



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

**Programa de doctorado en Biología molecular y Genética
Departamento de Bioquímica y Biología molecular**

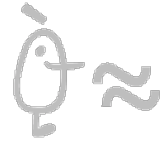
**Implicación de miRNAs en la toxicidad mediada por
expansiones de repeticiones CTG en
Distrofia Miotónica**

Tesis doctoral

Presentada por: D. Juan Manuel Fernández Costa
Dirigida por: Prof. Dr. D. Rubén D. Artero Allepuz



Departament de Genètica



Dr. D. RUBÉN D. ARTERO ALLEPUZ, Profesor Titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València

INFORMA

que **D. JUAN MANUEL FERNÁNDEZ COSTA**, licenciado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación recogido en esta memoria bajo el título “Implicación de miRNAs en la toxicidad mediada por expansiones de repeticiones CTG en Distrofia Miotónica”.

Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para la presentación del mismo en el Departamento de Genética de la Universidad de Valencia, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor por la Universitat de València.

En Valencia, a 13 de octubre de 2015

Fdo. Dr. D. Rubén D. Artero Allepuz

El autor de la presente Tesis Doctoral disfrutó de un beca para la formación de personal investigador de carácter predoctoral de la *Conselleria d' Empresa, Universitat i Ciència de la Generalitat Valenciana* (BPI06/494).

Este trabajo se ha enmarcado dentro del proyecto “Nuevas dianas terapéuticas para la Distrofia Miotónica: análisis de microRNAs en dos modelos de animales de la enfermedad” financiado por la Fundación Ramón Areces dentro del XV concurso nacional para la adjudicación de ayudas a la investigación científico-técnica.

A mis padres

-Agradecimientos-

Mi madre cuenta que casi desde que empecé a hablar no paré de hacerle preguntas. Ella y mi padre se esforzaron en contestar a mis preguntas aunque algunas les resultaban extravagantes para un niño pequeño. Llegó un día en que dejaron de tener respuestas a preguntas cada vez más complicadas y empezaron a animarme a que buscara las respuestas por mí mismo. Ahí empezó una vocación de la que tengo la suerte de poder disfrutar a diario. Sin duda, los grandes responsables de lo que he conseguido son ellos. Gracias Papás por apoyarme, por entenderme y por soportarme incluso en momentos en los que ni yo mismo me soporto. Gracias por enseñarme a perseguir mis sueños, que todo esfuerzo tiene su recompensa y a vivir la vida con pasión.

Ha habido mucha gente que me ha ayudado en estos años de evolución profesional y personal. Espero no dejarme a nadie, por si acaso, pido perdón por adelantado.

Gracias a Rubén por ser mi mentor, por su paciencia infinita, por proponerme proyectos apasionantes y por las largas discusiones de las que he aprendido muchísimo y sigo haciéndolo. A Nuria, por ofrecerme, hace ya unos cuantos años, formar parte de esta gran familia y a Manuel por tener ideas tan interesantes.

A las mamás de DM, Maya, Lidón y Marta, por su ayuda en mis primeras etapas en el laboratorio. He aprendido mucho de las tres. Al resto de compis, a aquellos con los que he compartido bancada durante muchos años, a Yaiza, Vero, Fabrice, Use, Irma, M. Carmen y Ari. A las nuevas generaciones deseamos mucha suerte, sabéis que siempre tendréis mi ayuda. A mis alumnas colaboradoras por dedicarme parte de su tiempo. Y, por supuesto a mis chicas, Amparo y Bea, por compartir mucho más que los experimentos, por hacer que los momentos buenos fueran mejores y los malos no tan malos. Por las conversaciones en la escalera, las cenitas, las risas por Milán, Ámsterdam, Berlín, Brighton y Costa Rica!

Al resto de compañeros del departamento, por las tertulias de sobremesa, las cervecitas de los jueves, las fiestas en casa de Bea, Halloween, Navidad y tantos momentos inolvidables... A mi Glori, porque un cruce de miradas en el pasillo siempre acaba en una conversación reconfortante, por escucharme. A los miembros del PAS por hacernos la vida más fácil.

A mis amigos, mis Antoni@s y mis Biofriends, porque aunque seamos todos muy diferentes sois las personas que mejor me conocen. Gracias por tranquilizarme en los momentos malos y compartir los momentos buenos.

A mi GRAN familia, a todos, porque no solo sois grandes en número. A mi hermano, porque aunque a veces no nos entendemos muy bien, se que siempre podré contar con él. A Elena, mi segunda mamá, por eso. Y a mi Principito por aparecer en mi vida, darle la vuelta y enseñarme cosas que no conocía. Por apoyarme, entenderme y aguantarme en estos últimos meses de agobio.

A todas y todos mil gracias!

-Juanma-

Índice general

Introducción.....	1
1. La Distrofia Miotónica tipo 1	3
1.1. Base genética. Loci DM1 y DM2.....	6
1.2. Mecanismo molecular de patogénesis.....	7
1.2.1. Alteración de factores de <i>splicing</i> alternativo y <i>esplíceopatía</i>	9
1.2.2. Alteración de la traducción de mRNAs.....	10
1.2.3. Secuestro de factores de transcripción	10
1.2.4. Haploinsuficiencia de <i>DMPK</i>	10
1.2.5. Cambios en la estructura local de la cromatina.....	11
1.2.6. Transcripción bidireccional, RNA de interferencia y traducción no canónica asociada a repeticiones	11
2. Las proteínas de la familia Muscleblind.....	14
2.1. Implicación de las proteínas Muscleblind en el metabolismo de RNAs	15
2.2. Papel de las proteínas Muscleblind en DM1	17
3. Un modelo de DM1 en <i>Drosophila</i>	19
4. MicroRNAs.....	21
4.1. Organización genómica de los miRNAs.....	21
4.2. Ruta de biogénesis de los microRNAs	22
4.2.1. Rutas de biogénesis no canónicas.....	23
4.2.1.1. Rutas independientes del Microprocesador	23
4.2.1.2. Rutas independientes de Dicer	25
4.3. Mecanismos de silenciamiento génico mediado por miRNAs.....	25
4.3.1. Reconocimiento de los transcritos diana	25
4.3.2. Inhibición de la traducción	26
4.3.3. Degradación de mRNAs.....	26
5. miRNAs alterados en DM1.....	27
Objetivos	29
Resultados	33
1. Análisis de la alteración de miRNAs mediadas por repeticiones CUG.....	35
1.1. Descripción completa de los miRNAs expresados en moscas adultas ..	37
1.1.1. Validación de nuevos miRNAs.....	41
1.1.2. Validación de <i>miR-3R_25</i>	44
1.1.2.1.1. El cambio de tres nucleótidos en <i>miR-3R_25</i> no es un polimorfismo.....	47

1.1.2.1.2.	El cambio de tres nucleótidos en <i>miR-3R_25</i> no se detecta en su horquilla precursora.....	48
1.1.2.1.3.	El cambio de tres nucleótidos en <i>miR-3R_25</i> no proviene de la región genómica predicha.....	48
1.1.2.1.4.	La sonda para <i>miR-3R_25</i> detecta a <i>miR-1</i>	52
1.2.	Estudio de la expresión diferencial de miRNAs en un modelo para DM1 en <i>Drosophila</i>	53
1.3.	La reducción en los niveles de expresión de <i>miR-1</i> , <i>miR-7</i> y <i>miR-10</i> está conservada en pacientes de DM1.....	56
2.	Análisis funcional de miRNAs relevantes.....	60
2.1.	Estudio del origen de las alteraciones de miRNAs.....	60
2.1.1.	La transcripción de precursores primarios de miRNAs específicos está alterada en moscas DM1.....	60
2.1.1.1.	La expresión del precursor <i>pri-miR-7</i> está disminuida en DM1.....	63
2.1.2.	Implicación de <i>Muscleblind</i> en la desregulación de microRNAs en DM1.....	64
2.1.2.1.1.	Generación de moscas transgénicas <i>IR_{sp}-muscleblind</i>	64
2.1.2.1.2.	Análisis de la expresión de <i>muscleblind</i> en moscas <i>IR_{sp}-mbl</i>	67
2.1.2.1.3.	El silenciamiento de <i>muscleblind</i> potencia la toxicidad de los RNAs con expansiones CUG.....	67
2.1.2.2.	<i>Muscleblind</i> es necesario para la regulación de <i>miR-1</i> en <i>Drosophila</i>	69
2.1.3.	La alteración de miRtrones en moscas DM1 no se debe a defectos en el <i>splicing</i> de sus precursores.....	71
2.2.	Análisis de la función normal de miRNAs relevantes.....	72
2.2.1.	Análisis de dianas de los miRNAs alterados en DM1.....	72
2.2.2.	Validación de dianas de <i>miR-1</i> , <i>miR-7</i> y <i>miR-10a</i> en DM1.....	74
3.	Evaluación en <i>Drosophila</i> de miRNAs específicos como diana terapéutica para la DM1.....	77
3.1.	Rescate del fenotipo de atrofia muscular.....	77
3.1.1.	La expresión de <i>miR-1</i> en músculo de moscas DM1 no rescata el fenotipo de degeneración muscular.....	78
3.1.2.	La expresión de <i>miR-7</i> en músculo de moscas DM1 empeora el fenotipo de atrofia muscular.....	78
3.1.3.	La expresión de <i>miR-10</i> en músculo de moscas DM1 no rescata el fenotipo de atrofia muscular.....	80
3.1.4.	La expresión de <i>CG6695</i> , el gen hospedador de <i>miR-1003</i> , mejora el fenotipo de atrofia muscular en moscas DM1.....	80
3.1.5.	Análisis del efecto de <i>miR-1003</i> en el fenotipo de atrofia muscular de moscas DM1.....	81
3.1.5.1.	Generación de moscas transgénicas <i>UAS-miR-1003</i>	81

3.1.5.2. La expresión de <i>miR-1003</i> en músculo de moscas DM1 no rescata el fenotipo de atrofia muscular	81
3.2. Rescate de la reducción en la vida media en moscas DM1	82
Discusión	85
1. Caracterización del miRNoma de moscas adultas	87
1.1. <i>miR-3R_25</i> no proviene de la región genómica precursora predicha por miRDeep.....	89
2. La desregulación de miRNAs específicos en DM1 es debida a la expresión de RNAs con repeticiones CUG	90
3. La desregulación de miRNAs mediada por RNAs con repeticiones CUG está conservada en pacientes DM1	92
4. Las alteraciones de miRNAs en DM1 tienen diferentes orígenes	94
5. Las alteraciones en los transcritos diana de los miRNAs podrían contribuir a la sintomatología de la DM1	95
6. Potencial terapéutico de los miRNAs en DM1	98
Conclusiones	101
Material y Métodos.....	105
1. Material.....	107
1.1. Material biológico	107
1.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	107
1.1.2. Líneas celulares	108
1.1.3. Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i>	108
1.1.4. Biopsias musculares	110
1.2. Oligonucleótidos.....	111
1.2.1. Cebadores para PCR	111
1.2.2. Cebadores para PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	112
1.2.1. Cebadores para secuenciación	114
1.2.2. Sondas	114
1.2.3. Otros oligonucleótidos	115
1.3. Vectores y construcciones	115
1.3.1. Vectores de clonación.....	115
1.3.2. Vectores de transformación de la línea germinal de <i>Drosophila</i>	116
1.3.3. Construcciones y otros vectores.....	116
1.3.3.1.1. Construcciones generadas por síntesis química	116
1.4. Enzimas	117
1.5. Anticuerpos.....	118
1.6. Kits comerciales.....	118
1.7. Programas informáticos.....	118

1.8. Recursos en red	119
2. Métodos.....	119
2.1. Métodos moleculares.....	119
2.1.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	119
2.1.1.1. Extracción de DNA genómico.....	119
2.1.1.1.1. Extracción de DNA genómico de moscas adultas	119
2.1.1.1.2. Extracción de DNA genómico de embriones de <i>Drosophila</i> ..	120
2.1.1.2. Extracción de DNA plasmídico.....	120
2.1.1.3. Purificación de amplicones de PCR y de fragmentos de restricción	120
2.1.1.4. Purificación de DNA en agarosa por electroelución	120
2.1.1.5. Extracción de RNA total de moscas.....	121
2.1.1.6. Extracción de RNA de pequeño tamaño de moscas.....	121
2.1.1.7. Extracción de RNA de biopsias musculares	122
2.1.2. Extracción de proteínas de moscas	123
2.1.3. Amplificación de DNA por PCR.....	123
2.1.3.1. PCR anidada.....	123
2.1.3.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).....	124
2.1.3.2.1. qPCR de mRNAs.....	124
2.1.3.2.2. qPCR de miRNAs.....	124
2.1.4. Retrotranscripción (RT).....	125
2.1.4.1. Tratamiento con DNasa I.....	125
2.1.4.2. RT de mRNAs	125
2.1.4.3. RT de precursores de miRNAs	125
2.1.4.4. RT de miRNAs maduros	126
2.1.5. Transcripción <i>in vitro</i>	126
2.1.6. Digestión con RNasa A.....	126
2.1.7. Clonación.....	127
2.1.7.1. Clonación de la construcción IR _{sp} - <i>muscleblind</i> en pUAST y pBlueScript.....	127
2.1.7.2. Obtención de los transgenes UAS- <i>DsRed-miRNA</i>	127
2.1.8. Detección de RNAs pequeños por <i>northern blot</i>	127
2.1.9. Detección de proteínas por <i>Western blot</i>	128
2.2. Métodos celulares.....	129
2.2.1. Condiciones de cultivo de fibroblastos y transdiferenciación.....	129
2.2.2. Recuento de células	130
2.2.3. Congelación y descongelación de células.....	130
2.3. Métodos histológicos.....	130
2.3.1. Preparación de secciones semifinas de tórax.....	130
2.3.2. Análisis de la morfología de ojos de <i>Drosophila</i>	131
2.4. Selección de embriones por citometría de flujo.....	131
2.5. Análisis de la vida media de <i>Drosophila</i>	133

2.6. Análisis de imágenes.....	133
2.6.1. Cuantificación de la expresión de miRNAs por densitometría	133
2.6.2. Cuantificación del área muscular de los músculos indirectos del vuelo (IFMs).....	133
2.7. Métodos bioinformáticos.....	134
2.7.1. Alineamiento de secuencias	134
2.7.2. Búsqueda de dianas de miRNAs.....	135
Apéndice	137
1. Código IUPAC para ácidos nucleicos y aminoácidos.....	139
2. El sistema binario UAS/GAL4.....	141
Bibliografía.....	143
Anexo	167

Índice de tablas

Tabla I-1. Transcritos con defectos de <i>splicing</i> en DM1 y ratones <i>knock-out</i> para <i>Mbnl1</i>	18
Tabla I-2. miRNAs alterados en DM1	28
Tabla R-1. Librerías de RNAs de pequeño tamaño para secuenciación masiva	36
Tabla R-2. Número de lecturas obtenidas por secuenciación masiva y tras el procesado bioinformático.....	37
Tabla R-3. Perfil de expresión de miRNAs en moscas silvestres	38
Tabla R-4. Nuevos miRNAs candidatos	39
Tabla R-5. miRNAs alterados en moscas modelo DM1	55
Tabla R-6. Lecturas medias para los miRNAs del clúster miR-310~313	60
Tabla R-7. Lecturas medias para los miRNAs del clúster miR-959~964	61
Tabla R-8. Dianas de miRNAs alteradas en biopsias musculares de pacientes con DM1	74
Tabla R-9. Dianas de <i>miR-1</i> alteradas en biopsias musculares de pacientes con DM1	75
Tabla R-10. Dianas de <i>miR-7</i> alteradas en biopsias musculares de pacientes con DM1	76
Tabla R-11. Dianas de <i>miR-10a</i> alteradas en biopsias musculares de pacientes con DM1	77
Tabla MM-1. Cepas de referencia	108
Tabla MM-2. Cepas equilibradoras.....	108
Tabla MM-3. Cepas mutantes.....	109
Tabla MM-4. Cepas UAS.....	109
Tabla MM-5. Cepas Gal4.....	109
Tabla MM-6. Cepas recombinantes	109
Tabla MM-7. Biopsias musculares del Hospital de Donostia.....	110
Tabla MM-8. Biopsias musculares del Hospital La Fe (Valencia)	110
Tabla MM-10. Cebadores para PCR	111

Tabla MM-11. Cebadores para PCR anidada	112
Tabla MM-12. Cebadores para qPCR de genes de <i>Drosophila</i>	112
Tabla MM-13. Cebadores para qPCR de genes humanos.....	113
Tabla MM-9. Cebadores para secuenciación de DNA clonado	114
Tabla MM-14. Sondas para <i>northern blot</i>	114
Tabla MM-15. Oligonucleótidos 3R_25	115
Tabla MM-16. Construcciones y otros vectores.....	116
Tabla MM-17. Enzimas.....	117
Tabla MM-18. Anticuerpos primarios.....	118
Tabla MM-19. Kits.....	118
Tabla MM-20. Programas informáticos	118
Tabla MM-21. Bases de datos	119
Tabla MM-22. Aplicaciones en red	119
Tabla A-1. Código de ácidos nucleicos.....	139
Tabla A-2. Código de aminoácidos	140

Índice de figuras

Figura I-1. Ejemplos de defectos en el <i>splicing</i> alternativo relacionados con síntomas en DM1.....	5
Figura I-2. Los transcritos de <i>DMPK</i> mutantes forman inclusiones ribonucleares en los núcleos de fibroblastos de pacientes DM1.	8
Figura I-3. Mecanismos moleculares de patogénesis en DM1.	13
Figura I-4. Modelo posicional de la actividad de <i>splicing</i> de MBNL1.	15
Figura I-5. Fenotipos de la DM1 en un modelo de la enfermedad en <i>Drosophila</i> ...	21
Figura I-6. Rutas de biogénesis de miRNAs canónica y de miRtrones.	24
Figura R-1. Niveles de proteína Dicer-1 en moscas mutantes.	41
Figura R-2. Detección de <i>miR-1</i> mediante northern blot en moscas mutantes para Dicer-1.....	42
Figura R-3. Validación de nuevos miRNAs por Northern blot.	42
Figura R-4. Niveles de expresión de <i>miR-3R_25</i> en mutantes para <i>Dicer-1</i>	44
Figura R-5. La secuencia de <i>miR-3R_25</i> es diferente a la secuencia del genoma....	45
Figura R-6. Lecturas con cambios en todos los miRNAs detectados en mosca.....	46
Figura R-7. La sonda para <i>miR-3R_25</i> no reconoce la secuencia genómica.	47
Figura R-8. <i>miR-3R_25</i> se expresa en la cepa de referencia del proyecto genoma de <i>Drosophila</i>	47
Figura R-9. Región genómica donde se localiza el precursor de <i>miR-3R_25</i>	49
Figura R-10. <i>miR-3R_25</i> se expresa en embriones con deleciones en la región genómica donde se localiza su precursor.	50
Figura R-11. La sobreexpresión del precursor de <i>miR-3R_25</i> no afecta los niveles del miRNA maduro.	51
Figura R-12. La secuencia de <i>miR-3R_25</i> coincide con la de <i>miR-1</i>	52
Figura R-13. La sonda de <i>miR-3R_25</i> detecta <i>miR-1</i> en Northern blot.	53
Figura R-14. La expresión de las repeticiones CTG en músculo de <i>Drosophila</i> altera los niveles de expresión de miRNAs específicos.	54
Figura R-15. Validación de las alteraciones en la expresión miRNAs específicos en moscas modelo DM1.....	56

Figura R-16. Alineamiento de las secuencias de <i>miR-1</i> , <i>miR-7</i> y <i>miR-10</i>	57
Figura R-17. Validación de alteraciones en los miRNAs <i>miR-1</i> , <i>miR-7</i> y <i>miR-10</i> en pacientes con DM1.	58
Figura R-18. Los niveles de expresión de <i>miR-1</i> , <i>miR-7</i> y <i>miR-10</i> están reducidos en células de pacientes con DM1.	59
Figura R-19. Los miRNAs de los clústeres <i>miR-310~313</i> y <i>miR-959~964</i> están alterados en moscas modelo DM1.	61
Figura R-20. Los pri-miRNAs de los clústeres <i>miR-310~313</i> y <i>miR-959~964</i> están reducidos en moscas DM1.	62
Figura R-21. <i>pri-miR-7</i> está reducido en moscas DM1.	63
Figura R-22. Los pri-miRNAs precursores de <i>miR-7</i> están reducidos en músculo de pacientes de DM1.	64
Figura R-23. Esquema de los transcritos <i>muscleblind</i> y de la región diana del RNAi.	66
Figura R-24. Validación <i>in vitro</i> de la construcción <i>IR_{sp}-mbl</i> mediante digestión con RNasa A.	66
Figura R-25. La expresión de la construcción <i>IR_{sp}-mbl</i> reduce los niveles de expresión de <i>muscleblind in vivo</i>	68
Figura R-26. El silenciamiento de <i>muscleblind</i> potencia la toxicidad de los RNAs con expansiones CUG.	69
Figura R-27. <i>Muscleblind</i> regula los niveles de <i>miR-1</i>	70
Figura R-28. Análisis del <i>splicing</i> de los intrones precursores de <i>miR-1003</i> y de <i>miR-1006</i> en moscas DM1.	72
Figura R-29. La expresión de las dianas de <i>miR-1</i> , <i>miR-7</i> y <i>miR-10a</i> están alteradas en músculo de pacientes DM1.	73
Figura R-30. Validación de dianas específicas de <i>miR-1</i> , <i>miR-7</i> y <i>miR-10a</i> en biopsias musculares de pacientes DM1.	76
Figura R-31. La sobreexpresión de <i>miR-1</i> no rescata el fenotipo de degeneración muscular de las moscas DM1.	78
Figura R-32. La sobreexpresión de <i>miR-7</i> reduce el tamaño de los músculos indirectos del vuelo en las moscas DM1.	79
Figura R-33. La expresión de <i>miR-7</i> en músculo adulto no altera el fenotipo de atrofia muscular de las moscas DM1.	79

Índices

Figura R-34. La sobreexpresión de <i>miR-10</i> no rescata el fenotipo de atrofia muscular de las moscas DM1.....	80
Figura R-35. <i>CG6695</i> , el gen hospedador de <i>miR-1003</i> , rescata el fenotipo de atrofia muscular en moscas DM1.	81
Figura R-36. <i>miR-1003</i> no rescata el fenotipo de atrofia muscular en moscas DM1.	82
Figura R-37. La sobreexpresión de <i>miR-1</i> , <i>miR-7</i> y <i>miR-10</i> tiene diferentes efectos en la supervivencia de moscas DM1.	83
Figura D-1. El algoritmo miRDeep está basado en la biogénesis de los miRNAs. ..	88
Figura D-2. Las repeticiones CUG interrumpidas forman horquillas similares a las repeticiones puras.	92
Figura D-3. MBNL1 participa en la biogénesis de <i>miR-1</i>	93
Figura D-4. Desregulación de miRNAs mediada por la expresión de RNAs con repeticiones CUG en DM1.	97
Figura MM-1. Extracción y purificación de RNAs pequeños.	122
Figura MM-2. Esquema de la generación de la construcción <i>IR_{sp}-muscleblind</i> por fusión de fragmentos de DNA mediante PCRs anidadas y solapantes.	123
Figura MM-3. Transgén UAS-DsRed-miRNA.....	127
Figura MM-7. Selección de embriones por citometría de flujo.	132
Figura MM-5. Análisis densitométrico de la señal de <i>Northern blots</i>	134
Figura MM-6. Análisis de imagen y cuantificación del área muscular de los IFMs.	135
Figura A-1. Sistema de expresión UAS/GAL4.....	141

Introducción

1. La Distrofia Miotónica tipo 1

La Distrofia Miotónica tipo 1 (DM1, OMIM #160900) es una enfermedad neuromuscular descrita por primera vez en 1909 por el médico alemán Hans Steinert. A pesar de tratarse de una enfermedad rara, la DM1 es la miopatía hereditaria más frecuente en la población adulta. La prevalencia de la DM1 en Europa es de 1/20000 habitantes (Bouhour *et al.* 2007). Sin embargo, dada la existencia de formas moderadas o asintomáticas no diagnosticadas se estima que la incidencia real sea mayor.

Los síntomas definitorios de la DM1 afectan principalmente al músculo incluyendo miotonía, degeneración y debilidad muscular (Harper 2001). La miotonía, síntoma característico de la DM1, se define como un retraso en la relajación de los músculos después de la contracción voluntaria o la estimulación eléctrica. Sin embargo, la principal causa de minusvalía en los pacientes no es la miotonía sino la debilidad muscular causada por una degeneración muscular progresiva, lo que se define como distrofia. Generalmente los pacientes con DM1 tienen problemas cardíacos. Son frecuentes las arritmias cardíacas causadas por defectos en la conducción de las fibras musculares del corazón. Estas arritmias pueden llegar a ser graves causando muerte súbita, siendo esta la segunda causa de mortalidad en DM1 tras el fallo respiratorio (Foff y Mahadevan 2011).

A parte del músculo, otro tejido muy afectado por la enfermedad es el sistema nervioso central (SNC). El cerebro de los pacientes con DM1 presenta atrofia cortical, lesiones en la sustancia blanca y una reducción del volumen del cerebro, aunque no se ha establecido la relación entre estos defectos y los síntomas neurológicos. Los síntomas neurológicos principales son déficit cognitivo, trastornos de comportamiento y excesiva somnolencia diurna (Harper 2001, Gagnon *et al.* 2007).

Aunque la DM1 se define como una enfermedad neuromuscular, presenta un cuadro clínico multisistémico. Prácticamente todos los órganos y tejidos están afectados en los pacientes con DM1, existiendo mucha variabilidad en la manifestación de los síntomas. Entre los síntomas más comunes encontramos la presencia de cataratas iridiscentes, trastornos digestivos, resistencia a la insulina, calvicie frontal en los varones o esterilidad (Harper 2001, Gagnon *et al.* 2007).

A nivel molecular la DM1 se caracteriza por errores en la regulación del *splicing* alternativo que provocan la presencia de variantes de *splicing* fetales de algunos transcritos en tejidos adultos. A los errores en el *splicing* de transcritos se les conoce

Introducción

como *esplíceopatía* y la DM1 fue la primera enfermedad en la que se describieron (Osborne y Thornton 2006). Hasta la fecha se han descrito más de 20 fenómenos de *splicing* aberrante en pacientes de DM1 (Tabla I-1) (Du *et al.* 2010, Lin *et al.* 2006) y varios de ellos se han relacionado directamente con algunos síntomas. En concreto se ha relacionado directamente la *esplíceopatía* con la miotonía, la debilidad muscular y la resistencia a la insulina (Fig. I-1). La miotonía se ha relacionado con errores en el procesado del exón 7a del gen del *canal de cloro tipo 1*, *ClC-1* (Charlet *et al.* 2002, Mankodi *et al.* 2002). Este exón presenta un codón de parada prematuro y su inclusión en el transcrito final genera una proteína truncada no funcional. Además estos transcritos son degradados por la vía *NMD* (del inglés *non-sense mediated decay*). En la población sana esta variante solo está presente en el feto, sin embargo en los pacientes se expresa durante toda la vida. La expresión de esta variante no funcional junto a la reducción en la transcripción del gen en el músculo de los pacientes (Ebraldize *et al.* 2004), se traduce en una reducción en la conductancia del cloruro, causando despolarización y desestabilización de los potenciales de membrana en las fibras musculares, lo que provoca la miotonía.

Otro ejemplo de *esplíceopatía* relacionada con síntomas en DM1 lo encontramos en la debilidad muscular. La eliminación del exón 11 en los transcritos maduros del gen de la Anfifisina 2 (*BIN1*) en el músculo esquelético de pacientes de DM1 se ha correlacionado con la debilidad muscular (Fugier *et al.* 2011). El exón 11 de *BIN1* es específico de músculo y codifica un dominio de unión a inositol fosfato (IP). En el músculo de personas sanas este exón se incluye en el transcrito maduro mientras que en las células musculares de pacientes con DM1 el exón 11 es excluido del transcrito maduro produciendo una isoforma fetal. Esta isoforma produce una proteína sin el dominio IP que, como consecuencia, resulta inactiva. La Anfifisina 2 es necesaria para la formación de la red de túbulos T que controlan el proceso acoplado de excitación-contracción en las fibras musculares (Lee *et al.* 2002a). En DM1, la falta de función de la Anfifisina 2 provoca alteraciones en la organización de la red de túbulos T lo que se traduce en debilidad muscular.

