



VNIVERSITAT  
D<sup>NI</sup> VALÈNCIA

# **DESCUBRIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA ESTEFENANTRINA COMO FÁRMACO PARA LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1**

Memoria realizada en el programa de doctorado de Biotecnología, bajo la dirección de los doctores Rubén Artero Allepuz, Arturo López Castel y Manuel Pérez Alonso, presentada por

**Irma García Alcover**

para optar al grado de Doctora por la Universidad de Valencia

Valencia, 2015



D. Rubén Artero Allepuz, Doctor en Biología y Profesor Titular del Departamento de Genética de la Universidad de Valencia, D. Arturo López Castel, Doctor en Biología y Director Científico de la empresa Valentia Biopharma S.L. y D. Manuel Pérez Alonso, Doctor en Biología y Profesor Titular del Departamento de Genética de la Universidad de Valencia

**CERTIFICAN:**

Que Dña. Irma García Alcover, licenciada en Biología por la Universitat de València, ha realizado bajo su codirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “Descubrimiento y caracterización de la estefenantrina como fármaco para la Distrofia Miotónica Tipo 1”.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para la obtención del grado de Doctora.

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

En Valencia, a 13 de Enero de 2015

**Dr. Rubén Artero Allepuz   Dr. Arturo López Castel   Dr. Manuel Pérez Alonso**





Para la realización de la presente Tesis Doctoral, la autora ha disfrutado de una beca predoctoral de la Conselleria d'Educació e Industria (5/2007). Dentro del marco de esta tesis, la autora fue también beneficiaria de fondos para la realización de una estancia de cuatro meses en la Universidad de Virginia, Charlottesville, USA.

El trabajo se ha enmarcado dentro del proyecto "New therapeutic approaches for myotonic dystrophy: functional genomics and in vivo drug discovery studies" financiado por la Fundación Genoma España.



A Carmen



## **AGRADECIMIENTOS**

Tengo tanta gente a la que agradecer el que por fin este proyecto vea la luz que espero no dejarme a nadie...

Debo agradecer a Manuel el haberme “captado” para esto de la genética con moscas por primera vez y por haber tenido esa fantástica idea que es Valentia Biopharma. A él, junto con Nuria y Rubén debo agradecerles el haberme aceptado en lo que un día fue GMD. A Rubén, agradecimiento especial por haberme aceptado como doctoranda y guiarme durante esos primeros tiempos de oscuridad total, así como por toda la paciencia y tiempo invertido durante la dirección de mi tesis, sobretodo en esta etapa final. A Arturo, gracias por haberme guiado en el trabajo día a día, por darme ánimos y ver siempre el lado positivo de las cosas.

Gracias a los compañeros de aquel GMD inicial, a Lidón y Vero por esos consejos sabios sobre la ciencia y la vida, que tan útiles me han sido después. A Yaiza, por esa contagiosa dedicación extrema y esas noches de compañía en el laboratorio. A Ana Villalba, por habernos hecho reír tantas veces con tus historias. A JuanMa, por poner siempre banda sonora a los experimentos y por ese buen humor que vas contagiando a todo el lab. A Bea, por enseñarme a quitarle importancia a las cosas y a reír siempre que pueda. A Fabrice, por fofilar, por dejarse regar y por tantas historias! Sobretodo por tu buen humor y disposición a ayudar en todo momento. A Amparillo, por tantas cosas que no se ni

## *Agradecimientos*

por dónde empezar? por enseñármelo todo sobre moscas y ciencia, por tener santa paciencia con mis errores iniciales, por pelear por mí cuando yo no me atrevía a hacerlo, por liarme para que fuera en kayak, para ir a aquella cena freaky, por hacerme subir en barco con lo que me mareo...y por tantas y tantas historias que hemos compartido, por lo bien que me lo has hecho pasar y lo mucho que me has hecho aprender. A M<sup>a</sup> Carmen, nuestros caminos han ido prácticamente en paralelo, así que vas a aparecer en tantos sitios... pero aquí voy a agradecerte por esas miles de horas de compañía sacando vírgenes y sembrando larvas!

Gracias también a toda la gente del departamento de genética con los que he compartido tantos momentos buenos, a Josep, Jose Luis, Amparo, Sirena, Camila, Patri, Cristina, Iván, Gloria por haber creado ese ambiente de buen rollo en las comidas y pasillos. A Agata en especial por esas clases de español, por haberme escuchado y animado siempre. A Javi, por haber sido triple compañero de departamento, máster y Valentia, por tener las cosas tan claras y tirar siempre para adelante.

A los técnicos de genética, a J, Fede, Javi y Nuria, por hacernos las cosas más fáciles aunque a vayamos a última hora.

A mis compañeros de Valentia, a Raquel, por haberme ayudado con la puesta a punto del screening. A Jose Rubén, por tu calma y capacidad de comunicación, por toda tu ayuda personal y científicamente en esos primeros años de Valentia. A Jordi, además de por tu ayuda con las moscas, el screening y los in situs, por todo ese conocimiento freaky y esas paridas que nos hacían reír a todas. A Rebeca, por haber hecho

posible que Valentia sea una realidad, por tu comprensión y apoyo cuando me han hecho falta y por ser un ejemplo de cómo se puede tirar siempre hacia delante. A M<sup>a</sup> Carmen, de nuevo, por todas esas tardes mano a mano marujeando en Valentia. A Isa, por todas esas horas en el animalario, por esos viernes de subidón y por tantas y tantas veces que nos has hecho reír a todos. A Aida, porque sin ti esta tesis no hubiera sido posible, no sólo por tu ayuda con todo el trabajo de laboratorio, desde moscas hasta extracciones y tantas miles de cosas que has hecho por mí, sino también por haberme escuchado siempre, por todo el apoyo que me has dado durante tantos años, sobretodo en esos inicios tan duros. A mi único compañero este último año, a Juanma, por haber continuado con ese buen humor a pesar de todo. A Silvia, esa gran desconocida hasta este último año, por toda tu ayuda con todo lo que son papeleos y escaneados y por recomendarme tantísimos libros. A Arturo, por ser compañero además de jefe, por escucharme y entenderme siempre. Gracias a todos los becarios que han pasado por Valentia y que han ayudado de un modo u otro, en especial a Edu, porque sufría con las dichosas clonaciones casi más que yo.

Gracias al personal del animalario, a Inma, las Amparos, a Jesús, a Rafa, por estar siempre dispuestos a ayudar y por ese buen ambiente que han creado que hace que apetezca ir a trabajar allí.

Gracias también a todas las personas con las que me he cruzado en algún momento durante mi vida científica, a los que me han enseñado cosas o facilitado faenas de la tesis.

También han sido de gran importancia todas aquellas personas que me han apoyado desde fuera del mundo científico. Las biólogas, Amparo,

## *Agradecimientos*

Ana, Carmen y Lorena, por haberme escuchado en mis momentos buenos y malos, por haber compartido conmigo los mismos temores e incertidumbres, pero sobretodo por todos esos buenos momentos vividos juntas. A los pedorros, M<sup>a</sup> Carmen (sí, otra vez, aunque tú no escribas agradecimientos), a David, a Arantxa, gracias también por haberme ayudado con todos los papeleos de la tesis, y mención especial a Salva, por haberme animado y guiado en esos primeros momentos, sin ese empujón puede nunca hubiera escrito esta tesis.

A mi familia, a mis padres y mi hermana, por vuestro apoyo incondicional, por haber estado siempre ahí y haberme dado las fuerzas y el ánimo cuando me han hecho falta. Y en especial gracias a mis padres por haber sido tan cansinos y no haber dejado de incordiarme con la frase: “cómo va la tesis?”.

A JuanRa, por tantos años queriéndome, por haberme animado siempre a terminar este proyecto, por quererme, por ser siempre mi punto de apoyo y enseñarme tantísimas cosas.

A Carmen, por haberse dormido algunas noches pronto y haberme dejado escribir esta tesis, por entender que “las mamás también trabajan” y darme un motivo por el que continuar.

A María, que aún está por llegar, pero que me ha dado el empujón final que necesitaba para terminar esta tesis.

A todos, y perdón si me he dejado a alguien, muchas gracias, al fin y al cabo el trabajo sólo sale adelante si hay un buen equipo detrás y todos vosotros habéis contribuido de un modo u otro a que esta tesis sea una realidad.



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. La Distrofia Miotónica tipo 1.....	1
1.1. Manifestaciones clínicas.....	1
1.2. Alteraciones histopatológicas y séricas.....	4
1.3. Alteraciones moleculares.....	4
2. Base genética de la Distrofia Miotónica: los loci DM1 y DM2.....	6
3. Patogénesis de la Distrofia Miotónica .....	8
3.1. Alteración de factores de <i>splicing</i> alternativo.....	11
3.2. Alteración de factores de transcripción.....	14
3.3. Desregulación de microRNAs.....	15
3.4. Silenciamiento de genes por generación de fragmentos de siRNA.....	17
3.5. Traducción sin ATG asociada a repeticiones.....	18
3.6. Papel de DMPK.....	19
3.7. Cambios epigenéticos.....	20
4. Papel de las proteínas Muscleblind en el desarrollo de DM1.....	25
4.1. MBNL1-3 son proteínas de dedos de zinc.....	25
4.2. Función molecular de las proteínas Muscleblind en el metabolismo del RNA.....	28
4.3. Papel de las proteínas Muscleblind en la diferenciación terminal.....	32
4.4. Las proteínas MBNL1 y CELF1 regulan el <i>splicing</i> durante el desarrollo.....	35

5. Modelos animales de DM1.....	37
5.1. Modelos en <i>C.elegans</i> .....	38
5.2. Modelos en <i>D.rerio</i> .....	39
5.3. Modelos en <i>Drosophila</i> .....	40
5.4. Modelos en <i>Mus musculus</i> .....	43
6. Tratamientos y terapias contra la DM1.....	47
6.1. La expansión de las repeticiones y la inestabilidad somática	48
6.2. Los niveles de RNA tóxico.....	49
6.2.1. Ribozimas.....	49
6.2.2. Oligonucleótidos antisentido.....	51
6.3. La horquilla de RNA.....	53
6.4. La unión RNA tóxico-proteínas.....	54
6.5. Modificar los niveles de las proteínas de unión al RNA.....	56
6.6. Restaurar el <i>splicing</i> de los transcritos alterados.....	58
6.7. Paliar síntomas.....	59
7. El rastreo de compuestos in vivo como herramienta para la identificación de nuevas terapias.....	60
7.1. Limitaciones del rastreo tradicional de compuestos.....	60
7.2. <i>Drosophila</i> como modelo para la búsqueda de fármacos.....	61
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>65</b>
<b>Objectives.....</b>	<b>65</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>

1. Generación de moscas transgénicas para un minigen:reportero cuyo <i>splicing</i> dependa de MBNL1.....	67
1.1. La expresión de 480 repeticiones CTG en la musculatura de <i>Drosophila</i> altera el <i>splicing</i> de diferentes transcritos.....	67
1.2. Muscleblind humano rescata el fenotipo de alteración del <i>splicing</i> debido a las repeticiones CTG.....	72
1.3. Las repeticiones CTG alteran el <i>splicing</i> de un minigen exógeno en <i>Drosophila</i> .....	74
1.4. La luciferasa es el gen reportero más reproducible y fácilmente cuantificable en <i>Drosophila</i> .....	77
1.4.1. La toxina Ricin A resulta tóxica al expresarla en la musculatura de <i>Drosophila</i> .....	77
1.4.2. La proteína GFP se puede utilizar en moscas adultas como proteína reportera.....	80
1.4.3. La proteína luciferasa presenta poca variabilidad y una gran ventana en la musculatura de <i>Drosophila</i> .....	82
2. Validación de moscas espliceosensoras para su uso en el rastro de compuestos a gran escala.....	84
2.1. Distintos espliceosensores son capaces de producir luciferasa a niveles detectables en la musculatura de <i>Drosophila</i> .....	84
2.2. Las repeticiones CTG reducen la expresión de luciferasa al expresarlas junto con el espliceosensor en la musculatura de <i>Drosophila</i> .....	91
2.3. La disminución en los niveles de luciferasa no es debida a un efecto inespecífico sobre la luciferasa.....	94

2.4. La proteína humana MBNL1 es capaz de rescatar la disminución en los niveles de luciferasa inducida por las repeticiones CTG.....	95
2.5. El espliceosensor INSR es sensible a los niveles de expresión de las repeticiones CTG.....	98
2.6. Las alteraciones en el espliceosensor INSR son específicas de las repeticiones largas de CUG.....	100
2.7. El análisis por RT-PCR semicuantitativa de las isoformas obtenidas al expresar el espliceosensor INSR junto con las repeticiones CTG muestran alteraciones en el <i>splicing</i> distintas a las esperadas.....	102
3. Rastreo de compuestos a gran escala.....	105
3.1. El formato de rastreo permite el análisis a gran escala de compuestos.....	105
3.2. El fenotipo de disminución de luminiscencia puede ser rescatado por un compuesto positivo administrado en formato HTS.....	107
3.3. La estefenantrina, identificada en el rastreo químico, es capaz de suprimir la toxicidad de las CTG.....	109
4. La estefenantrina es capaz de unirse a las repeticiones CUG.....	110
5. Validación de la actividad anti-CUG de la estefenantrina en <i>Drosophila</i> .....	113
5.1. El aumento en los valores de luciferasa producido por la estefenantrina no es debido a un efecto directo sobre la	

luciferasa, el sistema UAS/Gal4 ni sobre las repeticiones CTG.....	113
5.2. La estefenantrina reduce la formación de foci en <i>Drosophila</i> .....	115
5.3. La estefenantrina mejora el fenotipo funcional de longevidad en moscas modelo de DM1.....	116
6. Validación de la actividad del compuesto en líneas celulares derivadas de pacientes.....	118
6.1. La estefenantrina reduce el número de agregados nucleares en fibroblastos de pacientes.....	119
6.2. La estefenantrina es capaz de rescatar defectos en el <i>splicing</i> del transcrito cTNT en mioblastos de pacientes.....	121
7. Validación de la actividad de la estefenantrina en un modelo murino de DM1.....	122
7.1. La estefenantrina disminuye el grado de miotonía en ratones modelo de DM1.....	123
7.2. La estefenantrina no resulta tóxica a concentraciones a las cuales es eficaz en ratones modelo de DM1.....	125
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>127</b>
1. Las moscas modelo de DM1 reproducen la espliceopatía descrita en pacientes de DM1.....	127
1.1. El receptor de la insulina <i>InR</i> .....	127
1.2. El gen <i>CG30084</i> .....	128
1.3. El gen <i>Fhos</i> .....	129
1.4. La <i>troponina T (TnT)</i> .....	130

2. La proteína humana MBNL1 es capaz de revertir defectos en el <i>splicing</i> provocados por 480 repeticiones CTG en los músculos indirectos del vuelo de la mosca.....	134
3. Las expansiones CTG alteran el <i>splicing</i> de minigenes mamíferos en el contexto biológico de <i>Drosophila</i> .....	136
4. Optimización de un ensayo de alto rendimiento en <i>Drosophila</i> para el rastreo de moléculas <i>in vivo</i> .....	139
5. Características de las quimiotecas.....	152
6. Identificación de la estefenantrina como fármaco anti-cug.....	154
7. La estefenantrina reduce fenotipos de DM1 en <i>Drosophila</i> .....	159
8. La estefenantrina rescata fenotipos de DM1 en líneas celulares derivadas de pacientes.....	161
9. La estefenantrina reduce la miotonía en ratones modelo de DM1.....	163
10. Potencial de la estefenantrina como molécula terapéutica.....	165

**CONCLUSIONES.....169**

**Conclusiones.....169**

**MATERIAL Y MÉTODOS.....171**

I. Experimentos <i>in vitro</i> .....	171
1. Materiales.....	171
1.1. RNAs.....	171
2.1. Ensayos de unión de la estefenantrina a las repeticiones CUG.....	171

2.2. Preparación de electroforesis.....	172
2.2.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	172
2.2.2. Electroforesis en geles no desnaturizantes de poliacrilamida.....	173
II. Experimentos en <i>Drosophila</i> .....	173
1. Materiales.....	173
1.1. Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	173
1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	176
1.3. Cebadores II.....	176
1.4. Quimiotecas.....	182
1.5. Kits.....	183
2. Métodos.....	183
2.1. Preparación de medios de cultivo utilizado para llevar a cabo el rastreo de compuestos.....	183
2.2. Análisis del <i>splicing</i> de transcritos por RT-PCR semicuantitativa.....	184
2.2.1. Extracción de RNA total.....	184
2.2.2. Tratamiento con DNasa I y retrotranscripción.....	185
2.2.3. Amplificación de los transcritos por PCR.....	186
2.3. Generación de moscas UAS-TnnT3.....	187
2.3.1. Generación de la construcción pUAST-TnnT3.....	187
2.3.1.1. Extracción del minigen TnnT3 del vector origen y apertura del vector destino.....	187
2.3.1.2. Ligación del vector pUAST con el minigen TnnT3.....	188

2.3.2. Clonación de la construcción pUAST-TnnT3.....	190
2.3.2.1. Generación de células competentes por el método del RbCl.....	191
2.3.2.2. Transformación de células competentes por choque térmico.....	191
2.3.3. Microinyección y generación de stocks.....	191
2.3.4. Mapeo de los transgenes.....	192
2.3.4.1. Mapeo genético.....	192
2.3.4.2. PCR inversa.....	193
2.3.4.2.1. Extracción de DNA genómico.....	193
2.3.4.2.2. Fragmentación del DNA genómico.....	194
2.3.4.2.3. Circularización.....	194
2.3.4.2.4. Amplificación por PCR del fragmento genómico de interés.....	194
2.4. Análisis de reporteros en <i>Drosophila</i> .....	195
2.4.1. Estudio de la toxicidad de la proteína Ricin A.....	195
2.4.2. Estudio de la cuantificación de GFP en <i>Drosophila</i> ....	197
2.4.3. Estudio de la cuantificación de la actividad de la luciferasa en <i>Drosophila</i> .....	197
2.5. Generación de las moscas espliceosensoras UAS-TnnT3:Luc, UAS-cTNT:Luc y UAS-INSR:Luc.....	198
2.5.1. Obtención de la luciferasa sin ATG en el vector pUAST.....	198
2.5.1.1. Mutagénesis dirigida mediante PCR de la luciferasa.....	198



2.5.1.2. Subclonación de la luciferasa sin codón de inicio en un vector lanzadera.....	200
2.5.1.3. Clonación del reportero luciferasa sin ATG en el vector Puast.....	201
2.5.2. Obtención de los minigenes reporteros TnnT3:Luc, cTNT:Luc e INSR:Luc.....	202
2.5.2.1. Mutagénesis dirigida mediante PCR de cada uno de los minigenes.....	202
2.5.2.1.1. Mutagénesis del minigen TnnT3.....	203
2.5.2.1.2. Mutagénesis del minigen cTNT.....	203
2.5.2.1.3. Mutagénesis del minigen INSR.....	203
2.5.2.2. Subclonación de cada uno de los minigenes modificado de un vector intermedio.....	206
2.5.3. Clonación de los minigenes en el vector pUAST-luc...207	
2.5.4. Obtención de las moscas espliceosensoras UAS-minigen:luc.....	207
2.6. Rastreo de quimiotecas.....	207
2.6.1. Ensayo de toxicidad del DMSO.....	207
2.6.2. Preparación de las placas con compuestos.....	208
2.6.3. Cuantificación de individuos.....	209
2.6.4. Análisis de datos.....	209
2.7. Cuantificación de los niveles de transcritos (CUG)480 mediante RT-PCR.210.....	210
2.7.1. Obtención del cDNA.....	210
2.7.2. Amplificación por PCR de SV40.....	210
2.8. Detección de foci.....	211

2.8.1. Preparación	de	la	
muestra.....			211
2.8.2. FISH (Fluorescence In Situ Hybridization).....			212
2.9. Ensayo de longevidad.....			213
III.Experimentos en cultivo celular.....			213
1. Materiales.....			213
1.1. Líneas celulares empleadas.....			213
1.2. Cebadores III.....			214
1.3. Kits.....			215
2. Métodos.....			215
2.1. Ensayo de citotoxicidad.....			215
2.2. Detección de foci.....			215
2.1.1. Preparación de la muestra.....			215
2.1.2. FISH (Fluorescence In Situ Hybridization).....			216
2.1.3. Análisis de datos.....			216
2.3. Análisis del <i>splicing</i> de transcritos por RT-PCR semicuantitativa.....			217
2.3.1. Administración del compuestos.....			217
2.3.2. Extracción de RNA total.....			217
2.3.3. Amplificación de los transcritos por PCR.....			218
2.3.4. Análisis de datos.....			218
IV.Experimentos en ratones.....			218
1. Materiales.....			218
1.1. Cepas.....			219
1.2. Cebadores IV.....			219
1.3. Kits.....			220
2. Métodos.....			220

2.1. Genotipado de los ratones HSA <sup>LR</sup> .....	220
2.1.1. Obtención del DNA genómico.....	220
2.1.2. HAS/MSA multiplex PCR.....	220
2.1.3. Comprobación del número de repeticiones CTG en los ratones HSA <sup>LR</sup> .....	221
2.2. Anestesia.....	222
2.3. Inyección de compuestos.....	222
2.4. Electromiografía (EMG) .....	222
2.5. Medida de peso.....	223
2.6. Análisis de sangre.....	223
2.7. Eutanasia.....	223
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>225</b>
Introduction.....	225
Results and discussion.....	226
<b>ANEXO</b> .....	<b>229</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>231</b>



## ***Introducción***



## 1. La Distrofia Miotónica tipo 1.

La Distrofia Miotónica tipo 1 (DM1, OMIM #160900) fue descrita por primera vez por el médico alemán Hans Steinert, Leipzig (1875-1911), por lo que también se conoce en Europa como enfermedad de Steinert. Aunque su prevalencia varía según la raza, la Oficina de Enfermedades Raras (ORD) del NIH (<http://rarediseases.info.nih.gov/>) estima la prevalencia mundial de esta enfermedad en 1 cada 8.000 nacidos vivos, por lo que se incluye dentro de las enfermedades raras, aquellas que afectan a menos de 1 cada 2.000 ciudadanos en Europa. Su edad de aparición es variable, pero principalmente se diagnostica en la edad adulta por lo que, a pesar de ser una enfermedad rara, es el tipo de distrofia muscular más común en la población adulta.

### 1.1. Manifestaciones clínicas.

La Distrofia Miotónica se ha definido como una enfermedad multisistémica de expresividad clínica altamente variable (Tabla 11)(Harper, 2001). Sus síntomas afectan principalmente al músculo, viéndose especialmente comprometidas la musculatura distal en las extremidades inferiores y la musculatura facial (Harper, 2001; Gagnon *et al.*, 2007). La degeneración de los músculos faciales suele provocar ptosis, lo que les confiere a los pacientes un aspecto típico de “cara de cuchillo”. Uno de los síntomas característico de la enfermedad es la miotonía o incapacidad de relajar el músculo tras una contracción voluntaria. Aunque la miotonía incapacita a los pacientes para realizar ciertas tareas cotidianas, es la debilidad

## Introducción

muscular asociada a esta enfermedad la principal causa de minusvalía en pacientes. Esta debilidad muscular se debe a una degeneración muscular progresiva, lo que se conoce como distrofia. La debilidad de la musculatura faríngea y lingual produce disartria, voz nasal y problemas de deglución. Algunos pacientes presentan debilidad en el diafragma y los músculos intercostales con insuficiencia respiratoria. Aunque en las primeras fases de la enfermedad, la degeneración muscular afecta únicamente a la musculatura distal, conforme avanza la enfermedad, la musculatura proximal puede verse también comprometida (Harper, 2001; Longo *et al.*, 2012). Por último la esperanza de vida de los pacientes de DM1 se encuentra reducida siendo la principal causa de muerte el fallo respiratorio o cardiaco.

**Tabla 11.** Principales síntomas de la Distrofia Miotónica Tipo 1

Tejido afectado	Síntomas	Referencias
<b>Muscular</b>	Debilidad de la musculatura distal	(Harper, 2001)
	Miotonía	(Harper, 2001)
	Ptosis facial	(Longo <i>et al.</i> , 2012)
	Fatiga	(Kalkman <i>et al.</i> , 2005)
	Insuficiencia respiratoria	(Longo <i>et al.</i> , 2012)
<b>Cardiaco</b>	Defectos en la conducción cardiaca	(Longo <i>et al.</i> , 2012)
<b>Gastrointestinal</b>	Disfagia	(Bellini <i>et al.</i> , 2006)
	Estreñimiento o diarrea	(Bellini <i>et al.</i> , 2006)
	Cálculos biliares	(Cardani <i>et al.</i> , 2008)
	Transaminasas elevadas	(Heatwole <i>et al.</i> , 2006)
	Déficits del lóbulo frontal-parietal	(Sistiaga <i>et al.</i> , 2010)



<b>CNS y sistema cognitivo</b>	Trastornos de la personalidad	(Bungener <i>et al.</i> , 1998)
	Ansiedad y depresión	(Antonini <i>et al.</i> , 2006)
	Hipersomnolencia diurna	(Dauvilliers & Laberge, 2012)
	Apnea del sueño	(Pincherle <i>et al.</i> , 2012)
	Leve atrofia cortical	(Giorgio <i>et al.</i> , 2006)
	Cambios en la materia blanca	(Wozniak <i>et al.</i> , 2013)
<b>Ocular</b>	Cataratas iridiscentes	(Longo <i>et al.</i> , 2012)
<b>Endocrino</b>	Hiperinsulinemia	(Orngreen <i>et al.</i> , 2012)
	Disfunción tiroidea	(Orngreen <i>et al.</i> , 2012)
	Diabetes mellitus	(Orngreen <i>et al.</i> , 2012)
	Atrofia testicular	(Harper, 2001)
	Alteraciones en la homeostasis del Calcio	(Santoro <i>et al.</i> , 2014)
	Infertilidad	(Matsumura <i>et al.</i> , 2009)

También se observan frecuentemente perturbaciones cardiacas en sujetos con DM1. Las anormalidades del ECG (electrocardiograma) incluyen bloqueo de primer grado y afección más extensa al sistema de conducción. A veces ocurre bloqueo cardiaco completo y muerte súbita. También se observa a menudo prolapso de la válvula mitral (Longo *et al.*, 2012).

Además del músculo, el sistema nervioso central (SNC) también se ve afectado por la enfermedad, provocando síntomas neurológicos como hipersomnolia, déficits cognitivos y trastornos del comportamiento (Harper, 2001; Gagnon *et al.*, 2007). Los pacientes pueden sufrir

## *Introducción*

reducción en el volumen del cerebro, atrofia cortical y lesiones en la sustancia blanca, sin que hasta la fecha se hayan relacionado causalmente con los síntomas neurológicos presentes en los pacientes.

Otros signos acompañantes incluyen cataratas iridiscentes (presentes en todos los pacientes), resistencia a la insulina, atrofia gonadal y calvicie en los varones e hipomotilidad de esófago y colon (Longo, 2012).

### **1.2. Alteraciones histopatológicas y séricas.**

La biopsia muscular muestra atrofia muscular que afecta de forma selectiva a las fibras tipo 1 en el 50% de los casos y a las fibras anilladas. Es frecuente la presencia de núcleos localizados centralmente en fibras musculares individuales y fibras atroficas con cúmulos nucleares picnóticos. Aunque la necrosis de las fibras musculares y el aumento del tejido conjuntivo, presentes en otras distrofias musculares, son menos aparentes en DM1 (Longo, 2012).

A nivel serológico, la actividad de la creatina kinasa (CK) puede o no estar aumentada en pacientes, así como los niveles de inmunoglobulina G y M (IgG e IgM) pueden estar disminuidos, debido a su catabolismo acelerado (Jensen *et al.*, 1971). Además, algunos pacientes muestran aumentados marcadores de estrés oxidativo, como la superóxido dismutasa (SOD) cuyos niveles superan los de individuos control en un 40% (Toscano *et al.*, 2005).

### **1.3. Alteraciones moleculares.**

La distrofia miotónica se considera también una espliceopatología, ya que presenta alteraciones en el *splicing* de un gran número de transcritos (Tabla I2). La presencia, debido a estos cambios en el *splicing*, de isoformas aberrantes de los transcritos se ha relacionado con varios de los fenotipos observados en los pacientes. Así, el *splicing* aberrante del receptor de la insulina *INSR*, del canal de cloro *CLCN1* y del integrador *BIN1* se han relacionado directamente con la resistencia a la insulina, la miotonía (Ranum & Cooper, 2006) y la debilidad muscular (Fugier *et al.*, 2011), respectivamente.

**Tabla I2.** Transcritos alterados en DM1

Tejido	Transcrito	Exón implicado	Referencia
Músculo esquelético	<i>APL</i>	ex 5a, 5b	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>BIN1</i>	ex 11	(Fugier <i>et al.</i> , 2011)
	<i>CAPN3</i>	ex 16	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>CLCN1</i>	in 2, ex 7a, 8a	(Mankodi <i>et al.</i> , 2002; Salvatori <i>et al.</i> , 2009)
	<i>FHOS</i>	ex 11a	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>GFAT1</i>	ex 10	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>INSR</i>	ex 11	(Savkur <i>et al.</i> , 2001)
	<i>MBNL1</i>	ex 7	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>MBNL2</i>	ex 7	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>MTMR1</i>	ex 2.1,2.2	(Buj-Bello <i>et al.</i> , 2002)
	<i>NRAP</i>	ex 12	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>RYR1</i>	ex 70	(Kimura <i>et al.</i> , 2005)
	<i>SERCA</i>	ex 22	(Kimura <i>et al.</i> , 2005)
	<i>z-Titin</i>	ex Zr4,Zr5	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>m-Titin</i>	M-line ex5	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
<i>TnnT3</i>	exón feta	(Salvatori <i>et al.</i> , 2009)	

	<i>ZASP</i>	ex 11	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
<b>Corazón</b>	<i>cTNT</i>	ex 5	(Philips <i>et al.</i> , 1998)
	<i>ZASP</i>	ex 11	(Mankodi <i>et al.</i> , 2001)
	<i>ZASP</i>	ex 11	(Mankodi <i>et al.</i> , 2001)
	<i>m-Titin</i>	ex 11	(Mankodi <i>et al.</i> , 2001)
	<i>KCNAB1</i>	ex 2	(Mankodi <i>et al.</i> , 2001)
	<i>ALP</i>	ex 5	(Mankodi <i>et al.</i> , 2001)
	<i>ANK2</i>	ex 21	(Orengo <i>et al.</i> , 2008)
	<i>CAPZB</i>	ex 8	(Orengo <i>et al.</i> , 2008)
	<i>FXR1</i>	ex 15, 16	(Orengo <i>et al.</i> , 2008)
	<i>SCN5A</i>	ex 6a	(Wahbi <i>et al.</i> , 2013)
<b>Cerebro</b>	<i>TAU</i>	ex 2, 10	(Sergeant <i>et al.</i> , 2001)
	<i>APP</i>	ex 7	(Jiang <i>et al.</i> , 2004)
	<i>NMDAR1</i>	ex 5	(Jiang <i>et al.</i> , 2004)

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

La causa genética de la DM1 radica en la expansión del trinucleótido CTG en el extremo 3' UTR del gen *distrophia myotonica-protein kinase* (*DMPK*, Entrez #1760), localizado en la región cromosómica 19q13.2-q13.3 (Fig. I1) (Brook *et al.*, 1992). Los individuos sanos pueden tener entre 5 y 35 copias de este trinucleótido, mientras que los pacientes tienen más de 50, llegando incluso a miles. El número de copias del trinucleótido CTG en sangre correlaciona de forma aproximada con la gravedad de los síntomas y la edad de aparición de la enfermedad (Harley *et al.*, 1993). Así, la DM1 se divide en diferentes subtipos en

función del número de repeticiones y la gravedad de los síntomas (Tabla I2). Se habla de DM1 clásica o de inicio adulto cuando la enfermedad comienza a manifestarse en la segunda década de vida, teniendo por lo general los pacientes entre 50 y unos pocos cientos de repeticiones CTG mientras que en la DM1 congénita (o enfermedad de Thomsen) el número de repeticiones es mayor, llegando incluso a miles de copias y los primeros síntomas aparecen desde el nacimiento siendo éstos además más graves.

**Tabla I3.** Subtipos de Distrofia Miotónica Tipo 1

<b>Fenotipo</b>	<b>Manifestaciones clínicas</b>	<b>Número de repeticiones CTG</b>	<b>de Edad de aparición</b>
<b>Premutación</b>	Asintomático	35 a 49	No aplicable
<b>Leve</b>	Cataratas Miotonía leve	50 a ~150	20 a 70 años
<b>Clásica</b>	Debilidad Miotonía Cataratas Calvicie Arritmias cardiacas	~100 a ~1000	10 a 30 años
<b>Congénita</b>	Hipotonía infantil Defectos respiratorios Déficit intelectual Además de los síntomas de la clásica	>1000	Desde el nacimiento hasta los 10 años

(Tabla modificada de Bird, 1993 (Bird, 1993).

## *Introducción*

El número de repeticiones CTG, y por consiguiente las gravedad de los síntomas, aumenta de generación en generación, mientras que la edad de manifestación disminuye. Este fenómeno se conoce como anticipación genética y es debida a la inestabilidad de las repeticiones en la línea germinal de los progenitores (Pearson *et al.*, 2005). Además de esta inestabilidad germinal, los pacientes presentan también inestabilidad somática, es decir, el número de expansiones varía en un mismo individuo en función del tejido (Davies *et al.*, 1992; Lavedan *et al.*, 1993; Thornton *et al.*, 1994; Kinoshita *et al.*, 1996) y la edad (Martorell *et al.*, 1997).

Existe otro tipo de Distrofia Miotónica, la Distrofia miotónica de tipo 2 (DM2 o PROMM, OMIM #602668) cuya causa radica en la expansión de otro microsatélite, el tetranucleótido CCTG, en el intrón 1 del gen *CNBP1* (*cellular retroviral nucleica acid-binding protein 1*, Entrez #7555). En este caso las repeticiones CCTG se convierten en patogénicas cuando se encuentran en rango de 75-11000 (Liquori *et al.*, 2001). La DM2 es aún menos frecuente que la DM1, constituyendo un 2% de los casos diagnosticados como Distrofia Miotónica, siendo su prevalencia de 1 cada 100000 individuos en Europa. La sintomatología de DM2 es similar a la de DM1 aunque con un cuadro clínico más leve, siendo la musculatura proximal la más afectada en este caso.

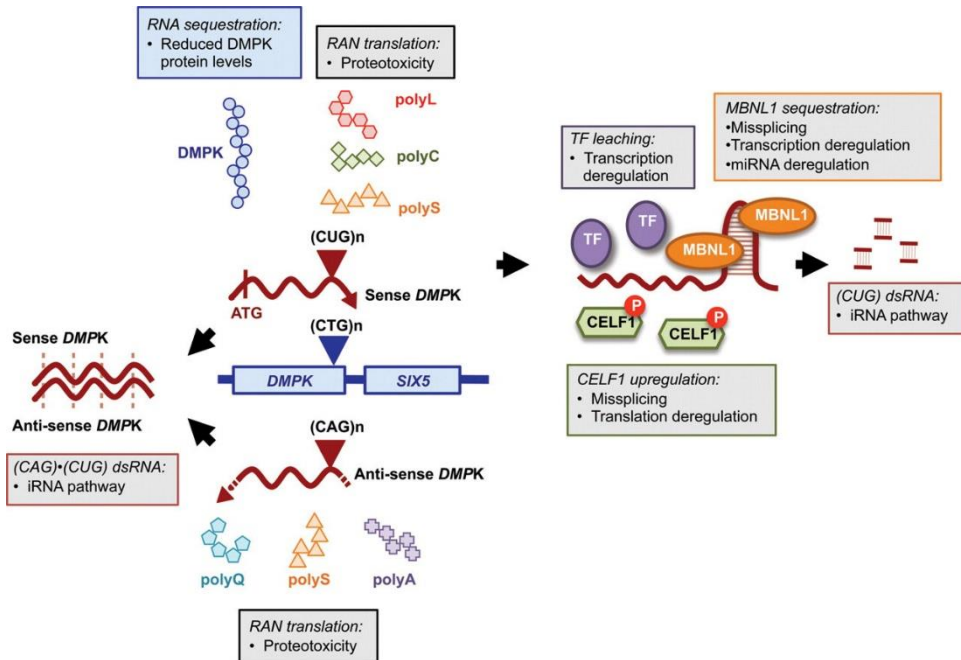
### **3. Patogénesis de la Distrofia Miotónica.**

El mecanismo molecular por el que las expansiones en el trinucleótido CTG desencadenan la Distrofia Miotónica parece ser la toxicidad del RNA portador de las repeticiones expandidas. Este RNA

se pliega sobre sí mismo a nivel de las repeticiones, formando una horquilla de doble cadena que interfiere con el procesado de sus propios transcritos, de transcritos diferentes o con proteínas de unión al RNA, lo que se conoce como ganancia de función tóxica del RNA. Este mecanismo de patogénesis explica el hecho que las patologías DM1 y DM2, causadas por la expansión de repeticiones similares en regiones no codificantes de genes distintos, presenten una sintomatología tan similar. Además, la expresión de 250 repeticiones CUG en un transcrito heterólogo en ratón, así como la expresión de 480 repeticiones CUG en *Drosophila*, reproduce síntomas de la DM1 como la miotonía, la degeneración muscular o las alteraciones en el *splicing* alternativo (Mankodi *et al.*, 2000; de Haro *et al.*, 2006; Garcia-Lopez *et al.*, 2008), demostrando el papel clave de estas repeticiones en la patogénesis de la enfermedad. En conjunto, la ganancia de función tóxica del RNA explica cómo una enfermedad causada por una mutación en una región no traducida de un gen es capaz de desencadenar el amplio cuadro clínico que presentan los pacientes de DM1, así como su homología con DM2. Una vez establecida la toxicidad del RNA por ganancia de función como causa de la DM1, comenzaron a identificarse otros RNAs como causa molecular de un gran número de enfermedades como DM2, FXTAS, SCA3, SCA8, SCA10, SCA12 y HDL2 (Ranum & Cooper, 2006; Rudnicki *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Daughters *et al.*, 2009). Sin embargo en los últimos años se han descrito un gran número de alteraciones que no parecen estar ligadas directamente a la expresión del RNA tóxico, sino más bien a la presencia de estas expansiones a nivel de DNA, generándose un esquema de la enfermedad más complejo, donde

## Introducción

todavía se debe determinar la implicación patogénica que tiene cada una de ellas en la enfermedad (Fig I1).



**Figura I1. Patogénesis molecular de DM1: mecanismos de toxicidad del RNA, *espliceopatía*, alteración de la expresión génica y proteotoxicidad.**

El gen DMPK con las expansiones CTG se transcribe en sentido generando transcritos con repeticiones CUG y antisentido generando transcritos con repeticiones CAG. Los transcritos DMPK con repeticiones CUG forman horquillas de RNA que se acumulan en el núcleo, lo que podría disminuir los niveles de esta proteína. El secuestro del factor nuclear MBNL por las horquillas provoca la falta de función de este factor de *splicing* lo que afecta al *splicing* alternativo, a la traducción y regulación de miRNAs. La alteración de factores de transcripción debido a los transcritos de DMPK puede producir cambios en la expresión génica. La activación de CELF1 mediada de algún modo por la expansión de las repeticiones, provoca a su vez alteraciones en el *splicing* alternativo y la traducción. La ruta del RNA interferente puede verse activada por el procesamiento de las estructuras de RNA de doble cadena (horquillas) o por la hibridación de los transcritos sentido y antisentido de DMPK. Ambos transcritos pueden a su vez sufrir traducción RAN en todas sus posibles pautas de

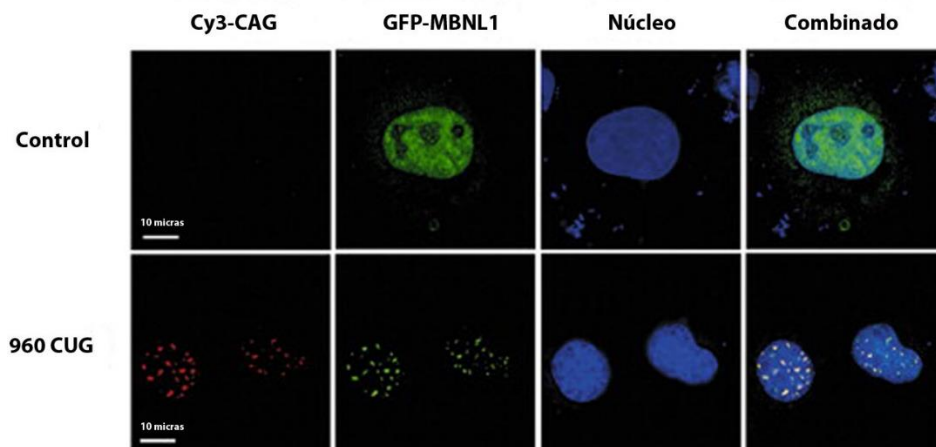


lecturas generando homopolímeros que pueden ser tóxicos para la célula. Figura tomada de Sicot *et al.*, 2011.

Los RNAs portadores de las horquillas de doble cadena que forman las repeticiones CUG quedan retenidas en el núcleo donde secuestran factores de unión al RNA de doble cadena, formando grandes inclusiones ribonucleoproteicas a las que se denominan foci (Michalowski *et al.*, 1999; Mooers *et al.*, 2005). Retenidas en el núcleo, las repeticiones CUG provocan de manera directa o indirecta un gran número de alteraciones, algunas de las cuales pueden relacionarse directamente con síntomas de la enfermedad, explicando así la complejidad de la DM1. Entre las alteraciones observadas en DM1, bien sean debidas directamente al RNA tóxico o a las expansiones a nivel de DNA, se encuentran:

### *3.1. Alteración de factores de splicing alternativo.*

Las expansiones tóxicas también alteran factores de *splicing* alternativo, siendo las proteínas de la familia Muscleblind MBNL1-3 (del inglés *Muscleblind-like proteins 1-3*), las más relevantes para la patogénesis de la enfermedad. Estas proteínas se encuentran secuestradas en los foci nucleares (Fig I2) (Miller *et al.*, 2000; Fardeai *et al.*, 2002; Mankodi *et al.*, 2003; Kino *et al.*, 2004). El papel clave de estas proteínas en la distrofia miotónica será discutido en detalle en el apartado 4 de la introducción.



**Figura I2. Secuestro de MBNL1 en inclusiones nucleares de repeticiones CUG.**

Las repeticiones CUG (Cy3-CAG) forman agregados en los núcleos de células COSM6 transfectadas con *DMPK* conteniendo 960 (960 CUG) o 0 (control) repeticiones CTG. La cotransfección con MBNL1 marcado con GFP (GFP-MBNL1) muestra la colocalización (combinado) de esta proteína con los foci nucleares. Figura modificada de Ho et al., 2005 (Ho, Savkur, *et al.*, 2005)

Otro factor de *splicing* alterado en DM1 es la proteína CELF1 (CUGBP-ETR-3 like factor 1), cuyos niveles se encuentran aumentados en mioblastos, músculo esquelético y corazón de pacientes (Savkur *et al.*, 2001; N. A. Timchenko, Cai, *et al.*, 2001; Dansithong *et al.*, 2008). CELF1 es miembro de la familia de proteínas CELF (CELF1-CELF6, *CUG-BP and ETR-3-like factor*), las cuales contienen tres dominios de unión al RNA del tipo RRM (*RNA recognition motif*) y un *linker* que varía entre las distintas proteínas CELF. CELF1 es una proteína multifuncional que actúa a nivel de núcleo y citoplasma regulando el *splicing*, la estabilidad y la traducción de sus RNA diana (Y. K. Kim *et al.*, 2014). A pesar de no conocerse el mecanismo exacto por el que la expansión de repeticiones CTG activa a CELF1, sí que se conoce la

implicación de diversas proteínas como la glicógeno sintasa kinasa 3 $\beta$  (gsk3 $\beta$ ), la cual fosforila a CELF1 en la Ser302, aminoácido implicado en la regulación de la traducción (K. Jones *et al.*, 2012). Sin embargo, el papel que pueda tener la fosforilación de este residuo en las otras funciones desempeñadas por CELF1 como la regulación del *splicing* o la estabilidad del RNA se desconoce. Otras proteínas implicadas en la alteración de CELF1 son la PKC (proteína kinasa C), la cual hiperfosforila a la proteína CELF1 haciéndola más estable (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007) y la proteína Akt (proteína kinasa B), la cual regula la distribución nuclear-citoplasmática de CELF1 (Huichalaf *et al.*, 2010). La implicación de CELF1 en la patogénesis de DM1 ha quedado demostrada tras la sobreexpresión de esta proteína en modelos murinos, donde se observaron alteraciones en el *splicing* como los descritos en DM1 (Ho, Bundman, *et al.*, 2005) y aumento de los niveles de sus dianas transcripcionales p21 y MEF2A (N. A. Timchenko *et al.*, 2004), desembocando en alteraciones histopatológicas en el músculo esquelético y cardiaco, pérdida de musculatura, anormalidades ECG y letalidad prematura. Además, al expresar las expansiones CUG tóxicas en ratones deficientes para CELF1, Kim y colaboradores observaron que los defectos histopatológicos asociados a la toxicidad del RNA eran más leves comparados con ratones que expresaban sólo las repeticiones CUG, por lo que la proteína CELF1 tiene un papel clave en el desarrollo de la distrofia muscular asociada a DM1 (Y. K. Kim *et al.*, 2014). Por último, se ha descrito la implicación de esta proteína en la regulación de la cardiogénesis (Blech-Hermoni *et al.*, 2013) y en el desarrollo y función neuronal (Ladd *et al.*, 2013).

## *Introducción*

Otros factores de *splicing* alterados por las repeticiones CUG son las ribonucleoproteínas heterogéneas hnRNP F y hnRNP H, las cuales colocalizan con los foci aunque no se observa una disminución significativa de estas proteínas en el resto del núcleo (Jiang *et al.*, 2004). De hecho, se ha postulado la implicación de hnRNP H en la estabilización de la horquilla de RNA, por lo que esta proteína podría no estar secuestrada sino realizando algún papel estabilizador en los foci (D. H. Kim *et al.*, 2005).

Recientemente, se ha descrito la posible implicación de otro factor de *splicing* RBFOX1 en DM1 (Klinck *et al.*, 2014), el cual parece colaborar con MBNL1 en el control del *splicing* alternativo en el músculo de ratones modelo.

### *3.2. Alteración de factores de transcripción.*

Se ha demostrado la unión y el secuestro de varios factores de transcripción, entre los que destacan las proteínas de especificidad 1 y 3 (Sp1 y Sp3), el receptor gamma del ácido retinoico (RAR $\gamma$ ) y las proteínas STAT1 y STAT3 implicadas en la traducción de la señal y la activación de la transcripción (Ebralidze *et al.*, 2004). El secuestro de estos factores nucleares impide a dichas proteínas realizar sus funciones normales en la célula, observándose una disminución de hasta el 90% en la presencia de estos factores en la cromatina activa, impidiendo la transcripción de sus genes diana, entre los que se encuentra el transportador de iones *canal de cloro tipo 1* (CICN1). Este gen codifica para un canal de cloro de la membrana de las fibras musculares, participando en la propagación de los potenciales de acción. La ausencia de este canal de cloro parece contribuir, junto con

las alteraciones en su *splicing* descritas previamente, a la miotonía observada en pacientes, tanto de DM1 como de DM2.

El factor de transcripción NKX2-5, implicada en el desarrollo y conducción cardiaca, se encuentra también aumentada en el músculo esquelético y cardiaco de pacientes, lo que provoca un aumento en la transcripción de sus genes diana (Yadava *et al.*, 2008)

Otro factor de transcripción cuyos niveles están alterados es la proteína MyoD, implicada en la miogénesis, que se encuentra disminuida tanto en mioblastos de ratón que expresan el gen *DMPK* junto con 200 repeticiones CTGs (Amack *et al.*, 2002) como en mioblastos de pacientes (N. A. Timchenko, Iakova, *et al.*, 2001). Sin embargo, la causa de esta desregulación, así como su relación con las horquillas de RNA tóxico se desconoce.

También se ha observado la disminución del factor de transcripción Mef2 en el corazón de pacientes de DM1, lo que altera la expresión de un gran número de mRNAs y miRNAs cuyo efecto parece explicar la patología cardiaca observada en DM1 (Kalsotra *et al.*, 2014).

Por último, la presencia de las repeticiones CTG expandidas provoca alteraciones en la localización subcelular del factor de transcripción SHARP (SMART/HDAC1-associated repressor protein), el cual se encuentra en un 90% localizado en el citoplasma. Esta deslocalización provoca la disminución de los niveles de RNA basales de al menos 25 transcritos implicados en el desarrollo y la función muscular (Dansithong *et al.*, 2011).

### 3.3. Desregulación de microRNAs.

## Introducción

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs no codificantes que regulan la expresión génica mediante la disminución de los niveles de sus mRNA diana o mediante el bloqueo de su traducción. (Ambros, 2001; Guo *et al.*, 2010) pueden contribuir a la sintomatología de DM1. Existen diversos estudios en los que encuentran alteraciones de determinados miRNAs en músculo esquelético y corazón de pacientes de DM1, entre los que se encuentran miR-206, miR-210, miR-1, miR-335, miR-29b, miR-29c, miR-33 (Latronico & Condorelli, 2009; Gambardella *et al.*, 2010; Perbellini *et al.*, 2011; Rau *et al.*, 2011; Kalsotra *et al.*, 2014). Rau y colaboradores describieron la alteración de miR-1 tanto en corazón de pacientes de DM1 como de DM2, además demostraron la implicación de la proteína MBNL1 en la biogénesis de este miRNA. Esta reducción provoca el aumento de dos de sus dianas, Cav 1.2 y connexin 43, implicados en los canales de calcio y de las uniones gap, respectivamente. La alteración de estas dos proteínas podría en última instancia contribuir a la disfunción cardíaca observada en los pacientes (Rau *et al.*, 2011).

En el caso del corazón varios de los miRNAs alterados en DM1 están asociados a arritmias y fibrosis. Además, en este tejido la pérdida de función del factor de transcripción Mef2 es clave para la alteración de estos miRNAs, ya que su sobreexpresión restablece los niveles normales de estos miRNAs en corazón de ratones modelo de DM1 (Kalsotra *et al.*, 2014).

Ensayos en *Drosophila* identificaron 20 miRNAs cuya expresión variaba al expresar 480 repeticiones CTG, de éstos 19 estaban disminuidos y uno aumentado. El estudio de aquellos miRNAs conservados en humanos demostró que *miR-1*, *miR-7* y *miR-10*

estaban también alterados en biopsias de pacientes de DM1. Además Muscleblind está implicado en la regulación de *miR-1* y *miR-7*, ya que sus niveles se encuentran disminuidos en moscas deficientes para *mbl* (Fernandez-Costa *et al.*, 2013)

Perfetti y colaboradores analizaron la sangre de pacientes en búsqueda de alteraciones en los mi-RNAs, observando ocho miRNAs aumentados en pacientes (*miR-133a*, *miR-193b*, *miR-191*, *miR-140-3p*, *miR-454*, *miR-574*, *miR-885-5p*, *miR-886-3p*) y uno disminuido (*miR-27b*)(Perfetti *et al.*, 2014). Este trabajo es de gran relevancia debido a la urgente necesidad de definir biomarcadores no invasivos que permitan monitorizar la progresión de la enfermedad así como la eficacia de los posibles tratamientos en DM.

Cabe destacar que algunos de los miRNAs alterados lo están también en otras enfermedades musculares (Johnson *et al.*, 2008; Matsuzaka *et al.*, 2014), lo que genera controversia sobre de si las alteraciones observadas en los miRNAs son causa o consecuencia de la enfermedad (Sicot *et al.*, 2011).

#### *3.4. Silenciamiento de genes por generación de fragmentos de siRNA.*

Las repeticiones CUG de los mensajeros *DMPK* forman estructuras de horquillas imperfectas las cuales pueden ser diana de la maquinaria del RNA interferente y generar pequeños RNAs interferentes (siRNAs, del inglés small interfering RNAs). En modelos celulares de DM1, estos siRNAs se unen a secuencias complementarias en transcritos diana silenciando su expresión, pudiendo contribuir a la patogénesis de la enfermedad (Krol *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios realizados

## *Introducción*

en ratones modelo de DM1 no reproducen los resultados observados en cultivo celular (Osborne *et al.*, 2009).

### *3.5. Traducción sin ATG asociada a repeticiones.*

La traducción sin ATG (traducción RAN, del inglés Repeat-Associated Non-ATG) es un fenómeno que ocurre independientemente de la presencia de un codón ATG de iniciación de la traducción y en todas las pautas de lecturas. Los transcritos antisentido de DMPK generan mediante traducción RAN péptidos homopolímeros de poliglutaminas en ratones modelo y mioblastos de DM1 (Zu *et al.*, 2011). Estos transcritos de DMPK podrían generar también cadenas largas de polileucina, policisteína y polialanina (Pearson, 2011; Zu *et al.*, 2011). Este tipo de péptidos homopolímeros podrían provocar proteotoxicidad similar a la descrita en las enfermedades de poliglutaminas como la enfermedad de Huntington o varias ataxias espinocerebelares (SCA). En DM2 también se ha descrito la existencia de proteínas formadas por la repetición del motivo Leu-Pro-Ala-Cys producto de la traducción RNA de los intrones portadores de las expansiones del tetranucleótido CCUG (Zu *et al.*, 2011). También se ha demostrado la existencia de traducción RAN en otras enfermedades causadas por expansiones de trinucleótidos como FXTAS (síndrome de temblor/ataxia asociado al X frágil) (Todd *et al.*, 2013), SCA8 (ataxia espinocerebelar 8)(Zu *et al.*, 2011) o ELA (esclerosis lateral amiotrófica) (Zu *et al.*, 2013). Sin embargo, el mecanismo exacto de traducción RAN, así como su implicación en la patogénesis de estas enfermedades está por esclarecer.



