como estima de la velocidad de la reacción (la cual es proporcional a la cantidad de enzima presente) no detectamos diferencias significativas respecto a la pendiente de la recta control en ningún caso (Fig. R9A). Esto demuestra que ninguno de los compuestos identificados afectaba al sistema Gal4/UAS.

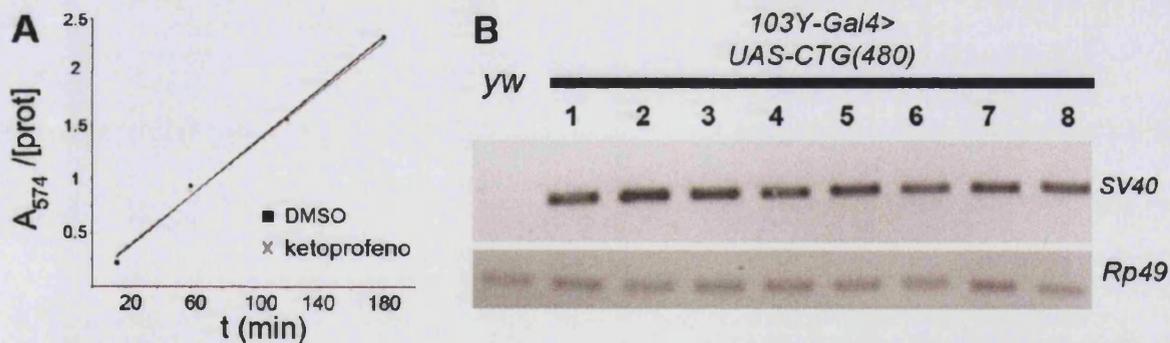


Figura R9. Efecto de los compuestos identificados sobre la expresión de transgenes. (A) Ejemplo representativo de ensayo de actividad β -Galactosidasa. La cantidad de proteína total para cada extracto se cuantificó con el fin de normalizar los valores de Absorbancia₅₇₄. Para el ejemplo de la figura (ketoprofeno), los valores de concentración total de proteína no diferían significativamente del control ($\alpha=0.05$, test t). Los valores de Absorbancia₅₇₄ normalizados se representaron en gráficas frente al tiempo y se compararon las pendientes de las rectas resultantes. Para el caso de la figura, la pendiente control (0.0011) y la pendiente compuesto (0.0012) no mostraron diferencias significativas ($\alpha=0.01$). (B) Gel de agarosa en el que se muestran los niveles de expresión de (CUG)480 obtenidos mediante RT-PCR del terminador del SV40 en moscas tratadas con DMSO (control, 1), espirolonactona (2), clenbuterol (3), metoclopramida (4), etisterona (5), orfenadrina (6), tioguanosina (7), y ketoprofeno (8) a la misma concentración que la utilizada para el rastreo químico. Como control negativo se usaron moscas no transgénicas de genotipo *yw*. Los niveles de transcritos *Rp49*, que codifican una proteína ribosómica, fueron utilizados como control de carga del cDNA molde. Las reacciones de PCR de *SV40* y *Rp49* se llevaron a cabo durante 30 y 25 ciclos, respectivamente.

Por otro lado, cabía la posibilidad de que los compuestos afectasen a las repeticiones a nivel del ARN, alterando la estabilidad de los transcritos CUG. Por esta razón, llevamos a cabo un segundo experimento en el que detectamos los niveles de ARN (CUG)480 mediante RT-PCR a partir de moscas *103Y-Gal4/+;UAS-(CTG)480/+*. Debido a que la amplificación mediante técnicas convencionales de RT-PCR de 480 repeticiones CUG no era posible, diseñamos cebadores específicos para el terminador del virus SV40, presente en la secuencia del transgén. Estos cebadores no alineaban con ninguna otra región del genoma de *Drosophila* y no dieron lugar a ningún amplificado en moscas no transgénicas (*yw*). La intensidad de las bandas obtenidas en la reacción de PCR mostraba niveles de repeticiones CUG similares en todos los casos (Fig. R9B), descartando así que el efecto supresor de los compuestos se debiese a una posible acción sobre los niveles de transcritos (CUG)480.

4.3.2. Efecto de las moléculas identificadas sobre la toxicidad de (CTG)480 en el ojo

El gen *sevenless* (*sev*) de *Drosophila* se expresa en los pares de fotorreceptores R1/R6 y R3/R4, así como en R7, en las células cono y en las *mystery cells* del ojo. La expresión de (CTG)480 bajo el control del promotor de *sev* (*sev-Gal4*) da lugar a un ojo rugoso de tamaño reducido y con fusión de omatidios. Con el fin de determinar si las 10 moléculas identificadas eran capaces de suprimir la toxicidad de (CTG)480 en este tejido, decidimos estudiar su efecto en moscas de genotipo *sev-Gal4 UAS-(CTG)480/+*. Ninguna de las moléculas causó diferencias significativas en la rugosidad del ojo en estos individuos (Fig. R10), sugiriendo que el efecto de los compuestos sobre la toxicidad de (CTG)480 en el cerebro dependía de factores presentes en los MB. No obstante, cabe destacar que el ojo adulto comienza su desarrollo a partir del estadio de larva L3 para completarse durante la metamorfosis de la pupa, la cual se encuentra recluida en el interior de una cubierta denominada pupario y no ingiere alimento. Debido a que los fármacos se encontraban disueltos en la comida, es posible que ésta fuese la razón de la falta de actividad observada.

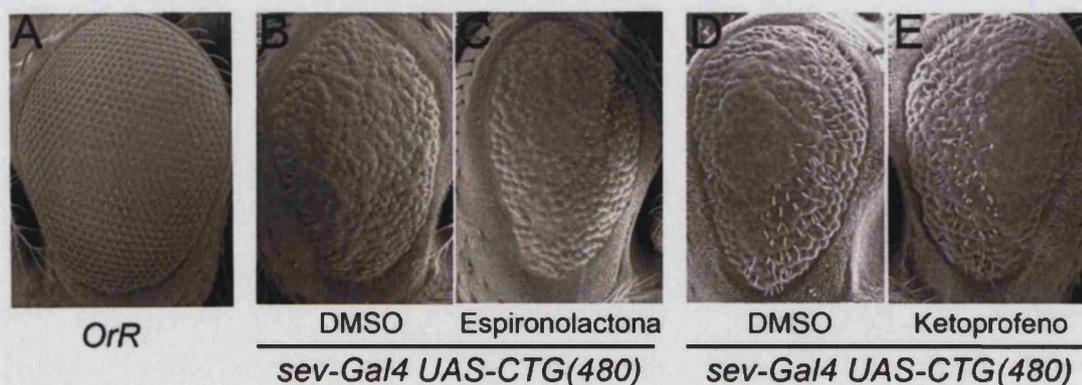


Figura R10. Efecto de los compuestos sobre la toxicidad de (CTG)480 en el ojo. La expresión de (CTG)480 en el ojo de *Drosophila* bajo el control de la línea *sev-Gal4* da lugar a un fenotipo rugoso (B y D). Este fenotipo se utilizó para validar la interacción entre las moléculas identificadas en el rastreo y la toxicidad de las repeticiones. Ningún compuesto suprimió el fenotipo de ojo rugoso a la concentración ensayada (5 μ M), de lo cual las figuras C (espironolactona) y E (ketoprofeno)

muestran dos ejemplos. La imagen (A) muestra el ojo de una mosca de genotipo salvaje (*OrR*), en la que se aprecia la disposición ordenada de los omatidios.

5. Rastreo de una quimioteca combinatoria de hexapéptidos

5.1. Identificación del péptido p88 como supresor de la toxicidad de (CTG)480

La segunda colección rastreada consistía en una quimioteca combinatoria en formato de rastreo posicional, formada por combinaciones de hexapéptidos en conformación dextrógira (D-aminoácidos, resistentes a proteasas) (Dooley & Houghten, 1993; Pinilla *et al.*, 1992; Vilar *et al.*, 1998). De manera resumida, cada vial de esta quimioteca está formado por una mezcla de 2.5 millones de péptidos que comparten un único aminoácido en una posición definida y difieren en el resto (Fig. R11A). Así, la combinación de las 6 posiciones definidas por los 20 aminoácidos posibles da lugar a los 120 viales que componen la quimioteca, sumando un total de 50 millones de secuencias distintas. El principio en el que se basa el uso de quimiotecas combinatorias en formato de rastreo posicional es que cada una de las posiciones de la molécula se ensaya independientemente de las demás. De esta manera, a partir de la lectura de los resultados del rastreo se obtienen los aminoácidos más activos para cada posición. Basándose en combinaciones de éstos, se sintetizan a continuación péptidos de secuencia definida (lo que se conoce como deconvolución), los cuales se ensayan de nuevo con el fin de confirmar o descartar su actividad (Fig. R11B).

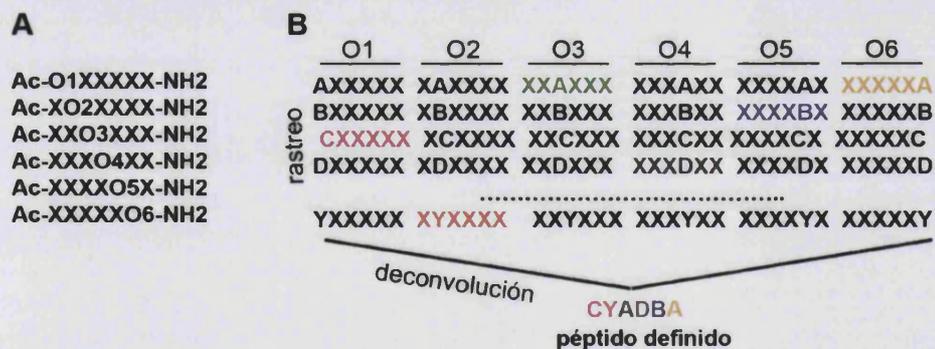


Figura R11. Estrategia de rastreo posicional. (A) O1, O2...O6 representan posiciones definidas ocupadas por los 20 aminoácidos posibles y las X hacen referencia a una mezcla equimolar de 19 de los 20 aminoácidos naturales (la cisteína se omite en las X, pero no en

las posiciones definidas). Las 6 posiciones por los 20 aminoácidos posibles dan lugar a 120 combinaciones cada una de las cuales representa un vial en la quimioteca. (B) Una vez identificados los viales positivos (representados en color en el esquema), se estudia qué aminoácido ocupa la posición definida en cada uno de ellos. La combinación de los aminoácidos positivos para dar lugar a péptidos de secuencia definida es lo que se conoce como deconvolución.

Los 120 viales que constituyen la quimioteca se ensayaron de manera individual sobre el fenotipo de letalidad a una concentración de 80 µM, tal y como se ha descrito en el apartado 4.1. El análisis estadístico de los resultados reveló un total de 28 viales positivos (p<0.05; 23.3% del total), cada uno de los cuales representa un aminoácido activo en una posición concreta. Así, para las posiciones O1, O2, O3, O4, O5 y O6 obtuvimos un total de seis, tres, seis, cuatro, dos y siete aminoácidos activos respectivamente (Fig. R12A). Para llevar a cabo la deconvolución, seleccionamos 10 de estos 28 aminoácidos, atendiendo a su grado de actividad

en el ensayo biológico. Finalmente, de las combinaciones posibles seleccionamos 16 secuencias para llevar a cabo la síntesis de los hexapéptidos definidos (Fig. R12B). La selección de estos 16 péptidos atendió a criterios de redundancia entre las propiedades físicas y químicas de aminoácidos activos en posiciones similares.

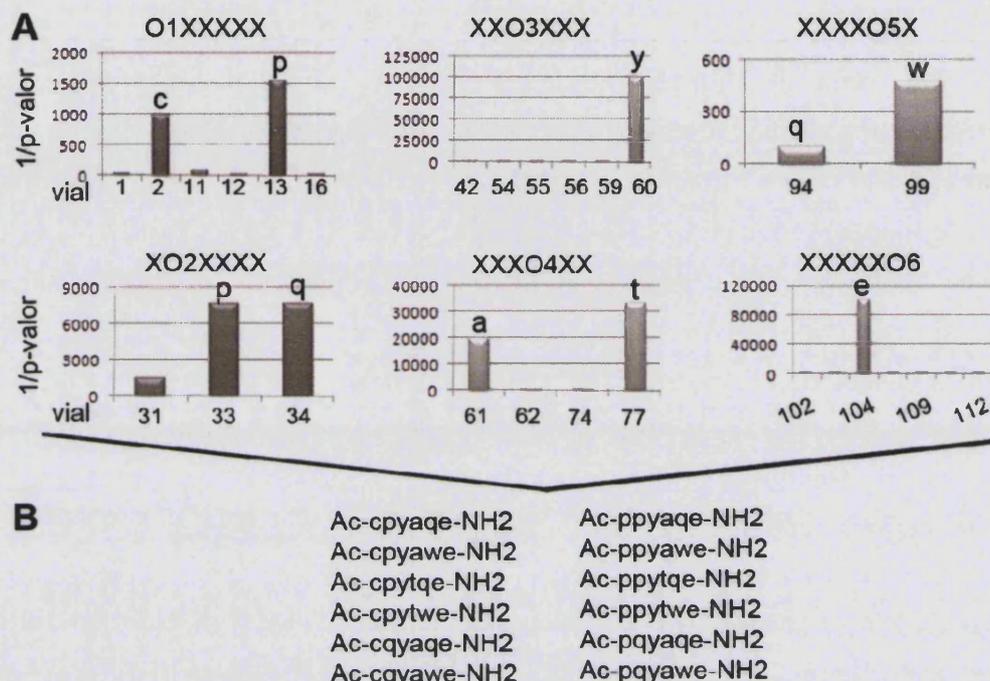


Figura R12. Resultado del rastreo primario y deconvolución. (A) El rastreo de la quimioteca y su posterior análisis estadístico revelaron un total de 28 viales positivos (p -valor <0.05) cuyo código numérico se señala en el eje de abscisas de cada gráfica. De entre éstos, los 10 aminoácidos señalados (correspondientes a los viales con mayor actividad) se seleccionaron para llevar a cabo la deconvolución. (B) La deconvolución dio lugar a 16 hexapéptidos definidos. O1XXXXX, XO2XXXX, XXO3XXX, XXXO4XX, XXXXO5X y XXXXXO6 representan viales con aminoácidos definidos para las posiciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente. Las gráficas muestran la inversa del p -valor obtenido en el rastreo primario como medida de actividad. A lo largo del texto los D-aminoácidos se representan en letra **minúscula** mientras que los L-aminoácidos se muestran en **mayúscula** (ver código en Apéndice 2).

Los 16 hexapéptidos definidos fueron ensayados a la mayor concentración posible en función del porcentaje de DMSO en el que se encontrasen disueltos, siguiendo un procedimiento similar al descrito para el rastreo primario. Dos péptidos mostraron cambios significativos en el número de hembras nacidas respecto al control: cpyaqe, que potenció el fenotipo de letalidad provocado por (CTG)480, y ppyawe (al que nos referiremos a lo largo del texto como péptido 88 ó p88), que lo suprimió, ambos a una concentración de 80 μ M (Tabla R2).

Tabla R2. Actividad de los péptidos definidos obtenidos tras la deconvolución		
Secuencia	Concentración	Nacidas tratadas/Nacidas control
Ac-cpyaqe-NH2	80 μ M	0,3*
Ac-cpyawe-NH2	80 μ M	-
Ac-cpytqe-NH2	80 μ M	0,8
Ac-cpytwe-NH2	62 μ M	-
Ac-cqyaqe-NH2	25 μ M	2,0
Ac-cqyawe-NH2	25 μ M	-
Ac-cqytqe-NH2	80 μ M	1,4
Ac-cqytwe-NH2	57 μ M	0,9
Ac-ppyaqe-NH2	80 μ M	2,0
Ac-ppyawe-NH2	80 μM	4,0*
Ac-ppytqe-NH2	80 μ M	0,8
Ac-ppytwe-NH2	80 μ M	3,0
Ac-pqyaqe-NH2	80 μ M	0,8
Ac-pqyawe-NH2	40 μ M	1,8
Ac-pqytqe-NH2	40 μ M	0,5
Ac-pqytwe-NH2	38.5 μ M	0,4

* indica p -valor <0.05 . - indica que no nacieron hembras en los tubos control ni en los tratados. En gris se resalta el péptido 88 (p88).

Con el fin de confirmar el efecto supresor del péptido p88 llevamos a cabo un ensayo de dosis-respuesta (Fig. R13). p88 no mostró actividad significativa a 20 μ M y 40 μ M, mientras que ésta aumentó a 80 μ M (dando lugar a un incremento de supervivencia de 6.7 respecto al control) y 125 μ M (con un incremento de 8.3 respecto al control). El análisis de los datos mediante un test no lineal reveló que la dosis efectiva 50 (DE50) de p88 era de 70.4 μ M. A 250 μ M la actividad del péptido disminuyó, posiblemente debido a un efecto tóxico.

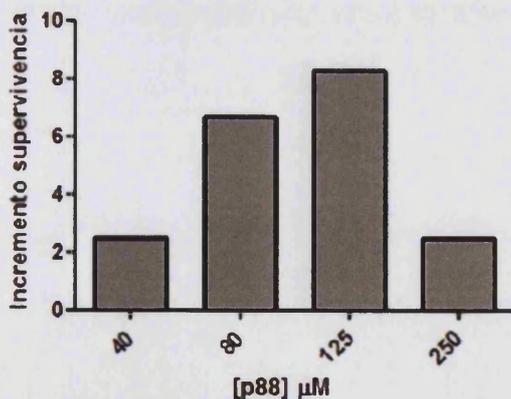


Figura R13. Ensayo dosis-respuesta de p88 en los MB. p88 suprime el fenotipo de letalidad en moscas *103Y-Gal4/+;UAS-(CTG)480/+* de manera más eficaz entre 80 y 125 μ M. Esta tendencia se pierde al aumentar la concentración a 250 μ M, posiblemente debido a que p88 resulta tóxico a dosis altas. El valor Incremento de supervivencia corresponde a $([\text{hembras nacidas tratadas}] - [\text{hembras nacidas control}]) / n \times 100$.

5.2. Estudio de la toxicidad de p88

Con el fin de analizar la toxicidad de p88 estudiamos su efecto sobre moscas de genotipo salvaje (*OrR*) en medio nutritivo casero (ver Material y Métodos). Puesto que desconocíamos el valor máximo de DMSO tolerable por las moscas en esta comida, realizamos un primer experimento sometiendo a los individuos a concentraciones crecientes del disolvente, bien desde estadio embrionario o desde fase de larva L1. La tolerancia al DMSO en comida casera

resultó ser de un orden de 3-4 veces mayor que la determinada para el medio nutritivo instantáneo (0.3-0.4% vs 0.1%, Fig. R14 y apartado 4.1 de Resultados). Los resultados de supervivencia obtenidos para los individuos tratados con DMSO desde el embrión mostraron una variabilidad muy alta (Fig. R14A), probablemente debido a la presencia de huevos sin fecundar entre los embriones seleccionados. Los individuos tratados desde estadio larvario mostraron un comportamiento mucho más homogéneo (Fig. R14B). Por esta razón, decidimos alimentar a larvas L1 con concentraciones crecientes de p88 (valor final de DMSO $\leq 0.12\%$) y contamos el número de individuos que llegaban a fase de pupa y adulto. El péptido no resultó tóxico en ninguno de los estadios a ninguna de las concentraciones ensayadas (67.5 μM , 125 μM , 250 μM , 500 μM y 1 mM; n: 150 en cada caso; Fig. R14C), pudiendo por tanto existir un efecto tóxico dependiente de genotipo en el caso mostrado en la figura R13.

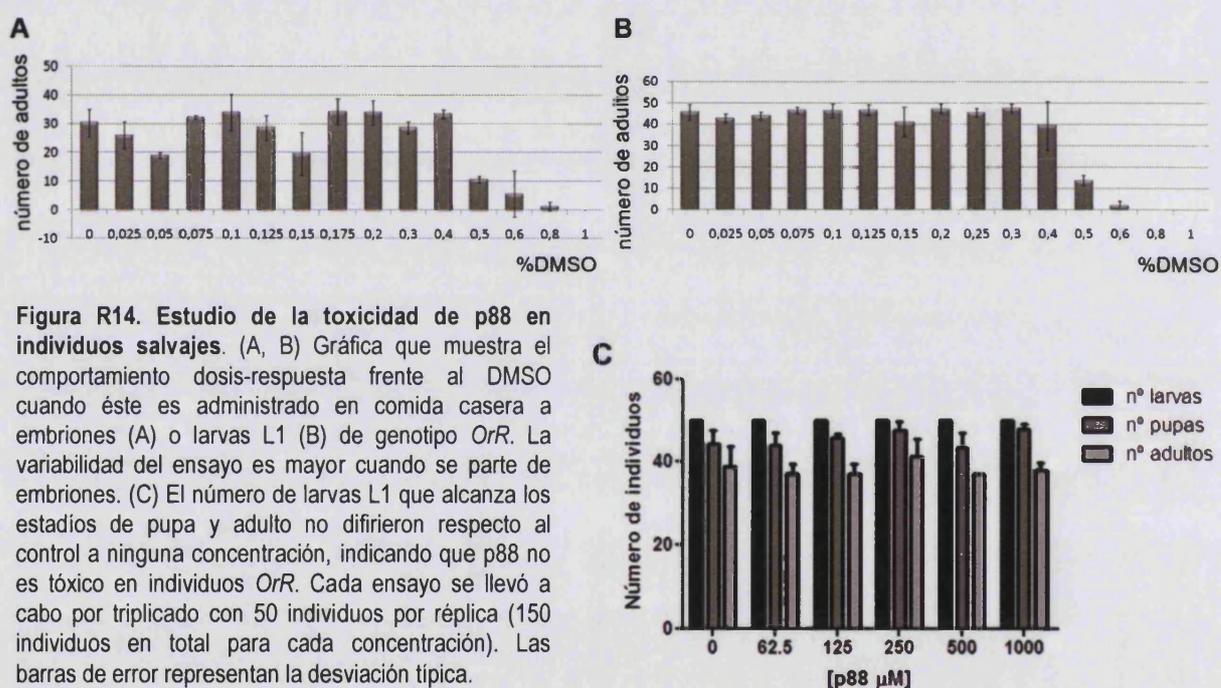


Figura R14. Estudio de la toxicidad de p88 en individuos salvajes. (A, B) Gráfica que muestra el comportamiento dosis-respuesta frente al DMSO cuando éste es administrado en comida casera a embriones (A) o larvas L1 (B) de genotipo *OrR*. La variabilidad del ensayo es mayor cuando se parte de embriones. (C) El número de larvas L1 que alcanza los estadios de pupa y adulto no difirieron respecto al control a ninguna concentración, indicando que p88 no es tóxico en individuos *OrR*. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado con 50 individuos por réplica (150 individuos en total para cada concentración). Las barras de error representan la desviación típica.

5.3. Todos los aminoácidos que forman p88 son críticos para su actividad

Con el fin de determinar la contribución de cada uno de los residuos del péptido 88 a su actividad realizamos un rastreo de alaninas (Muñoz *et al.*, 2007). Esta técnica se basa en la sustitución de cada uno de los aminoácidos del péptido por alanina manteniendo los demás. La alanina es un aminoácido pequeño y en general poco activo, razón por la cual es utilizado para este tipo de estudios. Ya que cada sustitución por alanina examina la contribución de un aminoácido individual, este experimento permite, por un lado, evaluar si p88 es susceptible de optimización (en caso de que una sustitución mantenga o aumente la eficacia de la molécula), así como determinar qué aminoácidos son importantes para su función (en caso de que una

sustitución disminuya su actividad). La secuencia de p88 (ppyawe) permite 5 sustituciones, por lo que se sintetizaron 5 hexapéptidos nuevos que fueron ensayados sobre el fenotipo de letalidad en moscas *103Y-Gal4; UAS-(CTG)480/+* y comida comercial, tal y como se ha descrito para el rastreo primario. Todos ellos mostraron una actividad menor que la molécula original, indicando que todos los aminoácidos en la secuencia de p88 son necesarios para la actividad final del péptido (Fig. R15).

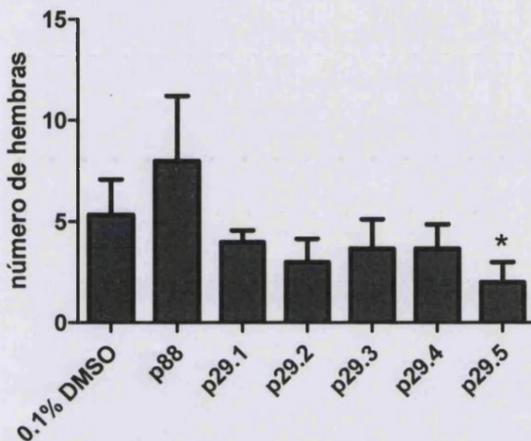


Figura R15. Rastreo de alaninas. La sustitución por alanina de cualquiera de los residuos de p88 causa una pérdida de actividad. Los péptidos fueron administrados en la comida a larvas *103Y-Gal4/+; UAS-(CTG)480/+*. El número de hembras nacidas tras el tratamiento con p29.5 fue significativamente inferior al de las moscas control (DMSO), indicando un posible efecto tóxico de este péptido. Todos los péptidos se ensayaron a la máxima concentración posible en función del DMSO (ver apartado 2.3.2.3. de Material y Métodos). p29.1, ppyawa; p29.2, ppyaae; p29.3, ppaawe; p29.4, payawe; p29.5, apyawe. Las barras muestran valores promedio con su error estándar. * indica p-valor<0.05.

5.4. Validación de la actividad de p88 en otros tejidos

5.4.1. p88 mejora los defectos histológicos causados por (CTG)480 en los músculos indirectos del vuelo

Puesto que los síntomas principales de la DM1 afectan al músculo, decidimos estudiar el efecto de p88 sobre este tejido en las moscas modelo. La expresión de (CTG)480 bajo el control del promotor de la cadena pesada de la Miosina (línea *Mhc-Gal4*) provoca defectos a nivel histológico en los músculos indirectos del vuelo (IFMs, del inglés *indirect flight muscles*), los cuales incluyen pérdida de fibras musculares y degeneración progresiva. Dichos defectos afectan a la función de este tejido, impidiendo a las moscas volar (García-López *et al.*, 2008). El péptido 88 se ensayó sobre el fenotipo de falta de vuelo utilizando el método de *caída en cilindro* desarrollado por Benzer (Benzer, 1973) y en medio nutritivo casero. No observamos cambios en la capacidad de vuelo de las moscas (concentraciones ensayadas: 62.5 μ M y 125 μ M; n: 117 y 77 respectivamente) respecto al control con DMSO (n: 55). No obstante, el análisis al microscopio de secciones transversales de tórax de moscas modelo de 3-4 días de edad reveló una mejora de los músculos a nivel histológico, con un incremento en la cantidad de fibras y en el tamaño de los paquetes musculares (Fig. R16). Puesto que la capacidad de vuelo de las moscas es muy sensible a cambios estructurales y metabólicos en los IFMs, es posible la mejora histológica observada no fuese suficiente como para permitir a los individuos volar.

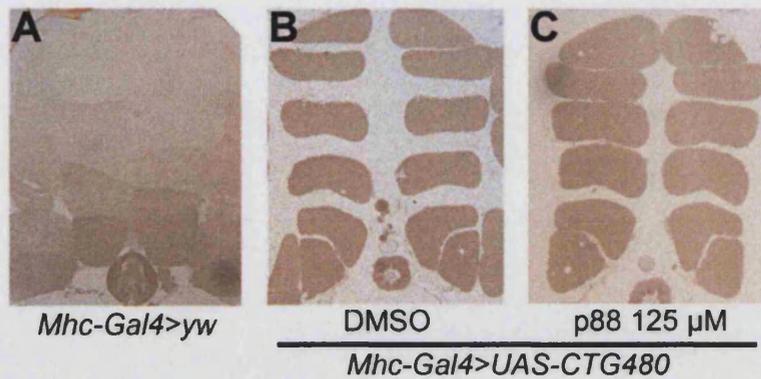


Figura R16. p88 suprime la toxicidad de (CTG)480 en los músculos indirectos del vuelo (IFMs). Secciones transversales de 1.5 µm de los IFMs de moscas normales (A), moscas que expresaban (CTG)480 (B) y de moscas que expresaban (CTG)480 tratadas con p88 (C). Las moscas tratadas con péptido mostraban paquetes musculares de mayor tamaño que el control con DMSO. Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 10x.

Para confirmar esta observación, así como cuantificar el efecto de p88, llevamos a cabo un ensayo de dosis-respuesta y realizamos cortes histológicos semifinos en moscas de 10 días de edad (Fig. R17A-E). La cuantificación del área muscular en las moscas tratadas con 62.5 µM, 125 µM y 250 µM de péptido reveló un incremento significativo dependiente de dosis (Fig. R17F). Estos resultados demuestran que el efecto del péptido es independiente de factores específicos de tejido, ya que p88 es activo tanto en el cerebro como en el músculo. A 500 µM, sin embargo, los músculos mostraban un tamaño reducido y la viabilidad de las moscas disminuyó, indicando que a esta concentración la actividad del péptido podría verse contrarrestada por un efecto tóxico.

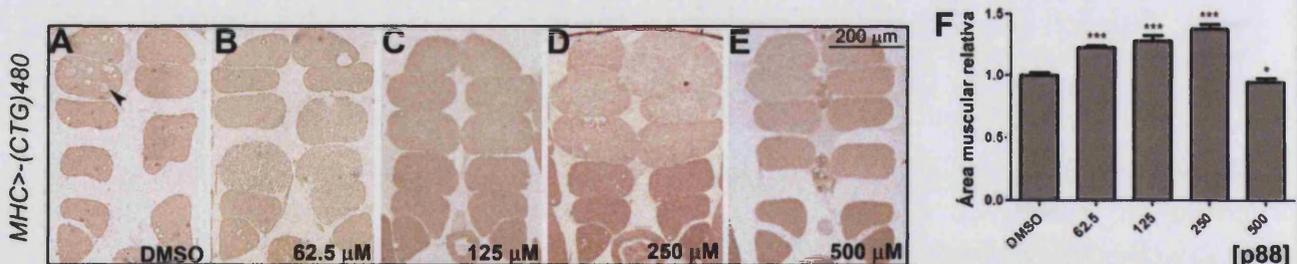
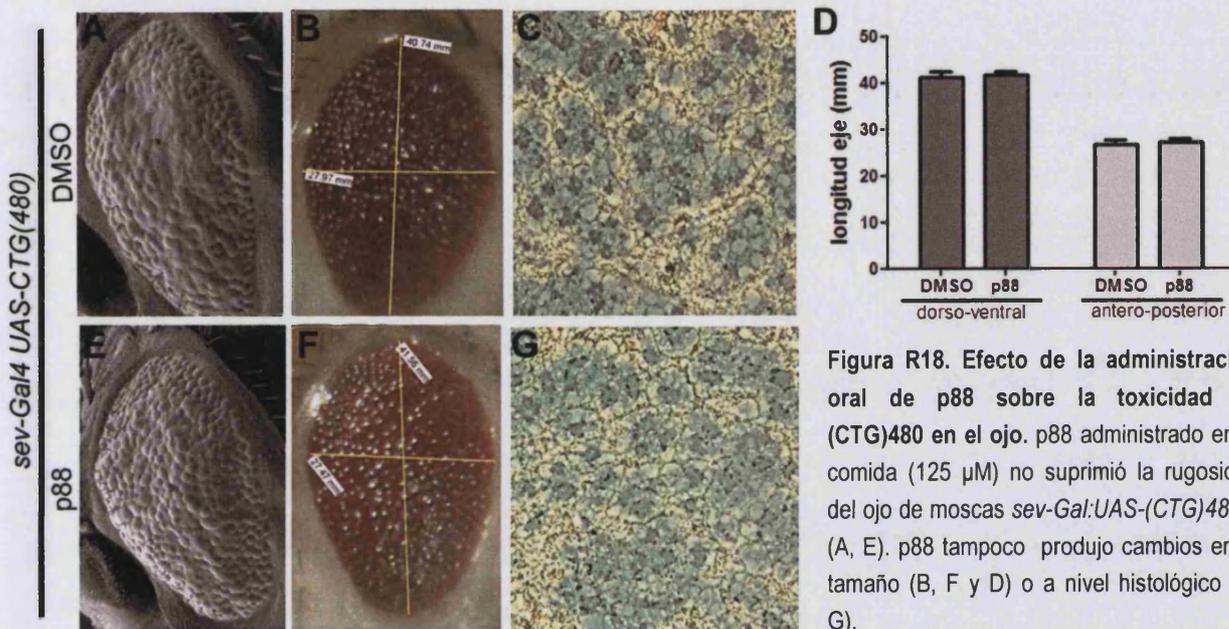


Figura R17. Respuesta a dosis de p88 en los IFMs. Secciones transversales (1.5 µm) de los IFMs de moscas *Mhc-Gal4+;UAS-(CTG)480/+* tratadas con 0.12% DMSO (control) (A) y con p88 a distintas concentraciones (B-E). Entre 62.5 µM y 250 µM p88 causó un incremento significativo en el área muscular respecto a las moscas control (F), así como una disminución en la pérdida de fibras (cabeza de flecha en A). A 500 µM el área de los IFMs resultó ser menor que en las moscas control. Las barras en la gráfica muestran valores promedio con su error estándar. * indica p-valor<0.05, *** indica p-valor <0.0001.

5.4.2. El péptido 88 no suprime la toxicidad de (CTG)480 en el ojo

Con el fin de analizar el efecto de p88 sobre la rugosidad del ojo en las moscas modelo, administramos p88 a individuos de genotipo *sev-Gal4 UAS-CTG480/+* a 80 µM y 125 µM en medio nutritivo casero. El análisis de imágenes de microscopía electrónica de barrido en moscas de entre 2-3 días de edad no mostró diferencias significativas en el fenotipo (Fig. R18A y E). La cuantificación del tamaño del ojo sobre imágenes tomadas a la lupa tampoco reveló

diferencias significativas entre las moscas tratadas y las moscas control (Fig. R18B, F y D). Por último, para estudiar el efecto de p88 a nivel histológico analizamos secciones longitudinales semifinas de retina. El tejido de las moscas que expresaban (CTG)480 mostraba un aspecto desorganizado, con fusión de omatidios y pérdida de simetría de los fotorreceptores (Fig. R18C). Las moscas tratadas con p88 no mostraron mejora a nivel histológico respecto al control (Fig. R18G), posiblemente debido a que el péptido no está presente en la cantidad adecuada en las células cuando la metamorfosis tiene lugar.



6. La expresión endógena de p88 suprime fenotipos provocados por repeticiones CTG

La administración de p88 suprimía al menos parte de los fenotipos provocados por (CTG)480. Sin embargo, dado que en nuestros ensayos p88 se añadía a la comida, no podíamos saber cuántas moléculas llegaban finalmente a las células con repeticiones CUG. Con el fin de poder controlar de manera precisa la administración de p88 y asegurarnos de que el péptido estaba presente en los mismos tejidos y en el mismo momento que los transcritos (CUG)480, generamos moscas transgénicas capaces de expresar el péptido 88 de manera endógena y controlada utilizando el sistema Gal4/UAS. Para la obtención de dichas moscas diseñamos tres transgenes diferentes (*UAS-p88C1*, *UAS-p88C2* y *UAS-p88C3*), los cuales codifican distintos péptidos basados en la secuencia de p88 (Fig. R19), teniendo en cuenta el sesgo en el uso de codones en *Drosophila* (es decir favoreciendo el uso de G y, sobre todo, de C en los sitios sinónimos; Powell & Moriyama, 1997) y añadiendo a la secuencia de p88 una metionina inicial, así como tres glicinas espaciadoras. Además, aguas arriba del codón de inicio

ATG añadimos 21 nt del extremo 5'UTR del gen *act5C* de *Drosophila* que incluía la secuencia Kozak, con el fin de potenciar la traducción de los transgenes.

El péptido 1 (p88C1) contenía la secuencia directa de p88. Como ya comentamos, los péptidos de la quimioteca de hexapéptidos están formados por D-aminoácidos. Las formas D (dextrógiras) de los aminoácidos son estereoisómeros de las formas L (levógiras) y sólo los L-aminoácidos se sintetizan en las células y se incorporan a las proteínas. Por lo tanto, si la disposición espacial de las cadenas laterales de p88 era importante para su función, ésta se perdería al ser p88C1 sintetizado a partir de L-aminoácidos por *Drosophila*. Por esta razón, decidimos generar la construcción 2 (p88C2), en la cual se invirtió la secuencia que codifica a p88, dando lugar a un péptido retroinverso (Chorev & Goodman, 1995; P. M. Fischer, 2003). En el momento en que estos transgenes fueron generados, las construcciones más cortas descritas en la literatura codificaban péptidos de más de 20 aminoácidos (Ja *et al.*, 2007), lo que suponía más del doble del tamaño de p88C1 y p88C2 (de tan sólo diez aminoácidos). Por esta razón, generamos la construcción C3 (p88C3), la cual combinaba las construcciones C1 y C2, dando lugar a un péptido de 19 aminoácidos. Las tres construcciones fueron microinyectadas en los precursores de la línea germinal de embriones de *Drosophila* dando lugar a 10 líneas de moscas transgénicas para cada transgén.

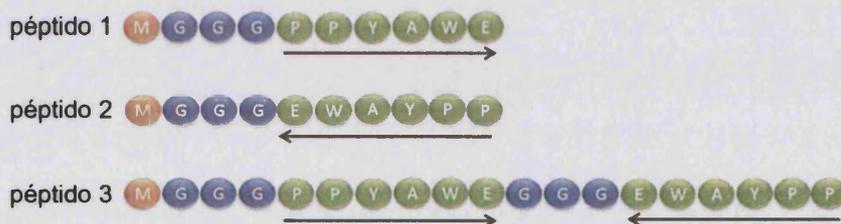


Figura R19. Derivados de p88 generados para su expresión endógena en *Drosophila*. Secuencia de los péptidos 1 (p88C1), 2 (p88C2) y 3 (p88C3). En naranja se muestra la metionina inicial, en azul las tres glicinas espaciadoras y en verde la secuencia de p88 directa (→) o retroinversa (←).

Las moscas transgénicas obtenidas se cruzaron con las líneas de moscas recombinantes *GMR-Gal4 UAS-(CTG)480/CyO* y *Mhc-Gal4 UAS-(CTG)480/TM6b* generadas durante este trabajo, las cuales dirigían la expresión de las repeticiones CTG en ojo y músculo, respectivamente. Debido a la presencia de dos construcciones UAS en la descendencia de dichos cruces, expresamos los transgenes *UAS-(CTG)480* y *UAS-GFP* de manera simultánea como control negativo con el fin de garantizar una cantidad comparable de proteína Gal4 disponible para activar la expresión de cada transgén. Al igual que las moscas *GMR-Gal4 UAS-(CTG)480/+*, los adultos *GMR-Gal4 UAS-(CTG)480/UAS-GFP* presentaban un fenotipo de ojo fuertemente rugoso. La coexpresión de (CTG)480 y p88C2 o C3 (pero no p88C1) a 19°C y 21°C dio lugar a moscas con ojos menos rugosos que los individuos control (Fig. R21 y Fig. R20B-C y E-F). Estos resultados confirmaban que p88 era capaz de suprimir fenotipos

desencadenados por las repeticiones e indicaban que los péptidos se traducían y eran activos a pesar de su corto tamaño. No obstante, el fenómeno contrario ocurría a 25°C y a 29°C. A 25°C la expresión endógena de p88C2 o p88C3 potenciaba la toxicidad de las repeticiones CTG dando lugar a un ojo de menor tamaño, con pérdida de pigmentación y dramática fusión de omatidios (Fig. R20H-I). A 29°C el cruce entre moscas *GMR-Gal4 UAS-(CTG)480/CyO* y *UAS-p88C2* o *UAS-p88C3* no produjo descendientes del genotipo de interés, indicando que p88 reducía la viabilidad de los individuos *GMR-Gal4 UAS-(CTG)480* a dicha temperatura. Cabe destacar que la expresión de p88C2 y p88C3 por sí sola a 25°C y 29°C no causó ningún fenotipo (Fig. R20G). Debido a que los cambios de temperatura afectan de manera diferente a la expresión de los transgenes (CTG)480 y p88C1-3 al estar éstos insertados en regiones distintas del genoma, es posible que exista una relación crítica entre la cantidad de péptido y repeticiones CTG, superada la cual p88 podría volverse tóxico.

Todas las líneas portadoras del transgén *UAS-p88C2* ensayadas (es decir, 5) y una de las tres líneas portadoras del transgén *UAS-p88C3* modificaron el fenotipo de las moscas *GMR-Gal4 UAS-(CTG)480*, mientras que ninguna de las cinco líneas ensayadas de la construcción *UAS-p88C1* lo hizo. Este resultado indica que tan sólo la expresión endógena de una forma retroinversa de p88 formada por L-aminoácidos es capaz de revertir el fenotipo causado por la expresión de (CTG)480, confirmando que la orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos del péptido juega un papel esencial en su actividad.

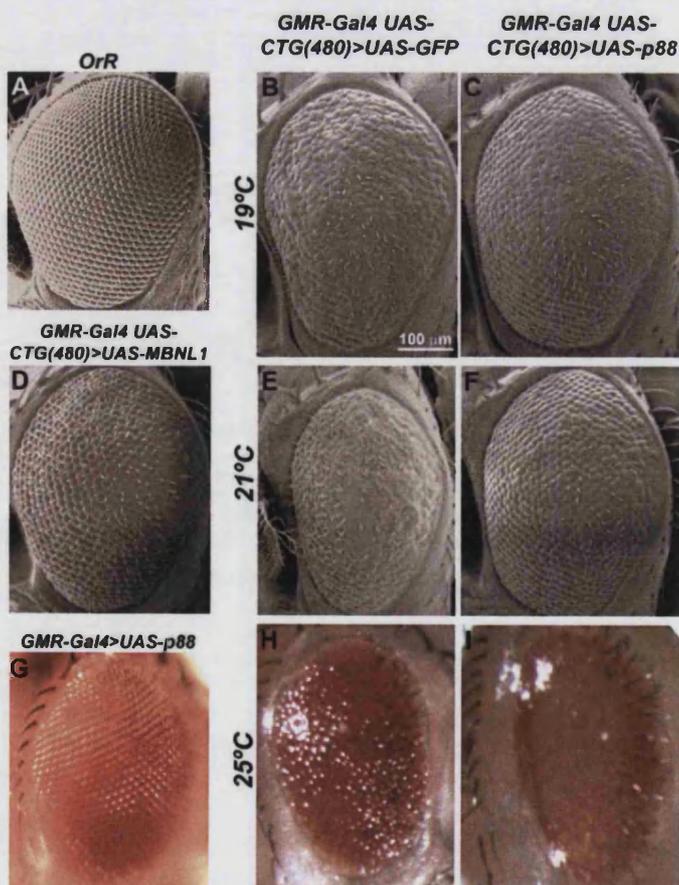


Figura R20. La expresión endógena de p88 mediante el sistema Gal4/UAS suprime la rugosidad causada por (CTG)480 en el ojo. *UAS-p88C2* y *C3* suprimieron la toxicidad de (CTG)480 en ojo a 19°C y 21°C, dando lugar a un fenotipo menos rugoso y a un incremento en el tamaño respecto a las moscas control (B, E vs C, F). Al aumentar la temperatura este fenómeno se invirtió y *UAS-p88C2* y *C3* potenciaron el efecto de las repeticiones (25°C; H vs I). *UAS-p88C2* por sí solo no produjo ojo rugoso a 25°C (G). La figura (A) muestra un ojo salvaje. (D) La interacción entre (CTG)480 y *MBNL1* se utilizó como control positivo. En todos los casos el transgén *UAS-GFP* se empleó como control negativo. Las imágenes (A-F) fueron tomadas bajo el microscopio electrónico de barrido. Las imágenes (G-I) se tomaron bajo la lupa. Los ejemplos (C) y (F) muestran la interacción con una línea transgénica de la construcción 3 (*UAS-p88C3*).

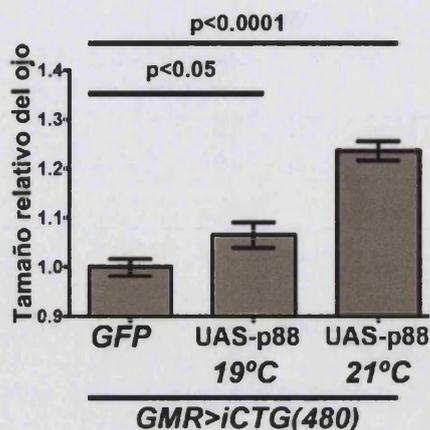


Figura R21. La expresión endógena de p88 mediante el sistema Gal4/UAS suprime el efecto de (CTG)480 sobre el tamaño del ojo. La cuantificación de la longitud del ojo en el eje dorso-ventral de moscas *GMR-Gal4 UAS-(CTG)480/UAS-p88C3* mostró un aumento significativo relativo al tamaño del ojo en las moscas control (*GMR-Gal4 UAS-(CTG)480/UAS-GFP*; p-valor<0.05, test t). Este efecto era mayor al aumentar la temperatura de 19°C a 21°C.

La coexpresión de (CTG)480 y p88C2 o p88C3 en la musculatura con la línea *Mhc-Gal4* a 25°C también suprimió los defectos histológicos de los IFMs en adultos recién eclosionados, aumentando el tamaño de los paquetes musculares (Fig. R22). Esto confirma el efecto de p88 sobre (CTG)480. De nuevo, tan sólo líneas portadoras de los transgenes 2 y 3 modificaron el fenotipo. Cabe destacar que la supresión de la toxicidad de (CTG)480 era mayor que la obtenida mediante la administración oral del péptido, sugiriendo que restringir la presencia de p88 a las células que expresan las repeticiones CTG aumenta su eficacia.

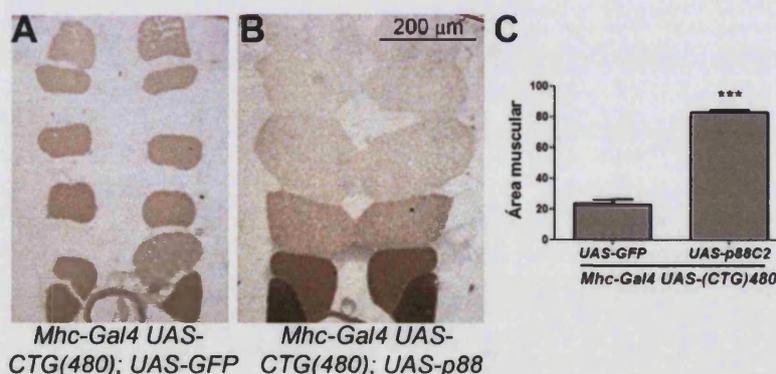


Figura R22. Expresión endógena de p88 en los IFMs mediante el sistema Gal4/UAS. Secciones transversales de tórax (1.5 µm) de moscas que expresan (CTG)480 (A) o (CTG)480 y p88C2 simultáneamente (B) bajo el control del promotor del gen *Mhc*. p88C2 causó un aumento del tamaño de los músculos (C), disminuyendo la distancia entre paquetes. El área muscular se obtuvo binarizando las imágenes tomadas al microscopio y cuantificando el porcentaje de pixeles correspondiente a músculo.

7. Estudio del mecanismo de acción de p88

Los resultados obtenidos *in vivo* demostraban un efecto de p88 sobre la toxicidad de las repeticiones CTG. No obstante, desconocíamos el mecanismo molecular por el cual esto sucedía. La Fig. R23 muestra varias hipótesis que resumen cómo p88 podría ejercer su efecto en las células. En primer lugar, p88 podría afectar a los niveles de transcritos (CUG)480, bien interfiriendo con el sistema Gal4/UAS o disminuyendo la estabilidad de los ARNs tóxicos (Fig. R23A). Por otro lado, p88 podría unirse a las repeticiones CUG liberando factores nucleares secuestrados por éstas, como Mbl, de manera que dichas proteínas podrían desempeñar de nuevo sus funciones normales (Fig. R23B). p88 podría también unirse a las repeticiones CUG impidiendo que éstas se plieguen formando horquillas tóxicas de doble cadena (Fig. R23C).

Por último, p88 podría actuar sobre otras proteínas o transcritos aguas abajo de las repeticiones afectando, por ejemplo, a la estabilidad o al procesado de éstos (Fig. R23D).

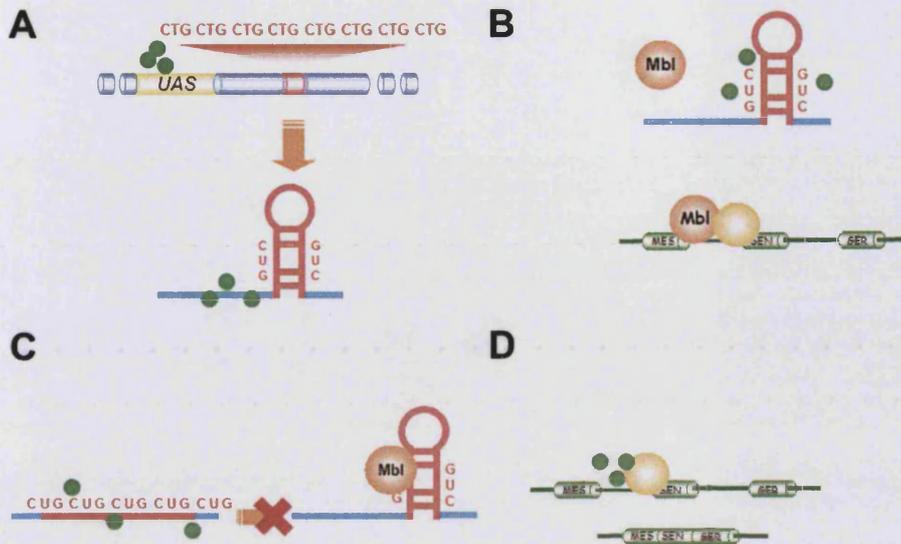


Figura R23. Posibles mecanismos de acción de p88 sobre la toxicidad de (CTG)480. p88 podría afectar a la expresión de las repeticiones (A), desplazar a Mbl de las horquillas de ARN (B), desestabilizar las horquillas tóxicas (C) o actuar aguas abajo de las repeticiones (D).

Con el fin de estudiar cada una de las hipótesis propuestas, decidimos llevar a cabo una serie de experimentos a nivel molecular e *in vitro*, los cuales se detallan a continuación.