La resistencia a la insulina que presentan los pacientes de DM1 se debe a la expresión en músculo esquelético adulto de una isoforma fetal del gen del *receptor de insulina*, *IR* (Savkur *et al.* 2001). El exón 11 del *IR* se incluye en el transcrito final de manera progresiva con la edad en la población sana. En los pacientes de DM1 la inclusión del exón 11 no ocurre conservándose la isoforma fetal del *IR*. Esta isoforma fetal del *IR* es una forma con poca capacidad de señalización. La baja respuesta metabólica asociada a la menor capacidad señalizadora del receptor de la insulina predispone a los pacientes a padecer diabetes.

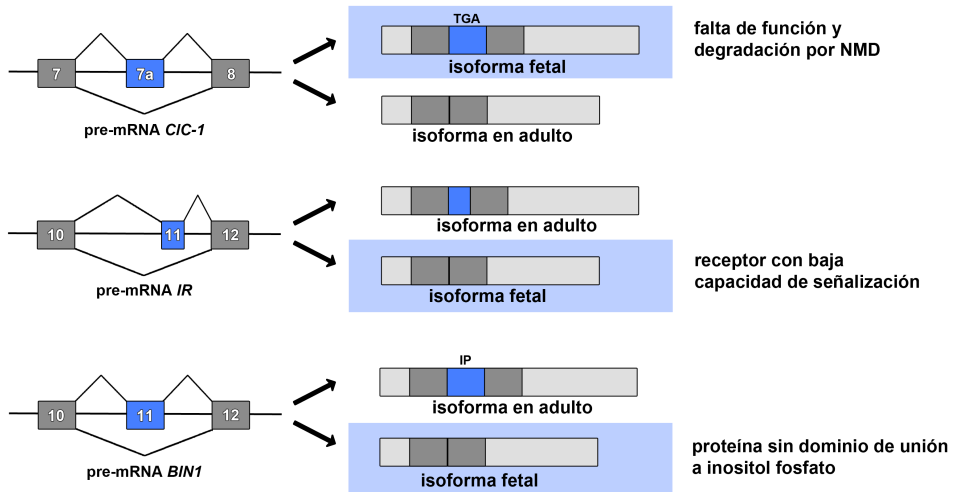


Figura I-1. Ejemplos de defectos en el *splicing* alternativo relacionados con síntomas en DM1.

Los transcritos de los genes del *CIC-1*, *IR* y *BIN1* tienen alterado el *splicing* alternativo en DM1 predominando las formas fetales (fondo azul) en tejidos adultos de pacientes DM1. La inclusión del exón 7a, que contiene un codón de parada prematuro (TGA), en los transcritos del *CIC-1* conduce a la degradación de los transcritos por la ruta NMD. La falta de proteína *CIC-1* en el músculo esquelético produce la miotonía. La exclusión del exón 11 en el *IR* genera una isoforma fetal con baja capacidad señalizadora, lo que produce la resistencia a la insulina en DM1. La forma fetal de *BIN1* que expresan los pacientes de DM1 no contiene el exón 11. Este exón codifica un dominio de unión a inositol fosfato (IP) y la falta de este dominio genera una proteína inactiva. Como consecuencia la biogénesis y organización de la red de túbulos T falla provocando debilidad muscular.

Además de alteraciones en el *splicing* alternativo de transcritos, se han descrito varios mecanismos moleculares que contribuyen a la patología de la DM1. Estos incluyen alteraciones en la expresión de transcritos a nivel de transcripción (Du *et al.* 2010), poliadenilación (Batra *et al.* 2014, Goodwin *et al.* 2015), la traducción independiente de ATG asociada a repeticiones (traducción RAN)(Zu *et al.* 2011), transcripción bidireccional (Moseley *et al.* 2006), alteraciones epigenéticas (Lopez Castel *et al.* 2011a, Lopez Castel *et al.* 2011b) o alteración en la expresión de microRNAs (Gambardella *et al.* 2010, Perbellini *et al.* 2011, Rau *et al.* 2011, Kalsotra *et al.* 2014), entre otros.

1.1. Base genética. Loci DM1 y DM2

La DM1 es una enfermedad genética que presenta una herencia autosómica dominante. La base genética de la DM1 radica en la presencia de una mutación dinámica en la región 3' no traducida (UTR) del gen *Proteína Kinasa de DM* (*DMPK*, Entrez #1760) localizado citogenéticamente en la región cromosómica 19q13.3 (Brook *et al.* 1992, Fu *et al.* 1992, Mahadevan *et al.* 1992, Buxton *et al.* 1992, Harley *et al.* 1992). Esta mutación consiste en una expansión del trinucleótido CTG. En la población sana, el gen *DMPK* presenta de 5 a 35 copias de este trinucleótido, mientras que en los pacientes de DM1 el gen *DMPK* contiene más de 50 copias del trinucleótido CTG. Generalmente, el número de repeticiones correlaciona con la gravedad de los síntomas y la edad en la que comienzan a manifestarse. Así, en la forma adulta de la enfermedad, que comienza a manifestarse en la segunda década de la vida, el rango de repeticiones oscila entre 50 y varios cientos. En los casos en el que el número de repeticiones alcanza los miles de copias, la enfermedad se manifiesta desde el nacimiento en forma de distrofia miotónica congénita (DMC). La DMC es la forma más grave de distrofia miotónica, los pacientes presentan retraso mental, trastornos respiratorios y problemas en la diferenciación muscular.

En DM1, el número de repeticiones CTG aumenta de generación en generación. Por consiguiente, la edad de aparición desciende y la gravedad de la enfermedad aumenta con las sucesivas generaciones. Este fenómeno se conoce como anticipación genética y es característico en algunas mutaciones dinámicas (Harper *et al.* 1992). El fenómeno de anticipación se debe a la inestabilidad de las secuencias repetitivas en la línea germinal de los progenitores. De manera que, durante la gametogénesis el número de tripletes puede aumentar o en ocasiones disminuir. Con el paso de generaciones el aumento en el número de repeticiones puede alcanzar el rango patológico.

En 1994, se describieron tres casos de pacientes con manifestaciones clínicas de DM1 pero que no presentaban una expansión patológica del trinucleótido CTG en el gen *DMPK* (Thornton *et al.* 1994). Siete años después, se describió una segunda mutación dinámica en la región cromosómica 3q21.3 (Liquori *et al.* 2001). Esta mutación consiste en la expansión de repeticiones CCTG en el intrón 1 del gen de *CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein* (*CNBP*, Entrez 7555). La enfermedad causada por esta mutación recibe el nombre de DM2 (OMIM #602668) y representa el 2 % de los casos detectados de distrofia miotónica. En DM2, el rango patológico va desde 75 hasta 11.000 repeticiones CCTG. Los síntomas de este tipo de distrofia miotónica son similares a los de DM1 aunque suelen ser más leves en DM2.

1.2. Mecanismo molecular de patogénesis

El hecho de que dos mutaciones dinámicas en genes diferentes causen enfermedades con sintomatología similar sugiere un mecanismo de patogénesis común basado en la toxicidad de RNA. La confirmación decisiva de esta hipótesis en la que la expresión de RNAs con expansiones del trinucleótido CUG resultan tóxicas provino de la generación de modelos animales. En el año 2000 Mankodi y colaboradores describieron el primer ratón transgénico que expresaba RNAs con repeticiones CUG en un contexto génico independiente de *DMPK* (Mankodi *et al.* 2000). En concreto, estos ratones presentan un transgén con 250 repeticiones CTG en la región 3' UTR del gen de la actina humana, un gen no relacionado con DM1 pero que se expresa en músculo esquelético. Estos ratones transgénicos desarrollan miotonía, defectos musculares y eventos de *splicing* alterados característicos de la DM1 (Mankodi *et al.* 2000, Lin *et al.* 2006), lo que demuestra que las repeticiones CTG son tóxicas *per se*. La generación de otros modelos en *C. elegans*, *Drosophila* y pez cebra ha confirmado la toxicidad de las repeticiones CTG independientemente del gen *DMPK* (Chen *et al.* 2007, de Haro *et al.* 2006, Wang *et al.* 2011, Garcia-Lopez *et al.* 2008, Picchio *et al.* 2013, Todd *et al.* 2014).

El estudio de la localización subcelular de los transcritos de *DMPK* en células de pacientes de DM1 mostró que los transcritos con expansiones CUG se acumulan en el núcleo en forma de inclusiones ribonucleares o *foci* (Fig. I-2)(Davis *et al.* 1997, Taneja *et al.* 1995). Posteriormente, se demostró que las repeticiones CUG adquieren una estructura secundaria en forma de horquilla estable y que la estabilidad de la horquilla es mayor cuando los RNAs presentan repeticiones en rango patogénico (CUG > 50) (Napierala y Krzyzosiak 1997, Tian *et al.* 2000, Mooers *et al.* 2005). En los núcleos de las células DM1, proteínas de unión a RNA interaccionan con estas horquillas de RNA y quedan retenidas en los *foci*. El secuestro de factores de transcripción y de *splicing* alternativo en los *foci* ribonucleares provoca la falta de función de estas proteínas generando alteraciones en la expresión génica y el *splicing* de transcritos característicos de la DM1.

El modelo de ganancia de función tóxica del RNA fue propuesto por primera vez para la DM1 y la DM2. Sin embargo, hasta la fecha se ha demostrado la implicación de este mecanismo en otras enfermedades debidas a expansiones de trinucleótidos (Echeverria y Cooper 2012). Tanto la ataxia espinocerebelar tipo 8 (SCA8, OMIM #603680) como la enfermedad de Huntington tipo 2 (HDL2, OMIM #606438) están causadas, al igual que la DM1, por mutaciones dinámicas del trinucleótido CTG. Estas mutaciones se encuentran en la región no codificante del gen *ataxina 8* (*ATXN8* o *SCA8*, Entrez #724066) en SCA8 y en un exón alternativo del gen *juntofilina-3* (*JPH3*, Entrez #57338) en el caso de la HDL2. Se ha demostrado que

Introducción

los transcritos con repeticiones CUG forman *foci* ribonucleares, similares a los de DM1, en tejido nervioso de pacientes de ambas enfermedades (Chen *et al.* 2009, Daughters *et al.* 2009, Rudnicki *et al.* 2007). La ganancia de función tóxica no es exclusiva en enfermedades causadas por repeticiones CTG ya que se ha demostrado la presencia de *foci* y falta de función de proteínas nucleares en enfermedades con otro tipo de expansiones como el síndrome del X frágil (OMIM #300624), causada por repeticiones CGG, la ataxia espinocerebelar 3 (SCA3, OMIM #109150), causada por repeticiones CAG, la ataxia espinocerebelar 10 (SCA10, OMIM #603516), causada por repeticiones ATTCT, o la esclerosis lateral amiotrófica/demencia frontotemporal (ALSFTD, OMIM #105550), causada por repeticiones GGGGCC (Sellier *et al.* 2010, Tassone *et al.* 2004, Hsu *et al.* 2011, Li *et al.* 2008, Wakamiya *et al.* 2006, DeJesus-Hernandez *et al.* 2011, Neumann *et al.* 2006).

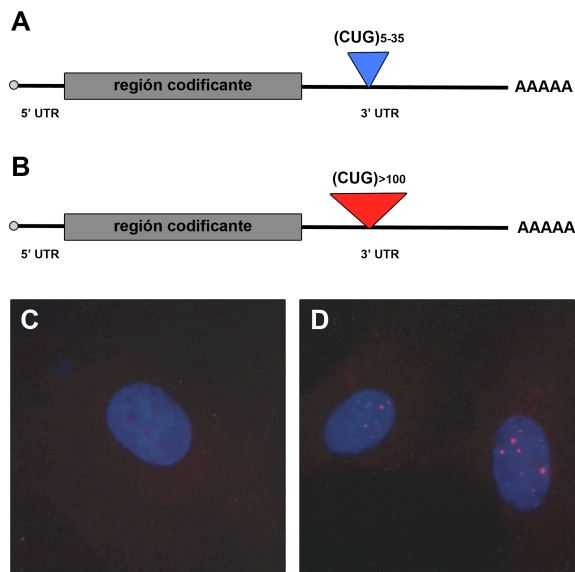


Figura I-2. Los transcritos de *DMPK* mutantes forman inclusiones ribonucleares en los núcleos de fibroblastos de pacientes DM1.

Esquema de transcritos del gen *DMPK* normal (A) con una longitud de 5-35 repeticiones CUG y mutante (B) con un rango de repeticiones patológico. (C y D) Hibridación *in situ* en fibroblastos humanos con una sonda (CAG)₃₀ marcada con Cy3 (rojo) para la detección de los transcritos con repeticiones CUG. En fibroblastos DM1, los transcritos *DMPK* se acumulan en inclusiones ribonucleares (D), pero no en fibroblastos de un individuo sano (C). En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI. Imágenes tomadas de Taneja *et al.* (1995).

1.2.1. Alteración de factores de *splicing* alternativo y *espliceopatía*

La *espliceopatía* es una de las características moleculares principales en DM1. Los transcritos de *DMPK* con expansiones de repeticiones CUG alteran la distribución celular normal de factores de *splicing* alternativo lo que origina la activación de patrones fetales de *splicing* en los tejidos adultos (Fig. I-3). Por un lado, las proteínas de la familia Muscleblind, MBNL1-3 (del inglés *Muscleblind-like protein*) se encuentran secuestradas en los *foci* de las células DM1, lo que provoca una falta parcial de su función (Fardaei *et al.* 2002, Kino *et al.* 2004, Mankodi *et al.* 2001, Miller *et al.* 2000, Jiang *et al.* 2004). Por otro lado, los niveles de la proteína CELF1 (del inglés *CUGBP, Elav-like family member 1*) están aumentados en las células DM1 debido a la hiperfosforilación de dos regiones de la proteína, una mediada por la proteína quinasa C (PKC) y la otra por la activación de la ruta Akt/GSK3 β . Estas fosforilaciones provocan la estabilización de la proteína en los núcleos celulares (Savkur *et al.* 2001, Timchenko *et al.* 2001, Kuyumcu-Martinez *et al.* 2007, Salisbury *et al.* 2008). MBNL1 y CELF1 regulan el *splicing* alternativo de manera antagonista de forma que el balance entre ambas proteínas determina la exclusión o inclusión de exones específicos. El desequilibrio de este balance en DM1 origina defectos en el *splicing* de un gran número de transcritos (Philips *et al.* 1998, Ho *et al.* 2004, Lin *et al.* 2006, Savkur *et al.* 2001, Du *et al.* 2010). Por ejemplo, en la regulación del exón 5 del transcrito de la troponina cardíaca (TNNT2), mientras MBNL1 reprime su inclusión, CELF1 la promueve. Ambas proteínas reconocen regiones diferentes en los transcritos inmaduros por lo que su antagonismo no se debe a fenómenos de competencia por el sitio de unión (Philips *et al.* 1998, Ho *et al.* 2004).

Durante el desarrollo los niveles de CELF1 disminuyen en el corazón hasta niveles apenas detectables en adultos y MBNL1 sufre un cambio de localización subcelular de citoplasma a núcleo. Un estudio de los cambios en los patrones de *splicing* durante el desarrollo del corazón en ratón, reveló que parte de estas transiciones están reguladas por MBNL1, CELF o ambas (Kalsotra *et al.* 2008). Estos resultados demostraron la relevancia de ambas proteínas en la transición de patrones de *splicing* durante el desarrollo y proponen una explicación a la detección de patrones fetales de *splicing* en tejidos de pacientes DM1.

Otros factores de *splicing* se encuentran alterados en las células DM1. Por ejemplo, la proteína Staufen-1 cuya expresión está aumentada en músculo esquelético de pacientes con DM1 (Ravel-Chapuis *et al.* 2012) o las proteínas heterogéneas nucleares hnRNP F y hnRNP H que se encuentran retenidas en los *foci* ribonucleares (Jiang *et al.* 2004, Kim *et al.* 2005). Aunque la consecuencia de la alteración de estos factores de *splicing* no está tan estudiada como en el caso de

Introducción

MBNL1 y CEFL1, la desregulación de estas proteínas puede contribuir a la *esplíceopatía* en DM1.

1.2.2. Alteración de la traducción de mRNAs

Además del *splicing* alternativo, CELF1 participa en otros procesos de regulación del metabolismo del RNA como la estabilidad de transcritos o su traducción a proteínas (Salisbury *et al.* 2008, Lee *et al.* 2010a). CELF1 se une a sus transcritos dianas y al factor de inicio de la traducción eIF2 promoviendo la traducción de *p21*, *C/EBP β* y *Mef2A* durante el desarrollo muscular (Iakova *et al.* 2004, Timchenko *et al.* 2004, Karagiannides *et al.* 2006). Estudios en ratones modelo para DM1, demostraron que la expresión de RNAs con repeticiones CUG aumenta la traducción de *C/EBP β* y *Mef2A*. La falta de función de *Celf1* en estos ratones mitiga el aumento de la traducción de estas proteínas (Kim *et al.* 2014).

1.2.3. Secuestro de factores de transcripción

En 2004 Ebralidze y colaboradores describieron el secuestro de factores de transcripción en los *foci* ribonucleares en un modelo celular de DM1 (Ebralidze *et al.* 2004). Demostraron que los transcritos con repeticiones CUG secuestran hasta el 90 % de algunos factores de transcripción como la *Specificity protein 1* (Sp1), los miembros 1 y 3 de la familia *signal transducer and activator of transcription* (STAT1, STAT3) y el receptor gamma del ácido retinoico (RAR γ). El secuestro de factores de transcripción contribuye a la alteración de la expresión génica en DM1 y por consiguiente a su patología molecular. Por ejemplo, la reducción del *canal de cloro tipo 1*, (*ClC-1*) cuya alteración se ha ligado a la miotonía, se debe en parte al secuestro de Sp1 en los *foci* ribonucleares, dado que el gen del *ClC-1* es una diana transcripcional directa de Sp1 (Berg *et al.* 2004).

1.2.4. Haploinsuficiencia de DMPK

El hecho de que los transcritos *DMPK* con expansiones CUG queden retenidos en los *foci* ribonucleares llevó a pensar que la falta de función parcial de *DMPK* contribuye a la patogénesis de la DM1. Diferentes estudios analizaron los niveles de *DMPK* en DM1 obteniéndose resultados contradictorios. Algunos estudios indicaron que los niveles de *DMPK* estaban reducidos tanto a nivel de transcrito como de proteína en DM1, aunque no se estableció una correlación entre el tamaño de las expansiones CTG y la disminución de *DMPK* (Fu *et al.* 1993, Novelli *et al.* 1993, Salvatori *et al.* 2005). Sin embargo otros estudios apuntan a que los niveles de los transcritos *DMPK* mutantes no están reducidos e incluso los niveles de proteína *DMPK* son ligeramente superiores en los tejidos DM1 (Eriksson *et al.* 1999, Narang *et al.* 2000).

La generación de ratones *knock-out* para *Dmpk* contribuyó a analizar las implicaciones de *DMPK* en la DM1. Estos ratones padecen miopatía tardía muy leve que no es característica de DM1 (Reddy *et al.* 1996, Jansen *et al.* 1996), defectos en la conducción cardíaca (Berul *et al.* 1999, Berul *et al.* 2000, Pall *et al.* 2003) e intolerancia a la glucosa (Llagostera *et al.* 2007). Por lo tanto, la reducción de *DMPK* podría contribuir a la sintomatología cardíaca y la resistencia a la insulina de la DM1. Sin embargo, el hecho de que la sintomatología de DM2 sea similar a la DM1 a pesar de que no implica a *DMPK* y que no se hayan encontrado mutaciones puntuales de falta de función responsables de DM1 apuntan a que la haploinsuficiencia de *DMPK* no es una causa principal en el desarrollo patológico en DM1.

1.2.5. Cambios en la estructura local de la cromatina

La expansión de trinucleótidos CTG forma elementos preferenciales para los nucleosomas lo que provoca la alteración de su localización promoviendo su formación y estabilización en DM1 (Wang *et al.* 1994, Wang y Griffith 1995, Volle y Delaney 2012). Además, la expansión de repeticiones CTG inducen un aumento en la metilación de sitios CpG que las flanquean y un aumento de la heterocromatina en su región (Lopez Castel *et al.* 2011b, Brouwer *et al.* 2013). Estos cambios epigenéticos producen un silenciamiento de la región genómica de *DMPK* que afecta a sus genes adyacentes *SIX5* (Entrez #147912) y *DMWD* (Entrez #1762) detectándose una reducción de la expresión de ambos genes en DM1 (Thornton *et al.* 1997, Alwazzan *et al.* 1999). Aunque se desconoce el papel de la falta de función de *SIX5* y *DMWD* en DM1, estudios en ratón y de sus patrones de expresión sugieren que podrían contribuir a la atrofia testicular y problemas neurológicos de los pacientes de DM1, sin embargo esta relación aun no se ha confirmado (Sarkar *et al.* 2000, Westerlaken *et al.* 2003).

1.2.6. Transcripción bidireccional, RNA de interferencia y traducción no canónica asociada a repeticiones

Se estima que más del 70 % del genoma de mamíferos se transcribe en ambos sentidos (Katayama *et al.* 2005). La mayoría de transcritos antisentido son no codificantes mientras que sus transcritos sentido correspondientes si que codifican para una proteína (Faghihi y Wahlestedt 2009). Se ha propuesto que los transcritos antisentido regulan la expresión génica tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional.

La transcripción bidireccional es una característica común en los *loci* con expansiones de repeticiones de trinucleótidos (Batra *et al.* 2010). En DM1, se han

Introducción

detectado transcritos *DMPK* antisentido (Cho *et al.* 2005, Zu *et al.* 2011). Aunque el papel de estos RNAs con repeticiones CAG en la patogénesis de la DM1 todavía no está claro, inicialmente se sugirió que pueden actuar regulando la expresión génica modificando la cromatina (Cho *et al.* 2005). Posteriormente se demostró que estos transcritos antisentido se acumulan en forma de *foci* ribonucleares en los tejidos de pacientes y ratones modelo para la DM1 (Huguet *et al.* 2012). MBNL1 colocaliza con estos *foci* formados por transcritos CAG lo que sugiere que la transcripción bidireccional de *DMPK* contribuye a la toxicidad mediada por la ganancia de función del RNA (Hsu *et al.* 2011, Huguet *et al.* 2012).

La co-expresión de transcritos con repeticiones CAG y CUG en *Drosophila* tiene un efecto sinérgico, los fenotipos de estas moscas son más graves que los de las que expresan los transcritos con repeticiones CAG y CUG por separado (Yu *et al.* 2011, Lawlor *et al.* 2011, Lawlor *et al.* 2012). En estas moscas los RNAs CAG y CUG hibridan y son procesados por la maquinaria de RNA de interferencia generando fragmentos de 21 nucleótidos que reconocen y silencian transcritos que contienen secuencias ricas en estas repeticiones. Además, los transcritos con repeticiones CAG y CUG pueden formar horquillas de simple cadena apareándose con ellos mismos. Estas horquillas imperfectas también son reconocidas y procesadas por la maquinaria de RNA de interferencia (Krol *et al.* 2007, de Mezer *et al.* 2011). Por lo tanto la transcripción bidireccional de *DMPK* activa la biogénesis de siRNAs lo que contribuye a la alteración de la expresión génica mediada por la toxicidad de RNAs con repeticiones CUG.

La traducción no canónica asociada a repeticiones (traducción RAN) se produce independiente del codón de iniciación ATG en todas las pautas de lectura. Fue descrita por primera vez para la SCA8 por Zu y colaboradores cuando intentaban estudiar por separado la toxicidad mediada por la ganancia tóxica de RNA y la proteotoxicidad (Zu *et al.* 2011). Los autores eliminaron el codón de inicio del gen de la ataxina 8 (*ATXN8*) para estudiar el papel de la toxicidad mediada por RNAs con repeticiones CAG en SCA8. Sorprendentemente, observaron la presencia de agregados de poliglutaminas en las células transfectadas con este minigen mutado. Además, comprobaron que la traducción RAN se produce en las 3 pautas de lectura de las repeticiones CAG, acumulándose en las células agregados tanto de poliglutaminas como de poliserinas y de polialaninas. Para determinar si la traducción RAN se produce *in vivo*, analizaron cerebros de autopsias de pacientes de SCA8. Detectaron agregados de polialaninas en las células de Purkinje en cerebros de pacientes de SCA8 pero no en cerebros de controles sanos lo que confirmó que la traducción RAN forma parte del mecanismo de patogénesis molecular de la SCA8.

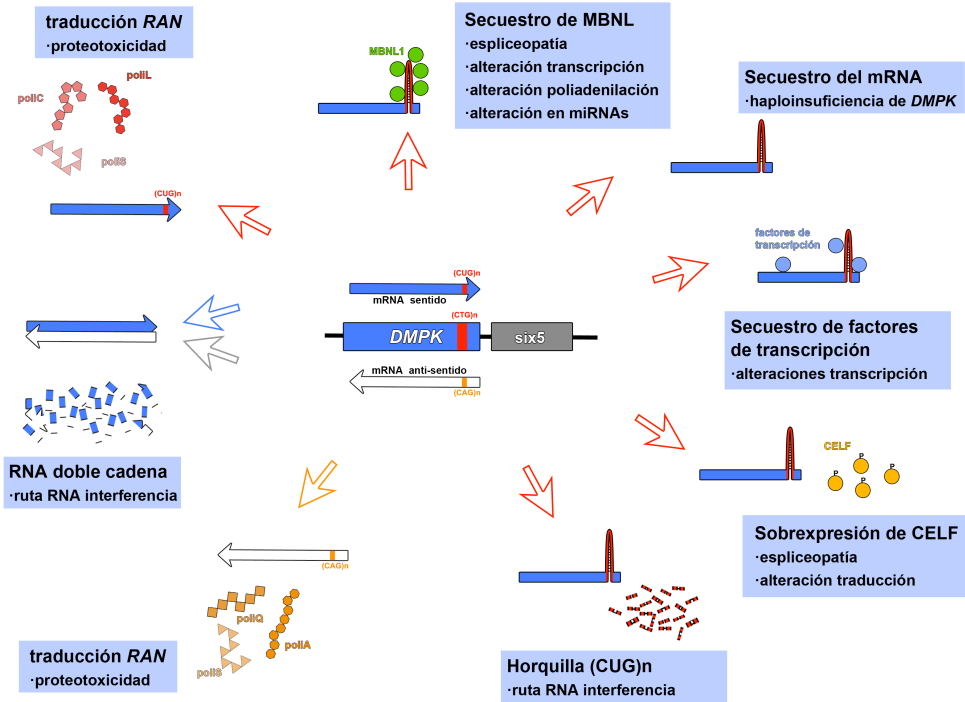


Figura I-3. Mecanismos moleculares de patogénesis en DM1.

El gen *DMPK* con repeticiones CTG se transcribe en ambas direcciones generando transcritos con repeticiones CUG y CAG. Las repeticiones CUG en los transcritos sentido forman horquillas que secuestran factores de transcripción y de *splicing* como MBNL1 y quedan retenidos en el núcleo en los *foci* ribonucleares provocando alteraciones en la transcripción, en miRNAs y en el *splicing* alternativo y la probable haploinsuficiencia de *DMPK*. La activación de CELF genera defectos en el *splicing* y la traducción. Tanto las horquillas CUG como la hibridación de transcritos sentido y anti-sentido activa la ruta de RNAi. Además ambos transcritos pueden sufrir traducción RAN en todas sus pautas de lectura generando homopolímeros tóxicos para las células.