### 3.6. Papel de DMPK.

El gen *DMPK* codifica para una serina/treonina kinasa (L. Timchenko *et al.*, 1995), homóloga de las kinasas MRCK (o kinasa de unión a Cdc42 relacionada con distrofia miotónica) y ROK/ROCK (o kinasa de Rho) (Kaliman & Llagostera, 2008) implicadas en la reorganización del citoesqueleto, el tráfico intracelular y el metabolismo proteico. Además, se ha descrito que DMPK fosforila a la proteína CELF1 *in vitro* (Roberts *et al.*, 1997). Existen dos isoformas de DMPK: la más abundante, de 80 kDa, se expresa únicamente en el músculo esquelético mientras que la otra isoforma, de 71 kDa se expresa en las células Purkinje del corazón (Maeda *et al.*, 1995). En el corazón, DMPK se encuentra principalmente en el retículo sarcoplásmico, donde interacciona físicamente con fosfolamban a quien probablemente fosforila y donde colocaliza con el receptor de la rianodina. Estos datos sugieren la implicación de DMPK en la homeostasis del calcio en los cardiomiocitos, lo que podría explicar la disfunción ventricular observada en pacientes (Kaliman & Llagostera, 2008). Además, esta proteína parece estar implicada en la respuesta al receptor  $\beta$ -adrenérgico cuyas alteraciones se han relacionado con fallos cardiacos (Llagostera *et al.*, 2012). Por último, se ha descrito la implicación de DMPK en la translocación de la insulina y el IGF-1 a la membrana plasmática, lo que podría estar relacionado con la insuficiencia insulínica observada en pacientes (Llagostera *et al.*, 2007).

Los transcritos *DMPK* con las repeticiones expandidas quedan retenidos en los foci nucleares (Fig I1), bloqueando el transporte de estos transcritos al citoplasma donde debería traducirse para dar

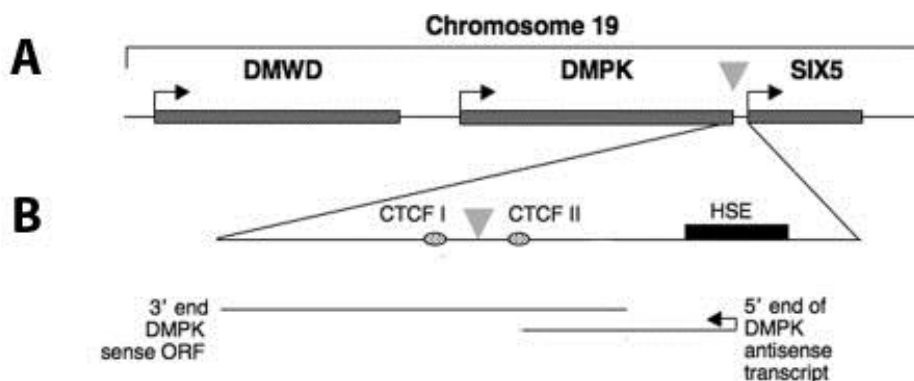
## *Introducción*

lugar a la proteína funcional (Taneja *et al.*, 1995). Esta retención en el núcleo llevó a proponer una posible haploinsuficiencia de DMPK como posible causa de la DM1, sin embargo existen datos contradictorios sobre si los niveles de DMPK en pacientes están realmente reducidos celulares (Fu *et al.*, 1993; Novelli *et al.*, 1993; Koga *et al.*, 1994; Narang *et al.*, 2000; Salvatori *et al.*, 2009). En cualquier caso, los ratones knockout para *Dmpk* tan sólo padecen una leve miopatía tardía, la cual no es característica de DM1 (Jansen *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996) defectos en la conducción cardíaca (Berul *et al.*, 2000; Pall *et al.*, 2003) e intolerancia a la glucosa (Llagostera *et al.*, 2007). Estos resultados, junto al hecho de que los síntomas de DM2, a pesar de no implicar a *DMPK*, sean tan similares a los de DM1, sugieren que una reducción en la función de esta proteína podría contribuir a la sintomatología cardíaca y la resistencia a la insulina de DM1, aunque su haploinsuficiencia no parece ser la causa principal de la sintomatología de DM1.

A pesar de que la función fisiológica exacta de DMPK se desconoce, esta proteína está implicada en la estabilización de la envoltura nuclear, clave para la determinación de la estructura nuclear, la regulación génica y la función muscular (Harmon *et al.*, 2011). Recientemente, se han encontrado alteraciones en la estructura nuclear en fibroblastos derivados de pacientes de DM1, aunque esta alteración es dependiente de la expresión de las repeticiones y no parece depender directamente de DMPK (Rodríguez *et al.*, 2014).

### *3.7. Cambios epigenéticos.*

La expansión de las repeticiones CTG provoca cambios significativos en la estructura local de la cromatina. Un ejemplo es el cambio en la localización de los nucleosomas (Wang *et al.*, 1994; Volle *et al.*, 2012), siendo las repeticiones CTG elementos preferenciales para su localización (Wang *et al.*, 1994). Además, las expansiones de CTG inducen la condensación del DNA en el locus DM1, lo que puede dificultar el acceso de los reguladores génicos (Otten *et al.*, 1995). Recientemente, se ha descrito el aumento de los niveles de metilación en sitios CpGs en las regiones flanqueantes a las repeticiones CTG, cuando éstas se han expandido (López Castel *et al.*, 2011), así como la unión del regulador epigenético PCNA (proliferating cell nuclear antigen) y el aumento de los niveles de heterocromatina en la región (Breuwer *et al.*, 2013) en muestras de ratones modelo para DM1 y tejidos de pacientes, lo que concuerda con observaciones previas que describían aumento de la heterocromatina inducido por la expansión de trinucleótidos (Saveliev *et al.*, 2003). En conjunto, estos resultados sugieren que las expansiones de CTG reprimen la transcripción de la región en la que se encuentran, lo que a su vez provoca cambios en la expresión de los genes vecinos (Klesert *et al.*, 1997; Thornton *et al.*, 1997; Alwazzan *et al.*, 1999; Westerlaken *et al.*, 2003; Breuwer *et al.*, 2013). El gen *DMPK* se encuentra flanqueado en 3' y 5' por los genes *SIX5* (Entrez #147912) y *DMWD* (Entrez #1762), respectivamente (Fig. I3A).



**Figura I3. Organización del locus DMPK.** (A) Región genómica del cromosoma 19 comprendiendo el gen DMPK y sus dos genes adyacentes: DMWD y SIX5. Con un triángulo gris se muestra la localización del trinucleótido CTG susceptible de expansiones. (B) Ampliación de la región comprendida entre el final del gen DMPK y el inicio de la transcripción del gen SIX5, mostrando los dos elementos aisladores CTCF (óvalos grises) y el sitio hipersensible a la DNAsa I (HSE) que contiene el promotor del gen *SIX5*. Se muestran también el extremo 3' del transcrito DMPK y el transcrito antisentido que abarca desde el promotor de *SIX5* hasta el elemento aislador CTCFII. En DM1 congénita el transcrito antisentido continua más allá de los elementos CTCF. Figura modificada de Kumari et al., 2009.

El gen *SIX5* pertenece a la familia de genes *SIX*, los cuales codifican proteínas que tienen un dominio SIX. *SIX5* se expresa en la córnea, el epitelio de la lente y los fotorreceptores de la retina. La expresión de este gen se encuentra disminuida en pacientes entre 20-60%. De manera interesante, la pérdida de una sola copia de este gen en ratones es suficiente para la generación de cataratas, las cuales se agravan con forme disminuye la expresión de *SIX5*. No obstante los pacientes de DM1 desarrollan un tipo de catarata muy característico denominada subcapular posterior, la cual otorga un aspecto iridiscente al ojo cuando se ilumina con una lamparilla. El tipo de cataratas observadas en los ratones mutantes para *SIX5* no parecen

ser de este tipo, sin embargo este gen parece estar implicado en el metabolismo de los iones en la lente ocular lo que podría contribuir a la formación de cataratas (Sarkar *et al.*, 2000). La falta de función total de este gen provoca, además de cataratas, atrofia gonadal y problemas en la conducción cardíaca (Sarkar *et al.*, 2000), por lo que *SIX5* podría estar implicado en la manifestación de estos síntomas en pacientes. El estudio del homólogo de *SIX5* en *Drosophila*, *D-Six4*, mostró la implicación de este gen en el desarrollo gonadal y muscular, observándose reducción testicular y falta de fusión de los mioblastos, lo que sugiere que *SIX5* podría estar implicado en la atrofia testicular y degeneración muscular de DM1 (Kirby *et al.*, 2001).

El gen *DMWD* es un gen de expresión ubicua aunque sus niveles están aumentados en testículos y cerebro, por lo que se ha postulado su posible implicación en la sintomatología observada en el cerebro de pacientes. En éstos, la expresión del gen *DMWD* está reducida en un 20-50% pero únicamente en el citoplasma, siendo los niveles nucleares similares a los presentes en individuos sanos (Frisch *et al.*, 2001). Esta disminución en los niveles citoplasmáticos pero no en los niveles de la fracción nuclear de *DMWD* llevó a proponer la existencia de algún mecanismo en CIS, que impidiera el transporte de los transcritos al citoplasma de manera similar a lo que supuestamente ocurre con los transcritos de *DMPK*. Una posible explicación sería la hipótesis propuesta por Alwazzan y colaboradores de que los transcritos de *DMWD* podían extenderse hasta el gen *DMPK* incluyendo las repeticiones CTG, lo que supuestamente retendría estos transcritos en el núcleo (Alwazzan *et al.*, 1999). Esta hipótesis

## Introducción

se ve reforzada por haberse encontrado este tipo de transcritos que incluiría los dos genes en ratones (Jansen *et al.*, 1996) y por el hecho de que el punto exacto de terminación del gen DMWD no ha sido mapeado (Shaw *et al.*, 1993). Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales para poder confirmar esta hipótesis.

Datos adicionales indican que, en DM1, las repeticiones CTG forman un elemento aislador junto con los dos sitios de unión de la proteína CTCF (CTCFb) que flanquean las repeticiones (Fig I3B) (Filippova *et al.*, 2001). Sin embargo, en ratones modelo de DM1 se observó aumento de la metilación CpG y de la heterocromatina local así como disminución en la transcripción dependientes de las expansiones CTG sin que los sitios de unión de CTCF se vieran afectados (Breuwer *et al.*, 2013). Donde estos aisladores sí parecer jugar un papel clave es en la transcripción bidireccional observada en DM congénita. En el locus DM1 se genera un transcrito antisentido de DMPK a partir de la región reguladora del gen adyacente *SIX5* que se extiende hasta el elemento aislador CTCF situado entre los dos genes (CTCF II) (FigI3B). En cambio, en fibroblastos de DM1 congénita la expansión de las repeticiones CTG está asociada con la falta de unión de la proteína CTCF a sus lugares de unión, con un aumento local de los niveles de heterocromatina, con la hipermetilación de las regiones CpGs presentes, y finalmente con una extensión de la longitud del transcrito antisentido generado más allá de los lugares de unión de CTCF (I y II). Esto podría resultar en un aumento de la expresión de *DMPK* durante la embriogénesis tardía como consecuencia de la activación de *SIX5* y contribuir a la aparición temprana de los síntomas en DM1 congénita (Cho *et al.*, 2005). Sin embargo, en

ensayos *in vivo* con ratones modelo con >1300 repeticiones, así como los genes adyacentes *SIX5* y *DMWD* y las regiones aisladoras CTCF, a pesar de detectarse transcritos antisentido, estos no parecen estar regulados por el promotor de *SIX5* ni estar asociado a la longitud de las repeticiones CTG (Breuwer *et al.*, 2013).

#### **4. Papel de las proteínas Muscleblind en el desarrollo de DM1.**

El papel clave de las proteínas MBNL en la patogénesis de la enfermedad se ha demostrado mediante ensayos de rescate genético con MBNL1 en ratones o moscas modelo, en los que la sobreexpresión de MBNL1 es capaz de revertir fenotipos de la enfermedad como la miotonía y las alteraciones en el *splicing* (Kanadia *et al.*, 2006). Otra aportación clave a la relevancia de MBNL1 en DM1 es el hecho de que los ratones deficientes en *Mbnl1* reproducen los principales síntomas de la enfermedad, como la miotonía, la histopatología muscular y las cataratas (Kanadia, Johnstone, *et al.*, 2003). Además, de los 156 transcritos alterados en los ratones modelo de DM1 que expresan 250 repeticiones CTG, al menos 128 se encuentran también desregulados en los ratones knockout de *Mbnl1* (Du *et al.*, 2010).

##### *4.1. MBNL1-3 son proteínas de dedos de zinc.*

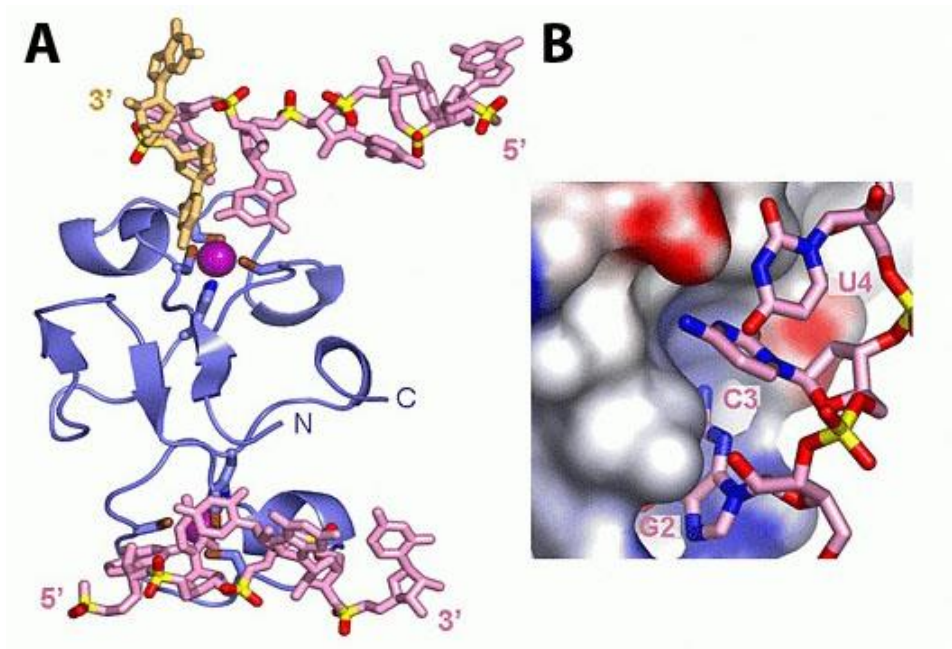
Las proteínas Muscleblind (Mbl) fueron descritas por primera vez en nuestro laboratorio hace más de una década (Begemann *et al.*, 1997; Artero *et al.*, 1998). Aunque fue inicialmente identificada en *Drosophila*, se han descrito proteínas Muscleblind en diferentes organismos desde nematodos (*Caenorhabditis elegans*) hasta

## Introducción

vertebrados. En invertebrados existe un solo gen *mbl* (Pascual et al., 2006), que en *Drosophila* codifica al menos 13 isoformas diferentes por *splicing* alternativo. En humanos, al igual que en la mayoría de vertebrados, existen 3 genes parálogos diferentes (*MBNL1*, *MBNL2*, and *MBNL3*), cada uno de los cuales codifica para 7, 2 y 6 isoformas distintas respectivamente.

Una característica común a todas las proteínas pertenecientes a la familia Muscleblind es la presencia de dedos de zinc en su extremo N terminal (Pascual *et al.*, 2006; Warf & Berglund, 2007). Estos dedos de zinc, del tipo CCCH actúan como módulos de interacción uniendo DNA, RNA, proteínas u otras moléculas pequeñas, siendo los responsables de la unión de MBNL1 a las horquillas de CUG expandido (Fig 13). Los dedos de zinc pueden coordinar uno o más iones de zinc, siendo esto crítico para la estabilidad de su estructura secundaria y, por tanto, para su función. Warf y Berglund demostraron que la integridad de estos dedos de zinc es imprescindible para que MBNL1 pueda unirse al RNA, ya que la sustitución de cualquiera de los residuos de cisteína por otro aminoácido inhibe la unión (Warf & Berglund, 2007).





**Figura I3. Unión de MBNL1 al RNA tóxico.** (A) Esquema que muestra la unión de los dedos de zinc 3 (ZnF3) y 4 (ZnF4) de MBNL1 a un RNA de secuencia r(CGCGUGU). ZnF3 y ZnF4 se disponen de manera antiparalela en el interior de la hebra, uniéndose respectivamente a tramos GC y GCU. (B) Las bases de guanina y citosina se insertan en huecos adyacentes de MBNL1 donde residuos conservados de arginina y aminoácidos aromáticos forman una red de puentes de hidrógenos. Figura tomada de Teplova & Patel (Teplova & Patel, 2008).

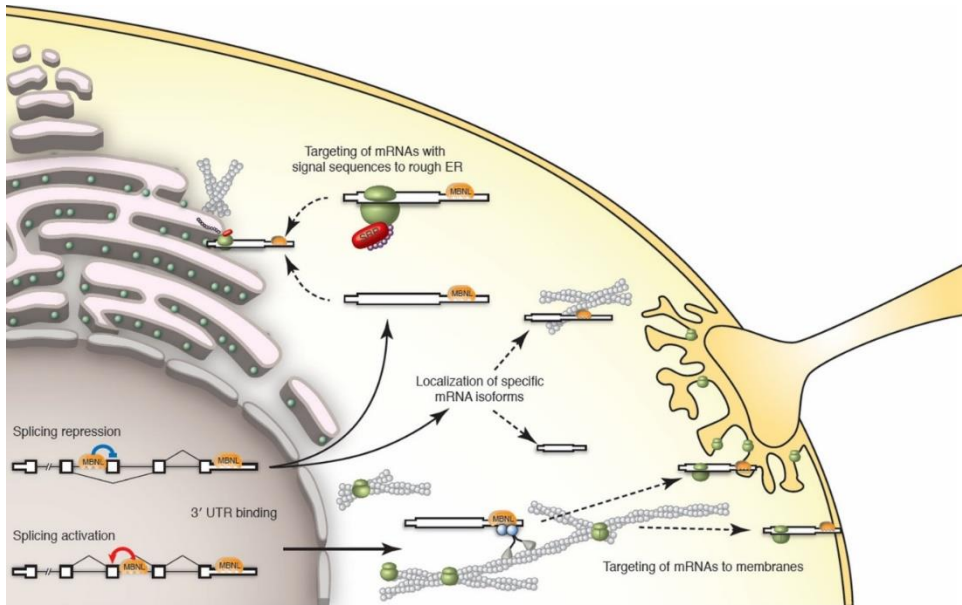
El mecanismo de reconocimiento de MBNL1 a sus dianas depende de la presencia de desapareamientos pirimidina-pirimidina y de la localización de los pares C-G y G-C en la horquilla de CUGs, lo que indica que MBNL1 reconoce tanto motivos de secuencia como motivos estructurales en el RNA (Warf & Berglund, 2007; Yuan *et al.*, 2007; Goers *et al.*, 2008). Mediante estudios de deleciones en transcritos *CTNT*, se definió la secuencia YGCU(U/G)Y, donde Y=U o C como el motivo de unión a MBNL1. Por último, además de a

## *Introducción*

moléculas de RNA de doble cadena, tanto los dedos de zinc de MBNL1 humano como de Mbl de *Drosophila* pueden unir secuencias de RNA de cadena sencilla (Ho *et al.*, 2004; Goers *et al.*, 2008) y al DNA (Kino *et al.*, 2004).

### *4.2. Función molecular de las proteínas Muscleblind en el metabolismo del RNA.*

Se sabe que MBNL2 participa en la localización subcelular de transcritos como la  $\beta$ -actina y la integrina  $\alpha$ 3 desde el núcleo a las adhesiones focales en la periferia celular para su traducción (Adereth *et al.*, 2005). Wang y colaboradores demostraron que las proteínas Mbnl murinas están implicadas en el transporte de cientos de mRNAs a las membranas, siendo su traducción dependiente de Mbnl1. Además, la unión de Mbnl1 al extremo 3'UTR de los transcritos contribuye a la secreción de la proteína, probablemente mediante su localización en el retículo endoplasmático (Wang *et al.*, 2012). También se ha implicado a las proteínas Muscleblind en la estabilidad de los RNAs mensajeros (Osborne *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2010; Masuda *et al.*, 2012).



**Figura I4. Funciones nucleares y citoplasmáticas de MBNL.** MBNL reprime o activa el *splicing* de transcritos en el núcleo. En el citoplasma la unión de MBNL a los extremos 3'UTRs dirige el transporte de los transcritos hacia el retículo endoplasmático rugoso. Por otro lado, los transcritos pueden ser dirigidos hacia la membrana para su traducción localizada, supuestamente mediante interacción con transportadores moleculares del citoesqueleto. Por último MBNL podría mediar la localización isoforma-específica de mRNA. Figura tomada de Wang et al., 2012.

A pesar del gran número de funciones que desarrolla Muscleblind en el metabolismo del RNA (Fig I4), la función más estudiada es su papel como factores de *splicing* alternativo en el músculo esquelético, corazón y sistema nervioso. MBNL1 regula principalmente el cambio en el *splicing* que tiene lugar en la transición de feto a adulto en el tejido muscular, mientras MBNL2 realiza un papel similar en el cerebro (Poulos *et al.*, 2013). Además, el papel de estas dos proteínas en la regulación del *splicing* parece ser intercambiable (Wang *et al.*, 2012). El papel de MBNL3 en el *splicing* de transcritos es más dudoso,

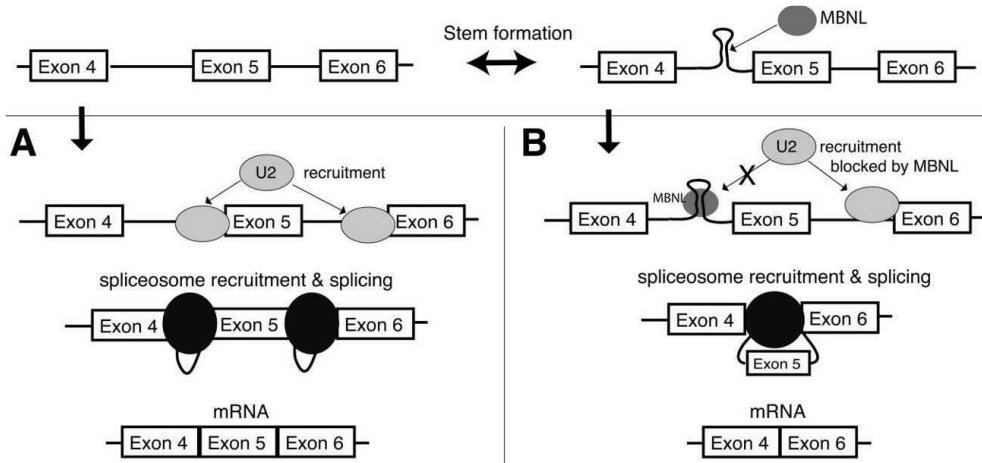
## Introducción

ya que parece no actuar como regulador del *splicing* alternativo *in vivo* aunque sí es capaz de promover el *splicing* de determinados exones *in vitro* (Ho *et al.*, 2004). MBNL1 regula el *splicing* 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, CIC-1 y RyR) y señalización (INSR, Sorbs1 y MTMR1), todos ellos implicados en DM. De hecho, el 80% de los transcritos alterados en ratones modelo que expresan las repeticiones tóxicas, se encuentran también alterados en ratones deficientes para Mbnl1, sugiriendo que los cambios en el transcriptoma inducidos por las repeticiones CUG son dependientes de Mbnl1 (Du *et al.*, 2010). Además, MBNL1 se une de manera directa al menos a tres de estos transcritos: *Serca1*, *cTNT* y *TNNT3* (Ho *et al.*, 2004; Hino *et al.*, 2007; 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 *cTNT* 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 & Berglund, 2007; Yuan *et al.*, 2007; Goers *et al.*, 2008).

Las proteínas Muscleblind pueden desempeñar un papel tanto activador como represor del *splicing* alternativo de exones específicos, de hecho, estudios en ratón demostraron que aproximadamente la mitad de los exones regulados por Mbnl1 son incluidos mientras la otra mitad son excluidos (Du *et al.*, 2010). Mediante análisis bioinformáticos se encontró un enriquecimiento en sitios de reconocimiento de MBNL1 aguas arriba de los exones reprimidos y aguas abajo de los exones incluidos (Goers *et al.*, 2008). Esto sugiere la existencia de un efecto posicional según el cual la actividad de MBNL1 dependería de su posición respecto al exón regulado. Este tipo de efecto posicional también ha sido descrito para otros factores de *splicing* como NOVA o FOX (Ule *et al.*, 2006; Yeo *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). El modelo de represión mediado por MBNL1 fue propuesto por Warf y Berglund, los cuales demostraron que MBNL1 se une a estructuras en horquilla cerca del sitio 3' de *splicing* del intrón 4 de la *cTNT*, estabilizándolas e inhibiendo la unión de la proteína U2AF65 (Warf & Berglund, 2007) (Fig. 15). MBNL1 estabilizaría esta estructura, impidiendo su reconocimiento por parte de otras proteínas de la maquinaria de *splicing*. La proteína U2AF65 forma parte de la maquinaria de *splicing*, siendo la unión de esta proteína al RNA el primer paso para el reclutamiento de esta maquinaria. U2AF65 se une al intrón 4 de los transcritos *cTNT* cuando éste se encuentra en forma de cadena sencilla, pero no cuando se encuentra en doble cadena. De esta manera, MBNL1 y U2AF65 se unirían al RNA de manera competitiva, por lo que la unión de MBNL1 inhibiría la inclusión del exón 5 (Warf & Berglund, 2007). El mecanismo por el que MBNL1 promueve la inclusión de exones

## Introducción

aguas arriba de su sitio de unión no está claro. El enriquecimiento en sitios de unión a MBNL1 aguas abajo de un exón se ha relacionado directamente con la inclusión de ese exón, sin embargo el mecanismo por el que MBNL1 promueve la inclusión de exones no está claro (revisado en Fernandez-Costa *et al.*, 2011).



**Figura. 15. Modelo del papel represor de MBNL1 sobre el *splicing* del exón 5 en los transcritos *cTNT*.** (A) En ausencia de MBNL1, la ribonucleoproteína U2 (U2 snRNP) se une a la cadena de polipirimidinas aguas arriba del exón 5, lo que recluta la maquinaria del *spliceosoma* a este sitio de *splicing* 3' y se produce la inclusión del exón 5. (B) MBNL1 se une a los motivos YGCY del intrón situado aguas arriba y estabiliza la estructura de la horquilla impidiendo la unión del factor de reconocimiento U2, por lo que no se produce el reclutamiento de la maquinaria del *spliceosoma* al sitio de *splicing* 3' y se produce la exclusión del exón 5. Figura tomada de Warf & Berglund, 2007.

### 4.3. Papel de las proteínas Muscleblind en la diferenciación terminal.

En *Drosophila*, *mb1* 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](http://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 en músculo esquelético (Fardaei *et al.*, 2002; Kanadia, Johnstone, *et al.*, 2003; Kanadia, Urbinati, *et al.*, 2003). En la mayoría de los tejidos, los niveles de mRNA de *MBNL1* y *MBNL2* aumentan durante la diferenciación, siendo este incremento especialmente evidente en el cerebro, corazón y músculo esquelético (Konieczny *et al.*, 2015). Concentraciones elevadas de las proteínas MBNL promueven la diferenciación mediante cambios en el metabolismo de determinados mRNAs diana (Konieczny *et al.*, 2015).

Las proteínas MBNL1 y MBNL2, no así MBNL3, están implicadas en los cambios en el *splicing* alternativo observados durante la reprogramación de las células madre embrionarias (ESC) (Han *et al.*, 2013). . La sobreexpresión de MBNL1 y MBNL2 en estas células provoca un cambio en el *splicing* alternativo de estas células de un patrón de células pluripotentes hacia uno más característico de células diferenciadas. Mientras que disminuir en un 90% estas proteínas provoca el efecto inverso, promoviendo un patrón de *splicing* alternativo más típico de células embrionarias pluripotentes. Además, las proteínas MBNL1 se han implicado en la diferenciación terminal de los eritrocitos (Cheng *et al.*, 2014) mediante la regulación del *splicing* alternativo de genes diana como *Ndel1* o *Mff*, los cuales están implicados en la eritropoyesis. En este trabajo quedó patente

## Introducción

además la importancia que tiene la localización subcelular de esta proteína en la regulación de esta diferenciación, ya que sólo la interferencia con la expresión de la isoforma de MBNL1 que incluye el exón 5 (localizada en el núcleo) es suficiente para bloquear la diferenciación terminal de los eritrocitos, a pesar de que la misma isoforma sin el exón 5 estuviera disponible en el citoplasma.

La localización subcelular de las proteínas MBNL1 parece también estar implicada en el desarrollo del cristalino en células derivadas de pacientes de MD1, lo que se relaciona con las características cataratas que sufren los pacientes. Esta implicación parece estar mediada por la regulación de MBNL1 del metabolismo del mRNA (Coleman *et al.*, 2014).

Por otro lado, 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 *myosin heavy chain (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). Recientemente Poulos y colaboradores propusieron que MBNL3 estaría implicado principalmente en la regeneración muscular, activando las células musculares satélite y la diferenciación miogénica que se produce tras una lesión muscular (Poulos *et al.*, 2013). 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 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*), un activador clave durante la miogénesis (Bargiela *et al.*, 2014).

#### 4.4. Las proteínas Muscleblind y CELF1 regulan el *splicing* durante el desarrollo.

En su papel como regulador del *splicing* alternativo, la proteína MBNL1 suele antagonizar la acción del factor de *splicing* CELF1, cuyos niveles se encuentran aumentados en mioblastos, músculo esquelético y corazón de pacientes en un orden de 3-5 veces (ver apartado 3.1).

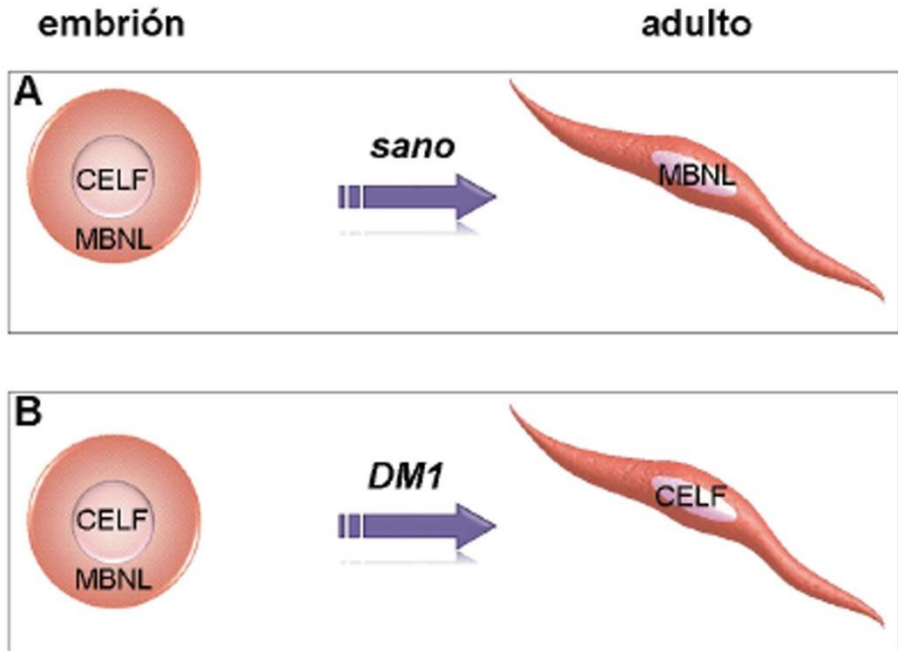
El balance entre las proteínas MBNL1 y CELF1 regula la inclusión o exclusión de exones alternativos en determinados transcritos, por lo que el desequilibrio entre ambas proteínas en los pacientes origina alteraciones en el procesado alternativo de un gran número de transcritos (Philips *et al.*, 1998; Savkur *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006). Un ejemplo es el exón 5 de la troponina cardíaca *cTNT*. Mientras MBNL1 reprime su inclusión en los transcritos maduros, CELF11 la promueve (Ho *et al.*, 2004). MBNL1 y las

## Introducción

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 (Philips *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 2004). Otro ejemplo lo constituye el exón 11 del receptor de la insulina *INSR*, aunque en este caso MBNL1 promueve la inclusión del exón, mientras que CELF1 induce su exclusión (Ho *et al.*, 2004).

Tras el nacimiento, el músculo esquelético sufre una serie de remodelaciones que implican cambios en los programas transcripcionales y post-transcripcionales, incluyendo cambios en los patrones de *splicing*. Kalsotra y col., estudiaron los cambios en el *splicing* que tienen lugar durante este periodo en ratones control y mutantes para *Mbnl1* y mostraron que *Mbnl1* controla los cambios en el patrón de *splicing* de al menos 18 y 13 transcritos durante el desarrollo del corazón y la musculatura esquelética, respectivamente (Kalsotra *et al.*, 2008). El análisis de las secuencias flanqueantes de los exones implicados en estas modificaciones del *splicing* reveló que los intrones adyacentes a estos exones alternativos estaban enriquecidos en motivos de unión a proteínas CELF (UGUGU/GUGUG) y a MBNL (UGCGC). Cabe destacar, que la distribución subcelular de MBNL1 cambia de predominantemente citoplasmática a nuclear, lo que coincide con los cambios observados en el *splicing* (Fig. 16) (Lin *et al.*, 2006). Además de los cambios en la distribución subcelular, los niveles de las proteínas CELF y *Mbnl1* también correlacionan, al menos en ratones, con los cambios en el patrón de *splicing*. Los niveles de CELF1 en el corazón disminuyen durante el desarrollo hasta niveles apenas detectables en individuos adultos, mientras que

los niveles de Mbnl1 comienzan a aumentar a partir del día 5 postnatal (Kalsotra *et al.*, 2008). Estos resultados explican la existencia de isoformas embrionarias en adultos en DM1.



**Figura I6. Cambios en la localización subcelular de las proteínas MBNL1 y CELF1.** (A) En el embrión la proteína MBNL1 se localiza principalmente en el citoplasma, mientras que CELF1 se encuentra en el núcleo. Durante el desarrollo los niveles de CELF1 disminuyen considerablemente (unas 10 veces), mientras MBNL1, que ahora pasa a localizarse principalmente en el núcleo, aumenta unas 4 veces sus niveles. (B) En los pacientes de DM1 los niveles de CELF1 en adultos se encuentran aumentados, mientras que el secuestro de la proteína MBNL1 simula una disminución de los niveles de ésta en el núcleo, por lo que en DM1 las proteínas MBNL1 y CELF1 presenta en adultos un patrón de distribución embrionario. Figura tomada de García-López, 2010.

## 5. Modelos animales de DM1.

## Introducción

En una enfermedad con un cuadro clínico tan variable como DM1, el papel de los organismos modelo es crucial para poder determinar las rutas y elementos implicados en la sintomatología observada en pacientes, así los organismos modelo de DM1 han ayudado a dilucidar el mecanismo de patogénesis de esta enfermedad. Entre los organismos utilizados para modelizar DM1, el ratón ha sido el más utilizado hasta la fecha. Sin embargo, existen otros organismos inferiores cuya menor complejidad los hacen más aptos para determinados procedimientos como rastreos genéticos o químicos, en los que también se ha modelizado DM1:

### 5.1. Modelos en *Caenorhabditis elegans*.

El nematodo *C.elegans* ha sido de gran ayuda en otras enfermedades neurodegenerativas para dilucidar los mecanismos de patogénesis subyacentes (Gidalevitz *et al.*, 2006). Su fácil manipulación genética, junto con su ciclo de vida corto hacen de este nematodo un excelente sistema en el que poder modelizar enfermedades genéticas. Además, este organismo, al ser transparente y tener menos de 1000 células somáticas permite a los investigadores seguir el desarrollo y la supervivencia de neuronas específicas, lo que es de gran ayuda en el estudio de enfermedades neurodegenerativas (Voisine & Hart, 2004). En *C. elegans* existen varios modelos de DM1, tanto de sobreexpresión de las repeticiones CUG como de alteración de los factores de *splicing* MBNL1 y CELF1. En el caso de sobreexpresión de CUGs, Chen y colaboradores fusionaron la proteína reportera GFP a un número creciente de repeticiones (5, 30, 83, 125, 213) observando distintos fenotipos (Chen *et al.*, 2007) que comprenden desde

defectos musculares leves hasta letalidad, en función del tamaño de las repeticiones, lo que correlaciona con la anticipación génica descrita en pacientes (Harper, 2001). En cuanto a las alteraciones de los factores de *splicing*, en *C. elegans* existe un solo gen *muscleblind* (*mbl-1*), cuya falta de función provoca fenotipos de falta de movilidad debido a la desorganización de los cuerpos densos en el músculo (estructuras homólogas a las bandas Z de los sarcómeros) (L. C. Wang *et al.*, 2008) y defectos sinápticos en las motoneuronas debidos a malformaciones de las sinapsis de las uniones neuromusculares (NMJ, del inglés neuromuscular junction) (Spilker *et al.*, 2012). Por otro lado, el homólogo de *CELF1* en *C. elegans*, *etr-1*, es necesario para el correcto desarrollo del músculo, causando su silenciamiento, entre otros efectos, parálisis corporal (Milne & Hodgkin, 1999).

Recientemente, utilizando este organismo como modelo de DM1 se ha descrito por primera vez la posible implicación de la ruta de nonsense-mediated mRNA decay (NMD) en la toxicidad y regulación de los niveles de los transcritos con expansiones tóxicas de CUG (Guerin *et al.*, 2014).

## 5.2. Modelos en pez cebra.

En los últimos años, el vertebrado *Danio rerio*, comúnmente llamado pez zebra, ha sido muy utilizado en la investigación de enfermedades neuromusculares (Dowling *et al.*, 2010; Telfer *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2011), así como para el rastreo de compuestos con propiedades terapéuticas (Kawara *et al.*, 2011). La principal ventaja que presenta este organismo es su capacidad para introducir construcciones de RNA, DNA o morfolinós en el estadio de célula única. Aprovechando

## Introducción

esto, Machuca-Tzili y colaboradores silenciaron el gen *mbnl2*, homólogo del humano *MBNL2*, observando que la falta de función de este gen causa alteraciones morfológicas en ojo, corazón, cerebro y músculo, así como alteraciones en el *splicing* de los transcritos *clcn1* y *cTNT*, teniendo un papel fundamental durante el desarrollo embrionario del pez zebra (Machuca-Tzili *et al.*, 2011).

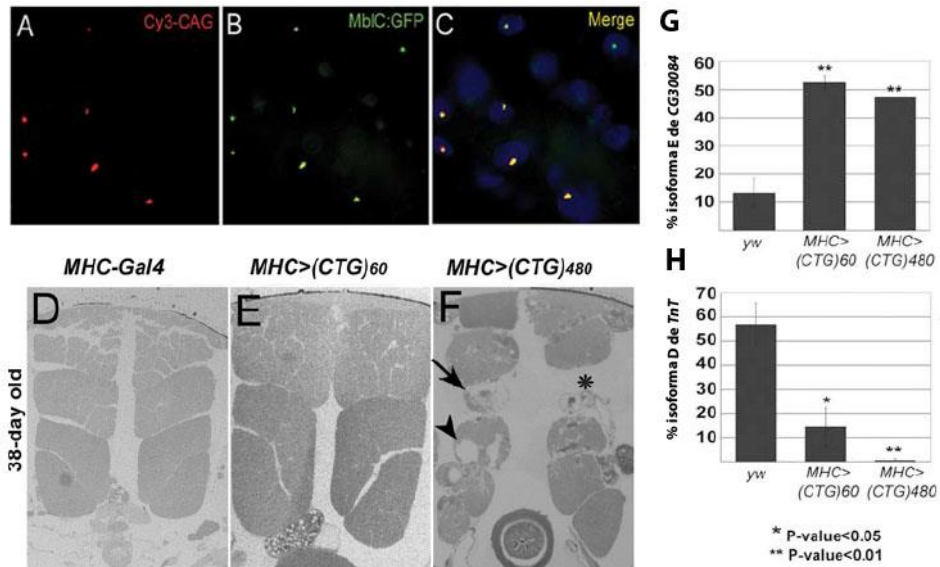
Este organismo también se utilizó para generar un modelo de DM1 mediante la introducción de un RNA conteniendo 91 repeticiones CUG, en el que se observaron anormalidades morfológicas, del comportamiento, disminución de la viabilidad y cambios transcripcionales en el sistema nervioso y muscular. Además, esta toxicidad fue suprimida al introducir también el mRNA que codifica para *mbnl2* (Todd *et al.*, 2014). Recientemente, este modelo ha sido utilizado para demostrar que una mayor estabilización del RNA portador de las expansiones de CUG disminuye la toxicidad asociada a dichas expansiones (Delorimier *et al.*, 2014).

### 5.3. Modelos en *Drosophila*.

*Drosophila melanogaster*, cuyo uso en investigación se remonta a hace más de un siglo, ha sido capaz de modelizar con éxito un gran número de enfermedades humanas (Pandey & Nichols, 2011). Gracias a su gran homología genética con humanos, con el 75% de los genes implicados en enfermedades humanas conservados en *Drosophila* (Rubin *et al.*, 2000) y a su fácil manipulación genética, se ha consolidado como una valiosa herramienta para el rastreo de modificadores genéticos y químicos de un gran número de enfermedades (Pandey & Nichols, 2011).

En 2005, Houseley y colaboradores generaron el primer modelo en *Drosophila* de DM1, basado en la expresión de 162 repeticiones CUG en la región 3'UTR de transcritos GFP (Houseley *et al.*, 2005). En estas moscas modelo, al igual que ocurre en pacientes, Mbl se encuentra secuestrado por las repeticiones CUG en agregados nucleares. Utilizando el sistema de expresión inducible Gal4/UAS (Brand & Perrimon, 1993), observaron que el número y la intensidad de estos agregados eran máximos 8 h después de la inducción de la expresión de las repeticiones y desaparecían entre 2 y 4 días después de que hubiera cesado la expresión. De este modo demostraron que los agregados nucleares son estructuras dinámicas que desaparecen una vez cesa la expresión del RNA tóxico. Además, los autores demostraron que Mbl no es suficiente para la formación de los foci, ya que la sobreexpresión de *mblA* o *mblC* 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 observable, demostrando por primera vez que la formación de agregados nucleares, incluyendo el secuestro de Mbl, no es tóxica *per se*. En nuestro laboratorio (y en el de otros grupos en paralelo) desarrollamos un modelo de DM1 en *Drosophila* mediante la expresión de 480 repeticiones CTG. Este modelo reproducía síntomas de la enfermedad como la formación de foci nucleares, el secuestro de Muscleblind, alteración en el *splicing* de determinados transcritos, degeneración muscular progresiva (Fig I6), neurodegeneración de los fotorreceptores del ojo y viabilidad reducida (de Haro *et al.*, 2006; García-Lopez *et al.*, 2008). Este modelo se ha utilizado con éxito para la búsqueda de fármacos en DM1 (García-López *et al.*, 2008; García-

López *et al.*, 2011), así como para la caracterización de otras alteraciones implicadas en DM1 (Fernández-Costa *et al.*, 2013).



**Figura I6. Fenotipos de DM1 reproducidos en *Drosophila*.** La expresión de 480 repeticiones CTG en *Drosophila* también produce la formación de agregados nucleares (A) que colocalizan con la proteína Muscblind (B-C). Los músculos indirectos del vuelo de estas moscas modelo también muestran degeneración y desorganización de los paquetes musculares (D-F). Además, presentan alteraciones en el *splicing* alternativo de los transcritos *CG30084* (G) y *TnT* (H). Figura modificada de García-López *et al.*, 2008.

Recientemente, Picchio y colaboradores generaron un modelo inducible de DM1 en larvas de *Drosophila* (Picchio *et al.*, 2013). En este trabajo los autores generaron cuatro líneas transgénicas independientes cada una de las cuales expresaba un número creciente de repeticiones CUG (240, 480, 600 o 960) y reprodujeron aspectos claves de la enfermedad. Entre otros, los autores



describieron movilidad reducida, retraso en la relajación muscular y alteraciones en la morfología muscular de las larvas. Además realizaron un análisis global de la transcripción buscando alteraciones en la expresión de genes que pudieran estar alterados en DM1, encontrando aproximadamente 600 genes cuya expresión estaba aumentada o disminuida respecto a los controles. Además, tanto la gravedad de los fenotipos observados como el número de genes desregulados aumentaba conforme aumentaba el número de repeticiones (Picchio *et al.*, 2013).

#### 5.4. Modelos en ratón (*Mus musculus*).

Existen varios modelos murinos de expresión de repeticiones CTG, cada uno reproduce algún aspecto importante de la enfermedad, sin ser ninguno de ellos un modelo completo de la DM1 capaz de reproducir todos los síntomas de la enfermedad. El primer modelo descrito por Mankodi y colaboradores se basaba en la expresión de 250 repeticiones CTG en el extremo 3'UTR de la actina esquelética humana (*HSA<sup>LR</sup>*, de *Human Skeletal Actin Long Repeats*) (Mankodi *et al.*, 2000). Estos ratones presentaban foci, miotonía, miopatía y defectos en el *splicing*, todo ello reversible por la sobreexpresión de *Mbnl1* (Kanadia *et al.*, 2006), demostrando la toxicidad de las repeticiones CTG y el papel clave de la proteína Muscleblind en la patogénesis de la enfermedad. Aunque inicialmente no se vieron alteraciones en la expresión de la proteína CELF1, recientemente sí que se ha detectado un aumento en los niveles de CELF1 en estos ratones (K. Jones *et al.*, 2012). Sin embargo, no reproducían aspectos clave de la DM1 como la inestabilidad somática e intergeneracional o

## Introducción

la debilidad y el desgaste muscular. Además, el fusionar las repeticiones a la actina humana, restringe la investigación al músculo esquelético adulto y ciertos aspectos de la unión neuromuscular (Wheeler *et al.*, 2007).

Otro modelo murino de DM1 en el cual las repeticiones CTG se encuentran en su contexto humano (45 kb de la región genómica que rodea a las repeticiones) es el bautizado como DM300 por tener 320 repeticiones CTG). Estos ratones reproducen los foci nucleares, la miotonía, la debilidad muscular y la histopatología además de mostrar retraso en el crecimiento y alta mortandad (Seznec *et al.*, 2000; Seznec *et al.*, 2001). A pesar de que los fenotipos observados eran leves y altamente variables (Huguet *et al.*, 2012), estos ratones tiene la ventaja de modelizar aspectos de la enfermedad en diferentes tejidos, detectándose foci en músculo esquelético, corazón y SNC, además de reproducir la inestabilidad somática e intergeneracional observada en pacientes. De hecho, a partir de DM300, por inestabilidad intergeneracional de las repeticiones, se generaron los ratones DM600 (600 repeticiones CTG) y DMSXL (>1300 repeticiones CTG), éstos últimos presentan fenotipos más fuerte con alta mortalidad, retraso del crecimiento, alteraciones en el *splicing* de transcritos expresados en músculo, corazón y SNC, así como defectos musculares a nivel histológico y funcional (Gomes-Pereira *et al.*, 2007; Huguet *et al.*, 2012; Decostre *et al.*, 2013). El estudio de estos ratones DMSXL permitió la caracterización de alteraciones en el sistema nervioso central en DM1, observándose cambios en los niveles de neurotransmisores o falta de plasticidad sináptica a corto plazo, lo que desemboca en fenotipos cognitivos y del

comportamiento (Hernandez-hernandez *et al.*, 2013). También permitió la detección *in vivo* de transcritos bidireccionales de *DMPK*, describiendo la existencia de ambos transcritos en los foci (Huguet *et al.*, 2012). Además, tanto los ratones DM600 como los DMSXL mostraban alteraciones en la función respiratoria respecto a los controles, aunque este fallo respiratorio no correlaciona con la longitud de las repeticiones ya que no observaron diferencias entre ambos modelos (Panaite *et al.*, 2013).

El hecho de necesitar un gran número de repeticiones CTG para poder tener fenotipos observables en los ratones parece ser debido a la baja expresión de los transcritos tóxicos en estos ratones (Gomes-Pereira *et al.*, 2007).

En cuanto a niveles de expresión de las repeticiones tóxicas, Mahadevan y colaboradores, lograron generar un modelo de DM1 en ratón que expresaba las repeticiones 200 veces más que ningún otro modelo murino. Este modelo contiene las expansiones en su contexto humano con el gen *DMPK* y su región reguladora de una manera inducible (Mahadevan *et al.*, 2006). A pesar de que la longitud de las repeticiones no está considerada patogénica (tan sólo 5 copias de las repeticiones CTG), estos ratones son capaces de reproducir la miotonía, el bloqueo cardíaco y la histopatología del músculo esquelético presente en los pacientes. Estos animales presentan alteraciones del *splicing* en el músculo esquelético, así como sobreexpresión de la proteína CELF1, aunque los autores no fueron capaces de detectar foci en sus tejidos. A pesar de la paradoja que supone el que repeticiones no patogénicas puedan producir fenotipos de DM1 cuando se expresan en grandes cantidades, este modelo ha

## *Introducción*

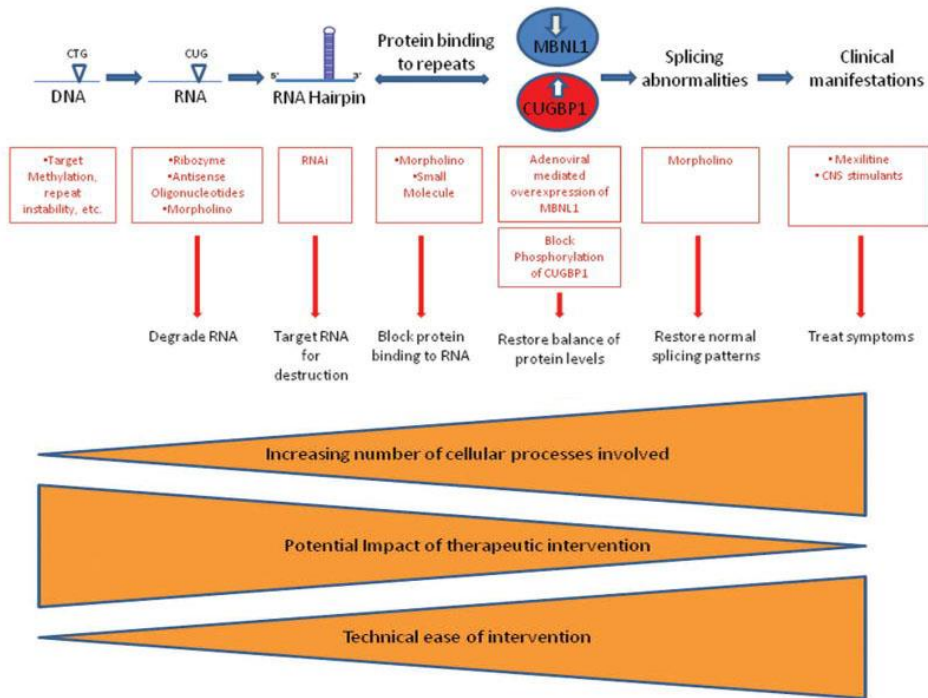
sido de gran importancia en el contexto de las terapias para DM1 ya que demostró por primera vez que los síntomas de la enfermedad podrían revertirse al dejar de expresar las repeticiones CUG, situando al RNA tóxico como principal diana para la búsqueda de fármacos para DM1. Además, el estudio de este modelo murino ha permitido la caracterización de otra proteína implicada en la patogénesis de DM1: el factor de transcripción NKX2-5 (Yadava *et al.*, 2008). Inicialmente, este factor de transcripción se identificó alterado en el corazón y músculo esquelético en estos ratones y su sobreexpresión en DM1 se confirmó en biopsias de músculo esquelético de pacientes. Este grupo también generó un modelo en ratón que expresaba un número mayor de repeticiones (200 copias del trinucleótido CTG), sin embargo estos ratones, a pesar de formar agregados nucleares y secuestrar MBNL1, no mostraban ningún fenotipo observable (Mahadevan *et al.*, 2006).