7.1. p88 no afecta a los niveles de expresión de (CTG)480

Para estudiar si p88 afectaba a la expresión de (CTG)480 utilizamos dos estrategias diferentes. En primer lugar, alimentamos a moscas *Mhc-Gal4/+;UAS-luciferasa/+* con el péptido a 250 μ M en medio nutritivo casero. A pesar de que p88 produjo una leve disminución en los niveles de emisión de luz, esta diferencia no era significativa respecto al control con DMSO ($\alpha=0.05$, test t; Fig. R24), demostrando que el péptido no afectaba al sistema Gal4/UAS. Sin embargo, la presencia de DMSO en la comida de las moscas control causó un incremento en los niveles de proteína luciferasa. Estos resultados indican que el disolvente podría afectar a la expresión de este transgén, posiblemente por su efecto descrito como supresor de la variegación dependiente de posición (Michailidis *et al.*, 1989).

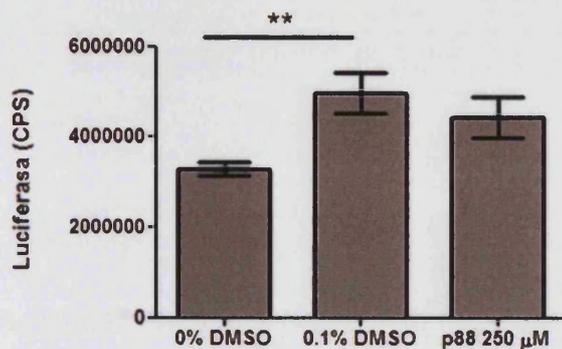


Figura R24. Efecto de la expresión de p88 sobre la expresión de la proteína reportera luciferasa. El tratamiento con p88 no afectó de manera significativa a la expresión de luciferasa comparada con moscas expuestas a la misma cantidad de DMSO (0.12%). Sin embargo, el DMSO por sí sólo incrementó la expresión del transgén. Las barras muestran valores promedio y su error estándar. ** indica p-valor<0.01.

En segundo lugar, determinamos si p88 afectaba específicamente a los niveles de transcritos (CUG)480 mediante RT-PCR a partir de moscas *Mhc-Gal4/+;UAS-(CTG)480/+* alimentadas con péptido 88 a diferentes concentraciones. Tras cuantificar la intensidad de las bandas obtenidas en la reacción de PCR no se detectaron diferencias significativas en los niveles de (CUG)480 a ninguna concentración (Fig. R25).

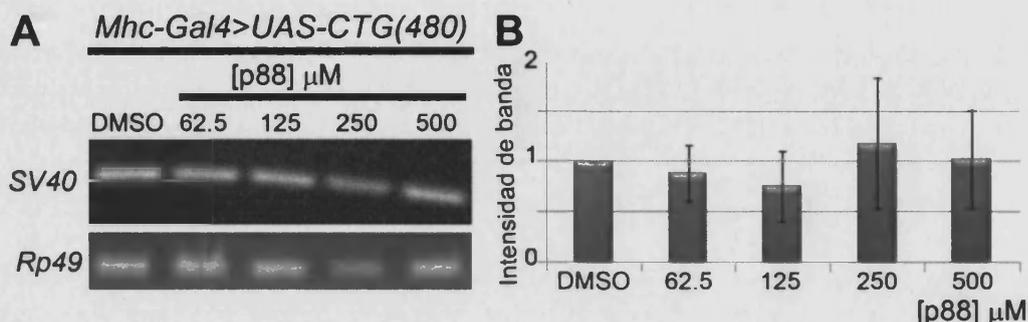


Figura R25. Efecto de p88 sobre la expresión de (CTG)480. (A) Gel de agarosa que muestra los niveles de transcritos (CUG)480 obtenidos mediante RT-PCR de una región del terminador SV40 en moscas *Mhc-Gal4/+; UAS-(CTG)480/+* tratadas con 0.12% DMSO (control) o con p88 a distintas concentraciones. La cuantificación de la intensidad de las bandas con el programa ImageJ no reveló cambios significativos en ningún caso ($\alpha=0.05$, test t). (B). Los transcritos del gen *Rp49* se utilizaron como control de carga del cDNA molde. Las reacciones de PCR de SV40 y *Rp49* se llevaron a cabo durante 30 y 25 ciclos, respectivamente. Las barras en (B) muestran valores promedio y su desviación típica.

7.2. Estudio del efecto del péptido 88 sobre la unión de Mbl a repeticiones CUG

Si p88 interfiriese con la unión al ARN de alguna de las proteínas secuestradas por las horquillas de repeticiones CUG tóxicas (hipótesis B en la Fig. R23) cabría esperar que existiese cierta homología de secuencia entre el péptido y dichas proteínas. Con el objetivo de estudiar esta posibilidad llevamos a cabo un análisis bioinformático utilizando el programa de comparación de secuencias MEGA (Tamura *et al.*, 2007) y comparamos la secuencia del péptido 88 con las secuencias de Mbl, hnRNP H, hnRNP F y Sp1. Este estudio reveló que tres de los seis aminoácidos de p88 alinean con el reverso de una secuencia conservada en el primer dedo de zinc de las proteínas Muscleblind, dominio a través del cual dichas proteínas se unen al ARN (Goers *et al.*, 2008; Warf & Berglund, 2007) (Fig. R26). Además, en este alineamiento la posición del triptófano de p88 coincide con la de una fenilalanina (aminoácido también aromático, apolar e hidrofóbico) crítica para la unión de la proteína Mbl a las repeticiones CUG (Teplova & Patel, 2008). Con el fin de determinar si el mecanismo de acción del péptido estaba basado en la competencia con Mbl por la unión a horquillas de ARN tóxicas estudiamos su efecto sobre la unión de la proteína a dichos ARNs *in vitro*.

dedo de Zinc 1

```

dme-MblC : SRWLCLEVCREFCRNKCSRQUTECKFAHPPANVEVC
cel-MblC : SRWLCVEVCREFCRGCRSRDQCECKFAHPPNVDVC
gga-Mbn11 : TKWLTLEVCREFCRGCRSRDTECKFAHPSKSCQVE
dre-Mbn11 : TKWLTLEVCREFCRGCRSRDAECKFAHPSKSCQVE
hsa-Mbn11 : TKWLTLEVCREFCRGCRSRDTECKFAHPSKSCQVE
hsa-Mbn12 : TKWLTLEVCREFCRGCRSRDTECKFAHPSKSCQVE
hsa-Mbn13 : TKWLTLEVCREFCRGCRSRDTECKFAHPSKSCQVE
p88-dir : PPYAW
p88-rev : EWAYPP
  
```

Figura R26. p88 alinea parcialmente con el primer dedo de zinc de Muscleblind. *dme*, *Drosophila melanogaster*; *cel*, *Caenorhabditis elegans*; *gga*, *Gallus gallus*; *dre*, *Danio rerio*; *hsa*, *Homo sapiens*. *Mbn1*-3 corresponden a los tres parálogos humanos. La secuencia reversa de p88 (p88-rev) alinea con una región crítica para la unión de la proteína al ARN. En negro se muestran aminoácidos conservados.

7.2.1. Expresión y purificación de los dedos de Zinc de Mbl

Para comprobar si el péptido 88 era capaz de competir con Mbl por la unión a las repeticiones CUG era necesario, en primer lugar, expresar y purificar la proteína Mbl. Limitamos dicho estudio a la porción de Mbl correspondiente a sus dedos de zinc (MblZF, aminoácidos 1-98) por dos motivos principales. En primer lugar, en *Drosophila* existen 7 isoformas Mbl distintas. A excepción de la isoforma MblD, todas ellas comparten la región que contiene los dos dedos de zinc (extremo Nt) y difieren en sus secuencias Ct. En segundo lugar, se ha descrito que tanto los dedos de zinc de MBNL1 como de Mbl son suficientes para unirse a sus secuencias diana (Warf y Berglund, 2007; Goers et al, 2008).

La clonación de MblZF se llevó a cabo en un vector derivado del vector comercial pET-15b (ver apartado 2.1.1. de Material y Métodos), de tal modo que la proteína MblZF se fusionó a 6 histidinas con un sitio de corte intermedio, el cual permitía eliminar dicha etiqueta mediante digestión con la proteasa TEV (del inglés *Tobacco Etch Virus*, ver Material y Métodos). Con el fin de encontrar las condiciones óptimas de expresión de MblZF en *E. coli* ensayamos combinaciones de tres variables diferentes: (1) la cepa bacteriana utilizada (*BL21 (DE3)*, *BL21 pLys (DE3)* y *BL21 pLys (DE3) Codon +*), (2) la concentración de $ZnCl_2$ en el medio (50 μM y 100 μM) y (3) la temperatura de inducción (30°C y 16°C). De entre todas las condiciones estudiadas conseguimos obtener una alta proporción de MblZF soluble al utilizar la cepa *BL21 (DE3)*, una concentración de $ZnCl_2$ de 50 μM y una temperatura de inducción de 16°C. El proceso de purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad en un sistema FPLC, con un rendimiento final de ~1.4 mg de proteína/L de cultivo (ver apartados 2.1.2 y 2.1.3 de Material y Métodos y Fig. MM4).

Para comprobar que la proteína purificada se encontraba en su conformación nativa analizamos su espectro de dicroísmo circular (DC) (Fig. R27B). El espectro de DC de MblZF era similar al descrito para los dedos de zinc de MBNL1 en 2007 por Warf y Berglund, con un pico pronunciado a 203 nm, el cual denotaba falta de estructura, y un pico débil a 220 nm, indicador de hélice alfa (Fig. R27A-C). Por otro lado, la caracterización del estado de oligomerización de la proteína MblZF en solución se llevó a cabo mediante cromatografía de

exclusión molecular (Fig. R27D). El volumen de exclusión obtenido para MbIZF correspondía a un peso molecular de 13.4 KDa, equivalente al tamaño de la proteína en forma monomérica, revelando que MbIZF no forma complejos consigo mismo, al menos en las condiciones del ensayo.

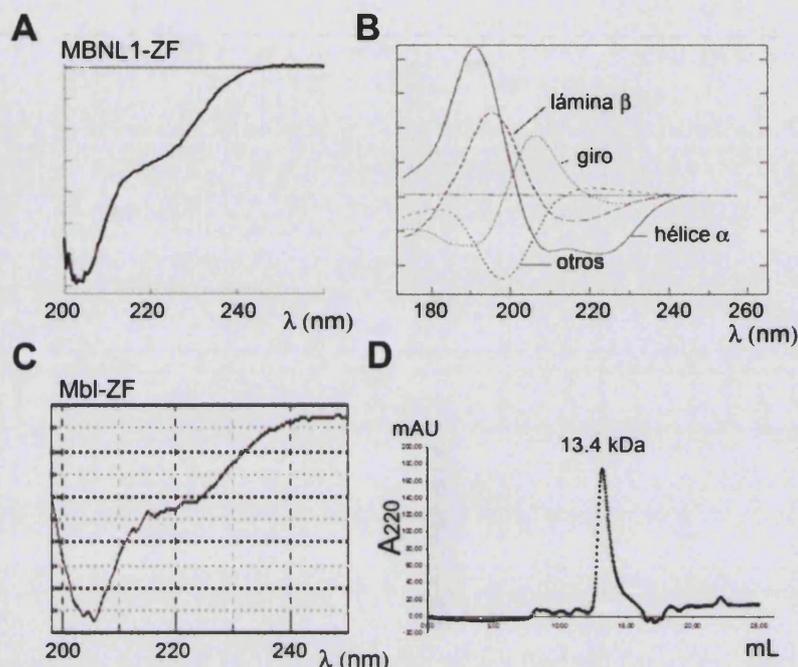


Figura R27. Espectro de DC de los dedos de zinc de las proteínas **Muscleblind**. (A) La proteína humana MBNL1 (2 μ M; Warf *et al.* 2007) presenta un pico pronunciado a 203 nm, y un pico débil a 220 nm, indicando que MBNL1ZF no posee estructura secundaria a excepción de una pequeña porción en forma de hélice alfa (comparar con patrón en B). MbIZF mostraba un espectro similar, con un pico pronunciado a 205 nm y otro débil a 222 nm (C). (D) MbIZF mostró un solo pico de elución al pasar por una columna de exclusión molecular. El volumen de elución coincide con el tamaño de MbIZF en forma de monómero.

7.2.2. p88 se une a repeticiones CUG *in vitro*

Una vez obtenida la proteína recombinante MbIZF estudiamos su capacidad de unión al ARN en presencia y ausencia de p88 mediante un ensayo de polarización de fluorescencia (FP). Cuando un haz de luz polarizada excita a un fluoróforo conjugado con una molécula pequeña, ésta sufre difusión rotacional más rápido que el tiempo necesario para que ocurra la emisión de luz, lo que resulta en una disposición al azar de la molécula en el momento de emisión de fluorescencia (despolarización). Sin embargo, la rotación de la molécula se vuelve más lenta cuando la viscosidad del medio o el volumen molecular cambian, aumentando la polarización de la luz emitida. De esta manera, midiendo los cambios en la polarización de un ARN formado por 23 repeticiones CUG conjugado al fluoróforo carboxifluoresceína, FAM-(CUG)₂₃, podríamos estudiar la unión entre éste y MbIZF, así como la capacidad de p88 de desplazar dicha interacción (Fig. R28) (Mao *et al.*, 2006; Perrin, 1926).

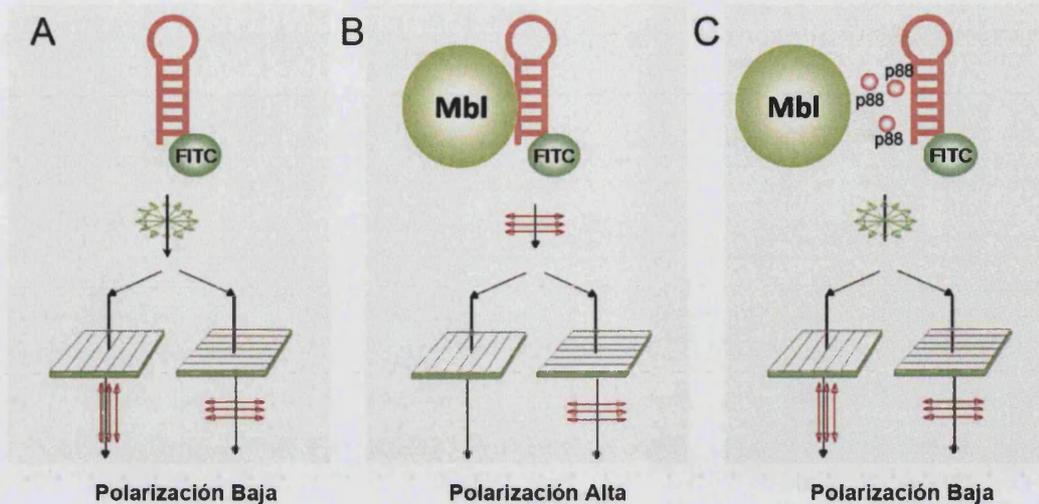


Figura R28. Esquema de un ensayo de polarización de fluorescencia. Los ensayos de polarización de fluorescencia consisten en marcar una molécula pequeña con un fluoróforo (repeticiones CUG conjugadas con carboxifluoresceína en nuestro caso; A), de forma que cuando ésta se une a una molécula de peso molecular mayor (como la proteína MblZF) se modifique su velocidad de rotación (B). Los cambios en la velocidad de rotación se pueden detectar excitando la molécula con haces de luz polarizada en los planos vertical y horizontal y midiendo la dirección de polarización de la fluorescencia emitida. Si una molécula de pequeño tamaño (como p88) fuese capaz de inhibir la unión entre MblZF y FAM-CU23, el ARN fluorescente incrementaría de nuevo su velocidad de rotación, reduciendo su polarización (C).

En estos ensayos la proteína MblZF causó un incremento en la FP de FAM-(CUG)23, indicando unión entre ambas moléculas (Fig. R29B). El análisis de la curva de unión mediante un test no lineal reveló una IC50 teórica de 900 nM. Con el fin de comprobar la especificidad de esta interacción llevamos a cabo estudios de competencia con un ARN no marcado, (CUG)23 (1:10, 1:100 y 1:200 respecto a FAM-(CUG)23). En todos los casos la sonda no marcada compitió la unión (Fig. R29A). p88 también causó un leve incremento en la FP del ARN FAM-(CUG)23 (p-valor: 0.0176; Fig. R29C). Sin embargo, la coadición del péptido y MblZF a FAM-(CUG)23 no disminuyó la polarización del ARN. Por el contrario, los valores de FP en presencia de p88 y MblZF simultáneamente eran mayores que los obtenidos por la adición de proteína MblZF sólo (p-valor: 0.0158; Fig. R29C). Este resultado sugiere que ambas moléculas podrían unirse al ARN sin interferir con la unión de la otra. No obstante, el incremento en los valores de FP tras la coadición de MblZF y p88 era menor que la suma de incrementos causados por ambos por separado ($\Delta mP(Mbl)$: 99.5; $\Delta mP(p88)$: 21.75; $\Delta mP(Mbl+p88)$: 108.25), lo que no descarta que exista una competencia parcial.

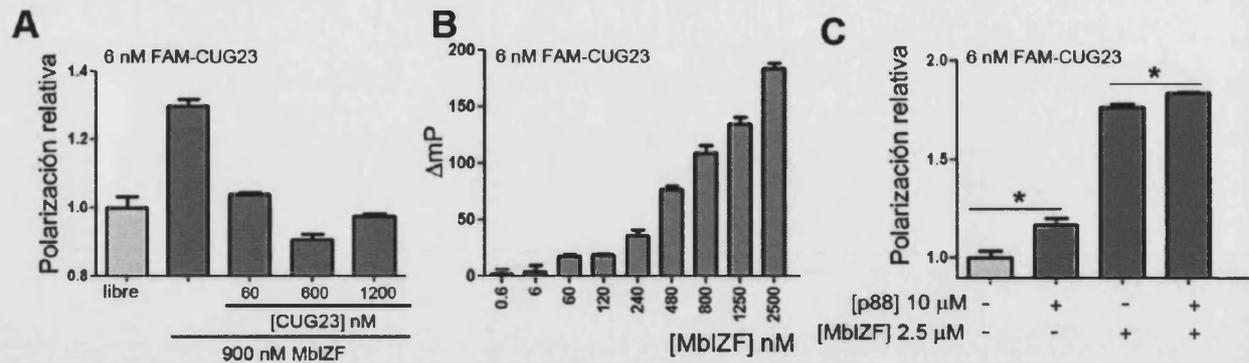


Figura R29. MblZF y p88 se unen a repeticiones CUG. (A) La adición de MblZF causó un incremento en la polarización de FAM-CUG23 provocado por la unión entre ambas moléculas. Esta unión es reversible si se compete con un ARN CUG23 no marcado (A) y es proporcional a la cantidad de MblZF (B). (C) p88 causó un incremento discreto en la polarización de FAM-CUG23 debido al reducido tamaño del péptido. Sin embargo, p88 no revirtió el efecto de MblZF sobre FAM-(CUG)23. * indica p -valor < 0.05 (test t).

Dado el bajo peso molecular de p88 (inferior a 900 Da), los cambios en la rotación del ARN inducidos por el péptido en los ensayos de FP son pequeños y no permiten llevar a cabo una caracterización detallada de la interacción. Por esta razón, decidimos estudiar la unión entre p88 y el ARN FAM-(CUG)23 mediante experimentos de retardo en gel (Jing *et al.*, 2003). Tras determinar la cantidad de ARN óptima para su detección (60 nM; Fig. R30A) analizamos, en primer lugar, la interacción entre FAM-(CUG)23 y MblZF. Dicha unión provocó tanto una disminución en la intensidad de la banda correspondiente al ARN libre en el gel como la formación de agregados de alto peso molecular en el interior del pocillo (Ingmer *et al.*, 1995). La formación de dichos agregados disminuía al competir la unión con sonda (CUG)23 no marcada (1:100), demostrando la especificidad de la interacción. Además, la unión entre FAM-(CUG)23 y MblZF no tenía lugar si el ARN fluorescente se incubaba con la proteína desnaturalizada por calor, ni si la reacción se llevaba a cabo entre FAM-(CUG)23 y una proteína no relacionada (colágeno $\alpha 3$) a la misma concentración que MblZF, de nuevo confirmando la especificidad de la unión (Fig. R30B). Con el fin de disminuir el tamaño de los complejos formados utilizamos un ARN formado por 4 repeticiones CUG (FAM-(CUG)4). Warf y Berglund describieron que los dedos de zinc de MBNL1 pueden unirse a repeticiones CUG formadas por un mínimo de 4 tripletes siempre y cuando se facilite la formación del lazo o 'loop' añadiendo 4 nucleótidos no complementarios hacia la mitad de la secuencia (ver Material y Métodos). Tal y como se muestra en la figura R30C, MblZF se unió a FAM-(CUG)4 pero el complejo formado quedó igualmente retenido en el pocillo.

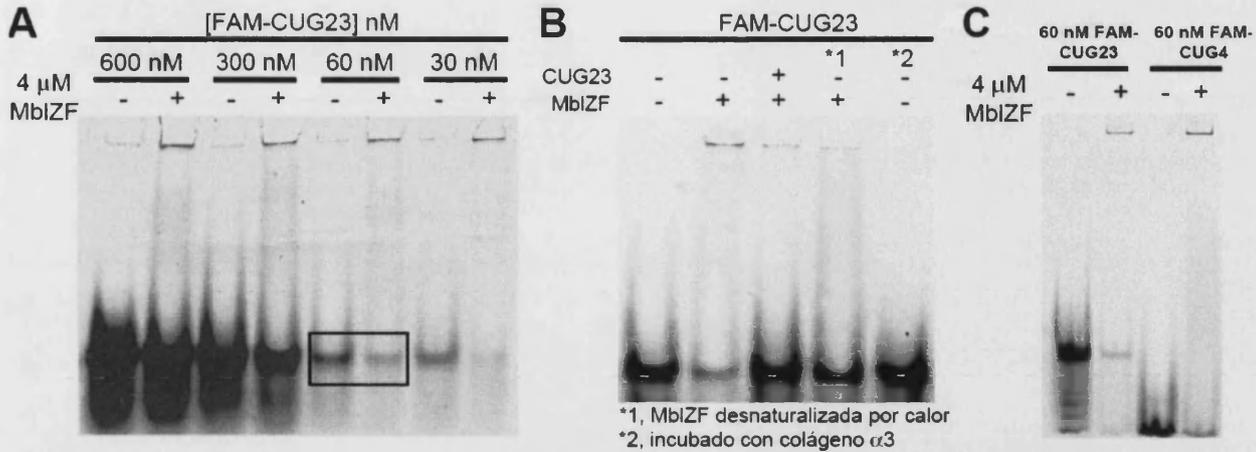


Figura R30. Estudio de la unión de MblZF a FAM-(CUG)23 mediante ensayos de retardo en gel. (A) MblZF se une a FAM-(CUG)23 causando la retención del complejo en el pocillo. Esto ocurre a todas las concentraciones de ARN ensayadas para una concentración de proteína fija. (B) La unión entre FAM-(CUG)23 y MblZF es específica ya que se puede competir con un ARN CUG23 no marcado (proporción FAM-(CUG)23:CUG23 1:100; carrera 3), y no ocurre si la proteína se desnatura por calor antes de incubar con FAM-(CUG)23 (carrera 4). La proteína colágeno alfa-3 utilizada a la misma concentración que MblZF no se une al ARN (carrera 5). (C) MblZF también se une a ARNs de menor tamaño (FAM-(CUG)4) formando complejos que quedan retenidos en el pocillo del gel.

Con el fin de descartar que FAM-(CUG)23 se uniese a la cola de histidinas de MblZF, eliminamos ésta mediante digestión con la proteasa TEV (Fig. R31A-C). La proteína MblZF sin histidinas (MblZF^{ΔHis}) mantenía la capacidad de unión al ARN (Fig. R31D).

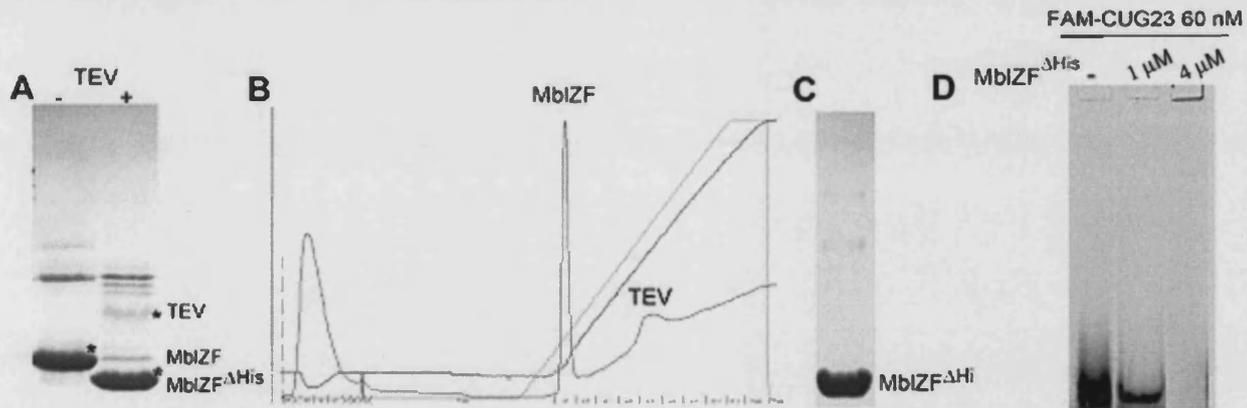


Figura R31. La cola de histidinas de MblZF no afecta a su unión con FAM-(CUG)23. (A) Gel que muestra la digestión con la proteasa TEV para eliminar las 6 histidinas de la proteína MblZF. El producto de la digestión (MblZF^{ΔHis}) se pasó por una columna de afinidad de Níquel para retener las Histidinas y eliminar TEV, al eluir ésta de manera diferente a MblZF^{ΔHis} (B). (C) Resultado tras la purificación. (D) MblZF^{ΔHis} se une a FAM-(CUG)23 y esta unión es proporcional a la concentración de proteína.

Para estudiar la unión de p88 a las moléculas de ARN CUG llevamos a cabo experimentos similares entre el péptido y FAM-(CUG)23. p88 se unió al ARN formando agregados de alto peso molecular, tal y como se ha descrito para MblZF. No obstante, en algunos casos pudimos observar una banda de retardo en el interior del gel (Fig. R32A). p88 se unía a FAM-(CUG)23 a

concentraciones de péptido elevadas (500 μM en adelante, Fig. R32B), indicando una baja afinidad entre ambas moléculas, al menos en las condiciones del ensayo. Esta afinidad se reducía al disminuir el tamaño de las repeticiones (FAM-(CUG)₄, Fig R32C). Con objetivo de determinar si p88 podía competir con MblZF por la unión al ARN, incubamos ambos en presencia de FAM-(CUG)₂₃. p88 no impidió la unión de MblZF, ya que en este caso todo el ARN pasó a formar parte de agregados de alto peso molecular (Fig. R32D). Esto podría deberse bien a un efecto sinérgico entre la proteína y el péptido o a un efecto aditivo si ambos se uniesen a sitios diferentes del ARN.

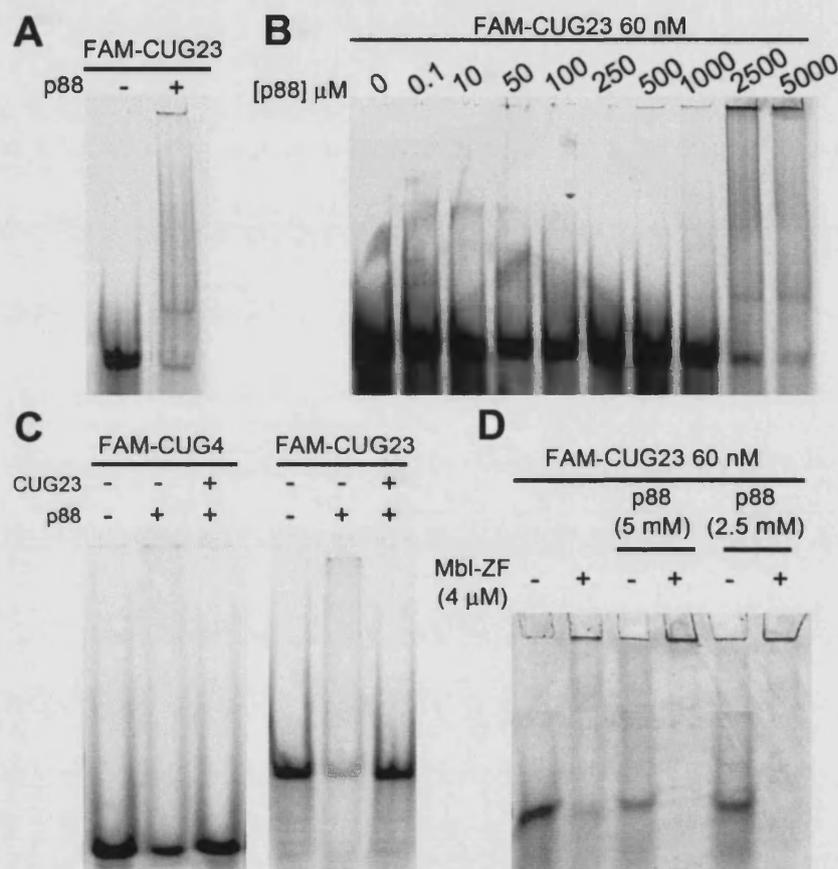


Figura R32. p88 se une a repeticiones CUG sin desplazar a MblZF. (A) p88 (1 mM) puede unirse al ARN FAM-(CUG)₂₃ (60 nM). (B) Esta unión es proporcional a la cantidad de péptido y se detecta a partir de ~500 μM . p88 (1 mM) se une con menor afinidad a repeticiones de tamaño corto (FAM-(CUG)₄, 60 nM) (C). La unión del péptido a FAM-(CUG)₂₃ no interfiere con la interacción de la proteína MblZF (D).

7.3. p88 se une a repeticiones CUG con mayor afinidad que a otras secuencias

Con el fin estudiar la especificidad de la unión observada entre p88 y las repeticiones CUG llevamos a cabo dos experimentos. En primer lugar, ensayamos los cinco hexapéptidos generados durante el rastreo de alaninas (ver apartado 5.3 de Resultados) mediante un experimento de entrecruzamiento con formaldehído. Ninguno de ellos se unió de manera significativa a FAM-(CUG)₂₃ (Fig. R33A), demostrando que todos los residuos de p88 son necesarios para su interacción con el ARN. Dado que estos péptidos no suprimieron la toxicidad del transgén (CTG)₄₈₀ en *Drosophila* (ver Fig. R15), la capacidad de unión de p88 a las repeticiones CUG parece ser necesaria para su actividad *in vivo*.

En segundo lugar, estudiamos el efecto de p88 sobre otras secuencias de ARN y ADN, tanto de doble cadena como de cadena sencilla, marcadas con carboxifluoresceína (FAM) (Fig. R34C). Dichas moléculas incluían (1) un ARN de cadena sencilla formado por 19 nt de la región 3'UTR del gen *DMPK* (ARNcs), (2) un ARN formado por 4 repeticiones CUG fusionadas a dicha secuencia de cadena sencilla de *DMPK* (ARNdc+cs), (3) un ARN capaz de formar una horquilla de doble cadena perfecta formada por 4 repeticiones CAG-CUG (ARNdc), (4) un ADN formado por 4 repeticiones CTG (ADNdc) y (5) un ADN correspondiente a los mismos 19 nt de la región 3'UTR del gen *DMPK*. p88 se unió en todos los casos (Fig. R33B). Además, un ARN mutado no marcado de secuencia (GUC)₄ (al cual los dedos de zinc de la proteína MBNL1 humana no se unen; Warf *et al.*, 2007) así como una mezcla de moléculas de ARN de transferencia (ARNt) desplazaron la unión entre p88 y FAM-(CTG)₂₃ (gel no mostrado). En conjunto, estos datos indican que la unión de p88 al ARN es específica de secuencia (ya que otros hexapéptidos mostraban un comportamiento diferente) y que el péptido puede unirse a más de un solo tipo de ácido nucleico.

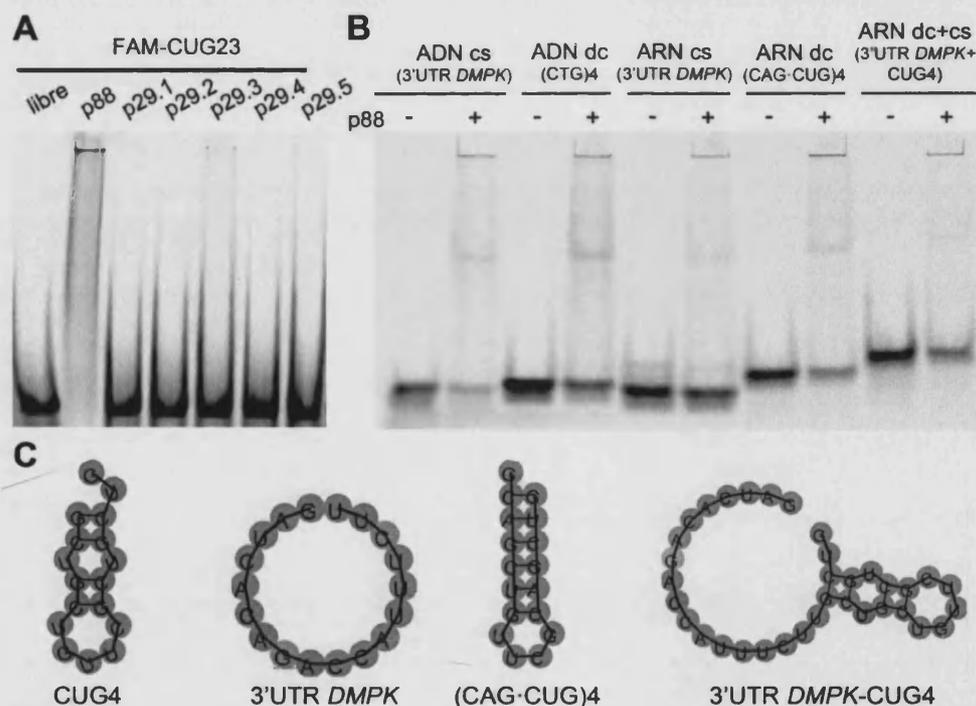


Figura R33. Especificidad de p88. (A) Ninguno de los cinco péptidos del rastreo de alaninas (2.5 mM) se unió al ARN FAM-(CUG)₂₃ (60 nM) de manera significativa, demostrando que la interacción descrita para p88 es específica. (B) p88 (1 mM) puede unirse tanto a ARN como ADN de doble cadena (dc) y cadena sencilla (cs) (60 nM). (C) Esquema que muestra la estructura secundaria de los ácidos nucleicos empleados en el experimento mostrado en (B).

Sin embargo, era posible que p88 se uniese con afinidad diferente a cada una de las secuencias estudiadas. Debido a que los complejos péptido-ARN y péptido-ADN detectados en nuestros experimentos de retardo en gel quedaban retenidos en el pocillo, la determinación de constantes de disociación (K_d) para cada interacción no fue posible. Con el fin de cuantificar la

unión entre p88 y dichos ácidos nucleicos, así como descartar que el péptido se uniese a la carboxifluoresceína en todos los casos, decidimos poner a punto un experimento de extinción de la fluorescencia intrínseca del triptófano presente en la secuencia de p88. El triptófano tiene un máximo de absorción a una longitud de onda de 280 nm y un pico de emisión máximo entre 300 y 350 nm (en función de la polaridad del solvente). La fluorescencia de este residuo cambia cuando la conformación de la proteína, y por tanto el ambiente en el que se encuentra expuesto, se ven modificados por su unión a otra molécula (Carpenter *et al.*, 2001a). Así, incubamos cantidades crecientes de las moléculas de ARN DMPK-CUG4, DMPK y CAG-CUG4, así como los ADNs CTG4 y DMPK con una cantidad fija de p88 (5 μ M), y medimos cambios en la emisión de fluorescencia del péptido a 351 nm. En todos los casos la señal disminuyó de manera proporcional a la cantidad de ARN o ADN añadida al medio, confirmando la unión observada anteriormente. Sin embargo, la representación en una recta de la fluorescencia emitida para cada punto de concentración relativa a la fluorescencia del péptido libre dio lugar a rectas con pendientes diferentes, indicando que la tasa de extinción de fluorescencia (y con ello la afinidad de la unión) era distinta entre los distintos ácidos nucleicos (Fig. R34). La pendiente de la curva era significativamente mayor para la molécula DMPK-CUG4 (-0.034 ± 0.003) que para CTG4 (-0.019 ± 0.005) y DMPK (ARN: -0.024 ± 0.003 y ADN: -0.028 ± 0.002) (p -valor <0.01). Sin embargo para el ARN CAG-CUG (-0.028 ± 0.003) esta diferencia no era estadísticamente significativa (p -valor >0.1 ; Fig. R34B). La molécula DMPK-CUG4 contenía las repeticiones CUG en su entorno de DMPK. En conjunto, esto sugiere la existencia de cierta selectividad por parte del péptido hacia sus dianas, uniéndose de manera preferente a los ARN tóxicos.

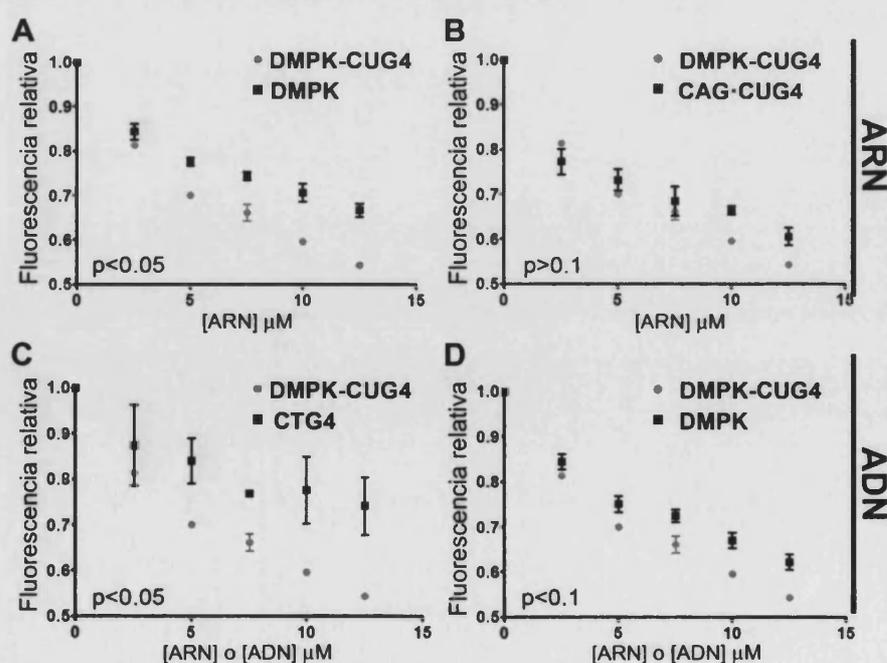


Figura R34. p88 se une con mayor afinidad a DMPK-CUG4. (A) Experimento de extinción de la fluorescencia del triptófano de p88. El péptido (5 μ M) se incubó con distintos ácidos nucleicos (2.5 μ M, 5 μ M, 7.5 μ M, 10 μ M y 12.5 μ M). La tasa de extinción de fluorescencia se midió como la pendiente de las rectas obtenidas al representar los valores de emisión de fluorescencia a 351 nm relativos al péptido libre para cada punto de concentración. Se realizaron al menos dos medidas por punto. En todos los casos dicha tasa era mayor para DMPK-CUG4, aunque no de manera significativa para CAG-CUG4 (B).

7.4. p88 provoca un cambio conformacional en las horquillas de doble cadena formadas por las repeticiones CUG

Tal y como se describe en la hipótesis C de la Fig. R23, un posible mecanismo para acción de p88 podría consistir en desestabilizar las horquillas tóxicas formadas por repeticiones CUG. Con el fin de estudiar posibles cambios en la estructura secundaria del ARN inducidos por la unión de p88, llevamos a cabo en primer lugar un experimento de dicroísmo circular (DC) utilizando un ARN con repeticiones CUG no marcadas (CUG60). Los espectros de dicroísmo circular de los ácidos nucleicos vienen dados por el apilamiento de las bases que conforman su secuencia. Por lo tanto, cuando una molécula se une al ARN, afectando a su estructura, se detecta un cambio en su espectro de DC (Carpenter *et al.*, 2001b). Incubar el ARN CUG60 (1 μM) con la proteína MblZF (1 μM y 1.5 μM) redujo la intensidad de la señal emitida por éste, aunque no desplazó el valor de longitud de onda máximo en el espectro (Fig. R35A), indicando que la unión de MblZF afecta al empaquetamiento de las bases del ARN. Cuando incubamos el ARN con concentraciones crecientes de p88 (0.1 μM , 0.5 μM , 1 μM , 10 μM y 20 μM) observamos un efecto similar (Fig. R35B). Durante las lecturas (~ 3 h), el ARN se mantuvo en la cubeta en el interior del dicrógrafo a 10°C. Para descartar que el ARN se hubiese degradado en este tiempo, medimos el espectro de DC del ARN CUG60 a tiempos 0 y 3 h, habiéndose mantenido éste a 10°C en todo momento. A las 3 horas el espectro de CUG60 no mostró cambios respecto al espectro obtenido a tiempo 0, demostrando que los efectos observados eran específicos (Fig. R35D). Además, los péptidos p29.1 (0.5 μM y 1 μM) y p29.4 (1 μM) del rastreo de alaninas no cambiaron el espectro del ARN libre (Fig. R35E y R35F), confirmando la especificidad de la unión. Por último, cuando añadimos MblZF (0.5 μM) seguido de p88 (0.5 μM), o viceversa, al ARN no observamos un incremento en la señal de DC, lo que sugiere que los cambios producidos en el ARN por uno de ellos no son reversibles por la adición posterior del otro.

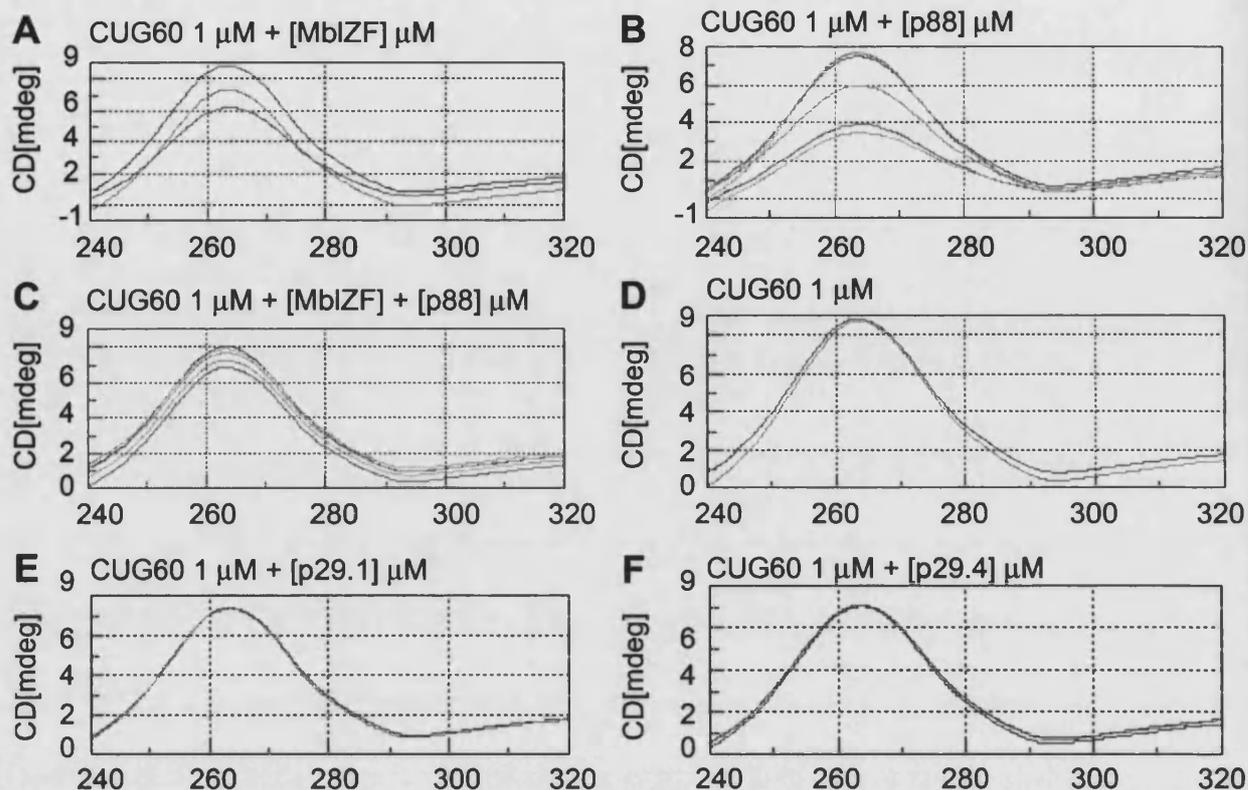


Figura R35. p88 disminuye el apilamiento de las repeticiones CUG. Tanto MblZF (A; 1 μ M y 1.5 μ M) como p88 (B; 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 10 μ M y 20 μ M) cambiaron el espectro de DC de CUG(60) (1 μ M), reduciendo el pico de emisión del ARN a ~265 nm de manera proporcional a la concentración de proteína o péptido. Sin embargo, este efecto no se revirtió cuando se incubó el ARN con MblZF y p88 conjuntamente, independientemente del orden de adición (C). Este cambio no se debía a degradación del ARN durante el tiempo que duró el experimento (D) y tampoco ocurría cuando CUG60 se incubaba con los hexapéptidos p29.1 (E, 0.5 μ M y 1 μ M) y p29.4 (F, 1 μ M). La curva representada en azul oscuro corresponde al ARN libre en todos los casos. En (A) — ARN 1 μ M+MblZF 1 μ M, — ARN 1 μ M+MblZF 1.5 μ M; (B) — ARN 1 μ M+p88 0.5 μ M, — ARN 1 μ M+p88 1 μ M, — ARN 1 μ M+p88 10 μ M, — ARN 1 μ M+p88 20 μ M; (C) — ARN 1 μ M+MblZF 0.5 μ M, — ARN 1 μ M+MblZF 0.5 μ M+p88 0.5 μ M, — ARN 1 μ M+p88 0.5 μ M, — ARN 1 μ M+p88 0.5 μ M+ MblZF 0.5 μ M.

Estos resultados demostraban que p88 disminuía el apilamiento de las bases del ARN y, por tanto, afectaba a la conformación de la molécula. Con el fin de confirmar si dichos cambios causaban una pérdida de la estructura en horquilla llevamos a cabo un experimento utilizando un ARN formado por 23 repeticiones CUG en el que una guanina había sido sustituida por su análogo 2-amino purina (2-AP-(CUG)₂₃). Cuando la 2-AP se encuentra en un entorno de cadena sencilla emite fluorescencia a 375 nm. Sin embargo, dicha emisión se extingue significativamente cuando la molécula se encuentra formando parte de una doble hélice (Datta *et al.*, 2006). A concentraciones bajas de MblZF y p88, para las cuales habíamos detectado unión en los experimentos de DC y Trp-FQ (ARN:proteína \leq 1:5), ninguno de los dos produjo cambios en la fluorescencia de la 2-AP (Fig. R36A-B). En el caso de MblZF esto coincide con observaciones previas publicadas por otros autores (Warf, Diegel *et al.*, 2009). Sin

embargo, al aumentar la concentración de p88 a 100 μM (ARN:péptido 1:100) el ARN 2AP-(CUG)23 sufrió un cambio conformacional de doble cadena a cadena sencilla, con un incremento de 2.9 veces en la emisión de fluorescencia de la molécula (Fig. R36B). Con el fin de confirmar la especificidad de este efecto, llevamos a cabo el mismo experimento incubando los péptidos del rastreo de alaninas p29.1 y p29.4 con el ARN 2-AP-(CUG)23 a la misma concentración (100 μM). Ninguno de estos péptidos produjo cambios en la emisión de fluorescencia, como tampoco lo hizo el DMSO por sí sólo (Fig. R36C). Por lo tanto, estos resultados indican que p88 es capaz de desestabilizar las horquillas de doble cadena formadas por las repeticiones CUG y confirman que MblZF y el péptido se unen de manera diferente al ARN.

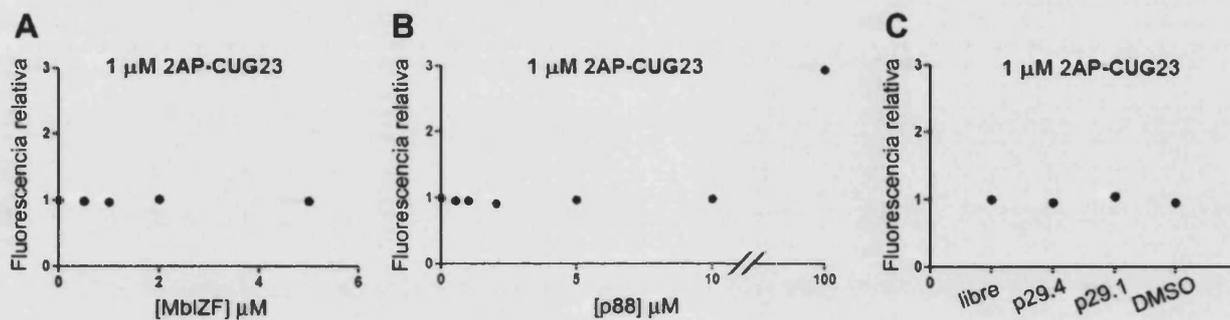


Figura R36. p88 abre las horquillas de repeticiones CUG. Medidas de la fluorescencia emitida por la 2-amino purina en un ARN (CUG)23 (1 μM) en presencia de MblZF (0.1 μM , 1 μM , 2 μM , y 5 μM) (A) o p88 (0.1 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM y 100 μM) (B) relativa a la fluorescencia emitida por el ARN libre. p88 causó un incremento de 2.9 en la fluorescencia de 2-AP, indicando un cambio hacia cadena sencilla (Datta *et al.*, 2006). Este efecto no se observó al incubar el ARN con DMSO ($\sim 0.05\%$), p29.1 o p29.4 (100 μM).