Los mismos autores demostraron que la traducción RAN también ocurre en transcritos antisentido con repeticiones CAG provenientes de la transcripción bidireccional de los transcritos con repeticiones CUG en DM1 (Zu *et al.* 2011). Detectaron agregados de poliglutaminas en mioblastos, músculo esquelético y sangre de pacientes de DM1 así como en tejidos de un modelo de DM1 en ratón, demostrando que la traducción RAN ocurre *in vivo* en los tejidos de pacientes de DM1. Aunque el mecanismo molecular de la traducción RAN requiere estudios futuros, resultados preliminares sugieren que podría contribuir a la patogénesis de la DM1. Se ha descrito la colocalización de los péptidos generados por la traducción

RAN con marcadores de apoptosis tanto en cultivos celulares como en ratones modelo de DM1 (Zu et al. 2011), por lo que la traducción RAN podría contribuir a la degeneración muscular en DM1.

2. Las proteínas de la familia Muscleblind

Las proteínas Muscleblind (Mbl) son factores de *splicing* alternativo que regulan la transición de patrones de *splicing* durante el desarrollo en tejidos específicos como el muscular, cardíaco y nervioso (revisado en Fernandez-Costa et al. 2011). Las proteínas Mbl se identificaron inicialmente en *Drosophila melanogaster* (Begemann et al. 1997, Artero et al. 1998) y posteriormente se describieron en otros artrópodos (*Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Bombix mori*), en nematodos (*Caenorhabditis elegans*) y en vertebrados (Pascual et al. 2006, Fardaei et al. 2002, Wang et al. 2008, Sasagawa et al. 2008, Liu et al. 2008). En invertebrados existe un único gen *muscleblind* mientras que los genomas de vertebrados presentan tres genes parálogos (MBNL1-3), excepto en pez globo, *Takifugu rubripes* donde se han encontrado cinco parálogos (Fernandes et al. 2007). Tanto en vertebrados como en invertebrados, los genes *muscleblind* codifican para diferentes isoformas.

La característica estructural de las proteínas Mbl es la presencia de motivos estructurales de tipo dedo de zinc CCCH en su extremo N terminal. Los dedos de zinc median el reconocimiento de las dianas de Mbl a través de la unión a horquillas de RNA de doble cadena con desapareamientos de pirimidinas. Diferentes estudios *in vitro* han concluido que este reconocimiento está conservado entre *Drosophila* y humanos (Goers et al. 2008, Warf y Berglund 2007), además la proteína MBNL1 humana es capaz de complementar la falta de función del gen *muscleblind* en *Drosophila* rescatando la letalidad embrionaria en embriones mutantes para *mbl* (Monferrer y Artero 2006). Estos estudios demuestran que la proteína humana y la de *Drosophila* son intercambiables funcionalmente.

Un segundo motivo funcional de las proteínas Mbl es el motivo KRAEK. Esta región contiene cinco residuos conservados desde *C. elegans* hasta humanos y se localiza en la región C terminal de las proteínas Muscleblind. El motivo KRAEK no participa en la actividad sobre el *splicing* de las proteínas Mbl pero es necesario para su correcta localización nuclear (Fernandez-Costa y Artero 2010, Vicente-Crespo et al. 2008, Kino et al. 2015). En la proteína humana MBNL1, el motivo KRAEK se encuentra en el exón 8 del pre-mRNA. Estudios de localización subcelular en cultivos celulares demostraron que para la correcta localización de MBNL1 es necesaria la participación de un segundo motivo similar a KRAEK presente en el exón 7 del pre-mRNA (Tran et al. 2011, Kino et al. 2015, Terenzi y Ladd 2010). La inclusión de este exón en el mRNA maduro está regulada por la misma MBNL1 (Gates et al. 2011) de manera que la actividad de MBNL1 está autoregulada

mediante el acoplamiento del control de la localización nuclear y el *splicing* alternativo.

2.1. Implicación de las proteínas Muscleblind en el metabolismo de RNAs

Las proteínas Muscleblind participan en el metabolismo de los RNAs a varios niveles. Diferentes estudios han demostrado la implicación de miembros de la familia Muscleblind en diferentes procesos como la estabilidad de mRNAs (Osborne *et al.* 2009, Du *et al.* 2010, Masuda *et al.* 2012), en la localización subcelular de transcritos (Adereth *et al.* 2005, Wang *et al.* 2012), la regulación de la poliadenilación (Batra *et al.* 2014, Lu 2011, Goodwin *et al.* 2015) o la biogénesis de miRNAs (Rau *et al.* 2011). Sin embargo, la función mejor caracterizada es la de reguladores del *splicing* alternativo. En humanos, MBNL1 regula los cambios de patrones de *splicing* durante el desarrollo muscular y del corazón (Kalsotra *et al.* 2008, Lin *et al.* 2006), mientras que MBNL2 tiene un papel similar en el sistema nervioso central (Charizanis *et al.* 2012, Goodwin *et al.* 2015). El papel de MBNL3 como regulador del *splicing* es más dudoso ya que no se ha demostrado su actividad *in vivo*, aunque es capaz de controlar el *splicing* de determinados exones *in vitro* (Ho *et al.* 2004, Poulos *et al.* 2013).

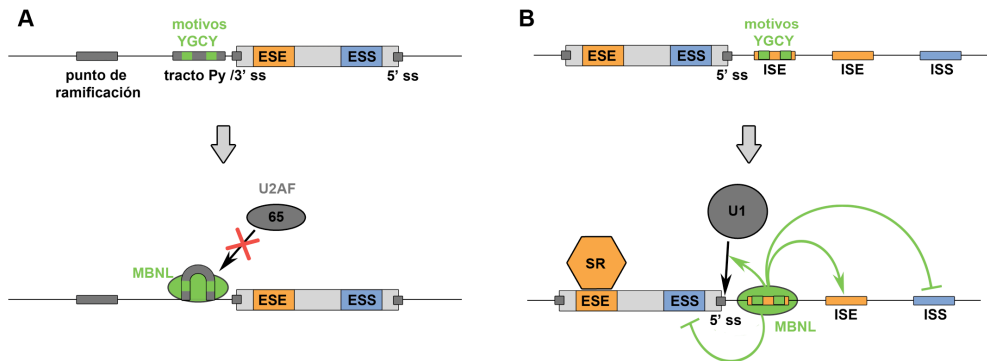


Figura I-4. Modelo posicional de la actividad de *splicing* de MBNL1.

Modelo de represión del *splicing* mediada por MBNL1 (A). MBNL1 se une a los motivos YGKY aguas arriba del sitio de *splicing* 3' del intrón y estabiliza una horquilla en el tracto de pirimidinas. La subunidad 65 del factor U2AF no puede reconocer el tracto de pirimidinas inhibiéndose el ensamblaje del espliceosoma e inhibiéndose el *splicing* de ese intrón. (B) MBNL1 se une a motivos YGKY aguas debajo de exones en los que activa su inclusión. Aunque el mecanismo de activación del *splicing* no está claro, se ha sugerido que MBNL1 podría inhibir el reconocimiento de las regiones inhibitoras del *splicing* (ISS), favorecer la unión de factores a regiones activadoras (ESS), o favorecer el reconocimiento del sitio de *splicing* 5' por el componente U1 del espliceosoma. Imagen modificada de Fernández-Costa *et al.* 2011.

Las proteínas Muscleblind regulan el *splicing* alternativo de transcritos específicos que codifican para proteínas estructurales en el sarcómero muscular como titinas, actinas, ZASP y diferentes troponinas, proteínas de adhesión y componentes del citoesqueleto como la proteína LIM1 de unión a actina, Nrap y fibronectina, proteínas implicadas en señalización como el receptor de insulina (IR), la sorbina (Sorbs1) o MTMR1 y proteínas de excitación y contracción como Serca-1, RyR y el canal de cloro (ClC-1), entre otras (Kanadia *et al.* 2003, Ho *et al.* 2004, Lin *et al.* 2006, Machuca-Tzili *et al.* 2006, Vicente *et al.* 2007, Kalsotra *et al.* 2008, Onishi *et al.* 2008, Vicente-Crespo *et al.* 2008, Kino *et al.* 2009, Kimura *et al.* 2009, Du *et al.* 2010, Picchio *et al.* 2013). Las proteínas Mbl de diferentes especies pueden regular el *splicing* de las dianas de sus ortólogos. Por ejemplo, Muscleblind de *Drosophila* se une al transcrito de la troponina cardíaca humana (Goers *et al.* 2008) y puede regular el *splicing* de la *Tnnt3* de ratón *in vitro* (Vicente-Crespo *et al.* 2008). Lo que indica que las dianas de las proteínas Muscleblind están conservadas.

Las proteínas Mbl pueden actuar como activadores o represores del *splicing* de exones específicos. Estudios de análisis global de *splicing* en músculo de ratones *knock-out* para *Mbnl1* demostraron que aproximadamente la mitad de los exones regulados por *Mbnl1* son incluidos en los transcritos maduros y la otra mitad excluidos (Du *et al.* 2010). MBNL1 reconoce motivos YGCY en sus dianas (Goers *et al.* 2010). Mediante aproximaciones bioinformáticas se analizaron los motivos de unión de MBNL1 en sus transcritos regulados y se determinó que MBNL1 se une aguas arriba de los exones que reprime y aguas debajo de los exones en los que promueve su inclusión (Du *et al.* 2010). Este descubrimiento sugiere un modelo posicional en el que la actividad de MBNL1 depende de su posición relativa al exón que regula (Fig. I-4). Modelos similares se han propuesto para otros factores de *splicing* específicos de tejido como las proteínas NOVA o FOX (Ule *et al.* 2006, Yeo *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2010). El modelo de represión mediada por MBNL1 está basado en la caracterización de la unión de MBNL1 a la troponina cardíaca humana (*TNNT2*) (Warf y Berglund 2007). En este modelo, MBNL1 se une a una estructura de horquilla cerca del sitio de *splicing* 3' del exón 5 y la estabiliza. La formación de esta horquilla inhibe el reconocimiento del sitio de *splicing* 3', específicamente el reconocimiento del tracto de pirimidinas por la subunidad 65 del factor U2AF y como consecuencia el exón se excluye del transcrito maduro (Warf *et al.* 2009a) (Fig. I-4, A). El mecanismo de activación del *splicing* por la unión a motivos YGCY aguas abajo del exón no está muy claro. En el caso del exón 11 del transcrito del *IR*, se ha demostrado que la activación del *splicing* mediada por MBNL1 es dependiente de factores activadores (proteínas SR) (Sen *et al.* 2010) por lo que se sugirió que MBNL1 puede actuar favoreciendo el reconocimiento de las regiones de activación del *splicing* (ESEs), reprimiendo el de las regiones

inhibidoras (ISSs) o ayudando al reconocimiento del sitio de *splicing* 5' por la maquinaria basal de *splicing* (Fig. I-4, B).

2.2. Papel de las proteínas Muscleblind en DM1

En los últimos años, se ha generado un número importante de modelos animales para DM1 así como mutantes para miembros de la familia *muscleblind*. El análisis de fenotipos en estos modelos a diferentes niveles ha determinado que las proteínas Mbl tienen un papel clave en el desarrollo de la patogénesis molecular de la DM1. Por ejemplo, la inactivación de *muscleblind* en *C. elegans* (*CeMbl*) provoca una desorganización de los cuerpos densos musculares y problemas locomotores en gusanos adultos similares a los observados en gusanos que expresan un RNA con 125 repeticiones CUG (Wang *et al.* 2008, Chen *et al.* 2007). En *Drosophila*, los mutantes nulos para *mbl* presentan problemas en la diferenciación terminal del músculo, así como parálisis parcial e hipercontracción del abdomen de las larvas (Artero *et al.* 1998). Un paso importante en el estudio de la implicación de Mbl en DM1 fue el desarrollo de ratones *knock-out*. Los ratones *knock-out* para *Mbnl1* desarrollan cataratas, miotonía y desorganización histológica del músculo similar a la de los pacientes, aunque no desarrollan degeneración muscular (Kanadia *et al.* 2003). Además los *knock-out* para *Mbnl2* también desarrollan miotonía y patología muscular (Hao *et al.* 2008), así como problemas en el SNC como trastornos del sueño, problemas cognitivos y defectos en la transmisión sináptica (Charizanis *et al.* 2012). Recientemente, se han generado ratones *knock-out* compuestos *Mbnl1^{-/-}*, *Mbnl2^{+/-}*. Estos ratones desarrollan *esplíceopatía* y defectos en la poliadenilación de transcritos en el SNC similares a los observados en cerebros DM1 (Goodwin *et al.* 2015). La demostración definitiva del papel clave de Mbl en DM1 se consiguió sobrexpresando la proteína en modelos animales de DM1. La sobrexpresión de *Mbnl1* en un ratón que expresa 250 repeticiones CUG revertió tanto la *esplíceopatía* como la miotonía (Kanadia *et al.* 2006, Chamberlain y Ranum 2012). De manera similar, la sobrexpresión de MBNL1 humano en moscas que expresan 480 repeticiones CTG suprime varios fenotipos provocados por las repeticiones como la degeneración muscular o fenotipos de ojo rugoso (de Haro *et al.* 2006, Garcia-Lopez *et al.* 2008, Bargiela *et al.* 2015). Estos resultados apoyan la idea de que el secuestro de las proteínas Mbl en los *foci* ribonucleares y su subsecuente falta de función es el principal desencadenante de la patogénesis molecular de la DM1. De hecho, la mayoría de las estrategias terapéuticas están dirigidas a aumentar MBNL1 o inhibir su interacción con los RNA tóxicos en células DM1 (Gareiss *et al.* 2008, Warf *et al.* 2009b, Lee *et al.* 2009, Pushechnikov *et al.* 2009, Childs-Disney *et al.* 2013, Wong *et al.* 2014, Arambula *et al.* 2009).

Introducción

Tabla I-1. Transcritos con defectos de *splicing* en DM1 y ratones *knock-out* para *Mbnl1*

Transcrito	Exón	Tejido	Referencia
<i>APL</i>	ex 5a, ex 5b	Músculo	(Lin <i>et al.</i> 2006)
<i>ATP2A1</i>	ex 22	Músculo	(Kimura <i>et al.</i> 2005, Lin <i>et al.</i> 2006)
<i>CAMK2D</i>	ex 14, ex 15	SNC	(Suenaga <i>et al.</i> 2012)
<i>CAPN3</i>	ex 16	Músculo	(Lin <i>et al.</i> 2006)
<i>CLC-1</i>	in 2, ex 7a, ex 8a	Músculo	(Mankodi <i>et al.</i> 2002, Charlet <i>et al.</i> 2002, Salvatori <i>et al.</i> 2009)
<i>DCLK1</i>	ex 19	SNC	(Suenaga <i>et al.</i> 2012)
<i>FHOS</i>	ex 11a	Músculo	(Lin <i>et al.</i> 2006)
<i>GFAT1</i>	ex 10	Músculo	(Lin <i>et al.</i> 2006)
<i>INSRI</i>	ex 11	Músculo	(Savkur <i>et al.</i> 2001, Sen <i>et al.</i> 2010)
<i>m-Titin</i>	M-line ex 5	Músculo	(Lin <i>et al.</i> 2006, Mankodi <i>et al.</i> 2001)
<i>MAPT</i>	ex 3, ex 12	SNC	(Suenaga <i>et al.</i> 2012)
<i>MBNL1</i>	ex 7	Músculo	(Lin <i>et al.</i> 2006)
<i>MBNL2</i>	ex 7	Músculo	(Lin <i>et al.</i> 2006)
<i>MRIP</i>	ex 9	SNC	(Suenaga <i>et al.</i> 2012)
<i>NFIX</i>	ex 123	Músculo	(Du <i>et al.</i> 2010)
<i>NRAP</i>	ex 12	Músculo	(Lin <i>et al.</i> 2006)
<i>PDLIM3</i>	ex 5	Corazón	(Kalsotra <i>et al.</i> 2008, Nakamori <i>et al.</i> 2013)
<i>PPLR5C</i>	ex 117	Músculo	(Du <i>et al.</i> 2010)
<i>SMYD</i>	ex 39	Músculo	(Du <i>et al.</i> 2010)
<i>SORBS1</i>	ex 26	SNC	(Suenaga <i>et al.</i> 2012, Nakamori <i>et al.</i> 2013)
<i>SPAG9</i>	ex 39	Músculo	(Du <i>et al.</i> 2010)
<i>TAU</i>	ex 2	SNC	(Dhaenens <i>et al.</i> 2008, Sergeant <i>et al.</i> 2001, Carpentier <i>et al.</i> 2014)
<i>TNNT2</i>	ex 5	Corazón	(Kalsotra <i>et al.</i> 2008, Philips <i>et al.</i> 1998)
<i>TNNT3</i>	exón fetal	Músculo	(Kanadia <i>et al.</i> 2003, Salvatori <i>et al.</i> 2009, Yuan <i>et al.</i> 2007)
<i>z-Titin</i>	ex Zr4, ex Zr5	Músculo	(Lin <i>et al.</i> 2006)
<i>ZASP</i>	ex 11	Músculo/Corazón	(Lin <i>et al.</i> 2006, Mankodi <i>et al.</i> 2001, Kalsotra <i>et al.</i> 2008)

La *esplíceopatía* es una característica molecular fundamental en DM1. Al menos se han encontrado 26 defectos de *splicing* en músculo esquelético, corazón y sistema nervioso central de pacientes con DM1 que se reproducen en ratones *knock-out* para *Mbnl1* (Tabla I-1). Además, análisis de expresión global de *splicing* en ratones modelo revelaron la correlación de defectos de *splicing* entre ratones que expresan 250 repeticiones CTG y ratones *knock-out* para *Mbnl1* (Du *et al.* 2010). De 221 eventos de *splicing* alterados un 80 % está en ambos ratones modelo lo que sugiere un papel clave de MBNL1 en la *esplíceopatía* que desarrollan los pacientes. A parte de la *esplíceopatía*, la expresión génica también está alterada en ratones DM1. Al menos 175 genes se expresan de manera anormal en ratones que expresan 250 repeticiones CTG. Estas alteraciones también correlacionan con las observadas en ratones *knock-out* para *Mbnl1* de manera que la falta de función de *Mbnl1* puede explicar el 75 % de los defectos de expresión (Du *et al.* 2010, Osborne *et al.* 2009). El análisis de clases funcionales de estos genes demostró que genes cuyas alteraciones son dependientes de *Mbnl1* están relacionados con la señalización de la insulina y el metabolismo de la glucosa mientras que las alteraciones independientes de *Mbnl1* corresponden a componentes de la matriz extracelular. Estos resultados apuntan a que la mayoría de defectos en el *splicing* y en la expresión génica provocados por RNAs tóxicos con repeticiones CUG están mediados por la falta de función de MBNL1.

3. Un modelo de DM1 en *Drosophila*

La generación de animales modelo para la DM1 ha sido clave para caracterizar los mecanismos de patogénesis de esta enfermedad tan compleja y determinar los elementos implicados y asociarlos a síntomas concretos. Para modelizar la enfermedad se han utilizado tanto animales invertebrados como vertebrados. En invertebrados se ha utilizado el gusano, *Caenorhabditis elegans* y la mosca, *Drosophila melanogaster*, mientras que en vertebrados se ha utilizado principalmente el ratón, *Mus musculus*, aunque también se han creado modelos en el pez cebra, *Danio rerio*. En todos los casos los modelos de DM1 se han conseguido expresando RNAs con repeticiones CUG en diferentes tejidos implicados en la patología y se han obtenido fenotipos típicos la de DM1 (Chen *et al.* 2007, de Haro *et al.* 2006, Garcia-Lopez *et al.* 2008, Picchio *et al.* 2013, Todd *et al.* 2014, Mankodi *et al.* 2000, Seznec *et al.* 2000, Seznec *et al.* 2001, Mahadevan *et al.* 2006, Wang *et al.* 2007).

Introducción

En nuestro laboratorio se generaron unas moscas que expresan 60 repeticiones CTG no traducibles. En estas moscas los RNAs con repeticiones CUG no formaban *foci* ribonucleares pero si que se detectaron defectos en el *splicing* de los transcritos de ZASP y la *troponina T (tnT)* (Fig I-5, G) (Garcia-Lopez *et al.* 2008, Vicente-Crespo *et al.* 2008). Para conseguir la expresión de expansiones de repeticiones CTG mas largas en nuestro laboratorio, y en otros grupos en paralelo, se generó un modelo en *Drosophila* por la expresión de 480 repeticiones CTG cuyo transgén está formado por repeticiones sintéticas interrumpidas cada 20 tripletes por el pentanucleótido CTCGA (Philips *et al.* 1998, de Haro *et al.* 2006, Garcia-Lopez *et al.* 2008). La expresión de 480 repeticiones CTG en músculo de *Drosophila* reproduce varios aspectos de la enfermedad en humanos como el secuestro de las proteínas Muscblind en los *foci* ribonucleares, la degeneración progresiva de los músculos indirectos del vuelo, alteraciones en el *splicing* o la reducción de la vida media de las moscas (Fig. I-5). Estas moscas reproducen, al menos en parte, la ruta de patogénesis de la enfermedad ya que la sobreexpresión de Muscblind y CELF1 modifican estos fenotipos (de Haro *et al.* 2006, Garcia-Lopez *et al.* 2008).

El modelo de DM1 en *Drosophila* se ha utilizado para llevar a cabo dos rastreos genéticos para encontrar nuevos componentes de la ruta de patogénesis de la enfermedad. En un primer trabajo, se identificaron 15 modificadores genéticos implicados en procesos celulares que no se habían relacionado con la DM1 hasta la fecha (Garcia-Lopez *et al.* 2008). Entre estos modificadores encontramos genes implicados en apoptosis, remodelación de la cromatina, transporte de mRNAs o de la matriz extracelular. Estudios posteriores han confirmado la implicación de algunos de estos procesos en DM1. Por ejemplo, se ha determinado que la apoptosis está aumentada en células de pacientes con DM1 y que es en parte responsable de la atrofia muscular en un modelo de DM1 en *Drosophila* (Loro *et al.* 2010, Bargiela *et al.* 2015). También se ha confirmado la alteración de la expresión de diferentes componentes de la matriz extracelular en ratones modelo para la DM1 (Du *et al.* 2010). En un segundo rastreo genético se identificaron 34 nuevos modificadores genéticos entre los que destacan dos proteínas de unión a RNA, TBPH, el ortólogo de TDP-43 de humanos y BSF, ortólogo de LRPPRC (Llamusi *et al.* 2013). Además, este modelo de DM1 en *Drosophila* se ha utilizado de manera exitosa para llevar a cabo rastreos químicos en los que se han identificado moléculas supresoras de fenotipos de DM1 que suponen potenciales terapias para la enfermedad (Garcia-Lopez *et al.* 2008, Garcia-Lopez *et al.* 2011, Garcia-Alcover *et al.* 2014).

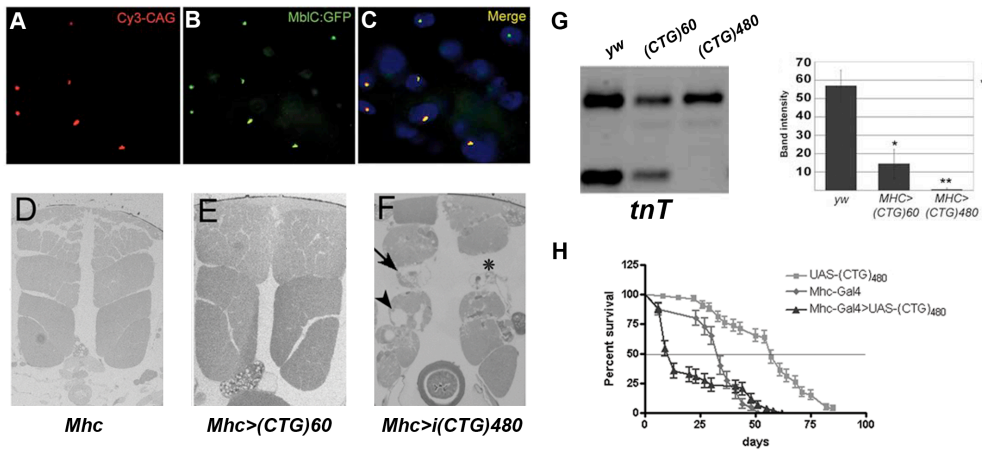


Figura I-5. Fenotipos de la DM1 en un modelo de la enfermedad en *Drosophila*.

La expresión de 480 repeticiones CTG en músculo de *Drosophila* provoca fenotipos típicos de la DM1: *foci* ribonucleares en los núcleos celulares del músculo donde colocaliza la proteína Muscleblind C (A-C), degeneración de los músculos indirectos del vuelo (D-F), alteraciones del *splicing* de la *tnT* (G) y reducción de la vida media de las moscas (H). La flechas indican la presencia de vacuolas y el asterisco la falta de paquetes musculares. Figuras tomadas de Garcia-Lopez *et al.*, 2008.

4. MicroRNAs

Los microRNAs (miRNAs, miRs) son RNAs no codificantes, monocatenarios y de pequeño tamaño (20 – 24 pares de bases). Exceptuando algún caso, los miRNAs regulan la expresión a nivel post-transcripcional. Generalmente, se unen a la región 3' *UTR* de sus RNA mensajeros diana bloqueando su traducción o induciendo su degradación en el citoplasma (Ambros 2004). Desde su descubrimiento en la década de los 90, se han descrito miles de miRNAs en animales y plantas y actualmente está reconocida su implicación no solo en el desarrollo y en la diferenciación celular, sino también en múltiples funciones fisiológicas por lo que su desregulación es importante en un gran número de patologías (Ha 2011).

4.1. Organización genómica de los miRNAs

Los miRNAs pueden clasificarse en diferentes categorías dependiendo de su localización en el genoma. La mayoría de los miRNAs humanos conocidos hasta la fecha (depositados en miRBase v. 21) son intergénicos (68 %). De entre los miRNAs intragénicos, un 12 % se encuentran en regiones intrónicas y el resto se localizan en exones codificantes, regiones repetitivas, RNAs no codificantes largos o regiones no codificantes (Londin *et al.* 2015). Los genes de miRNAs a menudo se

localizan cerca de otros miRNAs formando parte de clústers de miRNAs. Tanto los miRNAs que forman clústers como los que se localizan dentro de exones en genes hospedadores se suelen co-transcribir, de hecho se han descrito patrones de expresión comunes en varios casos (Baskerville y Bartel 2005). Por el contrario, los miRNAs intrónicos se pueden transcribir de manera independiente a su gen hospedador, incluso se han descrito diferencias en la expresión de miRNAs policistronicos dentro de intrones debido a que son regulados por *splicing* alternativo (Ramalingam *et al.* 2014).