Por último, existe otro modelo de DM1 en ratón que expresa 960 repeticiones CTG en su contexto natural en el exón 15 del gen *DMPK* bajo el control del sistema Cre-lox al que denominaron EpA960 (G. S. Wang *et al.*, 2007). El sistema Cre-lox permite la expresión dirigida del transgén, en este caso las repeticiones, a un tejido específico, permitiendo estudiar de manera independiente la toxicidad de las repeticiones en cada tejido. Así, la expresión de las repeticiones en el corazón produce alteraciones histopatológicas, funcionales y electrofisiológicas características de DM1 las cuales finalmente desembocan en la muerte prematura durante las dos primeras semanas tras la inducción de su expresión. Por otro lado, la expresión de estas repeticiones en el músculo esquelético reproduce la miotonía y la degeneración muscular progresiva observada en

pacientes cuatro semanas después de la inducción de su expresión (Orengo *et al.*, 2008). Tanto los cambios fisiológicos observados en músculo como en corazón van acompañados de agregados nucleares, secuestro de MBNL1, sobreexpresión de CELF1 y alteraciones del *splicing*. Sin embargo, aún sin inducir la expresión del transgén con el sistema Cre-lox, estos ratones parecen expresar las repeticiones CTG. Además, las 960 repeticiones CTG son interrumpidas, lo que puede estar relacionado con alteraciones moleculares y síntomas de DM1 inusuales (Musova *et al.*, 2009; Braida *et al.*, 2010).

## **6. Tratamientos y terapias contra la DM1**

A pesar de que la Distrofia Miotónica fue descrita por primera vez en 1909, hoy en día, más de un siglo después todavía no se ha encontrado un tratamiento eficaz contra esta enfermedad, siendo la paliación de los síntomas la única intervención terapéutica disponible hoy en día para los pacientes de DM1. Sin embargo, los recientes avances realizados en el entendimiento de la enfermedad y su patogénesis han llevado al desarrollo de nuevas estrategias centradas en distintas dianas terapéuticas (Fig I6):



**Figura 16. Pasos en la patogénesis y posibles dianas terapéuticas de DM1.** Resumen de los diferentes puntos en los que se puede atacar la enfermedad en el que se indican los posibles tratamientos, algunos de ellos actualmente en desarrollo, así como su potencial terapéutico y dificultad técnica. En general, conforme se avanza en el potencial terapéutico del posible fármaco aumenta la complejidad para su posible identificación. Figura tomada de Foff & Mahadevan., 2011.

*6.1. La expansión de las repeticiones y la inestabilidad somática.*

Esta opción es de momento una posibilidad teórica, ya que todavía no comprendemos bien el mecanismo por el cual las repeticiones se expanden tanto en células somáticas como germinales (Axford *et al.*, 2013). Sin embargo, en el futuro los mecanismos de reparación, las rutas de metilación y la maquinaria que regula la replicación del DNA durante el desarrollo pueden ser dianas clave para el control de la

inestabilidad de las repeticiones reduciendo su expansión así como la anticipación genética observada en pacientes (Foff & Mahadevan, 2011). En este sentido, Gomes-Pereira y Monckton identificaron varias moléculas capaces de reducir la tasa de expansión somática de las repeticiones CTG (Gomes-Pereira & Monckton, 2004), sin embargo, estas moléculas resultaron ser extremadamente tóxicas. Otra aproximación utilizando oligonucleótidos antisentido (ASO) consiguió suprimir la inestabilidad somática de las repeticiones CTG en cultivos celulares y en ratones modelo de DM1 (Nakamori *et al.*, 2011). Por último, también pueden resultar prometedoras moléculas pequeñas capaces de interactuar directamente con las repeticiones CTG a nivel de DNA (Foff & Mahadevan, 2011). Entre éstas, la pentamidina (Warf *et al.*, 2009), inicialmente descrita por su unión a la horquilla de CUGs, así como su derivado la heptamidina, la cual también se une a las repeticiones, parecen unirse también a las repeticiones CTG a nivel de DNA (Coonrod *et al.*, 2013).

## 6.2. Los niveles de RNA tóxico.

Atacar directamente al RNA portador de las repeticiones CUG parece ser una de las opciones más prometedoras hoy en día. En general esta estrategia se sirve de las ribozimas o de oligonucleótidos antisentido para disminuir los niveles del RNA tóxico.

### 6.2.1. Ribozimas.

Las ribozimas son moléculas de RNA capaces de interactuar con otras moléculas de RNA, bien modificando mediante *splicing* la secuencia original del RNA diana o cortándolo, lo que, en última instancia,

## Introducción

provoca la degradación de estos RNAs diana (Sioud, 2004). Phylactou y colaboradores demostraron que en fibroblastos en cultivo, estas ribozimas eran capaces de cortar la secuencia endógena conteniendo 12 repeticiones CTG del transcrito *DMPK* y sustituirla por una secuencia de tan sólo 5 repeticiones (Phylactou *et al.*, 1998; Phylactou, 2004). Sin embargo, el número de repeticiones sustituido (12 copias del trinucleótido CTG) no produce patogenicidad en DM1. Además, el hecho de liberar las repeticiones tóxicas del transcrito puede no mejorar el fenotipo de los pacientes, ya que en el caso de la DM2 las repeticiones se encuentran libres del transcrito en un intrón y continúan siendo patogénicas, si bien la gravedad de los síntomas parece ser menor. En conjunto, no está claro si el hecho de sustituir mediante *splicing* mediado por ribozima la secuencia de repeticiones largas por otra secuencia con repeticiones cortas podría tener un efecto terapéutico en los pacientes de DM1. Langlois y colaboradores, aprovecharon la capacidad de cortar y por tanto degradar el RNA de las ribozimas para destruir el RNA tóxico. Aprovechando el hecho de que el transcrito de *DMPK* mutante, no así el normal, queda retenido en el núcleo, utilizaron ribozimas nucleares las cuales teóricamente sólo tendrían acceso al RNA mutante (Langlois *et al.*, 2003). Mediante esta aproximación consiguieron reducir foci y rescatar parcialmente el *splicing* del receptor de la insulina en mioblastos DM1. Sin embargo, también observaron una reducción del 50% en los niveles del transcrito normal, esta reducción, aunque inferior a la observada para el transcrito mutante (63%), podría tener efectos adversos en los pacientes, ya que disminuir la expresión total de *DMPK* dada la importancia de *DMPK* en la función cardíaca y el metabolismo de la



insulina (Kaliman *et al.*, 2005; Llagostera *et al.*, 2007) podría resultar igualmente patológico. La disminución de los niveles del transcrito tóxico mediante su corte por ribozimas podría ser una terapia génica para DM1 siempre que se consiga mejorar su especificidad y administración (Foff & Mahadevan, 2011).

### 6.2.2. Oligonucleótidos antisentido.

Los oligonucleótidos antisentido (ASO) son secuencias cortas de cadena sencilla que se unen a un RNA diana. Esta unión puede (a) marcar el RNA para su degradación por RNAsa H o (b) inhibir estéricamente la unión de otras proteínas o RNAs. Respecto a los ASOs que degradan el RNA mediante activación de la RNAsa, también llamados *gapmers*, existen actualmente dos ASOs de este tipo en ensayos clínicos: mipomersen, para la hipercolesterolemia familiar (Raal *et al.*, 2010) y OGX-11, para el cáncer de próstata (Chi *et al.*, 2010). En DM1 el uso de estos *gapmers* para degradar los transcritos portadores de CUG mediante la activación de la RNasa H ha conseguido resultados positivos tanto en células como en ratones modelo de DM1, disminuyendo de manera específica los niveles de RNA tóxico en ambos modelos. Además, estos oligonucleótidos reducen los foci nucleares en células y ratón. En ratones tras su administración intramuscular, se observó mejoría en el *splicing* de los transcritos *Cypher*, *Serca* y *Cln1*, sin embargo también se detectaron anomalías histopatológicas en el músculo esquelético (Lee *et al.*, 2012). La administración sistémica de estos ASOs debería disminuir este tipo de toxicidad (Gao *et al.*, 2013). A pesar de haberse descrito que los *gapmers* tienen una distribución pobre en los tejidos más

## Introducción

afectados en DM1 (músculo esquelético, corazón y cerebro) (Muntoni and Wood, 2011), Wheeler y colaboradores consiguieron disminuir los niveles de RNA tóxico en músculo esquelético tras la administración subcutánea de ASOs dirigidos contra la región 3'UTR del gen de la actina humana que porta las 250 repeticiones en los ratones HSA<sup>LR</sup>. Utilizando esta aproximación los autores observaron disminución de foci, liberación de MBNL1, mejora de la miotonía y el *splicing*. Además, los niveles de RNA tóxico continuaban disminuidos un año después de la inyección sin observarse efectos adversos aparentes (Wheeler *et al.*, 2012). Basándose en estos ensayos las compañías farmacéuticas ISI ([www.isispharm.com](http://www.isispharm.com)) y Biogen ([www.biogenidec.com](http://www.biogenidec.com)) han establecido una colaboración para desarrollar un ASO dirigido contra la proteína DMPK que se espera testar en ensayos clínicos próximamente (<http://www.myotonic.org/isis-clinical-trial-update>).

Los ASOs que provocan un bloqueo estérico también se han utilizado para desarrollar posibles fármacos en otras enfermedades. Un ejemplo es el de la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD, OMIM #300377), para la cual la empresa AVI Biopharma posee un ASO que ha llegado de momento hasta la fase clínica IIb ([www.avibio.com](http://www.avibio.com)). En DM1, se obtuvieron resultados positivos con un morfolino (un tipo de ASOs de bloqueo estérico) dirigido contra las repeticiones expandidas. Este oligonucleótido antisentido fue capaz *in vitro* de unirse al RNA tóxico y mantenerse unido a él de forma estable, inhibiendo su unión a otras proteínas. En ratones modelo, la inyección del morfolino y su posterior electroporación disminuye los agregados nucleares, libera a MBNL1, reduce la miotonía y revierte

las alteraciones del *splicing* hasta niveles comparables con los de animales salvajes. Además el efecto de una simple inyección dura hasta catorce semanas en ratones. (Wheeler *et al.*, 2009). PS58, otro tipo de ASOs de bloqueo estérico (2'-O-metil-fosforotioato) diseñado para unirse a las repeticiones CUG también redujo los foci y mejoró el *splicing* en un modelo murino de DM1. Sin embargo, su efecto era local y observaron degradación del transcrito salvaje y la consiguiente disminución en los niveles de DMPK (Mulders *et al.*, 2009). A pesar de que estos dos ASOs de bloqueo estérico no estaban diseñados para activar la RNAsa H y, por tanto, degradar el RNA tóxico, sí se observó en ambos casos una disminución de los niveles de este RNA (50% para el caso del morfolino y 80% para el PS58) por mecanismos desconocidos hasta el momento (Mulders *et al.*, 2009; Wheeler *et al.*, 2009).

### 6.3. La horquilla de RNA.

Las horquillas largas de cadena doble son dianas de Dicer, la ribonucleasa encargada de reconocer los RNAs que serán degradados mediante la ruta del RNA interferente (revisado en Soifer *et al.*, 2007). Este mecanismo de degradación del RNA se encuentra activo en células con expansiones del trinucleótido CUG al introducir un oligonucleótido sintético (CUG)<sub>7</sub>, mostrando además una gran especificidad por los transcritos portadores de repeticiones largas (Krohl *et al.*, 2007).

El péptido ABP1, identificado mediante ensayos *in vivo* en *Drosophila*, es capaz de desestructurar la horquilla del RNA tóxico. ABP1 se une a la horquilla provocando un cambio en la molécula hacia RNA de

## Introducción

cadena sencilla. A nivel fenotípico, ABP1 revierte los foci nucleares, la degeneración muscular y letalidad inducidos por la expresión de las repeticiones CUG en la mosca. Además este hexapéptido también revierte las histopatología muscular y el *splicing* de los transcritos Serca y TnnT3 en ratones modelo (García-López *et al.*, 2011)

Dentro de esta categoría también se incluyen aquellas moléculas capaces de reducir el número de foci nucleares en pacientes. En este sentido, utilizando un ensayo de rastreo masivo *in vitro* en células modelo de DM1 en el que se buscaban compuestos capaces de disminuir los foci de estas células, se identificaron las moléculas Ro 31-8220 y chromomycin A3, las cuales fueron también capaces de liberar MBNL1, revertir las alteraciones en el *splicing* de los transcritos INSR y SERCA. Además, el compuesto Ro 31-8220 disminuye la toxicidad de las CUG en un modelo de pez zebra (Ketley *et al.*, 2014)

### 6.4. La unión RNA tóxico-proteínas.

Dado que el secuestro y subsiguiente pérdida de función de las proteínas Muscleblind tiene un papel fundamental en la patogénesis de la DM1, una aproximación terapéutica razonable sería inhibir 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). Posteriormente, utilizando un ensayo de retardo en gel, se identificó una molécula pequeña, la pentamidina con capacidad para inhibir la unión de MBNL1 a las repeticiones CUG. Sin embargo, como ya hemos mencionado, recientemente se ha demostrado que esta molécula también actúa a nivel de DNA (Coonrod *et al.*, 2013). En el estudio original, la pentamidina disminuía foci y revertía los defectos de *splicing* de los transcritos *INSR* y *CTNT* en células, y el del *Clcn-1* y *Serca1* en ratones, aunque sin un efecto dosis-respuesta (Warf *et al.*, 2009). La pentamidina se convirtió en el primer ejemplo de molécula identificada *in vitro* con un efecto terapéutico potencial sobre las repeticiones CUG *in vivo*. Sin embargo, los autores encontraron muerte celular en cultivo y letalidad en ratones a concentraciones muy próximas a las ensayadas, lo que no les permitía aumentar la dosis para incrementar el efecto positivo observado en los fenotipos de DM1. Además, el cambio observado en el *splicing* de transcritos parece ser independiente de la presencia de las repeticiones, lo que podría contrarrestar su posible valor terapéutico a largo plazo (Nakamori *et al.*, 2009; Warf *et al.*, 2009).

En los últimos años, se han publicado un gran número de trabajos en los que diseñan distintos ligandos modulares capaces de unirse a repeticiones (C/CUG)<sub>n</sub> y desplazar a MBNL1. Modificando los compuestos Hoechst 33258, kanamicina A, bis-benzimidazole desarrollan moléculas capaces de inhibir la unión de MBNL1 al RNA tóxico (Childs-Disney *et al.*, 2007; M. M. Lee *et al.*, 2009; Pushechnikov *et al.*, 2009; Childs-Disney *et al.*, 2011; Childs-Disney, Hoskins, *et al.*, 2012; Childs-Disney, Parkesh, *et al.*, 2012; Childs-

## *Introducción*

Disney *et al.*, 2013). Estos compuestos han conseguido resultados ligeramente positivos en la disminución de foci y recuperación del *splicing* en células (Childs-Disney, Hoskins, *et al.*, 2012) y en ratones (Childs-Disney, Parkesh, *et al.*, 2012). Además, el grupo del Dr. Zimmerman ha publicado diversos estudios en los que mediante el diseño racional identifican compuestos capaces de interferir en la unión del RNA tóxico a MBNL1 (Arambula *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2012; Jahromi *et al.*, 2013). Algunas de éstas moléculas fueron capaces de revertir la toxicidad de las repeticiones CUG en modelos celulares y en *Drosophila* (Wong *et al.*, 2014).

La modificación de estos compuestos para aumentar su eficacia *in vivo* constituye una de las mejores oportunidades para la identificación de un fármaco eficaz para DM1. Sin embargo, la principal limitación que surge en torno a esta aproximación es el hecho de que las moléculas que interfieren con la unión entre MBNL1 y CUG puedan 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 *et al.*, 2009), o interferir con otras proteínas con un mecanismo de unión al RNA similar a MBNL1.

### *6.5. Modificar los niveles de las proteínas de unión al RNA.*

Basándose en la importancia de las proteínas MBNL1 o CELF1 en la patogénesis de la DM1, otro modo de atacar la enfermedad sería restableciendo a niveles normales estas dos proteínas. De este modo esperaríamos al menos restaurar parte de los fenotipos observados en DM1. Existen dos pruebas de concepto que apoyan esta hipótesis: el rescate mediante la expresión de MBNL1 de determinados

fenotipos de la enfermedad en ratones modelo, y la reducción en la patología cardíaca tras el tratamiento de ratones modelo con un inhibidor de PKC.

La sobreexpresión de MBNL1 en los ratones modelo HSA<sup>LR</sup> reducía la miotonía y restablecía el *splicing* del canal de cloro (Kanadia *et al.*, 2006). Además, la sobreexpresión de MBNL1 en ratones sanos no provoca toxicidad asociada a un aumento de los niveles de esta proteína (Chamberlain *et al.*, 2012), por lo que aumentar los niveles de MBNL1 podría ser una posible estrategia terapéutica para la DM1. La administración directa de MBNL1 pasaría por el uso de vectores adenovirales los cuales, aunque muy prometedores, aún tienen que superar varias barreras técnicas para poder administrarse a pacientes. Sin embargo, pueden existir moléculas que aumenten la expresión del gen MBNL1, en este sentido la identificación de una molécula que aumentara los niveles de MBNL1 podría ser un fármaco eficaz para la DM1 capaz de revertir al menos los síntomas debidos a la falta de función de esta proteína.

Por otro lado, ya que la activación de CELF1 parece ser debida, al menos en parte, a su fosforilación mediada por PKC, es lógico suponer que un inhibidor de PKC provocaría la disminución de los niveles de esta proteína. Basándose en esta idea, Cooper y colaboradores administraron el inhibidor de PKC Ro-31-8220 en ratones que expresaban las repeticiones CTG en el corazón (G. S. Wang *et al.*, 2009). En estos ratones el tratamiento con Ro-31-8220 inhibía el aumento de los niveles de CCELF1, lo que en última instancia llevó a una significativa disminución de la mortalidad, mejoría de la conducción y contracción cardíaca y reversión de las alteraciones del

## *Introducción*

*splicing* de los transcritos diana de CELF1. Aunque los autores no discutieron el posible uso de este inhibidor de PKC en pacientes, ni su acción en otros tejidos distintos del cardíaco, dado el papel de PKC en la regulación de otras proteínas, es de esperar que la inhibición de esta proteína a nivel sistémico produzca un gran número de efectos secundarios.

Utilizando el mismo razonamiento se ensayaron dos compuestos inhibidores de quinasas: C16 y C51 en células de DM1, observándose reducción en el tamaño y el número de los foci nucleares, disminución de los niveles de CELF1 y reversión del *splicing* (Wojciechowska *et al.*, 2014). Al igual que ocurre con los inhibidores de PKC, cabe la posibilidad de que estas moléculas inhibidoras de quinasas provoquen efectos adversos al interactuar con la función de otras quinasas.

### *6.6. Restaurar el splicing de los transcritos alterados.*

Aunque para muchos de los fenotipos observados en los pacientes no existe una relación directa entre éstos y las alteraciones descritas en el *splicing* de determinados transcritos, sí que se ha establecido esta relación directa entre algunos de los síntomas clave de la DM1 y defectos en el *splicing*. Así, parece estar bastante bien establecida la relación entre las alteraciones en el *splicing* del transcrito CLCN-1 y la miotonía observada en los pacientes, al menos en los primeros estadios de la enfermedad (DiFranco *et al.*, 2013), mientras que la resistencia a la insulina sería consecuencia directa de los defectos en el *splicing* del transcrito INSR (Ranum & Cooper, 2006). Por lo tanto, es de esperar que la reversión de defectos de *splicing* en transcritos



como el del canal de cloro o la insulina mejoren los síntomas observados en los pacientes. En este sentido, Wheeler y colaboradores diseñaron ASO específicos para los transcritos Clcn-1 en ratones HSA, así como en ratones knockout de Mbnl1, 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 Clcn-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 ASOs con dianas diferentes para tratar los distintos síntomas de una manera eficaz.

### 6.7. Paliar síntomas

Existen varias aproximaciones terapéuticas en DM1 que consisten en el tratamiento paliativo de los síntomas. Entre ellos, el uso de mexiletin para disminuir la miotonía (Logigian *et al.*, 2010) o estimulantes del sistema nervioso central para evitar la fatiga (Penisson-Besnier *et al.*, 2008) son algunos ejemplos de fármacos que se dan rutinariamente para tratar síntomas en los pacientes. Existen otros ejemplos de compuestos que, a pesar de haber llegado incluso a ser testados en fase clínica, no consiguieron resultados positivos. Es el caso de la hormona DHEA (sulfato de dehidroepiandrosterona) la cual, a pesar de haber obtenido inicialmente resultados prometedores (Nakazora & Kurihara, 2005), no fue capaz de disminuir la miotonía en pacientes tras 12 semanas de administración (Penisson-Besnier *et al.*, 2008). Estudios preliminares demostraron que el factor de crecimiento IGF-1 podía mejorar la

## *Introducción*

fuerza muscular en adultos con DM1 (Vlachopapadopoulou *et al.*, 1995), lo que llevó a la compañía Insméd (www.insmed.com) al desarrollo de IPLEX, una forma recombinante de este factor de crecimiento que llegó a ser ensayada en estudios clínicos en fase II. Desgraciadamente los resultados obtenidos fueron negativos por lo que se descartó su uso para el tratamiento de la debilidad muscular en DM1.

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.

## **7. El rastreo de compuestos *in vivo* como herramienta para la identificación de nuevas terapias.**

### *7.1. Limitaciones del rastreo tradicional de compuestos.*

El descubrimiento de una única molécula prometedora para el tratamiento de una enfermedad determinada puede costar más de una década y millones de euros. A pesar de la gran cantidad de esfuerzo invertido, la mayoría de las moléculas candidatas terminan siendo descartadas en algún punto previo a su lanzamiento al mercado. Entre las principales causas de este alto número de fracasos

se encuentra la aparición de toxicidad o efectos secundarios no esperados.

El rastreo de fármacos tradicional se basa principalmente en ensayos *in vitro*, bien sean cultivos celulares, bioquímicos o de unión al receptor. En general las moléculas identificadas en estos ensayos no pueden ser usadas directamente *in vivo* ya que sus propiedades ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) no son las óptimas para su uso en pacientes. La optimización de las propiedades farmacológicas de estos compuestos con el fin de hacerlos aptos para su utilización en humanos, requiere de una costosa inversión para llevar a cabo su mejora mediante química médica. Existe un gran número de ejemplos de rastreos de compuestos tradicionales que, tras haber rastreado cientos de miles de moléculas, identifican posibles candidatos que finalmente son descartados en experimentos posteriores (Pandey & Nichols, 2011).

Los rastreos de compuestos *in vivo* permiten analizar la acción de una molécula en el contexto de un organismo completo proporcionando, en un mismo ensayo, información sobre las propiedades ADMET y la eficacia del compuesto.

### 7.2. *Drosophila* como modelo para la búsqueda de fármacos.

El uso de la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, 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 desde hace más de un siglo. Durante estos años se han desarrollado un gran número de herramientas para su estudio, lo que, junto al hecho de que el 75% de

## Introducción

los genes implicados en enfermedades humanas tienen un ortólogo en *Drosophila* (Reiter *et al.*, 2001), hacen de la mosca un organismo idóneo para el estudio de mecanismos moleculares de enfermedades humanas. De hecho, *D.melanogaster* ha sido utilizada con éxito para modelizar un gran número de enfermedades, entre las que se encuentran el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, neuromusculares, infecciosas, inflamatorias, cardiovasculares, expansiones de microsatelites, alteraciones del sueño, desordenes afectivos, cognitivos, del metabolismo, diabetes (Pandey & Nichols, 2011). Muchos de estos modelos se han beneficiado de la genética de *Drosophila*, la cual, con tan sólo cuatro cromosomas ha permitido la generación y el aislamiento de un gran número de mutantes para prácticamente todos sus genes (Dietzl *et al.*, 2007), así como la expresión ectópica de genes propios o de otras especies (Brand & Perrimon, 1993; Brand *et al.*, 1994; Phelps & Brand, 1998). Dado su corto ciclo de vida, su fácil manipulación y mantenimiento, su amplia descendencia y la disponibilidad de miles (Pandey & Nichols, 2011) de mutantes para distintos genes, *Drosophila* ha sido ampliamente utilizada para realizar rastreos genéticos que pudieran revelar rutas y mecanismos celulares implicados en una determinada enfermedad (M. A. Jones *et al.*, 2009; Kucherenko *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2014; Walker & Bernards, 2014). Del mismo modo, los rastreos genéticos han contribuido a detectar proteínas con actividades potencialmente susceptibles de manipulación farmacológica, aportando nuevas dianas terapéuticas. A pesar de su amplia utilización en los rastreos genéticos, el uso de *Drosophila* para el rastreo de fármacos es relativamente reciente. En 2005, Agrawal y colaboradores utilizaron

un modelo de Huntington en mosca para el análisis de terapias combinatorias de los fármacos SAHA, cistamina, rojo congo, Y-27632 y geldanamicina (Agrawal *et al.*, 2005). Pero fue en 2006 cuando Jaklevic y colaboradores llevaron a cabo un rastreo de fármacos como tal, utilizando una quimioteca formada por 1990 moléculas. En este rastreo los autores fueron capaces de identificar 3 fármacos que potenciaban el efecto del tratamiento por radiación en moscas modelo de cáncer (Jaklevic *et al.*, 2006). En los últimos años el rastreo de compuestos en *Drosophila* ha sido ampliamente utilizado para la identificación tanto de posibles fármacos como de rutas biológicas afectadas (Pandey & Nichols, 2011). De hecho, gracias a este tipo de ensayos en *Drosophila* se ha identificado dos potenciales fármacos para el tratamiento de SMA (atrofia muscular espinal) o el cáncer de tiroides: ampyra (Imlach *et al.*, 2012) y ZD6474 (Vidal *et al.*, 2005), respectivamente, encontrándose ambos fármacos en la fase III de ensayos ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Sin embargo, el rendimiento de este tipo de ensayos farmacológicos *in vivo* utilizando *Drosophila* no es comparable a la de rastreos *in vitro*, ya que hasta la fecha el máximo número de compuestos que se han ensayado diariamente utilizando *Drosophila* es de 15-30 compuestos por día (Pandey & Nichols, 2011).



***Objectives***





## OBJECTIVES

Our group previously performed drug discovery screens in a DM1 *Drosophila* model using a semilethality phenotype that served to identify a number of known medicaments (Garcia-Lopez *et al.*, 2008) and new molecules (Garcia-Lopez *et al.*, 2011) as suppressors of said phenotype. In despite of promising results, , these screens showed that (1) the throughput was very low (it took several months to screen only 400 drugs), (2) the tissue targeted was the fly brain, instead of the more typically affected muscular system, and (3) the readout of the screen was lethality, with no defined improvement of a molecular defect associated with the disease, which limited the potential final relevance of the hits identified. In an attempt to overcome said limitations, we set out this thesis project with the following specific aims:

1. To develop a high throughput drug screening method using an improved *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1.
2. To target the screen to a tissue highly relevant to the disease such as the somatic muscles of the flies (homologous to human skeletal muscles).
3. To identify molecules able to significantly improve a relevant phenotype directly linked to the human disease, such as a missplicing event.

## *Objectives*

4. To investigate the mechanism of action of candidate hit compounds to pave the way to potential structure-activity relationships during hit optimization.
5. To validate the therapeutic potential of hits identified in additional phenotypes/models of the disease, in particular cell culture and murine models of myotonic dystrophy.

***Resultados***



## **1. Generación de moscas transgénicas para un minigen:reportero cuyo *splicing* dependa de MBNL1.**

*1.1.- La expresión de 480 repeticiones CTG en la musculatura de Drosophila altera el splicing de diferentes transcritos.*

La Distrofia Miotónica tipo 1 ha sido caracterizada como una espliceopatía debido al gran número de transcritos que presentan alterado su patrón de *splicing*. Estas alteraciones parecen explicar la mayoría de los síntomas presentes en los pacientes de DM1 (ver apartado 1.3 de introducción). Dada la relevancia del *splicing* en esta enfermedad, nos propusimos analizar el modelo de DM1 en *Drosophila* generado en nuestro laboratorio (ver apartado 5.3 de introducción) para determinar si reproducía las alteraciones en el *splicing*. Para ello se realizó una búsqueda bibliográfica de todos los transcritos cuyo *splicing* se había descrito alterado en pacientes de DM1. Se analizó la existencia de homólogos de cada uno de estos transcritos en *Drosophila*, considerando homólogos no sólo aquellos transcritos cuya similitud con el humano fuera al menos del 40%, sino aquellos que además tuvieran conservado el exón o el intrón cuyo *splicing* era aberrante en pacientes. Basándose en estos parámetros se obtuvo una lista de 16 transcritos cuyo *splicing* era susceptible de estar alterado en moscas modelo de DM1 (tabla R1).

**Tabla R1.** Transcritos cuyo *splicing* está alterado en pacientes de DM1 y sus correspondientes homólogos en *Drosophila*

FlyBase ID	Humano	<i>Drosophila</i>	Función
FBgn0039528	<i>Alp</i>	<i>Dsd</i>	Fosfatasa alcalina
Fbgn0025866	<i>Capn3</i>	<i>calpB</i>	Procesamiento de proteínas
Fbgn0051116	<i>Cln1</i>	<i>Cg31116</i>	Contracción muscular
Fbgn0052030	<i>Fhos</i>	<i>Fhos</i>	Organización del citoesqueleto de actina
Fbgn0039580	<i>Gfat1</i>	<i>Gfat2</i>	Biosíntesis de carbohidratos
Fbgn0013984	<i>INSR</i>	<i>InR</i>	Ruta de la insulina
Fbgn0011286	<i>RyR1</i>	<i>Rya-r44F</i>	Contracción muscular, transporte de Ca
Fbgn0004551	<i>SERCA1</i>	<i>Ca-P60A</i>	Transmisión sináptica neuromuscular
Fbgn0001202	<i>KCANB1</i>	<i>HK</i>	Transporte intracelular dependiente de citoesqueleto, microtúbulos
Fbgn0051057	<i>TAU</i>	<i>Tau</i>	Despolimerización de los microtúbulos
Fbgn0010399	<i>NMDAR1</i>	<i>Nmdar1</i>	Transporte iónico, memoria
Fbgn0051999	<i>Fbln1</i>	<i>Cg31999</i>	Adhesión celular
Fbgn0013733	<i>Macf1</i>	<i>Shot</i>	Organización y biogénesis de microtúbulos
Fbgn0003721	<i>Tropomyosin 2</i>	<i>Tm1</i>	Contracción muscular
FBgn0004169	<i>TNNT1-4</i>	<i>TnT</i>	Morfogénesis muscular
Bgn0083919	<i>ZASP</i>	<i>CG30084 (Zasp52)</i>	Desarrollo de la estructura muscular

Dada la implicación del tejido muscular en DM1, se analizó el *splicing* de estos transcritos al expresar 480 repeticiones CTG en la musculatura de *Drosophila*. Para ello se utilizó el sistema UAS/GAL4 (ver anexo I) para dirigir la expresión de las repeticiones CTG a la musculatura, tejido en el que se expresa la cadena pesada de la miosina (*MHC*, *Myosin Heavy Chain*). Se estudió el *splicing* de 11 de estos transcritos en 6 genotipos distintos de moscas (Tabla R2).

**Tabla R2.** Genotipos utilizados para el estudio de la espliceopatía en las moscas modelo

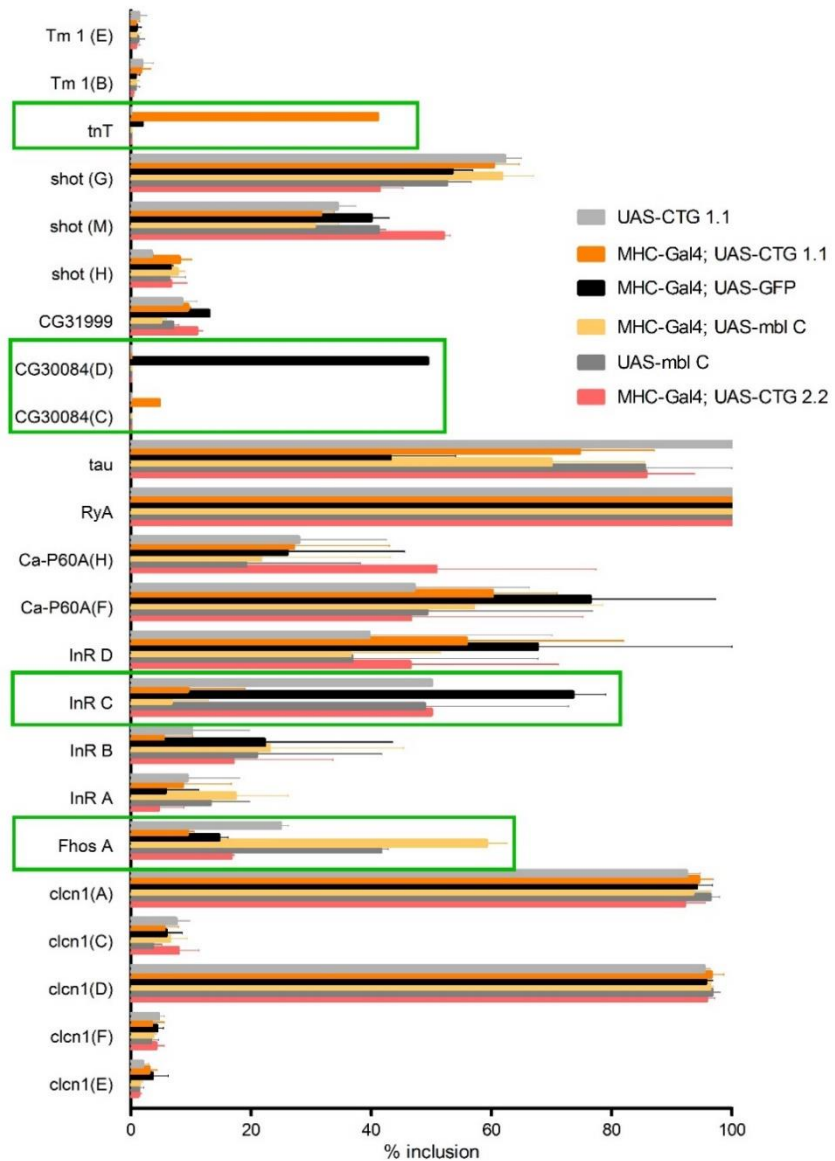
Genotipo	Descripción
<i>MHC-Gal4; UAS-CTG<sub>480</sub>1.1</i>	Expresan las 480 repeticiones en músculo
<i>MHC-Gal4; UAS-CTG<sub>480</sub>2.2</i>	Igual que anterior (1.1) pero el transgen de las repeticiones está en otra localización cromosómica
<i>MHC-Gal4;UAS-MblC</i>	Sobreexpresan el homólogo de MBNL1 en mosca, por lo que se espera que muestren un fenotipo opuesto al de las repeticiones CTG
<i>MHC-Gal4;UAS-GFP</i>	Control que expresa la proteína reportera GFP (Green Fluorescent Protein) para equilibrar el número de UAS en moscas control y problema
<i>UAS-CTG<sub>480</sub>1.1</i>	Control. Mismo fondo genético que las mosca problema <i>MHC-Gal4;UAS-CTG<sub>480</sub>1.1</i> pero no expresan las repeticiones al carecer de Gal4
<i>UAS-MblC</i>	Control. Mismo fondo genético que las mosca problema <i>MHC-Gal4;UAS-MblC</i> pero no expresan las repeticiones al carecer de Gal4

Se consideraron alterados aquellos exones cuyo porcentaje de inclusión aumentara o disminuyera en moscas modelo *MHC-Gal4;UAS-CTG 1.1* respecto a los controles *UAS-CTG 1.1*, *MHC-Gal4;UAS-GFP* o *UAS-mblC*. Considerándose especialmente interesantes aquellos exones que también se vieran alterados en moscas *MHC-Gal4; UAS-CTG 2.2* y *MHC-Gal4; UAS-mblC*, siendo el sentido de la alteración en este

## *Resultados*

último caso inversa a la observada en *MHC-Gal4; UAS-CTG 1.1*. El análisis de los 11 genes reveló que 4 (36%) de los transcritos estudiados tenían su *splicing* alterado en moscas *MHC-Gal4; UAS-(CTG)<sub>480</sub> 1.1* (Figura R1). Los 4 transcritos alterados correspondían a los genes *troponina T (TnT)*, *CG30084*, *InR* y *Fhos*, cuyos homólogos en humanos también están alterados en DM1 (*Troponina*, *Zasp*, *INSR* y *Fhos*)





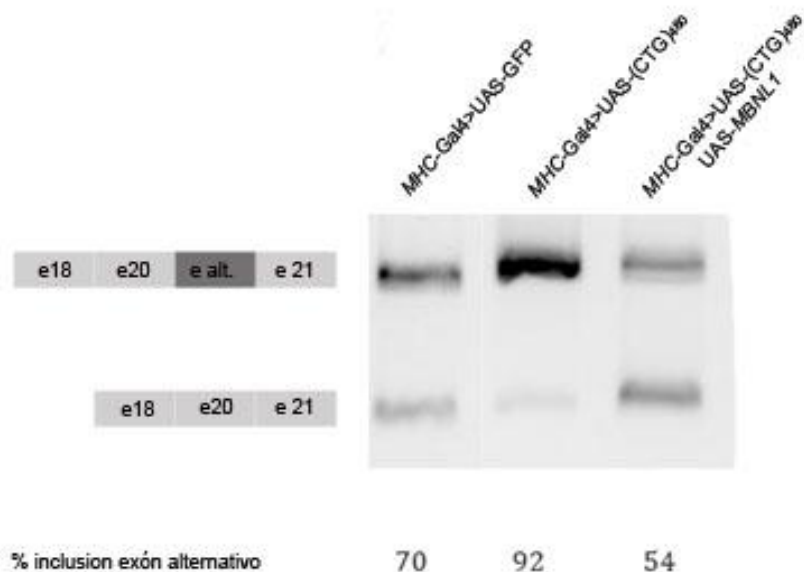
**Figura R1. Las expansiones CTG alteran en *Drosophila* el *splicing* alternativo de transcritos musculares endógenos.** Porcentaje de inclusión de los exones candidatos a estar alterados en moscas modelo de DM1. Valores obtenidos de la cuantificación con Image J de las fotos de los geles de agarosa corridos con los productos de la PCR semicuantitativa de cada uno de los transcritos estudiados. Se cuantificaron al menos 3 geles de RT-PCR independientes para cada gen. En el caso de los transcritos *TnT* y

CG30084 sólo se analizaron los genotipos *MHC-Gal4*, UAS-CTG480 y *MHC-Gal4*, UAS-GFP. Las barras de error corresponden al error estándar.

### 1.2.- *Muscleblind humano rescata el fenotipo de alteración del splicing debido a las repeticiones CTG.*

Previamente, en nuestro laboratorio, se demostró que la expresión del gen humano *MBNL1* es capaz de suprimir el fenotipo de rugosidad producido por la expresión de 480 repeticiones CTG en el ojo de *Drosophila* (García-López *et al*, 2008). Además, De Haro y colaboradores (2006) demostraron que la expresión de *MBNL1* mejora el fenotipo de degeneración muscular y disminuye el número de foci al ser expresado conjuntamente con 480 repeticiones CTG en la musculatura de *Drosophila* (De haro *et al.*, 2006). Estos resultados demuestran la conservación funcional de *Muscleblind* en la ruta de patogénesis de las repeticiones CTG en *Drosophila*. Una de las principales funciones de la proteína *MBNL1* es la de actuar como regulador del *splicing* alternativo de determinados transcritos, por lo que se propuso analizar si esta función también estaba conservada en *Drosophila*. Para ello se expresó la proteína humana *MBNL1* junto con las repeticiones CTG en la musculatura de *Drosophila* y se analizó mediante RT-PCR el *splicing* del transcrito endógeno *Fhos* (Figura R2). El patrón de *splicing* de *Fhos* en la musculatura presenta dos isoformas entre sus exones 18 y 21. La secuenciación de esas isoformas mostró que la diferencia

entre ellas era la presencia de una porción del intrón 20, en concreto la secuencia comprendida entre el nucleótido 464 y el 595. Este nuevo exón alternativo se incluía en distinta proporción en moscas que expresaban las repeticiones (92%) y moscas control (70%) (Figura R2). Al expresar la proteína MBNL1 junto con las 480 repeticiones CTG, los niveles de inclusión de este exón disminuyen hasta aproximadamente un 50% (Figura R2). Por lo tanto, la expresión de la proteína MBNL1 humana es capaz de rescatar el *splicing* aberrante de genes como *fhos* debido a la expresión de las repeticiones en la musculatura de *Drosophila*. El hecho de que la exclusión del nuevo exón en moscas que expresan las repeticiones y MBNL1 sea incluso mayor que en moscas control puede deberse a una excesiva compensación de la proteína MBNL1, probablemente debida a los altos niveles de expresión del transgén.



**Figura R2. La expresión de la proteína MBNL1 humana en *Drosophila* rescata los defectos en el *splicing* del transcrito *Fhos*.** Gel de agarosa mostrando el patrón de bandas obtenido al realizar RT-PCR del gen *fhos* para los distintos genotipos (*MHC-Gal4>UAS-CTG<sub>480</sub>*, *UAS-GFP*; *MHC-Gal4>UAS-CTG<sub>480</sub>*, *UAS-MBNL1* *MHC-Gal4>UAS-GFP*). A la izquierda se muestra el esquema de exones al que corresponde cada banda y debajo el porcentaje de inclusión del nuevo exón para cada genotipo. Se realizaron tres réplicas biológicas del genotipo de sobreexpresión de Muscleblind junto a las repeticiones (*MHC-Gal4>UAS-CTG<sub>480</sub>*, *UAS-MBNL1*)

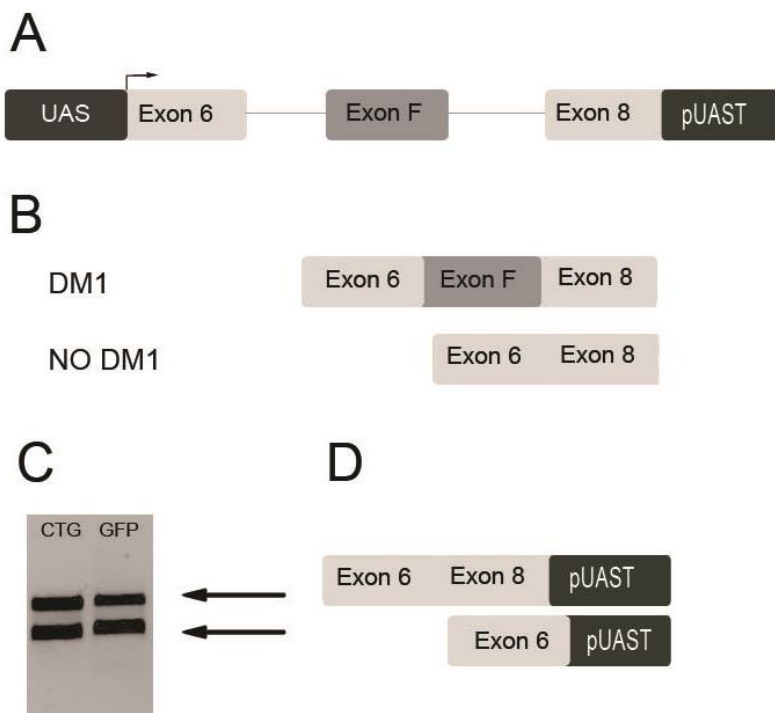
### 1.3.- Las repeticiones CTG alteran el *splicing* de un minigen exógeno en *Drosophila*.

Con el fin de obtener un modelo en *Drosophila* en el que los resultados obtenidos no fueran específicos de esta especie, se planteó generar este modelo utilizando un minigen exógeno a la mosca. Para ello se estudió la influencia del contexto biológico de *Drosophila* en el *splicing* de un minigen exógeno que se sabe afectado en DM1, el minigen *TnnT3* de ratón (gentilmente cedido por el Dr. Swanson, University of Florida). Este minigen está constituido por el exón fetal (exón 7), el exón e intrón 6, el intrón 7 (o fetal) y el exón 8 (Figura R3A). En ratones modelo de DM1 que expresan 250 repeticiones CTG, el exón fetal está incluido en los transcritos de individuos adultos. En el minigen generado por el laboratorio del Dr. Swanson, la inclusión de este exón dependía de los niveles de la proteína MBNL1 en mioblastos de ratón (Yuan, Y. *et al*, 2007) (Fig 3B). Se analizó su *splicing* en presencia o ausencia

de repeticiones CTG en el contexto biológico de *Drosophila*, para ello el minigen *TnnT3* fue clonado en el vector de expresión de *Drosophila* pUAST y se generaron moscas transgénicas (UAS-*TnnT3*). Éstas, tras ser puestas en homocigosis, se cruzaron con moscas que expresaban las 480 repeticiones CTG bajo la regulación del promotor de la *MHC* mediante el sistema UAS/Gal4 (*MHC-Gal4*>UAS-CTG<sub>480</sub>). Como control las moscas UAS-*TnnT3* se cruzaron con moscas que expresan la proteína GFP también con el promotor de la *MHC* (*MHC-Gal4*, UAS-GFP). El análisis por RT-PCR del *splicing* del minigen *TnnT3* en moscas de estos genotipos reveló la presencia de 2 bandas, correspondientes a dos isoformas cuya proporción variaba debido a la presencia de las 480 repeticiones CTG, aumentando la de mayor tamaño al expresar las repeticiones (Figura R3C).

La secuenciación de estas bandas mostró resultados distintos a los esperados; en lugar de incluirse el exón F, el fragmento incluido alternativamente correspondía al exón 6 del minigen *TnnT3* junto con una porción del vector pUAST correspondiente a los nucleótidos comprendidos entre el sitio de clonación múltiple y el sitio de *splicing* del terminador SV40 (Figura R3D). Este nuevo fragmento también es incluido en mayor proporción en las moscas *MHC-Gal4*; UAS-(CTG)<sub>480</sub> que en las moscas *MHC-Gal4*;UAS-GFP (Figura R3b), por lo que su inclusión sigue siendo un suceso de *splicing* dependiente de las repeticiones CTG. Estos resultados, aunque distintos a los

esperados, demostraron que las 480 repeticiones CTG son capaces de alterar el *splicing* de un minigen exógeno en el contexto biológico de *Drosophila*.



**Figura R3. El minigen *TnnT3* responde a la presencia de repeticiones CTG en *Drosophila*.** (A) Esquema del minigen *TnnT3*. (B) Esquema mostrando como se produce el *splicing* alternativo del minigen *TnnT3* en ratones DM1 y no DM1: en DM1 se produce la inclusión exón fetal (F), el cual es excluido en ausencia de repeticiones CTG. (C) Gel de agarosa mostrando las bandas obtenidas al expresar el minigen junto con las 480 repeticiones CTG o el gen GFP en la musculatura de las moscas *MHC-Gal4*. (D) Esquema de exones del evento de *splicing* aberrante debido a las CTGs en *Drosophila*.

*1.4.- La luciferasa es el gen reportero más reproducible y fácilmente cuantificable en Drosophila.*

Para detectar la inclusión de un exón alternativo de forma rápida y sensible, se decidió fusionar distintos minigenes a un gen reportero, de esta forma obteníamos un espliceosensor en el que las medidas del reportero fueran indicativas de la inclusión/exclusión del exón alternativo. El gen reportero debía cumplir una serie de requisitos: (a) minimizar posteriores procesados de la muestra, lo que además de agilizar la obtención de resultados evita la introducción de posibles errores durante su manipulación; (b) ser fácilmente cuantificable, permitiendo obtener datos cuantitativos, los cuales, al poder ser tratados estadísticamente, permiten una mayor objetividad.

Se analizaron 3 genes reporteros: la toxina Ricin A, la proteína verde fluorescente o GFP y la luciferasa.

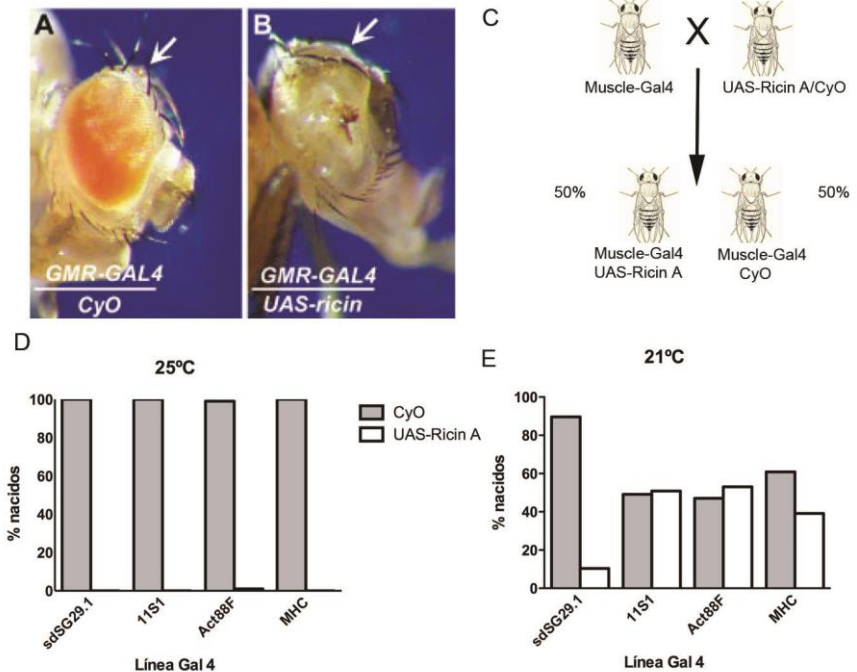
*1.4.1. La toxina Ricin A resulta tóxica al expresarla en la musculatura de Drosophila.*

Ricin A es una toxina previamente descrita (Moffat *et al*, 1992; Scudero *et al*, 2005) que produce muerte celular. Al expresar esta toxina en ojo de *Drosophila* se observa la casi total desaparición del ojo (Figura R4A), siendo este fenotipo modificable en función de los niveles de expresión de Ricin A. Sin embargo, a efectos de nuestro modelo de DM1 lo deseable

era poder expresar la proteína Ricin A en la musculatura o el sistema nervioso, ya que es en estos tejidos donde se producen la mayor parte de las alteraciones en el *splicing* de transcritos descritas en pacientes (ver apartado 1.3 de introducción). Preferiblemente, el reportero debería provocar un fenotipo cuantificable al ser expresado en el músculo de la mosca, tejido principalmente afectado en DM1 y en el que ya hemos demostrado que la presencia de las repeticiones CTG altera el *splicing* de minigenes exógenos (Figura R3B). Sin embargo la expresión del reportero Ricin A en la musculatura de *Drosophila* resulta letal en todas las líneas Gal4 utilizadas (Figura R4D). El sistema UAS/Gal4 depende de la temperatura, aumentando los niveles de expresión del gen regulado por la secuencia UAS al incrementarla. Para tratar de disminuir la letalidad producida por la toxina Ricin A se redujeron sus niveles de expresión disminuyendo manteniendo las moscas a 21°C. A esta temperatura, las líneas Gal4 sdSG29.1 y *MHC* seguían mostrando algo de letalidad (Fig 4E), sin embargo la expresión de Ricin A en el músculo con las líneas 11S1 y Act88F no provocó un aumento en la letalidad (Figura 4D). Por lo tanto, el espliceosensor podría generarse utilizando el fenotipo de letalidad, pero dado que la viabilidad puede verse afectada por muchos factores independientemente de la expresión de Ricin A, tratamos de realizar el rastreo utilizando otro tipo de fenotipo. Sin embargo ninguno de los individuos nacidos portadores del transgén UAS-Ricin A mostró alteraciones observables. Así, con este reportero podríamos



realizar un rastreo de compuestos con capacidad para revertir el fenotipo de letalidad observado de modo similar al rastreo realizado previamente en nuestro laboratorio (Garcia-Lopez *et al.*, 2008).



**Figura R4. Efecto de la expresión de la toxina Ricin A en distintas líneas Gal 4 de *Drosophila*.** (A) Las moscas *GMR-Gal4* presentan un ojo normal mientras que al expresar la toxina Ricin A bajo el control de este Gal4, las moscas presentan un fenotipo de ausencia de ojo (B). (Figura modificada de Scuderi *et al.*, 2005) (C) Esquema de los cruces realizados para los ensayos con Ricin A. El stock UAS-Ricin A se encuentra balanceado con *CyO*, por lo que al cruzarlo con cada una de las líneas Gal4 de músculo se espera que el 50% de los nacidos lleve el transgén UAS-Ricin A y el otro 50% el cromosoma balanceador *CyO*. (D) La expresión de esta toxina utilizando distintas líneas Gal4 de expresión en músculo provoca letalidad

## *Resultados*

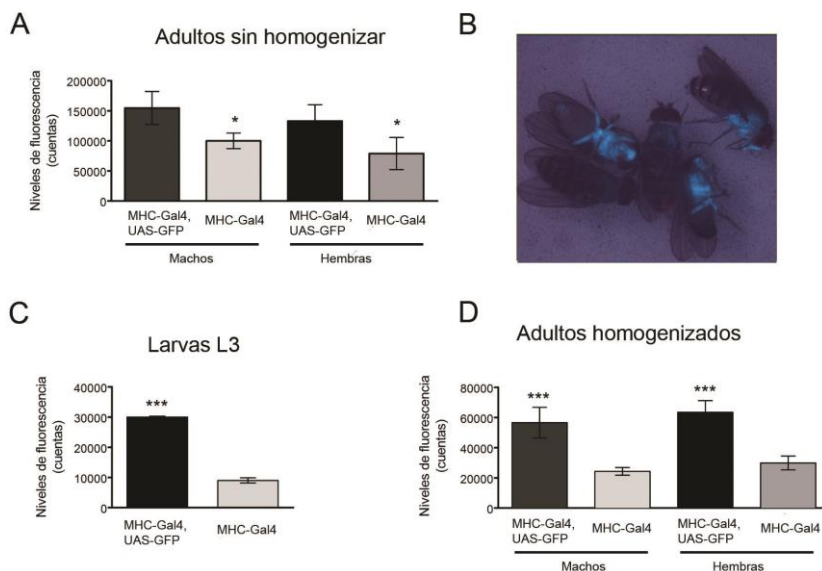
a 25°C con todas las líneas ensayadas. (E) La expresión del transgén Ricin A a 21°C utilizando las mismas líneas Gal4 sí que es compatible con la vida de la mosca, llegando incluso a valores de nacimiento similares a los controles en el caso de las líneas *11S1-Gal4* o *Act88F-Gal4*.