8. Validación de la actividad de p88 en un modelo de DM1 en ratón

8.1. Estudio de la toxicidad de p88 en mamíferos

Con el fin de estudiar el posible efecto tóxico de p88 en mamíferos y establecer la dosis máxima tolerable para posteriores ensayos, administramos el péptido a ratones de la cepa salvaje *FVB*. Debido a la baja absorción de los péptidos por las paredes del intestino decidimos llevar a cabo inyecciones intramusculares en el músculo tibial anterior de animales de 4-5 semanas de edad utilizando cuatro dosis diferentes: 0.5 μg , 1 μg , 10 μg y 100 μg (equivalentes a ~ 0.025 mg/Kg, 0.05 mg/Kg, 0.5 mg/Kg y 5 mg/Kg tomando 20 mg como peso medio de los animales) con un total de 6 ratones por dosis (3 hembras y 3 machos). Pasadas 4 semanas tras la inyección, los animales se sacrificaron y se llevó a cabo una autopsia visual, así como un estudio histomorfológico del músculo y análisis de sangre (Tabla R2 y Fig. R37). Como control se utilizaron animales inyectados con la misma cantidad de DMSO (0.2% para las dosis 0.5 μg y 1 μg y 2% para las dosis 10 μg y 100 μg).

La autopsia visual y el análisis histológico de los músculos de los animales tratados no revelaron diferencias significativas respecto a los controles con DMSO. En algunos casos se observaron signos de mixedematosis leve (es decir, acumulación de líquido) y, en ocasiones, una ligera inflamación, probablemente causados por la propia inyección (Fig. R37). Los análisis de sangre, no obstante, sí que mostraron diferencias entre los animales tratados y los control (Tabla R2). Como marcador de actividad renal se midió la cantidad de ácidos biliares, urea y creatinina en sangre. El enzima creatinafosfoquinasa (CPK) se usó como marcador de daño en músculo esquelético y corazón, y la fosfatasa alcalina (FA), la gama glutamil transpeptidasa (GGT) y la glutamato piruvato transaminasa (GPT) como marcadores de daño hepático. Todos los animales (incluidos los control) mostraban valores de urea y FA elevados respecto a los valores estándar (Tabla R2). Además, los animales control sometidos a DMSO al 2% presentaban valores de GPT y CPK anormalmente altos. Esto podría deberse a la toxicidad del DMSO o a la propia inyección. No obstante, la dosis de 10 μg mostró valores aún mayores de GPT en sangre que sus controles. Además, cabe destacar que dos de los ratones tratados con la dosis de 100 μg murieron aproximadamente 11 días después de la inyección (d/i), confirmando la toxicidad de p88 a esta concentración. De uno de estos dos animales pudo extraerse sangre momentos antes de su muerte. Este ratón presentaba valores extremadamente altos de urea, creatinina, CPK y GGT en sangre (p.e., un valor 28 veces mayor para la CPK que el límite superior de los valores estándar y 15 veces mayor que su control con DMSO).

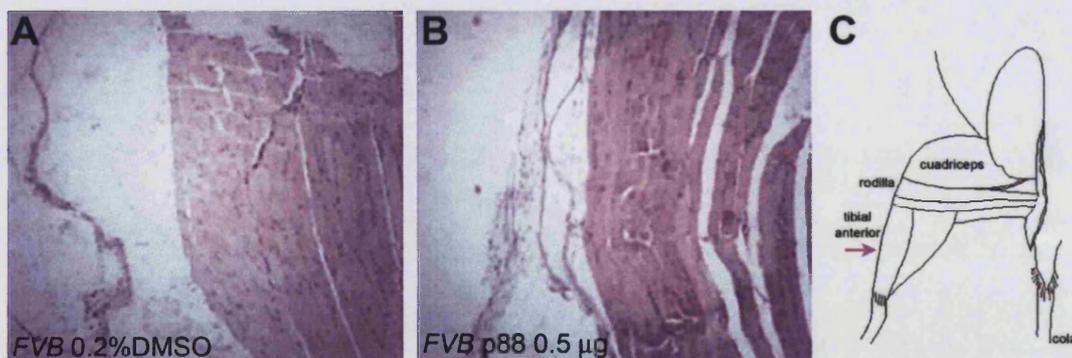


Figura R37. Ejemplo de análisis histopatológico. La inyección intramuscular de 0.2% DMSO (A) ó 0.5 μg de p88 (B) en ratones FVB generó una zona pequeña mixedematosa sin apenas reacción inflamatoria relevante asociada en ambos casos. (C) Esquema que muestra la localización del músculo tibial anterior en la extremidad posterior del animal.

Tabla R2. Toxicidad de p88 en ratones FVB

	ref.	DMSO 0.2%	p88 0.5 µg	p88 1 µg	DMSO 2%	p88 10 µg	p88 100 µg†
Riñón							
Á. Biliares ⁽¹⁾	<15	3.4±0.4	3.7±0.5	4.7±0.9	2.9±0.3	4.8±0.7	3.3±0.3
Urea ⁽¹⁾	17-28	45.2±9.6*	46.6±4.9*	36.1±1.2*	38.7±4.6*	54.2±3.2**	52.0±3.3**
Creatinina ⁽¹⁾	0.3-1	0.3±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0
Músculo							
CPK ⁽²⁾	50-500	203±43	77.0±18	40.5±25	4923±2012*	4937±1384*	2461±1036*
Hígado							
FA ⁽²⁾	45-222	400±25*	399±21*	326±15*	371±32*	297±16*	343±27*
GGT ⁽²⁾	0-12	1.0±0.0	1.0±0.0	1.6±0.4	2.1±0.5	0.7±0.1	1.3±0.4
GPT ⁽²⁾	26-77	67.0±7.0	67.2±6.0	60.6±7.1	70.3±16.3	143±32.4**	75.7±7.8

* indica valores más altos que los valores de referencia. ** indica valores más altos que el respectivo control con DMSO.

† 2 animales murieron aproximadamente a los 11 días d/i.

(¹) unidades expresadas en mcmol/L. (²) unidades expresadas en U/L.

8.2. p88 revierte los defectos de splicing de *Serca1* y *Tnnt3* en ratones *HSA^{LR}*

p88 suprime la toxicidad de (CTG)480 en el SNC, músculo y ojo de *Drosophila* y se une a repeticiones CUG *in vitro*. Para validar la relevancia de estos resultados en modelos de DM1 en mamíferos, decidimos ensayar p88 en ratones *HSA^{LR}*, cedidos a nuestro laboratorio por el Prof. Charles Thornton (Univ. Rochester, NY, EEUU). Estos ratones expresan 250 repeticiones CUG en los transcritos heterólogos de la *actina* humana y reproducen la mayoría de síntomas de la DM1, incluyendo defectos en el *splicing* alternativo de al menos 17 transcritos (Du *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2006; Mankodi *et al.*, 2000). Uno de los ejemplos más claros de *splicing* alterado tanto en pacientes como en ratones *HSA^{LR}* es el del exón 22 de los transcritos de la ATPasa dependiente de Ca^{+2} *Serca1*. En la población sana, dicho exón se excluye en las formas fetales y se incluye en el adulto. Sin embargo, tanto en los pacientes como en los ratones *HSA^{LR}* el exón 22 se excluye a lo largo de toda la vida, manteniéndose el patrón fetal en los individuos adultos (Kimura *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006). Otro ejemplo característico corresponde a los transcritos de la *troponina T del músculo esquelético* o *Tnnt3*. La proteína Tnnt3 se encuentra en los sarcómeros de las fibras musculares rápidas en el músculo esquelético. Sus transcritos sufren *splicing* alternativo del denominado exón F o fetal. En la población sana este exón está ausente en los individuos adultos, mientras que en los pacientes de DM1 y ratones *HSA^{LR}* el exón fetal se mantiene (Lin *et al.*, 2006).

Con el fin de determinar si p88 podía revertir los defectos de splicing de *Serca1* y *Tnnt3* en los ratones *HSA^{LR}*, llevamos a cabo inyecciones intramusculares del péptido a dos dosis: 0.5 µg y 10 µg. Los animales tratados se sacrificaron 1 semana, 2 semanas y 4 semanas después de la inyección y se diseccionó el músculo tibial anterior tanto de la pata derecha (inyectada con p88) como de la izquierda (inyectada con suero salino con DMSO al 0.2% para la dosis 0.5 µg y al 2% para la dosis 10 µg). Como control se utilizaron animales *FVB* y animales *HSA^{SR}*

(los cuales expresan 5 repeticiones CUG en transcritos de la *actina* humana) inyectados en ambas patas de manera similar, así como ratones *HSA^{LR}* en los que se inyectó suero con DMSO en las dos extremidades.

El análisis mediante RT-PCR de los transcritos de *Serca1* y *Tnnt3* de animales tratados con 0.5 µg no reveló cambios significativos en la inclusión de los exones 22 y fetal F respectivamente, a ninguno de los tiempos ensayados (geles no mostrados). Sin embargo, en al menos 2 de los 5 animales inyectados con 10 µg, p88 revirtió los defectos de *splicing* en ambos casos (Fig. R38A-C). Debido al complejo patrón de bandas obtenido para los transcritos de *Tnnt3* no pudimos cuantificar de forma precisa el incremento en el porcentaje de exclusión del exón fetal F inducido por p88. En el caso de *Serca1*, p88 aumentó el porcentaje de inclusión del exón 22 en un 1.3% (1 semana d/i, p-valor>0.05), 25.9% (2 semanas d/i, p-valor<0.05) y 38.3% (4 semanas d/i, p-valor<0.01) (Fig. R38D). Por último, p88 no afectó al *splicing* de *Serca1* y *Tnnt3* de animales FVB y *HSA^{SR}*, así como tampoco a los transcritos musculares del gen *Capzb*, los cuales se utilizaron como control de especificidad ya que su procesamiento no está alterado en los ratones modelo *HSA^{LR}* (Fig. R38A-C).

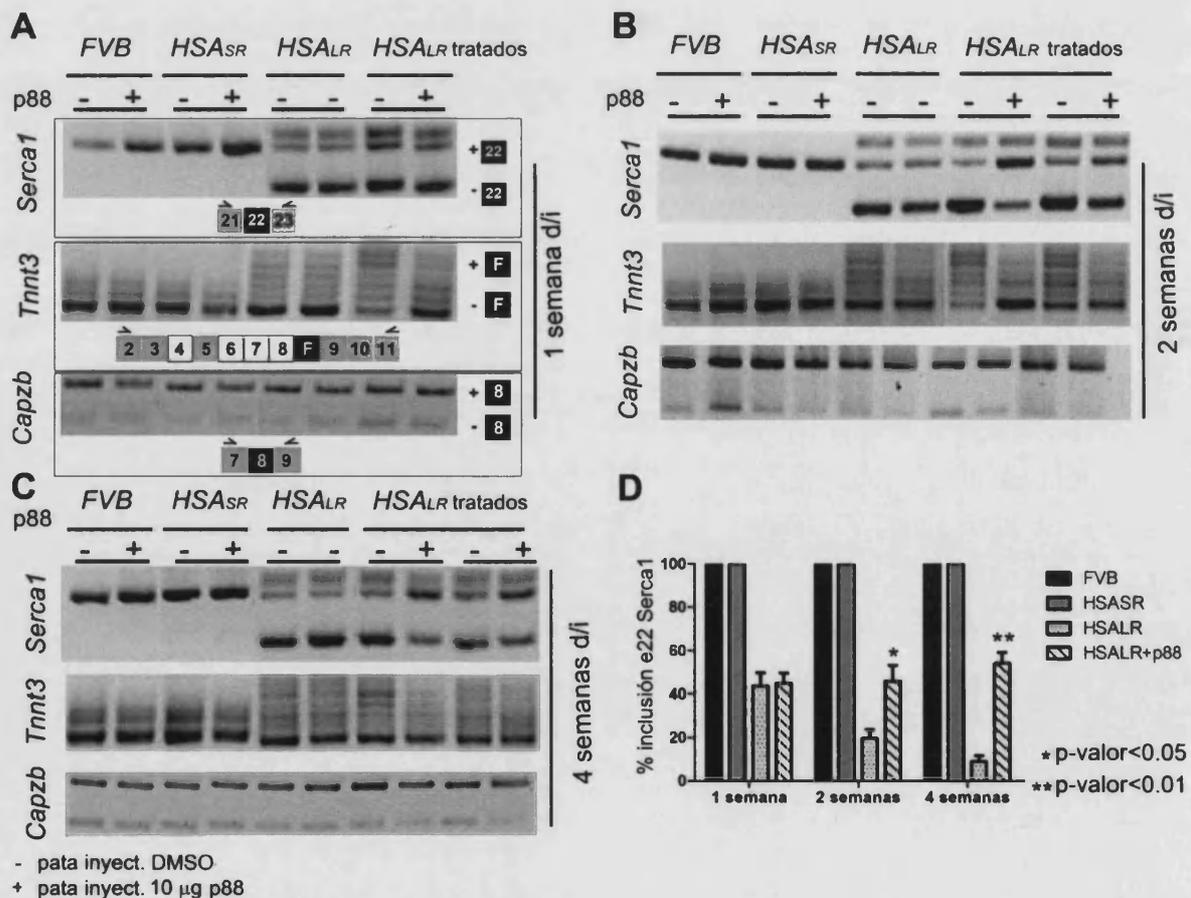


Figura R38. p88 revierte defectos de *splicing* de *Serca1* y *Tnnt3* en ratones modelo de DM1. La inyección intramuscular de 10 µg de p88 aumentó el porcentaje de inclusión del exón 22 de los transcritos de *Serca1* 2 y 4 semanas después d/i (B, C y D) y de exclusión del exón fetal F de *Tnnt3* 1, 2 y 4 semanas d/i (A, B y C). p88 no alteró el procesamiento de estos transcritos en

ratones *FVB* ni *HSA^{SR}*, y tampoco afectó los transcritos control *Capzb* (A-C). Las figuras (A-C) muestran resultados de RT-PCR llevadas a cabo durante 25 ciclos. Las líneas horizontales unen la extremidad izquierda (inyectada con suero con 2% DMSO) y derecha (inyectada con 10 µg péptido) del mismo animal, en ese orden. Las barras en (D) corresponden a valores promedio con su error estándar. Al menos dos reacciones de PCR se llevaron a cabo para cada animal. Los p-valores se hallaron utilizando un test t.

El análisis del procesado de los transcritos de *Serca1* en las patas derecha (inyectada con p88) e izquierda (inyectada con suero y 2% DMSO) procedentes de un mismo animal a las 4 semanas d/i reveló que en la extremidad no tratada con péptido el porcentaje de inclusión del exón 22 era mayor con respecto al mostrado por los animales *HSA^{LR}* inyectados con DMSO en ambas patas (Fig. R39). Esto indica que la cantidad de p88 que llegaba al músculo tibial anterior de la extremidad izquierda a través de la sangre era suficiente para revertir parcialmente los defectos de *splicing* de manera sistémica.

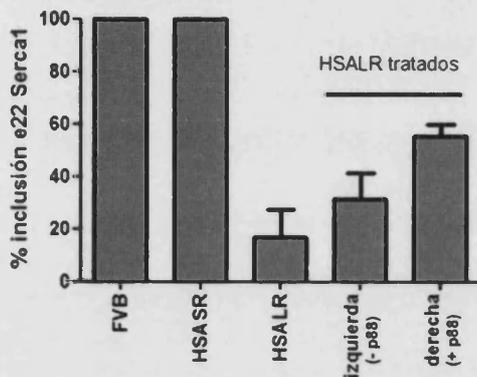


Figura R39. Efecto sistémico de p88 sobre el *splicing* alternativo de *Serca1*. El porcentaje de inclusión del exón 22 en ratones *FVB* y *HSA^{SR}* 4 semanas después de la inyección de 10 µg de p88 era del 100%. Este valor era del 16.8% ± 10.5 en los animales *HSA^{LR}* inyectados con 2% DMSO en ambas patas. En los animales *HSA^{LR}* tratados el porcentaje de inclusión resultó del 55.1% ± 4.9 en la pata derecha inyectada con p88 y del 31.5% ± 9.8 en la pata izquierda del mismo animal (inyectada con 2% DMSO). Las barras representan los valores promedio de 3 animales y su error estándar.

8.3. p88 revierte defectos histológicos en el músculo de ratones *HSA^{LR}*

La principal característica a nivel histológico tanto de la DM1 como de los animales *HSA^{LR}* es la presencia de núcleos centrales en las fibras musculares (Mankodi *et al.*, 2000). La inyección de 0.5 µg y 10 µg en el músculo tibial anterior de estos animales redujo de manera significativa el porcentaje de células con núcleos centrales respecto de los animales *HSA^{LR}* tratados con DMSO, mientras que no produjo cambios en los ratones *FVB* (Fig. R40). Este efecto era más pronunciado transcurridas 4 semanas tras la inyección, indicando que la mejora detectada es un proceso lento y podría mantenerse de manera prolongada.



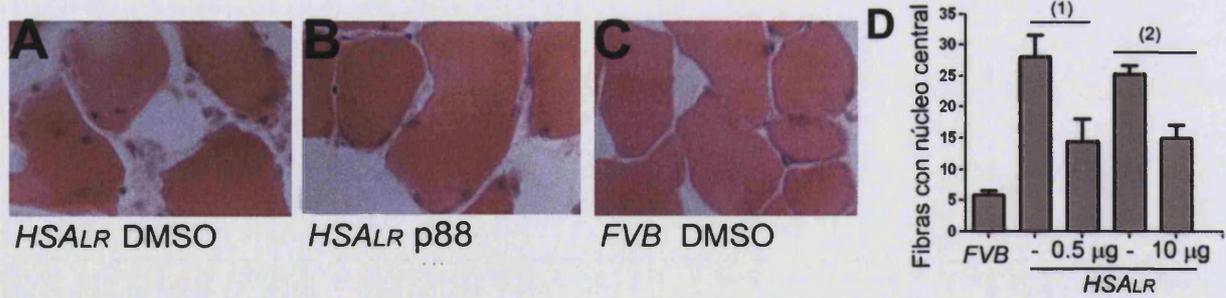


Figura R40. p88 disminuye el número de células musculares con núcleo central. Crio-secciones del músculo tibial anterior teñidas con hematoxilina eosina mostrando la presencia de núcleos centrales en los animales *HSA^{LR}* (A), mientras que éstos se disponen en la periferia de las células en los animales *FVB* (C). p88 redujo el porcentaje de fibras con núcleos centrales en los ratones *HSA^{LR}* de manera significativa 4 semanas tras la inyección tanto de 0.5 µg como de 10 µg de péptido (B y D). (1) Indica animales cuyo control se inyectó con 0.2% de DMSO. (2) Indica animales cuyo control se inyectó con 2% de DMSO.

En conjunto, los resultados obtenidos utilizando ratones modelo confirman el potencial terapéutico de p88 en mamíferos, abriendo nuevas vías de estudio en la búsqueda de tratamientos para la DM1.

Discusión

Discusión

1. La expresión de repeticiones largas del triplete CTG en el cerebro de *Drosophila* es tóxica

La expresión de 480 repeticiones del trinucleótido CTG en los Cuerpos de Seta (MB, *mushroom bodies*) de la mosca, utilizando la línea 103Y-Gal4, causó un fenotipo de letalidad dependiente de temperatura. Una vez sobrepasado el umbral de toxicidad, cambios de tan sólo 0.5-1°C mostraron efectos notables en la supervivencia de los individuos, indicando que las neuronas de los MB son extremadamente sensibles a los niveles de transcritos (CUG)480. El hecho de que otras líneas Gal4 de expresión en los MB reprodujesen el fenotipo de letalidad descrito para la línea 103Y demuestra que las repeticiones ejercen un efecto tóxico sobre dichas neuronas. Tanto las líneas 103Y como c739 y 238Y dirigen la expresión a los tres pares de lóbulos que forman los MB, la línea 045Y lo hace mayoritariamente a los lóbulos α/β y las líneas H24 y 201Y dirigen la expresión preferentemente a los lóbulos γ (www.fly-trap.org). La expresión de (CTG)480 utilizando las cuatro primeras líneas disminuyó la viabilidad de las moscas, mientras que las líneas H24 y 201Y no provocaron ningún efecto significativo. Estos datos sugieren que para que la expresión de los ARNs de repeticiones CUG en los MB sea tóxica es necesario que éstos se expresen al menos en los lóbulos α/β .

La ablación química de los MB mediante el tratamiento con Hidroxiurea (HU) consiguió suprimir parcialmente la letalidad inducida por las repeticiones CTG, confirmando de nuevo el efecto tóxico de (CUG)480 en este tejido. Este experimento, además, sugiere que dicha letalidad no se debe a un incremento en la muerte celular o neurodegeneración, pues de ser así el tratamiento con HU hubiese potenciado el fenotipo. Por el contrario, la expresión de repeticiones CUG en los MB podría alterar la actividad de estas neuronas, adquiriendo nuevas funciones o potenciando sus funciones normales. Cabe destacar que, aunque el incremento en la tasa de supervivencia observado respecto al control sea tan sólo del 30%, no esperábamos un rescate total, ya que no todas las neuronas de los MB desaparecen tras el tratamiento. Si, en efecto, las repeticiones CTG alteran la función de las neuronas en las cuales se expresan, el hecho de que algunas células sobrevivan al tratamiento seguiría haciendo perjudicial la actividad de las mismas.

Los MB son estructuras necesarias para el aprendizaje olfativo y la memoria en *Drosophila*, y se han relacionado con el cortejo en distintos insectos, entre otras funciones (McBride *et al.*, 1999; Zars *et al.*, 2000). Existen trabajos que demuestran que los MB juegan, además, un papel en la generación, regulación y coordinación de patrones de movimiento, aunque su acción sobre el control motor no ha sido estudiada en profundidad. Martin *et al.* analizaron el efecto de la pérdida de neuronas en los MB sobre la capacidad motora mediante el tratamiento

con HU y el uso de mutantes que afectan a su desarrollo (*mushroom body miniature*¹, *mbm*¹). En todos los casos los autores observaron un incremento en la actividad motora de las moscas, ya que una vez los individuos iniciaban el movimiento de manera espontánea tenían dificultad para detenerse (Martin *et al.*, 1998). En nuestro laboratorio, la expresión de (CTG)₄₈₀ usando la línea *Dmef2-Gal4* mostraba un efecto similar (Monferrer, 2007). El gen *Dmef2* se expresa principalmente en el mesodermo a partir de la gastrulación, pero también lo hace en las células Kenyon de los MB (Schulz *et al.*, 1996). En conjunto, esto sugiere que la expresión de repeticiones CTG en los MB de *Drosophila* podría comprometer su función sobre el control motor.

A diferencia de los experimentos de Martin *et al.*, la alteración de la función de los MB en las moscas modelo (CTG)₄₈₀ provocaba la muerte de los individuos. La expresión de (CTG)₄₈₀ con la línea de expresión pan-neuronal *elav-Gal4* a 29°C también resultó ser letal (datos no mostrados, generados durante este trabajo). Esto confirma que los ARNs CUG son tóxicos en el sistema nervioso de *Drosophila* al igual que en vertebrados. Sin embargo, existen pocos casos descritos de letalidad causada por sobreexpresión o silenciamiento de genes en los MB. Un ejemplo son los mutantes del gen *dfmr1*, homólogo del gen humano implicado en el síndrome del X frágil, los cuales tienen defectos morfológicos en los MB que implican a neuronas que se forman durante la metamorfosis. En estos mutantes, al igual que en nuestro modelo, se detectó una letalidad parcial en estadio de pupa madura (Michel *et al.*, 2004). Por otro lado, la expresión de la toxina tetánica (TNT) bajo el control del sistema Gal4/UAS se ha utilizado ampliamente en estudios de neurobiología en *Drosophila*, al actuar como inhibidor de la transmisión sináptica. La expresión de TNT en el cerebro no causa una pérdida de células en los MB, pero sí una alteración en su función al interrumpir la comunicación interneuronal. Martin *et al.* describieron que la presencia de TNT en los MB también causaba un incremento en la actividad locomotora. La expresión de *UAS-TNT* usando líneas de expresión en los lóbulos α/β disminuyó, además, la viabilidad de las moscas (Acevedo *et al.*, 2007). Como se ha comentado, la toxina tetánica no causa pérdida de las células en las cuales se expresa, pero sí una alteración en su función. Esto sugiere que afectar la actividad de estas neuronas puede causar la muerte de los individuos independientemente de que exista neurodegeneración.

Los mecanismos por los cuales una descoordinación motora originada por una alteración en la función de los MB puede resultar en letalidad no están descritos. Es posible que tras la metamorfosis y durante la eclosión del adulto en el interior del pupario, los individuos sean incapaces de llevar a cabo los pasos apropiados para abrir el opérculo. Éstos pasos consisten en una serie de movimientos abdominales estereotipados, específicos de especie. Se sabe que este comportamiento se desencadena desde el cerebro y que está mediado por una hormona neurosecretada denominada hormona de la eclosión (Horodyski *et al.*, 1993). Un fallo en el

mecanismo que controla este comportamiento impediría la eclosión de los individuos adultos, lo que podría conducir a la muerte de las moscas por inanición u otros efectos. En nuestro caso, el hecho de que la apertura manual del opérculo, mediante pinzas, diese lugar a moscas adultas viables y fértiles apoya esta hipótesis.

2. Optimización de un ensayo funcional en *Drosophila* para el rastreo de moléculas *in vivo*

Tal y como se describe en el apartado 9 de la Introducción, al inicio de este trabajo apenas existían precedentes de la aplicación de rastreos químicos en *Drosophila*. En este trabajo pusimos a punto una metodología con el fin de identificar moléculas que se comportasen como lo harían modificadores genéticos, es decir, suprimiendo o potenciando los fenotipos de expresión de las repeticiones CTG. Para ello, en primer lugar determinamos las condiciones óptimas de administración de los compuestos en la comida, en las cuales se minimizase el gasto de fármaco sin comprometer la viabilidad de los individuos.

En primer lugar, decidimos utilizar 1 mL de comida en tubos de 1 cm de diámetro y 5 cm de largo, ya que encontramos que la relación entre el volumen de comida y el diámetro del tubo era crítica, al definir ésta la superficie de evaporación del medio y con ello su durabilidad (datos no mostrados). De esta manera, el utilizar volúmenes de comida pequeños (<1 mL) en tubos de diámetro mayor de 1 cm elevaba la tasa de letalidad debido a la deshidratación del medio. Asimismo, un volumen de comida elevado (>1 mL) en un tubo estrecho disminuía la supervivencia de los individuos, probablemente por una peor difusión del oxígeno al fondo de la comida, en la cual se encontraban las larvas.

El fenotipo de letalidad descrito, al ser fácilmente cuantificable, proporcionaba una herramienta sencilla, rápida y objetiva con la que ensayar y valorar el efecto de los compuestos de las quimiotecas en estudio. De esta manera, el número inicial de individuos por tubo era otro aspecto importante a considerar, pues necesitábamos cantidades lo suficientemente grandes como para poder llevar a cabo análisis estadístico, sin promover la competencia de las larvas por la comida. Así, en nuestras condiciones experimentales, valores por encima de 30 individuos afectaban a la supervivencia. Por esta razón, decidimos utilizar 20 hembras (*103Y/+; UAS-(CTG)480/+*) y 10 machos (*yw/Y; UAS-(CTG)480/+*, control interno) por tubo, y aumentamos el número de réplicas a 3, contando en total con 90 individuos por molécula ensayada.

El hecho de que decidiésemos partir de larvas de primer estadio se debe principalmente a dos razones. En primer lugar, los MB se originan a partir de cuatro neuroblastos presentes ya en el embrión. Estos neuroblastos no se dividen hasta el estadio L1 larvario, momento a partir

del cual comienza el desarrollo de los MB (T. Lee *et al.*, 1999; Truman & Bate, 1988). Administrar los compuestos en estadíos posteriores supondría que los individuos no habrían estado en contacto con las moléculas en ensayo durante parte de la formación de los MB. Por otro lado, utilizar larvas L1 tiene dos ventajas frente al uso de embriones: evita la selección de huevos no fecundados o de embriones muertos y posibilita la distinción entre sexos gracias a la presencia de la mutación *yellow* en los machos (*yw/Y; UAS-(CTG)480/+*), la cual puede distinguirse por el color de la mandíbula de las larvas.

Tras analizar el posible efecto de la composición de distintos medios nutritivos (Tabla D1), decidimos utilizar comida instantánea comercial por tres motivos principales. En primer lugar, los medios de cultivo estándar caseros contienen extractos de maíz, soja y malta, lo cual añade un factor de variabilidad a la comida en función de la partida de harinas utilizada en su elaboración. Los medios instantáneos comerciales y el medio casero Lewis no contienen dichas harinas (Gonzalez-Candelas *et al.*, 1990). Sin embargo, tanto a este último como a los medios estándar se les añade ácido propiónico con el fin de evitar el crecimiento de hongos. Se ha descrito que tanto el ácido butírico como el ácido propiónico suprimen la variegación por efecto de posición, lo cual puede aumentar la expresión de transgenes (Michailidis *et al.*, 1989; ten Lohuis *et al.*, 1995). Debido a la sensibilidad del fenotipo de letalidad descrito en las moscas *103Y-Gal4/+; UAS-(CTG)480/+* frente a pequeños cambios en la expresión del transgén, decidimos evitar el uso de este componente en los medios de cultivo. Además, a causa de la presencia de agar tanto en los medios estándar como de Lewis, la comida ha de permanecer a $\geq 60^{\circ}\text{C}$ durante la adición de los compuestos para evitar su solidificación. Añadir las moléculas a un medio caliente podría comprometer la estabilidad de las mismas.

Tabla D1. Composición de distintos medios nutritivos de <i>Drosophila</i>		
Comida instantánea comercial	Medio casero estándar	Medio de Lewis
Maíz	Agar	Agar
Levadura de cerveza	Levadura	Levadura
Glucosa	Harina de soja	Sal común
Sacarosa	Harina de maíz	Azúcar
Fibra de Soja	Azúcar	Ác. propiónico
Ác. p-Hidroxibenzoico, metil ester	Extracto de malta	Etanol
	Ác. propiónico	Nipagín
	Etanol	
	Nipagín	

El dimetil sulfóxido (DMSO) es un disolvente orgánico utilizado en algunos casos como crioprotector o como facilitador de otros fármacos dada su capacidad para atravesar rápidamente la epidermis y membranas celulares (Notman *et al.*, 2007). Este compuesto en altas concentraciones puede ser tóxico. Las moléculas en las quimiotecas a ensayar estaban disueltas en DMSO, lo cual podría afectar a la tasa de supervivencia de las moscas, factor a

medir durante el rastreo. Por esta razón, determinamos la concentración máxima de DMSO tolerada por las larvas. La cantidad máxima tolerable en el medio nutritivo comercial resultó ser del 0.1%, lo cual es consistente con datos obtenidos por otros autores (Agrawal *et al.*, 2005; Jaklevic *et al.*, 2006). Sin embargo, esta cantidad resultó ser dependiente de la receta de medio de cultivo empleada. Así, para la comida casera estándar, el umbral de toxicidad del DMSO era aproximadamente 3 veces mayor que para el medio comercial. Esta diferencia podría deberse a que la comida casera es más rica en nutrientes que la comercial o a que el calor en la primera afecta al DMSO. Además, el medio nutritivo comercial sufre deshidratación de manera más rápida que el medio casero, lo que podría concentrar el compuesto. En ambos casos, la toxicidad asociada al DMSO limitaba la cantidad máxima de las moléculas a ensayar durante los rastreos.

3. Rastreo de moléculas de actividad conocida: Quimioteca Prestwick

3.1. Identificación de rutas fisiológicas relacionadas con la toxicidad de (CTG)480 en el cerebro de *Drosophila*

Los síntomas de la DM1 afectan principalmente al músculo y al sistema nervioso. A pesar de que los procesos que desencadenan las alteraciones musculares en los pacientes han sido estudiados en profundidad, todavía no se conocen los mecanismos responsables de otros muchos síntomas, como los problemas cognitivos, endocrinos o las cataratas. Esto dificulta el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas y reduce el abanico de compuestos aplicables a pacientes a unas pocas clases de moléculas.

Los defectos neurológicos de los pacientes incluyen excesiva somnolencia diurna y pérdida de memoria, entre otros. Entender el efecto tóxico de las repeticiones CTG en las neuronas de la mosca podría ayudar a comprender las causas de los síntomas nerviosos de los pacientes, permitiendo el diseño de terapias adecuadas. Los MB de *Drosophila* están implicados en tareas cognitivas complejas como el aprendizaje multisensorial o la capacidad de atención (Davis, 2005; Waddell & Quinn, 2001), y los principales fenómenos electrofisiológicos y metabólicos que ocurren en las neuronas de los MB provocando cambios en el cerebro que inducen al sueño están conservados respecto a vertebrados (Joiner *et al.*, 2006). Además, el hecho de que *Drosophila* carezca de barrera hematoencefálica facilita los estudios farmacológicos en este órgano.

El gen *mbl* se expresa en el cerebro adulto (www.flyatlas.org y datos no mostrados, generados durante este trabajo), entre otros tejidos y momentos del desarrollo. La falta de función de *mbl*, elemento clave en el desarrollo de síntomas de la DM1 como la miotonía o las cataratas (Kanadia, Johnstone *et al.*, 2003), potenció sustancialmente la letalidad inducida por

las repeticiones en los MB, demostrando así la relación de este fenotipo con componentes de la ruta de patogénesis de la enfermedad. Además, el hecho de que el tratamiento con HU revirtiese parcialmente la toxicidad de (CTG)480 demuestra que se trata de un fenotipo reversible farmacológicamente y, por tanto, adecuado para la búsqueda de moléculas modificadoras.

La mayoría de los compuestos que forman la quimioteca Prestwick se encuentran disponibles en el mercado y tienen un mecanismo de acción descrito. Estas moléculas se seleccionan en base a su alta diversidad química y farmacológica, así como su facilidad de obtención y no toxicidad en humanos (www.prestwickchemical.com). El hecho de que los compuestos a ensayar posean actividad conocida presenta dos claras ventajas: en primer lugar, las moléculas positivas sugieren nuevas vías fisiológicas alteradas en las células en presencia de repeticiones CTG, cuyo efecto es reversible químicamente. En segundo lugar, facilita y acelera la aplicación en pacientes, ya que el uso de la mayoría de ellos ya ha sido aprobado para otras indicaciones. Asumiendo que el mecanismo de acción descrito en mamíferos para las moléculas identificadas es aplicable a *Drosophila*, éstos podrían suprimir la toxicidad de (CTG)480 a través de diversas vías:

3.1.1. Inhibición de la excitación nerviosa

A. Inhibidores colinérgicos e histaminérgicos

La **orfenadrina** puede actuar como relajante muscular y como antidepresivo. Esta molécula se une tanto a receptores de histamina H1, como receptores NMDA y receptores muscarínicos, con efectos inhibitorios en todos los casos (www.drugbank.com). En humanos existen al menos dos tipos más de receptores de histamina, los H2 y H3. En *Drosophila*, sin embargo, existe un solo tipo de receptor cuya secuencia es homóloga a la de los receptores de tipo H1 (Nassel, 1999). Estos receptores se expresan en la mosca, al igual que en humanos, en el sistema nervioso incluyendo los MB. En *Drosophila* la histamina funciona como neurotransmisor sobre los fotorreceptores, neuronas mecanosensoriales e interneuronas del SNC. La falta de histamina en las moscas da lugar a individuos ciegos y con defectos mecanosensoriales (Melzig *et al.*, 1996).

Los receptores NMDA son receptores del neurotransmisor L-glutamato que median sinapsis excitatorias en el cerebro. Estos receptores están implicados en la plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria tanto en humanos como en la mosca. El genoma de *Drosophila* contiene dos genes que codifican receptores NMDA, *dNR1* y *dNR2*. Ambas proteínas se expresan débilmente en todo el cerebro aunque muestran una mayor expresión en un grupo de neuronas que rodea la región dendrítica de los MB (Xia *et al.*, 2005).

Los receptores muscarínicos responden al neurotransmisor acetilcolina y constituyen el tipo predominante de receptores colinérgicos en el sistema nervioso. En vertebrados existen 5 tipos distintos de receptores muscarínicos (M1-M5), los cuales se diferencian en su comportamiento farmacológico y su patrón de expresión. En *Drosophila* se ha detectado un único tipo de receptor muscarínico (Dm1). La expresión de *dm1* en células de *Xenopus* y mamíferos en cultivo reveló que las propiedades farmacológicas del receptor Dm1 de *Drosophila* se asemejan a las de los subtipos M1 y M3 de vertebrados (Blake *et al.*, 1993). De manera interesante, la apamina es una toxina procedente de la abeja que actúa sobre los receptores muscarínicos. Se ha sugerido que esta molécula podría tener potencial terapéutico sobre pacientes de Distrofia Miotónica, ya que inhibe la transmisión neuromuscular y con ello la excitabilidad del músculo, reduciendo las descargas tetánicas asociadas a la miotonía. Los antagonistas de los receptores muscarínicos M2 (los cuales median sinapsis inhibitorias) inhiben el efecto de la apamina, lo que indica que esta molécula podría llevar a cabo su función vía dichos receptores. Sin embargo, la acción de la apamina se potencia si se inhiben los receptores muscarínicos de tipo M1, los cuales tienen carácter excitatorio (Allen & Burnstock, 1990; de Matos Silva *et al.*, 2010). Estos datos apoyan el potencial terapéutico de los receptores muscarínicos en la DM1. Además, puesto que el receptor Dm1 de *Drosophila* presenta un comportamiento farmacológico similar a los receptores M1 de vertebrados, la identificación de inhibidores muscarínicos en nuestro rastreo es consistente con los experimentos con apamina de de Matos *et al.*

La **proglumida** es un fármaco empleado principalmente como inhibidor de la motilidad gastrointestinal y de las secreciones gástricas. En dosis bajas actúa como antagonista de la neurohormona colecistoquinina (CCK), mientras que a dosis altas puede inhibir las contracciones de la musculatura lisa por antagonismo con el sistema colinérgico (Onaga, 2007). Además de en el sistema digestivo, la CCK es uno de los neuropéptidos más abundantes en el sistema nervioso, tanto de vertebrados como de *Drosophila* (Nichols *et al.*, 1988), donde tiene un papel predominantemente excitatorio (Hommer *et al.*, 1985).

En conjunto, estos datos sugieren que la inhibición de neurotransmisores con actividad excitatoria en el cerebro de las moscas suprime fenotipos provocados por (CTG)⁴⁸⁰, indicando que las repeticiones podrían causar una hiperactivación de las neuronas donde se expresan o la activación de células nuevas dando lugar, en última instancia, al fenotipo de letalidad descrito.

B. Inhibidores de la dopamina y de la captación de monoaminas

La **metoclopramida** es un antagonista de la dopamina ya que puede unirse y bloquear a los receptores D2. En humanos, los receptores de la dopamina se clasifican en dos tipos principales: la familia de receptores D1 (D1 y D5) y la familia D2 (D2, D3 y D4). En *Drosophila*

el homólogo de los receptores D2 se denomina DD2R y se expresa en el sistema nervioso central y periférico de larva y adulto. Esta proteína se comporta de manera similar a los receptores D2 de mamíferos tanto a nivel estructural como farmacológico (Draper *et al.*, 2007; Hearn *et al.*, 2002). El silenciamiento del gen *DD2R* mediante ARNi (*UAS-DDR2i*) causa una reducción en la actividad locomotora de los individuos (Draper *et al.*, 2007). La metoclopranida puede también antagonizar el efecto del neurotransmisor serotonina a dosis altas. Se ha descrito que la inyección de serotonina en moscas recién eclosionadas origina un aumento en la actividad locomotora de manera dependiente de dosis (Kamyshev *et al.*, 1983). Por otro lado, el **nefopam** es un compuesto analgésico cuyo mecanismo de acción se ha relacionado con una inhibición en la captación de serotonina y dopamina, entre otras monoaminas (Esposito *et al.*, 1986; Fuller & Snoddy, 1993; Marazziti *et al.*, 1991). De esta manera, tanto la metoclopranida como el nefopam podrían reducir la actividad motora en las moscas, bien bloqueando los receptores DD2R dopaminérgicos o antagonizando el efecto de la serotonina, lo cual es consistente con la idea de un efecto tóxico de (CUG)480 por hiperactivación tóxica de grupos de neuronas que controlan el comportamiento motor.

El hecho de que los compuestos identificados actúen sobre los sistemas colinérgico y monoaminérgico sugiere que las repeticiones CTG pueden ser tóxicas en distintas poblaciones neuronales. Además, el efecto sobre cada una de ellas de manera individual sería suficiente para comprometer la viabilidad de las moscas, ya que la expresión de (CTG)480 en las neuronas dopaminérgicas (*Ddc-Gal4*) o colinérgicas (*Cha-Gal4*) de manera independiente también causaba la muerte de los individuos. Cabe destacar que ninguna de las moléculas identificadas antagoniza la acción del neurotransmisor GABA, a pesar de haberse ensayado inhibidores del mismo durante el rastreo. Esto apoya la hipótesis de una hiperexcitación dependiente de repeticiones CUG, ya que GABA tiene un efecto inhibitorio sobre las neuronas en el adulto y se ha demostrado su papel sobre el control del comportamiento motor (Leal *et al.*, 2004). De este modo, sería interesante ensayar el efecto de moléculas agonistas de GABA como potenciales supresores del fenotipo de letalidad.

C. Inhibidores de canales iónicos

El **clenbuterol** se prescribe a pacientes de afecciones respiratorias por sus propiedades relajantes sobre la musculatura lisa. Sin embargo, su uso está aprobado tan sólo en algunos países debido a su efecto anabolizante a dosis altas. El clenbuterol es un activador de los receptores β_2 -adrenérgicos en el músculo, el cual puede además bloquear canales de sodio bien de manera dependiente o independiente de su efecto sobre los receptores β_2 -adrenérgicos (Desaphy *et al.*, 2003). Todos los compuestos antimiotónicos comerciales en la actualidad

tienen como diana canales de sodio dependientes de voltaje. Por esta razón, el clenbuterol se ha sugerido como posible fármaco antimiotónico (W. Fischer *et al.*, 2001). La **espironolactona** es un inhibidor de la aldosterona, con la que compite por los receptores de sodio/potasio en los túbulos renales. Esta molécula promueve la excreción de agua y sodio, mientras que causa una retención de potasio, motivo por el cual se utiliza como agente diurético contra la hipertensión (www.drugbank.com). Sin embargo, la espironolactona puede también actuar inhibiendo las corrientes de calcio de manera similar a los bloqueadores de canales de dicho catión (Mironneau, 1990). Tanto el sodio como el calcio son elementos cruciales durante la función nerviosa. La despolarización de la membrana neuronal, así como los cambios en los niveles intracelulares de calcio, se generan por activación de canales de sodio y calcio dependientes de voltaje, iniciando procesos fisiológicos como la conducción de potenciales de acción, transmisión sináptica y mecanismos de excitación-contracción. Por otro lado, en mioblastos de pacientes DM1 en cultivo los niveles de calcio están elevados (Jacobs *et al.*, 1990). En la DM1 se han descrito variantes desreguladas de los transcritos de la ATPasa dependiente de calcio *SERCA* y el *receptor de la rianodina*, *RyR*, ambas implicadas en la recaptación y liberación de calcio desde y al citoplasma en procesos de contracción y relajación muscular (Kimura *et al.*, 2005). Las moscas también poseen receptores de rianodina (*Rya-r44F*) y, al igual que en mamíferos, las distintas variantes se generan mediante procesado alternativo de sus transcritos (Takeshima y col., 1994), existiendo en ambos casos isoformas musculares y específicas de sistema nervioso. Puesto que Mbl actúa como factor de *splicing* también en *Drosophila* sería interesante estudiar si *Rya-r44F* es una diana de esta proteína en la mosca.

3.1.2. Inhibición de la síntesis de prostaglandinas

La **indometacina** y el **ketoprofeno** son antiinflamatorios no esteroideos con propiedades analgésicas y antipiréticas. Su efecto antiinflamatorio se debe a que estos compuestos inhiben la acción de las enzimas ciclooxigenasa 1 (COX-1) y ciclooxigenasa 2 (COX-2), las cuales llevan a cabo la síntesis de prostaglandinas (PG) a partir del ácido araquidónico (www.drugbank.com). El estudio de las prostaglandinas en modelos invertebrados se ha visto dificultado durante mucho tiempo por la falta de un homólogo claro de las ciclooxigenasas de vertebrados, a pesar de haberse detectado actividad PGE2 en extractos de mosca (Pages *et al.*, 1986). No obstante, recientemente se ha publicado un trabajo en el que se demuestra genética y farmacológicamente la existencia de actividad COX en *Drosophila* por parte de una proteína peroxidasa codificada por el gen *ptx*. La expresión de la proteína COX-1 de mamíferos suprime fenotipos en moscas mutantes de este gen, demostrando una conservación funcional entre ambas enzimas (Tootle & Spradling, 2008). En mioblastos modelo de Distrofia Miotónica Congénita (DMC) en cultivo, los niveles de prostaglandina E2 (PGE2) están aumentados, lo

cual afecta a la fusión de las células durante la diferenciación (Furling, 2009). La adición de un antiinflamatorio no esteroideo inhibidor de COX-2, el ácido acetil salicílico, rescata los defectos en la fusión de estos mioblastos (patente U.S. Nº 20090088400), demostrando por tanto la validez del uso de estas moléculas como potencial terapia en los pacientes.

El peso molecular de los 480 compuestos ensayados en la quimioteca Prestwick varía entre 136.1 y 1488.8. Las 10 moléculas supresoras tienen un peso molecular de entre 254.3 y 416.6, lo cual es consistente con una mejor difusión en las células de los compuestos de menor tamaño. Ninguna de las 10 moléculas identificadas en el rastreo de esta quimioteca está siendo administrada en la actualidad en los pacientes. Sin embargo, varias de ellas poseen mecanismos de acción similares a otras moléculas en uso para el tratamiento específico de síntomas, así como a compuestos sugeridos en diversos estudios llevados a cabo en sistemas modelo. Estas moléculas, por tanto, podrían ser candidatas a terapias en los pacientes.

Dado que las distintas moléculas identificadas parecen revertir la toxicidad inducida por las repeticiones actuando sobre dianas diferentes, sería interesante llevar a cabo ensayos en los que se administrasen combinaciones de estos compuestos con el fin de estudiar posibles efectos sinérgicos, los cuales podrían ser validados posteriormente en ratón. Además, analizar si alguna de estas moléculas es capaz de mejorar fenotipos inducidos por la falta de función de *mbl* (como por ejemplo la hipercontracción muscular del abdomen) daría pistas acerca de la naturaleza de las interacciones detectadas, ya que Mbl podría, por ejemplo, regular el *splicing* alternativo de alguna de las dianas de estos fármacos.

3.2. Especificidad de los compuestos identificados

Dada la naturaleza del ensayo, era posible que los compuestos identificados estuviesen ejerciendo su efecto de manera inespecífica, afectando a los niveles de (CUG)⁴⁸⁰ al interferir con la síntesis del factor Gal4 y/o con su unión a las secuencias reguladoras UAS, disminuyendo así la expresión del transgén. Asimismo, la actividad de los compuestos podría reducir la tasa de transcripción global si su acción comprometiese de alguna manera la homeostasis de las células o si afectase a componentes específicos de la maquinaria de transcripción/traducción. Este último efecto, aunque inespecífico, se ha explotado como terapia potencial en diversas patologías. Un ejemplo son los inhibidores de las proteínas Histona Deacetilasas (HDAC), los cuales reducen la tasa de transcripción de las células. Estos compuestos han demostrado ser eficaces en modelos de Huntington en *Drosophila* y en ratón (Marsh & Thompson, 2004). No obstante, en nuestro estudio ninguna de las 10 moléculas identificadas disminuyó la actividad de la proteína reportera β -Galactosidasa expresada en los MB (*103Y/+;UAS-lacZ/+*), lo que indicaba un efecto de los compuestos identificados dependiente de las repeticiones CTG.

Sin embargo, esto no descartaba una posible actividad de las moléculas sobre la estabilidad de los ARNs portadores de repeticiones. La detección de secuencias repetitivas largas (>200 tripletes) mediante técnicas de PCR convencionales es inviable. Por esta razón, decidimos detectar los transcritos (CUG)₄₈₀ amplificando una región del terminador del virus SV40 procedente del vector pUAST. Esta región no alinea con ninguna otra secuencia del genoma de *Drosophila* y los cebadores empleados durante la reacción de PCR no dieron lugar a ningún amplificado inespecífico en moscas control *yw* ni *103Y-Gal4*. Siguiendo esta estrategia, la detección mediante RT-PCR de los transcritos (CUG)₄₈₀ tampoco reveló cambios significativos en los niveles de expresión del transgén respecto al control con DMSO. En conjunto, estos resultados indican que las moléculas identificadas llevan a cabo su efecto sobre la toxicidad de (CTG)₄₈₀ actuando sobre dianas específicas, sin afectar a los niveles de transcritos CUG.

En un segundo paso para estudiar la especificidad de los compuestos identificados, llevamos a cabo un rastreo secundario sobre un fenotipo de ojo rugoso provocado por la expresión de repeticiones CTG bajo el control del promotor del gen *sevenless* (*sev-Gal4 UAS-(CTG)₄₈₀/+*). Ninguna de las 10 moléculas modificó de manera significativa el fenotipo de estas moscas. Esto puede deberse a varios motivos: en primer lugar, es posible que el efecto de los compuestos sea específico de los MB, lo cual ocurriría si las moléculas no actuaran directamente sobre los ARN tóxicos sino aguas abajo, revirtiendo el efecto de las repeticiones sobre otras dianas o procesos en la célula. Dichas dianas podrían no estar presentes en otros tejidos, como el ojo. Por otro lado, los cambios que originan el ojo adulto en la mosca comienzan hacia la mitad del tercer estadio larvario, con la diferenciación de los fotorreceptores en los discos imaginales tras el paso del surco morfogénico y se completan a lo largo de la metamorfosis en la pupa. Durante este proceso la pupa se encuentra recluida en una cubierta denominada pupario, lejos de la comida y no se alimenta. Es posible, por tanto, que los compuestos administrados en la comida hayan sido excretados por los individuos antes de la formación del pupario y de que la expresión de repeticiones CTG afecte al desarrollo de este órgano.