4.2. Ruta de biogénesis de los microRNAs

En animales, los miRNAs son transcritos generalmente por la RNA polimerasa II como precursores primarios largos (pri-miRNAs) (Lee *et al.* 2004a). No obstante, se ha descrito la transcripción de pri-miRNAs por la RNA polimerasa III para miRNAs víricos, miRNAs derivados de tRNAs y miRNAs asociados a repeticiones Alu en humanos (Pfeffer *et al.* 2005, Babiarcz *et al.* 2008, Borchert *et al.* 2006). Dado que los pri-miRNAs son productos de la RNA polimerasa II, presentan caperuza de 7-metilguanosa (m⁷G) en 5' y están poliadenilados en su extremo 3' (Cai *et al.* 2004, Lee *et al.* 2002b). Cada pri-miRNA contiene una o varias horquillas precursoras de miRNAs (pre-miRNAs). En el núcleo, la RNasa III Droscha comienza el proceso de maduración de los miRNAs. Droscha reconoce y corta estas horquillas liberando pre-miRNAs de ~65 nt (Lee *et al.* 2003). Droscha requiere de la proteína de unión al RNA, DGCR8 (Pasha en *Drosophila*) como co-factor, juntas forman el complejo microprocesador (Denli *et al.* 2004, Gregory *et al.* 2004, Han *et al.* 2004). Tras ser procesados por el complejo microprocesador, los pre-miRNAs son exportados al citoplasma donde continua su maduración. En la exportación participa la proteína de unión a RNA de doble cadena, Exportina 5 (EXP5). EXP5 forma el complejo transportador junto al propio pre-miRNA y la proteína de unión a GTP, RAN-GTP. Tras la translocación a través del poro nuclear el GTP es hidrolizado y el complejo se disocia liberando el pre-miRNA en el citosol (Bohnsack *et al.* 2004, Lund *et al.* 2004, Yi *et al.* 2003). En el citoplasma los pre-miRNAs son procesados por una segunda RNasa III, Dicer (Dicer-1 en *Drosophila*). Dicer corta los pre-miRNAs en una región cercana al lazo de la horquilla liberando un RNA de doble cadena pequeño (21-15 nt) (Hutvagner *et al.* 2001). El enzima Dicer está conservado en los animales aunque en algunas especies existen diferentes parálogos con diferentes funciones. Por ejemplo, en *Drosophila*, Dicer-1 participa en la biogénesis de los microRNAs y Dicer-2 está implicado en la ruta de RNA de interferencia (Lee *et al.* 2004b). Otras proteínas de unión a RNA participan en el complejo catalítico como co-factores de Dicer. En *Drosophila*, la proteína Loquacious (Loqs) se une a Dicer-1 y es necesaria para la maduración de la mayoría de miRNAs (Forstemann *et al.* 2005, Saito *et al.* 2005). De manera similar, en humanos la proteína homóloga de Loqs, TRBP, modula la eficiencia del

procesado de algunos miRNAs (Lee y Doudna 2012, Fukunaga *et al.* 2012). Además el co-factor PACT también se une a Dicer aunque su papel en la maduración de los miRNAs aún no está claro (Lee *et al.* 2006). En el último paso en la maduración de los miRNAs, una de las dos hebras del RNA de doble cadena liberado por Dicer se integra junto a las proteínas Argonauta en el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Hammond *et al.* 2001, Gregory *et al.* 2005). Esta hebra constituye el miRNA maduro y es utilizado por el complejo RISC para seleccionar sus mRNAs diana por complementariedad de secuencia con el miRNA maduro.

La longitud nucleotídica del miRNA maduro puede ser heterogénea debido a cortes imprecisos de las nucleasas durante su biogénesis (Aravin y Tuschl 2005, Ruby *et al.* 2006, Lee *et al.* 2010b). Las diferentes variantes de un mismo miRNA se conocen como isomirs (Morin *et al.* 2008). Las variaciones en 5' del miRNA maduro podría afectar a su región semilla, región fundamental para el reconocimiento de sus dianas, probablemente por este motivo los cambios de longitud en 5' son minoritarios. La mayor parte de isomirs consisten en cambios de longitud en la región 3' del miRNA maduro.

4.2.1. Rutas de biogénesis no canónicas

La mayoría de miRNAs siguen la ruta de biogénesis canónica. Sin embargo se han descrito mecanismos alternativos que generan miRNAs maduros. Estos mecanismos se pueden agrupar en dos grupos principales: las rutas independientes del Microprocesador y las rutas independientes de Dicer.

4.2.1.1. Rutas independientes del Microprocesador

La primera ruta no canónica que se describió es la ruta de los miRtrones en *Drosophila* y *C. elegans*. Los miRNAs producidos por esta ruta derivan de pequeñas horquillas intrónicas con sitios de *splicing* en cada extremo, en las que la secuencia del pre-miRNA corresponde con la del intrón entero (Fig. I-6) (Ruby *et al.* 2007, Okamura *et al.* 2007). La horquilla intrónica es procesada por el espliceosoma y una enzima específica elimina el lazo típico de los intrones procesados tras lo cual el intrón se pliega adoptando la estructura típica de horquilla de los pre-miRNAs que es reconocida por la Exportina 5 y sigue la ruta canónica. Después de su descubrimiento inicial, se ha descrito la presencia de miRtrones en mamíferos y se ha demostrado que los miRtrones son los miRNAs independientes de Microprocesador más abundantes (Berezikov *et al.* 2007, Chong *et al.* 2010). En humanos se han descrito más de 240 miRtrones (Ladewig *et al.* 2012), lo que indica que esta ruta de biogénesis no supone un fenómeno aislado.

Introducción

El Microprocesador tampoco participa en la biogénesis de miRNAs derivados de pequeñas horquillas endógenas. Por ejemplo *miR-320* es transcrito por la RNA polimerasa II como una pequeña horquilla con caperuza m⁷G (Xie *et al.* 2013). Esta horquilla es reconocida y exportada al citoplasma por la Exportina 1. Tras el procesado por Dicer, solo la hebra 3p es seleccionada en el complejo RISC posiblemente porque la caperuza m⁷G en el extremo 5' de la hebra 5p debe interferir con la unión a las proteínas Argonauta.

Además otros RNAs no codificantes pueden producir miRNAs independientemente del Microprocesador. Se ha descrito la producción de miRNAs a partir de tRNAs, snoRNAs y snRNAs víricos (Babiarz *et al.* 2008, Ender *et al.* 2008, Cazalla *et al.* 2011). En todos estos casos no participa el Microprocesador pero la biogénesis sigue siendo dependiente de Dicer.

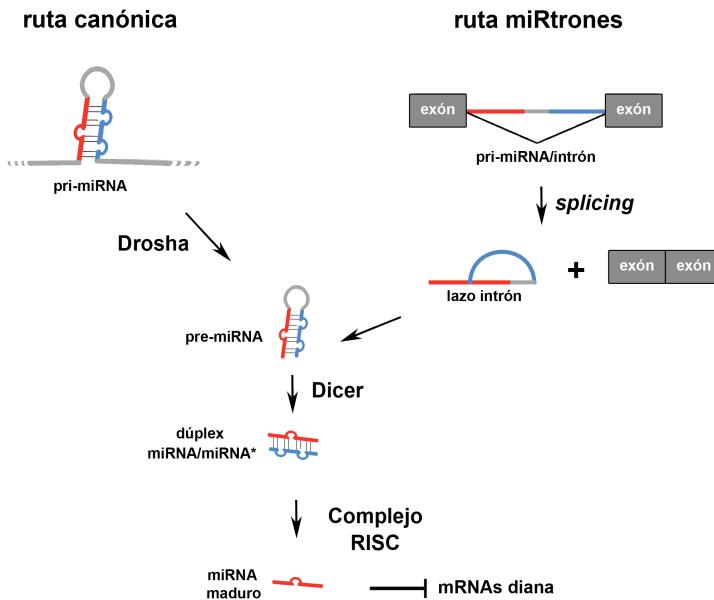


Figura I-6. Rutas de biogénesis de miRNAs canónica y de miRtrones.

En la ruta canónica de biogénesis los miRNAs se transcriben como transcritos precursores primarios (pri-miRNAs) que son procesados en el núcleo por Droscha para generar una o más horquillas precursoras (pre-miRNAs). Dicer procesa las horquillas en el citoplasma generando el miRNA maduro que se incorpora al complejo RISC para silenciar la expresión génica de sus dianas. Sin embargo, los miRtrones son pequeños intrones que una vez procesados por la maquinaria de *splicing* y eliminado el lazo adoptan estructura de horquilla precursora (pre-miRNA) y entran en la ruta canónica para ser procesados por Dicer.

4.2.1.2. Rutas independientes de Dicer

Aunque en la mayoría de rutas de biogénesis de miRNAs participa el enzima Dicer, en 2010 se descubrió que la maduración de *miR-451* es independiente Dicer (Yang *et al.* 2010). *miR-451* está conservado evolutivamente por lo que su biogénesis fue examinada en ratón, pez zebra y *Drosophila*. En los tres grupos se demostró de manera independiente que Dicer no interviene en la biogénesis de *miR-451* (Cheloufi *et al.* 2010, Cifuentes *et al.* 2010, Yang *et al.* 2010). El procesado del *pri-miR-451* por el Microprocesador genera una horquilla con un tallo de solo 18 nt que es demasiado corto para ser procesado por Dicer. El *pre-miR-451* es cargado directamente en la proteína Argonauta 2 y es procesado por la propia Argonauta 2 y una ribonucleasa específica de poli(A) (PARN) en el *miR-451* maduro de 23 nt (Yoda *et al.* 2013).

4.3. Mecanismos de silenciamiento génico mediado por miRNAs

4.3.1. Reconocimiento de los transcritos diana

En las últimas dos décadas una variedad de estudios bioquímicos, genéticos y bioinformáticos han determinado el mecanismo por el cual los miRNAs reconocen sus mRNAs diana. Estos estudios han revelado varias regiones dentro del mRNA susceptibles de ser reconocidas por complementariedad de bases por los miRNAs. La mayor parte de estas regiones se encuentran localizadas en la región 3' no traducida de los mensajeros diana (Bartel 2009, Carthew y Sontheimer 2009). En cuanto a la secuencia nucleotídica de los miRNAs, la región 5' parece crítica para la especificidad de unión entre el miRNA y su mRNA diana. En concreto los nucleótidos que se localizan entre las posiciones 2 y 8 y que constituyen la región semilla (Lewis *et al.* 2003, Bartel 2009). Estudios *in vitro* determinaron que los nucleótidos de la región semilla por si solos son capaces de reprimir la expresión de sus dianas y que cambios en la secuencia de la región semilla altera esta represión (Obad *et al.* 2011). El hecho de que el requerimiento de complementariedad sea una región tan pequeña resulta en que un único miRNA puede silenciar una gran variedad de transcritos y que un mRNA puede ser regulado por diferentes miRNAs (Lim *et al.* 2005, Peter 2010, Wu *et al.* 2010). Aunque la unión de la región semilla es fundamental para la represión de sus dianas, el apareamiento de nucleótidos adicionales aumenta la especificidad y la estabilidad de la unión (Lai 2002, Brennecke *et al.* 2005, Doench y Sharp 2004). Además, otros factores influyen en la especificidad del reconocimiento, por ejemplo, el apareamiento de los nucleótidos en posición 13 y 16, la presencia de bases A y U cerca de la región semilla o la proximidad de varios sitios de unión del miRNA en el 3' del mensajero diana están

asociados a una mayor eficiencia en la represión de transcritos mediada por miRNAs (Grimson *et al.* 2007, Nielsen *et al.* 2007).

4.3.2. Inhibición de la traducción

Los mecanismos mediante los que los miRNAs regulan negativamente la traducción son objeto de constante debate. La traducción de mRNAs eucariotas se divide en tres etapas principales, iniciación, elongación y terminación. El bloqueo de la traducción por los miRNAs puede ocurrir en cualquiera de las tres etapas (Filipowicz *et al.* 2008). Generalmente, el complejo RISC se une a la región 3' no traducida del mRNA y reprime el reconocimiento de la caperuza m⁷G por la maquinaria de traducción o bloquea el reclutamiento de las subunidades ribosómicas 40S y 60S en el RNA mensajero (Humphreys *et al.* 2005, Djuranovic *et al.* 2010, Chendrimada *et al.* 2007). También se ha descrito que la unión del complejo RISC a los mRNAs puede provocar la terminación aberrante de la traducción en la etapa de elongación (Petersen *et al.* 2006, Lytle *et al.* 2007). Sin embargo, los mecanismos por los que los miRNAs regulan la elongación y terminación de la traducción aun no están claros.

4.3.3. Degradación de mRNAs

Aunque estudios iniciales sugerían que los niveles de los transcritos de las dianas de los miRNAs no estaban alterados, trabajos más recientes han demostrado que la represión de la mayoría de las dianas de miRNAs está frecuentemente asociada a su desestabilización (Wu *et al.* 2006, Bagga *et al.* 2005, Behm-Ansmant *et al.* 2006). De hecho, la inhibición de la ruta de los miRNAs o la alteración experimental de los niveles de miRNAs provocan cambios marcados en los niveles de sus transcritos diana (Lim *et al.* 2005, Giraldez *et al.* 2006). En concreto, se ha demostrado que en mamíferos la degradación de los mRNAs diana es la principal vía por la que los miRNAs regulan a sus dianas (Guo *et al.* 2010).

En eucariotas, la degradación de mensajeros mediada por miRNAs puede seguir dos rutas, cada una de las cuales comienza con el acortamiento gradual de la cola poliA del transcrito. El mensajero puede ser degradado desde la región 3' → 5' por el exosoma o por la eliminación de la caperuza m⁷G seguida de la degradación 5' → 3' por la exonucleasa XRN1 (Parker y Song 2004). La degradación, o al menos sus pasos finales, ocurre en los cuerpos P, estructuras celulares en las que se acumulan enzimas catabólicas de mRNA y represores de la traducción (Parker y Sheth 2007, Eulalio *et al.* 2007).

5. miRNAs alterados en DM1

Los miRNAs juegan un papel crucial en la mayoría de los procesos biológicos lo que explica que la alteración de miRNAs específicos o de sus dianas se haya asociado a diferentes enfermedades humanas como el cáncer, cardiopatías, enfermedades metabólicas y enfermedades neurodegenerativas, entre las que se incluyen enfermedades causadas por expansiones de repeticiones (Eisenberg *et al.* 2007, Lee *et al.* 2011, Hebert y De Strooper 2009, Latronico y Condorelli 2009, Melo y Esteller 2011, Iorio y Croce 2012).

Estudios recientes han implicado a los miRNAs en DM1 (Tabla I-2). Se ha descrito la alteración de miRNAs específicos de músculo (miomiRs). Específicamente, *miR-1*, *miR-335* y *miR-206* se han observado aumentados en músculo esquelético de pacientes con DM1, mientras que *miR-29b*, *miR-29c* y *miR-33* presentan expresión reducida en comparación con músculo de individuos sanos (Perbellini *et al.* 2011, Gambardella *et al.* 2010). De manera opuesta a lo que ocurre en músculo esquelético, los niveles de *miR-1* están reducidos en corazón de pacientes DM1 (Rau *et al.* 2011). Además, la distribución subcelular de algunos miomiRs, tales como *miR-1*, *miR-206* y *miR-133b*, también está alterada en células de pacientes DM1 lo que puede interferir con su función normal (Perbellini *et al.* 2011).

El estudio de la expresión de algunas dianas de estos miRNAs reveló que están desreguladas en DM1 lo que indica que las alteraciones en miRNAs en DM1 son relevantes funcionalmente. En músculo esquelético, diferentes dianas de *miR-29* están aumentadas en pacientes (Perbellini *et al.* 2011). Estos transcritos incluyen genes relacionados con atrofia muscular como DAG1, DIABLO, RET o TRIM63. Además también se ha visto que algunas dianas de *miR-1* están aumentadas en músculo esquelético de DM1. Cabe destacar entre ellas algunos genes implicados en desarrollo muscular como MEF2, GATA6 o MET (Perbellini *et al.* 2011). El aumento de dianas de *miR-1* en un principio es incongruente con el aumento de *miR-1* pero podría ser explicado por el cambio en su distribución celular en músculo DM1. En el corazón de pacientes de DM1 y DM2 se ha observado que las dianas de *miR-1* GJA1 y CACNA1C están aumentadas lo que podría deberse a la infraexpresión del miRNA maduro de *miR-1* (Rau *et al.* 2011). Estos genes codifican para un canal de calcio (CACNA1C) y una conexina (GJA1), ambos relacionados con la conducción cardiaca. La desregulación de estos genes podría explicar las arritmias y problemas de conducción en los pacientes con DM1.

Tabla I-2. miRNAs alterados en DM1

miRNA	Función	Alteración en DM1	Referencia
<i>miR-1</i>	Miogénesis	Aumento de expresión en músculo esquelético	(Perbellini <i>et al.</i> 2011, Gambardella <i>et al.</i> 2010, Rau <i>et al.</i> 2011)
	Cardiogénesis	Disminución de su expresión en corazón	
	Control de la conducción cardíaca		
	Inhibición de la proliferación	Cambio en la localización subcelular	
<i>miR-29b</i> <i>miR-29c</i>	Adaptación al estrés cardíaco	Reducción de expresión en músculo esquelético	(Perbellini <i>et al.</i> 2011)
<i>miR-33</i>	Metabolismo del colesterol Control de la proliferación celular	Reducción de expresión en músculo esquelético	(Perbellini <i>et al.</i> 2011, Moore <i>et al.</i> 2010)
<i>miR-133</i>	Miogénesis Control de la conducción cardíaca Apoptosis	Cambio en la localización subcelular	(Perbellini <i>et al.</i> 2011)
<i>miR-206</i>	Miogénesis	Aumento de expresión en músculo esquelético (resultados contradictorios) Cambio en la localización subcelular	(Perbellini <i>et al.</i> 2011, Gambardella <i>et al.</i> 2010)
<i>miR-335</i>	Regeneración muscular	Aumento de expresión en músculo esquelético	(Perbellini <i>et al.</i> 2011)

Aunque para la mayoría de miRNAs no se ha determinado el origen de su alteración, se ha confirmado que la falta de función de MBNL1 es la responsable de que *miR-1* esté infraexpresado en el corazón de pacientes con DM1 (Rau *et al.* 2011). En condiciones normales MBNL1 se une a un motivo UGC en los pre-miRNAs de *miR-1* (*pre-miR-1-1* y *pre-miR-1-2*) y bloquea la unión de LIN28. En DM1, MBNL1 está secuestrado en los *foci* ribonucleares y LIN28 tiene acceso al pre-miRNA de *miR-1*. LIN28 promueve la uridilación del pre-miRNA por el enzima TUT4. Los pre-miRNAs uridilados son resistentes al corte de Dicer por lo que el pre-miRNA se acumula en células DM1 con la consecuente reducción del miRNA maduro y aumento de sus dianas.

Estos resultados implican a los miRNAs en la patogénesis molecular de la DM1, aunque son necesarios más estudios para descubrir otros miRNAs alterados en DM1, determinar el origen de esas alteraciones y sus consecuencias patológicas.

Objetivos

En los últimos años, el desarrollo de las técnicas de análisis de expresión global y bioinformáticas ha permitido analizar en profundidad la población de RNAs pequeños celulares. Debido al creciente número de miRNAs descubiertos y a su implicación en la regulación de la expresión génica, los miRNAs se han convertido en un importante campo de estudio en el contexto de las enfermedades humanas. De hecho, se ha asociado la alteración de determinados miRNAs a enfermedades tan diversas como el cáncer, enfermedades inmunitarias, infecciones virales o enfermedades neurodegenerativas. Los estudios actuales se centran en identificar y caracterizar la implicación de miRNAs específicos en estados patológicos para desarrollar el potencial de éstos en la generación de nuevos métodos de diagnóstico, pronóstico y terapias.

En el momento de comenzar este trabajo, no se habían descrito alteraciones de miRNAs en DM1. Sin embargo, existían evidencias indirectas que sugerían que las expansiones CUG podrían modificar la expresión de miRNAs. En concreto, Onishi y colaboradores demostraron que MBNL1 interacciona a través de RNAs con DDX1, una proteína implicada en la biogénesis de los miRNAs (Onishi *et al.* 2008). Debido a la falta de terapias efectivas y buenos métodos de diagnóstico y pronóstico moleculares para esta enfermedad, en este trabajo nos propusimos analizar la implicación de los miRNAs en DM1 y su potencial terapéutico siguiendo los siguientes objetivos:

Objetivo 1: Análisis global de las alteraciones de miRNAs provocadas por repeticiones CUG.

Objetivo 2: Análisis funcional de miRNAs relevantes.

Objetivo 3: Evaluación en *Drosophila* de miRNAs específicos como diana terapéutica para la DM1.

Resultados

1. Análisis de la alteración de miRNAs mediadas por repeticiones CUG

Las nuevas técnicas de secuenciación masiva permiten obtener millones de lecturas de diferentes secuencias de varias muestras en paralelo. Debido a su gran rendimiento, los resultados de estas plataformas se pueden emplear para diferentes tipos de estudios. La secuenciación a partir de librerías de RNA de pequeño tamaño se puede emplear en el estudio global de todos los miRNAs (miRNoma) presentes en una muestra permitiendo su identificación, caracterización y cuantificación. Por esta razón decidimos utilizar esta tecnología para analizar las posibles alteraciones en la expresión de miRNAs mediadas por la toxicidad de RNAs con repeticiones CUG. Para ello establecimos una colaboración con la compañía biotecnológica Sistemas Genómicos (www.sistemasgenomicos.com) y utilizamos la plataforma de secuenciación masiva SOLiD 3 de Applied Biosystems.

Decidimos dividir este objetivo en dos fases. Una primera fase que consiste en realizar una descripción completa de miRNAs expresados en moscas adultas silvestres, determinando los niveles de expresión de los diferentes miRNAs e identificando posibles nuevos miRNAs no descritos (resultados 1.1), y una segunda fase de análisis de expresión diferencial de miRNAs en moscas modelo de DM1 y controles (resultados 1.2). Para realizar estos dos objetivos obtuvimos moscas de diferentes genotipos (Tabla R-1) y aislamos la fracción de RNAs (15 – 30 nt) con la que se generaron librerías de RNA de pequeño tamaño para secuenciación masiva. Para la descripción completa de miRNAs utilizamos la cepa OrR como genotipo silvestre mientras que para el análisis de expresión diferencial en moscas modelo de DM1 realizamos cruces para obtener moscas que expresen 480 repeticiones CTG en músculo bajo el control del promotor de la cadena pesada de la miosina sarcomérica (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480*). Para tener en cuenta el posible efecto de posición de los transgenes en la expresión de los miRNAs, utilizamos 2 líneas transgénicas diferentes (1.1 y 2.2). Como control utilizamos moscas que expresan del factor Gal4 sin el transgén con repeticiones CTG (*Mhc-Gal4*). Se obtuvieron 2 réplicas biológicas (1 y 2) y para dos de los genotipos se realizaron 2 réplicas técnicas de las librerías de RNAs pequeños (a y b) para estudiar el posible error técnico de la secuenciación masiva. Todos los cruces se realizaron simultáneamente a 25°C y se seleccionaron machos adultos de dos días para evitar la contaminación de secuencias de RNAs de los embriones presentes en las hembras.

La generación de librerías y la secuenciación masiva mediante la tecnología SOLiD se realizó por parte de la empresa Sistemas Genómicos. Obtuvimos una

Resultados

media de unos 25 millones de lecturas para cada muestra. Los datos de secuenciación fueron procesados bioinformáticamente para obtener una medida cuantitativa de cada miRNA en cada muestra. Este trabajo fue realizado por Sheila Zuñiga del departamento de Bioinformática de Sistemas Genómicos. Brevemente, las secuencias se filtraron eliminando aquellas lecturas de baja calidad (QV) y aquellas que corresponden a RNAs pequeños de otro tipo (RNAs ribosómicos, de transferencia, adaptadores, ...). Las secuencias resultantes del filtrado se lanzaron contra el genoma de *Drosophila melanogaster* clasificándolas en función de si alinean en un sitio del genoma o en varios. Las secuencias que alinean en un único sitio del genoma (aproximadamente 3 millones de lecturas por muestra) se lanzaron contra la base de datos de miRNAs miRBase (versión 13.0) obteniéndose un listado de todos los miRNAs conocidos en cada muestra. A cada miRNA se le asoció un valor de cuantificación. El valor de cuantificación es un valor normalizado calculado en base a la suma del número de lecturas que mapean en ese miRNA por millón de lecturas totales que mapean en una región del genoma. La tabla R-2 ilustra el número de lecturas totales para cada muestra así como el número de lecturas filtradas durante el procesado bioinformático.

Tabla R-1. Librerías de RNAs de pequeño tamaño para secuenciación masiva

Código	Condición	Genotipo	Objetivo
O_1	Cepa silvestre	<i>OrR</i>	Objetivo 1.1
O_2			
C_1	Control	<i>yw, Mhc-Gal4</i>	Objetivo 1.2
C_2			
E1_1a	Experimental	<i>yw, Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)₄₈₀ 1.1</i>	Objetivo 1.2
E1_1b			
E1_2			
E2_1a	Experimental	<i>yw, Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)₄₈₀ 2.2</i>	Objetivo 1.2
E2_1b			
E2_2			

Tabla R-2. Número de lecturas obtenidas por secuenciación masiva y tras el procesado bioinformático

Librería	Lecturas totales	QV ¹	Mapean en 1 o más sitios		Mapean en un único sitio	
			lecturas filtradas ²	mapeables en genoma	lecturas filtradas ²	mapeables en genoma
O_1	28691891	21418676	3120769	2066628	2668549	910374
O_2	29572378	21965363	3254335	1719574	3175191	867498
C_1	14919576	13712379	4527662	1352675	4226508	733997
C_2	26213035	18271389	2442658	1777413	2209016	948600
E1_1a	17223663	14159616	1697692	1182656	1629176	584730
E1_1b	16187730	14091261	2282264	1102572	2198963	569180
E1_2	25749686	16468130	543153	1227194	509067	600971
E2_1a	22801642	16548011	1723402	997472	1645485	512370
E2_1b	25059295	17108127	1879348	993197	1829399	501887
E2_2	24441122	17581349	2258881	982556	2204352	513285

¹ lecturas tras el control de calidad ² tRNAs, rRNAs, adaptadores

1.1. Descripción completa de los miRNAs expresados en moscas adultas

Mediante secuenciación masiva y siguiendo el análisis bioinformático descrito anteriormente obtuvimos los datos de expresión de los miRNAs conocidos para dos muestras de moscas silvestres (cepa OrR, muestras O_1 y O_2). Detectamos 104 de los 153 miRNAs descritos en *Drosophila melanogaster* (miRBase, versión 13.0). Siete miRNAs tienen niveles de expresión elevados mientras que el resto se expresan en niveles más discretos en moscas adultas (Tabla R-3).

Una vez descritos los niveles de expresión para los miRNAs conocidos, nos propusimos identificar nuevos miRNAs a partir de los datos de secuenciación masiva que obtuvimos de las muestras de la cepa OrR. Este trabajo de predicción fue desarrollado por el Dr. Javier Terol y Sheila Zuñiga en el departamento de Bioinformática de Sistemas Genómico S.L. La búsqueda de nuevos miRNAs se llevó a cabo utilizando el algoritmo de predicción miRDeep (Friedlander *et al.* 2008). Para establecer el límite de score de miRDeep, previamente analizamos con el algoritmo miRDeep los datos de secuenciación que obtuvimos para los miRNAs conocidos. El score más bajo de miRDeep para los miRNAs conocidos fue -2.5. Por lo que decidimos utilizar como límites de predicción -2.5 para el score de miRDeep y al menos 20 lecturas de su secuencia por muestra para considerarlos como nuevos miRNAs. Con estas condiciones de predicción identificamos 64 nuevos miRNAs (Tabla R-4).