### *1.4.2.- La proteína GFP se puede utilizar en moscas adultas como proteína reportera.*

La GFP es una proteína que, tras ser excitada, emite luz verde fluorescente. Esta proteína ya había sido expresada en *Drosophila* mediante la introducción de un transgén que expresa su secuencia codificante (Timmons *et al.*, 1997). Sin embargo, hasta el momento no se había publicado en este organismo la cuantificación de los niveles de esta proteína utilizando un lector de fluorescencia. La cuantificación de la fluorescencia emitida al colocar moscas *MHC-Gal4;UAS-GFP* directamente en el pocillo de la placa a leer, a pesar de mostrar diferencias entre moscas que expresan la proteína GFP y moscas que no la expresan, resultó ser muy variable (Figura R5A), probablemente debido a la posición en que queda la mosca al caer en el pocillo. Si la mosca caía sobre su parte dorsal, dejando la parte ventral, con menos cutícula, expuesta al láser se obtenían unos valores de fluorescencia mayores que si la mosca se disponía ventralmente, dejando expuesto al láser su parte dorsal, con más cutícula que impide el paso de la fluorescencia en gran parte (Figura R5B). Este factor podría controlarse colocando cada una de las moscas dorsalmente, pero esta opción, además de consumir

demasiado tiempo, introduce una posible fuente de errores en el rastreo, por lo que fue descartada. Otra posibilidad era la de realizar la lectura de niveles de GFP en individuos con cutícula más fina (larvas de estadio L3), en las que los valores son más homogéneos (Figura R5C). Pero esta opción estaba condicionada al estadio en el que se produjera la alteración en el *splicing*, ya que el *splicing* alternativo está muy regulado durante el desarrollo (Stamm, S. *et al.*, 2005). Además el estadio larvario L3 se alcanza en aproximadamente 72 h a 25°C, por lo que, en caso de administrar los compuestos en el primer estadio larvario L1 (aproximadamente 24 h tras la puesta del huevo), el tiempo de exposición al compuesto sería de 48 h, muy inferior a los aproximadamente 9 días en los que la mosca estaría expuesta al compuesto en caso de leerse la fluorescencia en adultos. Por último, se analizaron los niveles de GFP tras homogenizar las moscas. Los valores obtenidos tras homogenizar resultaron ser menos variables (Figura R5D), obteniéndose una ventana entre controles y moscas que expresan 480 repeticiones suficiente para llevar a cabo el rastreo de compuestos. Así, con los resultados obtenidos se puede concluir que la GFP se puede utilizar como gen reportero en *Drosophila* para ensayos a gran escala utilizando preferiblemente adultos homogenizados o larvas L3.

## Resultados

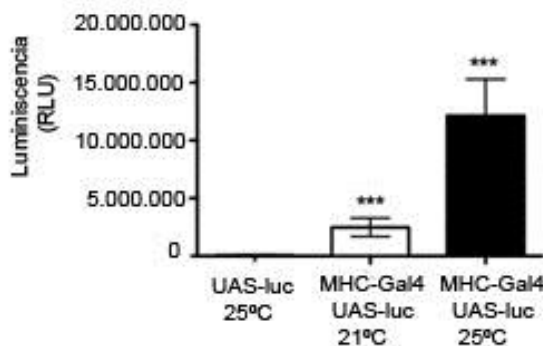


**Figura R5. Análisis del reportero GFP en *Drosophila*.** (A) Moscas *MHC-Gal4; UAS-GFP* mostrando distintas posiciones en las que se pueden presentar las moscas y como varía la cuantificación de la fluorescencia para cada una de ellas. (B) Se compararon los niveles de fluorescencia de moscas *MHC-Gal4, UAS-GFP* con moscas *MHC-Gal4* en 5 individuos adultos, (B) larvas L3 o (C) adultos homogenizados de cada genotipo utilizando un lector de placas VICTOR Wallac 1420 Multilabel Counter (Pelkin Elmer Lifesciences). Para cada caso se realizaron 3 réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas. Las barras de error corresponden al error estándar.\*p-valor<0.05\*\*\*p-valor<0.001 calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa Graphpad.

### 1.4.3.- La proteína luciferasa presenta poca variabilidad y una gran ventana en la musculatura de *Drosophila*.

En el momento en el que iniciamos los estudios con la luciferasa no se había descrito la introducción del gen que codifica para la luciferasa de luciérnaga en el genoma de

*Drosophila*, por lo que tuvimos que generar moscas UAS-luciferasa (UAS-luc). La generación del stock se llevó a cabo por el laboratorio Valentia Biopharma (www.valentiabiopharma.com). Se compararon los niveles de luminiscencia de moscas que expresaban la luciferasa en el músculo (*MHC-Gal4; UAS-Luc*) y moscas que no expresaban la luciferasa (*UAS-Luc*). Para ver la sensibilidad de esta proteína a cambios en sus niveles de expresión, se aprovechó la dependencia de la temperatura del sistema UAS/Gal4. Se midieron los niveles de luciferasa de moscas *MHC-Gal4; UAS-luc* crecidas a 25 y a 21°C con el fin de determinar si se podían ver diferencias en los niveles de expresión de la proteína. Las medidas de luciferasa de moscas *MHC-Gal4; UAS-luc* resultaron ser sensibles a los cambios en los niveles de expresión del transgén UAS-luciferasa inducidos al variar la temperatura, lo que demuestra que esta proteína es un buen reportero ya que las medidas obtenidas de luminiscencia son sensibles a los niveles de expresión de la luciferasa (figura R6).



**Figura R6. Análisis del reportero luciferasa en *Drosophila*.** Medidas de los niveles de luciferasa de 5 moscas adultas de

genotipo UAS-luc o *MHC-Gal4;UAS-luc* crecidas a 21 ó 25°C utilizando el lector de placas VICTOR Wallac 1420 Multilabel

## *Resultados*

Counter (Pelkin Elmer Lifesciences). Se realizaron al menos 3 réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas. Las barras de error corresponden al error estándar. \*\*\*p-valor<0.001 calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa Graphpad. R.L.U.= Relative Light Units

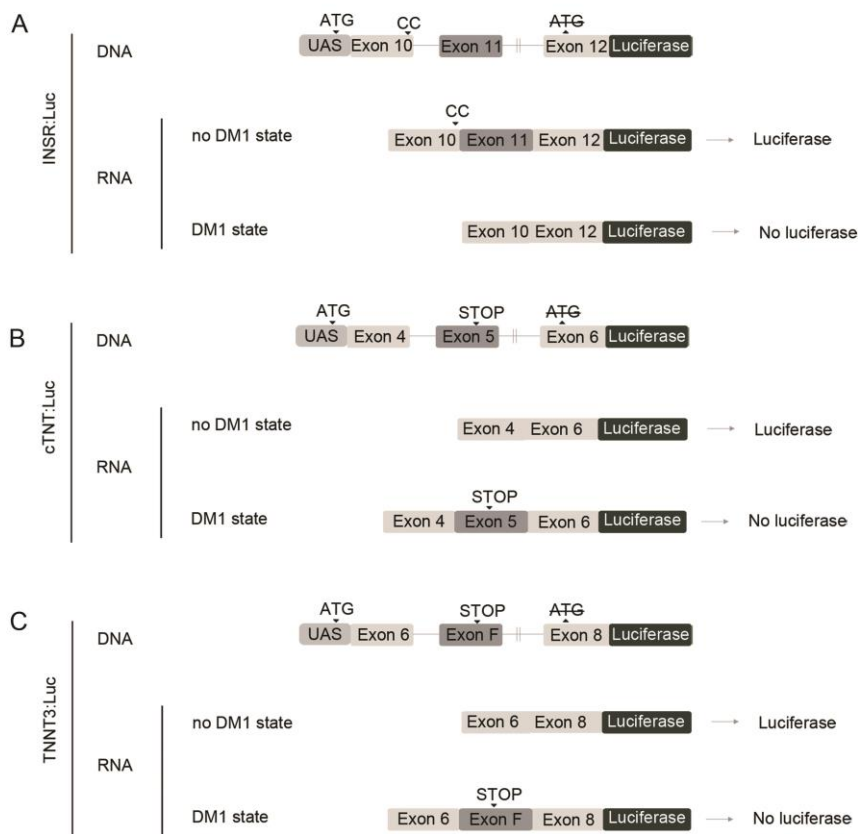
Una vez obtenidos los resultados de los tres genes reporteros estudiados, descartamos en principio el uso de Ricin A para evitar realizar un rastreo a gran escala utilizando un fenotipo de viabilidad. Por otro lado, tanto la GFP como la luciferasa necesitaban de un procesado de las muestras previo a su cuantificación. Este procesado, a pesar de homogenizar la mosca, tiene pocos pasos susceptibles de introducir errores, por lo que estos reporteros pueden ser utilizados para el rastreo de compuestos a gran escala. Finalmente, la mayor ventana obtenida por la luciferasa al comparar con moscas que no expresan la luciferasa, así como su mayor rango dinámico, nos hizo decantarnos por la luciferasa como el gen reportero escogido para generar las moscas espliceosensoras.

## **2.- Validación de moscas espliceosensoras para su uso en el rastreo de compuestos a gran escala.**

### **2.1.-Distintos espliceosensores son capaces de producir luciferasa a niveles detectables en la musculatura de *Drosophila*.**

Para la generación de un modelo en *Drosophila* que permitiera realizar un rastreo de compuestos anti-DM1 de forma rápida, elegimos tres minigenes exógenos ya previamente descritos en la literatura: *INSR*, *TnnT3* y *cTNT* (Savkur *et al.*, 2001; Yuan, Y. *et al.*, 2007 y Philips *et al.*, 1998). Se introdujo cada uno de ellos en un vector de expresión dirigida en *Drosophila* (pUAST), fusionándolos a la luciferasa de modo que los cambios en el splicing alternativo provocaran un cambio en la pauta de lectura de la luciferasa, aumentando o disminuyendo los niveles de esta proteína.

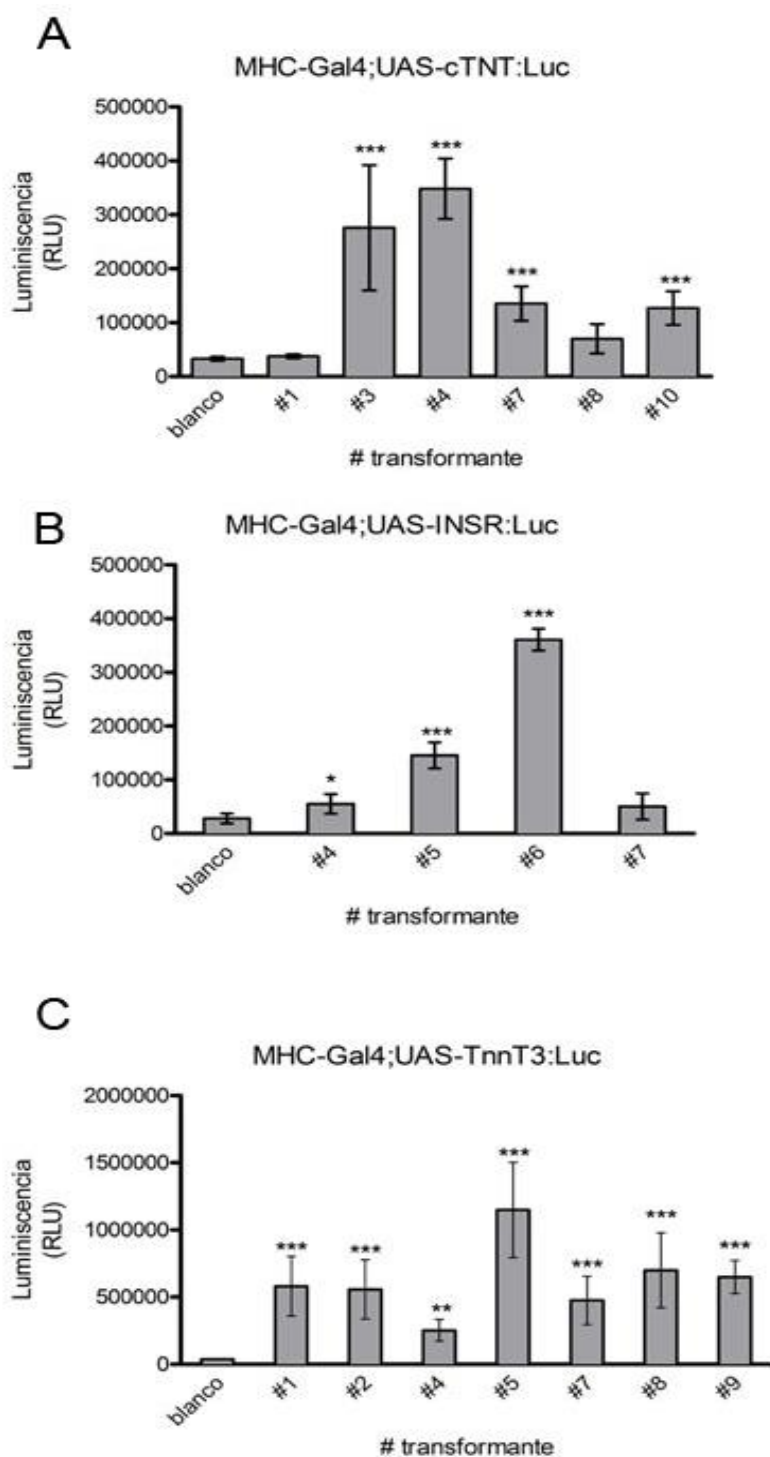
El diseño del espliceosensor fue tal que, al realizar el rastreo químico, aquellos compuestos capaces de revertir el *splicing* aberrante producirían un aumento en los niveles de luciferasa, evitando así falsos positivos debidos a una inhibición inespecífica de la luciferasa. De este modo, al producirse el suceso de *splicing* aberrante inducido por las repeticiones CTG, la luciferasa no está en pauta, por lo que los niveles de luciferasa disminuyen, mientras que un compuesto capaz, directa o indirectamente, de revertir el *splicing* aberrante, provocará un cambio hacia la correcta pauta de lectura de la luciferasa aumentando sus niveles de expresión (figura R7). Cabe destacar que la mayoría de los sucesos de *splicing* no son fenómenos de todo o nada, es decir, no se produce la exclusión o inclusión total de un exón o intrón, sino que normalmente se trata de porcentajes parciales de exclusión o inclusión, por lo que se expresan las dos isoformas y lo que varía es el porcentaje de cada una de ellas.



**Figura R7. Diseño de las construcciones de los espliceosensores.** Los minigenes *INSR* (A), *TNNT2* (B) y *TNNT3*(C) generados constan del exón alternativo en DM1 así como los dos exones constitutivos flanqueantes. Mediante mutagénesis dirigida por PCR se incluyó la secuencia Kozak de inicio de la traducción (ACCATGG) aguas arriba del exón constitutivo situado en 5' del exón alternativo. Además se eliminó el codón de inicio de la traducción (ATG) de la luciferasa y ésta se fusionó en pauta aguas abajo del exón situado en 3' del exón alternativo. En el caso del minigen de la *INSR*, se insertaron dos nucleótidos (CC) para producir los cambios en la pauta de lectura y en los minigenes *cTNT* y *TNNT3* se muestra donde aparecería el codón de STOP.



Se generaron moscas que expresaban cada uno de los minigenes fusionados a luciferasa bajo el control de la región reguladora UAS. Con el fin de estudiar los niveles de expresión de la luciferasa al expresar este transgén en la musculatura de *Drosophila*, las moscas espliceosensoras se cruzaron con moscas que expresan la proteína Gal4 según el patrón de expresión de la *MHC*. Todos los transformantes de cada uno de los minigenes expresaban la luciferasa, aunque existían diferencias en los niveles de expresión (Figura R8)



**Figura R8. Niveles de expresión de la luciferasa en los distintos transformantes de cada uno de los espliceosensores.** La expresión de los espliceosensores *cTNT* (A), *INSR* (B) y *TnnT3* (C) en la musculatura de *Drosophila* con la línea Gal4 *MHC*, produce niveles de luciferasa que pueden ser detectados utilizando la metodología puesta a punto en este trabajo. Se ensayaron 5 moscas por pocillo de entre 0 y 5 días, tomándose como blanco la línea *MHC*-Gal4. Las barras de error corresponden al error estándar. \*p-valor<0.05\*\*\*p-valor<0.001 calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa Graphpad.

Estas diferencias probablemente fueran debidas al punto de inserción del transgén en el genoma, por lo que se mapeó cada uno de los transformantes mediante PCR inversa (<http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>) para localizar la región cromosómica exacta en la que se insertó cada transgén (Tabla R2).

**Tabla R2. Localización cromosómica de los transformantes generados para cada una de los espliceosensores.** La columna “cromosoma” muestra los resultados obtenidos por mapeo genético, mientras que la columna “localización genómica” corresponde a los datos obtenidos por PCR inversa. En los casos en los que el transgén se insertó en un gen anotado, el número identificativo del gen aparece entre paréntesis. La versión del genoma de *Drosophila* utilizada para estos análisis fue la r5.16.

Transformante	Cromosoma	Localización genómica	Intergénico
UAS-cTNT:Luc#1	2	2L: 267.519	No (CG3645)
UAS-cTNT:Luc #2	2	2R: 9.915.017	No (CG8118)

Resultados

UAS-cTNT:Luc#3	No realizado	No realizado	No realizado
UAS- cTNT:Luc#4	2	2L: 8.416.700	No (CG13398)
UAS- cTNT:Luc#5	No realizado	No realizado	No realizado
UAS- cTNT:Luc#6	3	3L:3.250.494	No (CG12078)
UAS- cTNT:Luc#7	3	3L: 3.250.522	Sí
UAS- cTNT:Luc#8	2	2L: 7.010.351	Sí
UAS- cTNT:Luc#9	No realizado	No realizado	No realizado
UAS- cTNT:Luc10	3	3L: 8.818.598	No (CG4974)
UAS- TnnT3:Luc#1	3	3R:21.155.027	Sí
UAS- TnnT3:Luc #2	3	No realizado	No realizado
UAS- TnnT3:Luc #3	2	2L:825.813	Sí
UAS- TnnT3:Luc #4	3	3R:21.862.588	Sí
UAS- TnnT3:Luc #5	2	2R:14.499.381	Sí
UAS- TnnT3:Luc #6	3	3L:11.580.258	No (CG6097)
UAS- TnnT3:Luc #7	2	2R:13.680.196	Sí
UAS- TnnT3:Luc #8	1(X)	X:7.825.401	No (CG10777)
UAS- TnnT3:Luc #9	2	2L:18951814	No (CG10679)
UAS- TnnT3:Luc #10	3	3R:25.625.351	No(CG7788)
UAS-INSR:Luc#1	3	3L:9.056.056	No (CG32031)
UAS- INSR:Luc #2	3	3R: 19.606.437	No (CG10198)
UAS-INSR:Luc #3	3	3L:7.361.936	No (CG8582)
UAS-INSR:Luc #4	3	3L:14.983.339	Sí
UAS- INSR:Luc #5	3	3R:21.717.153	Sí
UAS- INSR:Luc #6	3	3L:3.250.494	Sí
UAS- INSR:Luc #7	2	2L:14.614.224	No (CG3479)
UAS- INSR:Luc #8	1(X)	X: 8.318.048	No (CG18009)

**2.2.-Las repeticiones CTG reducen la expresión de luciferasa al expresarlas junto con el espliceosensor en la musculatura de *Drosophila*.**

Una vez determinado que todas las construcciones espliceosensoras ensayadas expresaban luciferasa (Figura R8), se analizó el efecto de las repeticiones CTG sobre los niveles de esta proteína. Para ello se expresaron cada uno de los espliceosensores junto a las 480 repeticiones CTG en la musculatura de *Drosophila* utilizando el promotor *MHC-Gal4* y se midieron sus niveles de luciferasa. Como control se expresó cada uno de los espliceosensores junto con la proteína GFP en la musculatura de *Drosophila* utilizando también el promotor *MHC-Gal4*. La presencia de las repeticiones produjo una disminución significativa en los niveles de luciferasa en prácticamente todos los transformantes estudiados (Figura R9) aunque el grado de reducción variaba en función del transformante.

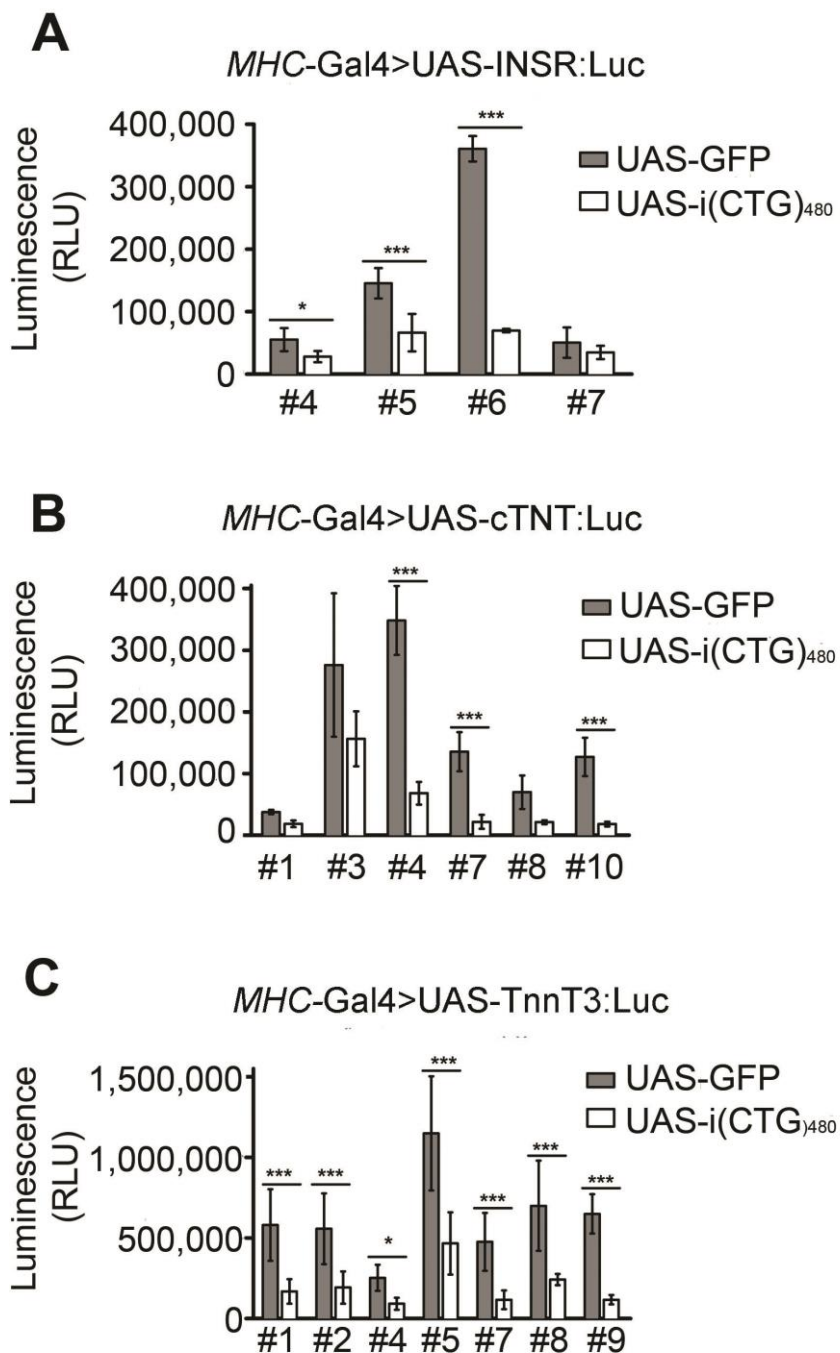


Figura R9. Niveles de expresión de la luciferasa con y sin repeticiones CTG en los distintos transformantes de cada una de las moscas

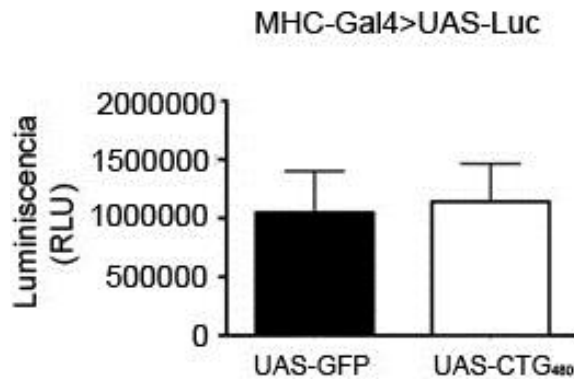
**spliceosensoras.** La expresión de 480 repeticiones CTG junto con el spliceosensor INSR (A), cTNT (B) o TnnT3 (c) en la musculatura de *Drosophila* con el Gal4 *MHC*, provoca una disminución en los niveles de luciferasa respecto al control UAS-GFP. Se ensayaron 5 moscas por pocillo de entre 0 y 5 días. Las barras de error corresponden al error estándar. \*p-valor<0.05 \*\*\*p-valor<0.001 calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa Graphpad.

Para llevar a cabo un rastreo químico de compuestos a gran escala, es necesario partir de un fenotipo robusto. En nuestro caso interesaba encontrar aquellas condiciones que permitieran obtener una mayor ventana entre los niveles de luciferasa obtenidos al expresar el minigen reportero en el músculo junto con las repeticiones CTG y los niveles de luciferasa obtenidos al expresarlo junto al control GFP. De cada minigen:luciferasa se seleccionó una línea transformante utilizando los siguientes criterios: (i) el spliceosensor no se encuentra insertado dentro de un gen (Tabla R2), (ii) existe una amplia ventana en los niveles de luciferasa entre moscas que expresan también las 480 repeticiones CTG y moscas que expresan el transgén control GFP (Figura R9), (iii) la línea transformante es viable en homocigosis y (iv) el transgén no se encuentra insertado en los cromosomas sexuales (tabla R2). En base a estos criterios, los transformantes seleccionados fueron el #7 para la troponina T del músculo esquelético rápido, el #8 del minigen de la troponina T cardiaca y el #6 del receptor de la insulina.

### **2.3.-La disminución en los niveles de luciferasa no es debida a un efecto inespecífico sobre la luciferasa.**

La disminución en las medidas de luciferasa podrían deberse a una interacción de las 480 repeticiones CTG y la luciferasa, bien a nivel de DNA (afectando a la transcripción, bien a nivel del sistema UAS/Gal4 o a nivel de la secuencia codificante de la luciferasa), a nivel de RNA (afectando a su estabilidad o procesamiento) o a nivel de proteína (afectando a su traducción, estabilidad, procesamiento o actividad). Para descartar esta posibilidad se utilizaron las moscas UAS-Luciferasa. Estas moscas, al igual que las espliceosensoras, se generaron utilizando el vector pUAST, por lo que la única diferencia entre estas dos líneas es la presencia o no del minigen exógeno. Se analizaron los niveles de luciferasa en moscas que expresaban la proteína en el músculo en presencia o ausencia de repeticiones CTG (Figura R10). Las medidas de luciferasa obtenidas no variaron significativamente en moscas que expresaban el transgén con 480 repeticiones CTG respecto a las medidas en moscas control con el transgén GFP. Según estos resultados, las repeticiones CTG no interfieren con la expresión de la luciferasa, por lo que la disminución en sus niveles observada al expresar las repeticiones con el espliceosensor (Figura R9) es debida a un efecto de las repeticiones sobre el minigen.





**Figura R10.** Las repeticiones CTG no afectan a la luciferasa en ausencia de minigen. Las medidas de luciferasa obtenidas en moscas que expresan el gen de la luciferasa sin

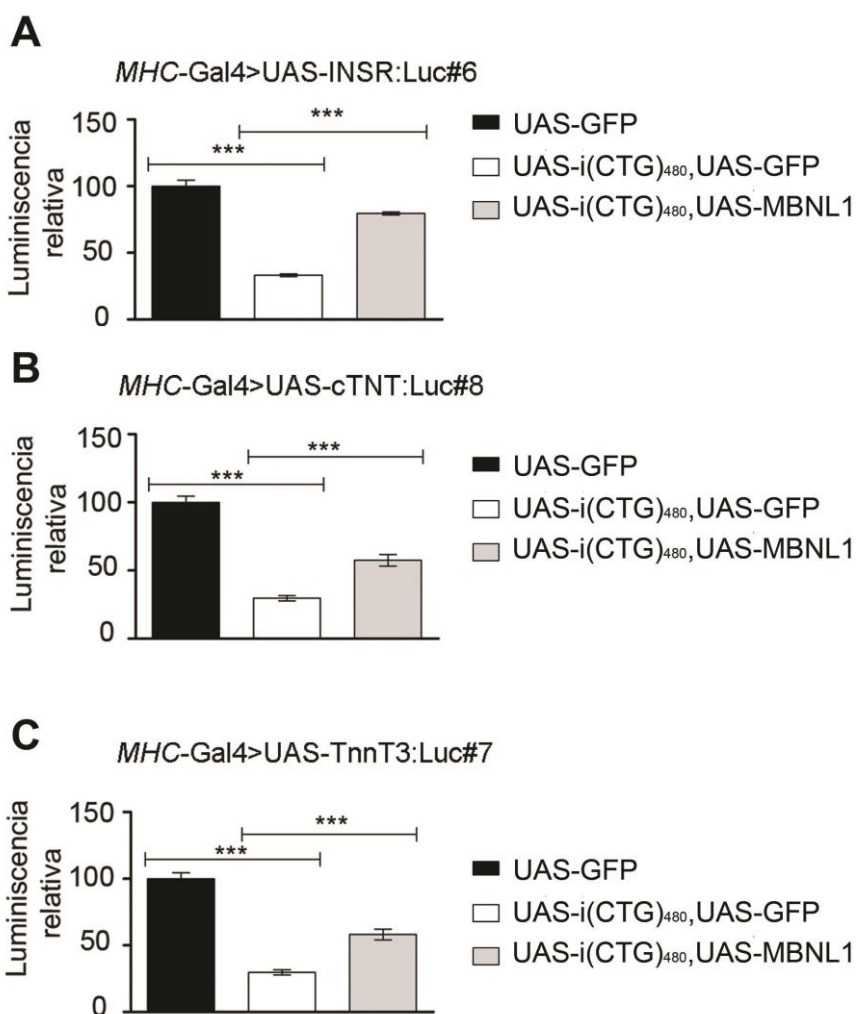
modificar en un fondo genético con 480 repeticiones CTG (*MHC-Gal4, UAS-Luc, UAS-CTG*) no son significativamente distintos de los obtenidos en moscas control (*MHC-Gal4, UAS-Luc, UAS-GFP*)

#### **2.4.- La proteína humana MBNL1 es capaz de rescatar la disminución en los niveles de luciferasa inducida por las repeticiones CTG.**

Para demostrar la conservación de la ruta de patogénesis en *Drosophila*, así como la relevancia médica de este fenotipo de disminución de luciferasa nos propusimos analizar los niveles de luciferasa al expresar las 480 repeticiones CTG junto con el minigen reportero y la proteína humana MBNL1 en la musculatura de *Drosophila*, utilizando la línea *MHC-Gal4*. Como control analizamos los niveles de luciferasa en moscas que expresan las 480 repeticiones CTG, junto con el minigen:luciferasa y la proteína GFP en la musculatura de *Drosophila*, utilizando la línea *MHC-Gal4*. Los niveles de

## Resultados

luciferasa aumentaron al expresar la proteína humana MBNL1 junto con las repeticiones (Figura R11). Por lo que la proteína MBNL1 es capaz de rescatar el fenotipo de disminución de luciferasa inducido por las repeticiones CTG. Este rescate alcanza valores del 46% en el caso del minigen del receptor de la insulina (INSR:luc), 29% en el de la troponina T cardíaca (cTNT:luc) y 28% en el de la troponina T del músculo esquelético rápido (*TnnT3:luc*).



**Figura R11. Rescate del fenotipo de disminución de los niveles de luciferasa por la expresión de MBNL1.** Las moscas que expresan la proteína humana MBNL1 junto con las 480 repeticiones CTG (UAS-CTG, UAS-MBNL1) muestran niveles de luciferasa superiores a los observados en moscas que expresan las repeticiones CTG junto con el transgén control UAS-GFP (UAS-GFP,UAS-CTG). Este incremento, aunque no los valores obtenidos en moscas que no expresan las repeticiones (UAS-GFP), se reproduce con los tres minigenes (*MHC-Gal4*, UAS-INSR:Luc, *MHC-Gal4*, UAS-cTNT:Luc y *MHC -Gal4*; UAS-*TnnT3*:Luc). Las barras de error corresponden al error estándar. \*\*\*p-valor<0.001 calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa Graphpad.

Con el fin de confirmar la presencia tanto de las repeticiones CTG como de la proteína MBNL humana en las moscas analizadas y descartar una posible contaminación, se detectó, mediante PCR, la presencia en el genoma de MBNL1 y del transgén CTG 480. Amplificamos el gen MBNL1 y las repeticiones CTG de 15 moscas *MHC-Gal4*; UAS-CTG<sub>480</sub>, UAS-MBNL1/UAS-minigen:luciferasa, hermanas de las moscas utilizadas para medir luciferasa, para cada uno de los minigenes. Observamos la presencia tanto de las repeticiones CTG como del transgén MBNL1 en todos los casos, por lo que el rescate observado del fenotipo causado por las 480 repeticiones es debido a la expresión de la proteína Muscleblind humana. Estos resultados confirman la conservación tanto de la ruta de patogénesis como de la funcionalidad entre Mbl de *Drosophila* y MBNL1 humano, así como la relevancia biomédica del fenotipo estudiado, pero

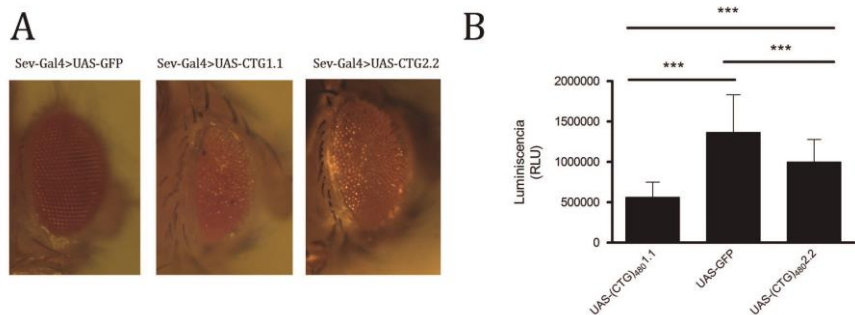
además demuestran que este fenotipo es susceptible de ser modificado.

## **2.5.- El espliceosensor INSR es sensible a los niveles de expresión de las repeticiones CTG.**

En base a los resultados obtenidos tanto en los niveles de rescate con MBNL1, como en la ventana obtenida al expresar las repeticiones CTG, se seleccionó el minigen del receptor de la insulina como espliceosensor en el rastreo químico. Este minigen presentaba una mayor ventana al comparar moscas que expresan las repeticiones con moscas que no las expresan (Figura R9). Además el minigen del receptor de la insulina es el que mejor responde a la presencia de MBNL1 (Figura R11), por lo tanto el resto de ensayos y validaciones llevados a cabo en este trabajo se hicieron utilizando este minigen.

Para poder realizar un rastreo fenotípico, ya sea genético o químico, es necesario demostrar previamente que el fenotipo está sensibilizado, esto es, que pequeños cambios en los niveles de expresión del transgén patológico, se traducen en cambios detectables en el fenotipo. Para modificar los niveles de expresión del transgén patológico se utilizaron otras líneas transformantes de 480 repeticiones. Al microinyectar en *Drosophila* con el vector pUAST, cada una de las líneas transformantes generadas inserta el transgén en una región cromosómica distinta, lo que se traduce en distintos niveles de expresión del transgén. Así, en el caso de las moscas que

expresan las 480 repeticiones CTG se generaron varias líneas transformantes, de las cuales la línea 1.1 ha sido la más estudiada (García-López *et al.*, 2008), por lo que se utilizó en este trabajo. Sin embargo, existen otras líneas generadas utilizando el mismo transgén que, debido a su localización cromosómica, se expresan en menor medida, como la línea 2.2, que provoca un fenotipo de rugosidad ocular más suave que el observado con la línea 1.1 (Figura R12a). Al analizar los niveles de luciferasa producidos por el espliceosensor en presencia de una u otra inserción, los valores obtenidos con el transformante 2.2 eran mayores que los observados con el transformante 1.1 (Figura R12b), por lo que el fenotipo de disminución en los niveles de luciferasa es menos acusado en el transformante 2.2, lo que concuerda con la menor expresión del transgén UAS-CTG<sub>480</sub> en este transformante.



**Figura R12. El transformante UAS-CTG<sub>480</sub> 2.2 disminuye los niveles de luciferasa del espliceosensor INSR menos que la línea 1.1.** (A) Expresión en ojo de las líneas transformantes UAS-CTG<sub>480</sub> 1.1, 2.2 y el transgén UAS-GFP como control. Se puede observar como la línea 1.1 provoca rugosidad con fusión de omatidios, disminución del tamaño ocular y necrosis (puntos negros), mientras que la línea 2.2 provoca un fenotipo

## Resultados

de rugosidad más leve, sin necrosis, fusión de omatidios o disminución del tamaño ocular. (B) Medidas de luciferasa del minigen INSR:Luc en moscas que expresan las 480 repeticiones CTG en la musculatura utilizando la línea transformante 1.1 ó 2.2 cruzada con moscas *MHC-Gal4*. La línea 2.2 provoca una disminución en los niveles de luciferasa comparado con el control (UAS-GFP), sin embargo esta disminución es significativamente menor que la observada al utilizar el transformante 1.1. Las barras de error corresponden al error estándar. \*\*\*p-valor<0.001 calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa Graphpad.

Los resultados obtenidos al comparar la línea transformante 1.1 con la línea 2.2 demuestran genéticamente que pequeñas disminuciones en la toxicidad de las repeticiones, similares a las que podríamos obtener con un fármaco, se traducen en un aumento de los niveles de luciferasa del espliceosensor, por lo que puede utilizarse para llevar a cabo el rastreo de compuestos a gran escala.

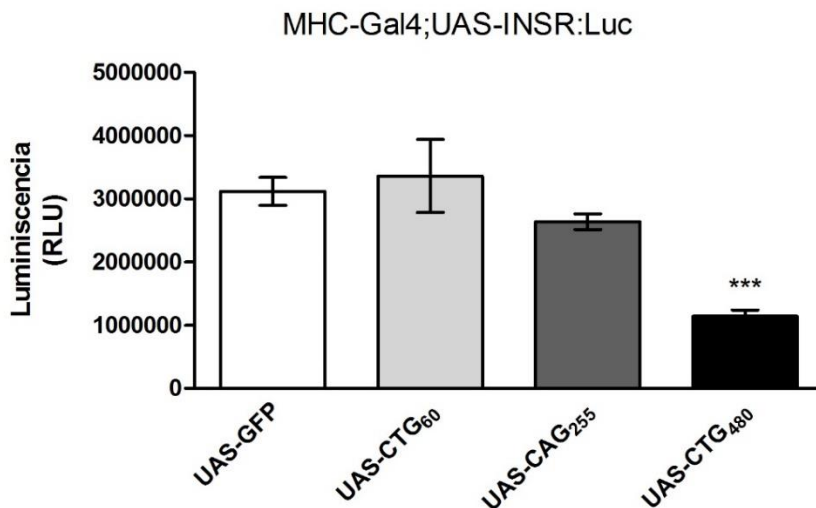
### **2.6.- Las alteraciones en el espliceosensor INSR son específicas de las repeticiones largas de CUG.**

Con el fin de demostrar la especificidad del espliceosensor se analizó su *splicing* llevando a cabo dos aproximaciones: por un lado el efecto de un número de repeticiones CUG cortas (CUG60), las cuales en *Drosophila* no resultan patogénicas (García-López *et al.*, 2008) y por otro el efecto de otras repeticiones distintas a CTG.

Las expresión de 60 repeticiones CUG no mostraba alteraciones al expresarla con distintas líneas Gal 4

(Monferrer, 2007), por lo que se consideran no patogénicas en *Drosophila*. Al expresar las 60 repeticiones CUG junto con el espliceosensor en la musculatura de *Drosophila* (*MHC-Gal4*; *UAS-CTG<sub>60</sub>*, *UAS-INSR:Luc*) se obtienen valores de luciferasa similares a los obtenidos al expresar el trangén control *UAS-GFP* (*MHC-Gal4*; *UAS-GFP*; *UAS-INSR:Luc*) (Figura R13).

Por otro lado, la expansión aberrante de repeticiones CAG también provoca enfermedades tales como Huntington o diferentes ataxias espinocerebrales (SCA1, 2, 3, 6, 7, 17). Aunque en este caso las repeticiones son codificantes, provocando una expansión de poliglutaminas en la proteína afectada, por lo que se conocen como enfermedades de poliglutaminas. En nuestro laboratorio disponíamos de moscas que expresan 255 repeticiones CAG codificantes bajo el control de la región reguladora *UAS* (gentilmente cedidas por Dr.J Lawrence Marsh). Estas repeticiones producían fenotipo de rugosidad al expresarlas en ojo (Marsh *et al*, 2003) por lo que utilizamos estas moscas para determinar la especificidad del espliceosensor. Al expresar estas repeticiones junto con el espliceosensor en la musculatura de *Drosophila*, no se observaron diferencias en los niveles de luciferasa respecto del control (*UAS-GFP*) (Figura R13). El hecho de que las 255 repeticiones CAG codificantes no afecten al *splicing* del espliceosensor demuestra la especificidad de éste por las repeticiones CUG.



**Figura R13. Otras expansiones, o repeticiones CTG no patogénicas, no alteran la expresión de espliceosensores.** Los valores de luciferasa obtenidos al expresar 255 repeticiones CAG codificantes o 60 repeticiones CTG junto con el espliceosensor en la musculatura de *Drosophila* con la línea MHC-Gal4 no son significativamente distintos a los obtenidos en las moscas control que expresan la proteína GFP. Las barras de error representan el error estándar. \*\*\*p-valor<0.001 calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa Graphpad.

Estos resultados demuestran que la disminución observada en los valores de luciferasa del espliceosensor al expresar las 480 repeticiones CTG es específica de estas repeticiones, no observándose disminución al expresar otras repeticiones patogénicas (CAG<sub>255</sub>) o expansiones CTG no patogénicas (CTG<sub>60</sub>).

## 2.7.- El análisis por RT-PCR semicuantitativa de las isoformas obtenidas al expresar el espliceosensor INSR

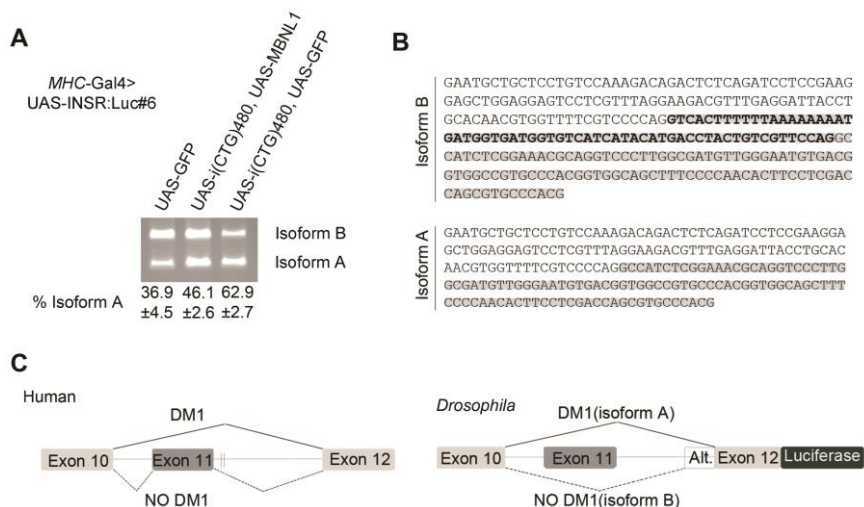


**junto con las repeticiones CTG muestran alteraciones en el *splicing* distintas a las esperadas.**

Con el fin de confirmar que las alteraciones observadas en los niveles de luciferasa correspondían a alteraciones en el *splicing* del minigen analizamos por RT-PCR el *splicing* del espliceosensor en presencia de las 480 repeticiones CTG o del transgén control GFP. El análisis por RT-PCR semicuantitativa de las isoformas del minigen del receptor de la insulina mostró la presencia de dos bandas tanto en presencia de las 480 repeticiones CTG como del transgén control y del rescate con la proteína humana MBNL1 (Figura R14A). Los niveles de isoforma A se encuentran en un 36.9% en ausencia de las repeticiones CTG. Sin embargo la expresión de las repeticiones aumenta los niveles de esta isoforma hasta 62.9%. Además estos valores eran rescatados hasta niveles normales (46.1%) al expresar la proteína humana MBNL1 junto a las repeticiones. La secuenciación de las bandas reveló cambios en el *splicing* del espliceosensor en *Drosophila* (Fig R14B, C). La isoforma B, mayoritaria en ausencia de repeticiones, resultante de la inclusión del exón 11 en humanos, mostró la exclusión del exón 11 y la inclusión de 62 nucleótidos aguas arriba del exón 12 en moscas (Alt. en Figura 14C). Lo que sugiere el uso de un sitio 3' de *splicing* críptico en *Drosophila*. Sin embargo, no se observaron diferencias entre humanos y moscas en la secuencia de la isoforma A (mayoritaria en presencia de las repeticiones). Tomados en su conjunto, estos

## Resultados

resultados demuestran que el splicing del espliceosensor INSR depende de la expresión de las repeticiones CUG y es rescatado con éxito por la expresión de la proteína humana MBNL1, además el cambio en la secuencia de la isoforma B no altera la pauta de lectura de la luciferasa respecto al diseño original.



**Figura R14. Análisis del *splicing* del espliceosensor en moscas modelo.**

(A) RT-PCR del espliceosensor en diferentes fondos genéticos: en presencia de las repeticiones CUG (UAS-i(CTG)480, UAS-GFP)], de las repeticiones CUG junto con la proteína humana MBNL1([UAS-i(CTG)480, UAS-MBNL1]), o en ausencia de repeticiones CUG (UAS-GFP). Se observa la amplificación de dos bandas (isoforma A e isoforma B), pero en distinta proporción en cada genotipo analizado. Los resultados se muestran en porcentaje de la isoforma A ( $\pm$ desv. estándar). (B) Secuencia de cada una de las bandas amplificadas. La isoforma B incluye el exón 10 (sin marcar), el exón 12 (marcado en gris) y una secuencia adicional de 62 nucleótidos de la región intrónica situada inmediatamente aguas arriba del exón 12 (en negrita). La isoforma A contiene el exón 10 (sin marcar) y el exón 12 (marcado en gris).

(C) Esquema mostrando el splicing alternativo del minigen INSR en humanos y en las moscas espliceosensoras. La isoforma A es mayoritaria en el contexto de DM1 (línea continua), mientras que la isoforma B es mayoritaria en el contexto de NO DM1 (línea punteada).

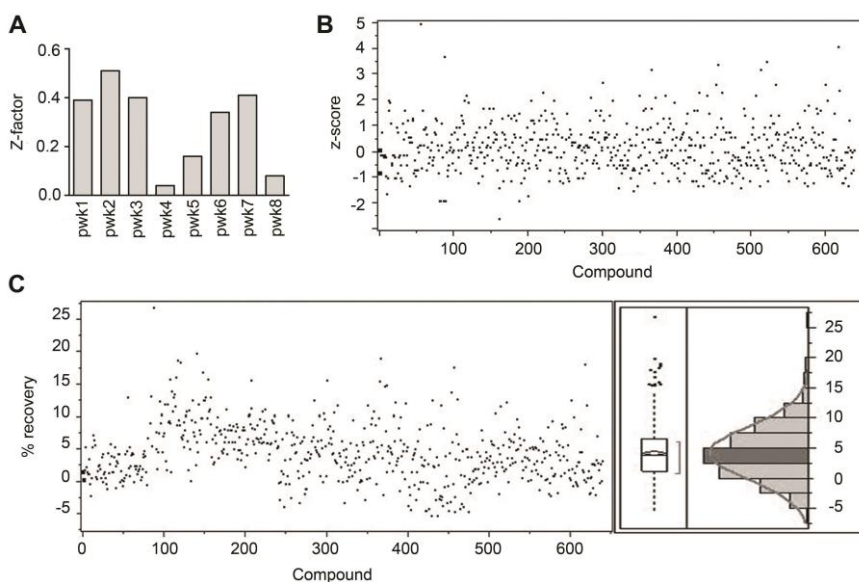
### **3.- Rastreo de compuestos a gran escala.**

#### **3.1.- El formato de rastreo permite el análisis a gran escala de compuestos.**

En colaboración con el laboratorio Valentia Biopharma S.L. se puso a punto el formato de rastreo químico con el fin de poder realizarlo con la mayor reproducibilidad y rendimiento posible. Además, se automatizó al máximo el proceso para disminuir las fuentes de errores mediante el uso de un robot multidispensador y un dispensador de embriones (ver material y métodos). El formato de rastreo, tras su optimización permite realizar rastreos químicos a gran escala (HTS, por sus siglas en inglés High Throughput Screening) *in vivo* en placa de 96 pocillos. Se llevó a cabo un ensayo piloto en el que se evaluaron 640 compuestos de la quimioteca Prestwick en el formato seleccionado, calculándose el estadístico factor Z (Zhang *et al*, 1999). Este estadístico mide la robustez del ensayo, siendo más robusto cuanto más cercano a 2, sin embargo, valores por encima de 0 son aceptables, siendo 0.5 lo normal en ensayos celulares (Tran *et al*, 2011). Tras el ensayo piloto se obtuvieron valores de factor Z positivos (Figura R15A) lo que valida el formato de 96

## Resultados

pocillos con el espliceosensor para el rastreo de compuestos a gran escala en *Drosophila*. Para el posterior rastreo, cualquier placa con valores de factor Z inferiores a 0 fue repetida. Los resultados fueron analizados como valores z-score (Kreyszig *et al.*, 1979) (Figura R15B) tras comprobar que los datos obtenidos se distribuían normalmente ( $W=0.97$  calculado con el test Shapiro-Wilk  $W$  utilizando el programa Graphpad) (Figura R15C). De este modo detectamos varias moléculas capaces de aumentar la luminiscencia en más de tres desviaciones estándar (valores z-score  $\geq 3$ ), por lo que este fue el punto de corte utilizado para identificar compuestos positivos durante el rastreo.



**Figura R15. Parámetros estadísticos obtenidos para el ensayo piloto.**

(A) Factores Z obtenidos para los 640 compuestos ensayados (ocho placas). (B) Diagrama de dispersión de los valores z-score obtenidos durante el ensayo piloto. (C) Diagrama de dispersión, cajas de outliers y gráfico de distribución del porcentaje de recuperación de luminiscencia

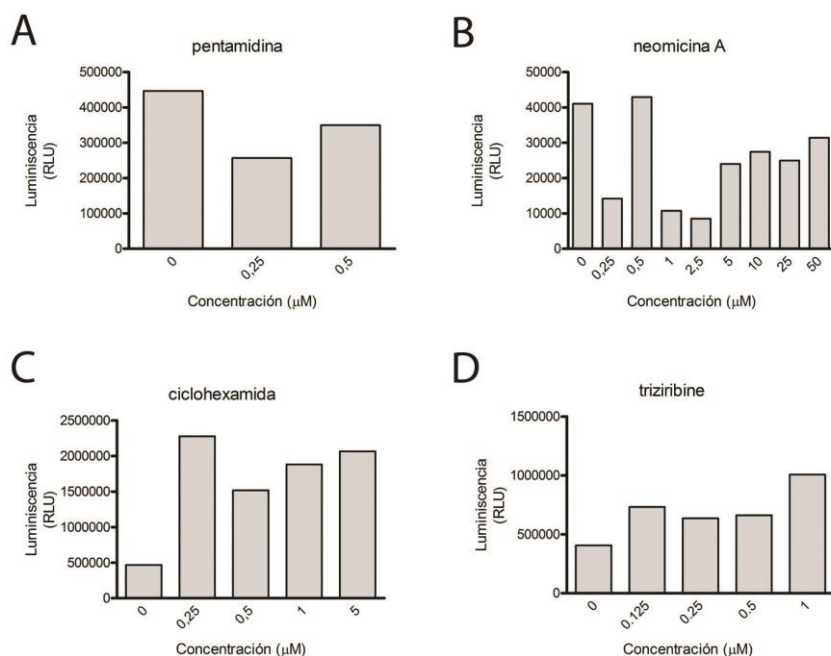
obtenido para cada uno de los 640 compuestos ensayados. Los gráficos muestran una distribución normal con la media alrededor de 0, lo que fue confirmado con un valor  $W=0.97$  en el test Shapiro-Wilk  $W$  test utilizando el programa Graphpad.