4. Rastreo de una quimioteca combinatoria de hexapéptidos

4.1. Características de la quimioteca

En este trabajo se utilizó una quimioteca combinatoria de péptidos en formato de rastreo posicional. Esta colección estaba formada por 120 viales, cada uno de los cuales consistía en una mezcla de hexapéptidos que comparten un único aminoácido en una posición concreta y difieren en el resto. De esta manera, al detectar un vial positivo se identifica un aminoácido activo en una posición determinada. La combinación de los aminoácidos más activos en cada

una de las posiciones ensayadas (viales) es lo que se conoce como deconvolución (Dooley & Houghten, 1993; Eichler *et al.*, 1995; Vilar *et al.*, 1998).

Los péptidos de la quimioteca utilizada en este trabajo están compuestos por D-aminoácidos. Esto se debe a que los péptidos constituidos por L-aminoácidos son menos estables frente a proteasas, lo cual dificulta su utilización como agentes terapéuticos. Una forma de prolongar la vida media de los péptidos en el organismo consiste en incorporar a las quimiotecas péptidos formados por D-aminoácidos o aminoácidos no naturales, los cuales no son reconocidos por las proteasas en el intestino y son menos susceptibles a degradación.

El tamaño de las moléculas a utilizar para la búsqueda de agentes potencialmente terapéuticos es un aspecto importante a considerar, ya que un peso molecular demasiado alto limita la absorción del compuesto por parte de las células. La optimización de moléculas para dar lugar a compuestos más activos suele venir acompañada de un incremento en el tamaño final de los mismos. Sin embargo, un peso molecular mayor de 1000 reduce el potencial terapéutico de las moléculas al disminuir su biodisponibilidad, lo cual hace necesario partir de compuestos pequeños. De esta manera, el 80% de los fármacos comercializados en la actualidad tiene un peso molecular por debajo de 450 (Fig. D1). El peso molecular medio de un aminoácido es de unos 135 Da. El tamaño aproximado de un hexapéptido, por tanto, varía entorno a 810 Da. Rastrear quimiotecas de péptidos formados por un número de aminoácidos mayor de 6 daría lugar a moléculas demasiado grandes. Por otro lado, a pesar de que existen colecciones de di, tri, tetra y pentapéptidos, aumentar el número de aminoácidos que forman la molécula da lugar a una mayor cantidad de péptidos definidos durante la deconvolución, incrementando la probabilidad de encontrar un compuesto activo.

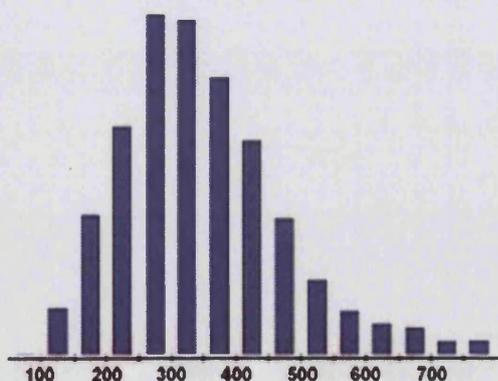


Figura D1. Distribución del peso molecular de los fármacos en el mercado. La mayoría de fármacos comercializados tiene un peso molecular inferior a 700, ya que esto favorece su entrada en las células. Durante el desarrollo de un nuevo fármaco, por tanto, es importante considerar el tamaño de las moléculas en estudio. Figura tomada del *Organic Chemistry Portal* (www.organic-chemistry.org).

4.2. Identificación de p88: un hexapéptido cuya secuencia alinea con Muscleblind

El proceso de deconvolución tras el rastreo de la quimioteca combinatoria dio lugar a 16 péptidos definidos. Todos ellos alineaban con una región conservada del primer dedo de zinc de las proteínas Muscleblind. Sin embargo, tan sólo p88 suprimió el fenotipo de letalidad. Los seis aminoácidos que conforman p88 (ppyawe) alinean con las secuencias PPANVE y

KFAHPP (en función de la orientación) del primer dedo de zinc de Mbl. El parecido entre p88 y KFAHPP es especialmente interesante debido a la presencia del aminoácido aromático fenilalanina (F) en una posición conservada en todas las proteínas Muscblind (Pascual *et al.*, 2006). Además, en la proteína MBNL1 humana, esta fenilalanina (Phe202) media junto a la tirosina 236 (Tyr236) la unión del dedo de zinc ZnF3 de MBNL1 al ARN, insertándose por medio de sus anillos aromáticos entre las bases guanina y citosina (Teplova & Patel, 2008). En otra proteína de dedos de zinc del tipo CCCH, Tis11d (UniProtKB/Swiss-Prot P47980), esta fenilalanina junto a una tirosina participan en la unión a dinucleótidos UU y AU en el ARN, respectivamente (Brown, 2005; Hudson *et al.*, 2004) (Fig. D2). p88 contiene un triptófano en la posición de esta fenilalanina, siendo ambos aminoácidos aromáticos y apolares. Es posible, por tanto, que el triptófano de p88 participe en la unión del péptido a los ácidos nucleicos.

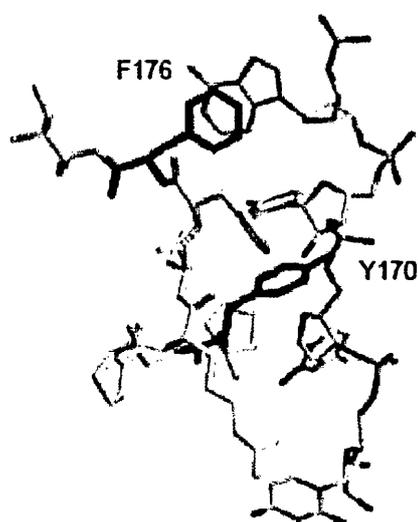


Figura D2. El dominio CCCH de Tis11d se une a la secuencia UAUU. La tirosina en posición 170 y la fenilalanina en 176 se intercalan entre los dinucleótidos U-U y AU, respectivamente (verde). La afinidad de la unión de Tis11d al ARN depende de dichos residuos. Figura tomada de Brown, 2005.

Con el fin de comprobar si la región KFAHPP de la proteína Mbl era capaz de suprimir la toxicidad de las repeticiones CTG, en este trabajo se ensayó un D-péptido de secuencia kfhapp (péptido pMbl, datos no mostrados) sobre el fenotipo de letalidad. Dicho péptido no mejoró la viabilidad de las moscas. Sin embargo, esto puede deberse a que el péptido pMbl estaba formado por D-aminoácidos, por lo que sus cadenas laterales estaban dispuestas de manera retroinversa a la forma L de KFAHPP. Cabe destacar que las cadenas laterales de un D-péptido pphafk (retroinverso del péptido pMbl) se dispondrían de manera similar a las de un L-péptido KFAHPP, y la fenilalanina coincidiría en este caso exactamente con la posición del triptófano de p88 (Fig. D3). Puesto que hemos demostrado que la actividad de p88 reside en la disposición espacial de sus cadenas laterales, ésta sería la orientación en la que el péptido 88 y Muscblind deben compararse. Como apoyo a esta idea, la expresión endógena del L-péptido AWEYPP (*UAS-p88C2*) suprimió la toxicidad de (CTG)₄₈₀, mientras que el L-péptido PPYAWWE (*UAS-p88C1*) no mostró ningún efecto.

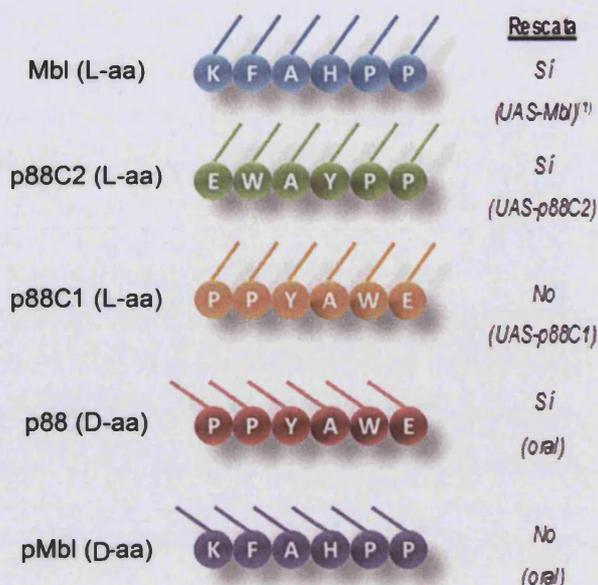


Figura D3. Comparación de la secuencia de Mbl con distintos péptidos. En azul se representa una región conservada del primer dedo de zinc de las proteínas Muscleblind (KFAHPP). En verde se muestra la secuencia del L-péptido p88C2 expresado mediante el sistema Gal4/UAS. La secuencia del esqueleto peptídico de p88C2 alinea parcialmente con Mbl, y las cadenas laterales de ambos se disponen en la misma orientación. En rojo se representa el D-péptido p88 administrado en la comida. La secuencia y la disposición de las cadenas laterales de p88 y Mbl coinciden si p88 se lee en la dirección reversa. En morado se representa la secuencia del D-péptido sintético pMbl. pMbl y Mbl comparten el mismo esqueleto peptídico pero las cadenas laterales se disponen de manera retroinversa. Tan sólo los tres primeros péptidos suprimieron fenotipos causados por la expresión de (CTG)480. Las barras diagonales simbolizan las cadenas laterales de cada residuo. (1) Sobreexpresión de la proteína entera.

4.3. El efecto de p88 sobre la toxicidad de (CTG)480 es específico de secuencia

La mutagénesis mediante rastreo de alaninas es una técnica utilizada para la determinación del papel funcional de residuos concretos en las proteínas (Cunningham & Wells, 1989; Morrison & Weiss, 2001). La sustitución de un aminoácido por alanina elimina la cadena lateral tras el carbono β sin alterar la conformación global de la proteína (al contrario que otros aminoácidos pequeños como la glicina o la prolina), a la vez que tampoco aporta efectos electrostáticos o estéricos significativos (Cunningham & Wells, 1989). La sustitución por alanina de cada uno de los aminoácidos de p88 de manera individual causó una pérdida de actividad de la molécula como supresora de la letalidad inducida por (CTG)480 en el cerebro. Esto indica que todos los residuos de p88 son necesarios para su actividad. Además, demuestra que su efecto es específico, ya que éste desaparece cuando se altera su secuencia. Aunque la sustitución de cualquier aminoácido por alanina podría hacer a p88 perder la capacidad de atravesar la membrana celular o causar una reducción en su solubilidad, entre otros, los datos obtenidos *in vitro* indican que la pérdida de actividad de los péptidos p29.1-p29.5 podría estar relacionada con su incapacidad de unión al ARN.

El cambio de la primera prolina de p88 (p29.5, apyaw) causó una reducción significativa en el número de hembras nacidas respecto al control, indicando un posible efecto tóxico de este péptido. Debido a sus propiedades, la prolina puede jugar un papel importante en la estructura de las proteínas, así como en su estabilidad. Por ejemplo, este aminoácido no suele formar parte de estructuras en alfa-hélice ya que distorsiona la cadena, pero es frecuente encontrar prolinas actuando como iniciadores de hélices. A pesar del reducido tamaño de p88, existen ejemplos de hexapéptidos descritos en la literatura que adoptan estructuras secundarias (Esteve *et al.*, 2001; Rundgren *et al.*, 2007). La secuencia correspondiente a p88

(en su forma L) no se encuentra disponible en ninguna de las estructuras proteicas depositadas en la base de datos pdb (protein data bank, www.rcsb.org). La secuencia más cercana, PPWAVE (en la que un triptófano ocupa la posición de la tirosina de p88), pertenece a la proteína 3-Oxoacil-ACP reductasa (3Ox CPR) de *Thermus thermophilus* (pdb #2A4K) y adopta una estructura en alfa-hélice donde la prolina actúa como casquete (o CAP) en el extremo Nt (Fig. D4). Esto indica que p88 podría adoptar una conformación crítica para su función y apoya la importancia de la conservación de todos los residuos del péptido para llevar a cabo su actividad.

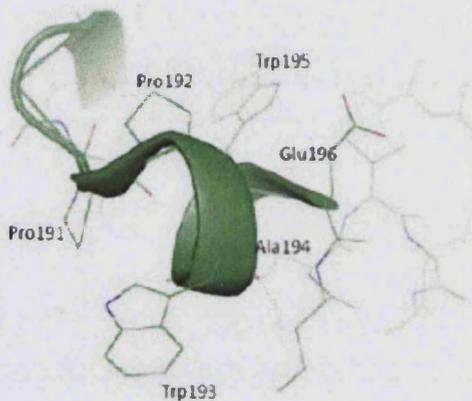


Figura D4. Conformación en alfa-hélice de la secuencia PPWAVE en el contexto de la estructura resuelta de la proteína 3Ox CPR. En general se acepta que los hexapéptidos carecen de estructura en solución. Sin embargo, p88 podría adoptar una conformación similar a la descrita al unirse al ARN. Figura obtenida en la base de datos pdb.

5. p88 suprime la toxicidad de las repeticiones CTG en el músculo de modelos de DM1 en *Drosophila* y ratón

El efecto supresor de p88 sobre la letalidad inducida por (CTG)₄₈₀ presentaba un comportamiento de dosis-respuesta, con una dosis efectiva 50 de 70.4 μM y un máximo de actividad detectado a 125 μM . Además de en el sistema nervioso, la expresión de repeticiones CTG en el músculo es tóxica tanto en pacientes como en modelos murinos e insectos (García-Lopez *et al.*, 2008; Mankodi *et al.*, 2000). Por esta razón, decidimos, en primer lugar, estudiar el efecto del tratamiento con p88 en secciones transversales de tórax de moscas modelo. Estos análisis revelaron un incremento dependiente de dosis en la cantidad de fibras musculares en los IFMs, dando lugar a paquetes musculares de mayor tamaño respecto a las moscas tratadas con DMSO con un valor máximo de actividad a $\sim 250 \mu\text{M}$. Esto confirma de nuevo la especificidad del efecto de p88 sobre la toxicidad de (CTG)₄₈₀ y demuestra que la actividad del péptido es independiente de factores específicos de tejido, ya que éste es capaz de suprimir fenotipos causados por las repeticiones tanto en el cerebro de la mosca como en el músculo. Sin embargo, a pesar de la mejora observada a nivel histológico, las moscas tratadas con p88 no recuperaron la capacidad de vuelo. Se ha descrito que los IFMs suponen hasta un 55-60% de la masa corporal de los insectos (Marden, 2000). Para poder volar es necesario que éstos constituyan al menos el 12-16% del total del peso de los individuos, y la capacidad de vuelo aumenta conforme este porcentaje se incrementa (Marden, 2000). Por lo tanto, es

posible que la mejora a nivel histológico causada por p88 no sea suficiente para obtener una mejora funcional en las moscas. Por otro lado, los IFMs son estructuras muy sensibles a cambios tanto ambientales como genéticos y requieren una alta organización celular y tisular para su correcto funcionamiento (Wojtas *et al.*, 1997). Las dos líneas *Mhc-Gal4* utilizadas durante este trabajo presentaban defectos de vuelo leves por sí solas, a pesar de que estas moscas no mostraban defectos a nivel histológico. Esto demuestra que la capacidad de vuelo puede estar comprometida independientemente de la existencia de alteraciones histológicas.

Con el fin de validar el potencial terapéutico de p88, estudiamos su efecto en el músculo de ratones *HSA^{LR}*. Estos animales expresan 250 repeticiones CTG en un transcrito heterólogo y reproducen los principales síntomas de la DM1, así como de los ratones *knockout* de *Mbn11* (Kanadia, Johnstone *et al.*, 2003; Mankodi *et al.*, 2000). No obstante, este modelo no desarrolla otros fenotipos como la pérdida de masa muscular, lo cual parece ser independiente de *Mbn11* y dependiente de *Cugbp1* (cuyos niveles no están alterados en los ratones *HSA^{LR}*). Dadas las limitaciones para administrar p88 en la comida en este caso, decidimos llevar a cabo inyección intramuscular de 0.5 µg y 10 µg de péptido en el músculo tibial anterior de la extremidad posterior derecha y la correspondiente cantidad de DMSO en la extremidad posterior izquierda. El análisis de criosecciones de dicho músculo procedentes de ratones *HSA^{LR}* tratados confirmó la actividad de p88 sobre la toxicidad de las repeticiones CTG en este tejido. En este caso, el péptido redujo el número de fibras con núcleos centrales, lo cual es una característica histopatológica tanto de los ratones modelo como de los pacientes (Mankodi *et al.*, 2000). Esta reducción, no obstante, no parecía responder a dosis, ya que la diferencia en el número de células con núcleos centrales en la pierna derecha (inyectada con p88) y la izquierda (inyectada con DMSO) en los ratones tratados con 0.5 µg de péptido era mayor que en los tratados con 10 µg. Esto podría deberse a la gran variabilidad entre animales observada para este fenotipo en concreto, tanto en nuestro laboratorio como en el laboratorio del Dr. Thornton (comunicación personal), o a que la mayor cantidad de DMSO empleada en el segundo caso contrarresta en alguna medida el efecto del péptido. No obstante, debido al método de cuantificación empleado, en el cual se contaba el número de células con núcleo central independientemente del número de núcleos por células, es posible que exista un efecto de dosis que no hayamos podido detectar.

En conjunto, estos datos demuestran que p88 puede suprimir defectos histológicos causados por la expresión de repeticiones CTG en el músculo, tanto en *Drosophila* como en ratón. Hasta la fecha, este es el primer compuesto capaz de suprimir la histopatología en modelos de DM1 del que tenemos conocimiento.

La ATPasa dependiente de Ca^{2+} del retículo endo/sarcoplásmico (*Serca1*) se expresa en las fibras musculares de contracción rápida y permite que el Ca^{2+} del citoplasma ingrese al

interior del retículo sarco/endoplásmico (ER), ayudando a reducir los niveles de Ca^{2+} libre en condiciones basales. La Troponina T de las fibras musculares rápidas (*Tnnt3*) es una proteína sarcomérica, también implicada en la contracción muscular. Tanto los transcritos *Serca1* como *Tnnt3* sufren *splicing* alternativo durante el desarrollo, el cual está alterado en los pacientes de DM1 y DM2, así como en los ratones *HSA^{LR}* y *knockout* de *Mbnl1* (Lin *et al.*, 2006). La inyección de 10 μ g de p88 consiguió revertir los defectos en el procesado alternativo de ambos transcritos. Sin embargo, la inyección de 0.5 μ g no mostró una mejora clara, demostrando que este efecto responde a dosis.

p88 no afectaba al *splicing* alternativo de *Serca1* y *Tnnt3* en ratones *FVB* ni *HSA^{SR}*, indicando que el péptido no altera la función normal de *Mbnl1* sobre sus dianas. Warf *et al.* describieron que la inyección de pentamidina es también capaz de revertir los defectos de *splicing* de los transcritos *Cln1* y *Serca1* en ratones *HSA^{LR}*. Sin embargo, los autores observaron que a determinadas dosis este compuesto alteraba el procesado normal de estos transcritos en células HeLa en cultivo en ausencia de repeticiones CTG (Warf, Nakamori *et al.*, 2009). *Capzb* codifica una proteína que regula el ensamblaje de los filamentos de actina, así como su anclaje a las bandas Z en las células musculares. Los transcritos de este gen sufren *splicing* alternativo, el cual está alterado en pacientes de DM1 y ratones modelo que expresan 960 repeticiones CTG y presentan niveles elevados de *Cugbp1* (Orengo *et al.*, 2008). En los ratones *HSA^{LR}* y *knockout* de *Mbnl1*, sin embargo, los transcritos de *Capzb* se procesan correctamente. p88 no afectó al procesado de estos transcritos, demostrando que el péptido tampoco altera la función de otros factores de *splicing* en la célula relacionados con la enfermedad.

La mejora inducida por p88, tanto en el *splicing* alternativo como a nivel histológico, era visible incluso un mes después la administración, sugiriendo que una sola inyección de p88 podría tener efectos terapéuticos a largo plazo. Éste es, hasta donde tenemos conocimiento, el compuesto con el mayor tiempo de duración o efecto (TE) descrito en un modelo de DM1. Hasta la fecha, tan sólo el tratamiento con el oligomorfolino CAG25 había logrado suprimir defectos de *splicing* en los ratones *HSA^{LR}* durante 3 semanas tras una sola inyección (Wheeler *et al.*, 2009). El largo TE de p88 podría deberse bien al hecho de que el péptido es resistente a la degradación por proteasas al estar formado por D-aminoácidos (de manera que podría permanecer en las células durante más tiempo), o a que su efecto en un punto temporal concreto sea suficiente como para devolver la homeostasis a las células de manera prolongada.

Por último, dado que tanto nuestro modelo en *Drosophila* como los ratones *HSA^{LR}* expresan las repeticiones CTG independientemente de *DMPK*, nuestros resultados *in vivo* demuestran que, por un lado, el efecto terapéutico de p88 tiene como diana los ARNs CUG

expandidos o alteraciones directamente desencadenadas por éstos y, por otro lado, que dicho efecto es independiente de otros factores relacionados con la enfermedad, como CUGBP1, los cuales no responden directamente a las repeticiones. Nuestro modelo en *Drosophila* expresa 480 repeticiones CTG interrumpidas cada 20 repeticiones por la secuencia CTCGA. El uso de repeticiones interrumpidas en la generación de animales modelo se debe a la dificultad para amplificar y clonar repeticiones CTG puras y ha sido descrito en otros modelos tanto en ratón como en mosca (de Haro *et al.*, 2006; Orengo *et al.*, 2008). El hecho de que p88 suprimiese fenotipos tanto en nuestro modelo en *Drosophila* como en los ratones *HSA^{LR}*, en los cuales las repeticiones carecen de interrupciones, sugiere que las repeticiones interrumpidas se comportan *in vivo* como las repeticiones puras.

6. Expresión endógena de p88 en *Drosophila*

La administración oral de p88 no suprimió el fenotipo de ojo rugoso de las moscas *sev-Gal4 UAS-(CTG)480/+*, tanto a nivel morfológico como histológico. Puesto que p88 era capaz de revertir fenotipos causados por la expresión de (CTG)480 en el sistema nervioso y en el músculo, cabía la posibilidad de que el péptido no estuviese llegando a los fotorreceptores del ojo en el momento y/o en la cantidad adecuados (ver apartado 3.2 de la Discusión). Dada la naturaleza peptídica de p88, decidimos emplear el sistema Gal4/UAS de *Drosophila* para generar los transgenes *UAS-p88C1-C3*, con el fin de controlar su expresión endógenamente. De este modo, las moscas pueden producir p88 de manera continua, de manera similar a lo descrito en los experimentos de rescate por sobreexpresión de *Mbn1* en ratones *HSA^{LR}* de Kanadia *et al.* (Kanadia *et al.*, 2006). Sin embargo, p88 está formado por tan sólo 6 aminoácidos. Esto suponía un reto a la hora de generar las construcciones correspondientes, ya que en la literatura no existían ejemplos de transgenes en *Drosophila* de tamaño tan reducido. Con el fin de facilitar la traducción de los transcritos *p88C1-C3*, añadimos 21 nt de la región 5'UTR del gen de expresión fuerte *actina 5C (act5C)* de *Drosophila* aguas arriba del ATG en las construcciones C1, C2 y C3. Esta región incluía la secuencia Kozak del gen (C-A-A-A-AUG), la cual se ajusta en todas las posiciones al consenso descrito para *Drosophila* (C/A-A-A-A/C-AUG) (Cavener, 1987). Además, durante el diseño de las construcciones tuvimos en cuenta el sesgo en el uso de codones de *Drosophila*, seleccionando aquéllos de uso preferente en la mosca, es decir, favoreciendo el uso de C en las posiciones sinónimas (Powell & Moriyama, 1997). Por último, expresamos los transgenes en músculo y ojo utilizando los promotores de los genes *Mhc* y *GMR* respectivamente (líneas *Mhc-Gal4* y *GMR-Gal4*), ya que ambos tienen una expresión fuerte en estos tejidos.

De las tres construcciones generadas, tan sólo las portadoras de la secuencia retroinversa de p88 (EWAYPP; *UAS-p88C2* y *UAS-p88C3*) suprimieron el fenotipo de ojo rugoso de las moscas *GMR-Gal4 UAS-(CTG)480/+* así como la degeneración muscular de las moscas *Mhc-Gal4 UAS-(CTG)480/+*. Este resultado convierte al L-péptido EWAYPP en una molécula potencialmente terapéutica y demuestra que la expresión endógena de péptidos funciona en tejidos en los que la administración oral daría lugar a niveles bajos de incorporación en las células, como el ojo. Estos experimentos indican, además, que la actividad de p88 reside en la disposición espacial de sus cadenas laterales y no únicamente en su esqueleto peptídico, ya que ninguna de las 10 líneas de la construcción C1 suprimió la rugosidad del ojo, mientras que todas las líneas transgénicas C2 ensayadas y una de las líneas C3 sí lo hicieron. Este resultado es especialmente interesante, ya que tal y como se ha comentado, la secuencia del péptido endógeno EWAYPP alinea con la secuencia KFAHPP del primer dedo de zinc de Mbl (ver apartado 4.2 de la Discusión).

En general, se acepta que los niveles de expresión de un transgén utilizando el sistema Gal4/UAS aumentan de manera proporcional a la temperatura (Duffy, 2002). La supresión del fenotipo de ojo rugoso de las moscas *GMR-Gal4 UAS-(CTG)480/+* al expresar *UAS-p88C2* o *UAS-pC3* era mayor a 21°C que a 19°C, mientras que a 25°C la expresión del péptido se volvía tóxica. Esto indica que, al igual que en los experimentos de administración oral, el efecto de p88 endógeno responde a dosis. Los transgenes (CTG)480, *UAS-p88C2* y *UAS-pC3* están insertados en zonas del genoma distintas, por lo que las secuencias reguladoras cercanas afectan de manera diferente a la expresión de cada uno de ellos. Por esta razón, es posible que los cambios en la temperatura afecten de manera desigual a la expresión de los transgenes, alterando el balance necesario entre p88 y (CTG)480. De esta manera, la expresión de *UAS-p88C2* ó *UAS-pC3* a 25°C en moscas modelo podría tener un efecto negativo, de manera similar a lo que ocurre con la administración oral. Cabe destacar que la expresión de *UAS-p88C2* y *UAS-pC3* por sí sólo a 25°C no resultó tóxica, al igual que la administración oral de p88 no lo era en moscas *OrR* para concentraciones que sí disminuían la viabilidad en moscas modelo.

Para poder llevar a cabo experimentos de localización subcelular de p88 y colocalización con repeticiones CUG *in vivo*, así como con otros componentes de la DM1, generamos un péptido p88 fluorescente (FAM-p88, no mostrado) el cual poder administrar de manera oral y detectar en cortes histológicos. Sin embargo, en nuestros ensayos *in vitro* el péptido FAM-p88 no se unió a las moléculas de ARN CUG (datos no mostrados), por lo que no pudimos abordar dichos estudios *in vivo*. En este sentido, la obtención de moscas transgénicas que expresan el péptido endógenamente supone una ventaja, ya que actualmente estamos generando un anticuerpo que permitirá llevar a cabo estudios inmunohistoquímicos de localización en los

tejidos, así como estudios cinéticos. Los resultados obtenidos con dicho anticuerpo ayudarán a comprender mejor el mecanismo de acción de p88 *in vivo*.

Por último, dada la existencia en *Drosophila* de líneas Gal4 de expresión inducible (Duffy, 2002), sería interesante llevar a cabo experimentos en los que los transgenes *UAS-(CTG)480* y *UAS-p88C2/C3* se expresasen y silenciases en momentos concretos del desarrollo, con el fin de identificar períodos críticos susceptibles de intervención farmacológica.

7. Estudio del mecanismo de acción de p88

7.1. p88 no afecta a la expresión de (CTG)480

La deconvolución de la quimioteca de hexapéptidos sobre un modelo *in vivo* de DM1 permitió la identificación de p88 como un péptido activo capaz de suprimir fenotipos en modelos en mosca y ratón. Sin embargo, comprender el mecanismo de acción de p88 es esencial para el posterior desarrollo de esta molécula y su potencial uso como fármaco. p88 puede unirse a secuencias de ADN (ver Fig. R33 y R34 de Resultados), por lo que podría afectar a la tasa de transcripción de (CTG)480 *in vivo*. Sin embargo, el análisis mediante RT-PCR de los niveles de expresión de transcritos (CUG)480 en moscas *Mhc-Gal4/+; UAS-(CTG)480/+* tratadas con p88 a distintas concentraciones no reveló diferencias significativas respecto al control con DMSO. Además, los niveles de emisión de luminiscencia en individuos de genotipo *Mhc-Gal4/+; UAS-luciferasa/+* alimentadas con p88 no difirieron de manera significativa respecto a las moscas control tratadas con DMSO. Esto descarta que p88 afecte a la capacidad de transcripción del transgén mediante el sistema Gal4/UAS (por ejemplo inhibiendo específicamente la actividad de Gal4) y/o a la estabilidad de los transcritos (CUG)480.

No obstante, en estos experimentos detectamos una diferencia considerable entre los niveles de emisión de luz en las moscas *Mhc-Gal4/+; UAS-luciferasa/+* alimentadas con DMSO y las que no habían estado expuestas al solvente. Se ha descrito que el DMSO puede aumentar la expresión de transgenes ya que suprime la variegación por efecto de posición (Michailidis *et al.*, 1989), lo cual podría explicar las diferencias observadas. Es posible que este efecto sea específico de la cepa *UAS-luciferasa* utilizada y no afecte a las moscas que expresan el transgén *UAS-(CTG)480*, ya que ambas construcciones están insertadas en zonas diferentes del genoma y las regiones de heterocromatina cercanas podrían afectar de manera distinta. A favor de esta idea, en ninguno de los experimentos con moscas modelo realizados durante este trabajo hemos detectado que el tratamiento con DMSO a dosis subtóxicas potencie los fenotipos en estudio.

7.2. p88 se une a repeticiones CUG con mayor afinidad que a otros ácidos nucleicos

Utilizando distintas técnicas *in vitro* para el estudio de interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos (los cuales incluyen ensayos de polarización de fluorescencia, retardo en gel y extinción de fluorescencia) hemos podido demostrar que p88 es capaz de unirse a ARNs formados por repeticiones CUG. Estos resultados, junto con el hecho de que los modelos *in vivo* utilizados en mosca y ratón expresan repeticiones CUG independientemente de *DMPK*, apoyan la hipótesis de que el mecanismo de acción del péptido en las células tenga como diana los ARN tóxicos. Sin embargo, tanto en los experimentos de retardo en gel como polarización de fluorescencia, la unión de p88 a los ARN fluorescentes se detectaba a concentraciones de péptido elevadas. En los experimentos de extinción de fluorescencia del triptófano (Trp-FQ), 2-aminopurina (2-AP) y dicroísmo circular (DC), donde ni el péptido ni el ARN están marcados con un fluoróforo, una relación [ARN:péptido] de 1:1 o inferior era suficiente para observar la unión. Esto indica que la presencia de carboxifluoresceína en el extremo 5' del ARN podría dificultar la interacción con otras moléculas. En todos los ensayos la proteína MblZF se utilizó como control positivo, ya que se ha descrito que tanto los dedos de zinc de MBNL1 como de Mbl se unen a repeticiones CUG (Goers *et al.*, 2008; Warf & Berglund, 2007; Yuan *et al.*, 2007). En nuestros experimentos de retardo en gel y polarización de fluorescencia la concentración de MblZF necesaria para detectar interacción con el ARN es más alta que la descrita en otros trabajos, lo cual es congruente con la idea de que el fluoróforo podría interferir con la unión.

Durante estos ensayos observamos que p88 se une con mayor afinidad a moléculas de ARN portadoras de un número mayor de tripletes (FAM-CUG23 vs FAM-CUG4). Este dato es importante, ya que la toxicidad de las repeticiones aumenta con su tamaño y éstas no son patológicas por debajo de ~35-50. En este sentido, la generación de un anticuerpo contra el péptido endógeno p88C2 nos permitiría comparar *in vivo* el grado de interacción entre el péptido y los ARNs CUG en moscas modelo que expresan distinto número de repeticiones (García-Lopez *et al.*, 2008).

Los péptidos p29.1-p29.5 (los cuales difieren respecto a p88 en un único aminoácido) no se unieron al ARN de manera significativa a concentraciones similares a las ensayadas para p88, demostrando la especificidad de secuencia de la unión descrita. Además, la tasa de extinción de fluorescencia de p88 en los experimentos de Trp-FQ era mayor cuando el péptido se incubaba con el ARN *DMPK*-CUG4 respecto a otras secuencias de ARN y ADN de cadena doble y cadena sencilla, indicando que p88 tiene una afinidad preferencial por sus dianas. En conjunto, estos resultados sugieren que las repeticiones CUG en su contexto natural (es decir, formando parte de los transcritos *DMPK*) podrían ser mejor diana de p88 en las células que el resto de ácidos nucleicos ensayados. La extinción de fluorescencia del triptófano al incubarse

DMPK-CUG4 con p88 es mayor que para los ARNs DMPK sin repeticiones. Este resultado, sumado al hecho de que p88 parece tener mayor afinidad por repeticiones CUG largas, indica que el péptido podría actuar de manera preferente sobre los transcritos *DMPK* mutantes en células de pacientes, sin alterar los transcritos salvajes.

7.3. p88 desestabiliza las horquillas de repeticiones CUG

La teoría de dicroísmo circular, desarrollada por primera vez en el siglo XIX por Biot Neumann y Fresnel Snatzke, se basa en el uso de rayos de luz formados por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes originando cambios de magnitud diferenciales. El principal campo de aplicación del DC es el estudio de estructuras secundarias de proteínas purificadas en solución, lo cual es posible gracias a la existencia de espectros de DC patrón (Greenfield, 2006). Sin embargo, para los ácidos nucleicos la predicción de estructuras secundarias mediante DC es algo más compleja. En general, existen tres tipos de conformación para el ARN: ARN-A, ARN-B y ARN-C (o ARN-Z) (Fig. D5). Si bien se pueden hacer asignaciones a una u otra familia en base a la forma del espectro de DC de la molécula, es difícil extraer información detallada exclusivamente a partir de la curva, debido a la gran cantidad de subgrupos existentes.

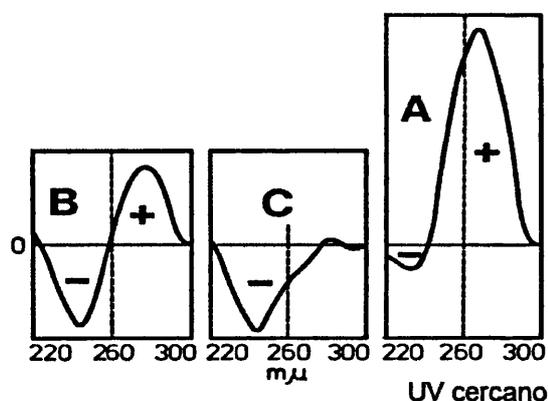


Figura D5. Tipos de espectro de dicroísmo circular de los ácidos nucleicos. Las curvas de DC de moléculas de ADN o ARN con estructura secundaria diferente presentan espectros distintos, cuyos picos máximo y mínimo difieren en su intensidad y en la longitud de onda a la cual se detectan.

En nuestros experimentos de DC, el ARN (CUG)60 presentaba un espectro con un pico máximo a ~265 nm, correspondiente a la forma A del ARN. Este resultado es congruente con la estructura en cristal obtenida para las repeticiones (Mooers *et al.*, 2005). La adición de p88 a (CUG)60 causó una disminución en la intensidad de la señal del pico máximo. Dicha reducción puede atribuirse a una disminución en el apilamiento de las bases del ARN, debido a un cambio conformacional de la molécula en presencia del péptido. Este efecto es específico de p88, ya que los péptidos p29.1 y p29.4 no afectaron al espectro del ARN.

Los experimentos con 2-aminopurina (2-AP) confirmaron el cambio inducido por p88 en la estructura de las repeticiones CUG. La 2-AP es un análogo de los nucleótidos adenina y

guanina, y como tal puede aparear con la timina y la citosina. Esta molécula emite a longitudes de onda >300 nm para las cuales el resto de nucleótidos de la cadena de ARN/ADN son transparentes. En general, la fluorescencia de la 2-AP aumenta en un orden de 2-3 veces cuando la molécula en la que se encuentra pasa de una conformación de doble cadena a cadena sencilla (Datta *et al.*, 2006). Estos cambios ocurren de manera estática cuando la 2-AP se encuentra apilada con purinas, pero lo hacen de manera dinámica cuando se encuentra apilada con pirimidinas (Jean & Hall, 2001). Por esta razón, la 2-AP se utiliza como marcador fluorescente para el estudio de cambios conformacionales dinámicos en los ácidos nucleicos. En nuestros experimentos utilizamos un ARN de 23 repeticiones CUG en el cual una guanina había sido sustituida por 2-AP. De esta manera, la 2-AP apareaba con una C de la doble hélice y se encontraba flanqueada en ambos lados por desapareamientos de pirimidina U-U. Para relaciones de [péptido:ARN] de 100:1 la emisión de fluorescencia de la 2-AP sufrió un incremento de 2.9 respecto al ARN libre, lo cual concuerda con el valor esperado según Datta *et al.* Estos resultados son congruentes con los obtenidos en los experimentos de DC e indican que el péptido es capaz de intercalarse entre las bases del ARN y abrir la doble hélice para dar lugar a una molécula de cadena sencilla. Se sabe que el DMSO inhibe la formación de estructuras secundarias en los ácidos nucleicos, como los formados por tramos ricos en GC. Sin embargo, en nuestros experimentos el solvente por sí sólo no afectó a la fluorescencia de la 2-AP, como tampoco lo hicieron los péptidos p29.1 y p29.4, indicando que se trata de un efecto específico.

En conjunto, estos resultados sugieren un efecto sobre la estabilidad de las horquillas de repeticiones CUG como posible mecanismo de acción de p88. Si el péptido desestabilizase la formación de dichas horquillas en el núcleo *in vivo* sería capaz de eliminar el principal origen de toxicidad en las células. En este sentido, p88 actuaría a través de un mecanismo de acción no descrito hasta la fecha en ninguna de las moléculas desarrolladas recientemente para combatir la DM1 (ver apartado 8 de la Introducción) con la ventaja adicional frente a dichos compuestos de que p88 puede ser administrado de manera oral. Además, dada la capacidad de p88 de desestabilizar la doble hélice en los ARNs tóxicos, sería interesante estudiar el efecto de p88 sobre otros ARNs patológicos de doble cadena del tipo CNG, como CAG o CGG.

7.4. p88 no compete con Muscleblind *in vitro*

En ninguno de los ensayos de unión llevados a cabo en este trabajo detectamos competencia entre p88 y MblZF por la unión a los ARN de repeticiones CUG, sugiriendo que p88 y MblZF se unen al ARN de manera distinta. Los experimentos con 2-aminopurina demostraron que, mientras p88 despliega las horquillas de ARN CUG, MblZF no afecta a la estructura de las repeticiones, tal y como describen trabajos anteriores (Warf, Diegel *et al.*, 2009). Se ha descrito que, al menos *in vitro*, los dedos de zinc de Muscleblind pueden unirse al

ADN y al ARN tanto en forma de doble cadena como de cadena sencilla (Goers *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2004; Kino *et al.*, 2004). Esto podría explicar que en nuestros experimentos la proteína MblZF pueda unirse a repeticiones CUG tanto en presencia de péptido (*ie.*, cadena sencilla) como en ausencia (*ie.*, doble cadena). Por otro lado, la proteína MblZF empleada en nuestros ensayos *in vitro* está compuesta exclusivamente por la región de dedos de zinc, ya que estos dominios son necesarios y suficientes para la unión al ARN (Goers *et al.*, 2008; Warf & Berglund, 2007). Sin embargo, MblZF carece de otros dominios relevantes para la función de la proteína *in vivo*, como el dominio KRAEK de localización subcelular o el dominio de dimerización, ambos presentes en el extremo Ct (Yuan *et al.*, 2007; Fernandez-Costa y Artero, 2010), lo cual podría afectar al efecto del péptido sobre la unión de la proteína al ARN. Por último, es posible que p88 desestabilice tan sólo una porción de las horquillas patológicas, quedando el resto en forma de doble cadena, a las cuales Mbl podría seguir uniéndose. De ser así, la unión de p88 a los ARN tóxicos de doble cadena *in vivo* podría generar un número de moléculas de cadena sencilla suficiente para liberar parcialmente a Mbl y restaurar su función en las células. El hecho de que hasta la fecha MBNL1 no se haya visto asociado a transcritos *DMPK* de cadena sencilla *in vivo* y de que p88 revierta defectos de *splicing* de transcritos regulados directamente por Mbn1 (*Serca1* y *Tnnt3*) en ratones *HSA^{LR}* apoya esta idea. Con el fin de comprobar esta hipótesis sería interesante llevar a cabo estudios de inmunodetección de Muscblind en cortes histológicos de animales modelo tratados.

A pesar del papel clave de las proteínas MBNL en el desarrollo de la DM1, no existe consenso en cuanto a que su presencia en inclusiones nucleares de repeticiones CUG en el núcleo sea la causa de su falta de función en las células. En 2005, Houseley *et al.* demostraron que la colocalización de Mbl en dichos agregados en *Drosophila* no causaba fenotipos, mientras que en nuestro laboratorio encontramos que las repeticiones CTG pueden provocar defectos en el *splicing* alternativo de transcritos diana de Mbl independientemente de la formación de inclusiones (Garcia-Lopez *et al.*, 2008; Houseley *et al.*, 2005). Por esta razón, algunos autores prefieren hablar de colocalización y secuestro de Muscblind en términos diferentes. De esta manera, incluso si p88 no pudiese liberar a Mbl de las inclusiones nucleares *in vivo* (colocalización), nuestros análisis en ratones modelo demuestran que el péptido estaría de algún modo actuando sobre su secuestro, restaurando su función como factor de *splicing*. Hasta la fecha, esta es la primera molécula de la que tenemos conocimiento que consigue recuperar la función de las proteínas Muscblind sin mimetizar la unión de éstas a las repeticiones CUG. Esto supone una ventaja frente a compuestos como la pentamidina, los cuales pueden afectar al procesado de otros transcritos diana de MBNL1 en condiciones no patológicas (Warf, Nakamori *et al.*, 2009).

8. Toxicidad de p88

Dada la capacidad de p88 de unirse a los ácidos nucleicos cabría esperar que la molécula fuese tóxica a partir de una cierta dosis. En moscas de genotipo *103Y-Gal4/+;UAS-(CTG)480/+* detectamos un efecto tóxico de p88 a una concentración de 250 μ M, mientras que en moscas *Mhc-Gal4/+;UAS-(CTG)480/+* dicho efecto no se detectaba hasta 500 μ M. En moscas *OrR* p88 no afectó a la viabilidad a ninguna concentración ensayada (≤ 1 mM). Estos datos sugirieron que unos genotipos podrían ser más sensibles que otros al efecto del péptido. Dicho fenómeno podría deberse a varias razones. En primer lugar, es posible que exista un componente específico de las repeticiones en la toxicidad de p88. Así, si nuestra hipótesis es cierta y p88 despliega las horquillas de ARN (CUG)480, estos transcritos dejarían de formar agregados ribonucleares y podrían ser exportados al citoplasma como ARNs de cadena sencilla. Se ha propuesto que la formación de agregados nucleares podría tener un papel protector (Arrasate *et al.*, 2004), lo cual en el caso de la DM1 se basa en el hecho de que la presencia de inclusiones por sí misma, tanto en el núcleo como en el citoplasma, no es suficiente para desencadenar fenotipos patológicos (Dansithong *et al.*, 2008; Houseley *et al.*, 2005). De esta manera, podría ocurrir que las moléculas de ARN de cadena sencilla (CUG)480 generadas por p88 fuesen tóxicas en el citoplasma a partir de un umbral, explicando el efecto negativo del péptido en moscas modelo pero no en las salvajes. Dado que las distintas construcciones Gal4 dan lugar a niveles diferentes de expresión de los transgenes que regulan, esto explicaría que p88 tenga un umbral de toxicidad distinto en las moscas *103Y-Gal4/+;UAS-(CTG)480/+* y *Mhc-Gal4/+;UAS-(CTG)480/+*, al diferir ambas en la cantidad de moléculas (CUG)480 susceptibles de formar ARNs de cadena sencilla. Sin embargo, es posible que las moscas modelo presenten una menor tolerancia a p88 que las moscas *OrR* debido simplemente a que su capacidad de respuesta está mermada al tratarse de moscas 'enfermas'. De esta manera, p88 podría también llegar a ser tóxico en la cepa *OrR* a concentraciones por encima de las ensayadas en este trabajo

La inyección intramuscular de 10 μ g (~ 0.5 mg/Kg) y 100 μ g (~ 5 mg/Kg) de p88 (pero no 0.5 μ g y 1 μ g; ~ 0.025 mg/Kg y 0.05 mg/Kg, respectivamente) en ratones de la cepa *FVB* dio lugar a niveles elevados de urea en plasma (indicador de la función renal), mientras que la dosis de 10 μ g causó alteraciones en el enzima GPT (indicador de la función hepática), demostrando que los niveles de p88 que llegan a la sangre tras la inyección son suficientes para alterar al menos a parte de los órganos a los que el péptido accede. Además, la inyección de 100 μ g causó la muerte de 2 de 6 animales, lo cual supone un valor próximo a la dosis letal 50 (DL50). Los ratones sometidos a las dosis más altas, así como sus controles, mostraban niveles de enzima CPK (marcador de la función muscular y cardíaca) elevados probablemente debido al DMSO (2%) y/o a la propia inyección. A pesar de esto, el examen histopatológico del músculo de estos ratones no reveló anomalías considerables en ningún caso, a excepción de

una mixedomatosis leve y ligera inflamación en algunos individuos. Esto indica que p88 no afecta de manera significativa a la estructura del músculo en los ratones salvajes.

Según nuestros resultados, el DMSO por sí sólo es tóxico tanto en mosca como en ratón. Por tanto, es posible que el DMSO disminuya el umbral de toxicidad del péptido, al sumarse su efecto al del solvente. Un apoyo a esta idea proviene del hecho de que p88 suprime los defectos histológicos y de *splicing* en ratones *HSA^{LR}* a una dosis a la que en los ratones *FVB* se detectó un efecto tóxico sobre la función hepática y renal. Por lo tanto, sería interesante ensayar la molécula disuelta en agentes menos nocivos. Un ejemplo es el polietilenglicol (PEG), el cual es cerca de unas 10 veces menos tóxico en *Drosophila* que el DMSO (datos no mostrados, generados durante este trabajo).

9. Potencial de p88 como molécula terapéutica

En este trabajo hemos identificado un D-péptido de 6 aminoácidos (p88) mediante el rastreo de una quimioteca combinatoria de hexapéptidos en formato de rastreo posicional en un modelo en mosca que reproduce los aspectos más relevantes de la DM1 en humanos (Garcia-Lopez *et al.*, 2008). Hasta la fecha, este es el primer ejemplo descrito del uso de quimiotecas combinatorias de péptidos en *Drosophila* del que tenemos conocimiento. Este péptido es capaz de suprimir fenotipos en SNC, músculo y ojo en *Drosophila*, así como en el músculo de ratones *HSA^{LR}* modelo de DM1, tanto a nivel histológico como molecular, revirtiendo defectos de *splicing* alternativo dependientes de la proteína Mbn11 (*Serca1* y *Tnnt3*) sin afectar al procesado de ambos en los animales salvajes ni al de otros transcritos musculares (*Capzb*).

p88 se une a repeticiones CUG *in vitro* desestabilizando las horquillas sin interferir con la unión de Muscleblind al ARN de doble cadena. En este trabajo proponemos que el péptido 88 y Muscleblind se unen a las repeticiones CUG de manera diferente y que las formas de ARN de cadena sencilla generadas por la unión de p88 son menos tóxicas que las formas en horquilla, restaurando la función como factor de *splicing* de la proteína Mbn11 en las células (Fig. D6). El hecho de que p88 tenga como diana la estructura secundaria de los transcritos de repeticiones CUG hace pensar que el péptido podría recuperar la función no sólo de las proteínas asociadas a éstas de manera directa (como MBNL1), sino también de otros factores o mecanismos afectados aguas abajo. A pesar de que CUGBP1 es un componente clave en la DM1, los datos generados no son suficientes para entender cómo p88 podría afectar a la función de esta proteína ni a su antagonismo con MBNL1, ya que los niveles de *Cugbp1* en los ratones *HSA^{LR}* no están alterados y no existe un homólogo claro en *Drosophila*. Por último, p88 podría tener actividad sobre otros ARNs tóxicos de doble cadena, por ejemplo CCUG, pudiendo ser terapéutico contra la DM2 u otras enfermedades originadas por expansiones CUG tales como la SCA8.

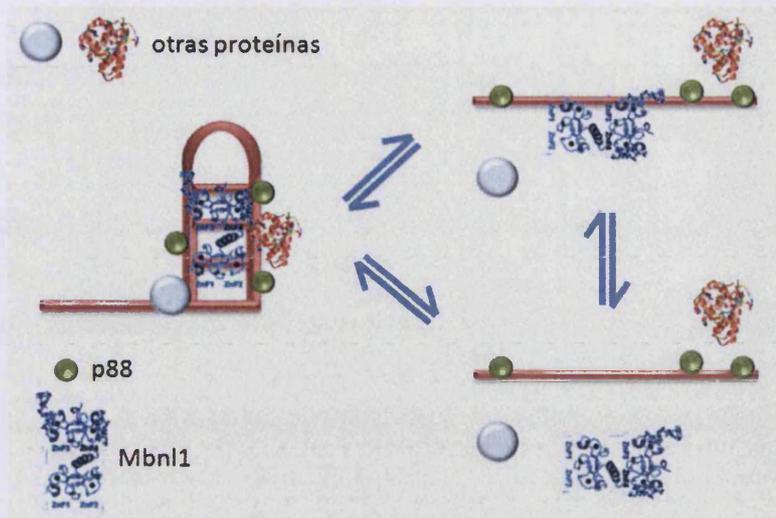


Figura D6. Posible mecanismo de acción de p88. MBNL1 se une a la porción interna de horquillas de repeticiones CUG (Teplova *et al.*, 2008). p88 podría unirse de manera diferente, desestabilizando la horquilla y dando lugar a moléculas de cadena sencilla a las cuales MBNL1 podría seguir unida (parte superior derecha de la figura) y/o de las que una proporción de la proteína secuestrada podría liberarse, restaurando su función como factor de *splicing* (parte inferior derecha). Otras proteínas con un mecanismo de unión a repeticiones CUG similar podrían también liberarse.