Tabla R-3. Perfil de expresión de miRNAs en moscas silvestres

miRNA	>10 ³ lecturas			>10 ² lecturas			>10 lecturas		
	media lecturas	error estándar	miRNA	media lecturas	error estándar	miRNA	media lecturas	error estándar	miRNA
<i>dme-miR-1</i>	85238.5	387.5	<i>dme-miR-317</i>	9768	3229.0	<i>dme-miR-956</i>	967	661.0	<i>dme-miR-2b-1</i>
<i>dme-miR-14</i>	56861.5	1936.5	<i>dme-miR-33</i>	9642.5	2543.5	<i>dme-miR-79</i>	870.5	603.5	<i>dme-miR-927</i>
<i>dme-miR-277</i>	45842.5	6613.5	<i>dme-miR-252</i>	6718.5	2141.5	<i>dme-miR-87</i>	795.5	8.0	<i>dme-miR-1010</i>
<i>dme-miR-276a</i>	37744.5	7709.5	<i>dme-miR-11</i>	6700	85.0	<i>dme-miR-263b</i>	714.5	432.5	<i>dme-miR-13a</i>
<i>dme-miR-279</i>	27764.5	7966.5	<i>dme-miR-307</i>	6633	1066.0	<i>dme-miR-92a</i>	668	508.0	<i>dme-miR-965</i>
<i>dme-miR-8</i>	13732	7065.0	<i>dme-miR-263a</i>	6593	1132.0	<i>dme-miR-986</i>	638.5	287.5	<i>dme-miR-4</i>
<i>dme-bantam</i>	12388	3900.0	<i>dme-miR-34</i>	6442.5	1186.5	<i>dme-miR-957</i>	635.5	15.5	<i>dme-miR-2b-2</i>
			<i>dme-miR-12</i>	6080.5	2754.5	<i>dme-miR-274</i>	569.5	244.5	<i>dme-miR-2c</i>
			<i>dme-miR-210</i>	4767.5	802.5	<i>dme-miR-190</i>	567	218.0	<i>dme-miR-137</i>
			<i>dme-miR-125</i>	4443	1841.0	<i>dme-miR-iab-4</i>	551.5	310.5	<i>dme-miR-978</i>
			<i>dme-miR-184</i>	3786	391.0	<i>dme-miR-304</i>	469.5	224.5	<i>dme-miR-318</i>
			<i>dme-let-7</i>	3749.5	1139.5	<i>dme-miR-960</i>	440.5	24.5	<i>dme-miR-963</i>
			<i>dme-miR-958</i>	2374.5	1256.5	<i>dme-miR-375</i>	393	212.0	<i>dme-miR-1015</i>
			<i>dme-miR-989</i>	2248	2248.0	<i>dme-miR-285</i>	365.5	50.5	<i>dme-miR-984</i>
			<i>dme-miR-7</i>	2132.5	497.5	<i>dme-miR-2a-2</i>	335.5	39.5	<i>dme-miR-999</i>
			<i>dme-miR-305</i>	1966.5	869.5	<i>dme-miR-987</i>	295.5	28.5	<i>dme-miR-976</i>
			<i>dme-miR-124</i>	1897	1436.0	<i>dme-miR-995</i>	293	180.0	<i>dme-miR-1004</i>
			<i>dme-miR-100</i>	1847.5	314.5	<i>dme-miR-932</i>	290	100.0	<i>dme-miR-313</i>
			<i>dme-miR-306</i>	1797.5	417.5	<i>dme-miR-312</i>	288.5	162.5	<i>dme-miR-977</i>
			<i>dme-miR-284</i>	1781.5	174.5	<i>dme-miR-316</i>	265	5.0	<i>dme-miR-1007</i>
			<i>dme-miR-1003</i>	1677	239.0	<i>dme-miR-9b</i>	256.5	145.5	<i>dme-miR-985</i>
			<i>dme-miR-9a</i>	1627.5	447.5	<i>dme-miR-998</i>	248	54.0	<i>dme-miR-929</i>
			<i>dme-miR-10</i>	1476	22.0	<i>dme-miR-193</i>	240	117.0	<i>dme-miR-286</i>
			<i>dme-miR-276b</i>	1377	295.0	<i>dme-miR-133</i>	236	147.0	<i>dme-miR-282</i>
			<i>dme-miR-31a</i>	1298	252.0	<i>dme-miR-1000</i>	231	11.0	<i>dme-miR-982</i>
			<i>dme-miR-994</i>	1286	1286.0	<i>dme-miR-31b</i>	209	11.0	<i>dme-miR-975</i>
			<i>dme-miR-988</i>	1173.5	312.5	<i>dme-miR-9c</i>	190	112.0	<i>dme-miR-283</i>
			<i>dme-miR-993</i>	1090.5	358.5	<i>dme-miR-311</i>	182.5	17.5	<i>dme-miR-962</i>
			<i>dme-miR-970</i>	1035.5	505.5	<i>dme-miR-92b</i>	170.5	72.5	<i>dme-miR-964</i>
						<i>dme-miR-2a-1</i>	169	38.0	<i>dme-miR-959</i>
						<i>dme-miR-1012</i>	141.5	27.5	<i>dme-miR-968</i>
						<i>dme-miR-1017</i>	138	40.0	<i>dme-miR-219</i>
						<i>dme-miR-310</i>	125.5	20.5	<i>dme-miR-219</i>
						<i>dme-miR-278</i>	118	29.0	<i>dme-miR-1006</i>
						<i>dme-miR-996</i>	117	48.0	

Tabla R-4. Nuevos miRNAs candidatos

miRNA	score	secuencia	cromosoma	hebra	coordenada	lecturas
<i>miR-3R_25</i>	3.7	UGGAAUGUAGGAAAUGUGGAA	3R	+	17468228	43
<i>miR-3L_27</i>	2.1	UGGCAGUGUUUGAAUGGAAC	3L	-	7511457	23
<i>miR-2L_7</i>	0.6	UGGAGCUGCCCUCUGCUUCU	2L	+	12819338	2563
<i>miR-2R_19</i>	0.4	UGGGCUACAGCGAGUCGCUCC	2R	-	19896944	28
<i>miR-2R_27</i>	0.4	GCUACAAGUUCACCAUGCUGGA	2R	-	11853909	64
<i>miR-3L_11</i>	0.4	UCCUCGAGCUGCUCACCGCC	3L	+	16024311	532
<i>miR-X_13</i>	0.3	UGCCCGUGCCCUCUGCGUGUG	X	+	20824459	79
<i>miR-2R_24</i>	0.2	CACAUCGAUGUUUUUCCACCU	2R	-	14067657	30
<i>miR-3L_4</i>	0.2	AGGCCCGCAACGAGCGCAAC	3L	+	9709288	45
<i>miR-2R_7</i>	0.1	AUCGAUGGCAGGGCGUUGGGUCU	2R	+	11721376	25
<i>miR-3R_35</i>	0.1	GCGUGUGACCCGUCAGAGUGU	3R	-	18773587	77
<i>miR-2L_21</i>	0	GUAGUCCACAGGGAUUCCC	2L	+	3466421	96
<i>miR-2R_9</i>	0	UACCUAGUGACUAGCGACU	2R	+	13986928	59
<i>miR-3R_24</i>	0	CGAUGGUUUGGGUUGGUUUGGU	3R	+	17412388	21
<i>miR-3R_35</i>	0	GGUGGAGGCGUUGGUGGCCUGC	3R	-	2962950	23
<i>miR-3R_48</i>	0	GCUUGGACUGUGCGGUUGA	3R	-	6296821	45
<i>miR-X_5</i>	0	UUGAGCCCUGUUCUCUGCC	X	+	828819	42
<i>miR-2L_20</i>	-0.1	CUAAAGCACCACCCGAGUGG	2L	-	10367475	206
<i>miR-2L_29</i>	-0.1	CGAGAUGAUCGGGAAUGC	2L	-	3036105	25
<i>miR-3L_28</i>	-0.1	CGCUAGGGGCGGUGGAGGA	3L	-	5582470	71
<i>miR-3R_17</i>	-0.1	UCCAGUAAUGUCCACUUACA	3R	+	12444559	55
<i>miR-2L_35</i>	-0.2	AGCCGCACACGUUCAGCUAC	2L	-	345049	58
<i>miR-2L_27</i>	-0.3	CGUGAUCGUGGUAACCGG	2L	-	4204979	57
<i>miR-3R_5</i>	-0.3	GGACGGUGAACCAGAGCAGG	3R	-	1644984	28
<i>miR-3L_21</i>	-0.4	AGAUACGGACCAUACUUGCGC	3L	-	13018101	35
<i>miR-3R_13</i>	-0.5	GCGGUUAAACCAUAUCAGUACAGUC	3R	+	7049487	327
<i>miR-3R_29</i>	-0.5	GGGCGAAACAUUGUGGCUU	3R	+	21535850	43
<i>miR-2L_2</i>	-0.6	GCACAAUAUGUGGAGCAUGU	2L	+	7772203	906
<i>miR-3L_11</i>	-0.6	AGCCACUCGAGCCGGGCUGA	3L	+	126495	34
<i>miR-3R_33</i>	-0.6	UGCUUGGACUACCGAUGUU	3R	-	19361195	238
<i>miR-2L_25</i>	-0.8	ACAGUUGUCUCGGUUUGGAC	2L	-	5183781	56
<i>miR-3R_42</i>	-0.8	CUCCAGUUGUCUGCCGUGCAG	3R	-	13535605	204
<i>miR-X_8</i>	-0.8	UCCCGCUGUCUUUCGGAAA	X	+	14577852	29

Resultados

miR-3L_17	-0.9	GUUAAUGUUGUCGUUAUGUAAG	3L	+	2620000	269
miR-3L_34	-0.9	GUGGUAUCCAAUACCUUCC	3L	-	3467392	164
miR-2R_22	-1	AUCCCUCGCUUGUCUUUGGG	2R	-	15457341	60
miR-X_12	-1	GGUUGUUCUGACUUGUC	X	+	20700024	24
miR-3L_36	-1.1	CGGAAACCAGGUGACAAUGCC	3L	-	2244706	44
miR-3L_8	-1.1	AACCCUUGCCGCACUGGUC	3L	+	13956196	283
miR-3R_2	-1.1	UGUCCGUGCCCAGGAUGAAG	3R	-	4334553	247
miR-3L_29	-1.2	CGCUAGGGGCGGUGGAGGA	3L	-	5582470	71
miR-3R_32	-1.2	AGUCCGGUGGAGCAUGUGGU	3R	-	20486576	34
miR-3R_4	-1.2	GUUUUGACUGCCUGACAUCA	3R	-	2150247	108
miR-X_27	-1.2	UGAGGUAGAUUUGGUGCGACGU	X	+	317401	60
miR-2L_16	-1.3	GUUCCAUUUAAGGUGCGUGAC	2L	-	15314503	36
miR-2R_10	-1.3	AGAAUGGCAAUAUCUGGCC	2R	+	14288698	25
miR-U_2	-1.3	UGCUAUUACAUAUUUCGUCGCGUC	U	-	4025089	28
miR-X_18	-1.3	CGUAUACGUUACGUUUGGGGCC	X	-	18069110	108
miR-2R_1	-1.4	AUAUUCUAGAUGGUGCACA	2R	+	657847	120
miR-3R_1	-1.4	AUGUCACUUGGUCCUCGCC	3R	-	4981427	28
miR-2L_28	-1.5	GUUAUUCGAUCUCAACAGG	2L	-	3473440	22
miR-3L_18	-1.6	CGACGAGGGGAGUGGGGAG	3L	-	18084708	42
miR-3L_20	-1.6	CAAUACUUUGGCUCUUGCA	3L	-	14888554	27
miR-2R_21	-1.7	ACGAUCACAAUCGAGCACU	2R	-	18581305	45
miR-2R_30	-1.7	CUUUUUUGGAGACUUGUUU	2R	-	6271010	48
miR-3L_19	-1.8	CAAUACUUUGGCUCUUGCA	3L	-	14888554	27
miR-X_9	-1.8	CGAGGAUCGUUUGCUAUCCAC	X	+	14996430	81
miR-3L_24	-1.9	CUUAGUCAUUUCACAGCCA	3L	-	11474839	34
miR-3R_23	-1.9	GGAAUAUCACAUGGUUCAGGCUACAAUA	3R	+	16648444	58
miR-X_17	-1.9	ACUCACGGCAUUUCAUUCACUUGC	X	-	21169304	136
miR-X_28	-2	UGAGGUAGAUUUGGUGCGACGU	X	+	317401	60
miR-3R_14	-2.1	CUGAUUGAGCCAAGUGAUC	3R	+	10590154	21
miR-3L_37	-2.2	UCUGAUCGCUUGUGUUUUU	3L	-	1877834	28
miR-3R_10	-2.2	UGCAUGUCUCCAGCCAGAAGGUAC	3R	-	588915	50
miR-2L_19	-2.4	GUGAAUGCUCCAAUGAGCUGA	2L	-	11017395	126
miR-3R_47	-2.5	GCUUGACAGCGAGACAGACAG	3R	-	7424126	55
miR-X_21	-2.5	GCGUUUGAUUCUGAUCACCU	X	-	16548222	59

En negrita se resaltan los miRNAs seleccionados para la validación

1.1.1. Validación de nuevos miRNAs

De los 64 nuevos miRNAs que obtuvimos en las predicciones, nos propusimos validar nueve. Seleccionamos miRNAs para la validación con diferentes niveles de expresión y scores de miRDeep (Tabla R-4) con el fin de abarcar un rango amplio dentro de las predicciones. Para validarlos, detectamos estos miRNAs en moscas mutantes para Dicer-1, proteína implicada en la biogénesis de miRNAs. En aquellos casos en los que se trate de un miRNA, observaremos una reducción del miRNA maduro y un aumento en el pre-miRNA en moscas mutantes interferentes para Dicer-1 (*UAS-IR-Dicer-1*), mientras que en moscas que sobreexpresan Dicer-1 (*UAS-Dicer-1*) el miRNA maduro debería aumentar respecto al control.

Expresamos los transgenes para Dicer-1 en todos los tejidos utilizando la línea de expresión ubicua *Act5C-Gal4*, como controles utilizamos la cepa silvestre *OrR* y expresamos la proteína GFP. Para confirmar la efectividad de los transgenes analizamos los niveles de la proteína Dicer-1 en estas moscas mediante western blot usando un anticuerpo específico. Como control detectamos la proteína endógena Tubulina (Fig. R-1). Observamos que en efecto los niveles de la proteína Dicer-1 están aumentados en las moscas que sobreexpresan Dicer-1 y están reducidos en moscas mutantes por interferencia para Dicer-1, respecto a los dos controles en los que se observan niveles similares de la proteína.

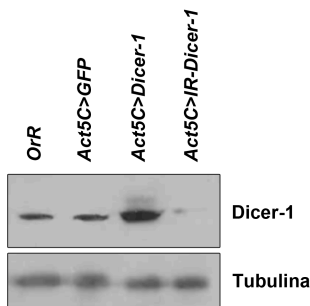


Figura R-1. Niveles de proteína Dicer-1 en moscas mutantes.

Western blot de extractos de proteína total de moscas con los genotipos: *OrR*, *Act5C-Gal4 UAS-GFP*, *Act5C-Gal4 UAS-Dicer-1* y *Act5C-Gal4 UAS-IR-Dicer-1* para Dicer-1. Confirmamos el aumento de proteína en las moscas que sobreexpresan Dicer-1 (*Act5C-Gal4 UAS-Dicer-1*) y la disminución de la proteína en moscas mutantes por RNAi (*Act5C-Gal4 UAS-IR-Dicer-1*) respecto a las moscas controles (*OrR* y *Act5C-Gal4 UAS-GFP*). Detectamos la proteína endógena Tubulina como control de carga.

Para confirmar que los cambios en los niveles de Dicer-1 afectan a la biogénesis general de los miRNAs detectamos *miR-1*, el miRNA más expresado en moscas adultas (Tabla R-3) en las moscas mutantes para Dicer-1. La detección se realizó mediante Northern blot para RNAs pequeños a partir de muestras de RNA total con una sonda LNA específica para *miR-1* (Fig. R-2). Confirmamos un aumento de

Resultados

miR-1 maduro en las moscas que sobreexpresan Dicer-1 respecto a los controles. En las moscas mutantes por RNAi para Dicer-1 se observa una disminución del miRNA maduro y la aparición de una tenue banda de mayor tamaño que correspondería al pre-miRNA de *miR-1*.

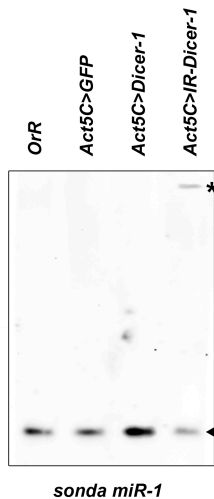


Figura R-2. Detección de *miR-1* mediante northern blot en moscas mutantes para Dicer-1.

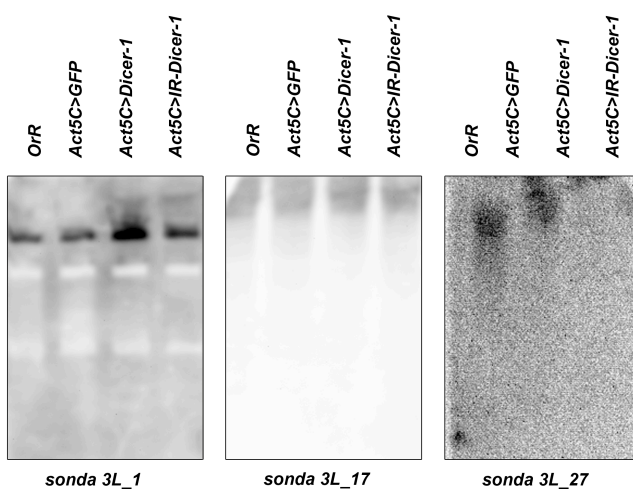
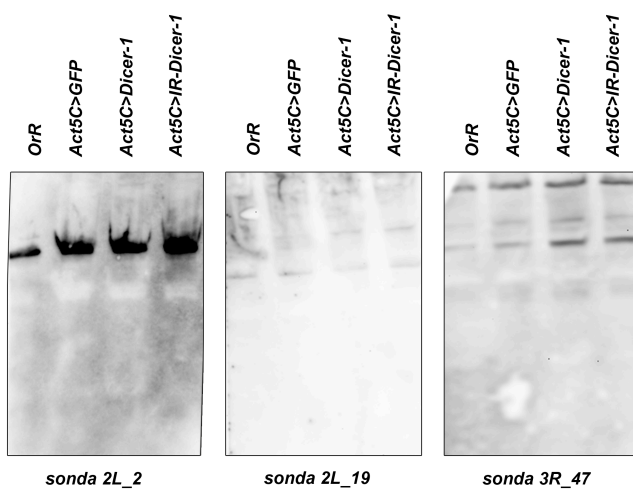
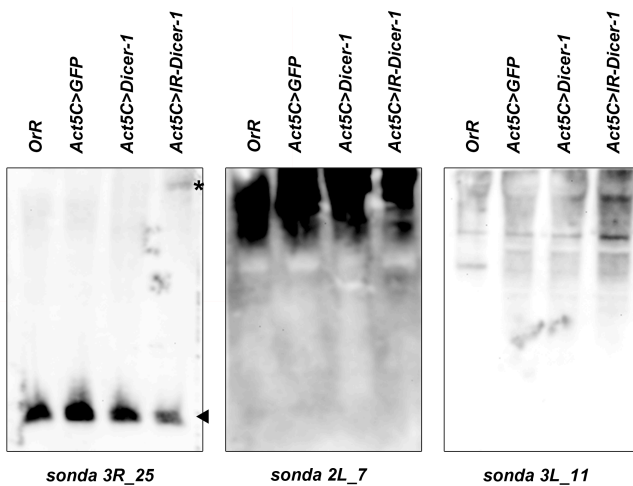
Northern blot con una sonda LNA para detectar *miR-1*. Las carreras corresponden a los genotipos: *OrR*, *Act5C-Gal4 UAS-GFP*, *Act5C-Gal4 UAS-Dicer-1* y *Act5C-Gal4 UAS-IR-Dicer-1*. El asterisco indica el pre-miRNA y la cabeza de flecha indica el miRNA.

La detección de *miR-1* además nos sirvió como puesta a punto del protocolo de northern blot para RNAs de pequeño tamaño. A partir de esas condiciones procedimos a validar los miRNAs candidatos mediante northern blot con sondas LNA complementarias a la secuencia de los miRNA maduros correspondientes a las lecturas de secuenciación masiva. En el caso de no obtener señal cambiamos las condiciones del protocolo optimizando las cantidades de RNA total y las condiciones de hibridación del northern blot hasta que obtuvimos señal para las nueve sondas.

De los nueve miRNAs candidatos, se validó como miRNA real uno, *miR-3R_25* (Fig. R-3). Para este miRNA detectamos una reducción en el miRNA maduro y la aparición de su precursor en moscas mutantes para Dicer-1. Para el resto la señal que se detectó no correspondía en ningún caso al tamaño esperado para un miRNA maduro por lo que los descartamos como miRNAs.

Figura R-3. Validación de nuevos miRNAs por Northern blot.

Northern blot a partir de RNA total de moscas con los genotipos: *OrR*, *Act5C-Gal4 UAS-GFP*, *Act5C-Gal4 UAS-Dicer-1* y *Act5C-Gal4 UAS-IR-Dicer-1* con sondas específicas para los nueve miRNAs candidatos seleccionados. El asterisco indica el pre-miRNA y la cabeza de flecha indica el miRNA maduro. Solo se detecta el pre-miRNA en moscas con niveles de Dicer-1 reducido en el caso de *miR-3R_25*.



Resultados

Para cuantificar los niveles de *miR-3R_25* en las moscas mutantes para *Dicer-1* detectamos su señal por Northern blot por triplicado y cuantificamos la señal del miRNA maduro por densitometría. Analizamos la expresión del RNA pequeño nuclear U6 como control endógeno (Fig. R-4). Tanto el aumento del miRNA maduro en moscas que sobreexpresan *Dicer-1* como su reducción en moscas mutantes por RNAi para *Dicer-1* resultaron significativamente diferentes respecto al control, confirmando que *miR-3R_25* es un nuevo miRNA. *miR-3R_25* resultó ser el miRNA con mayor score de miRDeep de los 64 identificados lo que sugiere que los valores de score de miRDeep menores corresponden a falsos positivos.

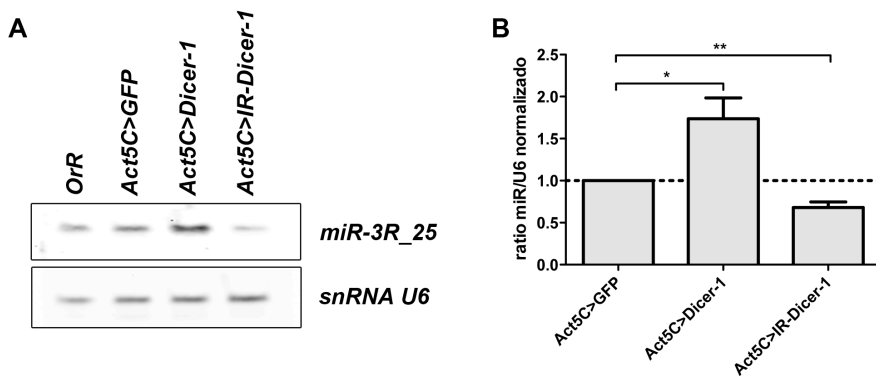


Figura R-4. Niveles de expresión de *miR-3R_25* en mutantes para *Dicer-1*.

A. Detección por Northern blot de *miR-3R_25* en muestras de los genotipos: *OrR*, *Act5C-Gal4 UAS-GFP*, *Act5C-Gal4 UAS-Dicer-1* y *Act5C-Gal4 UAS-IR-Dicer-1* y de *snRNA U6* como control endógeno. Se muestra una región representativa correspondiente al miRNA *miR-3R_25* maduro y a *snRNAU6*. B. Cuantificación de los niveles de *miR-3R_25* normalizados respecto al control endógeno *snRNA U6* y a la muestra control *Act5C-Gal4 UAS-GFP*. n=3, *p<0.05 y ** p<0.01

1.1.2. Validación de *miR-3R_25*

El análisis en profundidad de los datos de secuenciación masiva para el único miRNA que se validaba reveló que la mayoría de lecturas correspondientes a *miR-3R_25* no coinciden con la secuencia de su región genómica según las bases de datos (Fig. R-5). En concreto, la mayoría de lecturas del SOLiD, más de un 75 %, presentan un cambio de tres nucleótidos en la parte central del miRNA maduro, mientras que las lecturas correspondientes a la secuencia de las bases de datos representan el 20.6 % del total. Además, hay una pequeña población de secuencias que representan un 3.4 % del total que tienen otro cambio de tres nucleótidos pero en la región 3' del miRNA maduro.

El hecho de que la mayoría de lecturas para *miR-3R_25* tengan cambios respecto a las secuencias de las bases de datos podría deberse a errores de lectura durante la secuenciación masiva. Para descartarlo, analizamos las lecturas correspondientes a

los 104 miRNAs que detectamos en nuestras muestras (Tabla-3). Para la mayor parte de los miRNAs no encontramos ninguna lectura con cambios en la secuencia respecto a la de las bases de datos (Fig. R-6, A), mientras que los miRNAs que presentan lecturas con cambios son menos del 40 % del total. Además, en la mayoría de miRNAs con mayores niveles de expresión no detectamos ninguna lectura con cambios respecto a la secuencia genómica. Por ejemplo, *miR-1* es el miRNA con mayor expresión en moscas adultas (detectamos unas 85000 lecturas de media en nuestras muestras) y todas esas lecturas corresponden a la secuencia genómica. Lo mismo ocurre con otros miRNAs con más de 10000 lecturas como *miR-14*, *miR-276a*, *miR-8* o *bantam*.

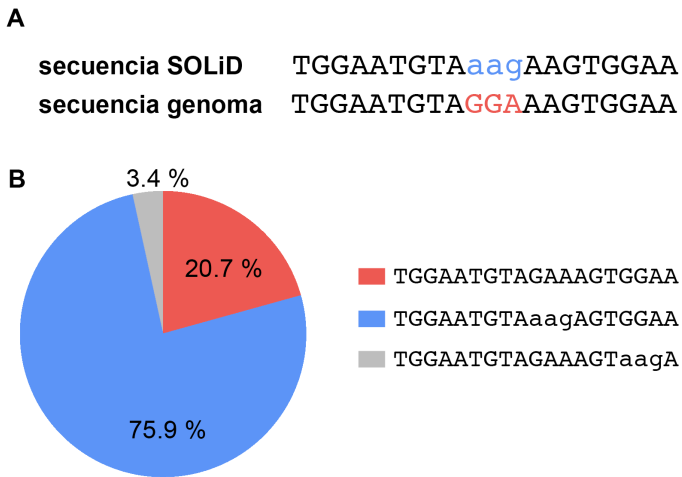


Figura R-5. La secuencia de *miR-3R_25* es diferente a la secuencia del genoma.

A. Secuencia mayoritaria para *miR-3R_25* en los datos de secuenciación masiva y secuencia correspondiente en el genoma de *Drosophila*. En rojo y azul se muestran los nucleótidos que difieren en ambas secuencias. B. Porcentaje de las lecturas de las tres secuencias correspondientes a *miR-3R_25* en los datos de SOLiD.

Para considerar que un miRNA presenta cambios tuvimos en cuenta que al menos una lectura de SOLiD para ese miRNA los tuviera. Cabe destacar que en general estas lecturas son las menos representadas en el total de lecturas para un miRNA por lo que aunque el 39.5 % de miRNAs presenten lecturas con cambios estas suponen una pequeña población respecto al total de lecturas para un miRNA determinado. Con una única excepción, en el caso de *miR-986* encontramos un cambio de un nucleótido (C→T) en la región central del miRNA maduro que aparece en el 92 % de lecturas. En general, la mayoría de cambios que observamos corresponden a cambios de un nucleótido (Fig. R-6, B) mientras que los miRNAs que tienen lecturas con cambios en tres nucleótidos solo suponen el 2.3 % del total

Resultados

de miRNAs con cambios. El cambio de tres nucleótidos consecutivos en la zona central del miRNA maduro de *miR-3R_25* supone un hecho excepcional respecto al total de lecturas.

Si los cambios en las lecturas de *miR-3R_25* respecto a la secuencia del genoma se debieran a errores de lectura esperaríamos que aparecieran cambios en otros miRNAs por azar. El hecho de que las lecturas con modificaciones no aparezcan en todos los miRNAs y que, cuando aparecen, suponen un porcentaje muy pequeño respecto al total de lecturas, junto que para los miRNAs que más se expresan en moscas adultas no encontremos lecturas con cambios, indica que los cambios en *miR-3R_25* no se deben a errores de lectura sino que estos miRNAs con tres nucleótidos diferentes están presentes en nuestras muestras.

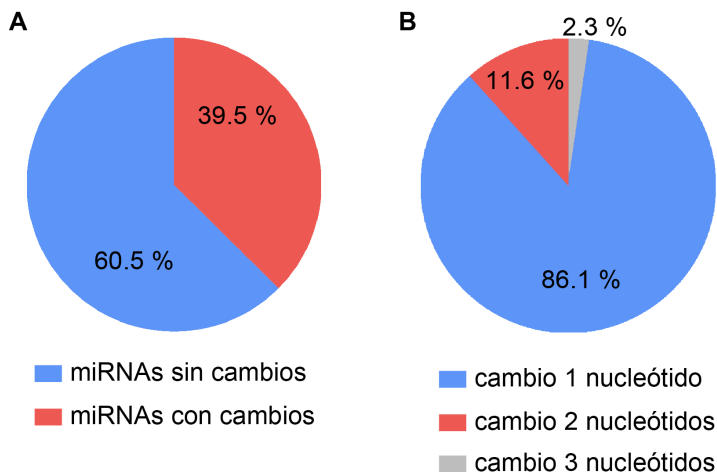


Figura R-6. Lecturas con cambios en todos los miRNAs detectados en mosca.