### **3.2.-El fenotipo de disminución de luminiscencia puede ser rescatado por un compuesto positivo administrado en formato HTS.**

Una vez determinadas las condiciones para llevar a cabo el rastreo de compuestos a gran escala, se comprobó la capacidad del ensayo para detectar compuestos positivos que, administrados oralmente, fueran capaces de revertir el fenotipo inducido por las repeticiones. Para ello se ensayaron distintos compuestos descritos como positivos en la bibliografía: pentamidina, ciclohexamida, neomicina A, triziribine (Warf *et al.*, 2009; Timchenko *et al.*, 2001 and O'Leary *et al.*, 2010, respectivamente). Sin embargo, sólo el compuesto triziribine y la ciclohexamida fueron capaces de aumentar los niveles de luciferasa (figura R16). La pentamidina resultó ser tóxica a concentraciones de  $1 \mu\text{M}$ , a las cuales aún no se detectaba actividad (Figura R16A). La toxicidad de la pentamidina en *Drosophila* es congruente con los altos niveles de toxicidad descritos para la pentamidina en humanos (O'Brien *et al.*, 1997, Izquierdo Patrón *et al.*, 1996). La neomicina A, a pesar de no ser tóxica a las condiciones ensayadas, tampoco mostró una mejoría en el fenotipo inducido por las repeticiones CUG (Figura 16b). En el caso de

## Resultados

la neomicina A, puede que su mecanismo de acción no afecte al *splicing* del minigen ensayado. Los compuestos triziribine y ciclohexamida sí fueron capaces de rescatar el fenotipo causado por las repeticiones CUG, aumentando los niveles de expresión de la luciferasa (Figura R16c y d). Estos resultados confirman que el espliceosensor es capaz de detectar controles positivos en un formato de rastreo de HTS *in vivo*, además de proporcionar simultáneamente información sobre sus propiedades ADMET.

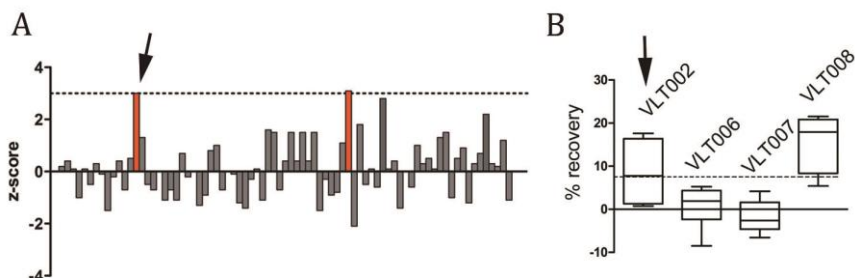


**Figura R16. El espliceosensor es capaz de detectar compuestos positivos en un formato de rastreo HTS.** Análisis de los niveles de expresión de la luciferasa en moscas modelo tratadas con positivos descritos en la bibliografía utilizando el formato de rastreo de compuestos a gran escala. La pentamidina (A) y la neomicina A (B) no mostraron

aumento en los niveles de luciferasa, sin embargo la ciclohexamida (C) y el triziribine (D) sí que fueron capaces de aumentar los niveles de luciferasa.

### **3.3.- La estefenantrina, identificada en el rastreo químico, es capaz de suprimir la toxicidad de las CTG.**

Tras el rastreo de 16.063 pequeñas moléculas procedentes de distintas quimiotecas, se seleccionaron como positivos aquellos compuestos capaces de producir un aumento en los niveles de luciferasa por encima de tres desviaciones típicas, lo que se traduce en un valor z-score de 3 o superior. Además, estos compuestos positivos se priorizaron por un mayor Z-score y una menor variabilidad. La estefenantrina fue identificada como positivo, ya que presentaba un valor z-score de 3 (Figura R17A) y confirmada como tal tras analizar individualmente al menos 8 moscas espliceosensoras tratadas con el compuesto (ensayo 8 puntos) y rescatar en un 7.5% los valores normales de luminiscencia (Figura R17B). Cabe destacar que aunque este porcentaje de recuperación es estadísticamente significativo ( $p$ -valor=0.017), no parece ser excesivamente alto. Sin embargo, respecto del rescate obtenido con la sobreexpresión de MBNL1 (46%), valor máximo teórico que podríamos obtener, el porcentaje de recuperación aumenta a un 16.3%.



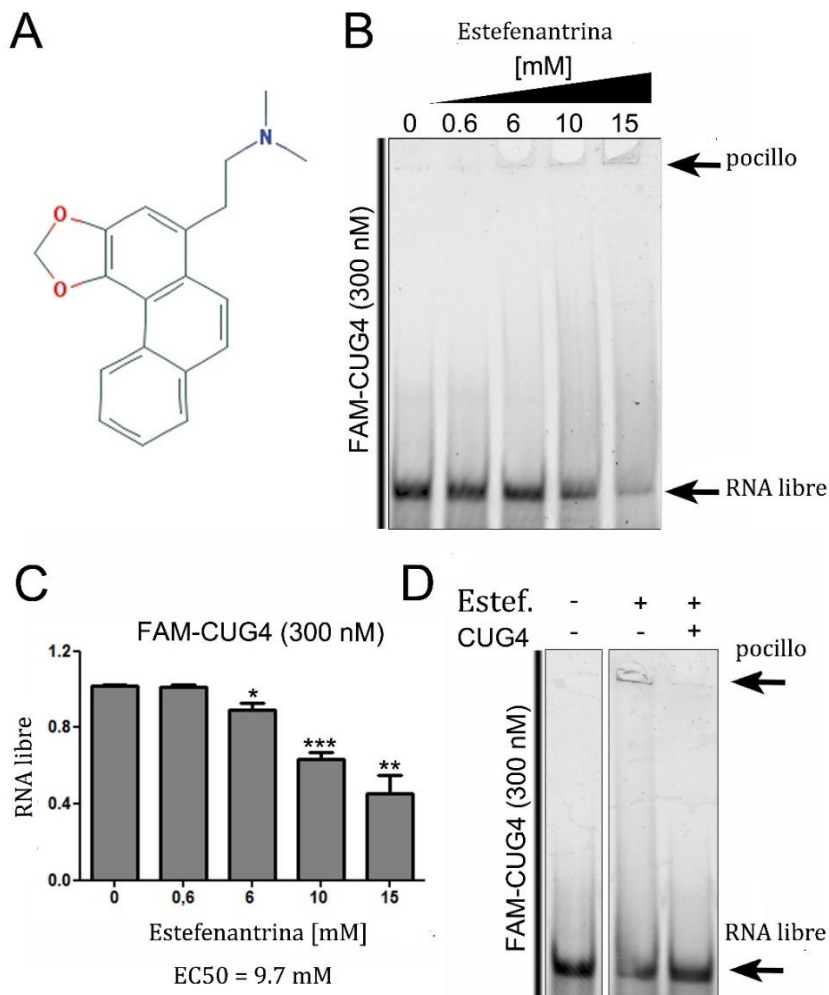
**Figura R17. Resultados obtenidos para la estefenantrina en el rastreo de compuestos a gran escala.** (A) Valores de Z-score obtenidos para la placa en la que se encontraba la estefenantrina (primera columna roja), donde además se identificó otro compuesto positivo (segunda columna roja). (B) Ensayo de 8 puntos en el que se confirmó como positiva la estefenantrina (VLT002, flecha) junto a otros compuestos analizados. Resultados mostrados como cajas representando los percentiles (de mínimo a máximo) con la media marcada como línea recta. Los compuestos VLT002 y VLT008 fueron confirmados como positivos al mostrar un porcentaje de recuperación igual o superior a 7.5% (línea punteada, punto de corte estadístico calculado con el test t de Student). Las barras de error corresponden al error estándar.

#### 4.- La estefenantrina es capaz de unirse a las repeticiones CUG.

La estefenantrina se obtuvo de una quimioteca de compuestos naturales (GreenPharma) en la que se disponía de información sobre la estructura de los compuestos. El análisis de la estructura de la estefenantrina (Figura R18A) reveló un anillo capaz de intercalarse entre los ácidos nucleicos, por lo que uno de los posibles mecanismos de acción de esta molécula podría ser el de unión a la horquilla de doble cadena



formada por el RNA tóxico. Para estudiar si era este el mecanismo de acción de la estefenantrina, se realizaron ensayos de retardo en gel para testar la capacidad de la molécula para interactuar con el RNA 4-CUG marcado con carboxifluoresceína (FAM-CUG4). Este RNA, con tan solo cuatro repeticiones, es capaz de formar la horquilla de doble cadena patogénica (Warf *et al.*, 2009). La estefenantrina se une al RNA FAM-CUG4 de forma dependiente de su concentración, siendo la mitad de su concentración máxima efectiva (EC50) de  $9.7 \pm 0.2$  mM (Figura R18B y C). Esta interacción fue revertida al competir con un RNA CUG4 no marcado, lo que demuestra la especificidad de la interacción (Figura R18D).



**Figura R18. La estefenantrina se une a las repeticiones CUG *in vitro***

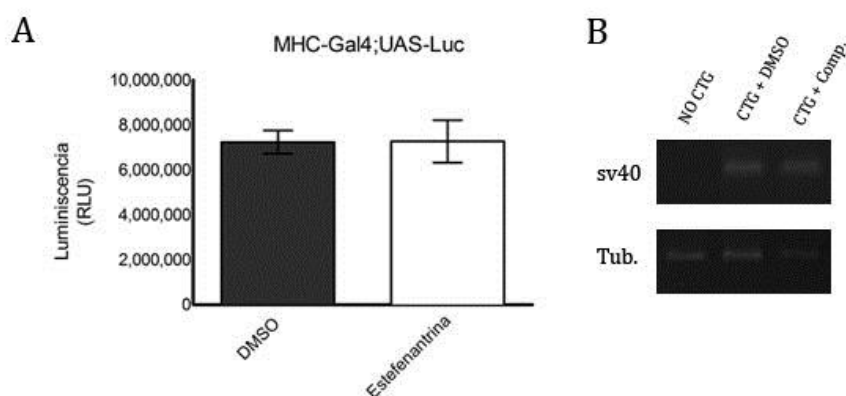
(A) Estructura de la estefenantrina con anillos aromáticos que sugieren como posible mecanismo de acción la unión a ácidos nucleicos (B) Ensayos de retardo en gel en los que se observa como el RNA formado por 4 repeticiones CUG marcado con FAM queda retenido en el pocillo del gel conforme aumenta la concentración de estefenantrina ensayada, quedando cada vez menos RNA libre. Esta disminución de RNA libre comienza a ser estadísticamente significativa a partir de 6 mM, siendo su EC50 de 9.7 mM (C) y es específica, ya que la adición de RNA no marcado libera el RNA marcado de nuevo (D). Las barras de error corresponden al error estándar.

## **5.- Validación de la actividad anti-CUG de la estefenantrina en *Drosophila*.**

### **5.1.- El aumento en los valores de luciferasa producido por la estefenantrina no es debido a un efecto directo sobre la luciferasa, el sistema UAS/GAL4 ni sobre las repeticiones CTG.**

Para descartar la posibilidad de un efecto de la estefenantrina sobre la transcripción, traducción, procesamiento y estabilidad de la luciferasa se analizaron los niveles de esta proteína al expresarla en la musculatura de moscas tratadas con estefenantrina o con DMSO. Los niveles de luminiscencia obtenidos en moscas control (*MHC-Gal4*; *UAS-INSR:Luc*) alimentadas con estefenantrina fueron similares a los obtenidos en las moscas control tratadas con DMSO (figura R19A). Por lo tanto, el efecto de la estefenantrina sobre el espliceosensor no es debido a un efecto inespecífico sobre la actividad de la luciferasa. Además, en este mismo experimento, la utilización del sistema *UAS/Gal4* para dirigir la expresión de la luciferasa permitió determinar que la estefenantrina no afecta al sistema *UAS/Gal4* (sistema utilizado para dirigir la expresión de las repeticiones y el espliceosensor al músculo en el rastreo primario).

Otro posible mecanismo por el que la estefenantrina podría estar provocando esta disminución en los niveles de luciferasa sería la interacción directa o indirectamente con la expresión de las 480 repeticiones CTG, la estefenantrina podría estar afectando a la transcripción o estabilidad de las repeticiones. Para descartar esta posibilidad, se llevó a cabo un segundo experimento en el que detectamos los niveles de RNA (CUG)<sub>480</sub> mediante RT-PCR a partir de moscas *MHC-Gal4/+;UAS-(CTG)<sub>480</sub>/+*. Debido a que la amplificación mediante técnicas convencionales de RT-PCR de 480 repeticiones CUG no era posible, utilizamos cebadores específicos para el terminador del virus SV40, presente en la secuencia del transgén (García-López *et al.*, 2011). La intensidad de las bandas obtenidas en la reacción de PCR mostraba niveles de repeticiones CUG similares en todos los casos (Figura R19B), descartando así que el efecto supresor de la estefenantrina se debiese a una posible acción sobre los niveles de transcritos (CUG)<sub>480</sub>.



**Figura R19. La estefenantrina no afecta a la luciferasa ni a los niveles de expresión de las repeticiones CUG.** (A) Los niveles de expresión de luciferasa obtenidos en moscas *MHC-Gal4; UAS-Luc* tratadas con DMSO o

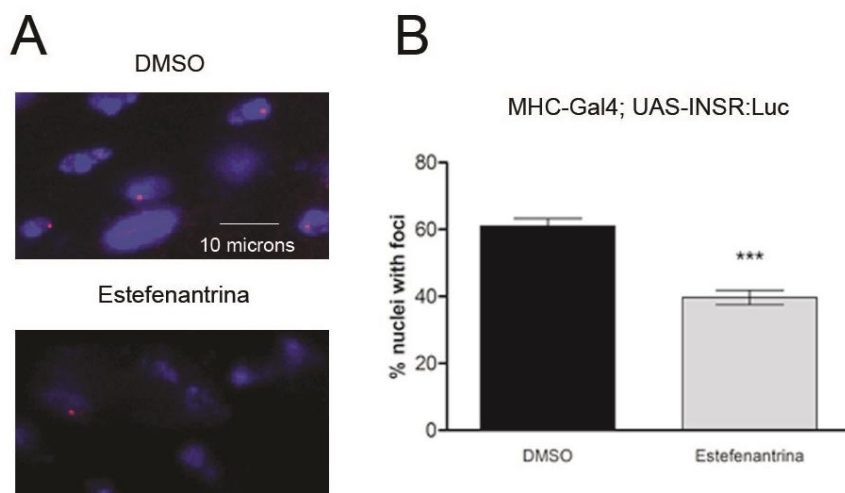
con estefenantrina no son significativamente distintos. Las barras de error corresponden al error estándar. (B) RT-PCR de moscas *MHC-Gal4* (NO CTG), *MHC-Gal4; UAS-CTG<sub>480</sub>* tratadas con DMSO (CTG + DMSO) o con estefenantrina (CTG + Comp.) para la secuencia terminadora del virus SV40, presente en el transgén *UAS-CTG<sub>480</sub>*. Conforme a lo esperado, no se obtuvo amplificación en las moscas no portadoras del transgén (NO CTG), mientras que para los niveles de expresión del terminador SV40 y, por tanto, de las repeticiones CTG, no diferían en moscas tratadas con estefenantrina (CTG + Comp.) o con DMSO (CTG + DMSO). El gen de la tubulina se utiliza como control de carga para normalizar los niveles de cDNA. En todos los casos la dosis de estefenantrina administrada fue la misma que la dispensada en el rastreo de compuestos (12,5  $\mu$ M).

## **5.2.- La estefenantrina reduce la formación de foci en *Drosophila*.**

Uno de los principales signos histopatológicos en los pacientes es la presencia de los foci ribonucleares en sus células, formados por la unión de la horquilla de RNA mutante y diversos factores nucleares (Junghans *et al.*, 2009). Si, como hemos determinado mediante ensayos *in vitro*, la estefenantrina es capaz de unirse a la horquilla de RNA *in vivo*, puede que esta unión afecte a la formación de los foci nucleares. Para estudiar si el compuesto efectivamente disminuía el número de foci, se analizó la distribución del RNA conteniendo las CUGs en los músculos indirectos del vuelo en secciones longitudinales del tórax de moscas *MHC-Gal4, UAS-(CTG)<sub>480</sub>, UAS-INSR:luc* tratadas con estefenantrina (12.5  $\mu$ M).

## Resultados

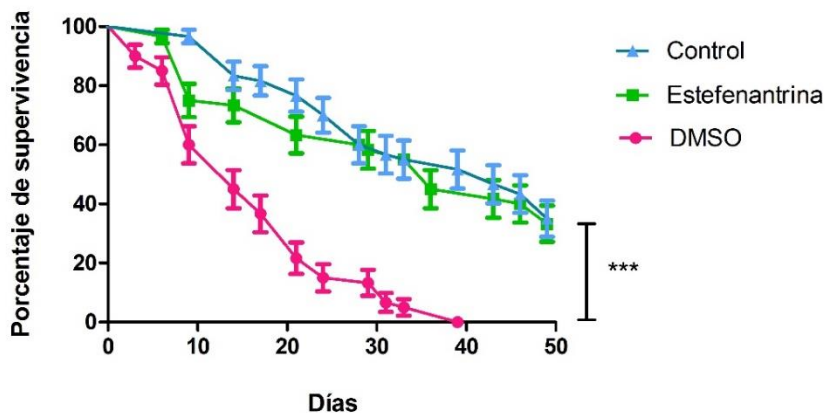
La administración oral del compuesto suprimió significativamente la formación de foci (Figura R20A). Esta reducción fue de un 20% respecto a las moscas no tratadas, disminuyendo el número de células con foci de un 60% en individuos tratados con DMSO a un 40% en aquellos tratados con estefenantrina (Figura R20B).



**Figura R20. La estefenantrina reduce el número de foci en *Drosophila*.** (A) Hibridación *in situ* de cortes transversales de musculatura de moscas tratadas con estefenantrina o control (DMSO) en las que se puede observar la disminución en el número de foci (B) La estefenantrina disminuye el número de núcleos con foci de manera estadísticamente significativa. \*\*\* p-valor < 0.001 calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa Graphpad. Las barras de error corresponden al error estándar.

### 5.3.- La estefenantrina mejora el fenotipo funcional de longevidad en moscas modelo de DM1.

Con el fin de obtener datos de la eficacia de la estefenantrina en un ensayo funcional, decidimos utilizar el fenotipo de longevidad disminuida descrito para las moscas modelo de DM1 (Garcia-Lopez, *et al.*, 2008). Para ello medimos la supervivencia durante 50 días de moscas *MHC-Gal4>UAS-(CTG)<sub>480</sub>* tratadas con estefenantrina o con DMSO. Al expresar las repeticiones CTG en la musculatura de *Drosophila* se observa una disminución en la curva de supervivencia de estas moscas respecto a las moscas control que no expresan las repeticiones (*MHC-Gal4>UAS-GFP*) (Figura R21). La supervivencia de estas moscas aumenta al ser tratadas con estefenantrina hasta niveles similares a los obtenidos con las moscas control (Figura R21). La curva de supervivencia de las moscas modelo tratadas con estefenantrina es estadísticamente significativo respecto a la curva de supervivencia de las moscas modelo sin tratar ( $p$ -valor $<0.0001$ ), mientras que esta curva no muestra diferencias significativas ( $p$ -valor=0.57) respecto a la curva de supervivencia de las moscas control (Figura R21). Estos resultados demuestran que la estefenantrina es capaz de revertir un fenotipo funcional en moscas modelo de DM1 hasta niveles similares a las moscas control.



**Figura R21. La estefenantrina aumenta la supervivencia de las moscas modelo de DM1.** Curvas de supervivencia representando el porcentaje de moscas supervivientes en función del tiempo en días. Se muestran las curvas de supervivencia de moscas *MHC-Gal4>UAS-(CTG)<sub>480</sub>* tratadas con DMSO (DMSO) o con estefenantrina (Estefenantrina) y de moscas *MHC-Gal4>UAS-GFP* tratadas con DMSO (Control). \*\*\*p-valor<0.0001 calculado con el test Kaplan-Meier utilizando el programa Graphpad.

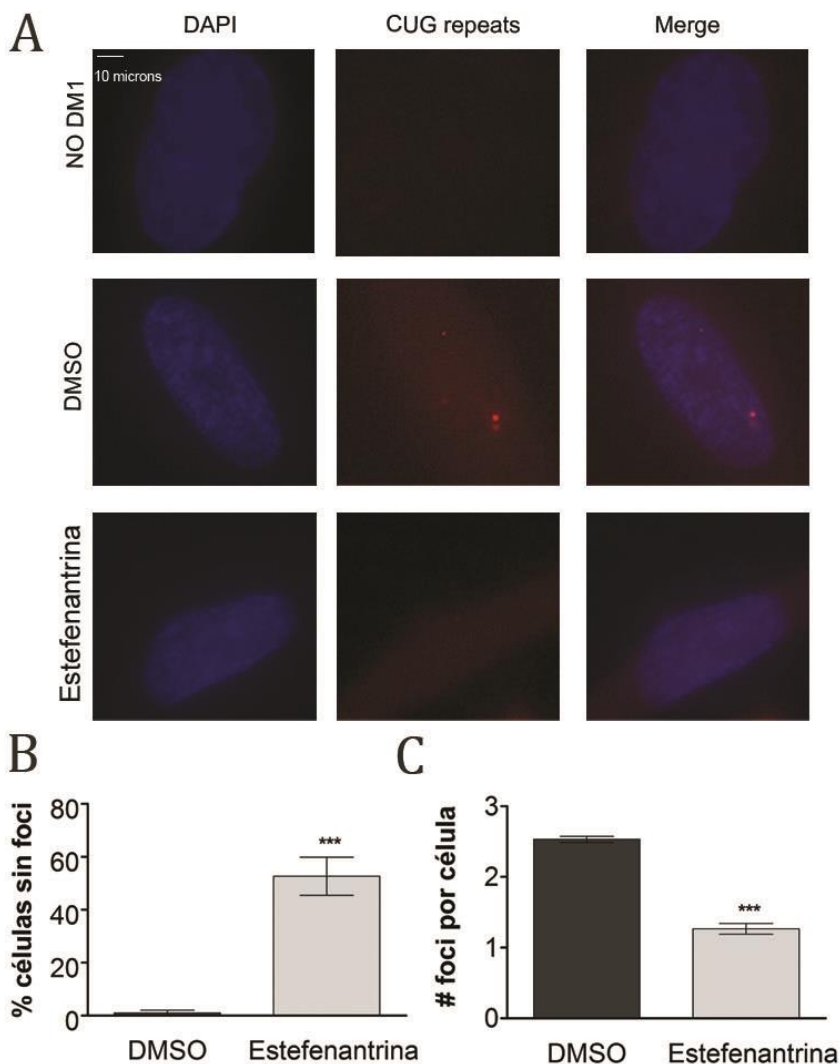
## 6.-Validación de la actividad del compuesto en líneas celulares derivadas de pacientes.

Para determinar la eficacia de la estefenantrina en un contexto humano, se realizaron ensayos en fibroblastos derivados de pacientes o de individuos sanos (gentilmente cedidos por el Dr. Adolfo L. de Munain, hospital Donostia). Estos fibroblastos fueron transfectados establemente por el grupo del Dr. Adolfo de Munain con MyoD, de modo que se podía inducir su transdiferenciación dirigida a mioblastos.



### **6.1.- La estefenantrina reduce el número de agregados nucleares en fibroblastos de pacientes.**

La eficacia de la estefenantrina para reducir los foci de RNA tóxico se testó en fibroblastos de pacientes con 333 repeticiones. Para ello se incubaron durante 24 h con estefenantrina a 100  $\mu\text{M}$ , (concentración inferior a la dosis letal 10 calculada para este compuesto, LD10=170  $\mu\text{M}$ ) o, como control, con DMSO. Mediante hibridación *in situ* fluorescente con sonda CAG marcada se pudo determinar la presencia de foci nucleares en estas líneas celulares (Figura R22A), mientras que en fibroblastos derivados de individuos sanos no se detectaban estos agregados ribonucleares. Se cuantificó el número de foci encontrados en fibroblastos de pacientes tratados con estefenantrina o con DMSO durante 24 h. Las células tratadas con estefenantrina mostraron un aumento en el número de núcleos sin foci (52.7%) respecto a las células control tratadas con DMSO (1%) (Figura R22B). Además aquellos fibroblastos que continuaban teniendo foci tenían de media menos foci por célula (1.2 foci por célula) que los fibroblastos tratados con DMSO (2.5 foci por célula) (Figura R22C). Por lo que la estefenantrina también es capaz de inhibir la formación de foci en un contexto humano.

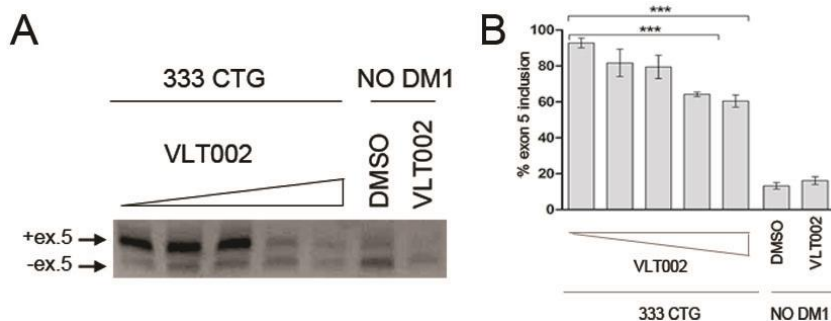


**Figura R22. La estefenantrina reduce la formación de foci en fibroblastos de pacientes.** (A) Hibridación *in situ* fluorescente mostrando los foci en los fibroblastos derivados de pacientes tratados con DMSO (control) o con estefenantrina (tratados). Los núcleos se muestran marcados en azul con DAPI mientras que la sonda CAG marca los foci en rojo. En los fibroblastos derivados de individuos sanos (NO DM1) no se detectan foci. (B) Cuantificación del número de núcleos sin foci observados en los fibroblastos tratados con DMSO o estefenantrina. (C) Número de foci

presentes en cada núcleo de fibroblastos tratado con DMSO o estefenantrina. Las cuantificaciones en (B) y (C) se llevaron a cabo contando al menos 150 núcleos (25 núcleos en 2 campos independientes y 3 réplicas biológicas). \*\*\* p-valor<0.001 calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa Graphpad. Las barras de error corresponden al error estándar.

## **6.2.-La estefenantrina es capaz de rescatar defectos en el *splicing* del transcrito cTNT en mioblastos de pacientes.**

Los mioblastos transdiferenciados a partir de fibroblastos derivados de pacientes muestran alteraciones en el *splicing* de determinados transcritos, entre ellos el de la *troponina T cardiaca* (*cTNT*). Con el fin de analizar si la estefenantrina era capaz de rescatar el *splicing* aberrante en un contexto humano, se analizó el *splicing* del transcrito *cTNT* en mioblastos de pacientes tratados con el compuesto. La estefenantrina fue capaz de revertir la inclusión aberrante del exón 5 observada en los mioblastos de pacientes (Figura R23A y B). Además, esta reversión es dependiente de dosis, aumentando el porcentaje de exclusión del exón 5 conforme aumenta la dosis del compuesto (Figura R23A y B). Por último, el efecto de la estefenantrina sobre el *splicing* de *cTNT* es específico de los mioblastos enfermos (333 CTG), ya que no se observaron alteraciones significativas en el *splicing* de este transcrito en mioblastos derivados de individuos sanos (NO DM1) (Figura R23A y B)



**Figura R23. La estefenantrina revierte el *splicing* aberrante del gen *cTNT* en mioblastos DM1.** (A) RT-PCR del gen *cTNT* de mioblastos derivados de individuos sanos (No DM1) o de pacientes (333 CTG) tratados con concentraciones crecientes de estefenantrina (0  $\mu$ M, 6.25  $\mu$ M, 12.5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 100  $\mu$ M). Aumenta la exclusión del exón 5 (banda inferior) al aumentar la concentración de estefenantrina, como se ve reflejado en los valores de % exclusión (B) en los que se cuantifica la intensidad de la banda inferior respecto a la superior. \*\*\* p-valor<0.001 calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa Graphpad. Las barras de error corresponden al error estándar.

## 7.- Validación de la actividad de la estefenantrina en un modelo murino de DM1.

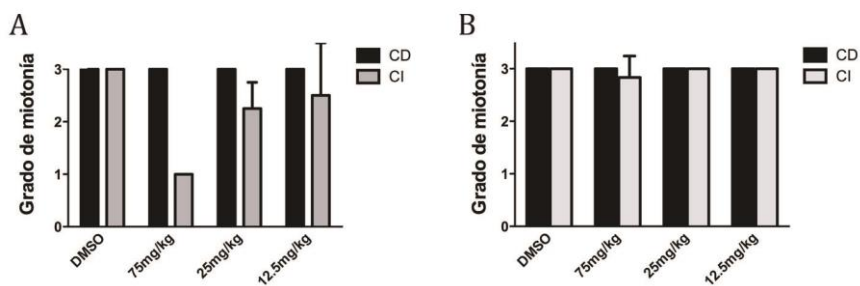
La estefenantrina demostró propiedades anti-DM1 en *Drosophila* y en células derivadas de pacientes. Para validar la relevancia de estos resultados en modelos de DM1 en mamíferos, decidimos ensayar este compuesto en ratones HSA<sup>LR</sup>, cedidos a nuestro laboratorio por el Profesor Charles Thornton (Univ. Rochester, NY, EEUU). Estos ratones expresan

250 repeticiones CUG en los transcritos heterólogos de la actina humana y reproducen la mayoría de síntomas musculares de DM1, incluyendo la miotonía (Mankodi *et al.*, 2000). La supresión de la miotonía por parte de la estefenantrina demostraría que este compuesto no es sólo capaz de revertir los efectos de las repeticiones CTG a nivel molecular, sino que la estefenantrina también mejora caracteres funcionales de DM1 como es la miotonía. Por lo que se propuso analizar el efecto de la estefenantrina en ratones HSA<sup>LR</sup>.

### **7.1. La estefenantrina disminuye el grado de miotonía en ratones modelo de DM1.**

La miotonía, síntoma característico de la enfermedad, se puede medir sin necesidad de sacrificar al animal mediante electromiografía, por lo que decidimos utilizarla como criterio para determinar el efecto de la estefenantrina en los ratones modelo. Se estudió el efecto de la estefenantrina en ratones HSA<sup>LR</sup> de seis semanas, dos semanas después de que desarrollen miotonía (Mankodi *et al.*, 2000). Para ello se inyectó intramuscularmente en el cuádriceps izquierdo de las patas posteriores distintas concentraciones de estefenantrina. El cuádriceps derecho se utilizó como control interno por lo que se le inyectó el vehículo en el que se disolvió la estefenantrina. Se pincharon diariamente durante tres días, realizando electromiogramas antes de pinchar por primera

vez y dos días después de haber pinchado la última dosis. Los valores de miotonía del cuádriceps derecho, pinchado con el vehículo, no mostraron diferencias entre antes y después de pinchar la estefenantrina. Sin embargo, las medidas de miotonía del cuádriceps izquierdo, pinchado con estefenantrina, se reducían considerablemente 2 días después de la última dosis (Figura R24A), mientras que aquellos pinchados con el vehículo mostraban valores de miotonía altos en los dos cuádriceps. Además esta disminución en los niveles de miotonía es dependiente de dosis, ya que la miotonía disminuye más cuanto mayor es la dosis administrada a los ratones. Cabe destacar que el grado de miotonía antes de pinchar era exactamente igual para el cuádriceps izquierdo y el derecho (Figura R24B).



**Figura R24. La estefenantrina disminuye el grado de miotonía en ratones HSA<sup>LR</sup>.** (A) Valores de miotonía de ratones HSA<sup>LR</sup> 2 días después de ser pinchados intramuscularmente con distintas concentraciones de estefenantrina en el cuádriceps izquierdo (CI) o con el vehículo (DMSO) en el cuádriceps derecho (CD). En el caso del DMSO se pincharon ambos cuádriceps con DMSO. El grado de miotonía se representa en una escala donde 0 es ausencia de

miotonía y 3 presencia de miotonía en el 90% de los puntos analizados o más. (B) Niveles de miotonía en ratones HSA<sup>LR</sup> antes de ser pinchados. Las barras de error representan el error estándar.

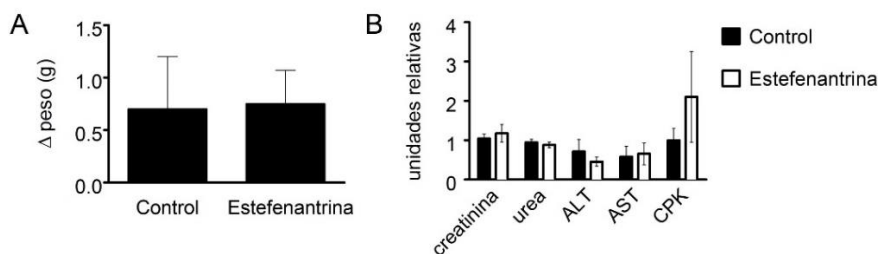
## **7.2. La estefenantrina no resulta tóxica a concentraciones a las cuales es eficaz en ratones modelo de DM1.**

En el momento en el que disminuyó la miotonía, dos días después de la última inyección, los animales fueron sacrificados. Con el fin de estudiar el posible efecto tóxico de la estefenantrina en mamíferos se analizaron en profundidad aquellos ratones pinchados con la máxima dosis (75 mg/kg). La disminución en el incremento de peso de los animales se ha asociado con toxicidad (Wheeler *et al.*, 2012), por lo que se pesaron los animales al principio y al final del tratamiento. El análisis de estos pesos no mostró diferencias significativas respecto a los animales control, ratones HSA<sup>LR</sup> en los que ambas patas estaban pinchadas con el vehículo (Figura R25A). Además, en el momento del sacrificio se realizó autopsia visual del estado general de los animales y el examen macroscópico de los principales órganos y sistemas no reveló diferencias respecto a los animales control.

Por último, se recogieron muestras de sangre de aquellos ratones inyectados con la máxima dosis (75 mg/kg) y se analizaron varios parámetros. Como marcador de actividad renal se midió la cantidad de urea y creatinina en sangre. El enzima creatinafosfoquinasa (CPK) se usó como marcador de

## Resultados

daño en músculo esquelético y corazón, y la fosfatasa alcalina (FA), la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) como marcadores de daño hepático. Ninguno de estos parámetros mostró diferencias significativas entre animales control y tratados (Figura R25B), por lo que la dosis de 75 mg/kg de estefenantrina no resulta tóxica en ratones.



**Figura R25. Toxicidad de la estefenantrina inyectada intramuscularmente en ratones HSA<sup>LR</sup>.** (A) Incremento en el peso de ratones HAS<sup>LR</sup> tratados con estefenantrina o control tras 5 días de tratamiento (B) Unidades relativas de distintos marcadores de toxicidad medidos en sangre extraída el día del sacrificio. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ratones HSA<sup>LR</sup> tratados con estefenantrina a 75 mg/kg y los ratones HSA<sup>LR</sup> control tratados con el vehículo. Los valores están normalizados, siendo uno la media de los ratones HSA<sup>LR</sup> control tratados con el vehículo. Las barras de error representan el error estándar. En ningún caso se detectaron diferencias estadísticamente significativas con el test t de student utilizando el programa Graphpad.



***Discusión***



## 1. Las moscas modelo de DM1 reproducen la espliceopatía descrita en pacientes de DM.

Previamente en nuestro laboratorio se generó un modelo de DM1 en *Drosophila* mediante la inserción estable de 480 repeticiones CTG en su genoma y su expresión bajo el control del sistema de expresión ectópico UAS/Gal4. Este modelo reproducía diversos fenotipos de la enfermedad como son la formación de foci nucleares, el secuestro de la proteína Muscleblind o la degeneración muscular (Garcia-Lopez *et al.*, 2008). En este trabajo nos propusimos analizar si estas moscas reproducían también la espliceopatía descrita en pacientes (Ranum & Cooper, 2006). El análisis de 11 transcritos candidatos reveló que cuatro de ellos (36%) presentaban alteraciones en su *splicing*, lo que demuestra una desregulación parcial del *splicing* alternativo. Los transcritos que mostraran su *splicing* alterado fueron InR: *InR*, *Fhos*, *troponina T* y *CG30084*.

1.1. *El receptor de la insulina InR.* En *Drosophila*, el gen *InR* codifica para cuatro isoformas (A-D), todas ellas traducen la misma proteína, aunque varían en su extremo 3' no codificante (3'UTR), lo que puede afectar a la localización y estabilidad de los transcritos (Hesketh, 2004). Sin embargo, no existen estudios en los que se distinga entre las distintas isoformas, en todos los artículos publicados en *Drosophila* las analizan juntas, probablemente debido al hecho de que las cuatro

codifican para exactamente la misma proteína. En el análisis realizado durante este trabajo en moscas modelo de DM1, encontramos alteraciones en el *splicing* del gen *InR*, disminuyendo los niveles de la isoforma C en presencia de las 480 repeticiones y aumentando en moscas que sobreexpresan la proteína Muscleblind C. Los distintos 3'UTRs podrían determinar diferencias en la eficiencia con la que el mRNA se traduce o influir en la localización subcelular de éstos. Sin embargo, debido a la falta de información sobre el papel de los distintos transcritos de *InR* en *Drosophila*, no es posible deducir las posibles consecuencias fisiológicas de esta alteración sin llevar a cabo experimentos que se desvían del objetivo principal de este trabajo.

1.2. El gen *CG30084* (también llamado *zasp52*) está implicado en la estabilidad y mantenimiento de los discos Z de los sarcómeros, ya que mutaciones en este gen provocan desprendimiento muscular y alteraciones en el ensamblaje y mantenimiento de los discos Z (Jani & Schock, 2007; Benna *et al.*, 2009). En *Drosophila*, *zasp52* sufre un *splicing* alternativo muy extenso, con 13 variantes descritas hasta el momento (Katzemich *et al.*, 2011), sin embargo, poco se sabe sobre el papel de cada transcrito o su expresión. Inicialmente, con la aproximación llevada a cabo en este trabajo en moscas adultas no se observaron diferencias en el *splicing* de este gen en moscas modelo y control. Sin embargo, previamente Machuca-Tzili y colaboradores, ya mostraron alteraciones en el *splicing*

de este gen en embriones de moscas con falta de función de Muscleblind (Machuca-Tzili *et al.*, 2006), por lo que eran de esperar alteraciones similares en el *splicing* de estos transcritos en embriones de moscas modelo de DM1, ya que el secuestro de Muscleblind por el RNA tóxico simularía la falta de función de esta proteína, al menos en parte. El estudio del *splicing* de este transcrito en embriones de las moscas modelo mostró alteraciones que corresponden a una mayor expresión de la isoforma E en moscas modelo comparado con las moscas control. El aumento de esta isoforma podría estar relacionada con la degeneración muscular observada en las moscas modelo de DM1 (García-López y col., 2008), sin embargo, debido a la poca información existente sobre la función de este transcrito en *Drosophila*, no podemos determinar su implicación en la degeneración muscular.

1.3. El gen *Fhos* en *Drosophila* codifica para 9 transcritos, todos ellos contienen los dominios de homología a formina FH1 y FH2. La interferencia con todas las isoformas *fhos* provoca alteraciones en la contracción cardiaca con aumentos en las dimensiones sistólica final y diastólica final en *Drosophila* (Wooten *et al.*, 2013) Mutaciones de falta de función de *fhos* que afectan a la isoforma más corta (isoforma b) se han relacionado con alteraciones en la muerte celular programada (MCP) dependiente de esteroides (Anhezini *et al.*, 2012). Cabe destacar que tanto en modelos en *Drosophila* (Vicente-Crespo *et al.*, 2008) como celulares (Furuya *et al.*,

2005) de DM1 se ha descrito muerte celular programada debida a la expresión de las repeticiones CUG. En el ensayo llevado a cabo en este trabajo no se observaron cambios en la expresión del transcrito b (implicado en MCP) entre moscas modelo de DM1 y moscas sanas, pero sí se identificaron cambios en el *splicing* del exón 15, cuya inclusión aumenta en las moscas modelo y disminuye con la sobreexpresión de *muscleblind C*. Sin embargo, debido a que este exón ha sido identificado recientemente y todavía no se conoce su papel en *Drosophila*, no podemos relacionar esta alteración en el *splicing* con fenotipos presentes en las moscas modelo de DM1.

1.4. *La troponina T (TnT)* es una proteína globular presente en el músculo estriado y cardíaco implicada en la contracción muscular (Potter *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 2000). En *Drosophila* existe un sólo gen (*upheld* o *up*) que codifica para todas las troponinas T (Fyrberg *et al.*, 1990; Benoist *et al.*, 1998). Este gen contiene 11 exones (Nongthomba *et al.*, 2007), de los cuales los exones 3,4 y 5 tienen *splicing* alternativo en diferentes músculos (Benoist *et al.*, 1998; Mas *et al.*, 2004). El exón 6 produce 2 mRNAs alternativos que difieren en un único codón debido a un sitio dador de *splicing* alternativo situado en este exón (Fyrberg *et al.*, 1990). Por último, se han descrito dos exones 10 (exón 10a y exón 10b) cuyo *splicing* es opuesto (si se incluye uno no se incluye el otro) y generan isoformas con 7 (10a) o 4 (10b) sitios potenciales de fosforilación. En la aproximación inicial llevada a cabo en este trabajo, la

troponina T (*TnT*) no mostró diferencias en el *splicing* de los exones 3, 4 y 5 entre adultos de moscas modelo de DM1 y moscas control. Sin embargo, Vicente-Crespo y colaboradores describieron alteraciones en el *splicing* de este transcrito en moscas mutantes para *muscleblind* en el estadio de pupa (Vicente-Crespo *et al.*, 2008), por lo que analizamos el *splicing* del transcrito *Tnt* en este estadio. Al estudiar el *splicing* de *Tnt* en el estadio de pupa, sí se observaban diferencias, aumentando el porcentaje de inclusión del exón 3, que codifica para un dominio rico en ácido glutámico homólogo al exón 5 de *cTNT* regulado por MBNL1 (Benoist *et al.*, 1998). El exón 3 de *Drosophila* está únicamente ausente en la isoforma de la troponina T que se expresa en los músculos TDT (músculo depresor de trocanter) e IFM (músculos indirectos del vuelo) y probablemente confiere propiedades específicas (Chaudhuri *et al.*, 2005). Sin embargo, Vicente-Crespo y colaboradores describían el suceso inverso, es decir, una mayor exclusión del exón 3 en mutantes de falta de función de *muscleblind* (Vicente-Crespo *et al.*, 2008). Estos mutantes de falta de función esperábamos que simularan el secuestro de Muscleblind observado en las moscas modelo (García-López *et al.*, 2008) y, por tanto, que la alteración en el *splicing* del transcrito *TnT* fuera similar en los dos casos. Las diferencias observadas podrían deberse a diferencias en el estadio pupal estudiado, ya que en nuestro caso utilizamos pupas de estadios tardíos (pupas de dos a cinco días) mientras que para

los análisis del mutante de *muscleblind* se utilizaron pupas tempranas (pupas de uno a dos días).

En general, no podemos relacionar las alteraciones en el *splicing* detectadas con fenotipos observados en las moscas modelo de DM1, debido principalmente a la falta de información sobre el papel de las isoformas alteradas. Cabe destacar que para los análogos humanos de estos cuatro genes tampoco está clara la relación directa entre los sucesos de *splicing* alterados y los síntomas observados en pacientes. El único *splicing* aberrante que parece estar directamente relacionado con un síntoma de la enfermedad es el del receptor de la insulina, en el que el aumento de la isoforma A en músculo parece explicar la resistencia a la insulina detectada en los pacientes (Santoro *et al.*, 2014). El estudio en profundidad en *Drosophila* de estas alteraciones del *splicing*, así como de los fenotipos provocados por las repeticiones en las moscas modelo de DM1, podría arrojar luz sobre la contribución de los homólogos humanos a los síntomas de la enfermedad.

A pesar de ser considerados como negativos en este ensayo, el resto de transcritos estudiados podrían también tener su *splicing* alterado. Un estudio en profundidad de cada uno de estos genes podría revelar alteraciones en el *splicing* no detectadas mediante esta aproximación. Cabe destacar que el objetivo de este experimento era determinar si las moscas modelo de DM1 reproducían también la espliceopatía presente



en los pacientes (Osborne & Thornton, 2006), de modo que realizamos una aproximación general sin profundizar en detalle en la regulación del *splicing* de los transcritos candidatos. Un análisis más exhaustivo del *splicing* de estos transcritos, por ejemplo, durante el desarrollo de la mosca, podría revelar alteraciones en otros estadios distintos al adulto. Así, puede que alguno de los transcritos cuyo *splicing* hemos descrito como no alterado, sufra una alteración del *splicing* similar a la observada en el transcrito de la *troponina T* o de *Zasp52*, en los que la desregulación del *splicing* se lleva a cabo en estadio distinto al adulto. Dado el papel que juega Muscleblind en la diferenciación terminal, encontrar el momento del desarrollo en el que se requiere de su regulación para el correcto *splicing* de un determinado transcrito es clave para poder identificar alteraciones en el *splicing* alternativo de dicho transcrito. Por otro lado, aquellos transcritos cuyo *splicing* no se ha visto alterado en este ensayo pero se expresan en otros tejidos distintos al muscular, podrían presentar alteraciones en el tejido en el caso de expresar las repeticiones en este otro tejido. El transcrito *Tau*, por ejemplo, podría ver alterado su *splicing* si las 480 repeticiones CTG se expresaran en el cerebro. Además, a pesar de haber dirigido la expresión de las repeticiones al músculo, por cuestiones técnicas, a la hora de analizar el *splicing* de los transcritos, utilizamos el RNA extraído del animal completo, de modo que en aquellos genes que se expresen en más de un tejido los posibles cambios ocurridos en la musculatura podrían quedar

enmascarados por la presencia de esas mismas isoformas en un ratio distinto en otros tejidos. Por último, no en todos los genes se estudiaron todos los posibles transcritos que podían obtenerse por *splicing* alternativo, por lo que pueden existir transcritos no estudiados cuyo *splicing* sí esté alterado. Debido a todas estas limitaciones, no podemos asumir que aquellos transcritos descartados según nuestra aproximación, no presenten alteraciones en su *splicing* en moscas modelo de DM1 bajo otras condiciones experimentales. Sin embargo, el objetivo de este ensayo era demostrar que las moscas modelo de DM1 presentan alteraciones en el *splicing* de determinados RNAs mensajeros, al igual que ocurre en pacientes, por lo que no realizamos un análisis más profundo de las alteraciones en el *splicing* de las moscas modelo de DM1. El hecho de observar cambios en el *splicing* de algunos transcritos (*InR*, *CG30084*, *TnT* y *fhos*) ortólogos de genes cuyo *splicing* en pacientes de DM1 se encuentra también alterado (*INSR*, *ZASP*, *TNNT* y *Fhos*, respectivamente) confirma la conservación de la ruta de patogénesis de DM1 en *Drosophila* y valida el estudio de este tipo de alteración característica de DM1 en *Drosophila*.

## **2. La proteína humana MBNL1 es capaz de revertir defectos en el *splicing* provocados por 480 repeticiones CTG en los músculos indirectos del vuelo de la mosca.**

Otro modo de demostrar la relevancia biomédica del fenotipo de *splicing* alterado y su conservación en la ruta de

patogénesis consiste en expresar alguno de los genes humanos implicados en la enfermedad en *Drosophila* y analizar la respuesta del *splicing*. La proteína MBNL1 es una de las proteínas secuestradas por las repeticiones CUG en agregados nucleares y su papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad se ve confirmado por diferentes experimentos: (i) ratones *knockout* para el gen *Mbnl1* reproducen aspectos de la enfermedad tales como la miotonía, cataratas y defectos en el *splicing* de transcritos (Kanadia *et al.*, 2003), (ii) la sobreexpresión *in vivo* del gen *Mbnl1* murino en ratones que expresan 250 repeticiones CTG (HSA<sup>LR</sup>) revierte la miotonía y defectos en el *splicing* de determinados transcritos alterados en estos ratones (Kanadia *et al.*, 2006) y (iii) de los 175 transcritos alterados en los ratones que expresan 250 repeticiones CTG, 127 están también alterados en ratones *knockout* para *Mbnl1* (Du *et al.*, 2010). En nuestro laboratorio disponíamos de varias cepas transformantes que expresaban el gen humano MBNL1 bajo el control del sistema UAS/Gal4 (Garcia-Casado *et al.*, 2002). Para llevar a cabo el estudio de rescate genético interespecífico, utilizamos el transformante KB1. Este transformante ya había sido capaz de rescatar el fenotipo de ojo rugoso provocado por la expresión de las repeticiones en el ojo de *Drosophila* (Garcia-Lopez *et al.*, 2008), por lo que esperábamos que también rescatara las alteraciones observadas en el *splicing*. Efectivamente, la expresión del gen *MBNL1* humano en moscas modelo de DM1 fue capaz de rescatar las alteraciones en el *splicing* del gen *fhos*

debidas a la expresión de las repeticiones CTG en su musculatura. Dada la implicación de MBNL1 en la patogénesis de la enfermedad en general, y del *splicing* en particular, la reversión de las alteraciones del *splicing* observada al expresar el gen MBNL1 junto con las 480 repeticiones CTG en la musculatura de la mosca, confirma la conservación de la ruta de patogénesis de DM1 en *Drosophila* así como su relevancia biomédica en humanos. Además, el hecho de ser capaz de rescatar el fenotipo provocado en *Drosophila* con la expresión de la proteína humana demuestra la homología funcional que existe entre *Drosophila* y humanos en esta ruta en concreto, ya que la proteína humana es capaz de regular el *splicing* alternativo en una especie distinta, lo que indica que la maquinaria del *splicing* alternativo de *Drosophila* responde a las presencia de la proteína humana MBNL1.

### **3. Las expansiones CTG alteran el *splicing* de minigenes mamíferos en el contexto biológico de *Drosophila*.**

Con el fin de conseguir un modelo en *Drosophila* más “humanizado”, en el que los resultados obtenidos puedan extrapolarse con éxito al desarrollo de tratamientos para los pacientes, decidimos estudiar en *Drosophila* el *splicing* de minigenes de mamíferos. La maquinaria encargada del *splicing* de transcritos, con más de 300 proteínas implicadas (Jurica & Moore, 2003), es uno de los procesos macromoleculares más

complejos, con una composición dinámica que requiere numerosas interacciones proteína-proteína y proteína-RNA. A pesar de su complejidad, o probablemente debida a ella, es un proceso muy conservado a lo largo de la evolución, de modo que especies tan dispares como las levaduras (*S. cerevisiae*) y humanos tienen grandes similitudes en su maquinaria de *splicing* (Wahl *et al.*, 2009). En el caso de *Drosophila*, varios son los estudios que demuestran que el mecanismo de *splicing* es muy similar al de humanos aunque con ciertas excepciones como por ejemplo la longitud de los exones (Mount *et al.*, 1992). En el momento de iniciar esta tesis no existían publicaciones en las que se describiera el *splicing* de un minigen de mamífero en humano *in vivo* en *Drosophila*. Con el fin de obtener una prueba experimental de que este tipo de *splicing* interespecífico era posible en moscas, decidimos analizar el *splicing* del minigen *TnnT3* de ratón en *Drosophila*. Elegimos este minigen por ser el único disponible en ese momento y porque, a pesar de ser un minigen de ratón, estudios previos habían demostrado que su *splicing* en células humanas era igual que en células de ratón (Yuan *et al.*, 2007). También analizamos la capacidad de este minigen para responder, al igual que lo hace en un contexto humano, a la presencia de 480 repeticiones CTG en *Drosophila*. Los resultados obtenidos confirmaron que en *Drosophila* también se producía el *splicing* de este minigen de ratón aunque con ligeras variaciones. La maquinaria de *splicing* alternativo no parece reconocer al exón alternativo en humanos, sin

embargo, el exón localizado inmediatamente aguas debajo de éste sí que muestra un *splicing* alternativo dependiente de las repeticiones. Además, en el caso de excluirse este exón, el sitio de *splicing* en 3' es distinto al utilizado en humanos. Sin embargo, dado que este nuevo sitio de *splicing* estaba localizado en la zona de clonación múltiple del vector utilizado para su microinyección en *Drosophila* este distinto uso del sitio de *splicing* en 3' podía deberse a artefactos generados por esta secuencia del vector o a diferencias en la maquinaria del *splicing* en *Drosophila*. A pesar de las variaciones observadas, se confirmó la existencia de *splicing* interespecífico en *Drosophila*, ya que la maquinaria de *splicing* de *Drosophila* es capaz de llevar a cabo el *splicing* de un minigen exógeno aunque con ligeras modificaciones. Además, al expresar las repeticiones CTG, el *splicing* de este minigen se veía alterado, por lo que se confirma la conservación de la ruta de patogénesis de las repeticiones.

Al realizar un ensayo en el que se ven implicadas dos especies distintas (un minigen humano o murino en el contexto biológico de *Drosophila*) esperamos aumentar las probabilidades de extrapolar los resultados a otras especies distintas de *Drosophila*. Así, cabe esperar que un compuesto cuyo mecanismo de acción sea específico de moscas no sea identificado como positivo utilizando este ensayo interespecífico. Siendo, por lo tanto, más probable que los positivos identificados así, lo sigan siendo en otras especies, en particular la humana.