Junto con la pentamidina, p88 es hasta la fecha el único compuesto de naturaleza no ribonucleica ensayado con éxito en modelos *in vivo* cuya diana son las repeticiones CUG tóxicas (Warf, Nakamori *et al.*, 2009). Sin embargo, a diferencia de la pentamidina, p88 es la única molécula para la cual se ha llevado a cabo administración oral con éxito (en un modelo en *Drosophila*) y presenta el mayor tiempo de efecto descrito (hasta 4 semanas tras una sola inyección en ratones modelo).

Los péptidos regulan un gran número de procesos fisiológicos, actuando como señales paracrinas, endocrinas o como neurotransmisores, entre otros. En los últimos años el uso de péptidos como fármacos ha experimentado un gran crecimiento. En Europa las empresas farmacéuticas y compañías biotecnológicas poseen varios péptidos en el mercado que se utilizan de manera terapéutica en diversas áreas como la neurobiología, hematología o endocrinología. En 2005 existían al menos 150-200 péptidos en fases clínicas y el número de péptidos en desarrollo en todo el mundo era de 600 a 700 (McGee, 2005). Algunos ejemplos de fármacos de naturaleza peptídica de uso en la actualidad incluyen la insulina, la hormona del crecimiento, la arginina vasopresina o la hormona liberadora de la hormona luteinizante. El Fuzeon, un péptido de 36 aminoácidos, fue descubierto en 1993 y aprobado en 2004 por la FDA (*Food and Drug Administration*, EEUU) para su uso en pacientes VIH-positivos, ya que evita la fusión del virus a la membrana plasmática de las células huésped (Hanna, 1999).

Sin embargo, la mayoría de estos péptidos no pueden administrarse por vía oral, ya que son rápidamente inactivados por los enzimas intestinales. Por esta razón es necesario administrarlos por vía nasal, intravenosa o subcutánea, entre otras. Los péptidos compuestos por D-aminoácidos, como p88, carecen de esta limitación al ser resistentes a proteasas. En este sentido, p88 presenta, además, la ventaja de haber sido identificado en un rastreo *in vivo*

donde las moléculas se administraron en la comida, lo cual garantiza la biodisponibilidad oral de los compuestos positivos.

La síntesis de D-péptidos puede ser un proceso caro. Además, el tamaño de un péptido puede ser elevado y limitar su absorción por las células. La optimización química de estas moléculas, por tanto, es un paso importante en su desarrollo como futuros fármacos. Al optimizar químicamente un péptido no sólo se maximiza su actividad, sino también otras propiedades como su solubilidad y absorción por las células. Una forma de obtener derivados activos de péptidos identificados en rastreos biológicos consiste en la generación de peptidomiméticos. Los peptidomiméticos se basan en la premisa de que la información tridimensional de los grupos reactivos en un péptido puede ser mimetizada mediante el diseño de moléculas de bajo peso molecular de naturaleza no peptídica (Vagner *et al.*, 2008; Wu & Gellman, 2008). De este modo, p88 podría representar una molécula cabeza de serie para el desarrollo posterior de un nuevo fármaco activo.

En conjunto, en este trabajo proponemos una serie de moléculas con capacidad para suprimir la toxicidad de repeticiones CTG *in vivo*, abriendo una vía de estudio en el desarrollo de nuevas terapias contra la DM1 y aportando un nuevo enfoque en la identificación y generación de nuevas moléculas con las que combatir la toxicidad de expansiones de tripletes CNG en el futuro.

Conclusiones

Conclusiones

Las conclusiones que pueden extraerse de los resultados presentados en este trabajo son las siguientes:

1. La expresión de expansiones CTG no codificantes en los Cuerpos de Seta (*Mushroom Bodies*) del cerebro de *Drosophila* parece afectar al control motor durante la eclosión de la pupa causando, en última instancia, la muerte de los individuos. Este fenotipo responde a niveles de expresión de Mbl y es susceptible de modificación química, siendo adecuado para la búsqueda de compuestos con potencial terapéutico para la DM1.
2. Mediante el rastreo de dos quimiotecas hemos identificado 11 moléculas capaces de suprimir la toxicidad de las repeticiones CTG en el cerebro de *Drosophila*. 10 de estos compuestos poseen actividad biológica conocida y podrían ejercer su efecto mediante mecanismos de acción que implican una inhibición de la transmisión nerviosa y de la síntesis de prostaglandinas.
3. Un D-hexapéptido no descrito hasta la fecha, p88, posee actividad sobre la toxicidad de las repeticiones CTG tanto en el cerebro como en el músculo de *Drosophila*, de manera dependiente de dosis en ambos casos. La expresión endógena de la forma retroinversa de p88 mediante el sistema Gal4/UAS (*UAS-p88*) también revierte fenotipos causados por los tripletes CTG, confirmando el efecto específico de p88 sobre la toxicidad de las repeticiones.
4. En este trabajo se describe por primera vez que péptidos de tan sólo 10 aminoácidos pueden expresarse en *Drosophila* utilizando el sistema Gal4/UAS.
5. Mediante un rastreo de alaninas hemos comprobado que todos los aminoácidos de la secuencia de p88 son necesarios para su unión al ARN y para su actividad *in vivo*. Además, mediante la generación de moscas transgénicas *UAS-p88* hemos demostrado que la disposición espacial de las cadenas laterales de p88 es crítica para su función.
6. Mediante experimentos *in vitro* hemos comprobado que p88 se une a repeticiones CUG desplegando las horquillas de ARN. La afinidad de esta unión es mayor que la observada para otros ácidos nucleicos y aumenta con el número de repeticiones.
7. p88 no desplaza la unión de MblZF a las repeticiones CUG *in vitro*. Puesto que ambas moléculas afectan de manera diferente a la conformación de las horquillas es posible que se unan de manera diferente al ARN.
8. Hemos confirmado la actividad de p88 en el músculo de ratones modelo de la enfermedad, demostrando que una sola inyección de p88 puede revertir defectos histopatológicos y de *splicing* dependientes de Mbnl1 durante al menos 4 semanas.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

I. Experimentos *in vitro*

1. Materiales

1.1. Cepas de *E. coli*

Las siguientes cepas de *E. coli* se usaron a lo largo de este trabajo:

Cepa	Genotipo
XL1-Blue ¹	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr)]</i>
SURE-2 ²	<i>e14-(McrA-) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvrC[F' proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]</i>
BL21 (DE3) ³	<i>F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal I (DE3)</i>
BL21 pLysS (DE3) ³	<i>F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal I (DE3) [pLysS Camr]a</i>
BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL ³	<i>F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU proLCamr] [argU ileY leuW Strep/Specr]</i>

¹ Cepa utilizada para la clonación y amplificación de plásmidos. ² Cepa utilizada para la clonación y amplificación de plásmidos con repeticiones CTG. ³ Cepas utilizadas para la expresión de proteínas.

1.2. Cebadores I

Los siguientes cebadores se utilizaron para llevar a cabo las reacciones de PCR relacionadas con los experimentos *in vitro* descritos en este apartado:

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tm
MbIZF_directo	GGAATTCATATGGCCAACGTTG	65 °C
MbIZF_reverso	CGGGATCCCGTTACTTGAGGGCCAAATGATT	65 °C

1.3. Kits

AxyPrep™ DNA Gel Extraction de Axygen
 High Pure Plasmid Isolation de Roche
 BCA de Pierce
 MEGAscript de Ambion
 PlusOne™ Silver Staining de Amersham

2. Métodos

2.1. Obtención de la proteína MbIZF

2.1.1. Clonación de MbIZF

2.1.1.1. Obtención de ADN genómico a partir de moscas de genotipo silvestre (OrR). Se homogenizaron 30 moscas de genotipo *OrR* en 200 µL de tampón A (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 0.5%). Tras añadir otros 200 µL de tampón A al homogenado éste se calentó a 65°C durante 30 min. A continuación, se añadieron 800 µL de tampón B (mezcla de KAc 5 M y LiCl 6 M en una relación 2:5) y la mezcla se incubó en hielo durante 10 min. Tras centrifugar 15 min a 12000 g y 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 600 µL de isopropanol frío. Tras una nueva centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de EtOH al 70% previamente enfriado. La mezcla se centrifugó de nuevo y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco, el pellet se resuspendió en 400 µL de agua estéril y se incubó 15 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 400 µL de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó por vórtex 1 min. La muestra se centrifugó durante 5 min a 12000 g y al sobrenadante se le añadió el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Los tubos se agitaron por vórtex 1 min y se centrifugaron de nuevo. Al sobrenadante se le añadieron 2.5 volúmenes de EtOH 100% frío y NaCl hasta una concentración final de 0.2 M. Tras 30 min de precipitación a -20°C la mezcla se centrifugó 10 min a 12000 g y 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó con 500 µL de EtOH al 70% frío. Tras centrifugar de nuevo 2 min a 12000 g y 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Finalmente, éste se resuspendió en 100 de µL agua estéril con ARNasa a 2 µg/ml.

2.1.1.2. Clonación de MbIZF en el vector pBlueScript II SK (+/-) y subclonación en el vector p11. La siguiente secuencia de 315 pb (Fig. MM1) fue obtenida mediante PCR a partir de 0.3 µg del ADN genómico de moscas *OrR* (ver apartado 2.1.1.1) y los cebadores MbIZF_directo y MbIZF_reverso, los cuales contenían secuencias adaptadoras para los enzimas de restricción *NedI* y *BamHI*. Para la reacción de PCR se utilizó un enzima de alta procesividad (Pwo DNA Polymerase, Roche diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. La temperatura de hibridación fue de 65°C y el número de ciclos 10+25.

5' **GGAATTCCA** | **TATGGCCAACGTTG**TCAATATGAACAGCCTGCTCAACGGCAAGGATTCGCGCTGGCTG
CAATTGGAGGTCTGTCGCGAGTTCAGCGCAACAAATGCTCGCGCCAGGACACCGAATGCAAGTTCGCCC
ATCCCCGGCCAACGTGGAGGTCCAGAACGGCAAGGTCACCGCCTGCTACGACAGCATCAAGGGCCGCTG
TAATCGTGATAAACCGCCGTGCAAATACTTTCATCCACCACAGCATCTGAAGGATCAGTTATTGATAAAT
GGACGCAATCATTGGCCCTCAAGTAACGG | **GATCCCG3'**

Figura MM1. Secuencia que codifica los dos dedos de zinc de la proteína Muscblind de *Drosophila*. La secuencia de los cebadores MbIZF_directo y MbIZF_reverso se resalta en negrita (extremos 5' y 3' respectivamente), con las secuencias de corte para los enzimas de restricción *NedI* y *BamHI* marcadas en azul en cada caso. En rojo se indica el codón de terminación.

El producto de PCR se fosforiló en sus extremos mezclando 10 μ L del mismo, 2 μ L del tampón de la T4 Ligasa (ya que éste es similar al tampón de la T4 Polinucleótido Kinasa y contiene ATP), 1 μ L del enzima T4 Polinucleótido Kinasa (PNK 200U; Roche diagnostics) y 7 μ L de H₂O estéril, e incubando a 37°C durante 30 min.

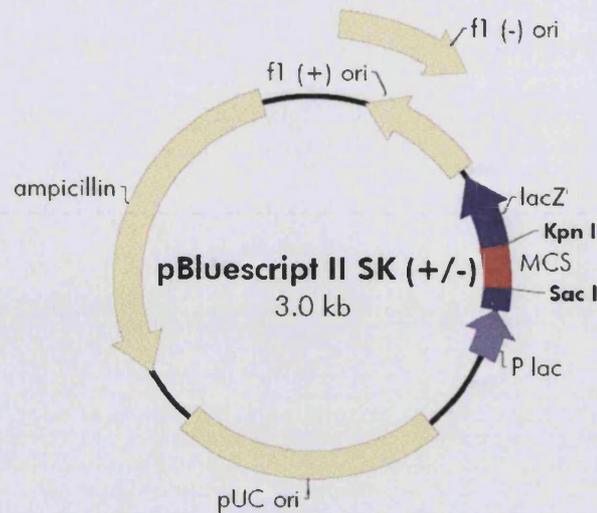
El ADN fosforilado se purificó a partir de un gel de agarosa al 0.8% (ver apartado 2.8.1. de Material y Métodos) utilizando el kit AxyPrep™ DNA Gel Extraction de Axygen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado, el fragmento de ADN con extremos romos se ligó al vector pBlueScript II SK (+/-) (Fig. MM2), previamente digerido con *EcoRV* y desfosforilado (Fosfatasa Alcalina, Roche diagnostics). La **ligación entre extremos romos** se llevó a cabo entre 50 ng de vector y la cantidad correspondiente de inserto según la siguiente fórmula, siendo la proporción I/V 3:1.

$$\text{Inserto (ng)} = I/V \times [\text{vector (ng)} \times \text{tamaño inserto (kb)} / \text{tamaño vector (kb)}]$$

A continuación, se añadieron 3 μ L de tampón 10X y 3 μ L del enzima T4 Ligasa (Roche diagnostics), y se completó con H₂O hasta un volumen final de 30 μ L. La reacción de ligación se llevó a cabo incubando a 16°C toda la noche.

Del producto de la ligación, 5 μ L fueron utilizados para la **transformación** de 200 μ L de células *E. coli* competentes (cepa XL1-Blue) siguiendo el método de choque térmico. Brevemente, éste consiste en incubar las células y el ADN durante 20 min en hielo antes de someterlas a 42°C durante 90 s. A continuación, las células se mantuvieron 2 min en hielo y se añadieron 4 volúmenes de LB atemperado para, seguidamente, incubar a 37°C durante 1h en agitación. Tras recoger las células por centrifugación (1000 g, 5 min), éstas se sembraron en placas de agar con 50 μ L/mL del antibiótico Ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C. Como control, se sembraron células transformadas con el vector pBlueScript II SK (+/-) abierto con *EcoRV* y desfosforilado. Al día siguiente se seleccionaron 14 colonias y éstas se traspasaron a tubos con 5 mL de LB con Ampicilina, donde se dejaron crecer toda la noche a 37°C en agitación. Posteriormente, estas células fueron lisadas y su ADN plasmídico extraído con el kit High Pure Plasmid Isolation de Roche.

El fragmento *MbIZF* se liberó del vector pBlueScript II SK (+/-) mediante digestión con los enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* (Roche diagnostics). La **digestión** se llevó a cabo mezclando 5 μ L del ADN plasmídico obtenido, 2.5 μ L de tampón B, 1 μ L de *NdeI*, y 16.5 μ L de H₂O e incubando toda la noche a 37°C. *NdeI* se inactivó a 65°C durante 15 min y se añadió 1 μ L de *BamHI* tras lo cual la reacción se incubó 2 h a 37°C.



pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 598-826)

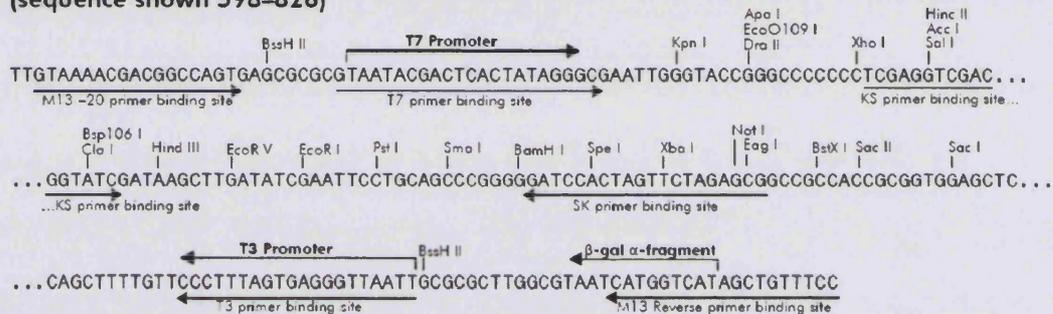


Figura MM2. Vector pBlueScript II SK (+/-). La imagen muestra el sitio de clonación múltiple (MCS). Figura tomada de www.stratagene.com.

El fragmento liberado se purificó en un gel de agarosa al 0.8% tal y como se ha descrito, y se ligó con el vector de expresión p11 (vector modificado a partir del vector comercial pET-15b; Fig. MM3). Al tratarse en este caso de una **ligación entre extremos cohesivos** la reacción se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche. De nuevo, del producto de la ligación 5 µL fueron utilizados para la transformación de 200 µL de células *E. coli* competentes (cepa XL1-Blue) siguiendo el método de choque térmico. Las secuencias del inserto así como del resto de regiones de interés del vector fueron comprobadas mediante secuenciación por la empresa Sistema Genómicos (www.sistemasgenomicos.com).

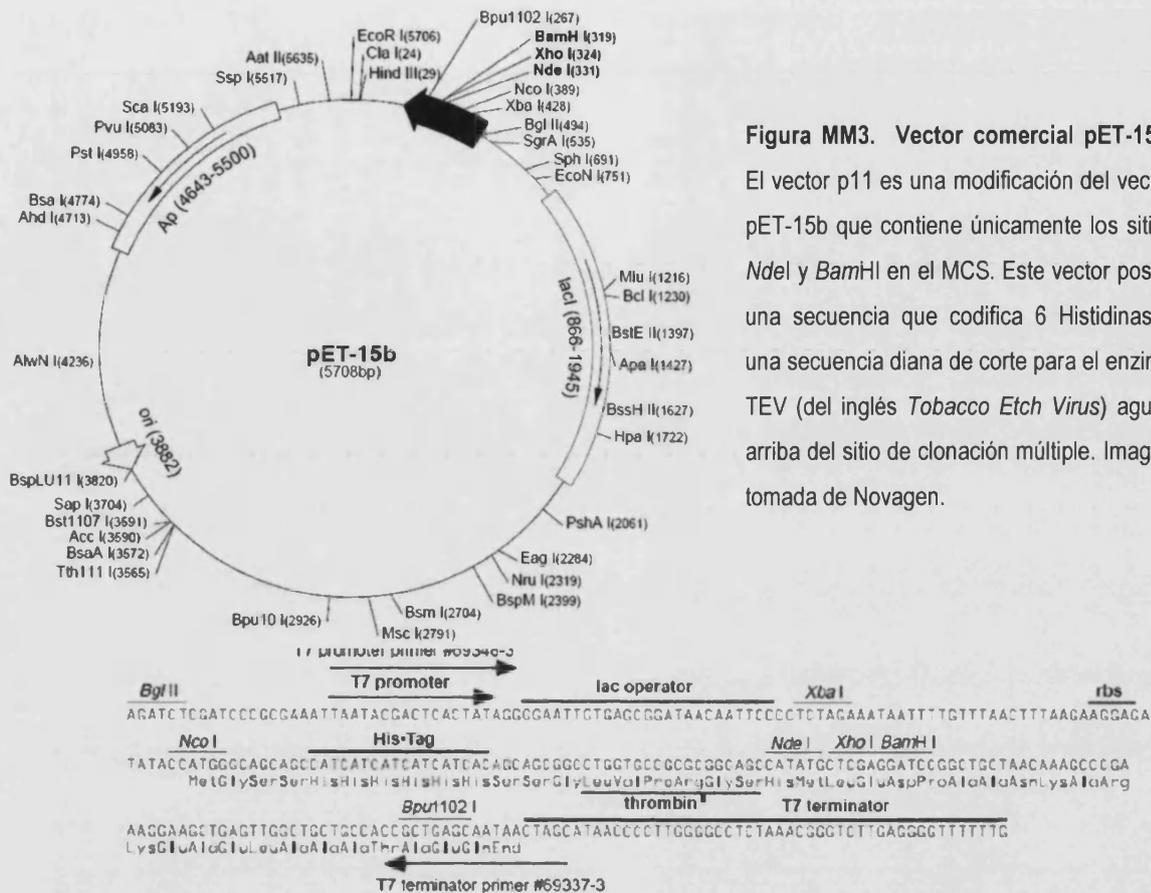


Figura MM3. Vector comercial pET-15b. El vector p11 es una modificación del vector pET-15b que contiene únicamente los sitios *Nde*I y *Bam*HI en el MCS. Este vector posee una secuencia que codifica 6 Histidinas y una secuencia diana de corte para el enzima TEV (del inglés *Tobacco Etch Virus*) aguas arriba del sitio de clonación múltiple. Imagen tomada de Novagen.

2.1.2. Expresión de la proteína MblZF

Las cepas de *E. coli* BL21 (DE3), BL21 pLys (DE3) y BL21 Plys (DE3) Codon + (Stratagene) se transformaron utilizando 0.1 µg de la construcción p11-MblZF con el fin de encontrar las condiciones óptimas de expresión de la proteína. Para cada cepa se llevó a cabo un cultivo a pequeña escala en 100 mL de LB suplementado con 2% glucosa, ZnCl₂ 50 µM y los antibióticos correspondientes en cada caso. Una vez los cultivos alcanzaron en una O.D₆₀₀ de 0.6 se indujo la expresión de MblZF añadiendo 1 mM de IPTG al medio e incubando durante 2 horas a 16°C. Las bacterias se recogieron por centrifugación (3600 rpm, 8 min y 4°C) y los pellets se resuspendieron en 10 mL de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 50 µM ZnCl₂, 10 % glicerol y 1 mM DTT). La solución resultante se dejó incubar 30 min en hielo en presencia de inhibidor de proteasas (cOmpete EDTA free, Roche; 1 pastilla/100 mL cultivo), lisozima (0.5 mg/mL) y Dnasa I (5 µg/µL). A continuación, las bacterias se lisaron mediante sonicación durante 3 min con descansos de 1 min a cada minuto, amplitud 35% y 0.5 ON, 0.5 OFF. Por último, tras centrifugar a 10000 rpm, 30 min y 4°C se recogió el sobrenadante y las muestras se resolvieron en geles de poliacrilamida al 15% (ver receta en apartado 2.8.2.).

Para llevar a cabo el escalado de los cultivos se empleó la cepa BL21 (DE3) y se prepararon cuatro cultivos de 500 mL (volumen total 2 L), llevándose a cabo el mismo

procedimiento arriba descrito. En este caso se obtuvo un volumen total de 200 mL a partir del lisado de bacterias.

2.1.3. Purificación de la proteína MbIZF

Los 200 mL obtenidos en el apartado 2.1.2. se utilizaron para la purificación de MbIZF mediante cromatografía líquida de afinidad (sistema FPLC ÄKTA™ purifier) en columnas HisTrapHP de 1mL (Amersham Biosciences). Como tampón de lavado (tampón A) se utilizó el tampón de lisis (ver composición en apartado 2.1.2.) al que se le añadió imidazol a una concentración final de 20 mM, mientras que el tampón de elución (tampón B) contenía imidazol a 500 mM. El proceso de purificación consistió en la inyección de la muestra a 0.5 mL/min, seguida de lavados (10 v/c) y elución en un gradiente de tampón B (de 0% a 100% en 20 v/c) seguida de lavados en 100% de tampón B (5 v/c). Las fracciones recogidas se resolvieron en geles de poliacrilamida al 15% y se seleccionaron aquéllas que contuviesen la proteína MbIZF lo más concentrada y pura posible (Fig. MM4). La identidad de MbIZF fue confirmada mediante secuenciación por espectrometría de masas a partir de geles de poliacrilamida por el servicio de proteómica del CIFP (Valencia).



Figura MM4. Obtención de la proteína MbIZF en *E. coli*. (A) Expresión de MbIZF en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*. A.I.: antes de la inducción con IPTG; S: sobrenadante del lisado de las células (fracción soluble); P: pellet del lisado de las células (fracción insoluble). La mayor parte de la proteína se encuentra en la fracción soluble (S). (B) Ejemplo de purificación de la proteína MbIZF en gradiente de imidazol por FPLC. Las fracciones 10 a 14 se sumaron para obtener un stock de proteína (C). Los asteriscos *1 y *2 muestran bandas secuenciadas por espectrometría de masas con el fin de confirmar la identidad de MbIZF (*1). La banda *2 resultó ser la proteína 50S de *E. coli*, descartando que se tratase de un producto de degradación de MbIZF.

2.1.4. Cambios de tampón de la proteína MbIZF

2.1.4.1. Mediante filtros concentradores. Con el fin de reducir el contenido en sales del tampón B de la proteína MbIZF (ver apartado 2.1.3.), éste se diluyó hasta 4000 veces en tampón fosfato 50 mM pH 7.5 con 150 mM NaCl y 50 μ M ZnCl₂, utilizando filtros concentradores Amicon Ultra-4 5K (Millipore) según las instrucciones del fabricante. A continuación se cuantificó la concentración total de proteína midiendo la absorbancia de la muestra a 280 nm (espectrofotómetro NanoDrop, ND-1000). Esta muestra se utilizó durante los experimentos de dicroísmo circular de proteínas.

2.1.4.2. Mediante membranas de diálisis. Con el fin de eliminar el imidazol de la solución final de proteína se dializaron fracciones de 1 mL de MbIZF en tampón de lisis (ver apartado 2.1.2.) o tampón de unión (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 μM ZnCl₂, 10 % glicerol y 1 mM DTT) a 4°C, utilizando membranas de diálisis de MWCO 3500 (Spectrum Laboratories, Inc.). Tras la diálisis se cuantificó la concentración total de proteína utilizando el kit BCA de Pierce y comparando con una recta patrón según las instrucciones del fabricante. Estas muestras se utilizaron tanto para los experimentos de polarización de fluorescencia como de retardo en gel.

2.1.4.3. Mediante columnas PD-10. El cambio de tampón por diálisis es un cambio lento. Debido a que los dedos de zinc contienen cisteínas, un cambio de tampón rápido minimiza la oxidación de éstas y con ello la precipitación de la proteína. Por esta razón se utilizaron columnas de desalado PD-10 (GE Healthcare). De manera resumida, se realizó un equilibrado de la columna utilizando 25 mL del tampón de interés (en nuestro caso tampón de unión, ver apartado 2.1.4.2.), se inyectaron 2.5 mL de la solución con MbIZF. A continuación, se eluyó la proteína añadiendo 3.5 mL de tampón de unión. Los dos últimos pasos se repitieron de nuevo y la columna se lavó con 25 mL de H₂O miliQ antes de ser lavada con H₂O miliQ y guardada a 4°C.

Las 6 fracciones resultantes se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 15% y la cantidad de proteína en cada una de ellas se cuantificó utilizando el kit BCA de Pierce. Estas muestras se utilizaron tanto para todos los experimentos de unión entre MbIZF y los distintos ARNs.

2.2. Experimentos de Dicroísmo Circular (DC)

2.2.1. Dicroísmo Circular de proteínas. Las medidas de DC se realizaron en cubetas Hellma con un paso de luz de 1 mm, en un volumen de 200 μL y a una concentración de proteína de 9 μM en tampón fosfato (ver composición en apartado 2.1.4.1.). El intervalo de longitud de onda del espectro fue de 198 nm a 250 nm. Los datos de DC obtenidos corresponden a la media de 10 barridos. Las medidas se realizaron con un dicrógrafo Jasco J-810 a temperatura ambiente.

2.2.2. Dicroísmo Circular del ARN.

2.2.2.1. Obtención del ARN CUG(60)

A. Subclonación de CTG(60) en el vector pBlueScript II SK (+/-). En nuestro laboratorio disponíamos de 60 repeticiones CTG (CTG(60)) en la región 3'UTR del gen *DMPK* clonadas en el vector pSP72 (Miller et al, 2000). El fragmento CTG60 se liberó mediante digestión con los enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* y se purificó en un gel de agarosa al 0.8% (ver apartado 2.1.1.2.). El fragmento purificado se ligó al vector pBlueScript II SK (+/-) siguiendo el protocolo de ligación descrito para secuencias con extremos cohesivos (ver apartado 2.1.1.2.). Del producto de ligación, 10 μL se utilizaron para transformar 100 μL de células *E. coli*

supercompetentes (cepa SURE-2; Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 100 μL de células y 2 μL de β -mercaptoetanol a tubos de polipropileno de 14 mL previamente enfriados. Tras mezclar suavemente, las células se incubaron en hielo durante 10 min con agitación suave cada 2 min. A continuación, se añadieron ~50 ng de ADN y los tubos se dejaron en hielo durante 30 min antes de ser sometidos a un choque térmico de 42°C durante 30 seg. Las células se mantuvieron en hielo durante 2 min y se añadieron 900 mL de medio NZY+ previamente atemperado a 42°C. Por último, los tubos se incubaron a 37°C durante 1h en agitación. 1 μL , 10 μL y 100 μL del cultivo (sin centrifugar) fueron sembrados en placas de agar con 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del antibiótico Ampicilina. Como control se sembraron células incubadas con el vector pBlueScript II SK (+/-) abierto con los enzimas *EcoRI* y *BamHI*. Al día siguiente se seleccionaron colonias para llevar a cabo la extracción de ADN plasmídico tal y como se describe en el apartado 2.1.1.2. Para asegurarnos de que el fragmento CTG(60) no se había expandido/contraído durante la clonación, se comprobó su tamaño en un gel de poliacrilamida para ácidos nucleicos al 8% (ver receta en apartado 2.8.4.).

B. Transcripción in vitro de CUG(60). 1 μg de la construcción pBlueScript-CTG(60) se digirió con *BamHI* con el fin de linearizar el plásmido y llevar a cabo la reacción de transcripción utilizando el promotor T7 del vector. La reacción se realizó utilizando el kit MEGAscript de Ambion mezclando 1 μg del ADN molde linearizado, 2 μL de ATP, 2 μL de CTP, 2 μL de GTP, 2 μL de UTP, 2 μL de tampón 10X, 2 μL de ARN polimerasa y completando con H_2O hasta 20 μL e incubando la reacción durante 4 horas a 37°C. El ARN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro (Eppendorf BioPhotometer) y se almacenó a -80°C.

2.2.2.2. Obtención de espectros. Las medidas de dicroísmo circular se tomaron en cubetas Hellma con un paso de luz de 1 mm, en un volumen de 150 μL y a una concentración de ARN CUG(60) de 1 μM . En cada caso se obtuvo el espectro del ARN libre antes de añadir a la cubeta un volumen máximo de 8 μL de MbIZF (1 μM y 1.5 μM), péptido 88 (0.5 μM , 1 μM , 10 μM y 20 μM), p29.1 (0.5 μM y 1 μM) o p29.4 (1 μM). El intervalo de longitud de onda del espectro fue de 240 nm a 320 nm. Los datos de DC obtenidos corresponden a la media de 10 barridos. Las medidas se realizaron con un dicrógrafo Jasco J-810 a 10°C.

2.3. Cromatografía de Exclusión Molecular

Se pasaron 40 μg de la proteína MbIZF en un volumen de 200 μL por una columna de exclusión molecular Superdex 75 en un sistema FPLC ÄKTA™purifier. El volumen de elución se comparó con un patrón de peso molecular.

2.4. Ensayos de Polarización de Fluorescencia (FP)

Para los experimentos de FP se utilizaron los siguientes ARNs sintetizados por la

empresa Metabion (www.metabion.com). Todos los ARNs se resuspendieron en H₂O estéril y las alícuotas se almacenaron a -80°C.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Escala de síntesis y Purificación
FAM-CUG23	FAM-CUG CUG	1 μmol - HPLC
CUG23	CUG CUG	1 μmol - HPLC

2.4.1. Ensayo de FP entre la proteína MbIZF y FAM-CUG23. Para poner a punto la cantidad de sonda fluorescente necesaria se ensayaron dos concentraciones distintas (6 nM y 60 nM) de un ARN sintético compuesto por 23 repeticiones CUG y conjugado en 5' con el fluoróforo carboxifluoresceína (FAM-CUG23). Una vez determinada la concentración óptima de sonda (6 nM), dicho ARN se incubó con cantidades crecientes de la proteína MbIZF (entre 0.6 nM y 2.5 μM). Todos los ensayos se llevaron a cabo en placas negras de 96 pocillos con un total de 4 réplicas por ensayo y en un volumen final por pocillo de 200 μL (blanco: 10 μL H₂O + 190 μL de tampón de lisis (ver apartado 2.1.2.); ARN libre: 10 μL del ARN FAM-CUG23 + 190 μL de tampón de lisis; ARN unido: 10 μL del ARN FAM-CUG23 + 190 μL MbIZF en tampón de lisis).

Una vez mezclados los componentes, la reacción se dejó incubar 20 min en hielo. Las medidas de milipolarización (mP) se obtuvieron utilizando un lector de placa Victor Wallac 1420 Multilabel Counter (Pelkin Elmer Lifesciences; filtro excitación FP480, emisión FP535).

2.4.2 Ensayos de competencia con sonda no marcada. La proteína MbIZF (900 nM) se incubó durante 20 min en hielo en presencia de un ARN no marcado, CUG23, a concentraciones de 60 nM, 600 nM y 1200 nM. A continuación se añadió la sonda marcada, FAM-CUG23 (6 nM), y la reacción se dejó incubar de nuevo en hielo durante 20 min. Por último, se obtuvieron medidas de milipolarización tal y como se describe en el párrafo anterior.

2.4.3. Ensayo de FP entre p88 y FAM-CUG23 y competencia con MbIZF. El mismo procedimiento se llevó a cabo para los ensayos de unión entre el péptido 88 y FAM-CUG23, aunque en este caso se añadió 0.05% DMSO al blanco. Para obtener una curva de unión del péptido a FAM-CUG23 (6 nM), p88 se utilizó a 5 μM, 10 μM, 50 μM, 100 μM, 200 μM, 400 μM, 600 μM y 1200 μM en las condiciones descritas. La capacidad del péptido 88 para desplazar la unión de MbIZF a FAM-(CUG)23 se estudió incubando FAM-CUG23 (6 nM) y 10 μM de péptido 88 durante 20 min en hielo, seguidos de 20 min en hielo tras añadir 2.5 μM de MbIZF a cada pocillo.

2.5. Ensayos de Retardo en Gel con sonda Fluorescente

lo cual se cargaron en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 6% sin EDTA (ver receta en apartado 2.8.3.), previamente sometidos a una corriente de 100V durante 30 min. La electroforesis se llevó a cabo en TB 0.5X suplementado con 5 mM MgCl₂ y 50 μM ZnCl₂ con un pH de 8.5 a 4°C en cubetas Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad Laboratories) a 200V durante aproximadamente 1 hora. Las imágenes de los geles se tomaron con el escáner de fluorescencia Typhoon 9400 (Amersham) utilizando los filtros de emisión 520 BP y 526 SP.

2.5.2. Ensayos de unión de p88. Los ensayos de unión entre p88 y los ARNs FAM-CUG23, FAM-CUG4, 3'UTR DMPK, (CAG-CUG)₄ y 3'UTR DMPK+CUG4, así como los ADNs FAM-CTG4 y 3'UTR DMPK se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μL (1 μL ARN, 1 μL péptido y 18 μL de tampón de unión), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.5.1 y añadiendo la cantidad de DMSO correspondiente al ARN libre en cada caso.

2.5.3. Ensayos de competencia con sonda no marcada. MblZF o p88 se preincubaron durante 10 min a 37°C con los siguientes ARN no marcados antes de añadir el ARN fluorescente: CUG23 (6 μM), CUG4 (6 μM), GUC4 (6 μM), ARNt (150 ng/μL). Una vez añadido el ARN marcado (60 nM), la mezcla se dejó incubar 20 min más a 37°C antes de cargar el gel tal y como se ha descrito en el apartado 2.5.1.

2.5.4. Eliminación de histidinas por digestión con TEV. 1 mL de la proteína MblZF a 100 μM en tampón de unión se digirió añadiendo 30 μL de un stock a ~120 μM de la proteasa TEV. La mezcla resultante se incubó a 16°C durante 2 h. Tras comprobar la digestión en un gel de poliacrilamida al 15%, ésta se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna HisTrap de 1 mL en un sistema FPLC Äkta Purifier. Como tampón de lavado se usó el tampón A (apartado 2.1.3.) sin imidazol. La elución se llevó a cabo en tampón B (ver apartado 2.1.3.) en 15 v/c. Tanto las fracciones recogidas en los lavados como en el gradiente de imidazol se resolvieron en geles de poliacrilamida al 15% para verificar el corte de la proteasa antes de proceder a su unificación.

2.5.5. Entrecruzamiento con formaldehído entre el ARN y MblZF o p88. La reacción de unión se llevó a cabo tal y como se ha descrito en el apartado 2.5.1. Tras ésta, e inmediatamente antes de cargar el gel, se añadieron 1.4 μL de formaldehído (FA) 10% (concentración final 0.7%) a cada muestra y la mezcla se dejó incubar 10 min a temperatura ambiente. Para parar la reacción de entrecruzamiento, se añadieron 2 μL de glicina a 2.5 mM (concentración final ~0.25 M). A continuación se añadió el tampón de carga y las muestras se resolvieron en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 6% con SDS.

2.6. Ensayos de extinción de fluorescencia del triptófano. p88 se diluyó a una concentración de 5 μM en tampón de unión (ver apartado 2.1.4.2) en un volumen final de 150 μL y se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia del triptófano entre 320 nm y 420 nm excitando a 290 nm. Las moléculas de ARN 3'UTR-DMPK, (CAG·CUG)₄, 3'UTR DMPK+CUG4 y de ADN 3'UTR

DMPK y CTG4 se añadieron a la cubeta con péptido a una concentración final de 2.5 μM , 5 μM , 7.5 μM , 10 μM y 12.5 μM , y los cambios en el pico de emisión de fluorescencia a 351 nm se midieron normalizando respecto al valor de fluorescencia del péptido libre. Al menos dos medidas se llevaron a cabo por cada punto de concentración. Las medidas se realizaron utilizando una cubeta Spectrosil 3 de 3 mm y en un espectrofluorímetro Jasco FP6500.

2.7. Ensayos de extinción de fluorescencia de la 2-aminopurina. El ARN 2AP-CUG23 se diluyó a 1 μM en tampón de unión (ver apartado 2.1.4.2) en un volumen final de 150 μL , se calentó a 90°C durante 3 min y se colocó inmediatamente en hielo, tras lo cual se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia entre 330 nm y 420 nm excitando a 312 nm. MbIZF (0.5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM), p88 (0.5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM y 100 μM), p29.1 (100 μM) y p29.4 (100 μM) se añadieron al medio y los cambios en el pico de emisión de fluorescencia a 375 nm se midieron restando el valor del tampón con la proteína o el péptido sin 2AP-CUG23 y normalizando respecto al valor de fluorescencia del ARN libre. Se llevaron a cabo tres medidas por cada punto de concentración. Las medidas se tomaron en una cubeta Spectrosil 3 de 3 mm y en un espectrofluorímetro Jasco FP6500.

2.8. Preparación de electroforesis

2.8.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Para la separación y visualización de fragmentos de ADN se utilizaron geles de agarosa a concentraciones de entre 0.8 y 2% en función del tamaño de los fragmentos a resolver. La agarosa se preparó en tampón TBE 1X (Tris-borato EDTA) con bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g/ml}$. El mismo tampón se utilizó durante la electroforesis.

Para resolver las muestras en el gel, éstas se prepararon en tampón de carga (glicerol al 50%, azul de bromofenol al 0.5% y EDTA pH 8.0 100 mM).

La visualización de los fragmentos se realizó con una lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda 312 nm.

2.8.2. Electroforesis y detección de proteínas en geles de poliacrilamida

2.8.2.1. Electroforesis. Para la separación de proteínas se utilizaron geles de acrilamida/bisacrilamida discontinuos al 15%. El gel empaquetador se preparó siguiendo las indicaciones del proveedor (Bio-Rad), con la siguiente concentración de componentes:

- ✓ 5% acrilamida/bisacrilamida (37.5:1)
- ✓ 0.08 M Tris-HCl pH 6.8
- ✓ 0.1% SDS
- ✓ 0.05% APS
- ✓ 0.125% TEMED

El gel separador se preparó con la siguiente concentración de componentes:

- ✓ 15% acrilamida/bisacrilamida
- ✓ 0.4 M Tris-HCl pH 8.8
- ✓ 0.1% SDS
- ✓ 0.05% APS
- ✓ 0.05% TEMED

Las muestras de proteínas se prepararon en tampón de carga (para 5X: Tris-HCl 60 mM pH 6.8, 50% glicerol, 2% SDS, 0.05% 2-β-mercaptoetanol, 0.1% azul bromofenol, 150 μL H₂O) y se desnaturalizaron a 80°C durante 5 min antes de ser cargadas en el gel. El tampón de electroforesis estaba compuesto por Tris 25 mM, glicina 0.2 M, SDS 0.1% y las muestras se resolvieron a un amperaje constante de 16 mA por gel.

2.8.2.2. Tinción con Coomassie. Los geles se incubaron con la solución colorante (azul coomassie R-250 0.1%, ácido acético glacial 8%, metanol 46%) durante 20 min en agitación orbital. Seguidamente, los geles se destiñeron en la solución decolorante (ácido acético glacial 5%, metanol 20%) durante al menos 30 min.

2.8.2.3. Tinción con plata. Esta tinción se llevó a cabo usando el kit PlusOne™ Silver Staining de Amersham. Brevemente, los geles se fijaron en solución decolorante durante al menos 30 min. A continuación, el gel se incubó durante 30 min en la siguiente mezcla: 37.5 mL de EtOH, 5 mL de trisulfato de sodio (5% w/v), 8.5 g de acetato de sodio y H₂O hasta 125 mL. Seguidamente se llevaron a cabo 3 lavados de 5 min con H₂O y los geles se incubaron durante 20 min en la siguiente mezcla: 12.5 mL de la solución nitrato de plata (2.5% w/v) y H₂O hasta 125 mL. Los geles se lavaron dos veces con H₂O (un minuto por lavado) y las bandas se revelaron durante 2-5 min con una mezcla de 3.1 g de carbonato de sodio y 100 μL de formaldehído (37% w/v) en 125 mL de H₂O. La reacción se paró incubando durante 10 min con 1.8 g en 125 mL de H₂O seguido de 3 lavados e 5 min con H₂O.

2.8.3. Electroforesis en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida

Para llevar a cabo los experimentos de retardo en gel se utilizaron geles nativos (no desnaturalizantes) de poliacrilamida al 6%, según la siguiente receta:

Para 20 mL (2 geles):

- ✓ 3 mL acrilamida:bisacrilamida 37.5:1
- ✓ 1 mL TB (Tris-Bórico, sin EDTA) 10X
- ✓ 200 μL APS
- ✓ 20 μL TEMED
- ✓ 15.78 mL H₂O

Las muestras se prepararon en tampón de carga (Para 5X: 20% sacarosa, 100 mM Tris-Bórico pH 8, 25 mM MgCl₂, 0.1% azul de bromofenol). Los geles se corrieron en tampón TB 0.5X suplementado con 5 mM MgCl₂ y 50 μM ZnCl₂ con un pH de 8.5.

La visualización de los geles se llevó a cabo en un escáner de fluorescencia (Typhoon 9400, Amersham) a 500-600V utilizando los filtros de emisión 520 BP y 526 SP.

2.8.4. *Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida.* Para medir la expansión de repeticiones durante la clonación del transgén CTG(60) se llevó a cabo una electroforesis de ADN en poliacrilamida siguiendo el siguiente procedimiento:

Para 15mL (2 geles):

- ✓ 6.3 g Urea
- ✓ 1.5 mL TBE 10X
- 9. 8% Acrilamida (19 acril:1 bis-acril)
- 10. Completar con H₂O hasta 15 mL
- 11. Agitar hasta que la urea esté disuelta
- 12. 75 μL de amonio persulfato 10%
- 13. 15 μL TEMED

2.8.5. *Electroforesis horizontal no desnaturizante de proteínas en geles de agarosa.* El punto isoeléctrico (pI) de MblZF es 9.5. El pH del tampón de electroforesis utilizado en nuestros ensayos de retardo en gel era de 8.5, lo que significa que la carga total de MblZF en el gel es positiva. Los geles de retardo son geles no desnaturizantes, por lo que no hay SDS presente en el medio que confiera carga negativa a la molécula para que ésta migre hacia el polo positivo. Decidimos comprobar que FAM-(CUG)₂₃ podía movilizar a MblZF corriendo el complejo en un gel horizontal de agarosa al 2.5% con los pocillos colocados en medio y tiñendolo con Coomassie (Fig. MM5). En este experimento la proteína MblZF migró hacia el polo negativo, en dirección contraria al marcador de peso molecular de proteínas, incluso si la electroforesis se llevaba a cabo a un pH de 10.5, superior al pI de MblZF.

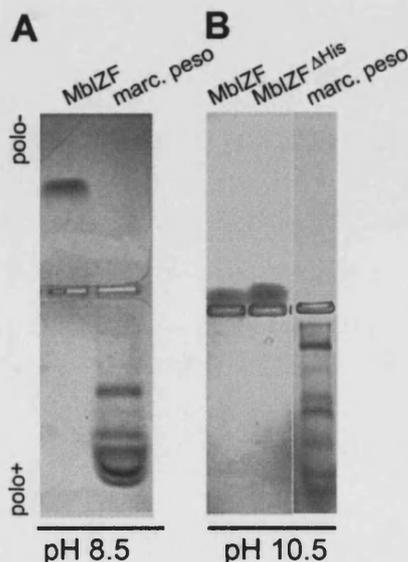


Figura MM5. Gel horizontal de proteínas en agarosa. (A) En las condiciones de electroforesis utilizadas (no desnaturizantes) la proteína MblZF migraba hacia el polo negativo. Si subíamos el pH del tampón de electroforesis un punto por encima del pI de MblZF la proteína seguía migrando hacia el polo negativo (B). La proteína MblZF^{ΔHis} tampoco entraba en el gel (B).

II. Experimentos en *Drosophila melanogaster*

1. Materiales

1.1. Cepas de *Drosophila melanogaster*

Las siguientes líneas de mosca fueron utilizadas a lo largo de este trabajo. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 25°C en medio nutritivo estándar (ver receta en apartado 2.8) a no ser que se especifique lo contrario.

1.1.1. Cepas de referencia

Genotipo

OrR

y¹w¹¹¹⁸

w¹¹¹⁸

1.1.2. Cepas balanceadoras

Genotipo

w; TM3/TM6b

w; lf/CyO, ftz-lacZ; MKRS/TM6b

Origen

Bloomington Stock Center

Bloomington Stock Center

1.1.3. Cepas mutantes

Genotipo

w; mb^{E27}/CyO

Origen

Mantenidas en nuestro laboratorio, en origen generadas por el Dr. Mlodzik (Begemann *et al.*, 1997)

1.1.4. Líneas UAS

Genotipo

yw; +; UAS-CTG₄₈₀

yw; +; UAS-CTG₆₀

w; UAS-MBNL1

w; UAS-GFP

w; UAS-LacZ

w; UAS-luciferasa

yw; UAS-p88 (C1)

yw; UAS-p88 (C2)

yw; UAS-p88 (C3)

Origen

Generadas en nuestro laboratorio (Garcia-Lopez *et al.*, 2008)

Generadas en nuestro laboratorio (Garcia-Lopez *et al.*, 2008)

Generadas en nuestro laboratorio (Garcia-Casado *et al.*, 2002)

Bloomington Stock Center

Bloomington Stock Center

Generadas por Valentia Biopharma

Generadas durante este trabajo

Generadas durante este trabajo

Generadas durante este trabajo

1.1.5. Líneas Gal4

Genotipo

Expresión en el SNC

OK107-Gal4

201-Gal4

c739-Gal4

H24-Gal4

Origen

Bloomington Stock Center

Bloomington Stock Center (Connolly *et al.*, 1996)

Bloomington Stock Center

Dr. Jean-Maurice Dura (Institut de Genetique Humaine, Montpellier, Francia)

238Y-Gal4, 045Y-Gal4 y 103Y-Gal4	Dr. J.D. Armstrong (Institute of Biomedical and Life Sciences, Universidad de Glasgow, Reino Unido) (Connolly <i>et al.</i> , 1996; Tettamanti <i>et al.</i> , 1997)
Cha-Gal4	Bloomington Stock Center
Ddc-Gal4	Dra. Mel Feany (H. Li <i>et al.</i> , 2000)
<i>Expresión en ojo</i>	
sev-Gal4	Dr. Marek Mlodzik (Mount Sinai School of Medicine, NY, EEUU)
GMR-Gal4	Dr. Alberto Ferrús (Instituto Cajal, Madrid, España)
<i>Expresión en músculo</i>	
Mhc-Gal4 (cr.2)	Dr. G. Davis (University of California San Francisco, California, EEUU)
UAS-GFP;Mhc-Gal4 (cr.3)	Dr. Eric Olson (University of Texas Southwestern Medical Center, Texas, EEUU)

1.1.6. Líneas recombinantes

Genotipo	Origen
238Y-Gal4 UAS-GFP/CyO	Generadas durante este trabajo
sevGal4 UAS-CTG ₄₈₀ /TM3	Generadas en nuestro laboratorio (Garcia-Lopez <i>et al.</i> , 2008)
GMR-Gal4 UAS-CTG ₄₈₀ /CyO	Generadas durante este trabajo
Mhc-Gal4 UAS-CTG ₄₈₀ /TM6b	Generadas durante este trabajo

1.2. Cebadores II

Los siguientes cebadores se utilizaron para llevar a cabo las reacciones de PCR relacionadas con los experimentos en *Drosophila* descritos en este apartado:

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Tm
SV40 directo	GGAAAGTCCTTGGGGTCTTC	60
SV40 reverso	GGAAGTGAATGGGAGCA	60
Rp49 directo	ATGACCATCCGCCAGCATAAC	55
Rp49 reverso	ATGTGGCGGGTGCCTTGTTTC	55

1.3. Quimiotecas

Quimioteca Prestwick (Prestwick Chemical Library)

Quimioteca combinatoria de hexapéptidos de Driverdrugs

1.4. Kits

Luciferase Assay System de Promega

Genopure Plasmid Midi Kit de Roche

2. Métodos

2.1. Destrucción química de los MB

2.1.1. *Administración de Hidroxiurea.* Se recogieron embriones de genotipo *yw/103Y-Gal4; +; UAS-CTG₄₈₀/+ y yw/Y; +; UAS-CTG₄₈₀/+* (control) en intervalos de 1 hora a 25°C en placas de agar de 5 cm. Pasadas 23 horas las larvas de primer estadio (L1) recién eclosionadas fueron colocadas en un tubo eppendorf con 200 µl de comida conteniendo Hidroxiurea (Fluka) a una concentración de 50 mg/mL. Las larvas se dejaron alimentar durante 4 horas a 25°C y a continuación se transfirieron a un tubo de comida nuevo sin Hidroxiurea donde se las dejó crecer a 28°C hasta estadio adulto.