A. Porcentaje de miRNAs con al menos una lectura con cambios respecto a la secuencia de las bases de datos. Se analizaron los 104 miRNAs que detectamos en moscas adultas. B. Porcentaje de cambios en uno, dos o tres nucleótidos.

Las lecturas de *miR-3R_25* con cambios suponen un 76 % del total, para la validación de los nuevos miRNAs diseñamos las sondas contra las lecturas mayoritarias en SOLiD para cada miRNA por lo que la sonda para este gen no está diseñada contra la secuencia del genoma, aunque como ambas difieren en tres nucleótidos la sonda podría detectar las dos poblaciones de miRNAs. Para determinar si la sonda detecta ambas secuencias, realizamos un Southern blot con oligonucleótidos con las secuencias correspondientes en el genoma y de las lecturas mayoritarias en SOLiD (Fig. R-7). La sonda solo detectó el oligonucleótido con la

secuencia de las lecturas del SOLiD por lo que los resultados de la validación de *miR-3R_25* corresponden al miRNA maduro con el cambio de tres nucleótidos.

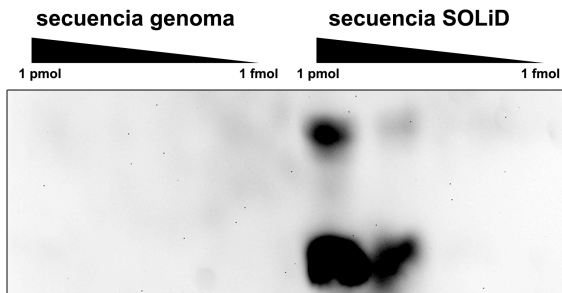


Figura R-7. La sonda para *miR-3R_25* no reconoce la secuencia genómica.

Detección por hibridación con la sonda para *miR-3R_25* de dos oligonucleótidos con la secuencia correspondiente al genoma y a la secuenciación masiva. La sonda solo detecta la secuencia de SOLiD.

1.1.2.1.1. El cambio de tres nucleótidos en *miR-3R_25* no es un polimorfismo

La cepa que utilizamos para el análisis de miRNAs en moscas adultas es la cepa de moscas silvestres *Oregon-R* mientras que en el proyecto del genoma de *Drosophila melanogaster* se utilizó como referencia la cepa *y¹; Gr22b¹ Gr22d¹ cn¹ CG33964^{R4.2} bw¹ sp¹; LysC¹ MstProx¹ GstD5¹ Rh6¹* (Rubin *et al.* 2000). La diferencia entre la secuencia de *miR-3R_25* que detectamos en la secuenciación masiva y la que se encuentra en las bases de datos podría deberse a un polimorfismo en esa región genómica. Para confirmarlo realizamos dos ensayos: detectamos *miR-3R_25* en la cepa de referencia utilizada en el proyecto del genoma de *Drosophila* y secuenciamos la región genómica de *miR-3R_25* en la cepa *OrR*.

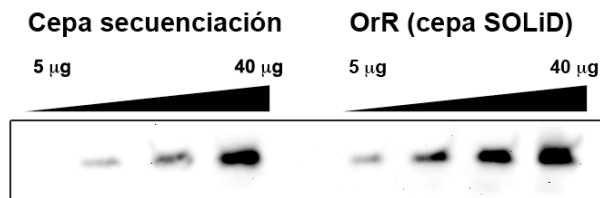


Figura R-8. *miR-3R_25* se expresa en la cepa de referencia del proyecto genoma de *Drosophila*.

Detección por northern blot de *miR-3R_25* en moscas de la cepa de referencia y en la cepa *OrR*. El

Detectamos *miR-3R_25* en la cepa de referencia utilizada en la secuenciación del genoma de *Drosophila* mediante northern blot para RNAs pequeños a partir de RNA total con la sonda LNA específica para *miR-3R_25* (Fig. R-8) y como control detectamos el miRNA en la cepa *OrR*. El miRNA se detecta en la cepa de referencia lo que indica que el cambio de tres nucleótidos no debe tratarse de un polimorfismo. Para confirmarlo secuenciamos la región genómica de *miR-3R_25* en la cepa *OrR*. Amplificamos 181 pb de la región genómica mediante PCR y

Resultados

secuenciamos el amplicón. La secuenciación de esta región confirmó que la región genómica de *miR-3R_25* en la cepa *OrR* es igual a la de las bases de datos, es decir que en el genoma no aparece el cambio de tres nucleótidos y por lo tanto podemos descartar que se trate de un polimorfismo.

1.1.2.1.2.El cambio de tres nucleótidos en *miR-3R_25* no se detecta en su horquilla precursora

Dado que la diferencia en la secuencia del *miR-3R_25* maduro no se debe a un polimorfismo en la cepa, nos planeamos testar si el cambio se produce a nivel de su miRNA precursor. Se han descrito modificaciones postranscripcionales para algunos miRNAs, pero en todos los casos se trata de fenómenos de editado del precursor similares a los que se dan en los RNAs mensajeros, cambios de una adenina a una inosina, y en ningún caso se han descrito cambios de tres nucleótidos.

Para confirmar si el cambio se produce en el pre-miRNA decidimos secuenciarlo. Aislamos la fracción de RNAs pequeños (<200 nt) a partir de una muestra de 200 machos adultos. Tras tratar el RNA con DNasa I para eliminar el posible DNA genómico residual realizamos la retrotranscripción del pre-miRNA de *miR-3R_25* con un primer específico para su secuencia y una enzima retrotranscriptasa termoestable. Esta enzima nos permitió realizar la reacción a 65 °C para evitar la formación de la horquilla del pre-miRNA. Amplificamos una región de 121 nt de la horquilla precursora mediante PCR y la clonamos en el vector pGEM-T. Secuenciamos 15 clones del pre-miRNA de *miR-3R_25*. En todos los casos detectamos el precursor con la secuencia genómica por lo que el cambio de tres nucleótidos en la secuencia del miRNA maduro no se debe a un cambio en el pre-miRNA.

1.1.2.1.3.El cambio de tres nucleótidos en *miR-3R_25* no proviene de la región genómica predicha

El algoritmo de predicción miRDeep localizó el precursor de *miR-3R_25* en el cromosoma 3R en la región citogenética 93F1 en la hebra opuesta al gen *E2f*. Concretamente, el miRNA maduro corresponde a las posiciones 17468228 – 174682247 en la hebra +. El hecho de que la secuencia de *miR-3R_25* maduro que validamos en moscas mutantes para Dicer-1 presente un cambio de tres nucleótidos respecto a la secuencia de esta región, y que este cambio no este presente en el pre-miRNA, podría deberse a que este pre-miRNA no sea el precursor de *miR-3R_25* y que *miR-3R_25* no provenga de la región genómica predicha por miRDeep.

Para confirmar si *miR-3R_25* se codifica en la región genómica predicha, buscamos moscas con aberraciones cromosómicas en esta región para detectar si

miR-3R_25 se expresa. Encontramos dos cepas de moscas con deleciones que cubren la región donde se encuentra el precursor de *miR-3R_25*: *Df(3R)Exel6186* y *Df(3R)ED6076* (Fig. R-9). Ambas deleciones cubren el precursor de *miR-3R_25* aunque la deleción *Df(3R)ED6076* cubre una región más amplia. En concreto, los puntos de corte de *Df(3R)ED6076* incluyen las regiones citogenéticas de 93E10 a 94A1, mientras que la deleción *Df(3R)Exel6186* incluye de 93E9 a 93F6.

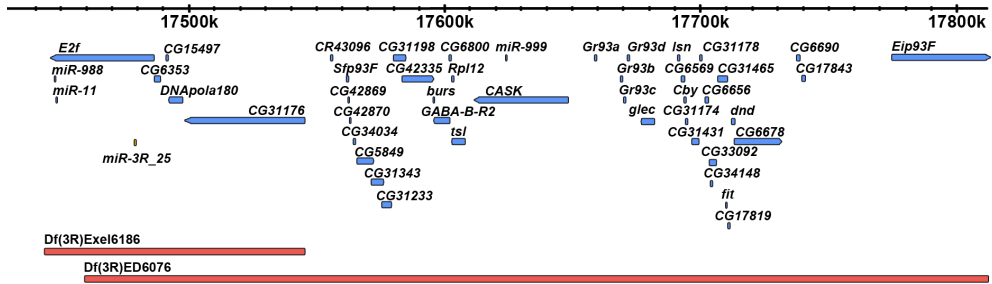


Figura R-9. Región genómica donde se localiza el precursor de *miR-3R_25*.

Representación de la región del cromosoma 3R de *Drosophila* donde se encuentra *miR-3R_25*. En naranja se muestra el precursor de *miR-3R_25* y en azul otros genes que cubren las dos deleciones utilizadas. La región que cubren las deleciones se representa en rojo. Escala 10 kb.

La detección de *miR-3R_25* la realizamos en embriones ya que ambas deleciones son letales en homocigosis. Para poder seleccionar los embriones mutantes cambiamos el cromosoma equilibrador del cromosoma 3, TM6b, que estabiliza la deleción en ambas cepas mutantes por el cromosoma TM3-GFP mediante cruces con la cepa TM3-GFP/TM6b. Este cromosoma contiene el gen de la proteína verde fluorescente GFP bajo el control de un promotor ubicuo de manera que los embriones con el cromosoma equilibrador son fluorescentes y los embriones homocigotos para las deleciones no lo son. Para la selección de embriones utilizamos un citómetro adaptado para embriones de *Drosophila*, el *embryo sorter COPAS select* (Unión Biométrica). Seleccionamos los embriones que no eran fluorescentes, un 8 % del total para la cepa *Df(3R)ED6076* y un 3% para la cepa *Df(3R)Exel6186*.

Amplificamos por PCR un fragmento de 121 nt que contiene la región de *miR-3R_25* a partir del DNA genómico de los embriones homocigotos para las deleciones para confirmar si las deleciones contienen el precursor de *miR-3R_25* (Fig. R-10, A). Como control utilizamos embriones de la cepa de referencia del proyecto genoma de *Drosophila*. Como control positivo, amplificamos la región de otro miRNA, *miR-3L_17* localizado en brazo L del cromosoma 3. No detectamos la región de *miR-3R_25* en los embriones homocigotos para *Df(3R)Exel6186*, confirmando que esta deleción incluye su región cromosómica. Sin embargo, en las

Resultados

muestras de los embriones *Df(3R)ED6076* si que amplificamos por PCR la región de *miR-3R_25* por lo que los extremos de esta deleción no están bien definidos y no incluyen la región citogenética 93F1.

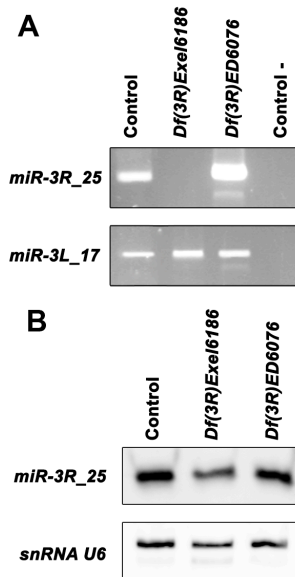


Figura R-10. *miR-3R_25* se expresa en embriones con deleciones en la región genómica donde se localiza su precursor.

A. Amplificación por PCR de las regiones genómicas de *miR-3R_25* y *miR-3L_17* en embriones homocigotos para las deleciones *Df(3R)Exel6186* y *Df(3R)ED6076*. Como control utilizamos la cepa de referencia *y¹; Gr22b¹ Gr22d¹ cn¹ CG33964^{R4.2} bw¹ sp¹; LysC¹ MstProx¹ GstD5¹ Rh6¹*. La región de *miR-3R_25* no se detecta en embriones *Df(3R)Exel6186* pero sí en embriones *Df(3R)ED6076*. La región de *miR-3L_17* se detecta en todas las muestras. B. Detección por northern blot de *miR-3R_25* en embriones de la cepa de referencia, y homocigotos para *Df(3R)Exel6186* y *Df(3R)ED6076*. Como control endógeno detectados *snRNA U6*. *miR-3R_25* se expresa en embriones de los tres genotipos.

Detectamos *miR-3R_25* en las muestras de embriones homocigotos para las deleciones mediante northern Blot de RNAs pequeños (Fig. R-10, B). Para confirmar que las cantidades de RNA en el ensayo eran similares para todas las muestras detectamos *snRNA U6* como control endógeno. *miR-3R_25* se expresa en los embriones homocigotos para las deleciones. Anteriormente habíamos confirmado que los embriones homocigotos para *Df(3R)Exel6186* no contienen la región genómica del precursor de *miR-3R_25* por lo que la detección del miRNA maduro en estas muestras sugiere que *miR-3R_25* no proviene del precursor predicho por miRDeep.

Durante la embriogénesis temprana de *Drosophila* se produce la translocación de RNAs de la madre al embrión. Estos RNAs maternos se generan en las células nodriza del ovario de las hembras y se transportan al embrión donde se expresan en las primeras etapas del desarrollo. Recientemente, se ha descrito el efecto materno para el miRNA *miR-34* en embriones (Soni *et al.* 2013). *miR-34* se transcribe y se procesa en las células nodrizas del ovario y el miRNA maduro se transporta al embrión donde controla la expresión de sus dianas. Si esto ocurriera para *miR-3R_25*, su detección en embriones homocigotos para *Df(3R)Exel6186* podría deberse a su expresión en las madres heterocigotas para la deleción de manera que los resultados de este ensayo no serían concluyentes. Para confirmar si el miRNA

maduro de *miR-3R_25* proviene del precursor predicho decidimos sobreexpresar su región genómica y detectar el miRNA maduro con el cambio de tres nucleótidos.

Obtuvimos mediante síntesis química un fragmento de 300 pb que contiene la región precursora de *miR-3R_25* y lo insertamos en 3'UTR del gen de la proteína roja fluorescente *dsRed2*. Previamente habíamos subclonado el gen *dsRed2* en el vector de transformación de la línea germinal de *Drosophila* pUAST para generar moscas transgénicas. Como control diseñamos el mismo transgén pero con el cambio de tres nucleótidos que detectamos en el *miR-3R_25* maduro. Generamos moscas transgénicas con los dos tipos de secuencias, la secuencia de la región precursora en el genoma *miR-3R_25(G)* y la secuencia precursora con el cambio en tres nucleótidos *miR-3R_25(S)*. Obtuvimos 10 líneas transgénicas para el transgén *miR-3R_25(G)*, 1.1 – 1.10 y nueve líneas para el transgén *miR-3R_25(S)*, 2.1 – 2.9.

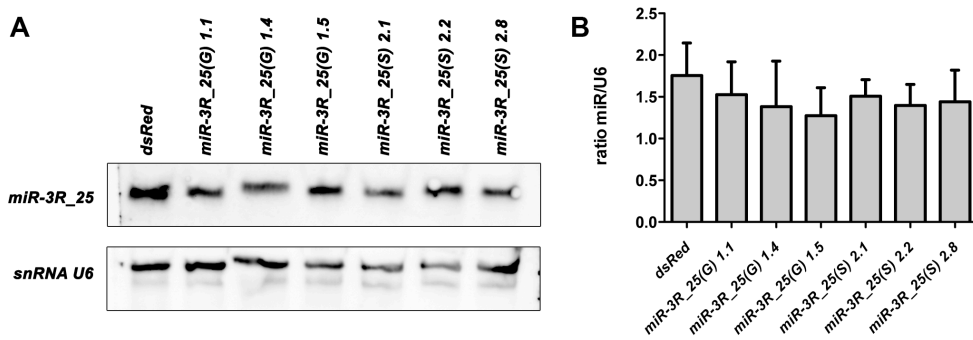


Figura R-11. La sobreexpresión del precursor de *miR-3R_25* no afecta los niveles del miRNA maduro.

A. Detección mediante northern blot de *miR-3R_25* en moscas que sobreexpresan las regiones precursoras del miRNA. Se utilizaron tres líneas de cada transgén. 1.1, 1.4 y 1.5 para *miR-3R_25(G)* y 2.1, 2.2 y 2.8 para *miR-3R_25(S)*. Como control utilizamos el transgén *UAS-dsRed*. Todos los transgenes se expresaron de manera ubicua con *Act5C-Gal4*. Como control endógeno detectamos el *snRNA U6*. B. Cuantificación de los niveles de *miR-3R_25* normalizados respecto al control endógeno *snRNA U6* (n=3). No se detectan cambios significativos en la expresión de *miR-3R_25* en ninguna muestra.

Expresamos los transgenes para *miR-3R_25* en todos los tejidos bajo el control de la línea de expresión ubicua *Act5C-Gal4*, como control expresamos la proteína roja fluorescente *dsRed*. Utilizamos tres líneas independiente para cada transgén. Las líneas 1.1, 1.4 y 1.5 para el precursor con la secuencia genómica, *miR-3R_25(G)* y las líneas 2.1, 2.2 y 2.8 para el precursor con la secuencia con las tres modificaciones *miR-3R_25(S)*. Antes de seleccionar las moscas para la extracción de RNA comprobamos que los transgenes se estaban expresando en todos los casos observando en una lupa con un módulo de fluorescencia la presencia de la proteína *dsRed* en todas moscas. A partir de extracciones de RNA total de las muestras

Resultados

realizamos tres northern blots de RNA de pequeño tamaño con la sonda de *miR-3R_25* que detecta la secuencia del miRNA maduro con los tres cambios (Fig. R-11, A; Fig. R-7). Detectamos el *snRNA U6* como control endógeno y cuantificamos la señal de *miR-3R_25* y de *snRNA U6* por densitometría. Normalizamos la expresión de *miR-3R_25* respecto al control endógeno para comparar su expresión en cada muestra. Al contrario de lo que esperábamos, no detectamos un aumento de la expresión de *miR-3R_25* en ninguna muestra (Fig. R-11, B). Estos datos confirman que el precursor de *miR-3R_25* predicho no es en realidad su precursor y por lo tanto *miR-3R_25* no proviene de la región del genoma predicha por miRDeep.

1.1.2.1.4. La sonda para *miR-3R_25* detecta a *miR-1*

Buscamos otras zonas en el genoma con homología a *miR-3R_25* para identificar su precursor mediante un Blast con la secuencia de *miR-3R_25* maduro. A parte de la región predicha por miRDeep, *miR-3R_25(G)*, encontramos otra región con homología en la banda citogenética 38C8 del cromosoma 2L. Esta región pertenece al precursor del miRNA *miR-1*. Al comparar los miRNAs maduros de *miR-3R_25* y *miR-1* comprobamos que los 16 primeros nucleótidos de ambos miRNAs son idénticos (Fig. R-12).

```
miR-3R_25 (G)  TGG AATGTAGGAAAGTGGAA
                ||| ||| ||| ||| ||| |||
miR-3R_25 (S)  TGG AATGTAAAGAAGTGGAA
                ||| ||| ||| ||| ||| |||
miR-1         TGG AATGTAAAGAAGTATGGAG
```

Figura R-12. La secuencia de *miR-3R_25* coincide con la de *miR-1*.

Secuencia de *miR-3R_25* en las lecturas de SOLiD (S), en las bases de datos (G) y secuencia de *miR-1*. Los guiones representan los nucleótidos comunes en las secuencias, en rojo, azul y gris se muestran los nucleótidos diferentes en cada secuencia.

Previamente, confirmamos la especificidad de la sonda para *miR-3R_25* comprobando que detectaba el miRNA con la secuencia, *miR-3R_25(S)* de las lecturas de SOLiD pero no la secuencia del genoma, *miR-3R_25(G)* (Fig. R-7). Sin embargo, dado que *miR-3R_25* y *miR-1* comparten la mayor parte de la secuencia de sus miRNAs maduros en la región 5', nos planteamos comprobar si la sonda para *miR-3R_25* detecta el miRNA maduro de *miR-1*. Para ello, utilizamos oligonucleótidos con la secuencia del miRNA maduro de *miR-1* y de *miR-3R_25* y detectamos por hibridación con la sonda para *miR-3R_25* (Fig. R-13). Como control detectamos los oligonucleótidos con la sonda para *miR-1*. Observamos que mientras la sonda para *miR-1* únicamente reconoce el oligonucleótido con la secuencia de *miR-1* maduro, la sonda para *miR-3R_25* detecta tanto el oligonucleótido con la secuencia de *miR-3R_25* como el oligonucleótido con la secuencia para *miR-1*.

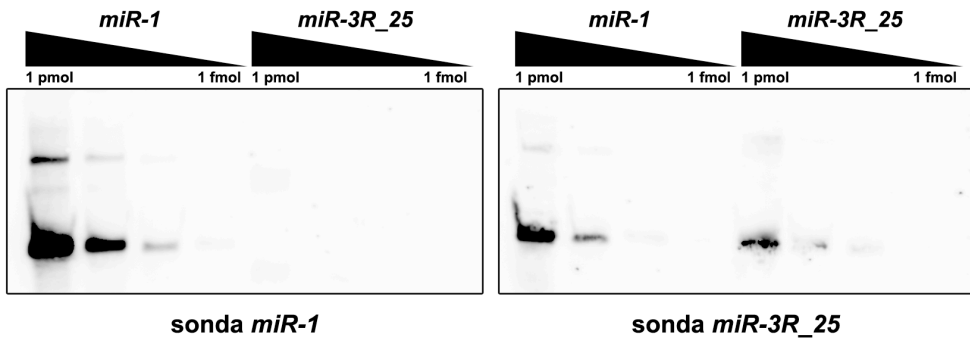


Figura R-13. La sonda de *miR-3R_25* detecta *miR-1* en Northern blot.

Detección por hibridación con la sonda para *miR-1* y la de *miR-3R_25* de dos oligonucleótidos con la secuencia correspondiente *miR-1* y la de *miR-3R_25* maduros. La sonda para *miR-1* detecta a *miR-1* pero no a *miR-3R_25* mientras que la sonda para *miR-3R_25* detecta las dos secuencias.

En resumen, la sonda para *miR-3R_25* es capaz de detectar a *miR-1*, el miRNA más expresado en moscas adultas (Tabla R-3). Esta sonda fue utilizada en la validación de *miR-3R_25* como nuevo miRNA en moscas mutantes para Dicer-1 (Fig. R-4), por lo que probablemente, los cambios en la expresión detectados en este ensayo se deban a cambios en los niveles de *miR-1*. Además, en mutantes por delección o por sobreexpresión del precursor de *miR-3R_25* no detectamos cambios en los niveles de expresión del miRNA maduro (Fig. R-10 y Fig. R-11). En conclusión, todos estos datos no confirman que *miR-3R_25* sea un nuevo miRNA por lo que decidimos no incluirlo en el estudio de expresión diferencial en moscas DM1. Sin embargo, la presencia de lecturas de *miR-3R_25* en todas las muestras secuenciadas no nos permite descartarlo como posible miRNA.

1.2. Estudio de la expresión diferencial de miRNAs en un modelo para DM1 en *Drosophila*

A partir de los datos de secuenciación masiva con SOLiD obtuvimos los valores de expresión para cada miRNA en cada muestra como se ha descrito previamente. Obtuvimos el miRNoma de dos líneas transgénicas independientes del transgén *i(CTG)480*, 1.1 y 2.2. Debido a la importancia del tejido muscular en la enfermedad, expresamos los transgenes en el músculo bajo el promotor de la cadena pesada de la miosina (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480*). Como control utilizamos moscas que expresaban únicamente la proteína Gal4 en el músculo (*Mhc-Gal4/+*). El análisis de expresión diferencial fue realizado en colaboración con el Dr. Manuel Mata del Hospital General de Valencia. Los datos de expresión para cada miRNA, que corresponde al número de lecturas de cada miRNA respecto al número de lecturas totales que mapean en un único punto del genoma, fueron transformados a su

Resultados

logaritmo en base 2. En total, analizamos dos muestras control (C_1 y C_2) y seis muestras experimentales (E1_1a, E1_1b, E1_2, E2_1a, E2_1b y E2_2) (Tabla R-1). Utilizamos el programa dChip para realizar un análisis de agrupamiento jerárquico o *clustering* usando el método del encadenamiento promedio (UPGMA). Para determinar qué cambios de expresión eran estadísticamente significativos aplicamos un análisis de la varianza (ANOVA, $\alpha=0.05$). Utilizamos la corrección para test múltiples de Benjamini-Hochberg o *False Discovery Rate (FRD)*. Encontramos 20 miRNAs expresados diferencialmente entre los dos grupos de muestras (Fig. R-14, Tabla R-5) lo que supone un ~13 % de los miRNAs analizados. La expresión de 19 miRNAs está reducida en las moscas modelo para DM1 y la de uno aumentada respecto a los controles. De estos 20 miRNAs, tres están conservados en humanos: *miR-1*, *miR-7* y *miR-10*.

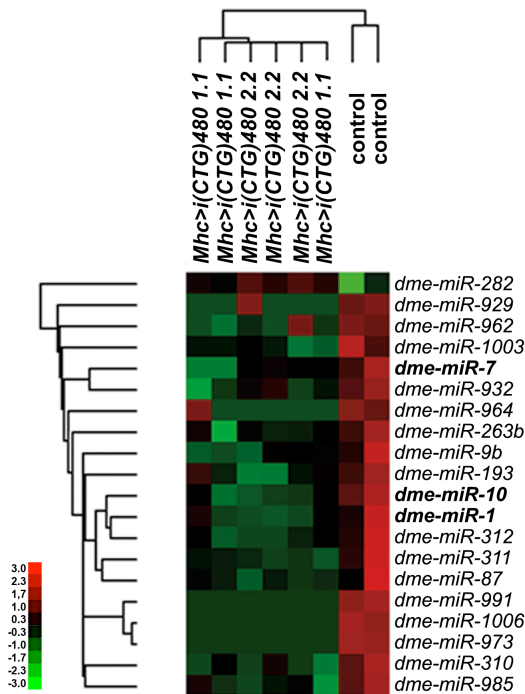


Figura R-14. La expresión de las repeticiones CTG en músculo de *Drosophila* altera los niveles de expresión de miRNAs específicos.

Mapa de calor y análisis de agrupamiento jerárquico de los perfiles de expresión de dos líneas independientes de *i(CTG)480* (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 1.1* y *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 2.2*) y moscas control (*Mhc-Gal4/+*). Las ramas más cercanas del dendrograma agrupan las muestras con perfiles de expresión más similares. Rojo y verde representan aumento y disminución de expresión, respectivamente. En negrita se resaltan los miRNAs conservados en humanos.

Seleccionamos tres miRNAs para validar el análisis de expresión diferencial, *miR-1*, *miR-7* y *miR-1003*. Los dos primeros, resultaban interesantes porque están conservados en humanos (Fig. R-16) mientras que *miR-1003* lo era por tratarse de un miRtrón. Realizamos tres extracciones de RNA total a partir de 50 machos de los genotipos *Mhc-Gal4/+* y *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 1.1* y analizamos la expresión de estos miRNAs mediante Northern blot de RNAs pequeños con sondas LNAs específicas para cada miRNA (Fig. R-15). Como control endógeno detectamos el *snRNA U6*. Cuantificamos la señal de cada miRNA por densitometría y normalizamos con la señal *snRNA U6*. Aplicamos el test t de Student de dos colas para comparar las muestras. Detectamos una reducción estadísticamente significativa en las moscas modelo DM1 para los tres miRNAs. La reducción para *miR-1* es de un ~70 %, para *miR-7* de un ~75 % y un ~50 % para *miR-1003*. Por lo tanto, estos resultados confirman que la expresión de las repeticiones CTG en músculo de *Drosophila* afectan al miRNoma generalmente reduciendo los niveles de expresión de miRNAs específicos.