#### **4. Optimización de un ensayo de alto rendimiento en *Drosophila* para el rastreo de moléculas *in vivo*.**

Tras determinar la existencia de *splicing* interespecífico en *Drosophila*, decidimos generar moscas *espliceosensoras* para el rastreo de compuestos a gran escala. Este término, acotado por nosotros (García-Alcover *et al.*, 2014), hace referencia a moscas que expresan un minigen que incluye un *splicing* alternativo crítico para la enfermedad fusionado a un gen reportero, de modo que cambios en el *splicing* del minigen se ven reflejados en cambios en los niveles de expresión del gen reportero. En este trabajo utilizamos por primera vez este tipo de espliceosensores para llevar a cabo con éxito el rastreo de compuestos a gran escala, con el fin de identificar compuestos capaces de mejorar el *splicing* de un transcrito diana implicado en DM1. Cabe destacar que, durante la realización de esta tesis, O'Leary y colaboradores publicaron el uso de este tipo de espliceosensores en la búsqueda de fármacos anti-DM1, lo que valida la idea inicial de realizar un rastreo de compuestos utilizando un espliceosensor. En el caso de O'Leary y colaboradores, el espliceosensor fue utilizado en mioblastos derivados de pacientes de DM1 para el rastreo de compuestos a gran escala (O'Leary *et al.*, 2010), analizando 13000 compuestos en un formato de alto rendimiento mediante una aproximación idéntica a la nuestra: el minigen del intrón 2 del canal de cloro (ClC-1) fusionado al reportero luciferasa. Sin

embargo, quizás por el minigen utilizado, por el tipo de aproximación *in vitro* o por la elección de la librería, no consiguieron encontrar ningún compuesto positivo. El minigen utilizado en este trabajo fue el minigen del intrón 2 del CIC-1, que incluye el exón 2, el intrón 2 y el exón 3. El gen *CIC-1* presenta un patrón de *splicing* muy complejo, observándose alteraciones en el *splicing* incluso en individuos sanos, obteniendo un 24% de los transcritos con codones de terminación prematuros, entre otras alteraciones (Mankodi *et al.*, 2002). Por otro lado, tal y como se explica en la introducción, la búsqueda de fármacos utilizando plataformas *in vitro* presenta limitaciones a la hora de poder convertirlos en un medicamento disponible para pacientes, principalmente por falta de propiedades farmacológicas óptimas (Giacomotto & Segalat, 2010). Además, la mayoría de los sucesos de *splicing* alternativo muestran un patrón finamente regulado en función del tejido y del momento de desarrollo, lo que pone de manifiesto la importancia del correcto contexto biológico en estudios de este tipo (Takeuchi *et al.*, 2010; Calarco *et al.*, 2011). Con el fin de solventar las limitaciones de los ensayos de *splicing in vitro* en este trabajo combinamos por primera vez el uso de un espliceosensor con el rastreo *in vivo* de compuestos a gran escala, lo que constituye la principal ventaja de nuestro ensayo. Esto, permite la expresión del espliceosensor en el tejido específico en el que se lleva a cabo el *splicing* del transcrito en condiciones fisiológicas, lo que garantiza la presencia de los factores y cofactores de *splicing*



necesarios para llevar a cabo el *splicing* del modo más similar posible a lo que ocurre en humanos.

Además del rastreo de compuestos, el uso de espliceosensores puede tener otras aplicaciones *in vivo*, como la detección de determinadas isoformas en el tejido en el que se está llevando a cabo su *splicing* alternativo. En 2006 se utilizó un espliceosensor para desarrollar un ratón transgénico capaz de monitorizar cambios en el *splicing* del transcrito FGFR2 (Fibroblast Growth Receptor-2) *in vivo* (Bonano *et al.*, 2006), el cual recientemente se ha utilizado para estudiar la plasticidad epitelial *in vivo* (Somarelli *et al.*, 2013). Por otro lado, el grupo del profesor Kuroyanagi (Ohno *et al.*, 2012; Kuroyanagi, Watanabe, & Hagiwara, 2013; Kuroyanagi, Watanabe, Suzuki, *et al.*, 2013), estudia *espliceosensores* en *Caenorhabditis elegans* utilizando como reporteros uno o varios fluoróforos con el fin de identificar proteínas implicadas en la regulación del *splicing*.

En este trabajo decidimos generar *espliceosensores* a partir de minigenes ya descritos cuyo *splicing* alternativo hubiera sido previamente descrito y caracterizado. Además de los minigenes utilizados para generar *espliceosensores* (*INSR*, *cTNT*, *TnnT3*), en el momento de inicio de esta tesis existían otros minigenes disponibles relacionados con DM1: el minigen del *CLCN-1* y el de *MTMR1*. Del *CLCN-1*, el único minigen de *CLCN-1* al que pudimos tener acceso fue el minigen del intrón 2 (Charlet *et al.*, 2002). El patrón de *splicing* de este minigen es muy variable, observándose incluso alteraciones en individuos

sanos (Mankodi *et al.*, 2002), por lo que inicialmente lo descartamos para la generación de este tipo de *spliceosensores*. El patrón de *splicing* del gen *MTMR1* en DM1, que implica a los exones 2.1 y 2.2 era más complejo, pudiendo producirse la exclusión aberrante del exón 2.2 únicamente o conjuntamente con la exclusión del 2.2 (Ho *et al.*, 2005). Además, los ensayos llevados a cabo con el minigen *MTMR1* solo demostraba su dependencia de la proteína ETR-3 (idéntica en un 78% a CELF1) (Faustino & Cooper, 2005) para llevar a cabo su *splicing*, que por otro lado solo cambiaba de un 87% a un 60% de inclusión del exón 2.2 en este minigen, esta diferencia parecía *a priori* demasiado pequeña para poder llevar a cabo un rastreo de compuestos *in vivo* usando este minigen fusionado a un reportero. Así, debido a su mayor complejidad, estos dos minigenes se mantuvieron como segunda opción por si no obteníamos resultados positivos con los tres primeros. Por lo que se llevó a cabo la generación de moscas *spliceosensoras* utilizando tres minigenes previamente descritos: el minigen del receptor de la insulina (*INSR*), el minigen de la *troponina T cardiaca (cTNT)* y el minigen de la *troponina T del músculo esquelético rápido (TnnT3)*, los cuales habían sido estudiados en detalle en cultivo celular donde demostraron su dependencia de las repeticiones CTG (Ho *et al.*, 2005), de Muscleblind (Yuan *et al.*, 2007) o de CELF1 (Savkur *et al.*, 2001). Los minigenes contienen los intrones y exones necesarios para llevar a cabo el *splicing* del exón 11 (*INSR*), del exón 5 (*cTNT*) y del exón

fetal (*TnnT3*). El uso de estos exones se encuentra alterado en pacientes de DM1 donde se produce la exclusión del exón (*INSR*) o su inclusión (*cTNT* y *TnnT3*). La elección de estos transcritos, no ya por nosotros, sino por otros autores para generar los minigenes, se debe principalmente a la relevancia que puede tener para los pacientes la corrección de su *splicing*. La exclusión aberrante del exón 11 de la *INSR* da lugar a una mayor expresión de la isoforma *IR-A* frente a *IR-B* en el músculo, lo que explica la resistencia a la insulina observada en este tejido en los pacientes de DM1 (Santoro *et al.*, 2014). En el caso de los genes *cTNT* y *TnnT3* su implicación directa en los síntomas de la enfermedad no está tan clara, sin embargo, probablemente contribuyan a los fenotipos de arritmias cardiacas (*cTNT*) y degeneración muscular (*TnnT3*) observados en pacientes. Cabe destacar que el minigen de la *TnnT3* es un minigen de ratón, lo que podría en principio suponer una limitación a la hora de extrapolar los resultados obtenidos a humanos, sin embargo, se ha demostrado que este minigen se comporta en células humanas igual que lo hace el gen humano en pacientes, habiéndose demostrado además su dependencia de *muscleblind* de *Drosophila* (Vicente-Crespo *et al.*, 2008), aumentando las probabilidades de que un *spliceosensor* generado con este minigen funcione en *Drosophila*. Por último, estos minigenes habían sido estudiados en detalle en cultivo celular donde demostraron su dependencia de las repeticiones CTG (Ho *et al.*, 2005), de

Muscleblind (Yuan *et al.*, 2007) o de CELF1 (Savkur *et al.*, 2001).

Tal y como se describe en el apartado 7.2 de la Introducción al comienzo de este trabajo apenas existían precedentes del uso de *Drosophila melanogaster* en el rastreo de compuestos, siendo la mayoría de ellos a pequeña escala, llegando como máximo a analizar 1000 compuestos mensuales, mientras los rastreos *in vitro* a gran escala analizan al menos 10 veces más (Pandey & Nichols, 2011).

El rastreo de compuestos a gran escala ha sido muy utilizado para la identificación de nuevos fármacos en general (Tigabu *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2014) y de fármacos anti-DM1 en particular (O'Leary *et al.*, 2010) (Chen *et al.*, 2012). En el caso de DM1 los rastreos de compuestos, cualquiera que sea la escala, se han basado siempre en ensayos *in vitro* (Chen *et al.*, 2012) (O'Leary *et al.*, 2010) (Furuya *et al.*, 2005), lo que explica las limitaciones que encuentran en validaciones posteriores, principalmente en cuanto a su distribución y/o especificidad (Foff & Mahadevan, 2011). Los rastreos de compuestos *in vivo* evitan este tipo de limitaciones, ya que permiten obtener en un mismo ensayo información sobre la eficacia del compuesto al mismo tiempo que proporciona información sobre sus propiedades ADMET (Administración, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad). Sin embargo, el rendimiento de los ensayos clásicos utilizados para el rastreo de compuestos *in vivo*, capaces de analizar entre 15 y 30 compuestos diariamente (Pandey & Nichols,

2011), no puede compararse con el rendimiento de los ensayos *in vitro* capaces de analizar cientos de compuestos diariamente. En este trabajo hemos conseguido desarrollar una plataforma de cribado de compuestos a gran escala que permite el rastreo de 250 compuestos diariamente, multiplicando por 10 el rendimiento obtenido previamente en los rastreos *in vivo* tradicionales.

Uno de los puntos clave de la aproximación llevada a cabo para poder realizar el rastreo a gran escala fue el centrarnos en un rastreo bioquímico en lugar de un rastreo fenotípico. En los rastreos fenotípicos, que utilizan fenotipos como la capacidad de vuelo (Chambers *et al.*, 2013), la rugosidad del ojo (Aritakula & Ramasamy, 2008) o la semiletalidad (García-López *et al.*, 2008), los datos que se obtienen suelen ser datos cualitativos, los cuales son difíciles de tratar estadística y objetivamente, y/o estar sujetos a modificaciones debidas a factores inespecíficos que pueden afectar al fenotipo observado (ej. Daños físicos en las alas de las moscas pueden afectar a su capacidad de vuelo o la cantidad de factores que pueden afectar a la viabilidad de las moscas cuando la lectura final es la viabilidad). Por el contrario, la lectura final de un gen reportero permite una mayor objetividad y rendimiento frente a las lecturas fenotípicas, ya que en su mayoría estas últimas deben ser leídas manualmente por un experimentador y, aunque existen empresas capaces de robotizar las lecturas fenotípicas, todavía los programas y equipos utilizados para este tipo de lecturas son susceptibles de fallos y ambigüedades

(Tsai & Huang, 2012). Cabe destacar que, a pesar de ser una lectura bioquímica de un evento molecular crítico para la enfermedad, el hecho de realizarlo sobre una diana de la enfermedad localizada por debajo en la ruta de patogénesis junto con el hecho de realizarse en un organismo completo permite la identificación de moléculas con distintos mecanismos de acción. Así, en el ensayo puesto a punto podemos, no solo detectar compuestos como el identificado en este trabajo capaz de desestabilizar la horquilla de RNA, sino que también se pueden identificar compuestos con otros mecanismos de acción como por ejemplo aquellos que tengan otro tipo de efecto sobre el RNA (ej. degradando el RNA tóxico, alterando la formación de la horquilla, su estabilidad o su capacidad de unión a otras proteínas como por ejemplo Muscleblind), sobre los factores de *splicing* Muscleblind o CELF1 o sobre el *splicing* del receptor de la insulina en sí mismo. De este modo se pueden identificar compuestos con distintos mecanismos de acción, muchos de ellos quizás aún por comprender, lo que abre un abanico de nuevas posibilidades.

Al iniciar este trabajo, el primer problema con el que nos encontramos fue la elección del gen reportero. El gen reportero debería ser fácilmente cuantificable con datos objetivos e implicar poca manipulación experimental para evitar la introducción de errores. Preferiblemente el reportero debería provocar un fenotipo cuantificable al ser expresado en el músculo, tejido principalmente afectado en DM1 y en el que

ya se ha demostrado que la presencia de las repeticiones CTG altera el *splicing* de minigenes exógenos. Se analizaron 3 genes reporteros: la toxina Ricin A, la proteína verde fluorescente o GFP y la luciferasa de luciérnaga.

Ricin A es una toxina que produce muerte celular (Figura R4A), (Moffat *et al.*, 1992; Scuderi & Letsou, 2005). Sin embargo, a efectos de nuestro modelo de DM1 lo deseable era poder expresar la proteína Ricin A donde el único fenotipo a analizar era la viabilidad de las moscas, la cual puede verse afectada por muchos otros factores. Además al utilizar el fenotipo producido por la expresión de la toxina Ricin A podríamos identificar como falsos positivos aquellos compuestos supresores directos de la toxicidad de Ricin A, por lo que, dado que teníamos otros dos reporteros en estudio con resultados prometedores, decidimos descartar la Ricin A como reportero para el rastreo de compuestos a gran escala.

En *Drosophila* se había descrito el uso del gen reportero GFP (Green Fluorescence Protein) *in vivo* principalmente para el estudio genes endógenos y el análisis de su expresión durante el desarrollo embrionario (Lawton *et al.*, 2014). El uso del gen reportero luciferasa *in vivo* en *Drosophila* estaba mucho menos extendido que el de la GFP, basándose principalmente en el estudio del ciclo circadiano mediante la fusión del reportero al promotor del gen *period*, componente del reloj circadiano (Belvin *et al.*, 1999). Sin embargo, hasta la fecha de inicio de esta tesis no se había descrito el uso de estos genes reporteros para análisis cuantitativos *in vivo* en *Drosophila*. La adaptación

de los dos reporteros más utilizados a nivel cuantitativo (el gen *GFP* y el gen de la luciferasa de luciérnaga) a ensayos cuantitativos *in vivo* en *Drosophila* pasó por adaptar a este organismo las técnicas históricamente limitadas a ensayos celulares o *in vitro*, como son la lectura en placa de los niveles de fluorescencia o luminiscencia. Este tipo de aproximación, en el que los niveles de genes reporteros son cuantificados en organismos *in vivo* supone un novedoso enfoque, con solo otro grupo trabajando con esta aproximación (Markstein *et al.*, 2008).

Tanto la luciferasa como la GFP dieron resultados positivos siendo capaces de distinguir en la lectura final entre la presencia o ausencia del gen reportero al utilizar adultos homogenizados. Sin embargo, la luciferasa mostraba una menor variabilidad y una mayor ventana entre moscas que expresaban y moscas que no expresaban el gen reportero, por lo que fue el reportero seleccionado para la generación del minigen.

Cabe destacar que en los últimos años la mayoría de los ensayos realizados con luciferasa utilizan también la luciferasa de la renilla como control (Kang *et al.*, 2013). En nuestro caso, uso de una sola luciferasa podía provocar falsos positivos o negativos en función de los niveles de expresión proteica o del tamaño de las moscas, por lo que nos planteamos el uso de la luciferasa renilla como reportero de la expresión de la isoforma alternativa en cada espliceosensor, de modo que el resultado final a analizar fuera el ratio entre las dos luciferasa



que correspondería al ratio entre las dos isoformas (la que incluye y la que excluye el exón alternativo). De este modo, diferencias en la expresión proteica o en el tamaño de las moscas deberían afectar por igual a ambas luciferasas por lo que el ratio no se vería afectado. Sin embargo, la inclusión de otra luciferasa en el *espliceosensor* suponía un aumento del 70% en el coste del rastreo, por lo que decidimos no incluir esta segunda luciferasa y validar con más ensayos los compuestos positivos obtenidos del rastreo, lo que resultaba más económico.

Así generamos moscas *espliceosensoras* que expresaba la luciferasa cuando el patrón de *splicing* del minigen de la *INSR*, del *cTNT* o de la *TnnT3* era el correcto. Mientras que si el *splicing* de estos minigenes era aberrante como el que se da en pacientes de DM1, la pauta de lectura de la luciferasa estaría truncada y no se expresaría la luciferasa. El diseño del *espliceosensor* se realizó de este modo para realizar el rastreo de compuestos “en positivo”, es decir, buscando un aumento de los niveles de luciferasa, de este modo se evita la identificación como positivos de compuestos que pudieran disminuir la expresión de la luciferasa inespecíficamente (ej. si el diseño del rastreo fuera tal que se identificaran como positivos compuestos que disminuyeran los niveles de luciferasa, un compuesto que provocara letalidad sería identificado como positivo al disminuir los niveles de luciferasa por muerte de los individuos). Cabe destacar que el diseño del *espliceosensor* se podría haber realizado utilizando

otra luciferasa como control, bien como control de proteína total o como control de los niveles de la otra isoforma alternativa. Sin embargo, el análisis de otra luciferasa (normalmente se utiliza una luciferasa procedente de un organismo distinto: renilla) hubiera encarecido el coste del rastreo inicial en un 70%, por lo que decidimos descartar el uso de esta segunda luciferasa. A pesar de asumir un mayor número de falsos negativos, el hecho de disminuir el coste permite aumentar el número de compuestos ensayados, con lo que esperábamos compensar la pérdida de algunos posibles positivos. Por otro lado, los posibles falsos positivos serían descartados en los ensayos posteriores de validación de los compuestos.

Tras caracterizar las tres moscas *esplíceosensoras* generadas (*INSR:Luc*, *cTNT:Luc*, *TnnT3:Luc*), se seleccionaron las moscas *INSR:Luc* por su menor variabilidad, mayor ventana entre mosca DM1 y control y mayor rescate con MBNL1. Por último la validación del *esplíceosensor* *INSR:Luc* mostró diferencias entre el *splicing* observado en humanos y el esperado en estas moscas, probablemente debido a diferencias que pueden existir entre la maquinaria de *splicing* entre humanos y *Drosophila* (Mount *et al.*, 1992). Sin embargo, el resultado final de expresión o no de la luciferasa en función de la ausencia o presencia de repeticiones CTG continúa siendo el mismo, no habiendo modificado este cambio la pauta de lectura. Además, este nuevo suceso de *splicing* también depende de las repeticiones CTG y se revierte con la expresión de la proteína

Muscleblind humana. Cabe destacar que esta reversión debida a MBNL1 no es completa, es decir, los valores del espliceosensor en presencia de la proteína humana y las repeticiones CTG no alcanzan los valores del espliceosensor en ausencia de las repeticiones. Esto puede ser debido al hecho de que existan otras proteínas implicadas en el *splicing* de los espliceosensores, las cuales sigan estando alteradas por la expresión de las repeticiones CTG. Por ejemplo, en el caso del espliceosensor *cTNT*, se sabe que la proteína CELF1 está también implicada en el *splicing* de este transcrito (Ho *et al.*, 2005), el homólogo de CELF1 en *Drosophila* podría estar afectado por la expresión de las repeticiones CTG y seguir contribuyendo a la alteración del *splicing* observada en el espliceosensor *cTNT* a pesar de la presencia de la proteína MBNL1. Por otro lado, podría tratarse de un problema de dosis de MBNL1, quizás los niveles de expresión de MBNL1 conseguidos al cruzar las moscas espliceosensoras por moscas UAS-MBNL1 podría no ser suficiente para conseguir revertir totalmente el *splicing*.

Este rastreo es, hasta la fecha, el mayor rastreo de compuestos realizado *in vivo* y el único realizado en *Drosophila* utilizando un *espliceosensor*. Cabe destacar que, a pesar de haber sido diseñada para ser utilizada con el *espliceosensor* en DM1, la plataforma de rastreo de compuestos puesta a punto puede ser utilizada tanto con otros *splicings* alterados como con otras alteraciones que puedan leerse como cambios en los niveles del reportero luciferasa (ej. cambios en la

transcripción de un determinado gen fusionando la luciferasa a su promotor). Esta versatilidad permite su utilización en otras enfermedades con alteraciones en el *splicing* como progeria (Beard *et al.*, 2008), cáncer (Clower *et al.*, 2010), Distrofia Miotónica Tipo 2 (Udd *et al.*, 2011) o Alzheimer (Crowe *et al.*, 2009), en las que las alteraciones del *splicing* están bien caracterizadas y los aspectos claves de la enfermedad conservados en *Drosophila* (Pandey & Nichols, 2011).

## 5. Características de las quimiotecas.

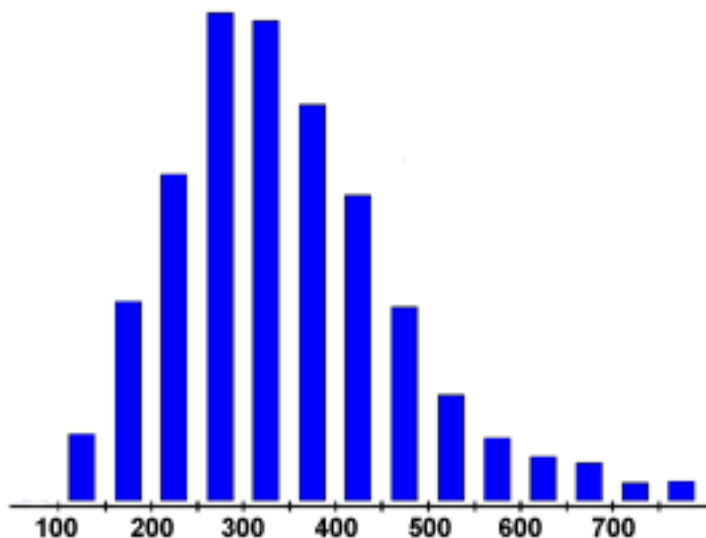
En este trabajo nos centramos principalmente en el rastreo de compuestos químicos, frente al de otras moléculas como RNAs interferentes o péptidos, ya que este tipo de moléculas permiten una mayor versatilidad al poder modificarse *a posteriori* su estructura química para conseguir una mayor efectividad, o mejores propiedades farmacológicas. Dado que el diseño de nuestro rastreo podía identificar compuestos con distintos mecanismos de acción, optamos por utilizar una elevada diversidad química con compuestos procedentes de distintas librerías químicas. Así, se analizó la capacidad anti-DM1 de compuestos de origen natural procedentes principalmente de organismos marinos, o compuestos derivados de la fermentación de hongos. Los compuestos de origen natural, son una fuente poco explotada de compuestos químicos que podrían tener actividad frente a algunas

enfermedades (Cautain *et al.*, 2014). Por otro lado utilizamos también quimiotecas de compuestos que se encuentran en el mercado o en alguna de las fases clínicas para otras indicaciones, estos compuestos se seleccionan en base a su alta diversidad química y farmacológica, así como su facilidad de obtención y perfil de toxicidad conocido en humanos. 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.

Finalmente también se utilizaron librerías que contenían extractos, lo que permite ensayar varios compuestos a la vez. En este caso, cualquier positivo implicaría un análisis en detalle para identificar el compuesto activo.

Por último, todos los compuestos ensayados tenían un peso molecular pequeño. 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).



**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](http://www.organic-chemistry.org)).

## 6. Identificación de la estefenantrina como fármaco anti cug.

Tras el cribado de 16,063 compuestos utilizando la plataforma de rastreo a gran escala puesta a punto en este trabajo, identificamos la estefenantrina como uno de los compuestos con actividad significativa en el ensayo *esplíceosensor* (hit).

Inicialmente, lo primero que queríamos confirmar era que los resultados observados no eran debidos a una acción inespecífica del compuesto alterando los niveles de expresión de las repeticiones o de alguno de los transgenes utilizados en el ensayo. Al analizar el efecto de la estefenantrina sobre cada uno de estos transgenes independientemente observamos que ni el UAS-CTC<sub>480</sub> ni el UAS-INSR:Luc se veía alterado por este compuesto, así los resultados observados son debidos a un efecto de la estefenantrina sobre el *splicing* del minigen del receptor de la insulina en presencia de repeticiones CTG.

Dada la naturaleza del ensayo, era posible que los compuestos identificados estuviesen ejerciendo su efecto de manera inespecífica, afectando a los niveles de (CUG)<sub>480</sub> 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 la estefenantrina no disminuyó la

actividad de la proteína reportera luciferasa expresada en la musculatura (*MHC-Gal4>UAS-Luc*), lo que descarta un efecto del compuesto sobre la transcripción total o específica del sistema UAS/Gal4. Además con este experimento también descartamos un posible efecto de la estefenantrina sobre la estabilidad o actividad de la luciferasa.

Por otro lado, el efecto de la estefenantrina podría deberse a un efecto sobre el *splicing* del minigen de la insulina independientemente de la presencia o no de las repeticiones. Este tipo de alteración podría ser directo si la molécula interfiriera con alguna de las proteínas implicadas en el *splicing* específico de este transcrito (ej. Muscleblind o CELF) o podría ser un efecto global sobre el *splicing* si afectara a alguno de los componentes del espliceosoma, aunque en este supuesto, sería de esperar que afectara a la viabilidad de las moscas lo cual en el caso de la estefenantrina no se observó. Cabe destacar que una de las pocas moléculas descritas con actividad anti-CUG, la pentamidina, presentaba este tipo de inespecificidad al analizar el *splicing* del transcrito *cTNT*. Células HeLa control que no expresaban las repeticiones CUG presentaban, al igual que las células que expresaban las repeticiones tóxicas, una disminución en la inclusión del exón 5 tras ser tratadas con pentamidina, siendo esta respuesta dependiente de dosis (Warf y col., 2009). Afortunadamente la estefenantrina no tiene este tipo de inespecificidad, ya que no se observaron cambios en el *splicing* del minigen de la insulina al expresarlo en moscas que no expresan las repeticiones CUG



(*MHC-Gal4>UAS:INSR:Luc* , *UAS-GFP*), en presencia de estefenantrina lo que indica un efecto dependiente de las repeticiones CTG.

Sin embargo, esto no descartaba una posible actividad de las moléculas sobre la estabilidad de los RNAs portadores de repeticiones. Por esta razón, decidimos detectar los transcritos (CUG)<sub>480</sub> amplificando, su amplificación mediante RT-PCR tampoco reveló cambios significativos en los niveles de expresión del transgén respecto al control con DMSO. En conjunto, estos resultados indican que la estefenantrina lleva a cabo su efecto sobre la toxicidad de (CTG)<sub>480</sub> actuando sobre dianas específicas, sin afectar a los niveles de transcritos CUG.

La estefenantrina es un alcaloide de origen natural aislada a partir de las plantas *Stephania tetrandra* (Menispermaceae) (Hu & Zhao, 1986), *Monocyclanthus vignei* (Annonaceae) (Achenbach *et al*, 1991) y *Dennettia tripetala* BAKER F. (Annonaceae) (Lopez-Martin *et al.*, 2002). Su actividad biológica conocida implica una potente inhibición de la acumulación leucocitaria inducida por la Angiotensina II (Ang-II) *in vivo*. A pesar de no haberse establecido todavía el mecanismo de acción específico para esta actividad anti-inflamatoria, sí que se conoce que este efecto está mediado por una acción antioxidante (reducción de las especies reactivas del oxígeno o ROS y bloqueo del receptor PAF (factor activador de plaquetas)), inhibiendo en neutrófilos humanos el aumento de los niveles intracelulares de calcio, anión superóxido y peróxido de hidrógeno provocados por la estimulación con

PAF (Estelles *et al.*, 2003). De manera muy interesante, las habilidades antioxidantes y de regulación del calcio intracelular de la estefenantrina sugieren que ambas podrían ser útiles en DM1 ya que existen diversos trabajos recientes que sugieren una alteración importante de estas rutas en pacientes de DM1 (Kosa *et al.*, 2014; Santoro *et al.*, 2014; Vallejo-Illarramendi *et al.*, 2014).

Cabe destacar también que, en un rastreo manual anterior utilizando las moscas modelo de DM1 y un fenotipo de letalidad producido por la expresión de las repeticiones en el cerebro de *Drosophila*, se identificaron como positivos otros compuestos, los fármacos ketoprofen e indomethacin, con propiedades antiinflamatorias (Garcia-Lopez *et al.*, 2008). Estos resultados apuntan a los compuestos con propiedades antiinflamatorias como una posible familia farmacológica activa en DM1. El análisis en profundidad de compuestos antiinflamatorios podría identificar nuevos fármacos anti-DM1. Inicialmente y teniendo en cuenta que la estefenantrina se identificó de una quimioteca de compuestos naturales en la que se disponía de información sobre la estructura de los compuestos, se observó que su estructura tridimensional adquiriría una disposición plana con capacidad para intercalarse entre los ácidos nucleicos. Teniendo en cuenta que uno de los mecanismos de acción potencialmente más relevante para la búsqueda de moléculas terapéuticas en DM1 incluiría unirse al RNA tóxico (Foff & Mahadevan. 2011), exploramos si la estefenantrina presentaba esta interesante

habilidad. Utilizando ensayos *in vitro* de retardo en gel demostramos que la estefenantrina es capaz de unirse a RNAs formados por las 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 de la estefenantrina en las células tiene como diana los RNAs tóxicos. Sin embargo, la unión de la estefenantrina a los RNA fluorescentes se detectaba a concentraciones de compuesto elevadas. Esto puede ser debido a la presencia de carboxifluoresceína en el extremo 5' del RNA, la cual podría dificultar la interacción del RNA con otras moléculas. Este tipo de interferencia del fluoróforo ya la propuso García-López para la unión del RNA a Muscleblind, así como al péptido anti-DM1 ABP1 (García-López, 2010).

## **7. La estefenantrina reduce fenotipos de DM1 en *Drosophila*.**

A pesar de la gran variabilidad sintomatológica que existe en los pacientes de DM1, una de las características presentes en todos los pacientes es la presencia de foci nucleares (Udd & Krahe, 2012). Este tipo de agregaciones nucleares son características de las enfermedades causadas por RNAs tóxicos (Caillet-Boudin *et al.*, 2014). En DM1, estos foci nucleares se reproducen en la mayoría de los modelos de la enfermedad, incluidos los fibroblastos derivados de pacientes (Larsen *et al.*,

2011) y en nuestras moscas modelo de expresión de CUG tóxico (García-López *et al.*, 2008). Si, como sugieren los datos *in vitro*, la estefenantrina es capaz de intercalarse en la horquilla de RNA, potencialmente podría ser capaz de interferir con la formación de estos agregados.

Los resultados observados, con una significativa reducción en el número de foci presentes en moscas modelo de DM1 tratadas con estefenantrina, avalan esta hipótesis, al igual que lo observado con otras moléculas testadas *in vivo* y con mecanismos de acción descritos muy similares (Leger *et al* 2013). Cabe destacar que existen datos contradictorios respecto a la patogenicidad de estos agregados nucleares, principalmente en ratón donde se observan fenotipos de DM1 en ausencia de foci (Mahadevan *et al.*, 2006) y en *Drosophila* donde a pesar de existir foci no se observan fenotipos patológicos (Houseley *et al.*, 2005). Estos datos han suscitado controversia en los últimos años (Mahadevan, 2012), sin embargo, la disminución observada tras el tratamiento con la estefenantrina indica una interacción de esta molécula con las proteínas y/o RNAs implicados en la formación y mantenimiento de los foci. Ho y colaboradores y Querido y colaboradores describieron el dinamismo de estos agregados nucleares (Ho *et al.*, 2005; Querido *et al.*, 2011), lo que probablemente explica las diferencias observadas en la toxicidad de los foci (Houseley *et al.*, 2005), en cualquier caso, estas agregaciones nucleares son un fenotipo característico de la enfermedad, por lo que actualmente siguen siendo muy

utilizadas para validar la acción de fármacos anti-DM1 (Wong *et al.*, 2014) e incluso para llevar a cabo rastreos de compuestos a gran escala (Ketley *et al.*, 2014).

Otra característica de los pacientes reproducida en las moscas modelo de DM1 es la reducción en la supervivencia de los individuos afectados con DM1 (Garcia-Lopez *et al.*, 2008). En *Drosophila*, el tratamiento con estefenantrina también mostró una importante mejoría en este fenotipo, llegando incluso a alcanzar niveles de supervivencia comparables a los de moscas sanas. En conjunto, la restitución significativa de dos fenotipos distintos (molecular y funcional), junto con el aumento de los niveles del *spliceosensor* en las moscas modelo de DM1 no solo valida el potencial terapéutico de la estefenantrina *in vivo*, sino que además sugiere que este potencial terapéutico es muy amplio, abarcando distintos aspectos de la enfermedad.

## **8. La estefenantrina rescata fenotipos de DM1 en líneas celulares derivadas de pacientes.**

Con el fin de validar el potencial terapéutico de la estefenantrina, estudiamos su efecto en células derivadas de pacientes de DM1. Para este estudio en un contexto humano decidimos utilizar fibroblastos y mioblastos derivados de pacientes de DM1. Cabe destacar que existen otros modelos celulares humanos de DM1, como las células HeLa (células tumorales de cáncer de cérvix) o las Hek (células embrionarias

de riñón). En estos casos, se suele transfectar con un transgen que exprese las repeticiones tóxicas con el fin de modelizar la enfermedad (Vicente-Crespo *et al.*, 2008; Childs-Disney *et al.*, 2013). Sin embargo, en nuestro caso, a pesar de suponer un mayor esfuerzo a nivel técnico, parecía más apropiado utilizar fibroblastos derivados de pacientes, éstos no están sujetos a la eficiencia de una transfección, ya que todas las células expresan las repeticiones tóxicas y no son células tumorales que han podido sufrir mutaciones en el genoma durante las sucesivas rondas de amplificación. Además en los fibroblastos, al ser derivados de pacientes de DM1, tenemos el contexto de la enfermedad al completo, lo que proporciona mayor relevancia terapéutica a la vez que contemplamos un mayor abanico de posibles mecanismos de acción de la estefenantrina. Dado que la estefenantrina fue capaz de disminuir los foci en nuestro modelo de *Drosophila*, era de esperar un efecto similar en los fibroblastos derivados de pacientes. El análisis de estos agregados nucleares en los fibroblastos tratados con estefenantrina, mostró una disminución significativa en el número de foci por célula así como un aumento en el número de células sin foci. Ambos parámetros indican una mejoría en los fibroblastos de pacientes gracias a la acción de la estefenantrina, lo que demuestra que este compuesto también es capaz de actuar en un contexto humano.

Como medida final del potencial terapéutico de la estefenantrina en un contexto humano, se evaluó también la capacidad de la estefenantrina para revertir alteraciones en el *splicing* de mioblastos transdiferenciados a partir de fibroblastos de pacientes. La estefenantrina fue capaz de mejorar el *splicing* alternativo del exón 5 del transcrito *cTNT* de un modo dependiente de dosis, validando así la acción anti-DM1 a nivel de *splicing* de la estefenantrina también en un contexto humano y demostrando su capacidad para restaurar distintos fenotipos moleculares descritos en pacientes.

Cabe destacar que la estefenantrina fue capaz de funcionar en células humanas, lo que descarta cualquier tipo de efecto específico de *Drosophila*. Tal y como esperábamos, obtuvimos compuestos capaces de funcionar en ambas especies, principalmente en humanos gracias al diseño inicial del experimento que planteaba un rastreo de compuestos interespecífico con un minigen humano expresado en *Drosophila*.

## **9. La estefenantrina reduce la miotonía en ratones modelo de DM1.**

Por último, con el fin de validar el potencial terapéutico de la estefenantrina en mamíferos utilizamos ratones HSA<sup>LR</sup> (Mankodi y col., 2000). Estos ratones expresan 250 repeticiones CTG en un transcrito heterólogo y reproducen varios de los principales síntomas musculares de DM1. No

obstante, este modelo no desarrolla otros fenotipos como la atrofia muscular. En los últimos años, cada vez más investigadores encuentran una gran variabilidad en los fenotipos bioquímicos descritos en este modelo, especialmente a nivel de *splicing* e histología del tejido muscular (comunicaciones orales en el congreso MDA's Scientific Conference (21-24 Abril, Washington, DC USA) y datos no mostrados). Sin embargo, la miotonía observada en los cuádriceps sí que se mantiene constante durante el desarrollo del ratón y no muestra variabilidad, por lo que decidimos utilizar este síntoma de DM1 para estudiar el efecto de la estefenantrina en mamíferos. El compuesto fue capaz de reducir la miotonía de los ratones modelo de un modo dependiente de dosis, lo que por un lado valida el potencial terapéutico de la estefenantrina al ser capaz de aliviar uno de los principales síntomas de la enfermedad y por otro, confirma la actividad de este compuesto en mamíferos, lo que junto con su actividad en *Drosophila* y células derivadas de pacientes, aumenta las posibilidades de que la estefenantrina sea activa también en humanos.

Dada la capacidad de la estefenantrina para unirse a los ácidos nucleicos, cabía la posibilidad de que la molécula resultara tóxica a partir de una cierta dosis. Sin embargo, las dosis estudiadas en mosca (hasta 100  $\mu$ M), ratón (hasta 75 mg/kg) o cultivo celular (hasta 100  $\mu$ M), no resultaron tóxicas. A bajas dosis de compuesto, esto es algo que cabía esperar



gracias al diseño del rastreo inicial *in vivo*, que excluía aquellos compuestos que resultaran tóxicos a las concentraciones ensayadas. Sin embargo, al aumentar las concentraciones ensayadas observamos que la estefenantrina tampoco resulta tóxica. Cabe destacar que las dosis máximas a ensayar, especialmente en ratones, vino delimitada por la solubilidad de la molécula en agua, ya que el DMSO, agente en el que se disuelve el compuesto en los ensayos, resulta tóxico, por lo que la estefenantrina debe administrarse disuelta en los porcentajes de DMSO máximo que admita cada organismo. Sin embargo, la solubilidad de la estefenantrina en agua es baja, por lo que al utilizar suero salino para la administración del compuesto disminuía considerablemente la concentración de compuesto a utilizar. En caso de necesitar aumentar la dosis para aumentar su eficacia, al tratarse de un compuesto químico, se pueden realizar modificaciones en la molécula que permitan aumentar su solubilidad en agua. Este tipo de propiedades farmacológicas, así como su farmacocinética y perfil de toxicidad en humanos son parámetros que deben determinar muy bien para definir el perfil completo de la estefenantrina como medicamento para su administración en humanos.

## **10. Potencial de la estefenantrina como molécula terapéutica.**

En este trabajo hemos identificado la estefenantrina mediante el rastreo de compuestos a gran escala en un modelo en mosca que reproduce los aspectos más relevantes de DM1 en humanos (García-Lopez *et al.*, 2008). La estefenantrina es capaz de suprimir fenotipos tanto en *Drosophila* como en ratones y líneas celulares derivadas de pacientes. Además actúa tanto a nivel molecular, revertiendo defectos en el *splicing* de transcritos como a nivel fenotípico reduciendo la miotonía, sin observarse efectos secundarios, inespecíficos o toxicidad a las dosis efectivas.

La estefenantrina se une a las repeticiones CUG *in vitro*, lo que probablemente explica la disminución observada en el número de foci nucleares tanto en *Drosophila* como en fibroblastos derivados de pacientes y la reversión de los fenotipos de DM1 observadas en los distintos modelos. El hecho de obtener resultados similares en distintas especies, incluidas células humanas, permite prever que probablemente este compuesto sea también efectivo en humanos. Además, existen otras enfermedades originadas por la expansión del mismo trinucleótido en otra región cromosómica como la enfermedad de Huntington tipo 2 (HL2) o la ataxia espinocerebelar tipo 8 (SCA8), o por expansiones de otras secuencias cuyos RNAs también adquieren conformaciones tóxicas como otras ataxias espinocerebelares (SCA1-17), la ataxia de Friedrich (FRDA), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la distrofia facioescapulohumeral (FSHD), el síndrome del X frágil (FRAX) u otras enfermedades relacionada con este

síndrome (FRAXE, FXTAS) en las que la estefenantrina podría tener actividad terapéutica.

En conjunto, en este trabajo proponemos la estefenantrina como una molécula 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 enfermedades en general y espliceopatías en particular.



***Conclusions***



Taken together, our results support the following main conclusions:

1. *Drosophila* is a good model of DM1 spliceopathy, since expression of toxic CUG repeats in its musculature leads to missplicing of several transcripts whose homologs in humans are also misspliced in DM1 patients. This spliceopathy modeled in *Drosophila* is human MBNL1-dependent, indicating a high level of conservation of this pathological pathway between human and *Drosophila*.
2. We have generated three different spliceosensor flies which the luciferase reporter coupled to a splicing event, allowing an automated and quantitative detection of splicing changes by measuring luciferase levels. All three spliceosensor flies are susceptible to genetic (by expression of human MBNL1) or chemical modification, being therefore suitable for a drug screening looking for compounds with anti-DM1 properties.
3. The usage of these spliceosensor flies in combination with latest advances in technological development have allowed the implementation of a high throughput *in vivo* screening platform which allows the analysis of 1000 compounds weekly and 2000 data points daily, being the *in vivo Drosophila*-based drug screening assay with the highest throughput published to date.
4. Stephenanthrine, a phenanthrine alkaloid, has been identified as able to suppress the CTG-induced toxicity using this spliceosensor drug screening assay.
5. The mechanism of action of stephanantrine is the binding to the CUG toxic RNA, as demonstrated by *in vitro* assays
6. Studies in culture cells derived from DM1 patients demonstrated the ability of Stephenanthrine to reduce foci and restore missplicing in a human context.

## *Conclusions*

7. Stephenanthrine was able to rescue a DM1 functional phenotype by reducing the myotonia observed in DM1 mice model mice.
8. Toxicity assays in culture cells and mice demonstrated a good therapeutic window since at the concentrations that stephenanthrine shows therapeutic activity no toxicity is detected yet.



## ***Material y Métodos***



## I. Experimentos *in vitro*

### 1. Materiales

#### 1.1. RNAs

Los RNAs fueron sintetizados por la empresa Metabion (www.metabion.com), con una escala de síntesis de 1  $\mu$ mol y purificados por HPLC. Los RNAs se resuspendieron en agua libre de RNasas y las alícuotas se conservaron a -80°C.

M1.1. RNAs utilizados en los ensayos <i>in vitro</i>		
Nombre	Secuencia 5'-3'	Experimento
FAM-CUG4	FAM- GCUG CUG UUCG CUG CUG	Retardo en gel
CUG4 sonda fría	GCUG CUG UUCG CUG CUG	Retardo en gel

### 2. Métodos

#### 2.1. Ensayos de unión de la estefenantrina a las repeticiones CUG.

Se calentó a 70°C durante 5 min una alícuota del RNA carboxifluoresceína (FAM)-CUG 4 diluido a 300 nM en tampón de unión (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 10 % glicerol) en un volumen final de 10  $\mu$ l, y se incubaron con estefenantrina o DMSO (control) a 37°C

durante 10 min. A las muestras se les añadió tampón de carga 5X (20% sacarosa, 100 mM Tris-Bórico (TB) pH 8, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% azul de bromofenol) y se dejaron enfriar en hielo tras lo cual se cargaron en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida al 8% sin EDTA (ver receta en apartado 2.3.2), sometidos previamente a una corriente de 100V durante 30 min. La electroforesis se llevó a cabo en TB 1X suplementado con 5 mM MgCl<sub>2</sub> y 50 µM ZnCl<sub>2</sub> con un pH de 8.5 a 4°C en cubetas Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad Laboratories) a 240 V durante aproximadamente 30 min. Las imágenes de los geles se tomaron con el escáner de fluorescencia Typhoon 9400 (GE Healthcare) utilizando los filtros de emisión 520 BP y 526 SP. La cuantificación de la intensidad de la banda libre de RNA se llevó a cabo usando el software Image J. El valor EC50 se calculó mediante un análisis de regresión no lineal.

## *2.2. Preparación de electroforesis.*

### *2.2.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.*

Para la separación y visualización de fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa a distintas concentraciones en función del tamaño de los fragmentos a resolver. La agarosa se preparó en tampón TBE 1X (Tris-borato EDTA). El mismo tampón se utilizó durante la electroforesis. Para resolver las muestras en el gel, éstas se prepararon en tampón de carga 5X: 500 µl de agua, 496 µl de tampón de bromofenol (glicerol al 50%, azul de bromofenol al 0.5% y 100 mM EDTA pH 8.0) y 4

μl de Gel red (Biotium). La visualización de los fragmentos se realizó con una lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda 312 nm.

2.2.2. *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 H<sub>2</sub>O

Las muestras se prepararon en tampón de carga (para 5X: 20% sacarosa, 100 mM Tris- Bórico pH 8, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% azul de bromofenol). Los geles se corrieron en tampón TB 0.5X suplementado con 5 mM MgCl<sub>2</sub> y 50 μM ZnCl<sub>2</sub> 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

## II. Experimentos en *Drosophila*

### 1. Materiales:

#### 1.1. Cepas de *Drosophila melanogaster*.

## Material y Métodos

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas de moscas. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 25°C en medio nutritivo estándar (ver receta en apartado 2.1) excepto cuando se especifique lo contrario.