2.1.2. *Disección de cerebros de adulto.* Con el fin de visualizar el grado de ablación química de los MB se diseccionaron cerebros de moscas de genotipo *103Y-Gal4/+; UAS-GFP/+*. Para ello, dormimos los individuos a la lupa y eliminamos las alas, las patas y la probóscide con ayuda de unas pinzas de disección y microtijeras (Fine Science Tools), transferimos los individuos a un vidrio de disección donde se les dio un baño de EtOH 70% para eliminar aceites y se les pasó a un vidrio de disección nuevo con PBS 1X donde se les retiró la cápsula que recubre la cabeza (incluidos los ojos) utilizando las microtijeras. El cerebro se mantuvo pegado al cuerpo para facilitar su posterior manipulación. A continuación, los cerebros se fijaron en PFA 4% durante 30 min, seguidos de 3 lavados de 5 min en PBS 1X. Por último, los cerebros fijados se colocaron en un portaobjetos sobre un medio de montaje con un agente que preserve la fluorescencia (Dako Fluorescent Mounting Medium, Dako) y se visualizaron al microscopio confocal (Leica TCS SP2 DM-R) haciendo series en el plano Z.

2.2. Ensayos de toxicidad

2.2.1. *Toxicidad del DMSO en medio nutritivo instantáneo.* Se ensayaron distintas concentraciones de DMSO (Calbiochem) presente en 1 mL de comida Instant *Drosophila* Medium (Sigma) en tubos de 1 cm de diámetro y 5 cm de largo a 28°C. En un primer ensayo probamos cantidades de 0, 0.1, 0.25, 0.9 y 2.25% de DMSO. En un segundo experimento ensayamos 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 y 0.5%. En todos los casos se realizaron un total de 3-5 réplicas. El número inicial de individuos por réplica fue de 10 larvas L1 macho de genotipo *yw/Y; +; UAS-CTG₄₈₀/+*. El grado de toxicidad se evaluó contando el número de individuos adultos nacidos.

2.2.2. *Toxicidad del DMSO en medio nutritivo casero.* Las siguientes concentraciones de DMSO se ensayaron en 5 mL de comida estándar (ver receta en apartado 2.8.) a 25°C: 0.025, 0.05, 0.75, 0.1, 0.125, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 y 1%. En todos los casos se

realizaron un total de 3 réplicas, con 50 individuos de genotipo *OrR* por réplica. El experimento se llevó a cabo partiendo tanto de embriones como de larvas L1 sin distinción por sexo. El grado de toxicidad se evaluó contando el número de individuos adultos nacidos.

2.2.3. *Toxicidad de p88 en medio nutritivo casero.* Las siguientes concentraciones de p88 se ensayaron en 5 mL de comida estándar a 25°C: 67.5 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM y 1 mM. En todos los casos se realizaron un total de 3 réplicas, partiendo de 50 larvas L1 de genotipo *OrR* por réplica. La toxicidad de p88 se evaluó contando el número de individuos que llegaban a pupa y adulto.

2.3. Rastreo de quimiotecas

2.3.1 *Quimioteca Prestwick.* Se ensayaron 480 compuestos pertenecientes a la quimioteca Prestwick (www.prestwickchemical.com) cedida por el Dr. Enrique Pérez Payá (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, España). Los compuestos fueron administrados en 1 mL de comida Instant *Drosophila* Medium (Sigma) a una concentración final de 5 µM y 0.1% de DMSO. En cada tubo se colocó un total de 30 larvas L1: 10 machos y 20 hembras de genotipo *yw/Y; +; UAS-CTG₄₈₀/+* y *yw/103Y-Gal4; +; UAS-CTG₄₈₀/+*, respectivamente. Se hicieron 3 réplicas por compuesto y se mantuvo a los individuos a 28°C. Tras 8-9 días se contó el número de individuos adultos nacidos de ambos sexos y se comparó el número de hembras con el número de hembras nacidas en los tubos control sin compuesto con 0.1% de DMSO. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando una modificación del test exacto de Fisher, adaptado para casos de tamaño de muestra pequeño, en los que la prueba se aplique muchas veces, $\alpha=0.01$.

$$P = \sum_{i=1}^{a+1} P_i = \sum_{i=1}^{a+1} \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{(a+1-i)!(b-1+i)!(c-1+i)!(d+1-i)!n!}$$

donde:

	Vivas	Muertas	Total
Hembras Control	a	b	a + b
Hembras Compuesto	c	d	c + d

Los compuestos positivos detectados en el rastreo primario fueron sometidos a dos rondas más de validación, siguiendo el procedimiento descrito. Esto supone un total de 9 réplicas para las moléculas que superaron las tres rondas (3 réplicas por ronda) con una n total de 90 machos y 180 hembras.

2.3.2 *Quimioteca combinatoria de hexapéptidos.*

2.3.2.1. *Rastreo primario.* Se ensayaron 120 viales pertenecientes a una quimioteca combinatoria de hexapéptidos (www.diverdrugs.com). El rastreo primario se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.3.1. En este caso los compuestos fueron administrados a una concentración de 80 μM y 0.1% de DMSO.

2.3.2.2. *Deconvolución.* La deconvolución a partir de los viales positivos llevó a la síntesis de 16 hexapéptidos definidos por la empresa DiverDrugs SL (www.diverdrugs.com). Éstos se resuspendieron en agua con cantidades diferentes de DMSO en función de la solubilidad de cada uno de ellos. Los stocks de aquéllos hexapéptidos que contenían cisteínas fueron mantenidos en una atmosfera de nitrógeno con el fin de evitar su oxidación. Los 16 compuestos fueron ensayados de manera similar al rastreo primario (ver apartado 2.3.2.1). Éstos se administraron a una concentración de 80 μM en todos los casos en los que la concentración final de DMSO lo permitía. Para el resto se usó la concentración máxima posible, tal y como se detalla a continuación:

Nombre	Secuencia	Concentración	Nombre	Secuencia	Concentración
p79	Ac-cpyaqe-NH2	80 μM	p87	Ac-ppyaqe-NH2	80 μM
p80	Ac-cpyawe-NH2	80 μM	p88	Ac-ppyawe-NH2	80 μM
p81	Ac-cpytqe-NH2	80 μM	p89	Ac-ppytqe-NH2	80 μM
p82	Ac-cpytwe-NH2	62 μM	p90	Ac-ppytwe-NH2	80 μM
p83	Ac-cqyaqe-NH2	25 μM	p91	Ac-pqyaqe-NH2	80 μM
p84	Ac-cqyawe-NH2	25 μM	p92	Ac-pqyawe-NH2	40 μM
p85	Ac-cqytqe-NH2	80 μM	p93	Ac-pqytqe-NH2	40 μM
p86	Ac-cqytwe-NH2	57 μM	p94	Ac-pqytwe-NH2	38.5 μM

2.3.2.3. *Rastreo de alaninas.* Los hexapéptidos del rastreo de Alaninas fueron sintetizados por el laboratorio del Dr. Enrique Pérez Payá. Éstos se administraron en la comida tal y como se ha descrito en el apartado 2.3.1. Cada uno de los péptidos se ensayó en 0.1% de DMSO a la siguiente concentración:

Nombre	Secuencia	Concentración
p29.1	Ac-ppyawa-NH2	105 μM
p29.2	Ac-ppyaae-NH2	225 μM
p29.3	Ac-ppaawe-NH2	169 μM
p29.4	Ac-payawe-NH2	115 μM
p29.5	Ac-apyawe-NH2	239 μM

2.4. Cuantificación del efecto de los compuestos sobre la expresión de transgenes

2.4.1. *Cuantificación de la actividad β -Galactosidasa.* Partimos de moscas de genotipo 103Y-Gal4/+; UAS-lacZ/+ que habían comido compuesto (5 μM) en Instant *Drosophila* Medium

(Sigma) o no (control con 0.1% DMSO). Para cada compuesto se llevaron a cabo un total de 4 réplicas (2 para machos y 2 para hembras) en cada una de las cuales se homogenizaron 3 moscas en 100 μL de tampón de homogenización (tampón fosfato 50 mM pH 7.5, MgCl_2 1 mM). A cada homogenado se le añadieron 900 μL de tampón de homogenización y se agitó por vórtex 1 min seguido de un *spin*. 100 μL de la mezcla se diluyeron de nuevo en 400 μL de tampón de homogenización. De cada uno de los homogenados resultantes se añadió 1 μL a 500 μL de rojo de clorofenol β -D-galactopiranosido 1 mM (CPRG, Sigma) en cubetas de espectrofotómetro (Spectronics Genesys 5, Milton Roy) y se midió la absorbancia a 574 nm a tiempo 0, 60, 120 y 180 min. Las muestras se mantuvieron a 37°C entre las medidas.

Por otra parte, de cada extracto se tomaron 50 μL para cuantificar la cantidad de proteína total usando el Coomassie® Protein Assay Reagent (Pierce; rango de trabajo 1-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los valores de proteína total obtenidos se utilizaron para normalizar las medidas colorimétricas con CPRG. Las pendientes de las rectas normalizadas resultantes se compararon entre sí mediante un test de hipótesis sobre igualdad de pendientes de regresión ($\alpha=0.01$).

$$F_{\text{exp}} = \frac{\frac{S_2 - S_1}{k-1}}{\frac{S_1}{n-2k}}$$

donde S representa la suma de residuos al cuadrado para cada recta a comparar, k el número de pendientes y n el número de datos por recta. F_{exp} se distribuye según una variable F con grados de libertad $\nu_1 = k-1$ y $\nu_2 = n-2k$. Para comparar los valores de proteína total se aplicó el test t-student de una cola ($\alpha=0.05$).

2.4.2. Cuantificación de la cantidad de luciferasa. Partimos de moscas de genotipo *Mhc-Gal4/+; UAS-luciferasa/+* que habían comido p88 (250 μM) o no (control con 0.12% de DMSO y sin DMSO). Para cada condición se hicieron un total de 6 réplicas (3 para machos y 3 para hembras) en cada una de las cuales se homogenizaron 3 moscas en 100 μL de tampón 1X del kit Luciferase Assay System (Promega). De cada homogenado 50 μL fueron transferidos a placas blancas de 96 pocillos (Nunc), donde se añadieron 10 μL de reactivo de luciferasa por pocillo. Las medidas se llevaron a cabo utilizando un lector de placa Victor Wallac 1420 Multilabel Counter (Pelkin Elmer Lifesciences).

Por otra parte, de cada extracto se tomó 1 μL para cuantificar la cantidad de proteína total de manera similar al apartado 2.4.1., con el fin de normalizar los resultados. Una vez normalizados, los valores de luminiscencia obtenidos se compararon entre sí aplicando el test t-student de dos colas. $\alpha=0.05$.

2.4.3. Cuantificación de los niveles de transcritos (CUG)480 mediante RT-PCR.

2.4.3.1. Extracción de ARN total. Se homogeneizaron un total de hasta 50 moscas por genotipo y compuesto en 1 mL de TriReagent (Sigma). Los homogenizados se dejaron 5 min a temperatura ambiente antes de añadir 200 μ L de cloroformo a cada tubo. La mezcla se agitó y se dejó 5 min a temperatura ambiente. A continuación los tubos se centrifugaron durante 15 min a 12000 g y 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo donde se añadieron 500 μ L de isopropanol. Tras 10 min a temperatura ambiente se centrifugó de nuevo durante 10 min. El sobrenadante se eliminó y el pellet se lavó con 1 mL de EtOH al 75%. Tras una nueva centrifugación de 5 min a 7500 g y 4°C se eliminó el sobrenadante y el pellet se dejó secar al aire. Una vez seco, éste se resuspendió en agua libre de RNAsas previamente calentada a 60°C. En los casos en los que el ARN mostraba dificultad para ser resuspendido, los tubos se incubaron durante 5-10 min a 60°C. La cantidad de ARN obtenido se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Eppendor BioPhotometer). Todos los ARNs se diluyeron a una concentración final de 0.5 μ g/ μ L y se almacenaron a -80°C.

2.4.3.2. Tratamiento con DNasa I y retrotranscripción. El ADN genómico presente en las extracciones se eliminó mediante digestión de 2 μ g de ARN con DNasa I (Invitrogen), en un volumen de 10 μ L (4 μ L ARN 0.5 μ g/ μ L, 1 μ L tampón 10X, 1 μ L DNasa I y 4 μ L H₂O). La digestión se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 15 min. La DNasa I se inactivó por adición de 1 μ L de EDTA 25 mM seguido de 10 min a 65°C.

Como molde para la síntesis de cDNA se añadieron 5 μ L de la digestión con DNasa I (aproximadamente 1 μ g de ARN) al Mix 1 (1 μ L dNTPs 10 mM, 1 μ L Hexámeros (Roche), 5 μ L ARN y 5 μ L H₂O). Tras un primer paso de 5 min a 65°C para desnaturalizar el ARN, los tubos se colocaron inmediatamente en hielo y se añadieron 7 μ L del Mix 2 (4 μ L tampón 5X, 2 μ L DTT 0.1 M, 1 μ L Inhibidor RNasa (Invitrogen)) a cada uno. Por último, se añadió 1 μ L del enzima retrotranscriptasa SuperScript™ II (2U; Invitrogen). Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción la mezcla se calentó a 25°C durante 3 min en un termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems), seguido de 1 h a 42°C y 14 min a 70°C.

Como controles se llevaron a cabo las mismas reacciones bien sin enzima RT en la mezcla de reacción o sin ARN molde. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C.

2.4.3.3. Amplificación por PCR de SV40. El cDNA obtenido en el apartado 2.4.3.2. se usó como molde para la cuantificación de los niveles de expresión de (CUG)480. Éstos se detectaron amplificando una región del terminador del virus SV40 presente en los transcritos. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando los siguientes componentes: 10 μ L de cDNA (dilución 1:25), 0.5 μ L de dNTPs (25 mM), 2 μ L de tampón 10X, 0.5 μ L de cebador SVR40 directo (20 μ M), 0.5 μ L de cebador SV40 reverso (20 μ M), 0.5 μ L de polimerasa Netzyme (NEED) y 6 μ L de H₂O.

Las condiciones de amplificación fueron: un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30-35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 60°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 minuto, y finalmente, un periodo de elongación de 7 min a 72°C.

Como control de carga se midieron los niveles de los transcritos del gen *Rp49* de *Drosophila*. En este caso se usó como molde 1 µL de una dilución 1:100 del cDNA. La reacción de PCR se llevó a cabo de manera similar, con una temperatura de hibridación de 65°C y 29 ciclos de amplificación.

Los amplificadores se resolvieron en geles de agarosa al 2%. La cuantificación de las bandas se llevó a cabo utilizando los programas de análisis de imagen Photoshop o Image J. Las diferencias entre grupos se analizaron usando un test t-student de dos colas y $\alpha=0.05$.

2.5. Análisis de la morfología de los ojos

2.5.1. Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido. Se fijaron moscas del genotipo de interés en una solución que contenía una mezcla de paraformaldehído 4% (800 µL), glutaraldehído 8% (625 µL) y PBS 1X (575 µL) durante 2 h a temperatura ambiente en agitación. A las muestras se les añadió unas gotas de TritonX-100 para reducir la tensión superficial y facilitar que los individuos se hundiesen en la solución fijadora. A continuación, las muestras se deshidrataron mediante pases de 12 h en una serie de alcoholes al 25%, 50%, 75% y 100% a temperatura ambiente en agitación. Una vez deshidratadas, las muestras se sometieron a punto crítico con el fin de que todas las moléculas en estado líquido pasasen a estado gaseoso, evitando así que los ojos se deformasen cuando fuesen sometidos a alto vacío. Las muestras fueron sombreadas con oro-paladio y, finalmente, observadas al microscopio (microscopio ambiental de barrido Philips mod. XL-30) para analizar el grado de rugosidad de los ojos. Todas las imágenes se tomaron a 200 aumentos y un voltaje de 5V.

2.5.2. Análisis bajo la lupa y cuantificación del tamaño del ojo. El tamaño de los ojos se midió sobre imágenes tomadas a la lupa (Leica MZ APO) con un aumento de 60X y en las que se cuantificó la longitud del ojo en los ejes dorsoventral y anteroposterior con el programa de procesamiento de imágenes IM500 de Leica. Las medidas se compararon entre sí mediante el test t-student de dos colas y $\alpha=0.05$.

2.6. Análisis histológico de secciones semifinas de ojo y músculo

La morfología interna tanto de la retina como de los músculos indirectos del vuelo se analizó mediante la observación al microscopio de cortes semifinos de ojo y tórax, respectivamente. Para su preparación, las moscas se anestesiaron a la lupa y se les realizó un corte con bisturí en un ojo (cortes de retina) o bien se les eliminaron las patas, alas, cabeza y parte del abdomen (cortes de músculo) con el fin de facilitar la penetración del fijador en ambos casos. Durante este proceso, las moscas fueron colocándose en un tubo con 200 µL de la solución 1 (¼ paraformaldehído 4%, ¼ glutaraldehído 8%, ¼ Na₂HPO₄ 0.2 M y ¼ NaH₂PO₄ 0.2 M) en hielo. A continuación, se añadieron 200 µL de la solución 2 (mezcla 1:1 solución 1 y tetraóxido de osmio, Polysciencias Inc.) y la mezcla se incubó 30 min en hielo. Seguidamente se eliminó todo el líquido y se añadieron 200 µL de la solución 2 durante 1-2 horas en hielo. Las muestras se deshidrataron mediante pases de 5 min en EtOH al 30%, 50% y 70% en hielo, y al 90% y 100% (2X) a temperatura ambiente. A continuación, se llevaron a cabo dos pases de 10 min en óxido de propileno (Fluka). Por último, las muestras se dejaron toda la noche en una mezcla 1:1 de óxido de propileno y resina epoxi. Al día siguiente, el líquido se sustituyó por resina epoxi pura, y ésta se dejó penetrar en las muestras durante al menos 4 h. Pasado este tiempo, las moscas fueron colocadas y orientadas en moldes con resina y las muestras se dejaron polimerizar toda la noche en un horno Pasteur a 70°C. Tanto el tetraóxido de osmio como el óxido de propileno y la resina son extremadamente tóxicos por lo que se manipularon en campana de extracción de flujo en todo momento.

Una vez polimerizada la resina, los bloques fueron tallados para dar a las muestras la orientación adecuada. Las muestras fueron cortadas con una cuchilla de diamante en secciones de 1 micra (ojo) ó 1.5 micras (músculo) en un ultramicrotomo REICHERT & JUNG modelo ULTRACUT E. Las secciones se colocaron en portas gelatinizados con una gota de medio de montaje DPX (Fluka) y se cubrieron con un cubreobjetos para su posterior observación al microscopio óptico. Las imágenes de músculo se tomaron a un aumento de 10X en campo claro. Las imágenes de ojo se tomaron a 63X en campo oscuro.

2.7. Generación de moscas transgénicas UAS-p88

2.7.1. Clonación de p88 en pUAST

Las siguientes secuencias de ADN fueron diseñadas en nuestro laboratorio y sintetizadas por la empresa Metabion (escala de síntesis 0.04 µmol, purificación por HPLC).

Construcción p88C1_directo (5' → 3')

AATTCAAACACACCAAATCTTACAAAATGGGCGGCGGCCCCCCCTACGCCTGGGAGTAATAATAAT

Construcción p88C1_reverso (5' → 3')

GTTTGTGTGGTTTAGAATGTTTTACCCGCCGCCGGGGGGGATGCGGACCCTCATTATTATTAGATC

Construcción p88C2_directo (5' → 3')

AATTCAAACACACCAAATCTTACAAAATGGGCGGCGGCGAGTGGGCCTACCCCCCTAATAATAAT

Construcción p88C2_reverso (5' → 3')

GTTTGTGTGGTTTAGAATGTTTTACCCGCCGCCGCTCACCCGGATGGGGGGATTATTATTAGATC

Construcción p88C3_directo (5' → 3')

AATTCAAACACACCAAATCTTACAAAATGGGCGGCCCCCTACGCCTGGGAGGGCGGCATGGGCGGCGA
GTGGGCCTACCCCCCTAATAATAAT

Construcción p88C3_reverso (5' → 3')

CTAGATTATTATTAGGGGGGTAGGCCACTCGCCGCCCATGCCGCCCTCCAGGCCGTAGGGGGGGCCGC
CCATTTGTAAAGATTTGGTGTGTTTG

En azul se muestra la secuencia diseñada para codificar los péptidos basados en p88, según el sesgo en el uso de codones de *Drosophila*. En naranja y verde se muestran los adaptadores para los enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI* respectivamente, necesarios para su clonación en el vector pUAST. El color rojo corresponde a codones de parada, y en negro se representan los 21 nucleótidos de la 5'UTR del gen *act5C* añadidos.

Los pares directo y reverso de las secuencias C1, C2 y C3 fueron hibridados mezclando 5 µL de la secuencia directa (100 µM), 5 µL de la secuencia reversa (100 µM), 20 µL tampón de hibridación 5X y 70 µL de H₂O. La mezcla se calentó a 95°C durante 5 min y se dejó enfriar lentamente toda la noche hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Las secuencias hibridadas se fosforilaron utilizando el enzima Polinucleótido Kinasa tal y como se ha descrito en el apartado 2.1.1.2. A continuación, las muestras se purificaron precipitando con fenol:cloroformo (ver apartado 2.1.1.1.) y cada una de las parejas se ligó con el vector pUAST (Brand y Perrimon, 1993; Fig. MM6) previamente digerido con *EcoRI* y *XbaI* y desfosforilado, siguiendo el protocolo descrito para ligación entre extremos cohesivos (apartado 2.1.1.2.).

2.7.2. Microinyección y generación de stocks

Las construcciones pUAST-p88C1, pUAST-p88C2 y pUAST-p88C2 se amplificaron en *E. coli* utilizando el kit Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) y se enviaron a la empresa BestGene (www.thebestgene.com) para su microinyección en embriones de *Drosophila*. De los 200 embriones microinyectados, BestGene generó 10 líneas de moscas transformantes para cada construcción. Dichas líneas se hicieron homocigotas mediante cruces entre hermanos de ojos rojos.

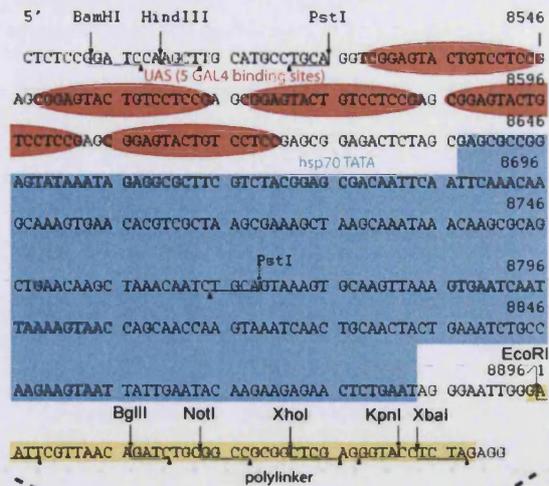
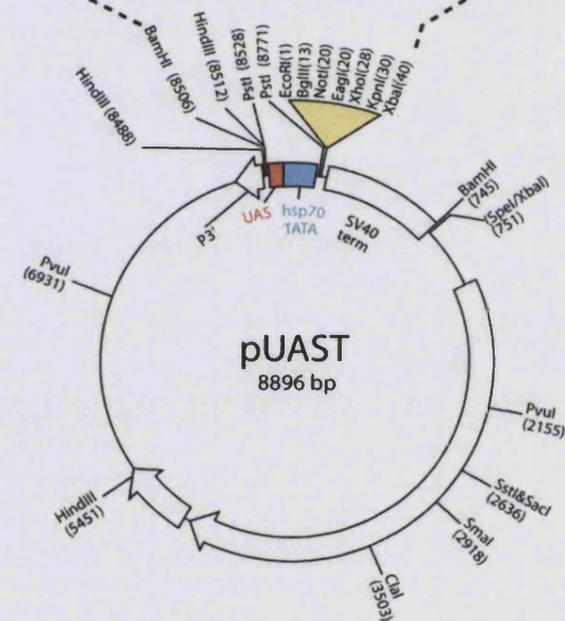


Figura MM6. Vector pUAST. La imagen muestra el sitio de clonación múltiple (MCS). Este vector contiene 5 sitios de unión a Gal4, así como la caja TATA de la hsp70 aguas arriba del MCS. Aguas de abajo del MCS contiene la secuencia terminadora del virus SV40.



2.8. Preparación de medio de cultivo estándar de *Drosophila melanogaster*

Para preparar 80 tubos/40 botellas se mezclan los siguientes ingredientes:

- ✓ H₂O 1L
 - ✓ Agar 10.5 g
 - ✓ Levadura 60 g
 - ✓ Harina de soja 10 g
 - ✓ Harina de maíz 60 g
 - ✓ Azúcar 50 g
 - ✓ Extracto de malta 80 g
- Antifúngico:
- ✓ Ác. Propiónico 5 mL
 - ✓ Etanol 10 mL

- ✓ Nipagín 3 g

Preparación:

- ✓ Disolver el agar con la mitad de agua hasta que hierva
- ✓ Disolver el resto de componentes, excepto el antihongos, con el resto de agua y añadir al agar hirviendo
- ✓ Remover la mezcla hasta que espese y retirar del fuego
- ✓ Espera 5 min y añadir el antihongos antes de dosificar

III. Experimentos en ratón

Todos los experimentos de este estudio se han llevado a cabo conforme a las directrices europeas sobre experimentación animal (Directiva del Consejo Europeo 2003/65/CE) y han sido aprobados por el Comité de Ética de Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia.

1. Materiales

1.1. Cepas de ratón

Las siguientes cepas de ratón fueron utilizadas a lo largo de este trabajo. El mantenimiento de los animales fue llevado a cabo por el animalario de la Universidad de Valencia.

Cepa	Descripción	Origen
FVB	Genotipo de referencia	Harlan (www.harlan.com)
HSA ^{SR}	Transgénicos que expresan 5 repeticiones CTG bajo el control del promotor de la <i>actina humana</i>	Dr. Thornton (University of Rochester, NY, EEUU) (Mankodi <i>et al.</i> , 2000)
HSA ^{LR}	Transgénicos que expresan 250 repeticiones CTG bajo el control del promotor de la <i>actina humana</i>	Dr. Thornton (University of Rochester, NY, EEUU) (Mankodi <i>et al.</i> , 2000)

1.2. Cebadores III

Los siguientes cebadores se utilizaron para llevar a cabo las PCRs relacionadas con los experimentos *en ratón* descritos en este apartado:

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tm
Serca1 E21	GCTCATGGTCCTCAAGATCTCAC	55
Serca1 E23	GGGTCAGTGCCTCAGCTTTG	55
Tnnt3_dir	TGTCAATGAGGGCTTGGAG	55
Tnnt3_rev	TTCACATCGCCAGCATCTGTGC	55

Cebadores descritos en Kanadia *et al.*, 2006.

2. Métodos

2.1. Anestesia e Inyección de compuestos

Todos los animales, de aproximadamente 20 g de peso, fueron sometidos a anestesia gaseosa con una mezcla de isofluorano y O₂:N₂O (40:60) antes de y durante la inyección. La inyección fue llevada a cabo por la Dra. Beatriz Llamusi (miembro de nuestro laboratorio, con experiencia en experimentación con roedores) de manera intramuscular sobre el músculo tibial anterior (TA) de las patas posteriores derecha e izquierda en todos los animales, utilizando agujas biseladas de 29 gauges e inyectando un volumen de 10 µL.

2.2. Eutanasia

Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical por la Dra. Beatriz Llamusi.

2.3. Ensayos de toxicidad de p88 en ratones salvajes

Los ensayos de toxicidad de p88 se llevaron a cabo utilizando ratones *FVB* de 5 semanas de edad. A estos animales se les inyectaron las siguientes dosis de péptido:

p88	Número de animales
0.5 µg (~0.025 mg/Kg)	3 hembras y 3 machos
1 µg (~0.05 mg/Kg)	3 hembras y 3 machos
10 µg (~0.5 mg/Kg)	3 hembras y 3 machos
100 µg (~5 mg/Kg)	3 hembras y 3 machos
DMSO (controles)	Número de animales
0.2%	3 hembras y 3 machos
2%	3 hembras y 3 machos
Total de animales	36

Pasadas 4 semanas tras la inyección, los animales fueron sacrificados y la veterinaria del animalario de la Universidad de Valencia (Dña. Inmaculada Noguera) realizó una autopsia visual.

2.3.1. Análisis histomorfológico del músculo. Los músculos TA de las extremidades posterior derecha e izquierda fueron diseccionados y fijados en formol. El análisis histopatológico se llevó a cabo por el Laboratorio del Dr. Juan Bta. Montoro Soriano, S.L.U, Valencia.

2.3.2. Análisis de sangre. Para llevar a cabo estos análisis la veterinaria del animalario de la Universidad de Valencia (Dña. Inmaculada Noguera) realizó un sangrado total por

punción intracardiaca de los animales inmediatamente después de ser éstos sacrificados. La sangre se pasó a tubos eppendorf no heparinizados y éstos se centrifugaron a 1000 g durante 10 min con el fin de precipitar las células. El plasma se pasó a tubos nuevos y se almacenó a 4°C hasta su recogida por el Laboratorio del Dr. Juan Bta. Montoro Soriano, S.L.U, Valencia.

2.4. Ensayo del efecto de p88 en ratones HSA^{LR}

Estos ensayos se llevaron a cabo sobre ratones FVB, HSA^{SR} y HSA^{LR} de 5 semanas de edad. A estos animales se les inyectaron las siguientes dosis de p88 (pata derecha) y DMSO (pata izquierda o ambas patas⁽¹⁾):

p88	Número de animales		
	FVB	HSA ^{SR}	HSA ^{LR}
1 µg (~0.05 mg/Kg)	5	5	5
100 µg (~0.5 mg/Kg)	5	5	5
DMSO (sólo HSA ^{LR}) ⁽¹⁾			
	Número de animales		
0.2%	5		
2%	5		
Total de animales	40		

2.4.1. Análisis del splicing alternativo de los transcritos Serca1 y Tnnt3 mediante RT-PCR semicuantitativa

2.4.1.1. Extracción de ARN de músculo y obtención de cDNA. La disección del músculo TA de las patas derecha e izquierda se llevó a cabo a 4°C inmediatamente después de sacrificar a cada animal. La mitad de cada uno de ellos (aprox. 40 mg) se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C. Posteriormente, estos músculos fueron utilizados para llevar a cabo extracción de ARN tal y como se describe en el apartado 2.4.3.1. añadiendo 3 µg de Glicógeno (GlycoBlue™ de Ambion) al paso de precipitación con isopropanol. La reacción de retrotranscripción se realizó de manera similar al apartado 2.4.3.1.

2.4.1.2. Amplificación por PCR. La detección de transcritos Serca1 y Tnnt3 se llevó a cabo tal y como se describe en el artículo de Kanadia *et al.*, 2006. Brevemente, 2 µL del cDNA obtenido en el apartado anterior se usaron como molde para la reacción de PCR con 0.3 µL del enzima polimerasa AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystems), a los que se le añadieron 5 µL tampón 10X, 5 µL de MgCl₂ 25 mM, 2.5 µL de dNTP 4 mM, 1 µL de cebador Serca1 E21 (o Tnnt3_dir) 20 µM, 1 µL de cebador Serca1 E22 (o Tnnt3_rev) 20 µM y H₂O hasta completar 50 µL.

Las condiciones de amplificación fueron: un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 sec, hibridación a 55°C durante 30 sec y extensión a 72°C durante 30 sec, y finalmente, un periodo de elongación de 7 min a 72°C.

Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 2%.

2.4.2. Estudio del efecto de p88 a nivel histológico. La otra mitad de cada músculo se colocó en moldes de criostato, se sumergió en OCT y se almacenó a -80°C hasta ser procesada en secciones de 10 µm en un criostato Leica CM 1510S. Las secciones se colocaron en portaobjetos gelatinizados y se teñieron con hematoxilina de Mayer (Panreac) durante 10-15 min. Tras un lavado en agua de 5 min, las secciones se tñieron con eosina (1% peso/vol en H₂O, Panreac) durante 5 min, seguido de un nuevo lavado en agua de 5 min. Los tejidos se deshidrataron en baños de alcohol al 70%, 96% y 100% durante 5 min, seguidos de un baño de Xilol de 10-15 min. Por último, a cada porta se le añadió una gota de medio de montaje DPX y se cubrió con un cubreobjetos.

Apéndice 1

El sistema GAL4/UAS de expresión de transgenes en *Drosophila* permite dirigir la expresión de una proteína de interés bajo un patrón de expresión deseado (Brand y Perrimon, 1993). Este sistema hace uso del factor de transcripción de levadura GAL4 y de su unión a las secuencias reguladoras llamadas UAS de manera que, por un lado, se genera una línea de moscas transgénicas que contenga en su genoma una construcción donde la región codificante de la proteína GAL4 esté bajo el control de las regiones reguladoras de interés (*Enhancer Z*; ver Fig. A1). Por otro lado, se genera otra línea de moscas que contenga en su genoma una construcción donde la región codificante del gen de interés (gen X) quede bajo el control de las secuencias reguladoras de la transcripción UAS. Al cruzar estas dos líneas de moscas se obtienen descendientes que contienen ambas construcciones (GAL4 y UAS) de manera que, el enhancer Z dirigirá la expresión de la proteína GAL4 según su propio patrón y esta proteína GAL4 se unirá a las secuencias reguladoras UAS que dirigirán a su vez la expresión del gen X. De esta forma, lo que finalmente se consigue es que el gen X se exprese bajo el control del enhancer Z. Debido a la naturaleza binaria del sistema (línea UAS y línea GAL) la expresión de un mismo gen de interés puede ser dirigida a distintos tejidos.

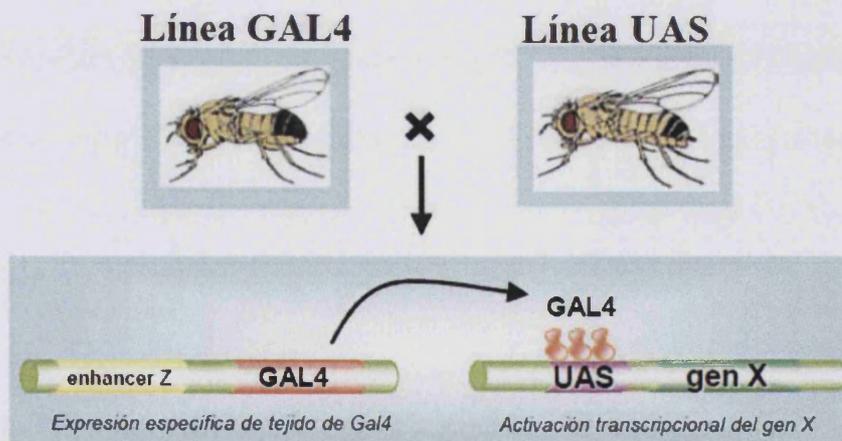


Figura A1. Sistema de expresión dirigida GAL4/UAS. La línea GAL4 expresa constitutivamente la proteína GAL4 bajo el patrón de expresión de la región reguladora elegida (*Enhancer Z*). La línea UAS solo expresará el gen X cuando exista proteína GAL4 en la célula y esto solo ocurrirá en la descendencia resultante del cruce entre ambas líneas de moscas.

Apéndice 2

La siguiente tabla muestra el código de aminoácidos, tanto en formato de tres letras como de una letra. A lo largo de este trabajo, al utilizar el código de una letra, se hace referencia en mayúsculas a los aminoácidos en su conformación levógira (L), mientras que los aminoácidos en conformación dextrógira (D) se representan en minúscula.

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Bibliografía

Bibliografía

- Acevedo, S. F., Froudarakis, E. I., Kanellopoulos, A., & Skoulakis, E. M. (2007). Protection from premature habituation requires functional Mushroom Bodies in *Drosophila*. *Learn Mem*, 14, 376-384.
- Adereth, Y., Dammai, V., Kose, N., Li, R., & Hsu, T. (2005). RNA-dependent Integrin alpha3 protein localization regulated by the Muscleblind-like protein MLP1. *Nat Cell Biol*, 7, 1240-1247.
- Agrawal, N., Pallos, J., Slepko, N., Apostol, B. L., Bodai, L., Chang, L. W., et al. (2005). Identification of combinatorial drug regimens for treatment of Huntington's disease using *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 3777-3781.
- Alwazzan, M., Newman, E., Hamshere, M. G., & Brook, J. D. (1999). Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum Mol Genet*, 8, 1491-1497.
- Allen, T. G., & Burnstock, G. (1990). M1 and M2 muscarinic receptors mediate excitation and inhibition of guinea-pig intracardiac neurones in culture. *J Physiol*, 422, 463-480.
- Amack, J. D., Reagan, S. R., & Mahadevan, M. S. (2002). Mutant DMPK 3'-UTR transcripts disrupt C2C12 myogenic differentiation by compromising myoD. *J Cell Biol*, 159, 419-429.
- Arambula, J. F., Ramisetty, S. R., Baranger, A. M., & Zimmerman, S. C. (2009). A simple ligand that selectively targets CUG trinucleotide repeats and inhibits MBNL protein binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 16068-16073.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R., & Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant Huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 431, 805-810.
- Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., et al. (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, 131-143.
- Babak, T., Zhang, W., Morris, Q., Blencowe, B. J., & Hughes, T. R. (2004). Probing microRNAs with microarrays: Tissue specificity and functional inference. *RNA*, 10, 1813-1819.
- Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Perez-Alonso, M., & Mlodzik, M. (1997). Muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development*, 124, 4321-4331.
- Benitez, J., Robledo, M., Ramos, C., Ayuso, C., Astarloa, R., Garcia Yebenes, J., et al. (1995). Somatic stability in chorionic villi samples and other Huntington fetal tissues. *Hum Genet*, 96, 229-232.
- Benzer, S. (1973). Genetic dissection of behavior. *Sci Am*, 229, 24-37.
- Berul, C. I., Maguire, C. T., Gehrman, J., & Reddy, S. (2000). Progressive atrioventricular conduction block in a mouse myotonic dystrophy model. *J Interv Card Electrophysiol*, 4, 351-358.
- Blake, A. D., Anthony, N. M., Chen, H. H., Harrison, J. B., Nathanson, N. M., & Sattelle, D. B. (1993). *Drosophila* nervous system muscarinic acetylcholine receptor: Transient functional expression and localization by immunocytochemistry. *Mol Pharmacol*, 44, 716-724.
- Blondelle, S. E., Takahashi, E., Dinh, K. T., & Houghten, R. A. (1995). The antimicrobial activity of hexapeptides derived from synthetic combinatorial libraries. *J Appl Bacteriol*, 78, 39-46.
- Bonetta, L. (2009). RNA-based therapeutics: Ready for delivery? *Cell*, 136, 581-584.
- Botta, A., Caldarola, S., Vallo, L., Bonifazi, E., Fruci, D., Gullotta, F., et al. (2006). Effect of the [CCTG]_n repeat expansion on ZNF9 expression in myotonic dystrophy type II (DM2). *Biochim Biophys Acta*, 1762, 329-334.
- Botta, A., Vallo, L., Rinaldi, F., Bonifazi, E., Amati, F., Biancolella, M., et al. (2007). Gene expression analysis in myotonic dystrophy: Indications for a common molecular pathogenic pathway in DM1 and DM2. *Gene Expr*, 13, 339-351.
- Branco, J., Al-Ramahi, I., Ukani, L., Perez, A. M., Fernandez-Funez, P., Rincon-Limas, D., et al. (2008). Comparative analysis of genetic modifiers in *Drosophila* points to common and distinct mechanisms of pathogenesis among polyglutamine diseases. *Hum Mol Genet*, 17, 376-390.
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118, 401-415.
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., 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*, 68, 799-808.
- Brown, R. S. (2005). Zinc finger proteins: Getting a grip on RNA. *Curr Opin Struct Biol*, 15, 94-98.
- Buj-Bello, A., Furling, D., Tronchere, H., Laporte, J., Lerouge, T., Butler-Browne, G. S., et al. (2002). Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells. *Hum Mol Genet*, 11, 2297-2307.

- Carpenter, M. L., Oliver, A. W., & Kneale, G. G. (2001a). Analysis of DNA-protein interactions by intrinsic fluorescence. *Methods Mol Biol*, 148, 491-502.
- Carpenter, M. L., Oliver, A. W., & Kneale, G. G. (2001b). Circular dichroism for the analysis of protein-DNA interactions. *Methods Mol Biol*, 148, 503-510.
- Carter, J. N., & Steinbeck, K. S. (1985). Reduced adrenal androgens in patients with myotonic dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*, 60, 611-614.
- Cavener, D. R. (1987). Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. *Nucleic Acids Res*, 15, 1353-1361.
- Connolly, J. B., Roberts, I. J., Armstrong, J. D., Kaiser, K., Forte, M., Tully, T., et al. (1996). Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in *Drosophila* Mushroom Bodies. *Science*, 274, 2104-2107.
- Cooper, T. A. (2009). Chemical reversal of the RNA gain of function in myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 18433-18434.
- Cunningham, B. C., & Wells, J. A. (1989). High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science*, 244, 1081-1085.
- Cziko, A. M., McCann, C. T., Howlett, I. C., Barbee, S. A., Duncan, R. P., Luedemann, R., et al. (2009). Genetic modifiers of dFMR1 encode RNA granule components in *Drosophila*. *Genetics*, 182, 1051-1060.
- Chang, S., Bray, S. M., Li, Z., Zarnescu, D. C., He, C., Jin, P., et al. (2008). Identification of small molecules rescuing fragile X syndrome phenotypes in *Drosophila*. *Nat Chem Biol*, 4, 256-263.
- Charlet, B. N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. V., Grice, E. A., & Cooper, T. A. (2002). 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., et al. (2007). Length-dependent toxicity of untranslated CUG repeats on *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 352, 774-779.
- Chen, W., Wang, Y., Abe, Y., Cheney, L., Udd, B., & Li, Y. P. (2007). Haploinsufficiency for *ZNF9* in *ZNF9*^{+/-} mice is associated with multiorgan abnormalities resembling myotonic dystrophy. *J Mol Biol*, 368, 8-17.
- Cho, D. H., & Tapscott, S. J. (2007). Myotonic dystrophy: Emerging mechanisms for DM1 and DM2. *Biochim Biophys Acta*, 1772, 195-204.
- Cho, D. H., Thienes, C. P., Mahoney, S. E., Analau, E., Filippova, G. N., & Tapscott, S. J. (2005). Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF. *Mol Cell*, 20, 483-489.
- Chorev, M., & Goodman, M. (1995). Recent developments in retro peptides and proteins-an ongoing topochemical exploration. *Trends Biotechnol*, 13, 438-445.
- Dansithong, W., Wolf, C. M., Sarkar, P., Paul, S., Chiang, A., Holt, I., et al. (2008). Cytoplasmic CUG RNA foci are insufficient to elicit key DM1 features. *PLoS One*, 3, e3968.
- Datta, K., Johnson, N. P., & von Hippel, P. H. (2006). Mapping the conformation of the nucleic acid framework of the T7 RNA polymerase elongation complex in solution using low-energy CD and fluorescence spectroscopy. *J Mol Biol*, 360, 800-813.
- Daughters, R. S., Tuttle, D. L., Gao, W., Ikeda, Y., Moseley, M. L., Ebner, T. J., et al. (2009). RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8. *PLoS Genet*, 5, e1000600.
- Davis, R. L. (2005). Olfactory memory formation in *Drosophila*: From molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci*, 28, 275-302.
- de Belle, J. S., & Heisenberg, M. (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of Mushroom Bodies. *Science*, 263, 692-695.
- de Haro, M., Al-Ramahi, I., De Gouyon, B., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N. A., et al. (2006). MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet*, 15, 2138-2145.
- de Matos Silva, L. F., de Paula Ramos, E. R., Ambiel, C. R., Correia-de-Sa, P., & Alves-Do-Prado, W. (2010). Apamin reduces neuromuscular transmission by activating inhibitory muscarinic M(2) receptors on motor nerve terminals. *Eur J Pharmacol*, 626, 239-243.
- De Temmerman, N., Sermon, K., Seneca, S., De Rycke, M., Hilven, P., Lissens, W., et al. (2004). Intergenerational instability of the expanded CTG repeat in the DMPK gene: Studies in human gametes and preimplantation embryos. *Am J Hum Genet*, 75, 325-329.
- Dean, N. L., Tan, S. L., & Ao, A. (2006). Instability in the transmission of the myotonic dystrophy CTG repeat in human oocytes and preimplantation embryos. *Fertil Steril*, 86, 98-105.

- Denholt, C. L., Hansen, P. R., Pedersen, N., Poulsen, H. S., Gillings, N., & Kjaer, A. (2009). Identification of novel peptide ligands for the cancer-specific receptor mutation EFGRvIII using a mixture-based synthetic combinatorial library. *Biopolymers*, 91, 201-206.
- Desaphy, J. F., Pierno, S., De Luca, A., Didonna, P., & Camerino, D. C. (2003). Different ability of clenbuterol and salbutamol to block sodium channels predicts their therapeutic use in muscle excitability disorders. *Mol Pharmacol*, 63, 659-670.
- Dooley, C. T., & Houghten, R. A. (1993). The use of positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries for the rapid determination of opioid receptor ligands. *Life Sci*, 52, 1509-1517.
- Draper, I., Kurshan, P. T., McBride, E., Jackson, F. R., & Kopin, A. S. (2007). Locomotor activity is regulated by D2-like receptors in *Drosophila*: An anatomic and functional analysis. *Dev Neurobiol*, 67, 378-393.
- Du, H., Cline, M. S., Osborne, R. J., Tuttle, D. L., Clark, T. A., Donohue, J. P., et al. Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 187-193.
- Duffy, J. B. (2002). Gal4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis*, 34, 1-15.
- Ebralidze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebralidze, K., & Junghans, R. P. (2004). RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science*, 303, 383-387.
- Eichler, J., Appel, J. R., Blondelle, S. E., Dooley, C. T., Dorner, B., Ostresh, J. M., et al. (1995). Peptide, peptidomimetic, and organic synthetic combinatorial libraries. *Med Res Rev*, 15, 481-496.
- Esposito, E., Romandini, S., Merlo-Pich, E., Mennini, T., & Samanin, R. (1986). Evidence of the involvement of dopamine in the analgesic effect of nefopam. *Eur J Pharmacol*, 128, 157-164.
- Esteve, V., Blondelle, S., Celda, B., & Perez-Paya, E. (2001). Stabilization of an alpha-helical conformation in an isolated hexapeptide inhibitor of calmodulin. *Biopolymers*, 59, 467-476.
- Fardaei, M., Rogers, M. T., Thorpe, H. M., Larkin, K., Hamshere, M. G., Harper, P. S., et al. (2002). Three proteins, MBNL, MBL and MBXL, co-localize *in vivo* with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet*, 11, 805-814.
- Fernandez-Costa, JM. & Artero R.. (2010). A conserved motif controls nuclear localization of *Drosophila* Muscleblind. *Molecules and Cells*. En prensa.
- Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M. L., de Gouyon, B., She, W. C., Luchak, J. M., Martinez, P., et al. (2000). Identification of genes that modify Ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature*, 408, 101-106.
- Filippova, G. N., Thienes, C. P., Penn, B. H., Cho, D. H., Hu, Y. J., Moore, J. M., et al. (2001). CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat Genet*, 28, 335-343.
- Fischer, P. M. (2003). The design, synthesis and application of stereochemical and directional peptide isomers: A critical review. *Curr Protein Pept Sci*, 4, 339-356.
- Fischer, W., Kittner, H., Regenthal, R., Malinowska, B., & Schlicker, E. (2001). Anticonvulsant and sodium channel blocking activity of higher doses of clenbuterol. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 363, 182-192.
- Fu, Y. H., Friedman, D. L., Richards, S., Pearlman, J. A., Gibbs, R. A., Pizzuti, A., et al. (1993). Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science*, 260, 235-238.
- Fuller, R. W., & Snoddy, H. D. (1993). Evaluation of nefopam as a monoamine uptake inhibitor *in vivo* in mice. *Neuropharmacology*, 32, 995-999.
- Furling, D. (2009). Abnormal secretion of prostaglandin E2 inhibits differentiation of congenital myotonic dystrophy muscle cells. *Presentación oral en el congreso IDMC-7 (Würzburg, Alemania)*.
- Furling, D., Lam le, T., Agbulut, O., Butler-Browne, G. S., & Morris, G. E. (2003). Changes in myotonic dystrophy protein kinase levels and muscle development in congenital myotonic dystrophy. *Am J Pathol*, 162, 1001-1009.
- Furuya, H., Shinnoh, N., Ohyagi, Y., Ikezoe, K., Kikuchi, H., Osoegawa, M., et al. (2005). Some flavonoids and DHEA-S prevent the cis-effect of expanded CTG repeats in a stable PC12 cell transformant. *Biochem Pharmacol*, 69, 503-516.
- Galderisi, U., Cipollaro, M., Melone, M. A., Iacomino, G., Di Bernardo, G., Galano, G., et al. (1996). Myotonic dystrophy: Antisense oligonucleotide inhibition of DMPK gene expression *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 221, 750-754.
- Garcia-Casado, M. Z., Artero, R. D., Paricio, N., Terol, J., & Perez-Alonso, M. (2002). Generation of gal4-responsive muscleblind constructs. *Genesis*, 34, 111-114.
- Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Garcia-Alcover, I., Vicente-Crespo, M., Alvarez-Abril, M. C., & Artero, R. D. (2008). Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*. *PLoS One*, 3, e1595.