Tabla R-5. miRNAs alterados en moscas modelo DM1

miRNA	<i>Mhc-Gal4/+</i>		<i>Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480</i>		p-valor ¹
	Expresión media	Error estándar	Expresión media	Error estándar	
<i>dme-miR-1</i>	126307.00	32841.00	76240.00	4409.00	0.0252603
<i>dme-miR-10</i>	5259.00	991.40	2499.00	202.50	0.00582726
<i>dme-miR-1003</i>	1892.00	185.20	1358.00	48.28	0.00651306
<i>dme-miR-1006</i>	18.32	1.71	0.00	0.00	7.67E-04
<i>dme-miR-282</i>	6.92	6.92	44.67	7.84	0.0136893
<i>dme-miR-929</i>	19.50	2.64	4.03	4.03	0.0480303
<i>dme-miR-962</i>	42.20	2.06	23.66	3.99	0.0438434
<i>dme-miR-7</i>	3126.00	831.50	1462.00	176.10	0.0335366
<i>dme-miR-932</i>	433.10	56.88	240.30	24.74	0.0343711
<i>dme-miR-964</i>	26.55	7.17	4.43	4.43	0.0366485
<i>dme-miR-263b</i>	1589.00	204.60	1046.00	65.10	0.0457602
<i>dme-miR-9b</i>	252.70	107.20	96.30	9.98	0.0227701
<i>dme-miR-193</i>	865.40	85.53	645.70	36.26	0.0436514
<i>dme-miR-310</i>	234.70	36.59	125.90	10.38	0.00875552
<i>dme-miR-311</i>	296.20	92.78	159.50	4.88	0.00792433
<i>dme-miR-312</i>	339.70	148.90	126.50	9.04	0.0132496
<i>dme-miR-87</i>	662.00	151.90	460.20	12.06	0.0292459
<i>dme-miR-991</i>	62.80	17.48	0.00	0.00	9.86E-03
<i>dme-miR-973</i>	14.82	0.98	0.00	0.00	2.95E-05
<i>dme-miR-985</i>	191.10	37.26	84.36	9.46	0.0142829

¹ El test FDR se aplicó para corregir los p-valores

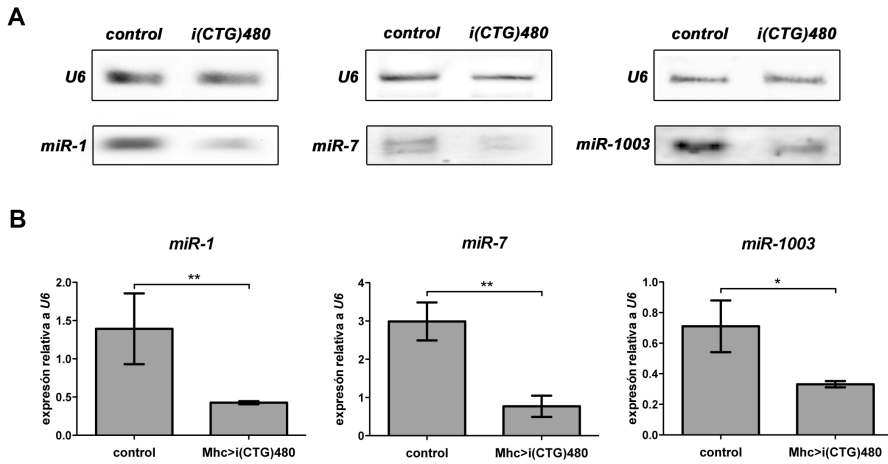


Figura R-15. Validación de las alteraciones en la expresión miRNAs específicos en moscas modelo DM1.

A. Detección por Northern blot de RNAs pequeños de *miR-1*, *miR-7* y *miR-1003* en muestras de los genotipos: *Mhc-Gal4/+* y *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480* y de *snRNA U6* como control endógeno. Se muestra una región representativa correspondiente a los miRNAs maduro y a *snRNAU6*. B. Cuantificación de los niveles de los miRNAs normalizados respecto al control endógeno *snRNA U6*. Las gráficas representan la expresión media y el error estándar. n=3, *p<0.05 y ** p<0.01

1.3. La reducción en los niveles de expresión de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10* está conservada en pacientes de DM1

De los 20 miRNAs alterados en moscas modelo para DM1 tres están conservados en humanos: *miR-1*, *miR-7* y *miR-10* (Fig. R-16). En humanos, existe un único miRNA maduro para *miR-1* que se genera a partir de dos precursores *pre-miR-1-1* y *pre-miR-1-2*. En el caso de *miR-7* existen tres precursores que se procesan en un mismo miRNA maduro, *pre-miR-7-1*, *pre-miR-7-2* y *pre-miR-7-3*. Sin embargo, *miR-10* tiene dos precursores en humanos, *pre-miR-10a* y *pre-miR-10b*, que dan lugar a dos miRNAs maduros diferentes, *miR-10a* y *miR-10b* respectivamente. En los tres casos, existe un alto grado de conservación entre los miRNAs de *Drosophila* y los de humanos. Los miRNAs maduros de *miR-1* y *miR-10* difieren en dos y tres posiciones respectivamente, mientras que la secuencia del miRNA maduro de *miR-7* es idéntica en *Drosophila* y en humanos. En cuanto a los precursores de los tres miRNAs, existen dos regiones altamente conservadas que corresponden a lo que se procesará como miRNA maduro y a la región opuesta a este en la horquilla precursora. Aunque en humanos existan más precursores para estos miRNAs que en *Drosophila*, las horquillas precursoras tienen un estructura

similar, lo que sugiere que los mecanismos de biogénesis de estos miRNAs podrían estar también conservados entre humanos y *Drosophila*.

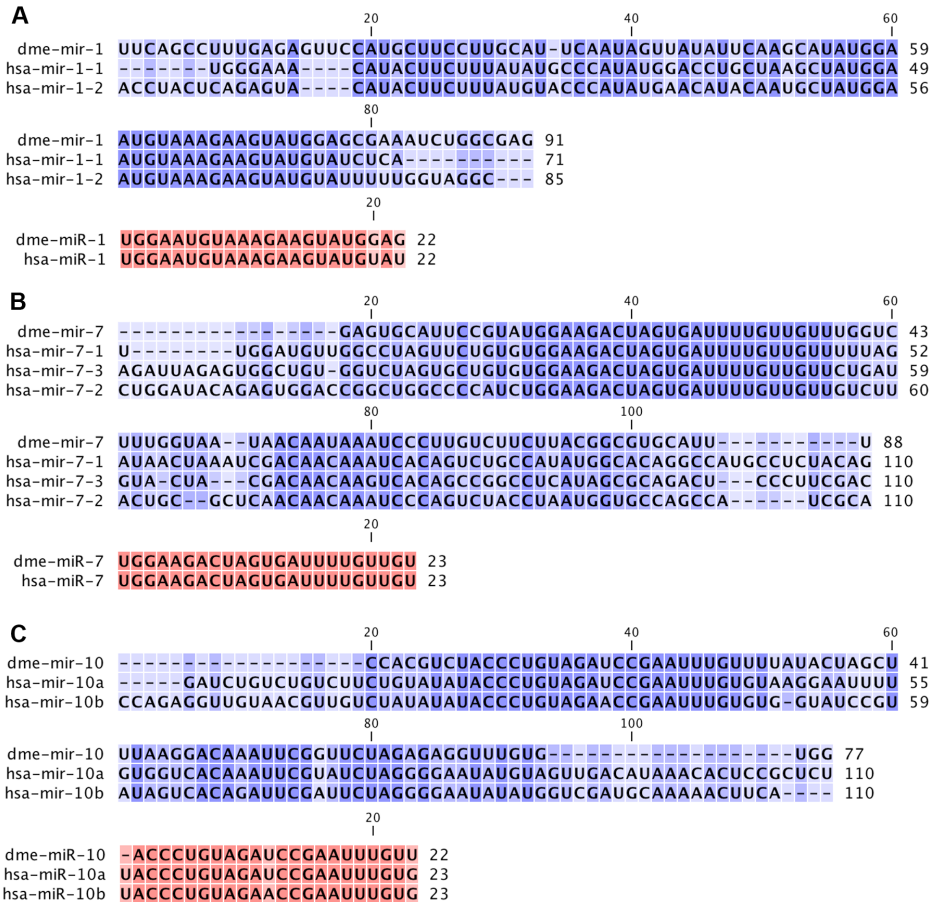


Figura R-16. Alineamiento de las secuencias de miR-1, miR-7 y miR-10.

El alineamiento de las secuencias de (A) miR-1, (B) miR-7 y (C) miR-10 muestra su conservación entre *Drosophila* y humanos. En azul se muestran los alineamientos correspondientes a los pre-miRNAs y en rojo los que corresponden a sus miRNAs maduros respectivos. dme, *Drosophila melanogaster*; hsa, *Homo sapiens*.

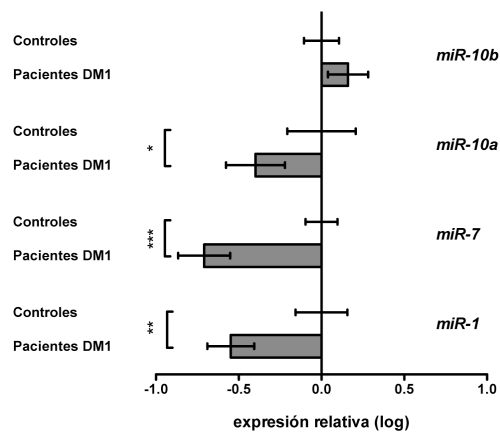
Analizamos la expresión de miR-1, miR-7, miR-10a y miR-10b en músculo esquelético de pacientes de DM1 para validar la relevancia para la enfermedad de nuestros resultados en *Drosophila*. Determinamos los niveles de expresión de los cuatro miRNAs mediante qRT-PCR en muestras de biopsias de músculo esquelético de cinco pacientes DM1 y cinco controles sanos (Tabla MM-7). Como controles analizamos dos snoRNAs, RNU44 y RNU48, que normalmente se utilizan

Resultados

como controles endógenos para el estudio de expresión de miRNAs en humanos. Realizamos ensayos Taqman específicos para cada gen y calculamos la expresión relativa de cada miRNA respecto al control *RNU48* mediante el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Fig. R-17). El control *RNU44* no pudo utilizarse como gen endógeno ya que detectamos diferencias significativas en su expresión entre pacientes y controles. Observamos una disminución significativa en la expresión de *miR-1* (~72 %), de *miR-7* (~80 %) y de *miR-10a* (~60 %) en músculos de pacientes respecto a individuos sanos, mientras que no detectamos cambios significativos para *miR-10b*. Eliminamos del análisis a los individuos control 6 y 7, porque se comportaban como outliers en todos los ensayos. Además estos controles tienen una edad de 76 y 87 años, respectivamente, sensiblemente superior a la edad media de los pacientes estudiados (47 ± 5 años) lo que podría influir en los resultados. De incluir a los controles 6 y 7 en el análisis, las diferencias observadas dejarían de ser significativas, detectándose únicamente una tendencia similar a la que se muestra en la Fig. R-17. Estos resultados demuestran que la alteración de miRNAs por la expresión de repeticiones CTG en músculo de *Drosophila* está conservada en humanos.

Figura R-17. Validación de alteraciones en los miRNAs *miR-1*, *miR-7* y *miR-10* en pacientes con DM1.

Análisis de expresión de los cuatro miRNAs por qRT-PCR en biopsias de músculo esquelético de pacientes con DM1 (n=5) y controles sanos (n=3). Se representa el logaritmo de la expresión relativa a los controles sanos normalizadas con el control endógeno *snoRNA RNU48*. Se observa una reducción en la expresión de *miR-1*, *miR-7* y de *miR-10a* en músculo de pacientes con DM1. *p-valor<0.05, **p-valor<0.01 y ***p-valor<0.001



Estudiamos la expresión de *miR-1*, *miR-7*, *miR-10a* y *miR-10b* antes y después de la diferenciación miogénica para determinar si las alteraciones en su expresión se originan durante la diferenciación muscular. Utilizamos una línea de fibroblastos de un paciente con DM1 y un control sano. Ambas líneas celulares fueron generadas y cedidas por el laboratorio del Dr. Adolfo López de Munaín (Hospital de Donostia). Brevemente, los fibroblastos fueron aislados a partir de piel del paciente y de un individuo sano y transformados con lentivirus con una construcción del gen murino MyoD bajo el control del sistema inducible Tet-on. La eficiencia del sistema de inducción se comprobó mediante la inmunodetección de MyoD en cultivos expuestos 24 h a doxiciclina.

Activamos el programa de diferenciación miogénica induciendo la expresión de MyoD con doxiciclina a una concentración de 2 μg por mL de medio de cultivo y recogimos los mioblastos tras diez días de cultivo. En paralelo, obtuvimos fibroblastos que en los que no activamos MyoD y analizamos la expresión de los cuatro miRNAs y de RNU 48 como control endógeno mediante qRT-PCR con sondas Taqman específicas. Antes de la miogénesis, la expresión de *miR-1* y *miR-10b* es igual en fibroblastos de pacientes de DM1 y controles (Fig. R-18, A y D), mientras que la expresión de *miR-10a* es levemente superior (Fig. R-18, C) y los niveles de *miR-7* están muy reducidos en fibroblastos de DM1 (Fig. R-18, B). Sin embargo, tras la inducción de la diferenciación los niveles de expresión de los cuatro miRNAs son significativamente inferiores en células de pacientes de DM1 que en los controles (Fig. R-18). Cabe destacar que para *miR-7* esta reducción es mayor en fibroblastos que en mioblastos. Estos resultados sugieren que las alteraciones en DM1 de los diferentes miRNAs deben tener su origen en diferentes mecanismos, al menos en el caso de *miR-7*, ya que mientras las alteraciones en la expresión de *miR-1*, *miR-10a* y *miR-10b* en células DM1 son dependientes de la diferenciación muscular, *miR-7* se encuentra disminuido en células DM1 aunque el programa de diferenciación miogénica no esté inducido.

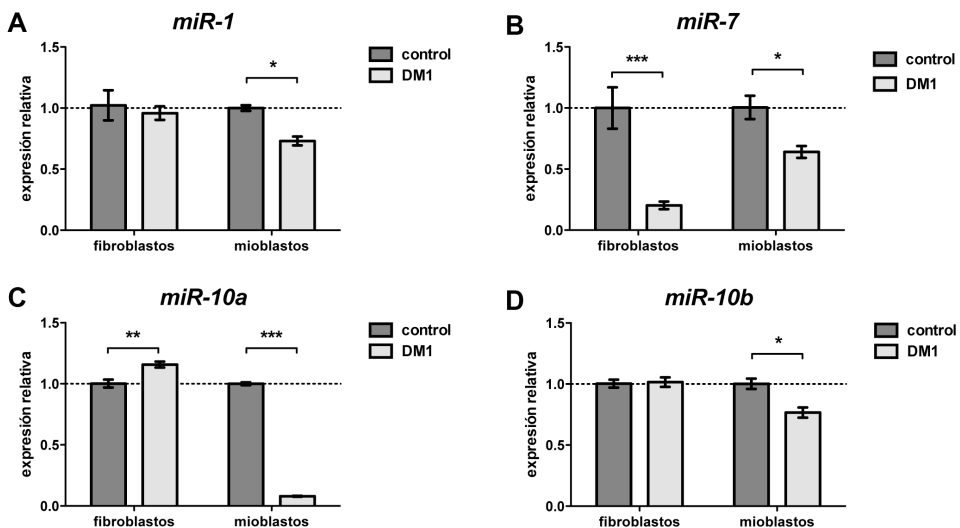


Figura R-18. Los niveles de expresión de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10* están reducidos en células de pacientes con DM1.

Análisis de expresión por qRT-PCR en fibroblastos de pacientes con DM1 (CTG=333) y controles sanos. Analizamos los niveles de los cuatro miRNAs antes y después de inducir la activación de la transdiferenciación miogénica. *miR-7* se encuentra reducido tanto en fibroblastos como en mioblastos transdiferenciados de DM1 (B), mientras que *miR-1* (A), *miR-10a* (C) y *miR-10b* (D) están reducidos solo tras la activación del programa miogénico en células DM1. Analizamos la expresión del *snoRNA U48* como control endógeno. Los datos de expresión se normalizaron respecto a las células control. *p-valor<0.05, **p-valor<0.01 y ***p-valor<0.001

2. Análisis funcional de miRNAs relevantes

2.1. Estudio del origen de las alteraciones de miRNAs

2.1.1. La transcripción de precursores primarios de miRNAs específicos está alterada en moscas DM1

Entre los 19 miRNAs con expresión reducida en las moscas modelo para la DM1, detectamos que tres miRNAs, *miR-310*, *miR-311* y *miR-312*, forman el clúster *miR-310~313*. Por lo tanto, estos miRNAs se transcriben como un policistrón a partir de un único precursor primario (Fig. 20, B). *miR-313* es el miRNA que completa el clúster pero no detectamos alteraciones en su expresión en el análisis global. Analizamos los datos de secuenciación masiva de los cuatro miRNAs del clúster (Tabla R-6) y realizamos un análisis de agrupamiento jerárquico usando el método UPGMA (Fig. R-19, A). Comprobamos que *miR-313* se comporta de manera similar que el resto de miRNAs de su clúster detectándose una reducción en su expresión en moscas DM1, aunque no resulta estadísticamente significativa.

Tabla R-6. Lecturas medias para los miRNAs del clúster miR-310~313

miRNA	C_1	C_2	E1_1a	E1_1b	E1_2	E2_1a	E2_1b	E2_2	p-valor
<i>dme-miR-310</i>	18.523	14.558	6.568	6.458	7.165	6.708	5.378	4.721	0.0088
<i>dme-miR-311</i>	25.524	14.175	9.110	7.451	7.955	5.620	6.196	6.200	0.0079
<i>dme-miR-312</i>	27.931	12.369	9.181	8.587	4.979	5.983	4.501	6.257	0.0132
<i>dme-miR-313</i>	5.397	3.065	2.401	1.064	1.943	1.269	0.818	0.683	n. s.

C= moscas control y E= moscas modelo para DM1. n. s. = diferencia no significativa

miR-960, *miR-962* y *miR-964* son otros tres miRNAs alterados en moscas DM1 que forman parte de un clúster (*miR-959~964*). Como para el otro clúster, analizamos los datos del resto de componentes del policistrón (*miR-959*, *miR-961* y *miR-963*) y confirmamos que estos miRNAs también están reducidos en moscas DM1, aunque no de manera significativa y que todos los miRNAs del clúster se comportan de manera similar diferenciándose claramente entre controles y moscas DM1 en el análisis de agrupamiento. (Tabla R-7 y Fig. R-19, B). Estos resultados sugerían que la alteración en la expresión de estos miRNAs podría estar causada por una desregulación a nivel de transcripción de sus mRNAs precursores.

Tabla R-7. Lecturas medias para los miRNAs del clúster miR-959~964

miRNA	C_1	C_2	E1_1a	E1_1b	E1_2	E2_1a	E2_1b	E2_2	p-valor
<i>dme-miR-959</i>	8.168	0.985	2.260	3.193	1.214	1.813	2.864	2.275	n. s.
<i>dme-miR-960</i>	21.805	23.972	11.300	9.864	7.408	2.296	8.417	7.508	<0.001
<i>dme-miR-961</i>	3.282	2.299	1.766	1.348	0.486	1.329	0.935	0.739	n. s.
<i>dme-miR-962</i>	4.011	3.667	1.554	1.774	1.457	1.632	1.929	2.048	0.0438
<i>dme-miR-963</i>	6.199	2.791	1.907	2.129	1.032	1.269	1.052	1.934	n. s.
<i>dme-miR-964</i>	2.407	2.080	1.483	1.135	0.425	1.088	0.994	0.967	0.0366

C= moscas control y E= moscas modelo para DM1. n. s. = diferencia no significativa

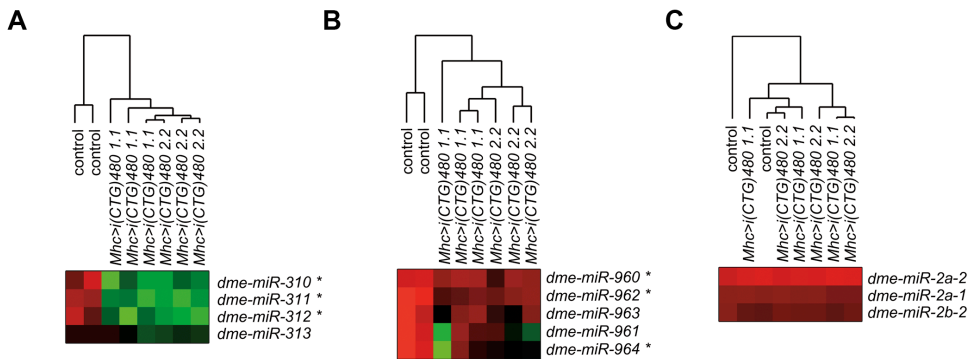


Figura R-19. Los miRNAs de los clústeres *miR-310~313* y *miR-959~964* están alterados en moscas modelo DM1.

Mapa de calor y análisis de agrupamiento jerárquico de los niveles de expresión de los clústeres *miR-310~313* (A), *miR-959~964* (B) y *miR-2a-1~2b-2* (C) en dos líneas *i(CTG)480* (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 1.1* y *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 2.2*) y moscas control (*Mhc-Gal4/+*). Las ramas más cercanas del dendrograma agrupan las muestras con perfiles de expresión más similares. Rojo y verde representan aumento y disminución de expresión, respectivamente.

Para confirmar esta hipótesis analizamos los niveles de expresión de los pri-miRNAs de estos clústeres por qRT-PCR en moscas modelo DM1 (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 1.1*) y controles (*Mhc-Gal4/+*). Como las regiones promotoras de los precursores no están bien definidas, diseñamos cebadores para amplificar regiones centrales de los clústeres (Fig. 20, A). Como control endógeno utilizamos el gen de la *Tubulina84B*. Realizamos qRT-PCRs para los precursores y el control endógeno con SYBR Green y calculamos la expresión relativa de cada precursor respecto a la *Tubulina84B* y normalizado respecto a las muestras control (*Mhc-Gal4/+*) con el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Observamos una reducción significativa de los niveles de los pri-

Resultados

miRNAs para ambos clústeres en las moscas DM1 (Fig. 20, B y C). Como control analizamos los niveles del pri-miRNA del cluster *miR-2a-1~2b-2*. Los miRNAs maduros de este clúster no están alterados en moscas DM1 (Fig. 19, C) y, consecuentemente, no detectamos diferencias significativas en la expresión del precursor de este clúster en las moscas DM1 (Fig. 20, D) lo que indica que la reducción en los niveles de los clústeres *miR-310~313* y *miR-959~964* es específica. Como control adicional, analizamos la expresión del gen *CG31646*. Este gen se localiza en la misma región cromosómica que el clúster *miR-959~964*, pero en la hebra opuesta, *CG31646* en la hebra + y el clúster *miR-959~964* en la hebra -. Los niveles de expresión de *CG31646* no están alterados en las moscas DM1 (Fig. 20, B) lo que descarta un efecto inespecífico en la expresión del pri-miRNA del clúster *miR-959~964* por un efecto del gen *CG31646*.

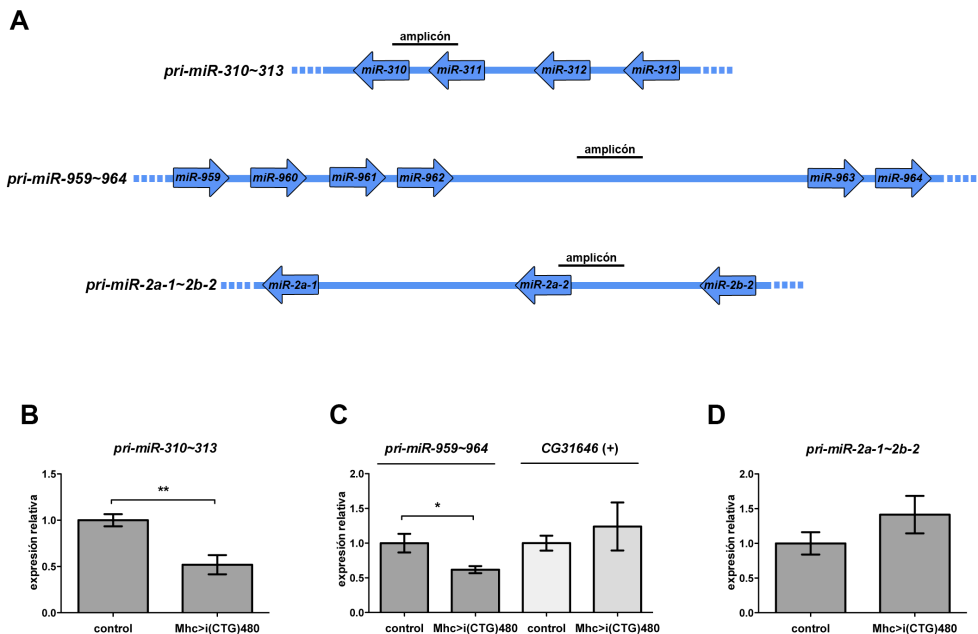


Figura R-20. Los pri-miRNAs de los clústeres *miR-310~313* y *miR-959~964* están reducidos en moscas DM1.

A. Representación a escala de los clústeres *miR-310~313*, *miR-959~964* y *miR-2a-1~2b-2* y la región amplificada por qRT-PCR. Análisis de expresión por qRT-PCR en moscas DM1 (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 1.1*) y moscas control (*Mhc-Gal4*) de los precursores de *miR-310~313* (B), *miR-959~964* (C) y *miR-2a-1~2b-2* (D). Los pri-miRNAs de *miR-310~313* y *miR-959~964* están reducidos en moscas DM1 mientras que no hay diferencias en el precursor de *miR-2a-1~2b-2* ni en el gen *CG31646*. *p-valor<0.05 y **p-valor<0.01

2.1.1.1. La expresión del precursor *pri-miR-7* está disminuida en DM1

Los niveles de expresión de los *pri-miRNAs* de los clústeres *miR-310~313* y *miR-959~964* están reducidos en moscas modelo DM1. Basándonos en estos resultados, nos propusimos estudiar si la disminución en los niveles de los precursores de *miRNAs* es el origen de las alteraciones en los *miRNAs* conservados en pacientes DM1. Para ello analizamos los niveles de los *pri-miRNAs* de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10*. Analizamos los niveles de expresión de *pri-miR-1*, *pri-miR-7* y *pri-miR-10* por qRT-PCR en moscas modelo DM1 (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 1.1*) y controles (*Mhc-Gal4/+*). Calculamos la expresión relativa de cada precursor respecto a la *Tubulina84B* y normalizamos respecto a las muestras control (*Mhc-Gal4/+*) con el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El análisis de expresión diferencial entre moscas DM1 y controles reveló que únicamente el precursor de *miR-7* está alterado en las moscas DM1 (Fig. R-21). *pri-miR-7* está disminuido en moscas modelo respecto a los niveles del control, mientras que no se encuentran diferencias significativas para *pri-miR-1* ni para *pri-miR-10*. Estos resultados apuntan a que las alteraciones en *miRNAs* debidas a la expresión de las repeticiones CUG tienen orígenes diferentes.

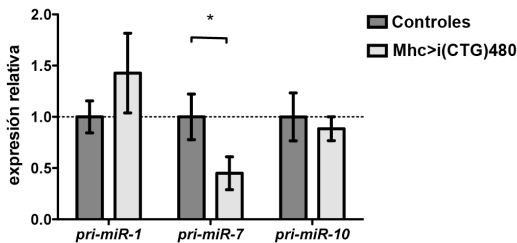


Figura R-21. *pri-miR-7* está reducido en moscas DM1.

Análisis de expresión por qRT-PCR en moscas DM1 (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 1.1*) y moscas control (*Mhc-Gal4*) de los *pri-miRNAs* de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10*. *pri-miR-7* está disminuido en moscas DM1 mientras que no hay diferencias en el precursor de *miR-1* y *miR-10*. *p-valor<0.05

El *miRNA* maduro de *miR-7* está completamente conservado en *Drosophila* y humanos. Sin embargo, mientras que en *Drosophila* hay un único *pri-miR-7*, en humanos el *miRNA* maduro se genera a partir de tres precursores: *pri-miR-7-1*, *pri-miR-7-2* y *pri-miR-7-3*. Para confirmar si la alteración en el precursor de *miR-7* está conservado en pacientes de DM1 analizamos la expresión de sus tres precursores en biopsias de músculo esquelético de enfermos con DM1.