### M1.1.1. Cepas de referencia

Genotipo	Procedencia
<i>OrR</i>	Bloomington Stock Center
<i>y<sup>1</sup>w<sup>1118</sup></i>	Bloomington Stock Center

### M1.1.2. Cepas balanceadoras

Genotipo	Procedencia
<i>w; TM3/TM6b</i>	Bloomington Stock Center
<i>lf/CyO, ftz-lacZ;</i> <i>MKRS/TM6b</i>	Bloomington Stock Center

### M1.1.3. Cepas mutantes

Genotipo	Procedencia
<i>w; mbl<sup>E27</sup>/CyO</i>	Dr. Mlodzik (Begemann <i>et al.</i> , 1997)

### M1.1.4. Líneas UAS

Genotipo	Procedencia
<i>yw; +; UAS-CTG 480</i> <i>1.1</i>	García-López et al. 2008
<i>yw; UAS-CTG 480 2.2</i>	Generadas en nuestro laboratorio
<i>w; UAS-MBNL1</i>	García-Casado et al., 2002
<i>w; UAS-GFP</i>	Bloomington Stock Center

<i>w; UAS-luciferasa</i>	Generadas por Valentia Biopharma
<i>w; UAS-Ricin A/CyO</i>	Dr. O’Kane (Moffat <i>et al.</i> , 1992)
<i>w; UAS-TnnT3</i>	Generadas en este trabajo
<i>w; UAS-TnnT3:Luc</i>	Generadas en este trabajo
<i>w; UAS-INSR:Luc</i>	Generadas en este trabajo
<i>w; UAS-cTNT:Luc</i>	Generadas en este trabajo
<i>w; UAS-Httex1Q93</i>	Dr.J Lawrence Marsh (Marsh J.L. <i>et al.</i> , 2000)
<i>UAS-MbIC</i>	Garcia-Casado <i>et al.</i> , 2002

#### **M1.1.5. Líneas Gal4**

<b>Genotipo</b>	<b>Procedencia</b>
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)
<i>MHC</i> -Gal4 (Cr.2)	Dr. G. Davis (University of California San Francisco, California, EEUU)
<i>MHC</i> -Gal4 (Cr.3)	Dr. Eric Olson (University of Texas Southwestern Medical Center, Texas, EEUU)
<i>Act88F</i> -Gal4	Dr. D.M.Standiford, University of Pennsylvania
1151-Gal4	Dr. J.C. Sparrow, University of York
24B-Gal4	Bloomington Stock Center

**M1.1.6. Stocks generados**

<b>Genotipo</b>	<b>Procedencia</b>
<i>MHC-Gal 4, UAS-CTG480/TM6b</i>	Generadas en este trabajo
<i>MHC-Gal 4; UAS-INSR:Luc</i>	Generadas en este trabajo
<i>MHC-Gal 4; UAS-TnnT3:Luc</i>	Generadas en este trabajo
<i>MHC-Gal 4; UAS-cTNT:Luc</i>	Generadas en este trabajo
<i>UAS-CTG 480, UAS-MBNL1</i>	Generadas en este trabajo
<i>UAS-CTG 480, UAS-Mbl C</i>	Generadas en este trabajo

*1.2. Cepas de Escherichia coli.*

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

*1.3. Cebadores II.*

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



**M1.3.1. Cebadores utilizados en las RT-PCRs  
semicuantitativas**

Gen	Cebador	Secuencia 5'-3'	Ta y ciclos	Tamaños esperados (pb)
<i>Rp49</i>	Rp49 F	ATGACCATCCGCCAGCA TAC	65, 25	130
	Rp49 R	ATGTGGCGGGTGCCTTG TTC	ciclos	
<i>TnT</i>	TnT F	CGACGATGAAGAGTACAC	55, 25	272
	TnT R	CTCTGGATCGCCCTCTCC	ciclos	
<i>CG30084</i>	CG3008 4 F	AGTGCCTCCACCATCTCAT C	65, 14 y	Transcrito E: 879
	CG3008 4 R	TCAACGAATCCAATGTCC TG	60,16 *	
	<i>Tubulina 84B</i>	Tubulin a F Tubulin a R	GTTTGTCAAGCCTCATAG CGGCAGATGTCGTAGATA G	
<i>CG31116 isoformas F y D</i>	FD3111 6 for	AAGAAAAGGGCGGAGACA AT	60, 29 ciclos	Transcrito F: 511 Transcrito D: 892
	FD3111 6 rev	TGGTGACATAGGCGTGGT TA		
	<i>CG31116 isoforma E</i>	E31116f or		
E31116r ev		ATCGGATACAGCCAAAT TC		
<i>CG31116 isoformas C y A</i>	CA3111 6 for	AACATGATCCTGCTGGGT TC	60, 29 ciclos	Transcrito C: 707 Transcrito A: 1088
	CA3111 6 rev	AGTATGGAGGTGCGTTCC AC		

## Material y Métodos

	BFhosfo	AACGGTCAAGCTCTTCTG		
<i>Fhos isoforma B</i>	r	GA	60, 29	726
	BFhosrev	TCACTGCTCGACTCCATG	ciclos	
	v	AC		
	AFhosfo	GTCATGGAGTCGAGCAGT		
<i>Fhos isoforma A</i>	r	GA	60, 29	839
	AFhosrev	TGTGATGCGGGTATCTAC	ciclos	
	v	GA		
<i>InR isoforma B</i>	BInRfor	CGTGAATGAAAAGTGCGA	60, 29	990
		AA		
	BInRrev	ACTTTTTGTCACTCCCCGT	ciclos	
		G		
<i>InR isoforma A</i>	AInRfor	TGTCCGGGTGTGTGAGTA	60, 29	760
		AA		
	AInRrev	CTTCTTTCCAGCTTGTGG	ciclos	
		C		
<i>InR isoforma C</i>	CInRfor	GCATGTGTTGGTGAGCGT	60, 29	661
		AT		
	CInRrev	TTTTTACCCGTCGTCTCCA	ciclos	
		C		
<i>InR isoforma D</i>	DInRfor	CGTTGTTGTTGCTGCTGT	60, 29	425
		TT		
	DInRrev	TTTCCCACGCTTGGATTT	ciclos	
		AC		
<i>Rya-r44F</i>	RyAr44F for	GGGCAAGTGGTACTTCGA	60, 29	921
		AT		
	RyAr44F rev	AAGGTTATGTTGCGGGTG	ciclos	
		AG		
<i>Ca-P60A isoformas HyF</i>	HFCaP60A for	TCTCATAAGCGGAGCGAT	60, 29	Transcrito H: 291
		TT		
	HFCaP60A rev	AAACAGGGCGAGAACAAA	ciclos	Transcrito F: 735
		TG		
<i>Ca-P60A isoforma G</i>	GCaP60A for	TTCAGCGTGAACAAGTCT	60, 29	982
		GG		
	GCaP60A rev	CAAGGGCAGCAGTAAGGA	ciclos	
		AG		
<i>Tau</i>	Tau for	GCACCAGCAAAAATCCAA	60, 29	869
		AT		
	Tau rev	CGGCTTATAGGTGGCATT	ciclos	
		GT		
<i>31999</i>	31999for	GCTCTGGCTTGGACTTTG	60, 29	1052
	r	TC		
	31999rev	TATAGCCTGTTCCGCAGC	ciclos	

	v	TT		
	Shotfor	TCCTTCGCAGCACTGTTA TG		Transcrito H: 845
<i>Shot</i>	Shotrev	CGTTTGCATCCCGGAG	60, 29 ciclos	Transcrito M:779 Transcrito G: 830
<i>Tropomio sina 1</i>	BJGTm1 for	GTTGAACATCACAATCCG TTCA		Transcrito B: 244
<i>isoformas B, J y G</i>	BJGTm1 rev	CGGTCTGGATCTTCTTCT GC	60, 29 ciclos	Transcrito J:239 Transcrito G: 498
<i>Tropomio sina 1</i>	HETm1 for	AGGACATTTGGCATCGTT TC		Transcrito H: 679
<i>isoformas H y E</i>	HETm1 rev	TGGACTTCTCCTTCGCCTT A	60, 29 ciclos	Transcrito E:181
<i>Mbl isoforma A</i>	AMblfor	GGCAACAAAACCCTATCT GA		Transcrito A: 911
	AMblrev	AGGCCAGGGAGATTTTC TA	60, 29 ciclos	
<i>Mbl isoforma B</i>	BMblfor	ATGCTCTCGGCTTTCACCT A		Transcrito B: 707
	BMblrev	TGGCAATGTGATGTGATG TG	60, 29 ciclos	
<i>Mbl isoforma C</i>	CMblfor	AGGTGCCAAGACAAAACC AC		Transcrito C: 990
	CMblrev	AGTGTTCATACTTTCCG GG	60, 29 ciclos	
<i>Mbl isoforma D</i>	DMblfor	CCCTACGTGCCAGTCTCAT T		Transcrito D: 956
	DMblrev	TCTGGTAGTGGTGACCCA CA	60, 29 ciclos	
<i>Mbl isoforma E</i>	EMblfor	CTGCCAGTTCAGGACTA GC		Transcrito E: 728
	EMblrev	TGTTTCTCTCCGTTTCGCT T	60, 29 ciclos	
<i>Mbl isoforma F</i>	FMblfor	CCGACAGATTAGAGTTAC TGGACA		Transcrito F: 951
	FMblrev	TCTGGTAGTGGTGACCCA CA	60, 29 ciclos	
<i>INSR:Luc</i>	<i>INSR:Luc</i> F	TGCTGCTCCTGTCCAAAG AC		Con exon alt: 227
	<i>INSR:Luc</i> R	GAAGTGTTGGGGAAAGCT G	56, 29 ciclos	Sin exon alt. 191

## Material y Métodos

\* Para amplificar el gen *CG30084* primero se llevaron a cabo 14 ciclos con un periodo de extensión a 98°C 15" y un periodo de hibridación a 65°C 15" seguidos de 16 ciclos consistentes en un periodo de extensión a 98°C 15", un periodo de hibridación a 60°C 15" y un periodo de extensión a 68°C 15". pb=pares de bases Ta=temperatura de annealing

### M1.3.2. Cebadores utilizados para secuenciar

Cebador	Secuencia 5'-3'	Tm
pJET D	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	64
pJET R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	64
pUAST D	CACCACAGAAGTAAGGTTCC	55
PUAST R	CTGCAACTACTGAAATCTGCC	55
Sec TnnT3 ppo 1 F	GGTGAAGCAGAAAGTCAGGCTGAGG	61
Sec TnnT3 ppo 2 F	AAGGGTAGGGTGAGCCCATCAG	60
Sec TnnT3 ppo 3 F	AGCTGCGGTCAATACCAGTCCCAA	62
Luc up R	CATCTTCCAGCGGATAGAATG	53
Sec ppo luc R	GATGTGACGAACGTGTACATC	53
Sec luc 1 R	GGAGAATAGGGTTGGCACCAGC	60
Sec luc 2 F	AAGTGCGCTGCTGGTGCCAA	62
Sec INSR 1 F	GTGGTGCGATTTTCAGCTCAC	56
Sec INSR 2 F	GAGATGGAGGCTACGATAAG	51
Sec INSR 3 F	AGAATTGCTGGAGCACAG	52

**M1.3.3 Cebadores utilizados en la PCR inversa**

Cebador	Secuencia 5'-3'	Aplicación
pwht1	GTAACGCTAATCACTCCGAACA GGTCACA	Amplificar el extremo 5' del transgén y aguas arriba
plac1	CACCCAAGGCTCTGCTCCCACAA T	
pry1	CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTT GAAT	Amplificar el extremo 3' del transgén y aguas abajo
pry4	CAATCATATCGCTGTCTCACTCA	
sepe1	GAACTCAGAATACTATTC	Secuenciar el amplificado de pry1 y pry4
sp1	ACAACCTTTCTCTCAACAA	Secuenciar el amplificado de pwht1 y plac1

**M1.3.4. Cebadores utilizados en la mutagénesis dirigida mediante PCR**

Cebador	Secuencia 5'-3'	Ta y ciclos	Modificación
clon luc F	AGCCACCCTCGAGGAAGA CGCCA	62, 39 ciclos	Elimina el ATG y añade el sitio de corte de <i>XhoI</i>
clon luc R	GGGGTACCTTACACGGCG ATCTTTCCGCCCTTCTTG G		
PPO	GGAATTCACCATGGGAG	59, 39 ciclos	Añade el sitio de corte de <i>EcoRI</i> y la secuencia Kozak
TnnT3 F	GAAGTCCAAGAAGGTAG GTG		
FIN	TGCGCTCGAGTTGGGTCT	ciclos	Añade el sitio de corte de <i>XhoI</i>
TnnT3 R	TGGTTTCTCCTCTGGTCA TG		

*Material y Métodos*

PPO cTNT	<u>GGAATTCACCATGG</u> CCGG		Añade el sitio de corte de <i>EcoRI</i> y la secuencia Kozak
F	TTCACAACCATCTAAAGC	58, 39	
		ciclos	
FIN cTNT	<u>CCCTCGAGGG</u> GCTACAAGA		Añade el sitio de corte de <i>XhoI</i>
R	TTGCTGGAGC		
	<u>GGAATTCACCATGG</u> GGG		Añade el sitio de corte de <i>EcoRI</i> , la secuencia Kozak y CC para mantener la pauta de lectura
PPO INSR	AATGCTGCTCCTGT <u>CCAA</u>		
F	AGACAGACTCTCAGATCC	65, 39	
	TCCGAAGGAGCTG	ciclos	
FIN INSR	<u>TTCTCGAG</u> CGTGGGCAC		Añade el sitio de corte de <i>XhoI</i>
R	GCTGGTCGAGGAAG		

**M1.3.5. Otros cebadores**

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Ta y ciclos</b>	<b>Experimento</b>
det CTG F	CTGCCGTCTTGTGGTATT TTC	63, 30	Confirmar la presencia del transgén UAS-(CTG) <sub>480</sub> en el genoma
det CTG R	ACACAACCTTTCTCTCA ACA	ciclos	
det MBNL1 F	GGTTTCACTGAAACATTT AACTACC	50, 30	Confirmar la presencia del transgén UAS-MBNL1 en el genoma
det MBNL1 R	AGCACACTGTCTTTCTCT CTTTAG	ciclos	
SV40 F	GGAAAGTCCTTGGGGTCT TC	60, 29	Determinar los niveles de transcripción del transgen (CTG) <sub>480</sub>
SV40 R	GGAAGTGAATGGGAG CA	ciclos	

*1.4. Quimiotecas.*

Nomenclatura	Tipo de colección	Número de compuestos
PCL	Compuestos de síntesis química con estructura conocida	1.200
MRK	Extractos naturales	2.160
GPH	Productos naturales puros con estructura conocida	560
SG	Extractos naturales	560
IUCT	Compuestos de síntesis química con estructura conocida	560
PEP	Librería combinatoria de hexapéptidos	120
BIOM	Productos y extractos naturales de origen marino	1.600
SPLK	Compuestos de síntesis química con estructura conocida	7.460
MRL	Productos naturales puros con estructura conocida	1.843

### 1.5. Kits

Luciferase Assay System (Promega)

High Pure Plasmid Isolation kit (Roche)

Genopure Plasmid Maxi Kit (Roche)

AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit (Axygen)

High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)

Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)

## 2. Métodos

2.1. Preparación de medio de cultivo utilizado para llevar a cabo el rastreo de compuestos.

En este caso se aplican un par de modificaciones a la preparación del medio nutritivo estándar (Ashburner, 1989): la concentración de agar fue del 0.75% y se añadieron todos los ingredientes salvo los antifúngicos. El medio se almacenó a 4°C hasta su utilización en el rastreo durante un periodo máximo de 2 semanas. En el momento de su utilización se calentó previamente hasta volver a disolver el agar, se dejó atemperar a 60°C y se le añadieron los antifúngicos. Durante el proceso de dispensación el medio fue mantenido en agitación en una placa calefactora a 60°C para evitar la polimerización del agar.

### *2.2. Análisis del splicing de transcritos por RT-PCR semicuantitativa.*

*2.2.1. Extracción de RNA total.* Se homogenizaron un total de hasta 50 moscas por genotipo y compuesto en 1 mL de TriReagent (Sigma). Los homogenados se dejaron 5 min a temperatura ambiente antes de añadir 200 µL 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 µL de isopropanol. Tras 10 min a temperatura ambiente se centrifugó de nuevo a 12000 g durante 10 min. El sobrenadante se eliminó y el pellet se lavó con 1 mL de etanol 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. La cantidad de RNA obtenido se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Eppendor BioPhotometer). Todos los RNAs se almacenaron a -80°C.

*2.2.2. Tratamiento con DNasa I y retrotranscripción.* El DNA genómico presente en las extracciones se eliminó mediante digestión de 2 µg del RNA con DNasa I (Fermentas), en un volumen de 10 µL (4 µL RNA 0.5 µg/µL, 1 µL tampón 10X, 1 µL DNasa I y 4 µL H<sub>2</sub>O). La digestión se llevó a cabo a 37°C durante 15 min. La DNasa I se inactivó por adición de 1 µL de EDTA 25 mM seguido de 10 min a 65°C. Como molde para la síntesis de cDNA se añadieron los 10 µL de la digestión con DNasa I al Mix 1 (1 µL dNTPs 10 mM, 1 µL hexámeros (Invitrogen)). Tras un primer paso de 5 min a 65°C para desnaturalizar el RNA, los tubos se colocaron inmediatamente en hielo y se añadieron 7 µL del Mix 2 (4 µL tampón 5X, 2 µL DTT 0.1 M, 1 µL Inhibidor RNasa (Invitrogen)) a cada uno. Por último, se añadió 1 µL del enzima retrotranscriptasa SuperScript™ II (2 U; Invitrogen). Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción, la mezcla se calentó a 25°C durante 10 min en un termociclador (mastercycler Eppendorf), seguido de 50 min a 42°C y 15 min a 70°C. Como controles se llevaron a cabo las mismas reacciones bien sin enzima RT en la mezcla de reacción o sin RNA molde. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C.

2.2.3. *Amplificación de los transcritos por PCR.* Tomamos 2  $\mu\text{L}$  de cDNA sintetizado en 2.2.2 (en el caso de la PCR del control de carga *Tubulina* cogimos 1  $\mu\text{L}$  y para el control de carga *Rp49* tomamos 1  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/100) y añadimos 5  $\mu\text{L}$  del tampón Flexi de la polimerasa Gotaq, 3  $\mu\text{L}$  de  $\text{Mg}^{+2}$ , 1  $\mu\text{L}$  del cebador directo (F) (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  del cebador reverso (R) (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM), 0.25  $\mu\text{L}$  de la polimerasa Gotaq y agua libre de DNAsas hasta un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de amplificación fueron: un paso previo de desnaturalización de 95°C durante 2 min, seguido de ciclos consistentes en desnaturalización a 95°C durante 30 s, hibridación durante 30 s a la temperatura de alineamiento indicada en el apartado 1.3.1 y amplificación a 72°C durante 1 min (el número de ciclos varía en función del transcrito, según la tabla 1.3.1). Por último se llevó a cabo una fase final de amplificación de 5 min a 72°C. Estas condiciones se aplicaron a todos los genes descritos en la tabla 1.3.1 salvo para el gen *CG30084*, para cuya amplificación utilizamos 0.5  $\mu\text{L}$  de la polimerasa LA Takara (Takara), 5  $\mu\text{L}$  del tampón 10X, 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{Mg}^{+2}$ , 1.75  $\mu\text{L}$  del cebador directo (F) (10  $\mu\text{M}$ ), 1.75  $\mu\text{L}$  del cebador reverso (R) (10  $\mu\text{M}$ ), 8  $\mu\text{L}$  de dNTPs (2.5 mM), y agua libre de DNAsas hasta un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de amplificación para este gen fueron las descritas en la tabla 1.3.1.

Los amplicones se resolvieron en geles de agarosa al 2%. La cuantificación de las bandas se llevó a cabo utilizando el

programa de análisis de imagen Image J. Las diferencias entre grupos se analizaron usando un test t-student de dos colas y  $\alpha=0.05$ .

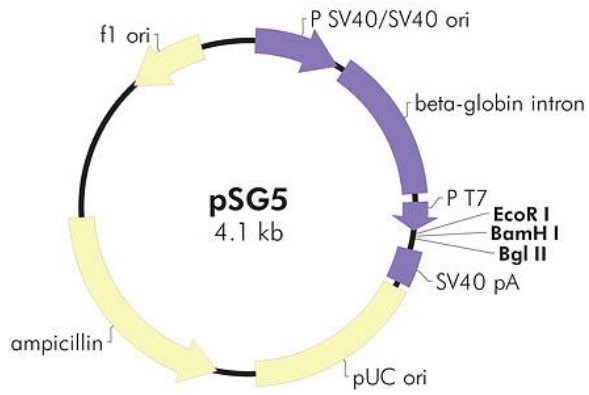
### 2.3. Generación de moscas UAS-TnnT3.

#### 2.3.1. Generación de la construcción pUAST-TnnT3.

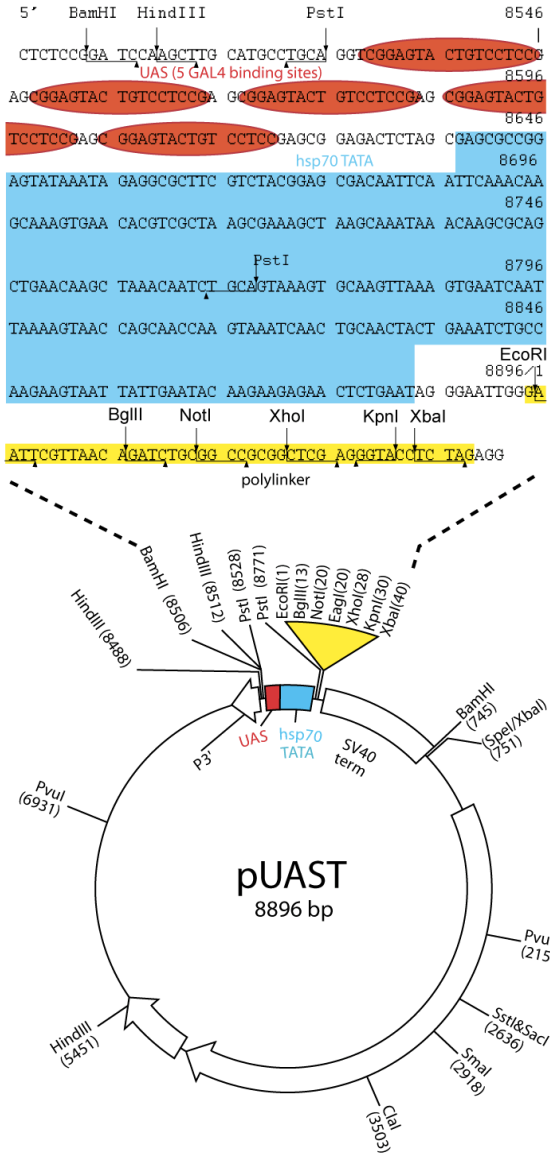
2.3.1.1. *Extracción del minigen TnnT3 del vector origen y apertura del vector destino.* El minigen *TnnT3* se obtuvo del laboratorio del Prof. Swanson (Dept. of Molecular Genetics and Microbiology, University of Florida, USA). Este minigen se encontraba en un vector de expresión de células de mamífero (pSG5) (Stratagene) (Figura M1a) y comprendía desde el nucleótido 6674 de la secuencia NC 000073.5 al 9511 de la misma secuencia. Esta secuencia se encuentra flanqueada por un sitio de corte del enzima de restricción *EcoRI* tanto en su extremo 5' como en su extremo 3'. Este sitio de restricción también está presente en el vector de transformación de la línea germinal de *Drosophila* pUAST (Figura M1b, Brand y Perrimon, 1993). Por lo que se utilizó para extraer el minigen *TnnT3* del vector pSG5 e introducirlo en el plásmido pUAST. Tanto el vector pSG5 conteniendo el minigen *TnnT3* (pSG5-*TnnT3*) como el vector pUAST vacío fueron digeridos durante 3 h con *EcoRI* siguiendo las recomendaciones del proveedor (Roche). En el caso del vector pUAST vacío, para evitar su recirculación se añadieron 2  $\mu$ L de fosfatasa alcalina

procedente del intestino de vaca (Roche) a la reacción. El minigen *TnnT3* fue separado del vector pSG5 en un gel de agarosa al 0.8%. La banda correspondiente al minigen *TnnT3* fue cortada y purificada con el kit AxyPrep™ DNA Gel Extraction (Axygen). Por otro lado se cargó 1 µL del vector pUAST digerido en un gel de agarosa al 0.8% para comprobar su completa digestión, utilizando el resto para purificarlo con el kit High Pure PCR Product Purification (Roche).

*2.3.1.2. Ligación del vector pUAST con el minigen TnnT3.* La ligación se llevó a cabo poniendo 50 ng del vector pUAST digerido, 1 µL del tampón de la ligasa 10X, 1 µL de ligasa T4 (Roche) y el minigen *TnnT3* digerido y purificado hasta un volumen final de 10 µL. Para cuantificar la cantidad de vector recircularizado, se realizó un control de ligación al que se le añadieron los mismos componentes salvo el minigen *TnnT3* que fue sustituido por agua. Estas mezclas se incubaron a 4°C hasta el día siguiente, momento en el que se llevó a cabo la transformación de células competentes (ver apartado 2.3.2.1)



Material y Métodos



**Figura M1. Vector pSG5 y vector pUAST.** Las imágenes muestran el esquema del vector pSG5 (a) y del vector pUAST (b). Ambos vectores contiene la secuencia terminadora del virus SV40 aguas abajo del MCS (sitio de clonación múltiple). El vector pUAST contiene además 5 sitios de unión a Gal4, así como la caja TATA de la hsp70 aguas arriba del MCS .

2.3.2. Clonación de la construcción pUAST-TnnT3.

*2.3.2.1 Generación de células competentes por el método del RbCl.* Se obtuvieron células competentes para su transformación por choque térmico a partir de células XL1Blue utilizando el método de RbCl (Sambrook, 2001)

*2.3.2.2 Transformación de células competentes por choque térmico.* Las células competentes obtenidas en el apartado anterior se transformaron con la construcción pUAST-*TnnT3* según métodos estándar y se sembraron en placas de LB agar (LB + 1.5% de agar) con ampicilina (50 µL/mL). Las placas se incubaron a 37°C hasta el día siguiente. Se transformaron también células con el control de ligación (ver apartado 2.3.1.2), en cuya placa deberían aparecer muchas menos colonias que en la placa sembrada con la ligación pUAST-*TnnT3*. Al día siguiente se seleccionaron 14 colonias que se sembraron en tubos con 5 mL de LB con ampicilina (50 µL/mL), donde se dejaron crecer toda la noche a 37°C en agitación. Posteriormente, estas células fueron lisadas y su DNA plasmídico extraído con el kit High Pure Plasmid Isolation de Roche. La correcta inserción del minigen se comprobó mediante digestión con enzimas de restricción y posterior secuenciación con los cebadores pUAST F y pUAST R que amplifican el MCS del vector pUAST.

*2.3.3. Microinyección y generación de stocks.* La construcción pUAST-*TnnT3* se amplificó en *E.coli* utilizando Genopure

Plasmid Maxi Kit (Roche) y se envió a la empresa BestGene (www.thebestgene.com) para su microinyección en embriones *yw* de *Drosophila*. De los 200 embriones microinyectados, BestGene generó 10 líneas de moscas transformantes. El vector pUAST lleva el minigen *white*, que da pigmentación de ojos rojiza, lo que permite seleccionar los individuos que han incorporado el transgén a su genoma (ojo rojo) de los que no (ojo blanco) al ser microinyectados en una cepa de ojos blancos (*w* o *yw*). Cada una de las 10 líneas se hizo homocigota mediante cruces entre hermanos de ojos anaranjados seleccionando ojos más rojos.

#### 2.3.4. Mapeo de los transgenes

**2.3.4.1. Mapeo genético.** Mediante cruces genéticos se localizó el cromosoma en el que se insertó el transgén del siguiente modo:

P	♀ <i>w</i> ; TM3 /TM6b	X	♂ ojos rojos ( <i>w+</i> )
F1	La inserción está en el cromosoma X si: ♀ ojos rojos		
			♂ ojos blancos
F1 X F1			
F2	La inserción no está en el cromosoma 3 (es decir, está en el 2) si: ♀ y ♂ ojos rojos y ebony		



La inserción está en el cromosoma 3 si: ♀ y ♂ ojos rojos no ebony

El cromosoma 4 de *Drosophila* es un cromosoma muy pequeño en el que se asume, en primera aproximación, que no se insertará el transgén.

2.3.4.2. *PCR inversa*. Para localizar la posición genómica exacta en la que se ha insertado el transgén se utilizó el protocolo de PCR inversa:

2.3.4.2.1. *Extracción de DNA genómico*. Se homogenizaron 30 moscas en 200 µl de Tampón A (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl y 0.5 % SDS) hasta que sólo hubiera cutículas. Los homogenizados se incubaron en un baño a 65 °C durante 30 min y se les añadió 800 µl de solución KAc/LiCl (1 parte de 5 M KAc y 2.5 partes de 6 M LiCl) incubándose en hielo 10 min. Posteriormente se llevó a cabo una centrifugación a 12000 g durante 15 min, adición de 600 µl de isopropanol al sobrenadante y otra centrifugación a 1200 g durante 10 min. El precipitado se lavó con etanol al 70 % y se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió en 400 µl de TE (pH 7.6-8) y el DNA se extrajo con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) en una segunda ronda de purificación. Finalmente el DNA se precipitó con etanol absoluto y 1/10 del volumen final de 3 M AcNa . El DNA fue resuspendido en 150 µl de agua

libre de RNasas y se comprobó su calidad y concentración en un gel de agarosa al 0.8 %.

*2.3.4.2.2. Fragmentación del DNA genómico.* El DNA genómico fue digerido con 2 enzimas de restricción de corte frecuente, *Sau3AI* y *HinP1*, en paralelo según el protocolo del fabricante (Fermentas) incubando durante 2.5 h a 37 °C. Posteriormente se inactivaron las enzimas siguiendo el protocolo del fabricante (Fermentas) y se comprobaron 10 µl de cada digestión en un gel de agarosa al 0.8%.

*2.3.4.2.3. Circularización.* El DNA genómico digerido se ligó en un volumen de reacción de 400 µl para favorecer la ligación intramolecular frente a la intermolecular. La ligación se incubó a 4 °C hasta el día siguiente en el que el DNA se precipitó con NaCl y etanol y se resuspendió en 40 µl de H<sub>2</sub>O libre de DNasas.

*2.3.4.2.4. Amplificación por PCR del fragmento genómico de interés.* Los cebadores utilizados en esta PCR permiten, o bien amplificar el DNA genómico situado aguas arriba de la inserción (*pwht1/plac*) o la secuencia genómica situada aguas abajo de la inserción (*pry4/pry1*). Se preparó la reacción de PCR inversa: 10 µl del DNA ligado, 1 µl de 10 mM dNTP, 1 µl del cebador directo a 10 µM, 10 µl del cebador reverso a 10 µM, 5 µL del tampón Flexi de la polimerasa Gotaq, 3 µL de Mg<sup>+2</sup>, 0.25 µl de polimerasa

Gotaq (2 U) y H<sub>2</sub>O libre de DNAsas hasta un volumen final de 50 µl.

Las condiciones para la amplificación fueron: un paso inicial de 95°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de hibridación a 60°C (para la pareja de cebadores pwht1/plac1) o a 55°C (para la pareja de cebadores pry4/pry1) y otro min de amplificación a 72°C y finalmente un periodo de elongación de 72°C durante 10 min.

Se comprobaron 5 µl de la PCR en un gel de agarosa al 1.5 % y se utilizó el kit AxyPrep™ DNA Gel Extraction (Axygen) para purificar el producto de PCR. El producto purificado se secuenció utilizando un cebador ubicado en el extremo del elemento P: sp1 para el producto de PCR de pry1/pry4 y sp1 para el producto de PCR de pwht1/plac1. La secuencia obtenida fue alineada contra el genoma completo de *Drosophila* utilizando el algoritmo blast de Flybase (<http://flybase.org/blast/>) para determinar el nucleótido exacto en el que se ha insertado el transgén.

#### 2.4. Análisis de reporteros en *Drosophila*

2.4.1. Estudio de la toxicidad de la proteína Ricin A. La toxina Ricin A provoca muerte celular, por lo que puede ser utilizada como reportero. Para ello se estudió su toxicidad al ser expresada en la musculatura de *Drosophila* con distintas líneas

Gal4: *Act88F*-Gal4, 1151-Gal4, *MHC*-Gal4 (crom.2) y 24B-Gal4. Este experimento se llevó a cabo a 2 temperaturas: 25°C y 21°C. Para el estudio a 25°C, se cruzaron moscas UAS-RicinA/*CyO* con moscas de cada una de estas líneas Gal4. Los parentales se eliminaron del tubo a la semana y se recogieron los adultos nacidos hasta transcurridos 17 días desde la puesta del cruce. A 21°C el cromosoma *CyO* no muestra fenotipo, por lo que para realizar el experimento a esta temperatura hubo que, mediante cruces genéticos, cambiar el cromosoma balanceador *CyO* por el *CyO*-GFP. La GFP sí que es observable a 21°C, por lo que para realizar el estudio a esta temperatura se utilizaron moscas UAS-Ricin A/*CyO*-GFP. Estas moscas se cruzaron con moscas de cada una de las líneas Gal4 de expresión en músculo. Los padres se eliminaron transcurrida una semana y se recogieron los adultos hasta pasados 17 días desde la puesta del cruce. Se analizó la capacidad de vuelo de la descendencia obtenida tanto a 25°C como a 21°C en las 24 h posteriores a la salida del adulto de la pupa. Esta capacidad fue analizada utilizando el ensayo de vuelo descrito previamente (Benzer et al., 1973). Las moscas fueron colocadas en un cilindro de 20 cm de alto y 5.5 cm de diámetro con un vial contenido en hielo en la base. Las moscas que cayeron directamente a la base fueron contabilizadas como moscas incapaces de volar. Las moscas capaces de mantenerse en las paredes del cilindro fueron contabilizadas como voladoras.

2.4.2. *Estudio de la cuantificación de GFP en Drosophila.* Para llevar a cabo la cuantificación de los niveles de GFP se utilizaron moscas *MHC-Gal4;UAS-GFP* de entre 0-5 días de edad, obtenidas al cruzar los stocks *UAS-GFP* y *MHC-Gal4* (Cr.2). Como control se usaron moscas *MHC-Gal4* (Cr.2) que no deberían dar fluorescencia. Se introdujeron por triplicado un número conocido de moscas (de 1 a 5) en pocillos de una placa negra (Nunc). Se probó, también por triplicado, a machacar un número conocido de moscas (de 1 a 5) en distintos volúmenes de PBS 1X (200-100  $\mu$ L) y transferir 50  $\mu$ L a una placa negra (Nunc) en la que se llevará a cabo la cuantificación de los niveles de GFP. Para la cuantificación se excitó cada uno de los pocillos con luz de 485 nm y se midió la emisión de fluorescencia a 535 nm utilizando el lector de placas 2104 Envision Multilabel Reader (Perkin Elmer). De cada pocillo se tomaron 6 medidas en distintos puntos y se obtuvo la media y la desviación estándar de cada pocillo. Mediante una prueba t de student comparamos los valores obtenidos en las 3 réplicas de moscas control (*MHC-Gal4*) con los valores obtenidos en las 3 réplicas de moscas problema (*MHC-Gal4; UAS-GFP*)

2.4.3. *Estudio de la cuantificación de la actividad de luciferasa en Drosophila.* Se homogenizaron 3 moscas en 150  $\mu$ L de tampón 1X del kit Luciferase Assay System (Promega). De cada homogenado se transfirieron 50  $\mu$ L a placas blancas de 96 pocillos (Nunc), donde se añadieron 10  $\mu$ L de reactivo de luciferasa por pocillo utilizando el dispensador del lector de

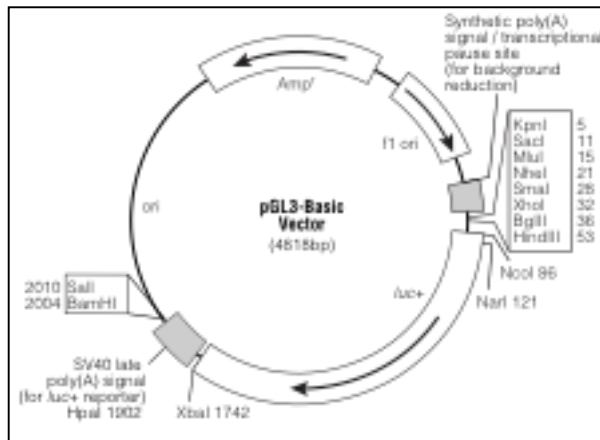
placas Envision Multilabel Reader (Perkin Elmer). Las medidas se llevaron a cabo utilizando este mismo lector de placas.

*2.5. Generación de las moscas espliceosensoras UAS-TnnT3:Luc, UAS-cTNT:Luc y UAS-INSR:Luc.*

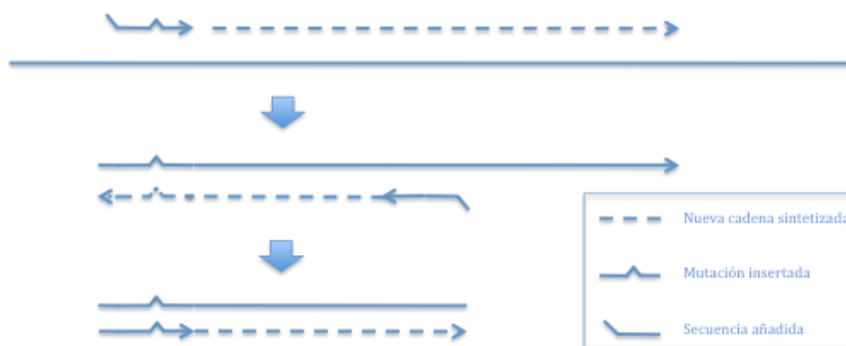
*2.5.1. Obtención de la luciferasa sin ATG en el vector pUAST.* Con el fin de generar una construcción en la que la pauta de lectura de la luciferasa dependa del *splicing* correcto del minigen, se eliminó el codón de inicio ATG de la luciferasa para impedir que ésta se traduzca independientemente del minigen.

*2.5.1.1 Mutagénesis dirigida mediante PCR de la luciferasa.* La luciferasa se obtuvo a partir del vector pGL3-Basic (Promega) (Figura M2), realizándole una serie de modificaciones: se eliminó su codón ATG y se flanqueó de sitios de restricción para facilitar su clonación. Para ello se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida mediante PCR (Figura M3) en la que se amplificó la luciferasa mediante una reacción de PCR en la cual el cebador directo (luc sin ATG F) alinea perfectamente con la secuencia 5' de la luciferasa menos con el codón ATG. De esta forma cada una de las copias generadas durante la PCR llevará la secuencia completa de la luciferasa pero sin el codón ATG. Además se añadió el sitio de corte de *XhoI* (CTCGAG) en el extremo 5' y el sitio de corte de *KpnI* (GGTAAC) en el extremo 3' mediante su incorporación en la secuencia del cebador directo y reverso, respectivamente. La PCR se llevó a cabo con

la polimerasa pfu (Fermentas), ya que esta polimerasa posee prueba de lectura evitando la introducción de mutaciones en la secuencia del DNA amplificado. Para la reacción se añadieron: 1  $\mu$ L del vector pGL3 (aprox. 50 ng), 5  $\mu$ L de tampón pfu 10X, 0.5  $\mu$ L dNTPs 25mM, 1  $\mu$ L del cebador clon luc F (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L del cebador clon luc R (10  $\mu$ M), 1.25  $\mu$ L de polimerasa pfu y agua libre de DNasas hasta un volumen final de 50  $\mu$ L. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización a 95° C durante 3 min, 39 ciclos consistentes en un paso de desnaturalización de 30 s a 95°C, un paso de alineación de 30 s a 62°C un paso de extensión de 1.5 min a 72°C y un último paso de extensión de 10 min a 72°C.



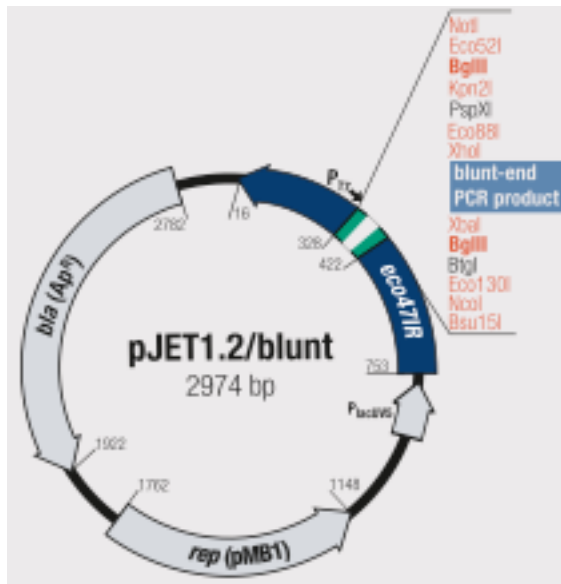
**Figura M2. Mapa del vector pGL3-Basic.** El vector contiene la secuencia codificante de la luciferasa (luc+) aguas abajo del sitio de clonación múltiple (MCS)



**Figura M3. Mutagénesis dirigida mediante PCR.** En esta estrategia de mutagénesis las mutaciones se insertan en el DNA al realizar una PCR sobre éste utilizando cebadores que contengan la mutación. Además se pueden añadir secuencias flanqueantes aguas arriba o abajo del DNA amplificado añadiéndolas en el extremo 5' del primer. Figura modificada de Higuchi *et al.*, 1988.

*2.5.1.2. Subclonación de la luciferasa sin codón de inicio en un vector lanzadera.* El producto de la PCR se ligó directamente en el vector de clonación pJET 1.2/Blent (Figura M4) siguiendo el protocolo de la casa comercial (Fermentas) y el producto de la ligación (pJET-luciferasa) se usó para transformar células competentes según el apartado 2.3.3.





**Figura M4. Mapa del vector pJET1.2/blunt.** Esquema del vector de subclonación pJET1.2/blunt mostrando su MCS en el que se encuentra el sitio de clonación de productos de PCR.

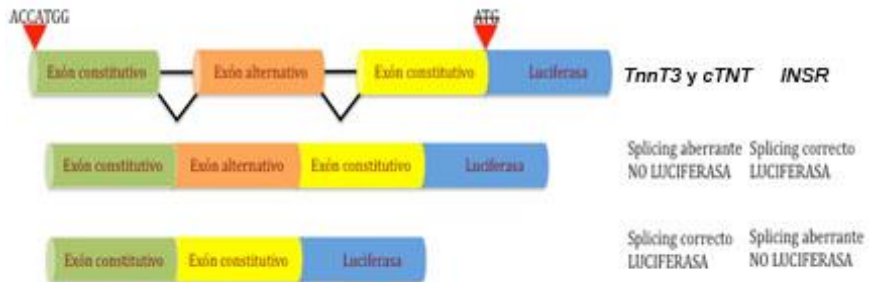
*2.5.1.3. Clonación del reportero luciferasa sin ATG en el vector pUAST.* Se confirmó mediante secuenciación tanto la eliminación del codón de inicio como la integridad de la ORF de la luciferasa. Tanto la construcción pJET-luciferasa como el vector pUAST se digirieron con los enzimas de restricción *XhoI* y *KpnI* según el protocolo de la casa comercial (Fermentas). De este modo se liberó la luciferasa del vector de subclonación pJET y se abrió el vector destino pUAST. Los productos de la digestión de pJET-luciferasa se separaron en gel de agarosa al 0.8%. La banda correspondiente a la luciferasa se cortó del gel y se purificó con AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit (Axygen). Por otro lado se corrió en gel de agarosa al 0.8% 1  $\mu$ L del vector pUAST digerido para comprobar su digestión (aparición

de una sola banda correspondiente a la conformación lineal del vector) .El resto del vector fue purificado con el Kit High Pure PCR Product Purification (Roche) y cuantificado corriéndolo en un gel de agarosa al 0.8% junto con un marcador de pesos moleculares de concentración conocida (marcador VII de Roche). La ligación y clonación de la construcción pUAST-luc se llevaron a cabo siguiendo los pasos descritos en los apartados 2.3.1.2 y 2.3.2.

2.5.2. *Obtención de los minigenes reporteros TnnT3:Luc, cTNT:Luc e INSR:Luc.*

*2.5.2.1 Mutagénesis dirigida mediante PCR de cada uno de los minigenes.* Cada uno de los minigenes fue mutado de modo que quedaran en pauta con la secuencia de la luciferasa si su *splicing* se daba correctamente, y rompieran la pauta de lectura de la luciferasa en caso de que el *splicing* del minigen fuera aberrante. Además, para aumentar los niveles de transcripción se añadió aguas arriba la secuencia Kozak (ACCATGG) que incluye el codón de inicio de la transcripción (ATG) rodeado de la combinación de nucleótidos más frecuentes en las secuencias que son traducidas en eucariotas (Kozak, 1987). Además, para facilitar su clonación, a cada minigen se le añadió la secuencia de corte del enzima *EcoRI* (GAATTC) en el extremo 5' y la secuencia de corte del enzima *XhoI* (CTCGAG) en el 3'. Por último se modificó la secuencia para conseguir que la pauta de lectura de la luciferasa fuese

correcta en el caso de que se diera el *splicing* normal (exclusión del exón alternativo en el caso del minigen *TnnT3* y *cTNT* e inclusión de este exón en el caso del minigen *INSR*) (Figura M5). Los minigenes se diseñaron de este modo con el fin de obtener un fenotipo de disminución de los niveles de luciferasa en las moscas modelo de DM1 cuyo *splicing* es aberrante debido a las repeticiones CTG. Gracias a este diseño el rastreo de compuestos se realiza buscando un aumento en los niveles de luciferasa. Este tipo de ensayos en los que se busca un aumento de la función y no una disminución del reportero analizado suelen tener menor número de falsos positivos. Para añadir los cambios a las secuencias originales de los minigenes se utilizó la misma técnica utilizada para mutar la luciferasa en el apartado 2.5.1.1 (mutagénesis dirigida mediante PCR).



**Figura M5.** Esquema del minigen fusionado a la luciferasa. El diseño de las construcciones minigen:luciferasa es tal que la pauta de lectura de la luciferasa sea la correcta al darse el *splicing* del minigen correctamente, mientras que si el *splicing* es aberrante (como ocurre en el caso de las moscas modelo de DM1) la pauta de lectura de la luciferasa no será la correcta y no se sintetizara proteína. En el caso de los minigenes *TnnT3* y

*cTNT* el *splicing* correcto corresponde a la exclusión del exón alternativo, mientras que en el caso del minigen *INSR* el *splicing* correcto consiste en la inclusión, por lo que será en estos casos en los que se produzca luciferasa, ya que su pauta de lectura será la correcta.

**2.5.2.1.1. Mutagénesis del minigen *TnnT3*.** El minigen *TnnT3* se obtuvo a partir de la construcción pSG5-*TnnT3* utilizada en el apartado 2.3.1. Con el fin de añadirle las mutaciones antes comentadas al minigen *TnnT3* se realizó una PCR con los cebadores PPO *TnnT3* F y FIN *TnnT3* R. El cebador PPO *TnnT3* F lleva la secuencia Kozak y la secuencia de corte del enzima *EcoRI*, junto con un nucleótido más aguas arriba para permitir su correcta digestión. El cebador FIN *TnnT3* R lleva la secuencia de corte del enzima *XhoI* junto con 4 nucleótidos aguas abajo para permitir su correcta digestión. Para llevar a cabo la PCR se utilizó la polimerasa pfu añadiendo: 1  $\mu\text{L}$  del vector pSG5-*TnnT3* (aprox. 50 ng), 2.5  $\mu\text{L}$  de tampón pfu 10X, 0.5  $\mu\text{L}$  dNTPs 25mM, 1  $\mu\text{L}$  del cebador PPO *TnnT3* F (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  del cebador FIN *TnnT3* R (10  $\mu\text{M}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  de polimerasa pfu y agua libre de DNAsas hasta un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . Las condiciones para la amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización a 95 $^{\circ}$ C durante 3 min, 39 ciclos consistentes en un paso de desnaturalización de 30 s a 95 $^{\circ}$ C, un paso de hibridación de 30 s a 59 $^{\circ}$ C un paso de extensión de 3 min a 72 $^{\circ}$ C y un último paso de extensión de 10 min a 72 $^{\circ}$ C.

2.5.2.1.2 *Mutagénesis del minigen cTNT*. El minigen de la *cTNT* (Ho *et al*, 2004) fue cedido por el Dr. Cooper (Baylor College of Medicine Houston, Texas). Para añadirle las mutaciones comentadas más arriba realizamos una PCR con los cebadores PPO *cTNT* F y FIN *cTNT* R. El primer PPO *cTNT* F introducirá en el minigen la secuencia de corte del enzima *EcoRI* en 5', junto con un nucleótido adicional en 5' para permitir su correcta digestión y la secuencia Kozak. El cebador FIN *cTNT* R lleva en su extremo 3' la secuencia de corte del enzima *XhoI* seguido de un par de nucleótidos para su correcta digestión. Para la reacción añadimos 1 µL del vector pSG5-*cTNT* (aprox. 50 ng), 2.5 µL de tampón pfu 10X, 0.5 µL dNTPs 25mM, 1 µL del cebador PPO *TnnT3* F (10 µM), 1 µL del cebador FIN *TnnT3* R (10 µM), 0.5 µL de polimerasa pfu y agua libre de DNAsas hasta un volumen final de 25 µL. Las condiciones para la amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización a 95° C durante 3 min, 39 ciclos consistentes en un paso de desnaturalización de 30 s a 95°C, un paso de hibridación de 30 s a 58°C un paso de extensión de 1.5 min a 72°C y un último paso de extensión de 10 min a 72°C.

2.5.2.1.3 *Mutagénesis del minigen INSR*. El minigen *INSR* (Kosaki *et al.*, 1998) fue gentilmente donado a nuestro laboratorio por el Dr. Webster (University of California, San Diego). Con el fin de introducir los cambios antes

mencionados amplificamos el minigen INSR con los cebadores PPO *INSR* F y FIN *INSR* R utilizando la polimerasa pfu. Para la PCR pusimos 1  $\mu$ L del vector pSG5-*INSR* (aprox. 50 ng), 2.5  $\mu$ L de tampón pfu 10X, 0.5  $\mu$ L dNTPs 25 mM, 1  $\mu$ L del cebador PPO *INSR* F (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L del cebador FIN *INSR* R (10  $\mu$ M), 0.5  $\mu$ L de polimerasa pfu y agua libre de DNAsas hasta un volumen final de 25  $\mu$ L. El cebador PPO *INSR* F lleva la secuencia de corte del enzima *Eco*RI, junto con un nucleótido en 5' para permitir su digestión, la secuencia Kozak y 2 citosinas para hacer coincidir la pauta de lectura de la luciferasa con el *splicing* correcto del minigen. El primer FIN *INSR* R lleva en 3' la secuencia de corte del enzima *Xho*I junto con 3 nucleótidos para su correcta digestión. Las condiciones para la amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización a 95° C durante 3 min, 39 ciclos consistentes en un paso de desnaturalización de 30 s a 95°C, un paso de hibridación de 30 s a 65°C un paso de extensión de 3 min a 72°C y un último paso de extensión de 10 min a 72°C.

*2.5.2.2. Subclonación de cada uno de los minigenes modificado en un vector intermedio.* Esto se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos en el apartado 2.5.1.2. La correcta pauta de cada uno de los minigenes se confirmó por secuenciación.

2.5.3. Clonación de los minigenes en el vector pUAST-luc. Para cada minigen, se digirió tanto la construcción pJET-minigen como el vector pUAST-luc con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* según protocolo de la casa comercial (Fermentas). De este modo el minigen queda liberado del vector de subclonación pJET y el vector destino pUAST-luc queda abierto. A partir de este punto se procedió igual que en el apartado 2.3.1.2 para generar cada una de las construcciones pUAST-minigen:luc.

2.5.4. Obtención de las moscas esspliceosensoras UAS-minigen:luc. Una vez obtenidas cada una de las construcciones pUAST-minigen:luc se comprobó por secuenciación la construcción completa utilizando los cebadores usados en el apartado 2.5.2.2 y se procedió como en el caso de la construcción pUAST-*TnnT3* sin mutagenizar (apartados 2.3.3 y 2.3.4) para conseguir las moscas UAS-minigen:luc y el mapeo de la inserción de cada uno de los transformantes obtenidos.

## 2.6. Rastreo de quimiotecas.

*2.6.1. Ensayo de toxicidad del DMSO.* Se prepararon diluciones seriadas del disolvente universal DMSO, y se dispensaron en placas de 96 pocillos conteniendo 250  $\mu$ L de medio nutritivo de rastreo (ver receta en el apartado 2.1) utilizando el multidispensador Biomek FX<sup>P</sup> (Beckman Coulter). Cada uno de los pocillos se sembró con 3 larvas L1 del genotipo UAS-*INSR:Luc.6/+; MHC-Gal4/UAS-(CTG)<sub>480</sub>* mediante un

dispensador de embriones COPAS (Union Biometrica). Las placas fueron incubadas a 25°C durante 2 semanas, periodo tras el cual se procedió a la congelación y posterior cuantificación del número de individuos nacidos. El porcentaje de individuos nacidos respecto a los sembrados se calculó a partir de 16 pocillos sembrados con la misma concentración. Cada experimento se repitió por triplicado.

*2.6.2. Preparación de las placas con compuestos.* Se dispensaron 5 µL de compuesto en placas de 96 pocillos conteniendo 250 µL de medio nutritivo para rastreo (ver receta en apartado 2.1) con el robot multidispensador Biomek FX<sup>P</sup> (Beckman Coulter). Se prepararon 6 placas réplica para cada una de las placas de las quimiotecas a ensayar, dejando la primera y la última fila de cada placa libre para dispensar el control (DMSO 0.25%). Cada uno de los pocillos se sembró con 3 larvas L1 de genotipo UAS-*INSR:Luc.6/+*; *MHC-Gal4/UAS-(CTG)<sub>480</sub>* mediante un dispensador de embriones COPAS (Union Biometrica). Diariamente se incorporó al menos una placa control en la que se dispensó DMSO 0.25% en los 96 pocillos los cuales fueron sembrados con 3 L1 del genotipo UAS-*INSR:Luc.6/+*; *MHC-Gal4/+*. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 2 semanas, periodo tras el cual se congelaron, manteniéndose a -20°C hasta el día de la lectura de datos (máximo 2 semanas).



2.6.3. *Cuantificación de individuos.* Las 6 réplicas de cada placa se combinaron en 3 uniendo las moscas obtenidas de 2 placas en una. Tras lo cual se cuantificó el número de moscas en cada pocillo mediante su escaneado con el Epson Expression 10000 XL escáner y su posterior recuento utilizando un software específico diseñado para la empresa Valentia Biopharma. Posteriormente se produjo la cuantificación de la actividad de luciferasa siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4.3.

2.6.4. *Análisis de datos.* Los datos de individuos por pocillo fueron cruzados con los datos de expresión de luciferasa utilizando el software antes mencionado. Se calculó el Z-factor para cada placa, descartándose aquellas en que el Z-factor fuera menor o igual a 0. Para cada pocillo obtuvimos los valores de Z-score (Figura M6), considerando positivos aquellos compuestos cuyo valor de Z-score fuera igual o superior a 3.

$$Z \text{ factor} = 1 - \frac{3 \sigma_{C+} + 3 \sigma_{C-}}{|\mu_{C+} - \mu_{C-}|}$$

$\sigma$  = desviación estándar  
 $\mu$  = media  
 $C+$  = control positivo  
 $C-$  = control negativo

$$Z\text{-score} = \frac{h_o - \mu_{ho}}{\sigma_{ho}}$$

$h_o$  = % recuperación  
 $\mu$  = media  
 $\sigma$  = desviación estándar

Z factor	Estructura del ensayo	Rastreo
1	Desviación estándar= 0 (no hay variación)	Ensayo ideal
$1 > Z \geq 0.5$	La diferencia entre controles positivos y negativos es grande	Ensayo excelente
$0.5 > Z > 0$	La diferencia entre controles positivos y negativos es pequeña	Ensayo doble
0	No existe diferencia, la variación de los controles positivos solapa con la variación de los controles negativos	Ensayo tipo Sí/No
< 0	No existe diferencia, la variación de los controles positivos solapa con la variación de los controles negativos	Rastreo imposible

**Figura M6. Z factor y Z score.** Fórmula para calcular los valores Z factor y Z score e interpretación de los valores del Z factor para rastreos de compuestos a gran escala. Figura modificada de Zhang *et al*, 1999.

### *2.7. Cuantificación de los niveles de transcritos (CUG)<sub>480</sub> mediante RT-PCR.*

Debido a la limitación de la PCR para amplificar secuencias repetitivas, la cuantificación de los niveles de transcritos (CUG)<sub>480</sub> se llevó a cabo mediante el amplificado de una región del terminador del virus SV40 presente en los transcritos, ya que para generar las moscas UAS-CTG480 se utilizó también el vector pUAST (García-López *et al.*, 2008 y Figura M1b).

*2.7.1. Obtención del cDNA.* Los cDNAs de moscas 103Y-Gal4; UAS-(CTG)<sub>480</sub> alimentadas con estefenantrina (12.5µM) o con DMSO (0.25%) se obtuvieron siguiendo los pasos de los apartados 2.2.1 y 2.2.2

*2.7.2. Amplificación por PCR de SV40.* El cDNA obtenido en el apartado 2.7.1. se usó como molde para la cuantificación de los niveles de expresión de (CUG)<sub>480</sub>. 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: 1 µL de cDNA, 0.5 µL de dNTPs (25 mM), 2 µL de tampón 10X, 0.5 µL de cebador SVR40 F(20 µM), 0.5 µL de cebador SV40 R (20 µM), 0.5 µL de

polimerasa Netzyme (NEED) y H<sub>2</sub>O libre de DNasas hasta un volumen de 25  $\mu$ L.

Las condiciones de amplificación fueron: un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguido de 29 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 60°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min, 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 *Tubulina* de *Drosophila*. En este caso se usó como molde 1  $\mu$ L de cDNA. La reacción de PCR se llevó a cabo de manera similar, con una temperatura de hibridación de 65°C y 25 ciclos de amplificación. Los amplificadores se resolvieron en geles de agarosa al 2%. La cuantificación de las bandas se llevó a cabo utilizando el programa de análisis de imagen Image J. Las diferencias entre grupos se analizaron usando un test t-student de dos colas y  $\alpha=0.05$ .

## *2.8. Detección de foci.*

*2.8.1. Preparación de la muestra.* Los tórax de las moscas a analizar se fijaron durante una noche en paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C, posteriormente se mantuvieron en una solución de sacarosa 30% en PBS durante 2 días. Transcurridos los 2 días, los tórax fueron embebidos en OCT, congelados en nitrógeno líquido y mantenidos a -80°C hasta su procesado, momento en el que se obtuvieron secciones transversales de 15  $\mu$ m con el criomicrotomo Leica CM 1510S.

2.8.2. *FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)*. Los portaobjetos con los cortes de tórax se lavaron tres veces con PBS 1X (cada lavado de 5 min) y se les añadió el buffer de acetilación fresco (580  $\mu$ L de trietanolamina y 125  $\mu$ L de acético anhidro en 50 mL de agua). Tras 10 min se lavaron tres veces (5 min cada lavado) con PBS 1X y se prehibridaron durante 30 min con solución de hibridación (10 mL formamida desionizada, 12  $\mu$ L de 5M NaCl, 400  $\mu$ L de 1M Tris-HCl pH=8, 20  $\mu$ L 0.5M EDTA pH=8, 2 g Dextrano sulfato, 400  $\mu$ L solución Denhart's 50X, 1 ml de esperma de arenque (10 mg/mL), H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 20 mL. Este tampón se conserva alicuotado a -80°C). La sonda marcada (Cy3-5'CAGCAGCAGCAGCAGCAGCA3'-Cy3, Sigma) tras calentarla a 65°C durante 5 min se añadió a los portaobjetos disuelta en tampón de hibridación (1/100) y se dejó hibridar a 37°C durante la noche en una cámara húmeda y oscura. Al día siguiente se lavó con SSC2X manteniendo las preparaciones a 32°C (2x15min) y 3x5 min lavados con PBS. Finalmente se montaron los portaobjetos con Vectastain y se tomaron fotografías utilizando un microscopio óptico Leica DM2500 con el objetivo de 40X. Se analizaron fotografías de al menos 3 campos distintos para cada individuo y se analizó un mínimo de 3 individuos por grupo. La cuantificación del número de foci por célula se llevó a cabo utilizando el programa de análisis de imagen Photoshop. Las diferencias entre grupos se analizaron usando un test t-student de dos colas y  $\alpha = 0.05$ .