- Gareiss, P. C., Sobczak, K., McNaughton, B. R., Palde, P. B., Thornton, C. A., & Miller, B. L. (2008). Dynamic combinatorial selection of molecules capable of inhibiting the (CUG) repeat RNA-MBNL1 interaction *in vitro*: Discovery of lead compounds targeting myotonic dystrophy (DM1). *J Am Chem Soc*, 130, 16254-16261.
- Goers, E. S., Voelker, R. B., Gates, D. P., & Berglund, J. A. (2008). RNA binding specificity of *Drosophila* Muscleblind. *Biochemistry*, 47, 7284-7294.
- Gomes-Pereira, M., Foiry, L., Nicole, A., Huguet, A., Junien, C., Munnich, A., et al. (2007). CTG trinucleotide repeat "Big jumps": Large expansions, small mice. *PLoS Genet*, 3, e52.
- Gomes-Pereira, M., & Monckton, D. G. (2004). Chemically induced increases and decreases in the rate of expansion of a CAG*CTG triplet repeat. *Nucleic Acids Res*, 32, 2865-2872.
- Gonzalez-Candelas, F., Mensua, J. L., & Moya, A. (1990). Larval competition in *Drosophila melanogaster*. Effects on development time. *Genetica*, 82, 33-44.
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*, 1, 2876-2890.
- Hanna, L. (1999). T-20: First of a new class of anti-HIV drugs. *BETA*, 12, 7-8.
- Hao, M., Akrami, K., Wei, K., De Diego, C., Che, N., Ku, J. H., et al. (2008). Muscleblind-like 2 (Mbnl2) - deficient mice as a model for myotonic dystrophy. *Dev Dyn*, 237, 403-410.
- He, F., Dang, W., Abe, C., Tsuda, K., Inoue, M., Watanabe, S., et al. (2009). Solution structure of the RNA binding domain in the human Muscleblind-like protein 2. *Protein Sci*, 18, 80-91.
- Hearn, M. G., Ren, Y., McBride, E. W., Reveillaud, I., Beinborn, M., & Kopin, A. S. (2002). A *Drosophila* dopamine 2-like receptor: Molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14554-14559.
- Heisenberg, M. (2003). Mushroom body memoir: From maps to models. *Nat Rev Neurosci*, 4, 266-275.
- Hino, S., Kondo, S., Sekiya, H., Saito, A., Kanemoto, S., Murakami, T., et al. (2007). Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of *Serca1* in Myotonic Dystrophy type 1. *Hum Mol Genet*, 16, 2834-2843.
- Ho, T. H., Charlet, B. N., Poulos, M. G., Singh, G., Swanson, M. S., & Cooper, T. A. (2004). Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J*, 23, 3103-3112.
- Ho, T. H., Savkur, R. S., Poulos, M. G., Mancini, M. A., Swanson, M. S., & Cooper, T. A. (2005). Colocalization of Muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in Myotonic Dystrophy. *J Cell Sci*, 118, 2923-2933.
- Hockly, E., Richon, V. M., Woodman, B., Smith, D. L., Zhou, X., Rosa, E., et al. (2003). Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2041-2046.
- Holt, I., Jacquemin, V., Fardaei, M., Sewry, C. A., Butler-Browne, G. S., Furling, D., et al. (2009). Muscleblind-like proteins: Similarities and differences in normal and myotonic dystrophy muscle. *Am J Pathol*, 174, 216-227.
- Holt, I., Mittal, S., Furling, D., Butler-Browne, G. S., Brook, J. D., & Morris, G. E. (2007). Defective mRNA in Myotonic Dystrophy accumulates at the periphery of nuclear splicing speckles. *Genes Cells*, 12, 1035-1048.
- Hommer, D. W., Palkovits, M., Crawley, J. N., Paul, S. M., & Skirboll, L. R. (1985). Cholecystokinin-induced excitation in the substantia nigra: Evidence for peripheral and central components. *J Neurosci*, 5, 1387-1392.
- Hon, L. S., & Zhang, Z. (2007). The roles of binding site arrangement and combinatorial targeting in microRNA repression of gene expression. *Genome Biol*, 8, R166.
- Horodyski, F. M., Ewer, J., Riddiford, L. M., & Truman, J. W. (1993). Isolation, characterization and expression of the eclosion hormone gene of *Drosophila melanogaster*. *Eur J Biochem*, 215, 221-228.
- Houghten, R. A., Appel, J. R., Blondelle, S. E., Cuervo, J. H., Dooley, C. T., & Pinilla, C. (1992). The use of synthetic peptide combinatorial libraries for the identification of bioactive peptides. *Biotechniques*, 13, 412-421.
- Houghten, R. A., Pinilla, C., Blondelle, S. E., Appel, J. R., Dooley, C. T., & Cuervo, J. H. (1991). Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature*, 354, 84-86.
- Houseley, J. M., Wang, Z., Brock, G. J., Soloway, J., Artero, R., Perez-Alonso, M., et al. (2005). Myotonic Dystrophy associated expanded CUG repeat Muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Hum Mol Genet*, 14, 873-883.
- Hudson, B. P., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2004). Recognition of the mRNA AU-rich element by the zinc finger domain of Tis11d. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 257-264.

- Huichalaf, C., Schoser, B., Schneider-Gold, C., Jin, B., Sarkar, P., & Timchenko, L. (2009). Reduction of the rate of protein translation in patients with Myotonic Dystrophy 2. *J Neurosci*, 29, 9042-9049.
- Ingmer, H., Fong, E. L., & Cohen, S. N. (1995). Monomer-dimer equilibrium of the PSC101 repA protein. *J Mol Biol*, 250, 309-314.
- Ja, W. W., West, A. P., Jr., Delker, S. L., Bjorkman, P. J., Benzer, S., & Roberts, R. W. (2007). Extension of *Drosophila melanogaster* life span with a GPCR peptide inhibitor. *Nat Chem Biol*, 3, 415-419.
- Jacobs, A. E., Benders, A. A., Oosterhof, A., Veerkamp, J. H., van Mier, P., Wevers, R. A., et al. (1990). The calcium homeostasis and the membrane potential of cultured muscle cells from patients with Myotonic Dystrophy. *Biochim Biophys Acta*, 1096, 14-19.
- Jaklevic, B., Uyetake, L., Lemstra, W., Chang, J., Leary, W., Edwards, A., et al. (2006). Contribution of growth and cell cycle checkpoints to radiation survival in *Drosophila*. *Genetics*, 174, 1963-1972.
- Jansen, G., Groenen, P. J., Bachner, D., Jap, P. H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., et al. (1996). Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet*, 13, 316-324.
- Jansen, G., Willems, P., Coerwinkel, M., Nillesen, W., Smeets, H., Vits, L., et al. (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, 575-585.
- Jean, J. M., & Hall, K. B. (2001). 2-aminopurine fluorescence quenching and lifetimes: Role of base stacking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 37-41.
- Jensen, H., Jensen, K. B., & Jarnum, S. (1971). Turnover of IgG and IgM in myotonic dystrophy. *Neurology*, 21, 68-71.
- Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T., & Thornton, C. A. (2004). Myotonic Dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of Muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet*, 13, 3079-3088.
- Jing, D., Agnew, J., Patton, W. F., Hendrickson, J., & Beechem, J. M. (2003). A sensitive two-color electrophoretic mobility shift assay for detecting both nucleic acids and protein in gels. *Proteomics*, 3, 1172-1180.
- Joiner, W. J., Crocker, A., White, B. H., & Sehgal, A. (2006). Sleep in *Drosophila* is regulated by adult Mushroom Bodies. *Nature*, 441, 757-760.
- Jung, J., & Bonini, N. (2007). CREB-binding protein modulates repeat instability in a *Drosophila* model for polyQ disease. *Science*, 315, 1857-1859.
- Kaliman, P., Catalucci, D., Lam, J. T., Kondo, R., Gutierrez, J. C., Reddy, S., et al. (2005). Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates phospholamban and regulates calcium uptake in cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 280, 8016-8021.
- Kaliman, P., & Llagostera, E. (2008). Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1. *Cell Signal*, 20, 1935-1941.
- Kalsotra, A., Xiao, X., Ward, A. J., Castle, J. C., Johnson, J. M., Burge, C. B., et al. (2008). A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 20333-20338.
- Kamyshev, N. G., Smirnova, G. P., Savvateeva, E. V., Medvedeva, A. V., & Ponomarenko, V. V. (1983). The influence of serotonin and p-chlorophenylalanine on locomotor activity of *Drosophila melanogaster*. *Pharmacol Biochem Behav*, 18, 677-681.
- Kanadia, R. N., Johnstone, K. A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C. A., Esson, D., et al. (2003). A Muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science*, 302, 1978-1980.
- Kanadia, R. N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S. G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A., et al. (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, 11748-11753.
- Kanadia, R. N., Urbinati, C. R., Crusselle, V. J., Luo, D., Lee, Y. J., Harrison, J. K., et al. (2003). Developmental expression of mouse muscleblind genes *Mbnl1*, *Mbnl2* and *Mbnl3*. *Gene Expr Patterns*, 3, 459-462.
- Kazemi-Esfarjani, P., & Benzer, S. (2000). Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science*, 287, 1837-1840.
- Kim, D. H., Langlois, M. A., Lee, K. B., Riggs, A. D., Puymirat, J., & Rossi, J. J. (2005). HRNP H inhibits nuclear export of mRNA containing expanded CUG repeats and a distal branch point sequence. *Nucleic Acids Res*, 33, 3866-3874.
- Kim, E. Y., Bang, J. Y., Chang, S. I., & Kang, I. C. (2008). A novel integrin alpha5beta1 antagonistic peptide, a5-1, screened by protein chip system as a potent angiogenesis inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 377, 1288-1293.

- Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J. D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., et al. (2005). Altered mRNA splicing of the skeletal muscle Ryanodine receptor and Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet*, 14, 2189-2200.
- Kino, Y., Mori, D., Oma, Y., Takeshita, Y., Sasagawa, N., & 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., et al. (1996). (CTG)_n expansions in various tissues from a myotonic dystrophy patient. *Muscle Nerve*, 19, 240-242.
- Klesert, T. R., Cho, D. H., Clark, J. I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., et al. (2000). Mice deficient in Six5 develop cataracts: Implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet*, 25, 105-109.
- Klesert, T. R., Otten, A. D., Bird, T. D., & Tapscott, S. J. (1997). Trinucleotide repeat expansion at the Myotonic Dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nat Genet*, 16, 402-406.
- Koga, R., Nakao, Y., Kurano, Y., Tsukahara, T., Nakamura, A., Ishiura, S., et al. (1994). Decreased myotonin-protein kinase in the skeletal and cardiac muscles in Myotonic Dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun*, 202, 577-585.
- Krahe, R., Ashizawa, T., Abbruzzese, C., Roeder, E., Carango, P., Giacanelli, M., et al. (1995). Effect of Myotonic Dystrophy trinucleotide repeat expansion on DMPK transcription and processing. *Genomics*, 28, 1-14.
- Krol, J., Fiszer, A., Mykowska, A., Sobczak, K., de Mezer, M., & Krzyzosiak, W. J. (2007). Ribonuclease Dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets. *Mol Cell*, 25, 575-586.
- Kurihara, T. (2005). New classification and treatment for myotonic disorders. *Intern Med*, 44, 1027-1032.
- Kuyumcu-Martinez, N. M., Wang, G. S., & Cooper, T. A. (2007). Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell*, 28, 68-78.
- La Spada, A. R., Roling, D. B., Harding, A. E., Warner, C. L., Spiegel, R., Hausmanowa-Petrusewicz, I., et al. (1992). Meiotic stability and genotype-phenotype correlation of the trinucleotide repeat in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet*, 2, 301-304.
- Lahue, R. S., & Slater, D. L. (2003). DNA repair and trinucleotide repeat instability. *Front Biosci*, 8, s653-665.
- Lavedan, C., Hofmann-Radvanyi, H., Shelbourne, P., Rabes, J. P., Duros, C., Savoy, D., et al. (1993). Myotonic dystrophy: Size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *Am J Hum Genet*, 52, 875-883.
- Leal, S. M., Kumar, N., & Neckameyer, W. S. (2004). GABAergic modulation of motor-driven behaviors in juvenile *Drosophila* and evidence for a nonbehavioral role for GABA transport. *J Neurobiol*, 61, 189-208.
- Lee, K. S., Squillace, R. M., & Wang, E. H. (2007). Expression pattern of Muscleblind-like proteins differs in differentiating myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 361, 151-155.
- Lee, M. M., Childs-Disney, J. L., Pushechnikov, A., French, J. M., Sobczak, K., Thornton, C. A., et al. (2009). Controlling the specificity of modularly assembled small molecules for RNA via ligand module spacing: Targeting the RNAs that cause myotonic muscular dystrophy. *J Am Chem Soc*.
- Lee, M. M., Pushechnikov, A., & Disney, M. D. (2009). Rational and modular design of potent ligands targeting the RNA that causes Myotonic Dystrophy 2. *ACS Chem Biol*, 4, 345-355.
- Lee, T., Lee, A., & Luo, L. (1999). Development of the *Drosophila* Mushroom Bodies: Sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development*, 126, 4065-4076.
- Li, H., Chaney, S., Roberts, I. J., Forte, M., & Hirsh, J. (2000). Ectopic G-protein expression in dopamine and serotonin neurons blocks cocaine sensitization in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol*, 10, 211-214.
- Li, L. B., Yu, Z., Teng, X., & Bonini, N. M. (2008). RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*. *Nature*, 453, 1107-1111.
- Li, X., Song, H., Nakatani, K., & Kraatz, H. B. (2007). Exploiting small molecule binding to DNA for the detection of single-nucleotide mismatches and their base environment. *Anal Chem*, 79, 2552-2555.
- Libby, R. T., Monckton, D. G., Fu, Y. H., Martinez, R. A., McAbney, J. P., Lau, R., et al. (2003). Genomic context drives SCA7 CAG repeat instability, while expressed SCA cDNAs are intergenerationally and somatically stable in transgenic mice. *Hum Mol Genet*, 12, 41-50.
- Lin, X., Miller, J. W., Mankodi, A., Kanadia, R. N., Yuan, Y., Moxley, R. T., et al. (2006). Failure of Mbnl1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*, 15, 2087-2097.
- Liquori, C. L., Ricker, K., Moseley, M. L., Jacobsen, J. F., Kress, W., Naylor, S. L., et al. (2001). Myotonic Dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science*, 293, 864-867.

- Lopez, A., Xamena, N., Marcos, R., & Velazquez, A. (2002). Germ cells microsatellite instability. The effect of different mutagens in a mismatch repair mutant of *Drosophila* (*spell1*). *Mutat Res*, 514, 87-94.
- Llagostera, E., Catalucci, D., Marti, L., Liesa, M., Camps, M., Ciaraldi, T. P., et al. (2007). Role of Myotonic Dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action. *PLoS One*, 2, e1134.
- Machuca-Tzili, L., Thorpe, H., Robinson, T. E., Sewry, C., & Brook, J. D. (2006). Flies deficient in Muscleblind protein model features of myotonic dystrophy with altered splice forms of Z-band associated transcripts. *Hum Genet*, 120, 487-499.
- Maeda, M., Taft, C. S., Bush, E. W., Holder, E., Bailey, W. M., Neville, H., et al. (1995). Identification, tissue-specific expression, and subcellular localization of the 80- and 71-kDa forms of myotonic dystrophy kinase protein. *J Biol Chem*, 270, 20246-20249.
- Mahadevan, M. S., Yadava, R. S., Yu, Q., Balijepalli, S., Frenzel-McCardell, C. D., Bourne, T. D., et al. (2006). Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in Myotonic Dystrophy. *Nat Genet*, 38, 1066-1070.
- Malinina, L. (2005). Possible involvement of the RNAi pathway in trinucleotide repeat expansion diseases. *J Biomol Struct Dyn*, 23, 233-235.
- Mankodi, A., Lin, X., Blaxall, B. C., Swanson, M. S., & Thornton, C. A. (2005). Nuclear RNA foci in the heart in Myotonic Dystrophy. *Circ Res*, 97, 1152-1155.
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., et al. (2000). Myotonic Dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science*, 289, 1769-1773.
- Mankodi, A., Takahashi, M. P., Jiang, H., Beck, C. L., Bowers, W. J., Moxley, R. T., et al. (2002). Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell*, 10, 35-44.
- Mankodi, A., Teng-Umnuay, P., Krym, M., Henderson, D., Swanson, M., & Thornton, C. A. (2003). Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in Myotonic Dystrophy types 1 and 2. *Ann Neurol*, 54, 760-768.
- Mankodi, A., Urbinati, C. R., Yuan, Q. P., Moxley, R. T., Sansone, V., Krym, M., et al. (2001). Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in Myotonic Dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet*, 10, 2165-2170.
- Mao, C., Flavin, K. G., Wang, S., Dodson, R., Ross, J., & Shapiro, D. J. (2006). Analysis of RNA-protein interactions by a microplate-based fluorescence anisotropy assay. *Anal Biochem*, 350, 222-232.
- Marazziti, D., Rotondo, A., Ambrogi, F., & Cassano, G. B. (1991). Analgesia by nefopam: Does it act through serotonin? *Drugs Exp Clin Res*, 17, 259-261.
- Marden, J. H. (2000). Variability in the size, composition, and function of insect flight muscles. *Annu Rev Physiol*, 62, 157-178.
- Margolis, J. M., Schoser, B. G., Moseley, M. L., Day, J. W., & Ranum, L. P. (2006). DM2 intronic expansions: Evidence for CCUG accumulation without flanking sequence or effects on ZNF9 mRNA processing or protein expression. *Hum Mol Genet*, 15, 1808-1815.
- Marsh, J. L., & Thompson, L. M. (2004). Can flies help humans treat neurodegenerative diseases? *Bioessays*, 26, 485-496.
- Martin, J. R., Ernst, R., & Heisenberg, M. (1998). Mushroom Bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem*, 5, 179-191.
- Martorell, L., Johnson, K., Boucher, C. A., & Baiget, M. (1997). Somatic instability of the Myotonic Dystrophy (CTG)_n repeat during human fetal development. *Hum Mol Genet*, 6, 877-880.
- Maurage, C. A., Udd, B., Ruchoux, M. M., Vermersch, P., Kalimo, H., Krahe, R., et al. (2005). Similar brain tau pathology in DM2/PROMM and DM1/Steinert disease. *Neurology*, 65, 1636-1638.
- McBride, S. M., Giuliani, G., Choi, C., Krause, P., Correale, D., Watson, K., et al. (1999). Mushroom Body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron*, 24, 967-977.
- McGee, P. (2005). First successes turn tide for peptide therapeutics. *Drug Discovery & Development*.
- Melzig, J., Buchner, S., Wiebel, F., Wolf, R., Burg, M., Pak, W. L., et al. (1996). Genetic depletion of histamine from the nervous system of *Drosophila* eliminates specific visual and mechanosensory behavior. *J Comp Physiol A*, 179, 763-773.
- Merrifield, B. (1963). Solid phase synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149-2154.
- Michailidis, J., Graves, J. A. M., & Murray, N. D. (1989). Suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* by fatty acids and dimethylsulphoxide: Implications for the mechanism of positive-effect variegation *Journal of Genetics*, 68, 1-8.

- Michalowski, S., Miller, J. W., Urbinati, C. R., Paliouras, M., Swanson, M. S., & 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, 3534-3542.
- Michel, C. I., Kraft, R., & Restifo, L. L. (2004). Defective neuronal development in the Mushroom Bodies of *Drosophila* fragile X mental retardation 1 mutants. *J Neurosci*, 24, 5798-5809.
- Milne, C. A., & Hodgkin, J. (1999). ETR-1, a homologue of a protein linked to Myotonic Dystrophy, is essential for muscle development in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, 9, 1243-1246.
- Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umuay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., et al. (2000). Recruitment of human Muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J*, 19, 4439-4448.
- Mirkin, S. M. (2006). DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders. *Curr Opin Struct Biol*, 16, 351-358.
- Mironneau, J. (1990). Calcium channel antagonist effects of spironolactone, an aldosterone antagonist. *Am J Cardiol*, 65, 7K-8K; discussion 3K.
- Monferrer, L. (2007). Un modelo en *Drosophila* del mecanismo de patogénesis de las expansiones CTG en la Distrofia Miotónica.
- Monferrer, L., & 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., & 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, 16626-16631.
- Morrison, K. L., & Weiss, G. A. (2001). Combinatorial alanine-scanning. *Curr Opin Chem Biol*, 5, 302-307.
- Moseley, M. L., Zu, T., Ikeda, Y., Gao, W., Mosemiller, A. K., Daughters, R. S., et al. (2006). Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in Spinocerebellar Ataxia type 8. *Nat Genet*, 38, 758-769.
- Mulders, S. A., van den Broek, W. J., Wheeler, T. M., Croes, H. J., van Kuik-Romeijn, P., de Kimpe, S. J., et al. (2009). Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in Myotonic Dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 13915-13920.
- Muñoz, A., Lopez-Garcia, B., Perez-Paya, E., Marcos JF. (2007). Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26. *Biochem Biophys Res Commu*, 2;354(1):172-7.
- Mutsuddi, M., Marshall, C. M., Benzow, K. A., Koob, M. D., & Rebay, I. (2004). The Spinocerebellar Ataxia 8 noncoding RNA causes neurodegeneration and associates with staufen in *Drosophila*. *Curr Biol*, 14, 302-308.
- Nakazora, H., & Kurihara, T. (2005). The effect of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) on myotonia: Intracellular studies. *Intern Med*, 44, 1247-1251.
- Narang, M. A., Waring, J. D., Sabourin, L. A., & Korneluk, R. G. (2000). Myotonic dystrophy (DM) protein kinase levels in congenital and adult dm patients. *Eur J Hum Genet*, 8, 507-512.
- Nassel, D. R. (1999). Histamine in the brain of insects: A review. *Microsc Res Tech*, 44, 121-136.
- Nichols, R., Schneuwly, S. A., & Dixon, J. E. (1988). Identification and characterization of a *Drosophila* homologue to the vertebrate neuropeptide cholecystokinin. *J Biol Chem*, 263, 12167-12170.
- Notman, R., den Otter, W. K., Noro, M. G., Briels, W. J., & Anwar, J. (2007). The permeability enhancing mechanism of DMSO in ceramide bilayers simulated by molecular dynamics. *Biophys J*, 93, 2056-2068.
- Novelli, G., Gennarelli, M., Zelano, G., Pizzuti, A., Fattorini, C., Caskey, C. T., et al. (1993). Failure in detecting mRNA transcripts from the mutated allele in Myotonic Dystrophy muscle. *Biochem Mol Biol Int*, 29, 291-297.
- Onaga, T. (2007). Effect of intravenous infusion of proglumide on ruminal motility in conscious sheep (*ovis aries*). *Vet Res Commun*, 31, 1021-1036.
- Orengo, J. P., Chambon, P., Metzger, D., Mosier, D. R., Snipes, G. J., & Cooper, T. A. (2008). Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2646-2651.
- Osborne, R. J., Lin, X., Welle, S., Sobczak, K., O'Rourke, J. R., Swanson, M. S., et al. (2009). Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*, 18, 1471-1481.
- Osborne, R. J., & Thornton, C. A. (2006). RNA-dominant diseases. *Hum Mol Genet*, 15 Spec No 2, R162-169.
- Owen, B. A., Yang, Z., Lai, M., Gajec, M., Badger, J. D., 2nd, Hayes, J. J., et al. (2005). (CAG)(n)-hairpin DNA binds to Msh2-Msh3 and changes properties of mismatch recognition. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 663-670.

- Pages, M., Rosello, J., Casas, J., Gelpi, E., Gualde, N., & Rigaud, M. (1986). Cyclooxygenase and lipoxygenase-like activity in *Drosophila melanogaster*. *Prostaglandins*, 32, 729-740.
- Pall, G. S., Johnson, K. J., & Smith, G. L. (2003). Abnormal contractile activity and calcium cycling in cardiac myocytes isolated from DMPK knockout mice. *Physiol Genomics*, 13, 139-146.
- Pascual, M., Vicente, M., Monferrer, L., & 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., et al. (2006). Interaction of Muscleblind, CUG-bp1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *EMBO J*, 25, 4271-4283.
- Pearson, C. E. (2003). Slipping while sleeping? Trinucleotide repeat expansions in germ cells. *Trends Mol Med*, 9, 490-495.
- Pearson, C. E., Nichol Edamura, K., & Cleary, J. D. (2005). Repeat instability: Mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet*, 6, 729-742.
- Perrin, F. (1926). Polarization de la lumiere de fluorescence. Vie moyenne de molecules dans l'etat excite. *J. Phys Radium*, 7.
- Philips, A. V., Timchenko, L. T., & Cooper, T. A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in Myotonic Dystrophy. *Science*, 280, 737-741.
- Pinilla, C., Appel, J. R., Blanc, P., & Houghten, R. A. (1992). Rapid identification of high affinity peptide ligands using positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries. *Biotechniques*, 13, 901-905.
- Powell, J. R., & Moriyama, E. N. (1997). Evolution of codon usage bias in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7784-7790.
- Pushechnikov, A., Lee, M. M., Childs-Disney, J. L., Sobczak, K., French, J. M., Thornton, C. A., et al. (2009). Rational design of ligands targeting triplet repeating transcripts that cause RNA dominant disease: Application to Myotonic muscular Dystrophy type 1 and Spinocerebellar Ataxia type 3. *J Am Chem Soc*, 131, 9767-9779.
- Ranum, L. P., & Cooper, T. A. (2006). RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci*, 29, 259-277.
- Reddy, S., Smith, D. B., Rich, M. M., Leferovich, J. M., Reilly, P., Davis, B. M., et al. (1996). Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet*, 13, 325-335.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., & Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*, 11, 1114-1125.
- Roberts, R., Timchenko, N. A., Miller, J. W., Reddy, S., Caskey, C. T., Swanson, M. S., et al. (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, 13221-13226.
- Rudnicki, D. D., Holmes, S. E., Lin, M. W., Thornton, C. A., Ross, C. A., & Margolis, R. L. (2007). Huntington's disease-like 2 is associated with CUG repeat-containing RNA foci. *Ann Neurol*, 61, 272-282.
- Rundgren, H., Mark, P., & Laaksonen, A. (2007). Molecular dynamics simulations of conserved hox protein hexapeptides. I. Folding behavior in water solution. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 810, 113-120.
- Salvaterra, P. M., & Kitamoto, T. (2001). *Drosophila* cholinergic neurons and processes visualized with Gal4/UAS-GFP. *Brain Res Gene Expr Patterns*, 1, 73-82.
- Salvatori, S., Fanin, M., Trevisan, C. P., Furlan, S., Reddy, S., Nagy, J. I., et al. (2005). Decreased expression of DMPK: Correlation with CTG repeat expansion and fibre type composition in Myotonic Dystrophy type 1. *Neurol Sci*, 26, 235-242.
- Salvatori, S., Furlan, S., Fanin, M., Picard, A., Pastorello, E., Romeo, V., et al. (2009). Comparative transcriptional and biochemical studies in muscle of Myotonic Dystrophies (DM1 and DM2). *Neurol Sci*, 30, 185-192.
- Sarkar, P. S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., et al. (2000). Heterozygous loss of *Six5* in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet*, 25, 110-114.
- Savkur, R. S., Philips, A. V., & Cooper, T. A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in Myotonic Dystrophy. *Nat Genet*, 29, 40-47.
- Savkur, R. S., Philips, A. V., Cooper, T. A., Dalton, J. C., Moseley, M. L., Ranum, L. P., et al. (2004). Insulin receptor splicing alteration in Myotonic Dystrophy type 2. *Am J Hum Genet*, 74, 1309-1313.

- Schulz, R. A., Chromey, C., Lu, M. F., Zhao, B., & Olson, E. N. (1996). Expression of the D-MEF2 transcription in the *Drosophila* brain suggests a role in neuronal cell differentiation. *Oncogene*, 12, 1827-1831.
- Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C. A., Watzet, A., et al. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in Myotonic Dystrophy type 1. *Hum Mol Genet*, 10, 2143-2155.
- Seznec, H., Lia-Baldini, A. S., Duros, C., Fouquet, C., Lacroix, C., Hofmann-Radvanyi, H., et al. (2000). Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability. *Hum Mol Genet*, 9, 1185-1194.
- Shaw, D. J., McCurrach, M., Rundle, S. A., Harley, H. G., Crow, S. R., Sohn, R., et al. (1993). Genomic organization and transcriptional units at the Myotonic Dystrophy locus. *Genomics*, 18, 673-679.
- Shelbourne, P., Winqvist, R., Kunert, E., Davies, J., Leisti, J., Thiele, H., et al. (1992). Unstable DNA may be responsible for the incomplete penetrance of the myotonic dystrophy phenotype. *Hum Mol Genet*, 1, 467-473.
- Smith, K. P., Byron, M., Johnson, C., Xing, Y., & Lawrence, J. B. (2007). Defining early steps in mRNA transport: Mutant mRNA in Myotonic Dystrophy type I is blocked at entry into SC-35 domains. *J Cell Biol*, 178, 951-964.
- Spiegel, R., La Spada, A. R., Kress, W., Fischbeck, K. H., & Schmid, W. (1996). Somatic stability of the expanded CAG trinucleotide repeat in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mutat*, 8, 32-37.
- Squillace, R. M., Chenault, D. M., & Wang, E. H. (2002). Inhibition of muscle differentiation by the novel Muscleblind-related protein CHCR. *Dev Biol*, 250, 218-230.
- Stilwell, G. E., Saraswati, S., Littleton, J. T., & Chouinard, S. W. (2006). Development of a *Drosophila* seizure model for *in vivo* high-throughput drug screening. *Eur J Neurosci*, 24, 2211-2222.
- Sugino, M., Ohsawa, N., Ito, T., Ishida, S., Yamasaki, H., Kimura, F., et al. (1998). A pilot study of dehydroepiandrosterone sulfate in Myotonic Dystrophy. *Neurology*, 51, 586-589.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24, 1596-1599.
- Taneja, K. L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., & Singer, R. H. (1995). Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of Myotonic Dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol*, 128, 995-1002.
- Tarnopolsky, M., Mahoney, D., Thompson, T., Naylor, H., & Doherty, T. J. (2004). Creatine monohydrate supplementation does not increase muscle strength, lean body mass, or muscle phosphocreatine in patients with Myotonic Dystrophy type 1. *Muscle Nerve*, 29, 51-58.
- ten Lohuis, M., Galliano, H., Heidmann, I., & Meyer, P. (1995). Treatment with propionic and butyric acid enhances expression variegation and promoter methylation in plant transgenes. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 376, 311-320.
- Teplova, M., & Patel, D. J. (2008). Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator Muscleblind-like MBNL1. *Nat Struct Mol Biol*, 15, 1343-1351.
- Tettamanti, M., Armstrong, J. D., Endo, K., Yao Yang, M., Furukubo-Tokunaga, K., Kaiser, K., et al. (1997). Early development of the *Drosophila* Mushroom Bodies, brain centres for associative learning and memory. *Dev Genes Evol*, 207, 242-252.
- Thornton, C. A., Griggs, R. C., & Moxley, R. T., 3rd (1994). Myotonic Dystrophy with no trinucleotide repeat expansion. *Ann Neurol*, 35, 269-272.
- Thornton, C. A., Johnson, K., & Moxley, R. T., 3rd (1994). Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes. *Ann Neurol*, 35, 104-107.
- Thornton, C. A., Wymer, J. P., Simmons, Z., McClain, C., & Moxley, R. T., 3rd (1997). Expansion of the Myotonic Dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nat Genet*, 16, 407-409.
- Timchenko, N. A., Cai, Z. J., Welm, A. L., Reddy, S., Ashizawa, T., & Timchenko, L. T. (2001). RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem*, 276, 7820-7826.
- Timchenko, N. A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z. J., Quan, L., & Timchenko, L. T. (2004). Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J Biol Chem*, 279, 13129-13139.
- Timchenko, N. A., Welm, A. L., Lu, X., & 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, 4517-4525.

- Tome, S., Holt, I., Edelman, W., Morris, G. E., Munnich, A., Pearson, C. E., et al. (2009). Msh2 ATPase domain mutation affects CTG*CAG repeat instability in transgenic mice. *PLoS Genet*, 5, e1000482.
- Tootle, T. L., & Spradling, A. C. (2008). *Drosophila* Pxt: A cyclooxygenase-like facilitator of follicle maturation. *Development*, 135, 839-847.
- Toscano, A., Messina, S., Campo, G. M., Di Leo, R., Musumeci, O., Rodolico, C., et al. (2005). Oxidative stress in Myotonic Dystrophy type 1. *Free Radic Res*, 39, 771-776.
- Trip, J., Drost, G., van Engelen, B. G., & Faber, C. G. (2006). Drug treatment for myotonia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004762.
- Truman, J. W., & Bate, M. (1988). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 125, 145-157.
- Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249, 505-510.
- Vagner, J., Qu, H., & Hruby, V. J. (2008). Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, 12, 292-296.
- Vicente-Crespo, M., Pascual, M., Fernandez-Costa, J. M., Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Miranda, M. E., et al. (2008). *Drosophila* Muscleblind is involved in troponin T alternative splicing and apoptosis. *PLoS One*, 3, e1613.
- Vilar, M., Carbonell, T., & Pérez-Payá, E. (1998). Química combinatoria en biomedicina: Una nueva estrategia en el desarrollo de antibióticos. *Revista Española de Quimioterapia*, 11.
- Waddell, S., & Quinn, W. G. (2001). What can we teach *Drosophila*? What can they teach us? *Trends Genet*, 17, 719-726.
- Wang, G. S., Kuyumcu-Martinez, M. N., Sarma, S., Mathur, N., Wehrens, X. H., & Cooper, T. A. (2009). PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of Myotonic Dystrophy type 1. *J Clin Invest*.
- Wang, L. C., Hung, W. T., Pan, H., Chen, K. Y., Wu, Y. C., Liu, Y. F., et al. (2008). Growth-dependent effect of Muscleblind knockdown on *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 366, 705-709.
- Warf, M. B., & Berglund, J. A. (2007). MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T. *RNA*, 13, 2238-2251.
- Warf, M. B., Diegel, J. V., von Hippel, P. H., & Berglund, J. A. (2009). The protein factors MBNL1 and U2AF65 bind alternative RNA structures to regulate splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 9203-9208.
- Warf, M. B., Nakamori, M., Matthys, C. M., Thornton, C. A., & Berglund, J. A. (2009). Pentamidine reverses the splicing defects associated with Myotonic Dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 18551-18556.
- Westerlaken, J. H., Van der Zee, C. E., Peters, W., & Wieringa, B. (2003). The DMWD protein from the Myotonic Dystrophy (DM1) gene region is developmentally regulated and is present most prominently in synapse-dense brain areas. *Brain Res*, 971, 116-127.
- Wheeler, T. M., Lueck, J. D., Swanson, M. S., Dirksen, R. T., & Thornton, C. A. (2007). Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of Myotonic Dystrophy. *J Clin Invest*, 117, 3952-3957.
- Wheeler, T. M., Sobczak, K., Lueck, J. D., Osborne, R. J., Lin, X., Dirksen, R. T., et al. (2009). Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science*, 325, 336-339.
- Wohrle, D., Schwemmle, S., & Steinbach, P. (1996). DNA methylation and triplet repeat stability: New proposals addressing actual questions on the CGG repeat of fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, 64, 266-267.
- Wojtas, K., Slepecky, N., von Kalm, L., & Sullivan, D. (1997). Flight muscle function in *Drosophila* requires colocalization of glycolytic enzymes. *Mol Biol Cell*, 8, 1665-1675.
- Wu, Y. D., & Gellman, S. (2008). Peptidomimetics. *Acc Chem Res*, 41, 1231-1232.
- Xia, S., Miyashita, T., Fu, T. F., Lin, W. Y., Wu, C. L., Pyzocha, L., et al. (2005). NMDA receptors mediate olfactory learning and memory in *Drosophila*. *Curr Biol*, 15, 603-615.
- Yadava, R. S., Frenzel-McCardell, C. D., Yu, Q., Srinivasan, V., Tucker, A. L., Puymirat, J., et al. (2008). RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKK2-5 expression. *Nat Genet*, 40, 61-68.
- Yuan, Y., Compton, S. A., Sobczak, K., Stenberg, M. G., Thornton, C. A., Griffith, J. D., et al. (2007). Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs. *Nucleic Acids Res*, 35, 5474-5486.
- Zars, T., Fischer, M., Schulz, R., & Heisenberg, M. (2000). Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science*, 288, 672-675.

Anexo

Genetic and Chemical Modifiers of a CUG Toxicity Model in *Drosophila*

Amparo Garcia-Lopez¹, Lidon Monferrer¹, Irma Garcia-Alcover², Marta Vicente-Crespo, M. Carmen Alvarez-Abril², Ruben D. Artero*

Department of Genetics, University of Valencia, Burjassot, Spain

Abstract

Non-coding CUG repeat expansions interfere with the activity of human Muscleblind-like (MBNL) proteins contributing to myotonic dystrophy 1 (DM1). To understand this toxic RNA gain-of-function mechanism we developed a *Drosophila* model expressing 60 pure and 480 interrupted CUG repeats in the context of a non-translatable RNA. These flies reproduced aspects of the DM1 pathology, most notably nuclear accumulation of CUG transcripts, muscle degeneration, splicing misregulation, and diminished Muscleblind function *in vivo*. Reduced Muscleblind activity was evident from the sensitivity of CUG-induced phenotypes to a decrease in *muscleblind* genetic dosage and rescue by MBNL1 expression, and further supported by the co-localization of Muscleblind and CUG repeat RNA in ribonuclear foci. Targeted expression of CUG repeats to the developing eye and brain mushroom bodies was toxic leading to rough eyes and semilethality, respectively. These phenotypes were utilized to identify genetic and chemical modifiers of the CUG-induced toxicity. 15 genetic modifiers of the rough eye phenotype were isolated. These genes identify putative cellular processes unknown to be altered by CUG repeat RNA, and they include mRNA export factor Aly, apoptosis inhibitor Thread, chromatin remodelling factor Nurf-38, and extracellular matrix structural component Viking. Ten chemical compounds suppressed the semilethal phenotype. These compounds significantly improved viability of CUG expressing flies and included non-steroidal anti-inflammatory agents (ketoprofen), muscarinic, cholinergic and histamine receptor inhibitors (orphenadrine), and drugs that can affect sodium and calcium metabolism such as clenbuterol and spironolactone. These findings provide new insights into the DM1 phenotype, and suggest novel candidates for DM1 treatments.

Citation: Garcia-Lopez A, Monferrer L, Garcia-Alcover I, Vicente-Crespo M, Alvarez-Abril MC, et al (2008) Genetic and Chemical Modifiers of a CUG Toxicity Model in *Drosophila*. PLoS ONE 3(2): e1595. doi:10.1371/journal.pone.0001595

Editor: Alfred Lewin, University of Florida, United States of America

Received: November 21, 2007; **Accepted:** January 18, 2008; **Published:** February 13, 2008

Copyright: © 2008 Garcia-Lopez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Our work was supported by grants GV04B164 and IARC0/04/051 from the Generalitat Valenciana, SAF2003-03536 from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), and Muscular Dystrophy Association (3315 and 4127). A.G.L. and M.V. were recipients of predoctoral fellowships from the MEC.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

*E-mail: ruben.artero@uv.es

□ Current address: Valentia biopharma, Technology Park of Valencia, Paterna, Spain

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Myotonic dystrophy 1 (DM1) is an autosomal dominant neuromuscular disease involving the expansion of unstable CTG repeats in the 3' untranslated region (UTR) of the *DM protein kinase (DMPK)* gene. DM1 is multisystemic and characteristic features include myotonia, muscular dystrophy, iridescent cataracts, cardiac arrhythmias, and signs of neuropathology [1]. A biochemical hallmark of DM1 is misregulated alternative splicing of specific skeletal muscle, heart and brain pre-mRNAs, which explain defined DM1 symptoms such as myotonia (reviewed in [2]).

In mice, expression of 250 CUG repeats within a heterologous RNA gives rise to DM1-like phenotypes thus demonstrating that expanded CUG repeat transcripts are themselves toxic to cells [3]. Results in *Drosophila*, however, are less clear cut. Expression of 162 pure CTG repeats in the context of the 3'UTR of a Green Fluorescent Protein (GFP) reporter gene has been reported not to cause signs of pathology [4] whereas larger, interrupted, CTG repeats induced muscle degeneration [5]. Several RNA binding proteins, most notably human Muscleblind-like proteins MBNL1, MBNL2 and MBNL3, are sequestered by mutant *DMPK* transcripts.

MBNL1 proteins co-localize with distinctive CUG ribonuclear foci within muscle and neuron nuclei in DM1 patients [6–8]. *Drosophila* model flies, though, demonstrate that ribonuclear foci are not pathogenic *per se*. RNA containing 162 CUG repeats accumulates in numerous nuclear foci together with *Drosophila* Muscleblind, but no evident pathogenic phenotype is detected [4]. DM1-associated defects are remarkably similar to those observed in *Mbnl1* knockout mice and include myotonia, ocular cataracts, histological abnormalities, and the abnormal use of specific alternative exons [9], [10]. *muscleblind (mb)* loss-of-function mutations in *Drosophila* provide additional examples of DM1-like phenotypes such as missplicing of the Z-band-associated transcripts α -actinin and *CG30084* [11], [12].

Mbnl1 regulates a fetal to postnatal developmental switch that controls the splicing pattern of a set of murine skeletal muscle transcripts [10]. CUG-binding protein 1 (CUG-BP1) forms an RNA-dependent complex with hnRNP H that antagonizes the activity of MBNL1 proteins [13]. Both CUG-BP1 and hnRNP H are upregulated in DM1 muscle cells [13], [14] thus further contributing to the splicing pathology. Significantly, rescue experiments in DM1 model mice demonstrate that loss of *Mbnl1* function is the key event of missplicing and myotonia [15].

Additionally, overexpression of normal *DMPK* 3'UTR mRNA in mice induced up-regulation of CUG-BP1 and also reproduced cardinal features of DM1 [16].

Great effort has been put to ameliorate myotonia and abnormal cardiac conduction in DM1, which are currently treated with sodium channel inhibitors (e.g. mexiletine). Muscular weakness and wasting, or daytime somnolence, however, show little or no improvement in pharmacological trials [17]. A number of genotoxic agents suppress somatic C₁TG expansion mosaicism in a cell culture model [18]. PC12 neuronal cell lines expressing 250 C₁TG repeats exhibit cell death after cell differentiation *in vitro* that is specifically inhibited by flavonoids [19].

We previously established that *Drosophila* Mbl and human MBNL1 proteins are functional homologs [20]. Haro et al. (2006) have reported that expression of 480 interrupted C₁TG repeats is toxic to *Drosophila* muscle cells, that CUG RNA and human MBNL1 accumulate into ribonuclear foci, and that human MBNL1 suppresses a CUG-induced eye phenotype. Here we describe similar transgenic flies in which we confirm muscle degeneration, ribonuclear formation, and genetic interaction with *muscleblind* gene dosage. We show that CUG expressing flies reproduce additional key features of the DM1 disease including misregulated alternative splicing of muscle genes, CUG tract length dependence of phenotypes, and CUG-dependent central nervous system alterations. Furthermore, model flies were used in genetic screens and functional assays to identify new components of the pathogenesis pathway and chemical suppressors of DM1-like phenotypes, respectively.

Results

Continued expression of expanded CUG repeats in *Drosophila* reduces lifespan and causes muscle degeneration

To understand the molecular and cellular mechanisms underlying the DM1 pathology we generated transgenic *Drosophila* lines that express 60 uninterrupted or 480 interrupted CUG repeats as a non-coding transcript under the control of the Gal4/UAS system. 480 repeats consisted of synthetic C₁TG repeats interrupted every 20 units by the CTCGA sequence (hereafter referred to as i(C₁TG)₄₈₀). The effect of expressing CUG repeat RNA in the *Drosophila* muscles or ubiquitously in the fly was studied with *Myosin heavy chain* (*Mhc*)-Gal4 and *daughterless* (*da*)-Gal4 lines, respectively. First we analyzed whether expression of i(CUG)₄₈₀ RNA in *Drosophila* tissues had any impact in their lifespan. Average survival of flies expressing i(CUG)₄₈₀ repeat RNA was lower than their corresponding control

flies heterozygous for the UAS transgene or Gal4 driver. Furthermore, differences in survival curves were statistically significant except for the *Mhc-Gal4>UAS-i(C₁TG)₄₈₀* and *Mhc-Gal4/+* survival curves, possibly due to a dominant effect of the *Mhc-Gal4* insertion, as this is a particularly weak stock, or the small population of flies tested (n = 40) (Figure 1). Continued expression of CUG repeat RNA in the fly musculature, or throughout the animal body, was therefore detrimental to fly survival.

Flies expressing i(CUG)₄₈₀ RNA in muscles additionally showed an age-dependent tendency to position wings upheld. These flies were flightless (n = 274) and showed alterations in indirect flight muscles (IFM), whereas those expressing (CUG)₆₀ RNA did not (0% flightless, n = 204). Both *UAS-(CTG)₆₀* and *UAS-i(CTG)₄₈₀* transgenes expressed repeat RNA to similar levels (Figure S1A). 2–3 day old flies expressing i(CUG)₄₈₀ RNA developed muscle histopathology, including vacuolization and reduction in fiber size (Figure 2A–F). We measured cross-sectional area of dorso longitudinal muscle 45e (Figure 2G). Average size of muscle 45e decreased to approximately 45% of normal when expressing 480 CUG repeat transcripts. The phenotype was degenerative as 38-day old flies had smaller IFM packages, muscles were occasionally missing, and vacuoles increased in average volume (Figure 2H). (CUG)₆₀ RNA did not appreciably affect muscle organization.

Degeneration of the pigmented retina and loss of photoreceptor neurons has been described in DM1 patients [1]. To investigate whether the retina of *Drosophila* was also susceptible to CUG repeat-mediated toxicity, we expressed i(CUG)₄₈₀ transcripts ubiquitously in the eye-antennal imaginal disc under the control of the *glass multiple reporter* (*gmr*)-Gal4 line. These flies showed eyes that were smaller and acutely rough. Tangential and frontal sections revealed severe alterations in the retina, including detachment of subretinal cells, thinning of fenestrated membrane and lack of photoreceptor rhabdomeres (Figure 2I–L). Expression of (CUG)₆₀ RNA under the same conditions did not appreciably affect eye morphology in tissue sections (data not shown). Thus, accumulation of CUG repeat RNA in *Drosophila* muscle and eye tissue produces degenerative phenotypes that are dependent on the CUG tract length.

CUG repeat RNA co-localizes with Muscleblind in nuclear foci

Nuclear inclusions containing CUG repeats and MBNL proteins are characteristic of DM1. We investigated whether i(CUG)₄₈₀ RNA similarly forms nuclear foci that include *Drosophila* Mbl. *mbl* encodes protein isoforms MblA, B, C and D, of which MblC has been shown

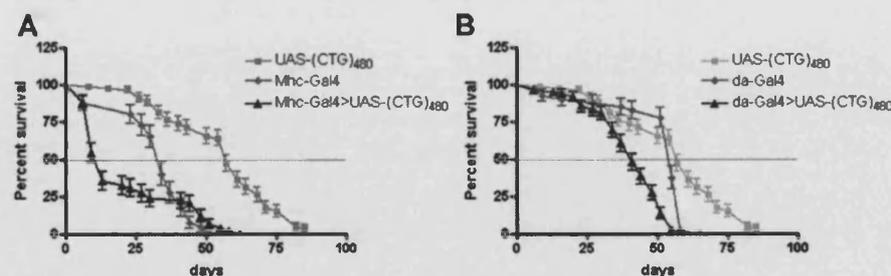


Figure 1. Flies expressing CUG repeats show shorter lifespan. Average percentage of live flies, with the genotypes indicated, versus age (in days). (A) Whereas control flies showed an average lifespan of 57 (*UAS-i(CTG)₄₈₀/+*; n = 80) and 34 (*Mhc-Gal4/+*; n = 40) days, i(CUG)₄₈₀-expressing flies lived 13 days in average (n = 60). Differences in lifespan curves were highly significant when comparing i(CUG)₄₈₀-expressing flies to *UAS-i(CTG)₄₈₀/+* control flies (p < 0.0001, Log-Rank test) but not to *Mhc-Gal4/+* controls. (B) Expression of i(CUG)₄₈₀ transgene in an ubiquitous manner (*da-Gal4>UAS-i(CTG)₄₈₀*) also reduced fly survival. Control flies showed a median survival of 57 (*UAS-i(CTG)₄₈₀/+*, n = 80) and 55 (*da-Gal4/+*, n = 40) days. Median survival for i(CUG)₄₈₀-expressing flies was of 41 days (n = 80), and lifespan curves for i(CUG)₄₈₀-expressing flies and both controls showed differences that were statistically significant (p < 0.0001, Log-Rank test). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism4 software.
doi:10.1371/journal.pone.0001595.g001

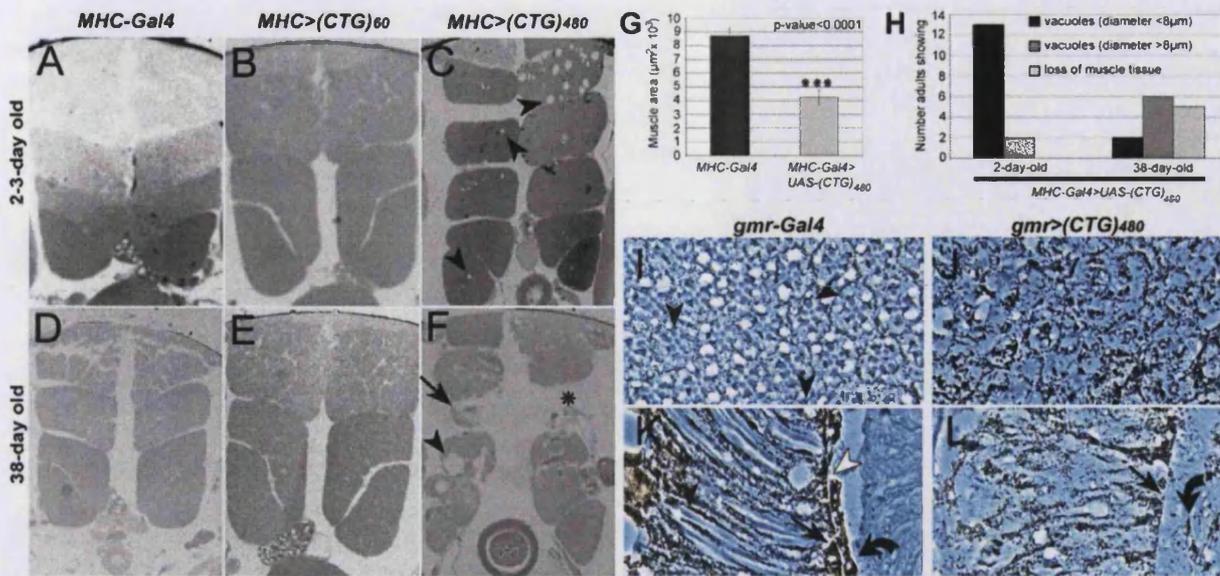


Figure 2. CUG-induced eye and muscle degeneration in flies. Transversal sections of resin-embedded (A–F) adult IFMs of control flies (*Mhc-Gal4*^{+/+}) (A, D) and flies expressing (CUG)₆₀ (B, E) or i(CUG)₄₈₀ RNA (C, F) under the control of the *Mhc-Gal4* driver. IFMs were studied in 2–3-day old (A–C) or 38-day old (D–F) flies. Expression of (CUG)₆₀ RNA was not toxic to muscle fibres (B), and IFMs did not degenerate over time (E). Expression of i(CUG)₄₈₀ RNA in IFMs led to vacuolization (arrowheads) and muscle disorganization (C). Muscle degeneration and wasting was conspicuous in 38-day old flies with large vacuoles (arrowheads), lower density of myofibrils per muscle (arrow) and missing muscles (asterisk). Results consistent with these have been obtained independently [5]. (G) Cross-sectional area of left dorso longitudinal muscle 45e [51] in 2 day-old control (*Mhc-Gal4*^{+/+}) and DM1 model flies (*Mhc-Gal4*^{+/+}>UAS-i(CUG)₄₈₀). n = 12 (control) and n = 34 (CUG expressing). (H) Muscle degeneration was measured as the frequency of vacuolar pathology and muscle area reduction, according to the following rating scale: vacuoles with diameter larger or smaller than 8 µm, or showing 45% or less of the normal muscle area. Muscle 45e was measured in 3–4 thorax sections per animal and a total of 15 young (2-day-old) or 13 aged (38-day-old) flies were analyzed. Control (*Mhc-Gal4*^{+/+}) and *Mhc-Gal4*^{+/+}>UAS-(CTG)₆₀ flies showed no muscle phenotype 2 or 38 days after eclosion. Tangential (I, J) and frontal (K, L) sections of adult *Drosophila* eyes with the genotypes *gmr-Gal4*^{+/+} (I, K) and *gmr-Gal4*^{+/+}/UAS-i(CUG)₄₈₀ (J, L) at 25°C. (I) Tangential sections exhibited a normal complement of photoreceptors per ommatidial unit (arrowheads point to rhabdomeres), although some pigment cells were absent. (J) Expression of expanded CUG repeats caused general disorganization of the eye retina. (K) In controls, rhabdomeres extend from the apical to the basal side of the retina (arrowheads) and the layer of pigment cell feet forms the fenestrated membrane (arrow), which is separated by the basement membrane (white arrowhead) from the underlying subretinal cells (bent arrow). (L) Eyes expressing i(CUG)₄₈₀ RNA lacked rhabdomeres and showed general disorganization of pigment cells. Fenestrated membranes were thinner and showed gaps (arrow). Subretinal cells were not tightly apposed to the basement membrane (bent arrow). doi:10.1371/journal.pone.0001595.g002

to regulate alternative splicing [12]. We co-expressed i(CUG)₄₈₀ RNA and the MblC isoform fused to the GFP (MblC:GFP) under the control of a *heat shock (hs)-Gal4* line. Simultaneous fluorescence detection in fly thorax sections showed nuclear co-localization of i(CUG)₄₈₀ RNA and MblC (Figure 3A–C). This was not observed in controls expressing i(CUG)₄₈₀ RNA or the fusion protein alone. (CUG)₆₀ RNA did not form nuclear foci when targeted with *Mhc-Gal4* to adult musculature (data not shown). Therefore, *Drosophila* MblC incorporates into expanded CUG repeat RNA-containing foci like its human MBNL counterparts.

muscleblind dose modifies CUG toxicity phenotypes

sevenless (sev)-Gal4 driven expression of i(CUG)₄₈₀ repeats (*sev-Gal4*^{+/+}>UAS-i(CUG)₄₈₀) disorganizes ommatidia and mechanosensory bristles, and reduces eye size, which generates an externally rough eye (Figure 3H). Introduction of the weak *mbl*⁷¹⁰³ or strong hypomorphic *mbl*^{E27} mutant alleles in this genetic background did not significantly modify eye morphology (Figure 3I, J; *mbl*^{E27} may reduce size slightly). However, a clear enhancement was observed in *mbl*⁷¹⁰³/*mbl*^{E27} trans heterozygous flies simultaneously expressing i(CUG)₄₈₀ RNA (Figure 3K). Conversely, targeted expression of human MBNL1 to *Drosophila* eye precursors expressing 480 interrupted CUG repeat transcripts strongly suppressed the rough eye phenotype, whereas expression of the unrelated GFP protein

under the same conditions showed no effect (Figure 3F, G). 60 CUG repeat RNA caused a milder effect on external eye morphology, only altering mechanosensory bristles (Figure 3D, E). From these experiments we conclude that CUG repeat RNA compromises *mbl* function *in vivo* as similarly shown in DM1 model mice and patients [21], [15], [10].

CUG repeat RNA induces spliceopathy in *Drosophila*

Sequestration of MBNL1 correlates with missplicing events in DM1 patients. To assess whether long CUG repeat transcripts in the fly produce analogous alterations, we studied the splicing pattern of muscle genes *CG30084*, a described target of Mbl activity in embryos [11], and *Drosophila troponinT (TnT)* in embryos, pupae and adult flies expressing 60 CUG and 480 interrupted CUG repeat RNAs (Figure 4). Missplicing of *CG30084* pre-mRNA was conspicuous with a strong upregulation of reverse transcriptase (RT) PCR band E in adult flies expressing either 60 or 480 CUG repeat RNA (Figure 4A, C; see also Figure S2). *TnT* was similarly affected. Two-day old pupae failed to show RT-PCR band D, which was not expressed in younger pupae (data not shown), when 480 interrupted CUG transcripts were targeted to the musculature and significantly lowered its levels with 60 CUG repeat RNA (Figure 4B, D). Thus, CUG transcripts induce spliceopathy in the *Drosophila* musculature.

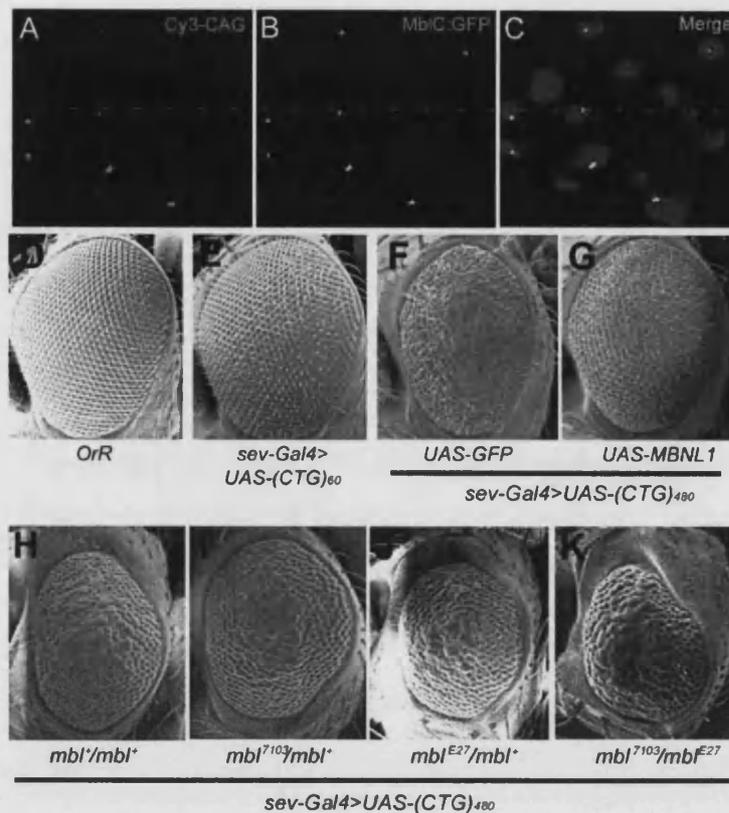


Figure 3. Muscblind forms nuclear inclusions with CUG repeat RNA and genetically interacts with repeat RNA phenotypes in vivo. i(CUG)₄₈₀ RNA and MbIC:GFP were coexpressed in adult flies using a *hs-Gal4* line (A–C). i(CUG)₄₈₀ transcripts detected by FISH (red; A) and MbIC:GFP detected by the GFP tag (green; B). Red and green channels are shown merged in (C), with nuclei counterstained with DAPI. Scanning electron microscope (SEM) images of *Drosophila* eyes (D–K). (D) External morphology of reference strain *OrR*. (E) *sev-Gal4* driven expression of (CUG)₆₀ RNA in eye precursors exhibits mild external defects, only altering mechanosensory bristles. Expression of i(CUG)₄₈₀ RNA driven by the same Gal4 generates a rough and reduced eye (H), a phenotype that is specifically suppressed by the simultaneous expression of human MBNL1 (G) but not by expression of the unrelated GFP protein (F). The CUG-dependent eye phenotype was not modified by the weak *mbl*⁷¹⁰³ allele (I), and only slightly modified by *mbl*^{E27} (J). However, the compound heterozygote enhanced roughness and eye size reduction (K). The compound heterozygote *mbl*⁷¹⁰³/*mbl*^{E27} displayed normal eyes in the absence of i(CUG)₄₈₀ RNA. doi:10.1371/journal.pone.0001595.g003

Dominant genetic modifiers of a CUG-induced rough eye phenotype

Once cardinal aspects of DM1 were confirmed in flies, we sought to identify new components of the pathogenic pathway. We performed a genetic screen of enhancer/suppressors of the *sev-Gal4*>*UAS-i(CTG)*₄₈₀ rough eye phenotype using a collection of 695 lethal P-element insertions and several candidate genes (Table 1, Figure 5A–H).

Some modifiers are regulators of gene expression. The suppressor *cap-n-collar* (*cnc*) encodes a bZIP protein involved in oocyte axis determination and head segment identity [22], [23]. Three Cnc protein isoforms have been described, of which CncC has been suggested to play a role in redox homeostasis [24]. We tested the ability of alleles *cnc*⁰³⁹²¹ (disrupts all *cnc* isoforms), *cnc*^{E^{P3258}} and *cnc*^{E^{P3633}} (interrupts *cncC*) to modify the CUG toxicity phenotype. Only *cnc*⁰³⁹²¹ dominantly suppressed the eye phenotype thus suggesting a limited or null implication of CncC in CUG toxicity. Halving the pyrophosphatase component of the Nucleosome remodelling factor (*Nurf-3B*) improved eye morphology but did not suppress unrelated overexpression phenotypes in the eye (data not shown).

Additional modifiers identified genes and pathways not previously implicated in CUG-induced toxicity. Mutations in the regulators of cell adhesion and actin cytoskeleton *coronin* (*coro*) [25] and *fear of intimacy* (*foi*) [26] suppressed the phenotype. Reduction of the major structural component of basement membrane α 2-chain type IV collagen (*vk*^{K00236}) enhanced the *sev-Gal4*>*UAS-i(CTG)*₄₈₀ phenotype.

Some modifiers of CUG toxicity control cell number. *Csk* negatively regulates the Src family of cytoplasmic tyrosine kinases. Mutations in *Csk*, which enlarge organs due to increased cell proliferation [27], suppressed i(CUG)₄₈₀ RNA toxicity (*Csk*^{1D8}). Mutations in the pro- and anti-cell death genes *spinster* and *thread* were suppressors and enhancers, respectively. *Drosophila* inhibitor of apoptosis protein (Diap), encoded by the *thread* (*th*) gene, showed complex interactions. Of the three alleles tested, loss-of-function *th*⁴ and *th*⁵ and gain-of-function *th*⁶⁻³⁵, only *th*⁴ strongly enhanced the CUG toxicity phenotype (Figure 5F). Nevertheless, *sev-Gal4* driven overexpression of *th* (*th*^{E^{P3308}}) in eyes simultaneously expressing i(CUG)₄₈₀ significantly suppressed the phenotype (Figure 5G) whereas expression of a control GFP transgene (*UAS-GFP*) under comparable conditions did not modify eye morphology. A similar suppression was observed upon expression

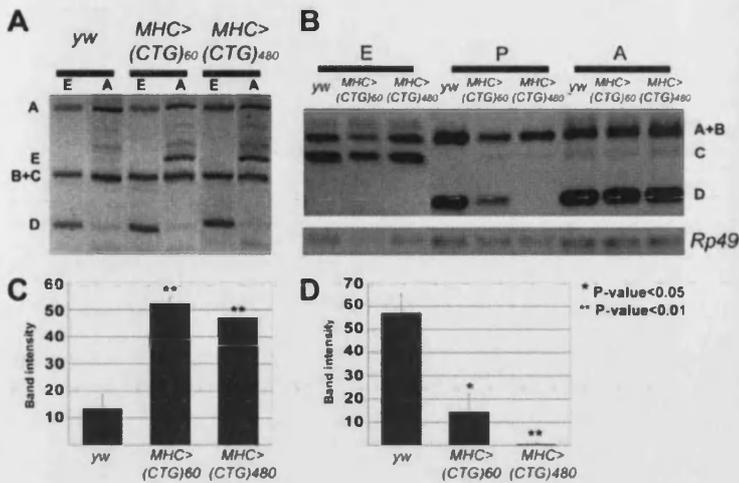


Figure 4. CUG repeat RNA misregulates alternative splicing of muscle genes *CG30084* and *TnT*. RT-PCR products from *CG30084* (A) and *TnT* (B) at the stages and from animals with the genotypes indicated. Bar graph representing intensities of ethidium bromide fluorescence (ranging from 0 to 100%, which equalled saturation) of band E (*CG30084*; C) and band D (*TnT*; D) from the specified genotypes. All RT-PCRs were within the linear range of amplification. Abbreviations used: 16–18 h after egg laying embryos (E); 2-day old pupae (P); 6–30 h after eclosion adults (A). All missplicing events were detected at least twice from independent RNA extractions. doi:10.1371/journal.pone.0001595.g004

of the closely related *Diap2* protein (*gmr-diap2* fusion construct). Furthermore, *th⁴* and *th⁵* dominantly enhanced *mb1C* overexpression in the *Drosophila* eye [28].

The *sev-Gal4>UAS-i(CTG)₄₈₀* eye phenotype was enhanced by halving the genetic dose of the mRNA export factor *Aly*. Several observations indicate a close relationship between mRNA export factors and exon junction complex (EJC) components [29]. However, when we tested a lethal mutation in EJC core component *tsunagi* (*tsu^{EP567}*) we found no effect. In summary we identified four cellular processes likely altered by CUG repeat

RNA: gene transcription, cell adhesion, programmed cell death and export of nuclear transcripts.

Targeted expression of expanded CUG repeats to the mushroom bodies produces a temperature-sensitive pupal lethal phenotype

Mushroom bodies (MBs) are brain structures involved in learning, sleep and memory. Because of the central nervous system involvement in DM1, we targeted expression of (CUG)₆₀

Table 1. Genetic enhancers and suppressors of a CUG-dependent rough eye phenotype

Gene	Description	Line	LOF/GOF alleles
<i>cnc</i>	bZIP transcription factor	l(3)j5E7	<i>cnc⁰³⁹²¹</i> S
<i>seven up</i>	orphan nuclear receptor	-	<i>svp¹, svp⁰⁷⁸⁴²</i> E
<i>Nurf-38</i>	Nucleosome remodeling factor	l(2)k16102	<i>Nurf-38^{k16102}</i> S
<i>jumeau</i>	FKH/WH transcription/remodeling factor	l(3)j8B6	<i>jumu⁰⁶⁴³⁹, jumu^{L70}</i> S
<i>foi</i>	zinc ion transporter	l(3)j8E8	<i>foi^{8E8}, foi^{neo13}</i> S
<i>viking</i>	alpha 2-chain type IV collagen	l(2)k00236	<i>vkg^{k00236}</i> E
<i>coro</i>	F-actin binding protein coronin	l(2)k08011	<i>coro^{exB}</i> S
<i>Csk</i>	negative regulator of Src protein family	l(3)j1D8	<i>Csk^{1D8}</i> S
<i>spinster</i>	cell death-inducing transmembrane protein	l(2)k09905	<i>spin^{k09905}</i> S
<i>thread</i>	inhibitor of apoptosis protein	-	<i>thread⁴/th^{EP3308}</i> E/S
<i>Aly</i>	mRNA export factor	-	<i>Aly⁰²²⁶⁷</i> E
<i>CG4589</i>	putative calcium binding protein	l(2)k10502	- E
-	probably affects mAcR-60C or <i>slik</i>	l(2)k00808	- S
-	unknown	l(2)k05911	- S
-	unknown	l(2)k09907	- E

Mutations assayed in the screen (Line). LOF/GOF column designates other loss (LOF) or gain-of-function (GOF) alleles showing interaction, or confirms that the line assayed is a known allele of the indicated gene. *svp¹*, *thread⁴* and *Aly⁰²²⁶⁷* were tested as candidate interacting mutations. None of the modifiers exhibit dominant eye phenotypes on their own. A second *vkg* loss-of-function allele (*vkg⁰¹²⁰⁹*) did not significantly modify eye morphology. Abbreviations: basic-leucine zipper (bZIP); fork head winged-helix (FKH/WH); Suppressor (Su); Enhancer (En).

doi:10.1371/journal.pone.0001595.t001

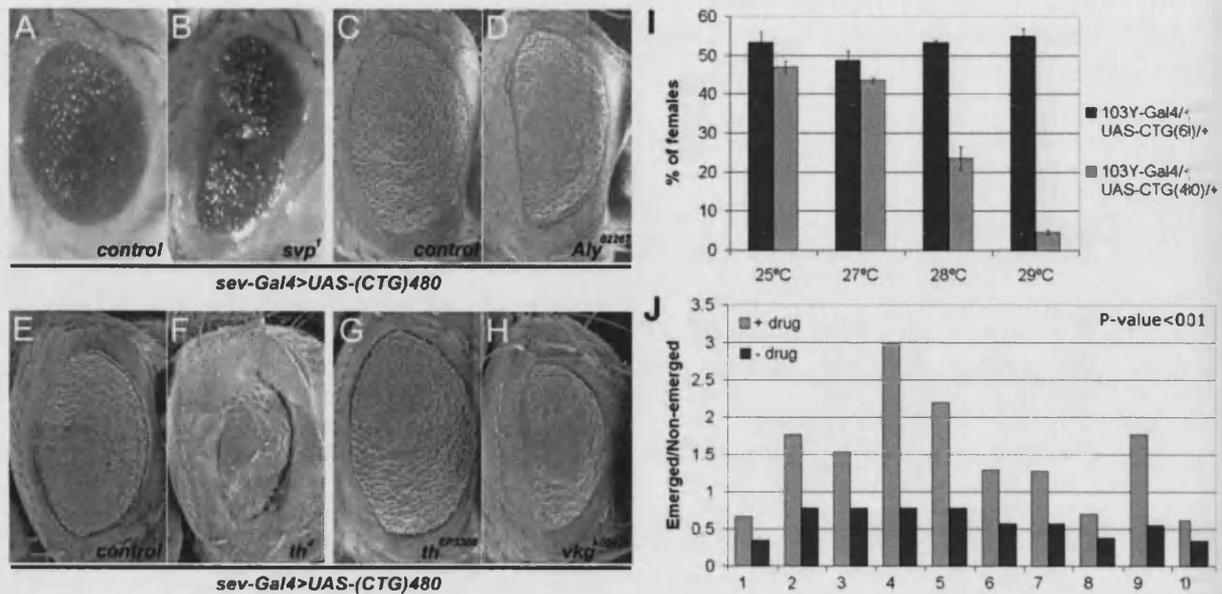


Figure 5. Dominant genetic enhancers and chemical suppressors of CUG-induced phenotypes. Stereomicroscope (A, B) and SEM C–H) views of adult *Drosophila* eyes. Female flies with the genotype *sev-Gal4 UAS-i(CTG)₄₈₀/+* (A, C, E) show eyes smaller than normal and externally rough. Both features increased in female flies heterozygous for *svp*¹ (B), *Aly*⁰²²⁶⁷ (D), *thread*⁴ (F) and *viking*^{k00236} (H) in the same genetic background whereas overexpression of *th* (*th*^{EP3308}, G) considerably improved morphology. Flies were raised at 25°C. (I) Percentage of viable females from crosses between the X-linked *103Y-Gal4* line and lines carrying the *UAS-i(CTG)₄₈₀* or *UAS-(CTG)₆₀* transgenes (note that only F₁ females express CUG RNA) at different temperatures. Only expression of 480 CUG RNA exhibited a temperature-dependent semilethal phenotype. Three independent MB-specific Gal4 driver lines showed a similar behaviour. (J) Emerged/non-emerged ratio measures the likelihood of survival of CUG-expressing females in control (–drug) and drug-treated flies (+drug). Abbreviations: 1, spironolactone; 2, metoclopramide; 3, ketoprofen; 4, nefopam; 5, orphenadrine; 6, proglumide; 7, ethisterone; 8, indomethacin; 9, clenbuterol; 10, thioguanosine. doi:10.1371/journal.pone.0001595.g005

and *i(CTG)₄₈₀* RNA to the *Drosophila* MBs (Figure 5I). Expression with the X-linked *103Y-Gal4* driver was not deleterious at 25°C. However, an increase in the level of expression (by raising the temperature) originated a female-specific semilethal phenotype in F₁ mature pupae expressing 480 interrupted CUG repeat RNA (Figure 5A). 28°C offered a threshold to CUG toxicity since only about 20% of emerged F₁ individuals were females (versus 50% expected) and some died during eclosion.

Reducing the genetic dose of *mbl* in a background expressing CUG repeats in the MBs (*103Y-Gal4/+; mbl^{E27}/+; UAS-i(CTG)₄₈₀/+*) reduced the number of F₁ females six fold compared to control flies that expressed CUG repeats only (*p*<0.001; Figure S3). Hence, targeted expression of *i(CTG)₄₈₀* RNA to the MBs sensitizes flies to the genetic dose of *mbl* supporting that the expression of CUG RNA in neurons reproduces a pivotal aspect of the DM1 pathogenesis, namely partial loss of *mbl* function.

Chemical modifiers of a CUG-induced neuronal phenotype

At 28°C the semilethal phenotype of *103Y-Gal4>UAS-(CTG)₄₈₀* flies was highly sensitive to small changes in expression of CUG RNA and was easy to quantify. It therefore provided a tool to screen chemical suppressors of the neuronal toxicity to CUG RNA. To this end, we assayed the ability of 400 compounds from the Prestwick Chemical Library (PCL), a collection of drugs selected for their biological activity, to increase viability of female flies expressing *i(CTG)₄₈₀* RNA in their MBs.

Drugs were tested individually diluted in nutritive media to ~5 μM, which carried along the maximum amount of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) that flies could tolerate (Figure S4), and the

number of adult females was compared to controls (Figure 5J). Statistical analysis identified ten molecules (*p*<0.01; 2.5% of total tested) that significantly suppressed CUG-induced lethality (Table S1).

Chemical suppressors were classified into five categories according to their mechanism of action (MOA), including non-steroidal anti-inflammatory agents, and drugs showing activity on sodium and calcium metabolism (Table 2). Dopaminergic and cholinergic neurons enervate motor neurons, which are among the most abundant neuron populations in the *Drosophila* MBs [30], [31]. Two classes of compounds identified specifically act on dopaminergic and cholinergic neurons, which suggests that *i(CTG)₄₈₀* RNA is toxic to these cell types. Genetic evidence supports this hypothesis; targeted expression of *i(CTG)₄₈₀* RNA to dopaminergic (*Ddc-Gal4*) and cholinergic (*Cha-Gal4*) neurons caused lethality (data not shown). Significantly, sodium channel blocker clenbuterol, which has been suggested effective to treat membrane excitability disorders including myotonic syndromes [32], [33], improved viability.

Compounds inhibiting Gal4 activity would lower transgene expression thus reducing toxicity to CUG RNA. Similarly, drugs might be working by stabilizing or degrading the CUG repeat RNA. To address these issues we first drove expression of the reporter *UAS-lacZ* with the *103Y-Gal4* line and measured β-galactosidase activity in flies taking suppressor drugs and controls (Table S1). None of the chemical suppressors tested significantly altered reporter expression. Second, we measured the level of expression of 480 interrupted CUG repeat RNA under the same conditions used for the chemical screen in flies taking suppressor compounds and controls taking DMSO. Levels of expression were comparable for all tested drugs

Table 2. Chemical suppressors of a CUG-induced semilethal phenotype

Biological Activity	Drug
Non-steroidal anti-inflammatory agents	<i>Ketoprofen</i> *
	<i>Indomethacin</i> *
Activity on dopamine receptors and monoamine uptake inhibitors	<i>Nefopam hydrochloride</i> **
	<i>Metoclopramide monohydrochloride</i> **
Muscarinic, cholinergic and histamine receptors inhibitors	<i>Orphenadrine hydrochloride</i> **
	<i>Proglumide</i> **
Activity on Na ⁺ and Ca ²⁺ metabolism	<i>Clenbuterol hydrochloride</i> **
	<i>Spiroglactone</i> *
Other activities	<i>Thioguanosine</i> *
	<i>Ethisterone</i> **

*indicates p-value<0.01

**indicates p-value<<0.001

Chemical suppressors of a CUG toxicity phenotype in pupal brain. Chemical suppressors were sorted by primary pharmacological activity. Assignments are based on different online sources, mostly PubChem and DrugBank databases. doi:10.1371/journal.pone.0001595.t002

(Figure S1B). Taken together these results suggest that candidate drugs did not significantly alter expression or stability of CUG repeat RNA and thus act through alternative mechanisms.

Discussion

Drosophila flies expressing 162 pure CTG repeats in the context of a 3'UTR reporter gene show no detectable pathological phenotype despite forming discrete ribonuclear foci in muscle cells [4]. This suggests that ribonuclear foci are not directly pathogenic but also that *Drosophila* might be refractory to CUG-induced toxicity since 162 pure CTG repeats are well within the pathogenic range in humans. In an attempt to express larger CTG repeat expansions, we and others [5] used synthetic, interrupted, CTG repeat minigenes [34] to model DM1 in flies. This was necessary because manipulation of large CTG repeat expansions is difficult due to their intrinsic instability and failure to amplify by PCR. Interrupted minigenes have been shown to reproduce molecular alterations characteristic of DM1, in particular missplicing of *cardiac troponin T* [34] and colocalization with *Muscleblind* in the cell nucleus [35], [5]; this work). In the fly, targeted expression of 480 interrupted CTG minigenes to the eye precursors generated phenotypes sensitive to the genetic dose of *muscleblind* and in the adult musculature produced muscle degeneration [5], this work). Furthermore, we describe missplicing of muscle transcripts (*CG30084* and *troponin T*). Although these are all alterations consistent with interrupted CTG repeats reproducing the behavior of pure CTG repeats, it remains formally possible that interrupting CTGA repeats initiate molecular alterations unrelated to those of pure CUG repeat RNA, or somehow modify CUG-dependent toxicity. In this regard recent evidence shows that CGG trinucleotide repeats in permutation alleles of the fragile X gene (*FMR1*) cause neurodegeneration in *Drosophila* [36], [37] and involve disruption of RNA-binding protein function (hnRNP A2, Pur α and CUG-BP1) as similarly described for alternative splicing regulators *Muscleblind* and CUG-BP1 in DM1. Thus, trinucleotide repeats similar to CTG have the capacity to cause RNA gain of function effects through mechanisms distinct from those described for CTG repeats.

DM1 was the first example of spliceopathy, i.e. expression of splice products that are developmentally inappropriate for a particular tissue. CUG repeat RNA effectively misregulated alternative splicing of Z-band component *CG30084* in *Drosophila*, leading to a strong increase of a transcript isoform we detect as RT-PCR band E (Figure 4A), whereas such isoform was almost absent in control adult flies. Similarly, expression of a *Drosophila TnT* transcript isoform we detect as RT-PCR band D (Figure 4B) was repressed in pupae expressing CUG repeat RNA, also leading to a developmentally abnormal alternative splicing. Expression of 60 CUG repeats altered alternative splicing of *CG30084* and *TnT* transcripts although these repeats did not appreciably affect muscle morphology and did not accumulate in ribonuclear foci. The apparent mismatch between molecular and cellular markers of pathology merits further consideration. First, we detect a mild eye phenotype in flies expressing 60 CUG repeats (Figure 3E) thus suggesting that 60 CTG repeats are indeed toxic to *Drosophila* cells but the phenotypes may be too weak to detect. Second, because the role of the ribonuclear foci in the disease state is currently unclear (foci are not pathogenic *per se*, at least in *Drosophila* [4]), absence of foci is not evidence that 60 CTG repeats are not toxic to *Drosophila* cells. Finally, the relevance of the alternative splicing alterations we detect in the *TnT* and *CG30084* genes is currently unknown. However, we do note that all normal alternative splicing products are detected in *CG30084* and appearance of band D is only delayed in *TnT* splicing. Therefore, we suggest that the apparent lack of match between phenotype and molecular defects in flies expressing 60 CUG repeat RNA might stem from the very different sensitivities of molecular methods and standard phenotypic assessment methods. Expectation was that flies expressing toxic RNA would show splice abnormalities typical of *mbl* loss-of-function [10]. However, we can not verify this prediction because no loss of *mbl* function phenotypes have been described in pupae and adults so far. We do notice, nevertheless, that expression of CUG repeat RNA in *Drosophila* embryos does not mimic molecular alterations described for *mbl* mutants [11], but we found inconsistencies in such description (Figure S2). It is also likely that sequestration of Mbl by CUG RNA is incomplete, thus not generating a *mbl* null-like molecular phenotype. Indeed, the splicing of *CG30084* was unaffected in *mbl* heterozygous embryos [11] demonstrating that even a reduction of 50% in Mbl protein is insufficient to interfere with splicing of *CG30084*.

Splicing of defined pre-mRNAs is defective in DM1, but the cellular readout of those changes is only beginning to be understood. The isolation of genetic enhancers and suppressors of a CUG-induced phenotype provides an unbiased approach for their identification. Our genetic screen recovered transcription and chromatin remodelling factors as modifiers. Previous observations have linked CUG toxicity to altered gene transcription [38]. Weakened cell adhesion due to impaired basement membrane, cell adhesion receptors, or both, might explain detachment of subretinal cells and sensitivity to the genetic dose of basement membrane component *vkg* and genes also influencing cell adhesion and cytoskeleton dynamics such as *cnc* [23], *coro* [25], and *foi* [26]. CUG repeat RNA might impair cell adhesion and sensitize cells to programmed cell death thus accounting for the reduction in eye size, and interaction with pro-apoptotic *spin* and apoptosis inhibitor *th*. Cell loss has been reported in specific brain areas of DM1 patients [1]. Cultured DM1 lens cells also show increased cell death, although the triggering event appears to be high intracellular Ca²⁺ levels [39]. Isolation of mutations in mRNA export factor *Aly* as enhancers, finally, possibly underscores the relevance of changes in nuclear accumulation of (CUG)₄₈₀ transcripts for toxicity.

Out of 400 drugs tested we identified ten that notably alleviated neuronal toxicity to CUG RNA. Assuming that the known MOA of the suppressor drugs apply to *Drosophila*, we found a number of molecules that inhibit neuron excitation through distinct mechanisms. These include dopamine D2 receptor antagonists (metoclopramide), inhibitors of monoamine reuptake (nefopam), and muscarinic and histamine receptor blockers (orphenadrine). Mutations that decrease or increase membrane excitability are known to trigger neurodegeneration to varying degrees in *Drosophila* [40]. Expanded CUG repeats might similarly induce excitotoxicity to MB neurons. Alternatively, neuronal hyperactivation may affect motor neurons in the brain, because pupae failed to emerge but were viable if released from puparium manually.

Using our CUG RNA fly model we identified mutations and drugs that significantly modified CUG toxicity phenotypes. These results advance our understanding of the cellular processes altered by CUG RNAs and provide a proof-of-concept data that *Drosophila* DM1 models can be successfully utilized for chemical screens.

Materials and Methods

Drosophila transgenics

Construct *UAS-(CTG)₆₀* was generated by subcloning 54 uninterrupted CTG repeats from the pCTG54 plasmid [41] into the *EcoRI/BamHI* sites of the *Drosophila* expression vector pUAST. Sequencing of the construct revealed that repeats expanded to 60 during cloning. Because DM1 alleles carrying longer expansions probed intractable we decided to use synthetic CTG repeats interrupted every 20 CTG units by the sequence CTCGA [34]. CTG repeats in sp72 (Promega) were digested with *XhoI* and cloned into the same site in pUAST to generate the *UAS-i(CTG)₄₈₀* construct. Both transgenes were injected into *y¹w¹¹¹⁸* embryos and independent lines established (6 *UAS-(CTG)₆₀* and 14 *UAS-i(CTG)₄₈₀*). Nine out of 14 *UAS-i(CTG)₄₈₀* lines were crossed to *T80-Gal4*, *sev-Gal4*, *gmr-Gal4* and *Mhc-Gal4* (see below for a description of these drivers) at different temperatures of culture. Of these, seven (1.1, 2.2, 3.3, 6.4, 7.1, 9.2, 13.1) revealed externally similar phenotypes in eyes, thorax/wing positioning, or ability to fly. Subsequent experiments were carried out with transgenic line 1.1, except for the assessment of nuclear CUG repeat RNA foci formation, which was also performed with transgenic line 2.2 giving the same qualitative result. Transgenic flies *UAS-mblC:GFP* will be described elsewhere. Briefly, the coding region of *mblC* was amplified by PCR and cloned in frame with GFP into pGFP-N3 (Clontech). The entire fusion gene was excised with *BglII/NotI* and subcloned into pUAST digested with the same enzymes. Transgenic flies were generated as above.

Fly strains and crosses

Mhc-Gal4 was obtained from G. Davis [42]; *gmr-Gal4* from A. Ferrús (Instituto Cajal, Madrid); *sev-Gal4* from M. Mlodzik (Mount Sinai School of Medicine, New York); *103Y-Gal4* from J.D. Armstrong [43] and *Ddc-Gal4* from Mel Feany [44]. All other strains were from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (Indiana) except for our own *mbl* mutant stocks and *UAS-MBNL1* flies [45]. *mbl⁷¹⁰³* is a P{lacW} insertion approximately 57 bp upstream of the *mblA* mRNA start site [46]. *mbl^{E27}* is an imprecise excision from P{lacW} insertion *mbl^{p5507b}* that removes exons 1 and 2 [47]. Females of the genotype *y¹w¹¹¹⁸; UAS-i(CTG)₄₈₀1.1 sev-Gal4/TM3* were crossed to males from a collection of 695 P{lacW} lethal insertions on the 2nd and 3rd chromosomes [48]. To produce the genotypes shown in Figure 2A *y¹w¹¹¹⁸; UAS-i(CTG)₄₈₀1.1* females were crossed to *y¹w¹¹¹⁸; hs-Gal4/CyO y⁺; UAS-mblC:GFP/+* males and adult offspring, in plastic vials, were heat shocked at 37°C for 1 h.

Scanning electron microscopy (SEM) and histology

Adult *Drosophila* eyes and thoraces were dissected out and embedded in Epon for transversal semi-thin sectioning [49] or processed for SEM [50]. Alternatively, thoraces were embedded in OCT and transversal sections (12 μm) were taken with a Leica CM 1510S cryomicrotome. Sections were processed for *in situ* hybridization with a Cy3-labeled (CAG)₁₀ probe and fluorescent detection of the MblC:GFP fusion protein as described [4]. SEM images were from a HITACHI S-2500. Image Manager Leica IM50 software was used to acquire cross-sectional muscle and vacuole areas.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay

Total RNA was extracted using Tri-Reagent (Sigma). To analyze the splicing patterns, 5 μg of total RNA were treated with DNase I and reverse transcribed (RT) with SuperScriptII RNase H⁻ RT following instructions from the provider (Invitrogen). 10 μl of a 1:25 dilution (*CG30084*), 1 μl (*Drosophila TnT*) or 1 μl of a 1:100 dilution (*Rp49*) of the RT reaction were used as template in a standard 50 μl (*CG30084*) or 20 μl (*TnT, Rp49*) PCR using TaKaRa LA Taq (*CG30084*) or *Thermus thermophilus* DNA polymerase (Netzyme, NEED) (*TnT, Rp49*) polymerases. For cycling conditions, primer sequences and annealing temperatures see supplementary materials and methods (Text S1) and Table S2.

Compound administration and screen

Laying pots from *en masse* crosses (*yw*; +; *UAS-i(CTG)₄₈₀1.1×103Y-Gal4/Y*; +; +) were periodically checked for first instar larvae. Ten male larvae of the genotype *yw/Y*; +; *UAS-i(CTG)₄₈₀1.1* and 20 female larvae with the genotype *yw/103Y-Gal4*; +; *UAS-i(CTG)₄₈₀1.1* were hand-picked and transferred to vials with 1 ml of Instant *Drosophila* Medium (SIGMA) containing 5 μM of compound or 0.1% DMSO in controls. 400 compounds of the PCL (Tables S3 and S4) were individually tested in triplicate. Cultures were grown at 28°C and the sex of adults scored. Males were used as internal controls to discard unviable cultures or toxic drugs. Compounds showing activity in the initial screen ($p < 0.01$; 30 drugs) were independently tested two more times in triplicate as above. For β-galactosidase activity readings and DMSO toxicity assays see supporting materials and methods.

Statistical analysis

For the chemical screen, the following modification of the Fisher's exact test ($\alpha = 0.01$) was used to analyze data from small size samples:

$$P = \sum_{i=1}^{a+1} P_i = \sum_{i=1}^{a+1} \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{(a+1-i)!(b-1+i)!(c-1+i)!(d+1-i)!n!}$$

where a is emerged females from control; b is dead females from control; c is emerged females from drug treated culture; d is dead females from drug treated culture. The number of emerged and dead females after drug administration was compared to that in control cultures. Data from all replicates was summed up and treated all together in order to increase the power of the test giving a final n = 60 (initial screen), or 180 for those drugs that were re-tested. We note that because the test we developed is exact, meaning by that we know the probability of the first species error and the potency of the test, the number of false positives does not increase with the continued use of the test. A t-student test was applied to all other comparisons between two groups.

Supporting Information

Text S1 It contains supplementary material and methods and supplementary reference list

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0001595.s001 (0.04 MB DOC)

Figure S1 Levels of transgene expression. RT-PCR detection of CUG repeat RNA from UAS-(CTG)₆₀ and UAS-i(CTG)₄₈₀ transgenes (A) and from UAS-i(CTG)₄₈₀ (B), driven by the indicated Gal4 line, in the presence of DMSO (control, 1), spirolonactone (2), clenbuterol (3), metoclopramide (4), ethisterone (5), orphenadrine (6), thioguanosine (7), and ketoprofen (8) at the same concentrations used in the chemical screen. RNA from yw flies was used as negative control and Rp49 transcripts were amplified as control of input RNA. (A) Levels of expression from both the UAS-(CTG)₆₀ and UAS-i(CTG)₄₈₀ transgenes were equivalent both in pupae (P) and adult flies (A).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0001595.s002 (4.24 MB TIF)

Figure S2 Genomic organization of CG30084 and alternative splicing isoforms detected. Exon usage in RT-PCR bands A to D (embryonic) and E (adult) according to the nomenclature used in Figure 3A. Bands A to D correspond to bands a to d in [11]. According to our results exon 12b is not detected in any RT-PCR product and exon composition of all bands shows inconsistencies with the published description [11].

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0001595.s003 (0.37 MB TIF)

Figure S3 CUG repeat RNA interferes with Muscleblind function in the brain structures the mushroom bodies. Expression of expanded CUG repeat RNA in the mushroom bodies of female flies is detrimental as only 32 individuals out of 214 were female in contrast with the expected 107 (second column; O/E ratio of 0.3). Flies heterozygous for mbl mutant allele mblE27 that simultaneously express CUG repeat RNA in their MBs show a further six fold reduction in viable female flies. 5 flies of the genotype of interest out of 368 were observed versus an expected number of 92 (O/E ratio of 0.05). Note that the presence of the transgene alone does not affect survival as the O/E ratio in males is still 1. These results show that muscleblind function is compromised in CUG-expressing MB neurons, thereby confirming the relevance of this phenotype to study DM1 defects in the brain. *** indicates p-value <<0.0001.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0001595.s004 (0.72 MB TIF)

Figure S4 Toxicity of DMSO carrier. yw larvae were fed food containing increasing concentrations of DMSO and the number of

individuals that reached adulthood was scored. Ten larvae were tested per replicate and up to five replicates were analyzed for each concentration. DMSO was not toxic up to 0.1% whereas concentrations of 0.15% or higher reduced viability in a dose-responsive manner when compared to controls; *** indicates p-value << 0.001. Bars represent standard deviations.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0001595.s005 (0.04 MB TIF)

Table S1 Complete list of chemical suppressors of a CUG-dependent semilethal phenotype. Drugs are listed alphabetically along with their main known activity in human cells, effect on expression of the UAS-lacZ reporter (measured by the enzymatic activity of β -galactosidase), and chemical structure. β -galactosidase activity comparisons between drug-treated flies and controls were only performed when total protein quantifications found no significant differences between samples.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0001595.s006 (0.08 MB DOC)

Table S2 Names, sequences and annealing temperatures of primers used in this work.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0001595.s007 (0.04 MB DOC)

Table S3 Complete listing of drugs assayed in this study

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0001595.s008 (0.04 MB XLS)

Table S4 Primary data from the chemical screen. For each compound we show in columns the number of females that emerged/not emerged in drug treated and control cultures as well as the p-value of the statistical analysis. Rows contain the results from each replicate, with triplicates from independent experiments highlighted with the same colour.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0001595.s009 (0.06 MB XLS)

Acknowledgments

We thank M. Pérez-Alonso, P. Morcillo, A. Tapanes and F. Aparisi for discussions, E. Perez-Paya for providing an aliquot of the PCL and M. Pascual for contributing transgenic flies *UAS-mblC:GFP*.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RA AG LM. Performed the experiments: MV AG LM IG MA. Analyzed the data: RA AG LM. Wrote the paper: RA AG LM.

References

- Harper P (2001) Myotonic dystrophy. London: Saunders.
- Ranum LP, Cooper TA (2006) RNA-Mediated Neuromuscular Disorders. *Annu Rev Neurosci*.
- Mankodi A, Logigian E, Callahan L, McClain C, White R, et al. (2000) Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289: 1769–1773.
- Houseley JM, Wang Z, Brock GJ, Soloway J, Artero R, et al. (2005) Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 14: 873–883.
- Haro MD, Al-Ramahi I, Gouyon BD, Ukani L, Rosa A, et al. (2006) MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of Myotonic Dystrophy Type 1. *Hum Mol Genet*.
- Fardaci M, Rogers MT, Thorpe HM, Larkin K, Hamshere MG, et al. (2002) Three proteins, MBNL1, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* 11: 805–814.
- Jiang H, Mankodi A, Swanson MS, Moxley RT, Thornton CA (2004) Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet* 13: 3079–3088.
- Mankodi A, Lin X, Blaxall BC, Swanson MS, Thornton CA (2005) Nuclear RNA foci in the heart in myotonic dystrophy. *Circ Res* 97: 1152–1155.
- Kanadia RN, Urbinati CR, Crusselle VJ, Luo D, Lee YJ, et al. (2003) Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3. *Gene Expr Patterns* 3: 459–462.
- Lin X, Miller JW, Mankodi A, Kanadia RN, Yuan Y, et al. (2006) Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 15: 2087–2097.
- Machuca-Tzili L, Thorpe H, Robinson TE, Sewry C, Brook JD (2006) Flies deficient in Muscleblind protein model features of myotonic dystrophy with altered splice forms of Z-band associated transcripts. *Hum Mol Genet* 120: 487–499.
- Vicente M, Monferrer L, Poulos MG, Houseley J, Monckton DG, et al. (2007) Muscleblind isoforms are functionally distinct and regulate alpha-actinin splicing. *Differentiation*.
- Paul S, Dansithong W, Kim D, Rossi J, Webster NJ, et al. (2006) Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *Embo J* 25: 4271–4283.
- Dansithong W, Paul S, Comai L, Reddy S (2005) MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1. *J Biol Chem* 280: 5773–5780.
- Kanadia RN, Shin J, Yuan Y, Beattie SG, Wheeler TM, et al. (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: 11748–11753.

16. Mahadevan Ms, Fau-Yadava RS, Yadava Rs, Fau-Yu Q, Yu Q, Fau-Balijepalli S, Balijepalli S, Fau-Frenzel-McCardell CD, Frenzel-McCardell Cd, Fau-Bourne TD, et al. (2006) Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in. *Nat Genet* 38: 1066–1070.
17. Kurihara T (2005) New classification and treatment for myotonic disorders. *Intern Med* 44: 1027–1032.
18. Gomes-Pereira M, Monckton DG (2006) Chemical modifiers of unstable expanded simple sequence repeats: What goes up, could come down. *Mutat Res* 598: 15–34.
19. Furuya H, Shinnoh N, Ohyagi Y, Ikezoe K, Kikuchi H, et al. (2005) Some flavonoids and DHEA-S prevent the cis-effect of expanded CTG repeats in a stable PC12 cell transformant. *Biochem Pharmacol* 69: 503–516.
20. Monferrer L, Artero R (2006) An interspecific functional complementation test in *Drosophila* for introductory genetics laboratory courses. *J Hered* 97: 67–73.
21. Kanadia RN, Johnstone KA, Mankodi A, Lungu C, Thornton CA, et al. (2003) A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302: 1978–1980.
22. Mohler J, Mahaffey JW, Deutsch E, Vani K (1995) Control of *Drosophila* head segment identity by the bZIP homeotic gene *cnc*. *Development* 121: 237–247.
23. Guichet A, Peri F, 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.
24. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R, et al. (2002) IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 110: 191–202.
25. Bharathi V, Pallavi SK, Bajpai R, Emerald BS, Shashidhara LS (2004) Genetic characterization of the *Drosophila* homologue of coronin. *J Cell Sci* 117: 1911–1922.
26. Mathews WR, Ong D, Milutinovich AB, Van Doren M (2006) Zinc transport activity of Fear of Intimacy is essential for proper gonad morphogenesis and DE-cadherin expression. *Development* 133: 1143–1153.
27. Read RD, Bach EA, Cagan RL (2004) *Drosophila* C-terminal Src kinase negatively regulates organ growth and cell proliferation through inhibition of the Src, Jun N-terminal kinase, and STAT pathways. *Mol Cell Biol* 24: 6676–6689.
28. Vicente-Crespo M, Pascual M, Fernandez-Costa J, Garcia-Lopez A, Monferrer L, et al. *Drosophila* Muscleblind is involved in *troponin T* Alternative Splicing and Apoptosis. *Plos One*. In press.
29. Gatfield D, Izaurralde E (2002) REF1/Aly and the additional exon junction complex proteins are dispensable for nuclear mRNA export. *J Cell Biol* 159: 579–588.
30. Neckameyer WS (1998) Dopamine and mushroom bodies in *Drosophila*: experience-dependent and -independent aspects of sexual behavior. *Learn Mem* 5: 157–163.
31. Gu H, O'Dowd DK (2006) Cholinergic synaptic transmission in adult *Drosophila* Kenyon cells in situ. *J Neurosci* 26: 265–272.
32. Fischer W, Kitner H, Regenthal R, Malinowska B, Schlicker E (2001) Anticonvulsant and sodium channel blocking activity of higher doses of clenbuterol. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363: 182–192.
33. Desaphy JF, Pierno S, De Luca A, Didonna P, Camerino DC (2003) Different ability of clenbuterol and salbutamol to block sodium channels predicts their therapeutic use in muscle excitability disorders. *Mol Pharmacol* 63: 659–670.
34. Philips AV, Timchenko LT, Cooper TA (1998) Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280: 737–741.
35. Ho TH, Savkur RS, Poulos MG, Mancini MA, Swanson MS, et al. (2005) Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *J Cell Sci* 118: 2923–2933.
36. Sofola OA, Jin P, Qjn Y, Duan R, Liu H, et al. (2007) RNA-binding proteins hnRNP A2/B1 and CUGBP1 suppress fragile×CGG premutation repeat-induced neurodegeneration in a *Drosophila* model of FXTAS. *Neuron* 55: 565–571.
37. Jin P, Duan R, Qurashi A, Qjn Y, Tian D, et al. (2007) Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a *Drosophila* model of fragile×tremor/ataxia syndrome. *Neuron* 55: 556–564.
38. Ebralidze A, Wang Y, Petkova V, Ebralidze K, Junghans RP (2004) RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* 303: 383–387.
39. Rhodes JD, Monckton DG, McAbney JP, Prescott AR, Duncan G (2006) Increased SK3 expression in DM1 lens cells leads to impaired growth through a greater calcium-induced fragility. *Hum Mol Genet* 15: 3559–3568.
40. Fergestad T, Ganetzky B, Palladino MJ (2006) Neuropathology in *Drosophila* membrane excitability mutants. *Genetics* 172: 1031–1042.
41. Miller JW, Urbinati CR, Teng-Umnay P, Stenberg MG, Byrne BJ, et al. (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *Embo J* 19: 4439–4448.
42. Marek KW, Ng N, Fetter R, Smolik S, Goodman CS, et al. (2000) A genetic analysis of synaptic development: pre- and postsynaptic dCBP control transmitter release at the *Drosophila* NMJ. *Neuron* 25: 537–547.
43. Tettamanti M, Armstrong JD, Endo K, Yao Yang M, Furukubo-Tokunaga K, et al. (1997) Early development of the *Drosophila* mushroom bodies, brain centres for associative learning and memory. *Dev Genes Evol* 207: 242–252.
44. Li H, Chaney S, Roberts IJ, Forte M, Hirsh J (2000) Ectopic G-protein expression in dopamine and serotonin neurons blocks cocaine sensitization in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 10: 211–214.
45. Garcia-Casado MZ, Artero RD, Paricio N, Terol J, Perez-Alonso M (2002) Generation of GAL4-responsive muscleblind constructs. *Genesis* 34: 111–114.
46. Prokopenko SN, He Y, Lu Y, Bellen HJ (2000) Mutations affecting the development of the peripheral nervous system in *Drosophila*: a molecular screen for novel proteins. *Genetics* 156: 1691–1715.
47. Begemann G, Paricio N, Artero R, Kiss I, Perez-Alonso M, et al. (1997) muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* 124: 4321–4331.
48. FlyBase (2003) The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Res* 31: 172–175.
49. Tomlinson A, Ready DF (1987) Cell fate in the *Drosophila* ommatidium. *Dev Biol* 123: 264–275.
50. Fernandez-Funez P, Nino-Rosales ML, de Gouyon B, She WC, Luchak JM, et al. (2000) Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature* 408: 101–106.
51. Bate M (1993) The mesoderm and its derivatives. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha acordó otorgar a esta Tesis Doctoral de

D./D^a **AMPARO GARCÍA LÓPEZ**

la calificación de *Sobresaliente CUM LAUDE*

Valencia, a ...17.. deseptiembre..... de ...2010.....

EL/LA SECRETARIO/A,

EL/LA PRESIDENTE/A

[Handwritten signature]
Dr. D. Manuel Pérez Alonso

[Handwritten signature]
E. Pérez Payá



Dr. D. Enrique Pérez Payá