## 2.9. Ensayo de longevidad.

Se colocaron 15 machos *MHC-Gal4>UAS-(CTG)<sub>480</sub>* recién nacidos en tubos conteniendo DMSO (0.25%) o estefenantina (50 $\mu$ M) disueltos en medio nutritivo de *Drosophila* (3 ml). Como control positivos se utilizaron 15 machos *MHC-Gal4>UAS-GFP* en tubos con DMSO (0.25%) y medio nutritivo (3 ml). Se realizaron 4 réplicas por compuesto, analizándose un total de 60 muestras por caso. Cada 2-3 días las moscas fueron transferidas a un tubo nuevo con comida recién preparada y se cuantificó el número de individuos muertos en cada cambio. Los resultados fueron representados mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier, en las que se representa el número de supervivientes en función del tiempo en días. Las curvas fueron comparadas utilizando el test de Kaplan-Meier con el programa Graphpad.

## III. Experimentos en cultivo celular

### 1. Materiales

#### 1.1. Líneas celulares empleadas.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron fibroblastos transdiferenciados en mioblastos con MyoD. Estos fibroblastos procedían de pacientes de DM1 o individuos sanos y fueron gentilmente donados por el Dr. López de Munain (Instituto Biodonostia, País Vasco)

Las distintas líneas utilizadas fueron:

<b>M1.1.1. Líneas celulares utilizadas</b>	
<b>Número identificativo</b>	<b>Número de repeticiones CTG*</b>
9.66	1000 repeticiones (DM1)
9.73	333 repeticiones (DM1)
9.88	<50 repeticiones (no DM1)

\* El número de repeticiones CTG en el gen *DMPK* fue determinado por southern blot a partir de muestras sanguíneas. (Dra. Amets Sáenz Peña).

Todas las líneas celulares fueron crecidas en medio de proliferación de fibroblastos: DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS), penicilina (50 IU/ml) y estreptomycin (50 µg/ml) (Invitrogen). Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador humidificado con CO<sub>2</sub> al 5%

### 1.2. Cebadores III.

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

<b>M1.2.1. Cebadores utilizados para los ensayos en cultivo celular</b>		
<b>Cebador</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Ta y ciclos</b>
<i>cTNT</i> F	GTCTCAGCCTCTGCTTCAGCATCC	55 y 27 ciclos
<i>cTNT</i> R	ATAGAAGAGGTGGTGAAGAGTAC	
<i>GAPDH</i> F	GTTACACCCATGACGAACAT	55 y 27 ciclos
<i>GAPDH</i> R	CATCTTCCAGGAGCGAGATC	

1.3. *Kits.*

CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay  
(Promega)

RNAGEM™ Tissue Plus kit (Zygem)

**2. Métodos**

2.1. *Ensayo de citotoxicidad.*

Las células fueron sembradas a una densidad de  $5 \cdot 10^3$  en placas de 96 pocillos de fondo plano, tras 24 h se añadieron diluciones seriadas del compuesto a ensayar en un volumen de 50  $\mu$ l. Tras 3 días se añadió el reactivo CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent (Promega) a las células siguiendo las instrucciones del fabricante. Transcurridas 2 h se midió la absorbancia a 490 nm con el lector de placas Envision (Perkin Elmer) y se calculó el IC<sub>50</sub> utilizando la media de cuatro réplicas. Cada ensayo se repitió por triplicado.

2.2. *Detección de foci.*

2.2.1. *Preparación de la muestra.* Se sembraron células en placas de 24 pocillos en los que previamente se había colocado un cubreobjetos. Se dejaron transcurrir 24 h para permitir que los fibroblastos se fijaran al cubreobjetos y se añadió el compuesto a ensayar. Se dejó actuar al compuesto durante otras 24 h tras las cuales se fijaron las células durante 15 min

con PFA 4% a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS 1X y se conservaron en EtOH 70% a 4°C hasta el momento de su procesado. En cada experimento se añadieron muestras de fibroblastos no afectados por DM1 y de fibroblastos afectados por DM1 tratados con DMSO a la misma concentración que lleva el compuesto.

*2.2.2. FISH (Fluorescence In Situ Hybridization).* Las células fueron rehidratadas con PBS 1X y prehibridadas durante 10 min a temperatura ambiente con el tampón de prehibridación (40% formamida, 2X SSC). La hibridación se realizó en cámara oscura a 37°C usando el tampón de hibridación (30% formamida, 2X SSC, 0.02% BSA, 1 mg/ml de tRNA de levadura (Sigma), 2 mM de sodio metavanadato, 1 mg/ml de DNA de esperma de arenque, 10% sulfato dextrano y 1 ng/ µl de la sonda de RNA (Cy3-5'CAGCAGCAGCAGCAGCAGCA3'-Cy3, Sigma). Tras la hibridación las células fueron lavadas con el tampón de prehibridación 2 x 15 min a 45°C y una vez con PBS 1X a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se montaron con la solución Vectashield con DAPI

*2.2.3. Análisis de datos.* El número de foci por núcleo se cuantificó en el microscopio óptico Leica DM2500 utilizando el objetivo de 63 aumentos. Se cuantificó el número de foci presentes en 3 campos distintos, en cada uno de los cuales contamos 25 células. El número de foci obtenido fue dividido



entre el número de células observadas y se analizó utilizando un test t-student de dos colas y  $\alpha=0.05$ .

### *2.3. Análisis del splicing de transcritos por RT-PCR semicuantitativa.*

*2.3.1. Administración del compuesto.* Las células se sembraron en placas petri de 60 mm, a una densidad de 125.000 cels/placa poniendo 3 ml de células en cada pocillo. Se dejaron transcurrir 24 h para permitir que los fibroblastos se fijaran y se cambió el medio de proliferación de fibroblastos (ver apartado 1.1) por el medio de diferenciación muscular (DMEM suplementado con 2% suero de caballo, penicilina (50 IU/ml), estreptomycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de apotransferrina, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de insulina y 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de doxiciclina). Transcurridas 24 h desde el cambio de medio, se añadió el compuesto a la concentración deseada. Se dejó actuar el compuesto durante otras 24 h, se lavaron las células con PBS 1X y se recogieron con un raspador.

*2.3.2. Extracción de RNA total.* A partir de las células recogidas en el apartado anterior, se extrajo el RNA con el kit RNAGEM™ Tissue Plus (Zygem) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 8  $\mu\text{l}$  del RNA obtenido como molde para la retrotranscripción siguiendo los pasos descritos en 2.2.2 de II.

**2.3.3. Amplificación de los transcritos por PCR.** Se utilizó 1  $\mu$ l del cDNA obtenido como molde para las PCRs de *cTNT* y GADPH junto con 10  $\mu$ l tampón Flexi gotaq, 3  $\mu$ l de  $Mg^{+2}$ , 1  $\mu$ l dNTPs 10 mM, 1  $\mu$ l cebador directo (*cTNT* F/GADPH F) (10 mM), 1  $\mu$ l cebador reverso (*cTNT* R/GADPH R) (10 mM), 0.25  $\mu$ l de la polimerasa gotaq y H<sub>2</sub>O libre de DNasas hasta un volumen final de 50  $\mu$ l. Las condiciones para la amplificación fueron un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 2 min, 27 ciclos constituidos por tres pasos (desnaturalización: 94°C 30 s, alineación: 55°C 60 s y elongación: 70°C 60 s) seguidos de un último ciclo de amplificación de 10 min a 72°C.

**2.3.4. Análisis de datos.** Los productos de las PCRs se separaron en un gel de agarosa al 2.5% (ver apartado 2.3.1 de I). La intensidad de las bandas se cuantificó con el programa Image J y se calculó el porcentaje de exclusión del exón 7 del gen *cTNT* normalizando con los valores del gen GADPH. Las diferencias entre grupos se analizaron usando un test t-student de dos colas y  $\alpha=0.05$ .

## **IV. Experimentos en ratones**

Todos los ensayos llevados a cabo durante esta tesis fueron aprobados por el comité de ética de experimentación animal de la Universidad de Valencia (2014/005/uveg/021).

### **1. Materiales**

1.1. Cepas.

Las siguientes cepas de ratón se utilizaron para llevar a cabo los experimentos de este trabajo.

M1.1.1. Cepas de ratón utilizadas		
Nombre	Descripción	Origen
FVB	Genotipo de referencia	Harlan (www.harlan.com)
HSA <sup>LR</sup>	Transgénicos que expresan 250 repeticiones CTG bajo el control del promotor de la <i>actina de músculo esquelético humano</i>	Dr. Thornton (University of Rochester, NY, EEUU) (Mankodi <i>et al</i> , 2000)

1.2. Cebadores IV.

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

M1.2.1. Cebadores utilizados para el genotipado de ratones		
Cebador	Secuencia 5'-3'	Ta y ciclos
HSA 23	AAACTTACATCTTCCCATGCTCC	
HSA 24	GAGACGCCCTCTGAGAAACAG	55, 25 ciclos
MSA 1	TCCTCAGGACGACAATCGAC	
MSA 2	CCTAAGGAGTTCACCCAGTCTG	58, 29 ciclos
HSA 10	TCCACCGCAAATGCTTCTAGACACAC	
HSA 18	GCAGGGGAGCATGGGAAGATGTAAG	60, 21 ciclos

### *1.3. Kits.*

DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

## **2. Métodos**

*2.1. Genotipado de los ratones HSA<sup>LR</sup>* Se genotiparon todos los ratones HSA<sup>LR</sup> durante las 3 primeras generaciones de la colonia utilizada en este trabajo. Posteriormente se realizaron genotipados puntuales de individuos elegidos al azar para confirmar la presencia de 250 repeticiones CTG en los individuos de la colonia.

*2.1.1. Obtención de DNA genómico.* En el momento del destete se recolectó 1 cm de cola de cada individuo a genotipar. Cada cola fue congelada y mantenida a -20°C hasta el momento de la extracción del DNA genómico con el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) según instrucciones del fabricante.

*2.1.2. HSA/MSA multiplex PCR.* Esta PCR permite amplificar tanto el gen de la actina murina (MSA) como el gen de la actina humana (HSA) portador de las repeticiones. Para ello se utilizaron 2 µl del DNA extraído en el apartado 2.1.1 (aprox. 100 ng) como molde de la PCR, junto con 10 µl del tampón Flexi gothaq, 5 µl Mg<sup>+2</sup>, 2.5 µl dNTPs (4 mM), 3.8 µl del cebador HSA 23 (4 µM), 3.8 µl del cebador HSA 24 (4 µM), 3.8 µl del cebador MSA 1 (4 µM), 3.8 µl del cebador MSA 2 (4 µM), 0.25

μl de la polimerasa gotaq y H<sub>2</sub>O libre de DNAsas hasta un volumen final de 50 μl. La amplificación se llevó a cabo mediante un ciclo de desnaturalización de 10 min, 25 ciclos de amplificación consistentes en un paso de desnaturalización de 30 s a 95°C, un paso de alineación de 30 s a 62°C y uno de elongación de 30 s a 72°C. Finalmente se realizó un último ciclo de elongación de 7 min a 72°C. El producto de esta PCR se corrió en un gel al 1.7% siguiendo las instrucciones del apartado 2.3.1 de I, en el que se separaron 2 bandas: una de ellas corresponde al amplificado de la actina murina (310 pb) y otra al amplificado de la actina humana (249 pb). Se consideraron heterocigotos para el transgén aquellos individuos en los que intensidad de la banda correspondiente a la actina humana era menor a la de la banda correspondiente a la actina murina y homocigotos aquellos en los que las dos intensidades fueran iguales o en los que la banda de la actina humana fuera más intensa. Como controles se añadieron rutinariamente a las PCRs: DNA humano, DNA de ratones no transgénicos y DNA de ratones homocigotos y heterocigotos.

*2.1.3. Comprobación del número de repeticiones CTG en los ratones HSA<sup>LR</sup>.* Con el fin de determinar que el número de repeticiones CTG es de 250 en los ratones HSA<sup>LR</sup> utilizados en este trabajo, se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de las repeticiones CTG. Para la reacción se añadieron: 2 μl del DNA extraído en el apartado 2.1.1 (aprox. 100 ng), 10 μl del tampón Flexi gotaq, 5 μl Mg<sup>+2</sup>, 2.5 μl dNTPs (4 mM), 3.8 μl del

## *Material y Métodos*

cebador HSA 10 (4  $\mu$ M), 3.8  $\mu$ l del cebador HSA 18 (4  $\mu$ M), 2.5  $\mu$ l de DMSO (10 mM), 0.25  $\mu$ l de la polimerasa gotaq y H<sub>2</sub>O libre de DNAsas hasta un volumen final de 50  $\mu$ l. El programa para la amplificación fue: 95°C durante 10 min, 21 ciclos consistentes en 30 s a 95°C, 30 s a 60°C, 2 min 22 s a 72°C y un último ciclo de 7 min a 72°C. El producto de la PCR esperado fue una única banda de 1192 pb correspondiente a 442 pb del amplificado de la actina humana junto con las 250 repeticiones CTG (750 pb). Se confirmó el tamaño del amplicón corriendo en un gel de agarosa al 0.8% el producto de la PCR (ver apartado 2.3.1 de I).

*2.2. Anestesia.* Todos los animales, de aproximadamente 20 g de peso, fueron sometidos a anestesia gaseosa con una mezcla de isoflurano y O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>O (40:60). Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical siendo anestesiados previamente.

*2.3. Inyección de compuestos.* La inyección fue llevada a cabo de manera intramuscular sobre el músculo cuádriceps de las patas posteriores derecha e izquierda en todos los animales, utilizando jeringas Hamilton de 1 ml e inyectando un volumen de 10  $\mu$ L

*2.4. Electromiografía (EMG).* El electromiograma fue realizado siempre manteniendo al animal anestesiado para poder mantenerlo inmovilizado. Las mediciones se realizaron con un

electrodo tipo aguja concéntrica de 30G utilizando el electromiógrafo TECA TD-20 MK II EMG/EP. Se realizaron 10 medidas en el cuádriceps de ambas patas en cada individuo. Las descargas miotónicas fueron clasificadas según la siguiente escala: 0, no miotonía; 1, descargas miotónicas ocasionales en menos del 50% de las inserciones; 2, descargas miotónicas ocasionales en más del 50% de las inserciones y 3, descargas miotónicas en prácticamente todas las inserciones.

*2.5. Medida de peso.* Todos los ratones, de aproximadamente 6 semanas de edad, fueron pesados el día en el que se llevó a cabo la inyección y el día del sacrificio previamente a ser anestesiados.

*2.6. Análisis de sangre.* Para llevar a cabo estos análisis realizamos un sangrado total por punción intracardiaca de los animales anestesiados. La sangre se colocó en tubos eppendorf no heparinizados y éstos se centrifugaron a 1000 g durante 10 min con el fin de precipitar las células. El plasma fue transferido a tubos nuevos y almacenado a 4°C hasta su recogida por el Laboratorio del Dr. Montoro Botella S.L., Valencia.

*2.7. Eutanasia.* Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical inmediatamente después de la punción intracardiaca sin dejarlos despertar de la anestesia. Se realizó

## *Material y Métodos*

una autopsia visual en la que se determinó la presencia o ausencia de daños macroscópicos en órganos y tejidos.



***Abstract***



## INTRODUCTION

Myotonic Dystrophy type 1 (DM1) is a systemic disorder characterized by myotonia, muscle wasting, cardiac alterations, cataracts and insulin resistance. DM1 is caused by the expansion of CTG repeats in the 3' untranslated region of DMPK gene. Mutant transcripts form CUG hairpins that sequester RNA-binding factors into nuclear foci, including Muscleblind-like 1 (MBNL1) and hnRNP H proteins, which regulate alternative splicing. DM1 cells also activate CELF1 protein, a transcription and splicing factor. MBNL1 and CELF1 proteins act antagonistically in exon selection in several transcripts, regulating the switch from a fetal to an adult splicing pattern, therefore sequestration of MBNL1 and increase of nuclear activity of CELF1 both act synergistically to missplice defined transcripts, which express their fetal isoforms in an adult stage. Although there are other molecular alterations which contribute to DM1 pathology, missplicing can explain some of the main symptoms of this disease: i.e. the missplicing of the insulin receptor *INSR* transcript observed in patients could explain their insulin resistance, similarly, the missplicing of the chloride channel *CICN-1* detected in DM1 could explain the myotonia present in this disease. No DM1 treatment has been found yet, being the only therapeutic intervention for patients targeted towards symptoms palliation. However, significant advances in understanding DM1 pathology have led to several translational approaches for treating DM1: targeting from the DNA expansion to restore the splicing alterations individually. Both in the advances in understanding DM1 pathogenesis and developing new possible therapies, model animals have been a valuable tool. DM1 has been modeled in *C.elegans*, *D.rario*,

*D.melanogaster* and *M.musculus*, all of them present advantages and disadvantages; broadly, more complex organism reproduce more accurately the human pathogenesis, while less complex organism allow more drug screening for a DM1 treatment. Previously on our lab, we have developed a DM1 fly model which reproduces several aspects of the disease including muscle wasting, nuclear foci and Muscleblind sequestration. This model was previously used to perform a drug screening using a semilethality phenotype. Although some positive compounds were identified using this screening, it showed some limitations including low throughput or the lethality readout with no defined improvement of a molecular defect associated with the disease, which limited the potential final relevance of the hits identified.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The main goal of this thesis was to perform a DM1 drug screening using this *Drosophila* model which allows a higher throughput and identifies molecules able to significantly improve a relevant phenotype directly linked to the human disease, such as splicing alterations. In order to achieve this main goal, we generated the first *Drosophila* spliceosensor model (transgenic flies in which the expression of human disease-linked splicing variants expressed from minigenes is coupled to the expression of a reporter) using three different minigenes (*INSR*, *cTNT* or *TnnT3*), whose splicing was previously described as altered in DM1 conditions, coupled with the luciferase reporter. In all cases, the spliceosensor construction was such that the presence of the CUG repeats decreased the levels of luciferase expression. These

spliceosensors flies were validated by determining that: (1) the luciferase levels of the spliceosensor decreased after CUG repeats expression, (2) the decrease observed in the luciferase levels was not due to an unspecific effect of the CTG over the luciferase itself, (3) the spliceosensor was sensible to CTG expression levels, (4) the spliceosensor change is specific of long CTG repeats. After validation, the *INSR* spliceosensor was selected as the best option to perform a drug screening which, after optimization, allowed reliable evaluation of 1200 compounds weekly, being the *Drosophila*-based drug screening with the highest throughput described to date. After screening of 16,063 compounds we identified Stephenanthrine as the best hit. Stephenanthrine was validated in different systems. First of all, the ability of Stephenanthrine to bind CUG repeats was demonstrated by a gel shift assay *in vitro*. Next, the specific effect of the Stephenanthrine over the spliceosensor was confirmed in *Drosophila* by discarding the possibility of an effect of this compound over the luciferase itself, the CUG repeats or the UAS/Gal4 system used to drive the expression of the spliceosensor and the CUG repeats to the desired tissue (muscle). In this organism (*Drosophila melanogaster*), Stephenanthrine was also able to decrease foci formation and to increase a short-longevity phenotype due to CUG expression. Further, we tested the activity of Stephenanthrine in a human background by analyzing foci formation and splicing defects, concluding that Stephenanthrine retains its anti-DM1 activity in a human background since it is able to decrease foci formation and rescue missplicing of *cTNT* transcripts in DM1 patient derived cells. Finally, intramuscular injections of Stephenanthrine in DM1 mouse models revealed the

*Abstract*

ability of this compound to reduce myotonia, a main symptom of DM1, *in vivo*. Notably, Stephenanthrine showed no toxicity at any of the dose used for intramuscular injection, indicating a good therapeutic window at least in mice.

All together, we have developed the first high throughput *in vivo* screening based on *Drosophila* which lead to the identification of Stephenanthrine ability to suppress CTG toxicity *in vivo*, opening a new field of study in DM1 therapeutics and providing a new approach in the identification and characterization of new molecules against diseases in general and spliceopathies in particular.

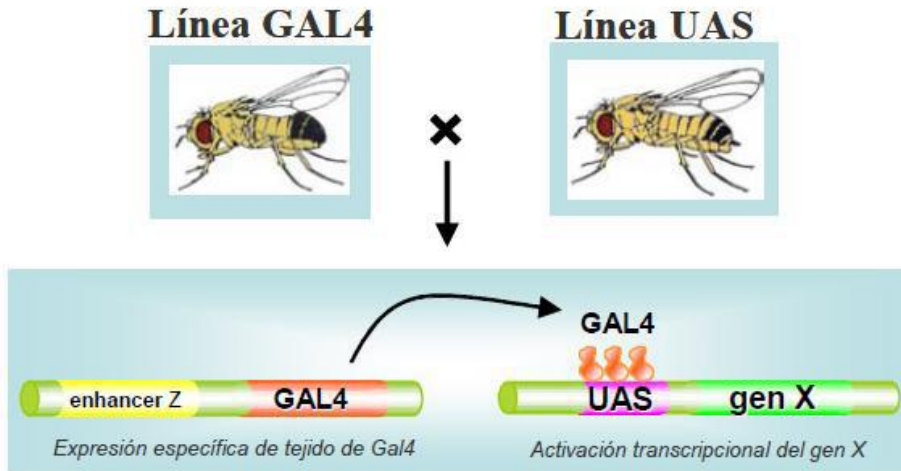
**Anexo**





**ANEXO I**

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.

## ***Bibliografía***



**BIBLIOGRAFÍA**

- Abrahamsson, A. E., Geron, I., Gotlib, J., Dao, K. H., Barroga, C. F., Newton, I. G., *et al.* (2009) Glycogen synthase kinase 3beta missplicing contributes to leukemia stem cell generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 3925-3929.
- 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.
- 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.
- Anhezini, L., Saita, A. P., Costa, M. S., Ramos, R. G. & Simon, C. R. (2012) Fhos encodes a *Drosophila* Formin-like protein participating in autophagic programmed cell death. *Genesis*, **50**, 672-684.
- Antonini, G., Soccia, F., Giubilei, F., De Carolis, A., Gagnani, F., Morino, S., *et al.* (2006) Health-related quality of life in myotonic dystrophy type 1 and its relationship with cognitive and emotional functioning. *J Rehabil Med*, **38**, 181-185.
- Aritakula, A. & Ramasamy, A. (2008) *Drosophila*-based in vivo assay for the validation of inhibitors of the epidermal growth factor receptor/Ras pathway. *J Biosci*, **33**, 731-742.
- 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.
- Auweter, S. D., Fasan, R., Reymond, L., Underwood, J. G., Black, D. L., Pitsch, S., *et al.* (2006) Molecular basis of RNA recognition by the human alternative splicing factor Fox-1. *EMBO J*, **25**, 163-173.

- Beard, G. S., Bridger, J. M., Kill, I. R. & Tree, D. R. (2008) Towards a *Drosophila* model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Biochem Soc Trans*, **36**, 1389-1392.
- 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.
- Belvin, M. P., Zhou, H. & Yin, J. C. (1999) The *Drosophila* dCREB2 gene affects the circadian clock. *Neuron*, **22**, 777-787.
- Bellini, M., Biagi, S., Stasi, C., Costa, F., Mumolo, M. G., Ricchiuti, A., *et al.* (2006) Gastrointestinal manifestations in myotonic muscular dystrophy. *World J Gastroenterol*, **12**, 1821-1828.
- Benna, C., Peron, S., Rizzo, G., Faulkner, G., Megighian, A., Perini, G., *et al.* (2009) Post-transcriptional silencing of the *Drosophila* homolog of human ZASP: a molecular and functional analysis. *Cell Tissue Res*, **337**, 463-476.
- Benoist, P., Mas, J. A., Marco, R. & Cervera, M. (1998) Differential muscle-type expression of the *Drosophila* troponin T gene. A 3-base pair microexon is involved in visceral and adult hypodermic muscle specification. *J Biol Chem*, **273**, 7538-7546.
- Benzer, S. (1973) Genetic dissection of behavior. *Sci Am*, **229**(6), 24-37
- Bird, T. D. (1993) Myotonic Dystrophy Type 1. In *GeneReviews(R)* (ed. by R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, T. D. Bird, C. R. Dolan, C. T. Fong, R. J. H. Smith & K. Stephens), Seattle (WA).
- Bonano, V. I., Oltean, S., Brazas, R. M. & Garcia-Blanco, M. A. (2006) Imaging the alternative silencing of FGFR2 exon IIIb in vivo. *RNA*, **12**, 2073-2079.
- 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.
- Braida, C., Stefanatos, R. K., Adam, B., Mahajan, N., Smeets, H. J., Niel, F., *et al.* (2010) Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum Mol Genet*, **19**, 1399-1412.
- Brand, A. H., Manoukian, A. S. & Perrimon, N. (1994) Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol*, **44**, 635-654.

- 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*, **69**, 385.
- Bugiardini, E., Meola, G. & Group, D.-C. (2014) Consensus on cerebral involvement in myotonic dystrophy: workshop report: May 24-27, 2013, Ferrere (AT), Italy. *Neuromuscul Disord*, **24**, 445-452.
- 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.
- Bungener, C., Jouvent, R. & Delaporte, C. (1998) Psychopathological and emotional deficits in myotonic dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **65**, 353-356.
- Caillet-Boudin, M. L., Fernandez-Gomez, F. J., Tran, H., Dhaenens, C. M., Buee, L. & Sergeant, N. (2014) Brain pathology in myotonic dystrophy: when tauopathy meets spliceopathy and RNAopathy. *Front Mol Neurosci*, **6**, 57.
- Calarco, J. A., Zhen, M. & Blencowe, B. J. (2011) Networking in a global world: establishing functional connections between neural splicing regulators and their target transcripts. *RNA*, **17**, 775-791.
- Cardani, R., Mancinelli, E., Saino, G., Bonavina, L. & Meola, G. (2008) A putative role of ribonuclear inclusions and MBNL1 in the impairment of gallbladder smooth muscle contractility with cholelithiasis in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord*, **18**, 641-645.
- Cautain, B., de Pedro, N., Murillo Garzon, V., Munoz de Escalona, M., Gonzalez Menendez, V., Tormo, J. R., *et al.* (2014) High-content screening of natural products reveals novel nuclear export inhibitors. *J Biomol Screen*, **19**, 57-65.
- Crowe, A., Huang, W., Ballatore, C., Johnson, R. L., Hogan, A. M., Huang, R., *et al.* (2009) Identification of aminothienopyridazine inhibitors of tau assembly by quantitative high-throughput screening. *Biochemistry*, **48**, 7732-7745.
- Chambers, R. P., Call, G. B., Meyer, D., Smith, J., Techau, J. A., Pearman, K., *et al.* (2013) Nicotine increases lifespan and rescues olfactory

- and motor deficits in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, **253**, 95-102.
- 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.
- Chaudhuri, T., Mukherjee, M., Sachdev, S., Randall, J. D. & Sarkar, S. (2005) Role of the fetal and alpha/beta exons in the function of fast skeletal troponin T isoforms: correlation with altered Ca<sup>2+</sup> regulation associated with development. *J Mol Biol*, **352**, 58-71.
- Chen, C. Z., Sobczak, K., Hoskins, J., Southall, N., Marugan, J. J., Zheng, W., *et al.* (2012) Two high-throughput screening assays for aberrant RNA-protein interactions in myotonic dystrophy type 1. *Anal Bioanal Chem*, **402**, 1889-1898.
- 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.
- Childs-Disney, J. L., Hoskins, J., Rzuczek, S. G., Thornton, C. A. & Disney, M. D. (2012) Rationally designed small molecules targeting the RNA that causes myotonic dystrophy type 1 are potently bioactive. *ACS Chem Biol*, **7**, 856-862.
- Childs-Disney, J. L., Parkesh, R., Nakamori, M., Thornton, C. A. & Disney, M. D. (2012) Rational design of bioactive, modularly assembled aminoglycosides targeting the RNA that causes myotonic dystrophy type 1. *ACS Chem Biol*, **7**, 1984-1993.
- Childs-Disney, J. L., Stepniak-Konieczna, E., Tran, T., Yildirim, I., Park, H., Chen, C. Z., *et al.* (2013) Induction and reversal of myotonic dystrophy type 1 pre-mRNA splicing defects by small molecules. *Nat Commun*, **4**, 2044.
- Childs-Disney, J. L., Tsitovich, P. B. & Disney, M. D. (2011) Using modularly assembled ligands to bind RNA internal loops separated by different distances. *Chembiochem*, **12**, 2143-2146.
- Childs-Disney, J. L., Wu, M., Pushechnikov, A., Aminova, O. & Disney, M. D. (2007) A small molecule microarray platform to select RNA internal loop-ligand interactions. *ACS Chem Biol*, **2**, 745-754.
- 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.



- Chou, M. Y., Rooke, N., Turck, C. W. & Black, D. L. (1999) hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells. *Mol Cell Biol*, **19**, 69-77.
- 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.
- 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.
- Dauvilliers, Y. A. & Laberge, L. (2012) Myotonic dystrophy type 1, daytime sleepiness and REM sleep dysregulation. *Sleep Med Rev*, **16**, 539-545.
- 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.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., *et al.* (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, **448**, 151-156.
- DiFranco, M., Yu, C., Quinonez, M. & Vergara, J. L. (2013) Age-dependent chloride channel expression in skeletal muscle fibres of normal and HSA(LR) myotonic mice. *J Physiol*, **591**, 1347-1371.
- Du, H., Cline, M. S., Osborne, R. J., Tuttle, D. L., Clark, T. A., Donohue, J. P., *et al.* (2010) Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 187-193.
- Ebraldidze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebraldidze, K. & Junghans, R. P. (2004) RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science*, **303**, 383-387.
- Estelles, R., Lopez-Martin, J., Milian, L., O'Connor, J. E., Martinez-Losa, M., Cerda-Nicolas, M., *et al.* (2003) Effect of two phenanthrene alkaloids on angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo. *Br J Pharmacol*, **140**, 1057-1067.
- Fairbrother, W. G., Yeh, R. F., Sharp, P. A. & Burge, C. B. (2002) Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science*, **297**, 1007-1013.
- Fardaei, M., Rogers, M. T., Thorpe, H. M., Larkin, K., Hamshere, M. G., Harper, P. S., *et al.* (2002) Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet*, **11**, 805-814.

- Faulkner, G., Pallavicini, A., Formentin, E., Comelli, A., Ievolella, C., Trevisan, S., *et al.* (1999) ZASP: a new Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein. *J Cell Biol*, **146**, 465-475.
- Faustino, N. A. & Cooper, T. A. (2005) Identification of putative new splicing targets for ETR-3 using sequences identified by systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Mol Cell Biol*, **25**, 879-887.
- Fernandez-Costa, J. M., Llamusi, M. B., Garcia-Lopez, A. & Artero, R. (2011) Alternative splicing regulation by Muscleblind proteins: from development to disease. *Biol Rev Camb Philos Soc*, **86**, 947-958.
- Foff, E. P. & Mahadevan, M. S. (2011) Therapeutics development in myotonic dystrophy type 1. *Muscle Nerve*, **44**, 160-169.
- Frisch, R., Singleton, K. R., Moses, P. A., Gonzalez, I. L., Carango, P., Marks, H. G., *et al.* (2001) Effect of triplet repeat expansion on chromatin structure and expression of DMPK and neighboring genes, SIX5 and DMWD, in myotonic dystrophy. *Mol Genet Metab*, **74**, 281-291.
- 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.
- Furling, D., Doucet, G., Langlois, M. A., Timchenko, L., Belanger, E., Cossette, L., *et al.* (2003) Viral vector producing antisense RNA restores myotonic dystrophy myoblast functions. *Gene Ther*, **10**, 795-802.
- 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.
- Fyrberg, E., Fyrberg, C. C., Beall, C. & Saville, D. L. (1990) *Drosophila melanogaster* troponin-T mutations engender three distinct syndromes of myofibrillar abnormalities. *J Mol Biol*, **216**, 657-675.
- Gagnon, C., Noreau, L., Moxley, R. T., Laberge, L., Jean, S., Richer, L., *et al.* (2007) Towards an integrative approach to the management of myotonic dystrophy type 1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **78**, 800-806.
- Gambardella, S., Rinaldi, F., Lepore, S. M., Viola, A., Loro, E., Angelini, C., *et al.* (2010) Overexpression of microRNA-206 in the skeletal

- muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *J Transl Med*, **8**, 48.
- 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., Llamusi, B., Orzaez, M., Perez-Paya, E. & Artero, R. D. (2011) In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 11866-11871.
- 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.
- Giacomotto, J. & Segalat, L. (2010) High-throughput screening and small animal models, where are we? *Br J Pharmacol*, **160**, 204-216.
- Gidalevitz, T., Ben-Zvi, A., Ho, K. H., Brignull, H. R. & Morimoto, R. I. (2006) Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science*, **311**, 1471-1474.
- Giorgio, A., Dotti, M. T., Battaglini, M., Marino, S., Mortilla, M., Stromillo, M. L., *et al.* (2006) Cortical damage in brains of patients with adult-form of myotonic dystrophy type 1 and no or minimal MRI abnormalities. *J Neurol*, **253**, 1471-1477.
- 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.
- Goren, A., Ram, O., Amit, M., Keren, H., Lev-Maor, G., Vig, I., *et al.* (2006) Comparative analysis identifies exonic splicing regulatory sequences--The complex definition of enhancers and silencers. *Mol Cell*, **22**, 769-781.

- Harley, H. G., Rundle, S. A., MacMillan, J. C., Myring, J., Brook, J. D., Crow, S., *et al.* (1993) Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet*, **52**, 1164-1174.
- Harper, P. S. (2001) *Myotonic Dystrophy*. Saunders, London.
- Heatwole, C. R., Miller, J., Martens, B. & Moxley, R. T., 3rd. (2006) Laboratory abnormalities in ambulatory patients with myotonic dystrophy type 1. *Arch Neurol*, **63**, 1149-1153.
- Hesketh, J. (2004) 3'-Untranslated regions are important in mRNA localization and translation: lessons from selenium and metallothionein. *Biochem Soc Trans*, **32**, 990-993.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hu, T. M. & Zhao, S. X. (1986) [The structures of oxofangchirine and stephananthrine isolated from *Stephania tetrandra* S. Moore]. *Yao Xue Xue Bao*, **21**, 29-34.
- Irion, U. (2012) *Drosophila* muscleblind codes for proteins with one and two tandem zinc finger motifs. *PLoS One*, **7**, e34248.
- Ito, S., Ueda, T., Ueno, A., Nakagawa, H., Taniguchi, H., Kayukawa, N., *et al.* (2014) A genetic screen in *Drosophila* for regulators of human prostate cancer progression. *Biochem Biophys Res Commun*, **451**, 548-555.

- 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.
- Jani, K. & Schock, F. (2007) Zasp is required for the assembly of functional integrin adhesion sites. *J Cell Biol*, **179**, 1583-1597.
- 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.
- 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.
- Johnson, R., Zuccato, C., Belyaev, N. D., Guest, D. J., Cattaneo, E. & Buckley, N. J. (2008) A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, **29**, 438-445.
- Jones, K., Wei, C., Iakova, P., Bugiardini, E., Schneider-Gold, C., Meola, G., *et al.* (2012) GSK3beta mediates muscle pathology in myotonic dystrophy. *J Clin Invest*, **122**, 4461-4472.
- Jones, M. A., Gargano, J. W., Rhodenizer, D., Martin, I., Bhandari, P. & Grotewiel, M. (2009) A forward genetic screen in *Drosophila* implicates insulin signaling in age-related locomotor impairment. *Exp Gerontol*, **44**, 532-540.
- Jurica, M. S. & Moore, M. J. (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell*, **12**, 5-14.
- 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.
- Kalkman, J. S., Schillings, M. L., van der Werf, S. P., Padberg, G. W., Zwarts, M. J., van Engelen, B. G., *et al.* (2005) Experienced fatigue in facioscapulohumeral dystrophy, myotonic dystrophy, and HMSN-I. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **76**, 1406-1409.

- 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.
- 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.
- Katzemich, A., Long, J. Y., Jani, K., Lee, B. R. & Schock, F. (2011) Muscle type-specific expression of Zasp52 isoforms in Drosophila. *Gene Expr Patterns*, **11**, 484-490.
- Ketley, A., Chen, C. Z., Li, X., Arya, S., Robinson, T. E., Granados-Riveron, J., *et al.* (2014) High-content screening identifies small molecules that remove nuclear foci, affect MBNL distribution and CELF1 protein levels via a PKC-independent pathway in myotonic dystrophy cell lines. *Hum Mol Genet*, **23**, 1551-1562.
- Kim, D. H., Langlois, M. A., Lee, K. B., Riggs, A. D., Puymirat, J. & Rossi, J. J. (2005) HnRNP H inhibits nuclear export of mRNA containing expanded CUG repeats and a distal branch point sequence. *Nucleic Acids Res*, **33**, 3866-3874.
- 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<sup>2+</sup>-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.
- 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.
- Klinck, R., Fourrier, A., Thibault, P., Toutant, J., Durand, M., Lapointe, E., *et al.* (2014) RBFOX1 Cooperates with MBNL1 to Control Splicing

- in Muscle, Including Events Altered in Myotonic Dystrophy Type 1. *PLoS One*, **9**, e107324.
- 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.
- 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.
- Kucherenko, M. M., Marrone, A. K., Rishko, V. M., Magliarelli Hde, F. & Shcherbata, H. R. (2011) Stress and muscular dystrophy: a genetic screen for dystroglycan and dystrophin interactors in *Drosophila* identifies cellular stress response components. *Dev Biol*, **352**, 228-242.
- Kuroyanagi, H., Watanabe, Y. & Hagiwara, M. (2013) CELF family RNA-binding protein UNC-75 regulates two sets of mutually exclusive exons of the *unc-32* gene in neuron-specific manners in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, **9**, e1003337.
- Kuroyanagi, H., Watanabe, Y., Suzuki, Y. & Hagiwara, M. (2013) Position-dependent and neuron-specific splicing regulation by the CELF family RNA-binding protein UNC-75 in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res*, **41**, 4015-4025.
- 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.
- Langlois, M. A., Lee, N. S., Rossi, J. J. & Puymirat, J. (2003) Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Mol Ther*, **7**, 670-680.
- Larsen, J., Pettersson, O. J., Jakobsen, M., Thomsen, R., Pedersen, C. B., Hertz, J. M., *et al.* (2011) Myoblasts generated by lentiviral mediated MyoD transduction of myotonic dystrophy type 1 (DM1) fibroblasts can be used for assays of therapeutic molecules. *BMC Res Notes*, **4**, 490.
- Latronico, M. V. & Condorelli, G. (2009) MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat Rev Cardiol*, **6**, 419-429.
- Lawton, K. J., Wassmer, T. L. & Deitcher, D. L. (2014) Conserved role of *Drosophila melanogaster* FoxP in motor coordination and courtship song. *Behav Brain Res*, **268**, 213-221.

- Lee, J. E., Bennett, C. F. & Cooper, T. A. (2012) RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 4221-4226.
- 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., 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.
- 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.
- 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.
- Logigian, E. L., Martens, W. B., Moxley, R. T. t., McDermott, M. P., Dilek, N., Wiegner, A. W., *et al.* (2010) Mexiletine is an effective antimyotonia treatment in myotonic dystrophy type 1. *Neurology*, **74**, 1441-1448.
- Longo, D. L., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Jameson, J. L. & Loscalzo, J. (2012) *Harrison's principles of internal medicine*. The McGraw-Hill Companies, New York.
- Lopez-Martin, J., Anam, E. M., Boira, H., Sanz, M. J. & Blazquez, M. A. (2002) Chromone and phenanthrene alkaloids from *Dennettia tripetala*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **50**, 1613-1615.
- Llagostera, E., Alvarez Lopez, M. J., Scimia, C., Catalucci, D., Parrizas, M., Ruiz-Lozano, P., *et al.* (2012) Altered beta-adrenergic response in mice lacking myotonic dystrophy protein kinase. *Muscle Nerve*, **45**, 128-130.
- 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. (2012) Myotonic dystrophy: is a narrow focus obscuring the rest of the field? *Curr Opin Neurol*, **25**, 609-613.
- 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.
- 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 CLC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell*, **10**, 35-44.
- Mankodi, A., Teng-Umuay, 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.
- Marsh, J. L. & Thompson, L. M. (2004) Can flies help humans treat neurodegenerative diseases? *Bioessays*, **26**, 485-496.
- Mas, J. A., Garcia-Zaragoza, E. & Cervera, M. (2004) Two functionally identical modular enhancers in *Drosophila* troponin T gene establish the correct protein levels in different muscle types. *Mol Biol Cell*, **15**, 1931-1945.
- Matsumura, T., Iwahashi, H., Funahashi, T., Takahashi, M. P., Saito, T., Yasui, K., *et al.* (2009) A cross-sectional study for glucose intolerance of myotonic dystrophy. *J Neurol Sci*, **276**, 60-65.
- 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.

- 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-Umnuay, 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.
- Moffat, K. G., Gould, J. H., Smith, H. K. & O'Kane, C. J. (1992) Inducible cell ablation in *Drosophila* by cold-sensitive ricin A chain. *Development*, **114**, 681-687.
- 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.
- Mount, S. M., Burks, C., Hertz, G., Stormo, G. D., White, O. & Fields, C. (1992) Splicing signals in *Drosophila*: intron size, information content, and consensus sequences. *Nucleic Acids Res*, **20**, 4255-4262.
- 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.
- Musova, Z., Mazanec, R., Krepelova, A., Ehler, E., Vales, J., Jaklova, R., *et al.* (2009) Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *Am J Med Genet A*, **149A**, 1365-1374.
- Nakamori, M., Sobczak, K., Moxley, R. T., 3rd & Thornton, C. A. (2009) Scaled-down genetic analysis of myotonic dystrophy type 1 and type 2. *Neuromuscul Disord*, **19**, 759-762.
- 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.
- Nongthomba, U., Ansari, M., Thimmaiya, D., Stark, M. & Sparrow, J. (2007) Aberrant splicing of an alternative exon in the *Drosophila*

- troponin-T gene affects flight muscle development. *Genetics*, **177**, 295-306.
- 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.
- O'Leary, D. A., Vargas, L., Sharif, O., Garcia, M. E., Sigal, Y. J., Chow, S. K., *et al.* (2010) HTS-Compatible Patient-Derived Cell-Based Assay to Identify Small Molecule Modulators of Aberrant Splicing in Myotonic Dystrophy Type 1. *Curr Chem Genomics*, **4**, 9-18.
- Ohno, G., Ono, K., Togo, M., Watanabe, Y., Ono, S., Hagiwara, M., *et al.* (2012) Muscle-specific splicing factors ASD-2 and SUP-12 cooperatively switch alternative pre-mRNA processing patterns of the ADF/cofilin gene in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, **8**, e1002991.
- Oliveira, D. M., Nakaie, C. R., Sousa, A. D., Farah, C. S. & Reinach, F. C. (2000) Mapping the domain of troponin T responsible for the activation of actomyosin ATPase activity. Identification of residues involved in binding to actin. *J Biol Chem*, **275**, 27513-27519.
- 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.
- Orngreen, M. C., Arlien-Soborg, P., Duno, M., Hertz, J. M. & Vissing, J. (2012) Endocrine function in 97 patients with myotonic dystrophy type 1. *J Neurol*, **259**, 912-920.
- 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.
- Pandey, U. B. & Nichols, C. D. (2011) Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev*, **63**, 411-436.
- 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.

- Pearson, C. E. (2011) Repeat associated non-ATG translation initiation: one DNA, two transcripts, seven reading frames, potentially nine toxic entities! *PLoS Genet*, **7**, e1002018.
- Penisson-Besnier, I., Devillers, M., Porcher, R., Orlikowski, D., Doppler, V., Desnuelle, C., *et al.* (2008) Dehydroepiandrosterone for myotonic dystrophy type 1. *Neurology*, **71**, 407-412.
- Perbellini, R., Greco, S., Sarra-Ferraris, G., Cardani, R., Capogrossi, M. C., Meola, G., *et al.* (2011) Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord*, **21**, 81-88.
- Phelps, C. B. & Brand, A. H. (1998) Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods*, **14**, 367-379.
- 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.
- Phylactou, L. A. (2004) Repair of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) transcripts by trans-splicing ribozymes. *Methods Mol Biol*, **252**, 373-383.
- Phylactou, L. A., Darrah, C. & Wood, M. J. (1998) Ribozyme-mediated trans-splicing of a trinucleotide repeat. *Nat Genet*, **18**, 378-381.
- Picchio, L., Plantie, E., Renaud, Y., Poovthumkadavil, P. & Jagla, K. (2013) Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Hum Mol Genet*, **22**, 2795-2810.
- Pincherle, A., Patrino, V., Raimondi, P., Moretti, S., Dominese, A., Martinelli-Boneschi, F., *et al.* (2012) Sleep breathing disorders in 40 Italian patients with Myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord*, **22**, 219-224.
- Potter, J. D., Sheng, Z., Pan, B. S. & Zhao, J. (1995) A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca<sup>2+</sup> regulation of muscle contraction. *J Biol Chem*, **270**, 2557-2562.
- Poulos, M. G., Batra, R., Li, M., Yuan, Y., Zhang, C., Darnell, R. B., *et al.* (2013) Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Hum Mol Genet*, **22**, 3547-3558.
- 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.

- Querido, E., Gallardo, F., Beaudoin, M., Menard, C. & Chartrand, P. (2011) Stochastic and reversible aggregation of mRNA with expanded CUG-triplet repeats. *J Cell Sci*, **124**, 1703-1714.
- Ranum, L. P. & Cooper, T. A. (2006) RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci*, **29**, 259-277.
- Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemin, J. P., Fischer, M. C., Jost, B., *et al.* (2011) Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 840-845.
- 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)<sub>n</sub> 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.
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., *et al.* (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, **287**, 2204-2215.
- 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.
- 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.
- Santoro, M., Piacentini, R., Masciullo, M., Bianchi, M. L., Modoni, A., Podda, M. V., *et al.* (2014) Alternative splicing alterations of Ca<sup>2+</sup> handling genes are associated with Ca<sup>2+</sup> signal dysregulation in myotonic dystrophy type 1 (DM1) and type 2 (DM2) myotubes. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **40**, 464-476.
- 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.

- Scuderi, A. & Letsou, A. (2005) Amnioserosa is required for dorsal closure in *Drosophila*. *Dev Dyn*, **232**, 791-800.
- Sen, S., Talukdar, I., Liu, Y., Tam, J., Reddy, S. & Webster, N. J. (2010) Muscleblind-like 1 (Mbnl1) promotes insulin receptor exon 11 inclusion via binding to a downstream evolutionarily conserved intronic enhancer. *J Biol Chem*, **285**, 25426-25437.
- Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurice, C. A., Wattez, 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., Agbulut, O., Sergeant, N., Savouret, C., Ghestem, A., Tabti, N., *et al.* (2001) Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum Mol Genet*, **10**, 2717-2726.
- 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.
- Sicot, G., Gourdon, G. & Gomes-Pereira, M. (2011) Myotonic dystrophy, when simple repeats reveal complex pathogenic entities: new findings and future challenges. *Hum Mol Genet*, **20**, R116-123.
- Sioud, M. (2004) Ribozyme- and siRNA-mediated mRNA degradation: a general introduction. *Methods Mol Biol*, **252**, 1-8.
- Sistiaga, A., Urreta, I., Jodar, M., Cobo, A. M., Emparanza, J., Otaegui, D., *et al.* (2010) Cognitive/personality pattern and triplet expansion size in adult myotonic dystrophy type 1 (DM1): CTG repeats, cognition and personality in DM1. *Psychol Med*, **40**, 487-495.
- Somarelli, J. A., Schaeffer, D., Bosma, R., Bonano, V. I., Sohn, J. W., Kemeny, G., *et al.* (2013) Fluorescence-based alternative splicing reporters for the study of epithelial plasticity in vivo. *RNA*, **19**, 116-127.
- 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.
- Takeuchi, A., Hosokawa, M., Nojima, T. & Hagiwara, M. (2010) Splicing reporter mice revealed the evolutionally conserved switching

- mechanism of tissue-specific alternative exon selection. *PLoS One*, **5**, e10946.
- 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.
- Tapscott, S. J., Davis, R. L., Thayer, M. J., Cheng, P. F., Weintraub, H. & Lassar, A. B. (1988) MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science*, **242**, 405-411.
- 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.
- Tigabu, B., Rasmussen, L., White, E. L., Tower, N., Saeed, M., Bukreyev, A., *et al.* (2014) A BSL-4 high-throughput screen identifies sulfonamide inhibitors of Nipah virus. *Assay Drug Dev Technol*, **12**, 155-161.
- Timchenko, L., Monckton, D. G. & Caskey, C. T. (1995) Myotonic dystrophy: an unstable CTG repeat in a protein kinase gene. *Semin Cell Biol*, **6**, 13-19.
- Timchenko, L. T., Timchenko, N. A., Caskey, C. T. & Roberts, R. (1996) Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*, **5**, 115-121.
- 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.
- 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.

- Tsai, H. Y. & Huang, Y. W. (2012) Image tracking study on courtship behavior of *Drosophila*. *PLoS One*, **7**, e34784.
- Udd, B. & Krahe, R. (2012) The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurol*, **11**, 891-905.
- Udd, B., Meola, G., Krahe, R., Wansink, D. G., Bassez, G., Kress, W., *et al.* (2011) Myotonic dystrophy type 2 (DM2) and related disorders report of the 180th ENMC workshop including guidelines on diagnostics and management 3-5 December 2010, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*, **21**, 443-450.
- Ule, J., Stefani, G., Mele, A., Ruggiu, M., Wang, X., Taneri, B., *et al.* (2006) An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation. *Nature*, **444**, 580-586.
- Vatta, M., Mohapatra, B., Jimenez, S., Sanchez, X., Faulkner, G., Perles, Z., *et al.* (2003) Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. *J Am Coll Cardiol*, **42**, 2014-2027.
- 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.
- Vicente, M., Monferrer, L., Poulos, M. G., Houseley, J., Monckton, D. G., O'Dell K, M., *et al.* (2007) Muscleblind isoforms are functionally distinct and regulate alpha-actinin splicing. *Differentiation*, **75**, 427-440.
- Vlachopapadopoulou, E., Zachwieja, J. J., Gertner, J. M., Manzione, D., Bier, D. M., Matthews, D. E., *et al.* (1995) Metabolic and clinical response to recombinant human insulin-like growth factor I in myotonic dystrophy--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*, **80**, 3715-3723.
- Voisine, C. & Hart, A. C. (2004) *Caenorhabditis elegans* as a model system for triplet repeat diseases. *Methods Mol Biol*, **277**, 141-160.
- Wahl, M. C., Will, C. L. & Luhrmann, R. (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, **136**, 701-718.
- Walker, J. A. & Bernards, A. (2014) A *Drosophila* screen identifies neurofibromatosis-1 genetic modifiers involved in systemic and synaptic growth. *Rare Dis*, **2**, e28341.
- Wang, G. S., Kearney, D. L., De Biasi, M., Taffet, G. & Cooper, T. A. (2007) Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J Clin Invest*, **117**, 2802-2811.



- 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*, **119**, 3797-3806.
- 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., 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.
- Wen, Y., Xu, L., Chen, F. L., Gao, J., Li, J. Y., Hu, L. H., *et al.* (2014) Discovery of a novel inhibitor of NAD(P)(+)-dependent malic enzyme (ME2) by high-throughput screening. *Acta Pharmacol Sin*, **35**, 674-684.
- 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., Krym, M. C. & Thornton, C. A. (2007) Ribonuclear foci at the neuromuscular junction in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord*, **17**, 242-247.
- 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.
- Wong, C. H., Nguyen, L., Peh, J., Luu, L. M., Sanchez, J. S., Richardson, S. L., *et al.* (2014) Targeting toxic RNAs that cause myotonic dystrophy type 1 (DM1) with a bisamidinium inhibitor. *J Am Chem Soc*, **136**, 6355-6361.
- Wooten, E. C., Hebl, V. B., Wolf, M. J., Greytak, S. R., Orr, N. M., Draper, I., *et al.* (2013) Formin homology 2 domain containing 3 variants associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*, **6**, 10-18.
- Wozniak, J. R., Mueller, B. A., Bell, C. J., Muetzel, R. L., Lim, K. O. & Day, J. W. (2013) Diffusion tensor imaging reveals widespread white

- matter abnormalities in children and adolescents with myotonic dystrophy type 1. *J Neurol*, **260**, 1122-1131.
- 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 NKX2-5 expression. *Nat Genet*, **40**, 61-68.
- Yeo, G. W., Coufal, N. G., Liang, T. Y., Peng, G. E., Fu, X. D. & Gage, F. H. (2009) An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 130-137.
- 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.
- Zhang, C., Frias, M. A., Mele, A., Ruggiu, M., Eom, T., Marney, C. B., *et al.* (2010) Integrative modeling defines the Nova splicing-regulatory network and its combinatorial controls. *Science*, **329**, 439-443.
- Zhou, Q., Chu, P. H., Huang, C., Cheng, C. F., Martone, M. E., Knoll, G., *et al.* (2001) Ablation of Cypher, a PDZ-LIM domain Z-line protein, causes a severe form of congenital myopathy. *J Cell Biol*, **155**, 605-612.
- Zhou, Q., Ruiz-Lozano, P., Martone, M. E. & Chen, J. (1999) Cypher, a striated muscle-restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to alpha-actinin-2 and protein kinase C. *J Biol Chem*, **274**, 19807-19813.
- Zu, T., Gibbens, B., Doty, N. S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M. D., *et al.* (2011) Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 260-265.