Estudiamos la expresión de los precursores mediante qRT-PCR en seis biopsias musculares de pacientes con DM1 y de seis controles (Tabla MM-8). Obtuvimos los datos de expresión relativa de cada precursor con el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando la expresión del gen GAPDH como gen endógeno. Los tres precursores de *miR-7* están disminuidos en músculo de pacientes DM1, aunque esta disminución solo es estadísticamente significativa para *pri-miR-7-1* y *pri-miR-7-2* (Fig. R-22). Por lo tanto la desregulación de los precursores de *miR-7* está conservada en pacientes de

Resultados

DM1 demostrando que la alteración en *miR-7* mediada por la expresión de las repeticiones CUG se debe, al menos en parte, a la disminución de sus precursores primarios.

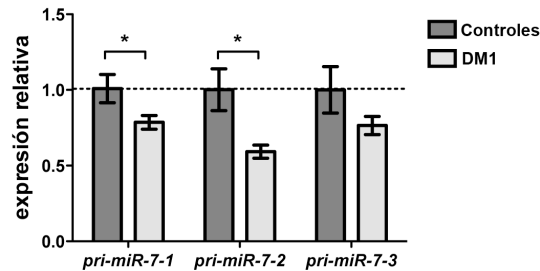


Figura R-22. Los pri-miRNAs precursores de *miR-7* están reducidos en músculo de pacientes de DM1.

A. Análisis de expresión de los precursores primarios de *miR-7* por qRT-PCR en muestras de músculo esquelético de pacientes DM1 y controles. Utilizamos la expresión de GAPDH como control endógeno. Detectamos una reducción en los tres precursores en músculo de pacientes aunque para *pri-miR-7-3* no es estadísticamente significativa (t-student). *p-valor<0.05

2.1.2. Implicación de Muscleblind en la disregulación de microRNAs en DM1

La pérdida de función de las proteínas Muscleblind al ser secuestradas en los *foci* ribonucleares es uno de los principales desencadenantes de la enfermedad. Recientemente, se ha descrito que MBNL1 participa en la biogénesis de *miR-1* y que la disminución de este miRNA en el corazón de pacientes DM1 se debe a la falta de función de MBNL1 (Rau *et al.* 2011). Para comprobar si la falta de función de *muscleblind* es la causa de las alteraciones en la expresión de los miRNA en *Drosophila* analizamos la expresión de los miRNAs en mutantes *muscleblind*.

2.1.2.1.1. Generación de moscas transgénicas *IR_{sp}-muscleblind*

Los mutantes *muscleblind* son letales en homocigosis por lo que para estudiar la expresión de los miRNAs en moscas adultas, decidimos generar moscas transgénicas mutantes por RNAi para *muscleblind*. La obtención de moscas mutantes por RNAi bajo el control de las regiones activadoras UAS nos permitirá dirigir la reducción de *mbl* en tejidos de interés como el muscular y evitar la letalidad.

A la hora de diseñar las construcciones capaces de desencadenar RNAi consideramos distintas posibilidades descritas en la bibliografía. En un estudio

previo, Giordano y colaboradores, compararon la eficiencia de tres tipos de construcciones para desencadenar silenciamiento por RNAi en *Drosophila* (Giordano *et al.* 2002). En el transgén *SymUAST* se inserta una copia del gen a silenciar entre dos regiones de secuencias UAS dispuestas en las cadenas sentido y antisentido del DNA, de manera que cuando se induce la expresión mediante el sistema UAS/Gal4 (anexo A-2) se transcriben tanto la secuencia normal del gen como la secuencia inversa (transcripción simétrica). De este modo se generan RNAs de doble cadena (dsRNAs) con la secuencia del gen. La transcripción simétrica de las dos cadenas de DNA puede resultar inefectiva por lo que en las otras dos estrategias se consigue generar un RNA de doble cadena a partir de una única transcripción. En la construcción *pUAST-IR* se insertan aguas abajo de las secuencias UAS dos copias del gen dispuestas de manera invertida. De manera similar, en la construcción *pUAST-IR_{sp}* las dos copias están separadas por una secuencia heteróloga. Esta secuencia espaciadora formará un bucle en el transcrito que facilita la formación de la horquilla en el RNA de doble cadena. Mediante estudios de expresión para el gen *white* con las tres construcciones, Giordano y colaboradores demostraron que, aunque las tres construcciones son capaces de silenciar la expresión del gen *white*, la construcción más efectiva era la *pUAST-IR_{sp}*. Por este motivo decidimos utilizar este tipo de construcción para silenciar la expresión de *muscleblind*.

Utilizamos la aplicación en red E-RNAi (Arziman *et al.* 2005) para diseñar el fragmento que utilizaremos para silenciar la expresión de los transcritos *muscleblind*. Esta aplicación evalúa regiones de 300-700 pb dentro de nuestra secuencia de interés y determina la capacidad para generar fragmentos eficientes de siRNA y la especificidad de cada región. Además E-RNAi diseña cebadores óptimos para amplificar estas regiones por PCR. La aplicación informática E-RNAi diseñó 10 regiones diferentes para el gen *muscleblind*. De entre ellas seleccionamos un fragmento de 525 pb correspondiente a la región comprendida entre las posiciones 13153076 y 13153600 del cromosoma 2R. Esta región se encuentra en el exon 1 del gen *muscleblind* y es común a todos los transcritos *mbl* descritos hasta la fecha (Fig. R-23). El algoritmo de E-RNAi predijo, para esta región, una eficiencia en la producción de siRNAs del 45.94 % y una especificidad del 100 %, no detectándose posibles dianas inespecíficas.

Generamos el cassette *IR_{sp}-muscleblind* mediante una serie de PCRs anidadas y solapantes (Fig. MM-2). Como secuencia espaciadora utilizamos una región de la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (GFP). Por lo tanto, la construcción de RNAi para *muscleblind* consiste en dos copias de una secuencia

Resultados

específica de *muscleblind* dispuestas de manera invertida y separadas por una secuencia heteróloga de la GFP.

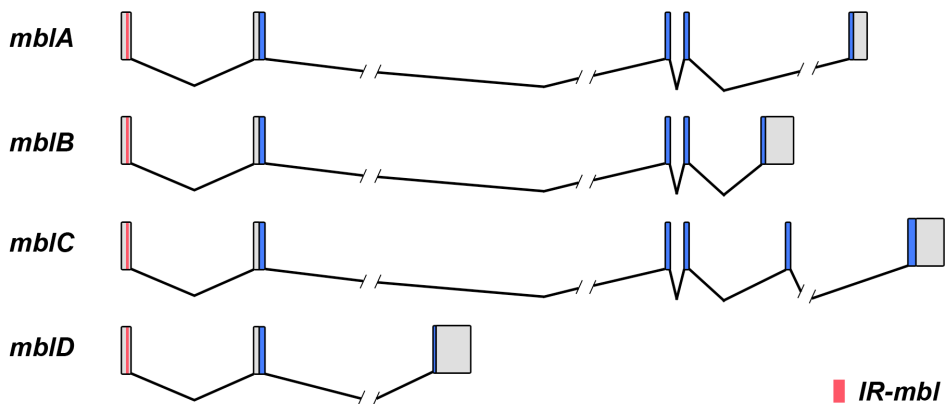


Figura R-23. Esquema de los transcritos *muscleblind* y de la región diana del RNAi.

Las cajas representan los exones presentes en cada isoforma de *muscleblind*, en gris exones no codificantes y en azul los codificantes. En rojo la región diana del RNAi localizada en el exón 1 común a todas las isoformas.

Antes de generar las moscas decidimos comprobar si la transcripción de la construcción IR_{sp} -*muscleblind* formaba la horquilla de doble cadena con un bucle separador. Para ello clonamos la construcción IR_{sp} -*muscleblind* en el vector *pBlueScript*, lo transcribimos *in vitro* con la polimerasa T7 y lo digerimos con RNasa A ajustando la concentración de NaCl a 0.3 M. La RNasa A en condiciones de baja concentración de sal corta indiscriminadamente RNA de doble cadena y de simple cadena, pero a una concentración igual o mayor de 0.3 M NaCl corta específicamente fragmentos de simple cadena (Ausubel *et al.* 2002). Tras la transcripción *in vitro* observábamos una banda de ~ 650 pb. Al digerir este fragmento en condiciones de alta concentración de NaCl aparecen productos de la digestión y una banda resistente a la digestión (de doble cadena) de tamaño inferior a la banda original (Fig. R-24). Estos resultados confirman que la transcripción de la construcción IR_{sp} -*mbl* genera una horquilla de RNA de doble cadena con un lazo espaciador.

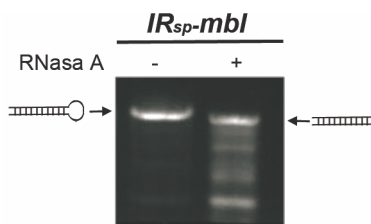


Figura R-24. Validación *in vitro* de la construcción IR_{sp} -*mbl* mediante digestión con RNasa A.

La transcripción del cassette IR_{sp} -*mbl* genera una horquilla que migra como un fragmento de unos 650 pb en un gel de agarosa. La digestión con RNasa A demostró que esta horquilla tiene una región de doble cadena y un lazo espaciador de simple cadena.

Para generar las moscas transgénicas, subclonamos la construcción *IR_{sp}-mbl* en el vector de transformación de la línea germinal de *Drosophila*, pUAST. El servicio de microinyección *VANEDIS Drosophila injection service* (Oslo, Noruega) microinyectó la construcción *UAS-IR_{sp}-muscleblind* en la línea germinal de embriones *white* de *Drosophila*. Estos embriones microinyectados eran mosaicos para la inserción del elemento P y algunos individuos de su descendencia F1 serían transgénicos. El elemento P contiene como marcador fenotípico el gen *miniwhite*, por lo que seleccionamos los individuos transformantes por la pigmentación de sus ojos. Cruzamos los individuos transformantes con la cepa *y w* para establecer las líneas de transformantes. De este modo establecimos 18 líneas transgénicas independientes para la construcción *UAS-IR_{sp}-muscleblind*.

2.1.2.1.2. Análisis de la expresión de *muscleblind* en moscas *IR_{sp}-mbl*

Para comprobar que los transgenes generados funcionan, es decir, que en efecto se da silenciamiento de *mbl*, cuantificamos los niveles de transcrito *mbl* mediante RT-PCR cuantitativa. Medimos los niveles de *mbl* y los normalizamos con los niveles de la *Tub84B*. Redujimos la variabilidad seleccionando hembras de 3 a 5 días, de este modo controlamos las variaciones debidas al sexo o a la edad. Además utilizamos 2 líneas transgénicas diferentes para evitar posibles efectos de posición de la inserción en el genoma de la mosca. Expresamos los transgenes *UAS-IR_{sp}-mbl* de manera ubicua mediante una línea que expresa la proteína Gal4 bajo el promotor de la Actina5C. Analizamos los niveles de *mbl* tanto en estas moscas que expresan el transgén como en las moscas parentales que utilizamos como controles. En el caso de la línea 105.9 obtuvimos un nivel de silenciamiento de *mbl* de un 50% (Fig. R-25, B) y alrededor de un 60% en el caso de moscas de la línea 56.1 (Fig. R-25, A). Como control analizamos el efecto de los transgenes *UAS-IR_{sp}-mbl* en presencia de un alelo mutante nulo para *muscleblind* (*mbl^{E27}*). Las moscas con el alelo *mbl^{E27}* tienen reducidos los niveles de *mbl* en un 40% respecto a los controles *y w* (Fig. R-25) mientras que con el transgén *UAS-IR_{sp}-mbl* expresado de manera ubicua detectamos un 12.5% (línea 56.1) y en 37% de *mbl* (línea 109.5) respecto a sus controles. En conclusión la línea 56.1 es más efectiva que la línea 109.5.

2.1.2.1.3. El silenciamiento de *muscleblind* potencia la toxicidad de los RNAs con expansiones CUG

La expresión en el ojo del transgén *UAS-i(CTG)480* bajo el control de *sevenless-Gal4* produce un fenotipo de ojo rugoso. Se ha demostrado que la falta de función de *muscleblind* potencia este fenotipo (García-Lopez et al. 2008). Este resultado es esperable ya que si las repeticiones CUG secuestran a *Muscleblind* y, como consecuencia, su función está reducida. Para comprobar si el silenciamiento de

Resultados

muscleblind modificaba el fenotipo de ojo rugoso cruzamos las líneas transgénicas *UAS-IR_{sp}-muscleblind* 56.1 y 109.5 con moscas del genotipo *sev-GAL4 UAS-i(CTG)480*. Como control utilizamos moscas *sev-GAL4 UAS-(CTG)480 UAS-GFP*. Este control nos sirve para comprobar que el efecto que observemos no se deba a la presencia de más de una secuencia UAS, ya que si el hecho de que haya más de una secuencia UAS hiciera que se redujera la expresión de los transgenes, observaríamos modificación del fenotipo. Previamente comprobamos que la reducción de *muscleblind* no genera ningún fenotipo, ya que las moscas *sev-GAL4 UAS-IR_{sp}-muscleblind* tienen el ojo normal, por lo que los fenotipos que obtengamos no se deberán a un efecto aditivo.

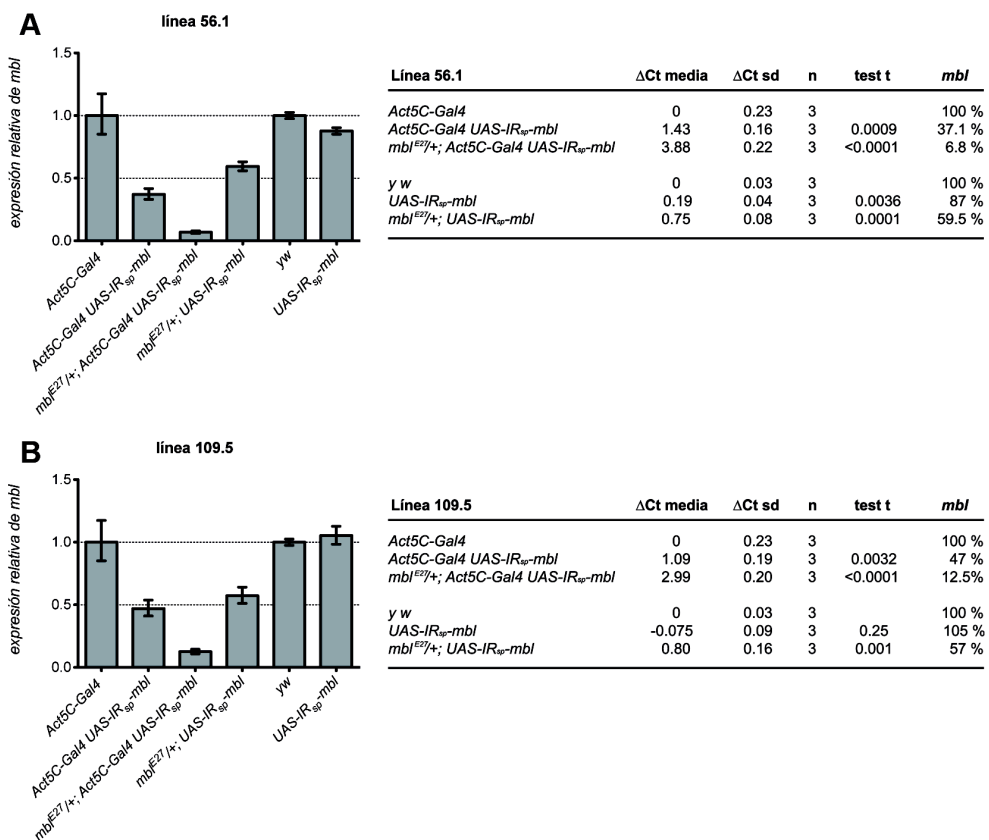


Figura R-25. La expresión de la construcción *IR_{sp}-mbl* reduce los niveles de expresión de *muscleblind* in vivo.

Análisis de expresión de *muscleblind* por qRT-PCR en moscas mutantes por RNAi. Los datos están normalizados tomando como referencia moscas de genotipo *Act5C-Gal4* y utilizando la *Tub84B* como control endógeno. Analizamos dos líneas independientes 56.1 (A) y 109.5 (B)

El silenciamiento de *muscleblind* empeora notablemente el fenotipo de ojo rugoso con las dos líneas utilizadas, 56.1 y 109.5 (Fig. R-26). Con ambas líneas aumenta la rugosidad y disminuye el tamaño del ojo (Fig. R-26, C y D). El fenotipo es más fuerte con la línea 56.1 dado que la reducción del ojo es mayor que con la línea 109.5 y además algunas moscas presentan un aumento en la fusión de omatidios y de puntos necróticos. Por ejemplo, en el caso de la línea 56.1 todas las moscas presentan puntos necróticos en los ojos mientras que en el caso de 109.5 presentan orificios un 58% de las moscas. Estos datos son congruentes con los datos de expresión obtenidos para los transgenes donde determinamos que la línea 56.1 produce un mayor silenciamiento de *muscleblind* que la línea 109.5 (Fig. R-25). Por este motivo utilizamos la línea *UAS-IR_{sp}-mbl* 56.1 para analizar si *Muscleblind* está implicado en la alteración de los miRNAs.

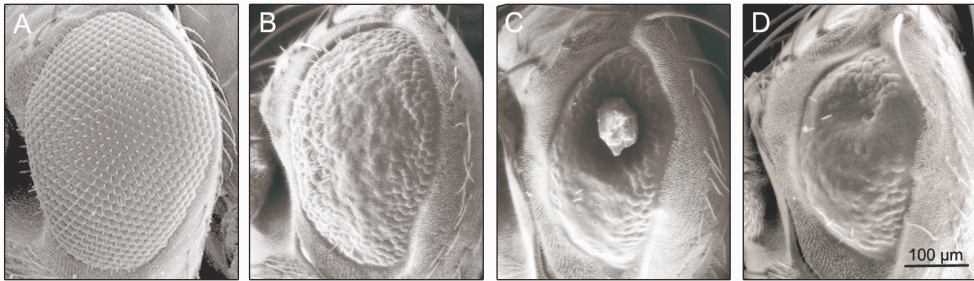


Figura R-26. El silenciamiento de *muscleblind* potencia la toxicidad de los RNAs con expansiones CUG.

Micrografías de microscopía electrónica de barrido de ojos de moscas adultas con los siguientes genotipos: (A) *OrR*, (B) *sev-GAL4 UAS-i(CTG)480 UAS-GFP*, (C) *sev-GAL4 UAS-i(CTG)480 UAS-IR_{sp}-mbl* (56.1), (D) *sev-GAL4 UAS-i(CTG)480 UAS-IR_{sp}-mbl* (109.5). La micrografía (A) muestra un ojo silvestre. Las moscas que expresan RNAs con repeticiones CUG presentan un fenotipo de ojo rugoso (B). El silenciamiento de *muscleblind* modifica este fenotipo (C y D). Los ojos de estas moscas tienen menor tamaño y mayor rugosidad y presentan un orificio por falta de omatidios.

2.1.2.2. *Muscleblind* es necesario para la regulación de *miR-1* en *Drosophila*

Para confirmar si *muscleblind* está implicado en la alteración de *miR-1* y *miR-7* en las moscas DM1, analizamos la expresión de los miRNA maduros en moscas que sobreexpresan la isoforma MbIC en músculo (*Mhc-Gal4 UAS-MbIC*) y moscas mutantes para *mbl* por RNAi en las que dirigimos el silenciamiento de *mbl* en músculo (*Mhc-Gal4 UAS-IR_{sp}-mbl*). Cuantificamos la expresión de *miR-1* y *miR-7* mediante Northern blot y utilizamos el *snRNA U6* como control endógeno (Fig. R-27). Detectamos que mientras la sobreexpresión de MbIC no afecta a los niveles de

Resultados

miR-1, el silenciamiento de *mbl* causa una reducción significativa de su expresión (Fig. R-27, A y C). Lo que indica que *mbl* es necesario para la biogénesis de *miR-1*. El silenciamiento de *mbl* también causa una disminución de los niveles de *miR-7* aunque en esta reducción no es estadísticamente significativa. Para *miR-7*, la sobreexpresión de MbIC tampoco afecta a su expresión (Fig. R-27, E y G).

El hecho de que *mbl* sea necesario para la biogénesis de *miR-1*, sugiere que su secuestro en los *foci* ribonucleares en DM1 podría ser el responsable de la alteración de *miR-1* en DM1. Si esto fuera así, la restitución de los niveles de *mbl* en moscas DM1 debería restablecer la expresión de *miR-1*. Para comprobarlo, sobreexpresamos la isoforma MbIC en moscas que expresan las repeticiones CUG en músculo (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-MblC*) y analizamos la expresión de *miR-1* comparándola con la de moscas DM1 (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480*). Observamos que la sobreexpresión de MbIC rescata los niveles de expresión de *miR-1* en un 55 % (Fig. R-27 B y D). Mientras que los niveles de *miR-7* no cambian al sobreexpresar MbIC (Fig. R-27 F y H). En conjunto, estos datos sugieren que *muscleblind* es necesario para la biogénesis de *miR-1* y está implicado en la alteración de su expresión en moscas DM1.

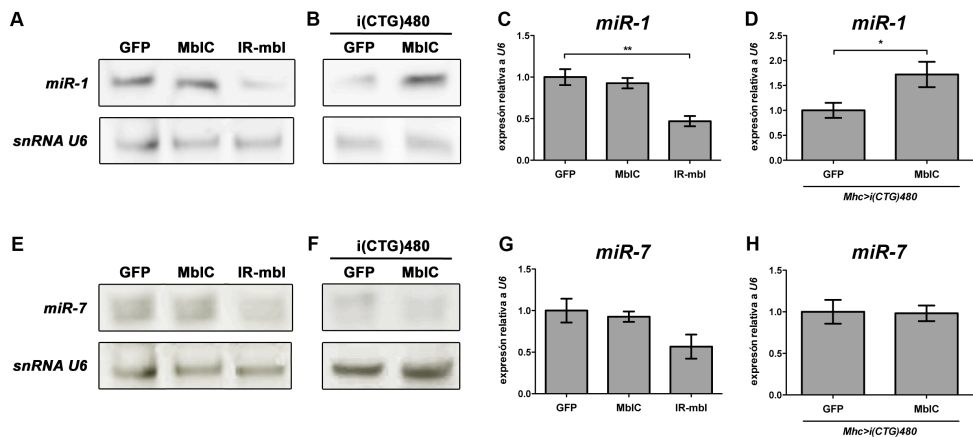


Figura R-27. Muscleblind regula los niveles de *miR-1*.

Detección por northern blot de *miR-1* y *miR-7* en moscas de los genotipos: *Mhc-GAL4 UAS-GFP*, *Mhc-GAL4 UAS-MblC*, *Mhc-GAL4 UAS-IR_p-mbl*, *Mhc-GAL4 UAS-i(CTG)480 UAS-GFP* y *Mhc-GAL4 UAS-i(CTG)480 UAS-MblC*. *snRNA U6* se usó como control endógeno. (A-C) El silenciamiento de *mbl* causa una reducción del 48 % expresión de *miR-1* y la expresión de MbIC en moscas DM1 rescata los niveles de *miR-1* en un 55 %, mientras que la expresión de MbIC en un fondo silvestre no altera los niveles de *miR-1* (B). Sin embargo cambios en los niveles de *mbl* no afectan a la expresión de *miR-7* (E y G) ni rescatan su alteración en moscas DM1 (F y H). n=4, *p-valor<0.05 y **p-valor<0.01.

2.1.3. La alteración de miRtrones en moscas DM1 no se debe a defectos en el *splicing* de sus precursores

Dos de los miRNAs alterados en las moscas modelo DM1, *miR-1003* y *miR-1006*, son miRtrones, miRNAs cuyos precursores son intrones enteros de genes hospedadores y que necesitan la maquinaria de *splicing* para su biogénesis. Dada la relevancia del *splicing* en la ruta de patogénesis de la DM1 nos propusimos comprobar si las alteraciones en estos miRNAs se deben a defectos en el *splicing* de su gen hospedador.

Analizamos el *splicing* del intrón hospedador de *miR-1003* (intrón 6 del gen *CG6695*) y de *miR-1006* (intrón 4 del gen *VhaSFD*) en moscas modelo de DM1 (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480*) y controles (*Mhc-Gal4/+*) mediante RT-PCR. Para comprobar si hay cambios en los niveles de los transcritos hospedadores, amplificamos una región de los mRNAs maduros de *CG6695* y *VhaSFD*. Como control analizamos el *splicing* del intrón precursor de *miR-1004* (intrón 19 del gen *CG43707*), cuyo miRNA maduro no está alterado en moscas DM1. Como cabía esperar, no detectamos cambios en el intrón 19 del gen *CG43707*, intrón precursor de *miR-1004* (Fig. R-28, C y E). En el caso del gen hospedador de *miR-1006*, no encontramos transcritos *VhaSFD* con el intrón 4 ni en moscas DM1 ni en los controles, por lo que el intrón está completamente escindido en los transcritos maduros de *VhaSFD* en ambas muestras (Fig. R-28, B). Sin embargo, en el caso del precursor de *miR-1003*, los niveles de transcritos *CG6695* con el intrón 6 están reducidos en moscas DM1 un ~24 % respecto a los controles (Fig. R-28, A y D), por lo que el intrón 6 se procesa con mayor eficiencia en moscas DM1 que en controles.

En moscas modelo para DM1 los niveles de los miRNAs maduros de *miR-1003* y de *miR-1006* están reducidos. Si esta reducción se debiera a defectos en el *splicing* de sus transcritos precursores, debería haber un aumento de transcritos de *CG6695* y *VhaSFD* con el intrón precursor retenido en moscas DM1. Sin embargo, para *CG6695* observamos una disminución de transcritos con el intrón 6 y para *VhaSFD* no detectamos transcritos con el intrón 4. Estos resultados sugieren que las alteraciones en moscas DM1 de los miRtrones *miR-1003* y *miR-1006* no se deben a defectos en el *splicing* de sus precursores.

Resultados

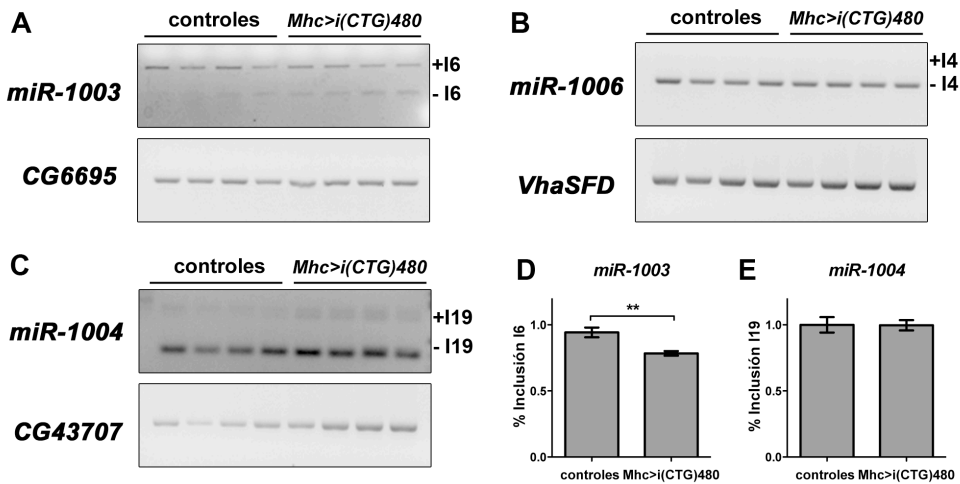


Figura R-28. Análisis del *splicing* de los intrones precursores de *miR-1003* y de *miR-1006* en moscas DM1.

Análisis por RT-PCR para comprobar la eficiencia en el *splicing* de los intrones hospedadores de *miR-1003* (A) y *miR-1006* (B) en moscas modelo DM1 (*Mhc-GAL4 UAS-i(CTG)480*) y controles (*Mhc-GAL4/+*). Como control analizamos el *splicing* del intrón hospedador de *miR-1004* (C). No detectamos cambios en el *splicing* del intrón 4 del gen *VhaSFD* (precursor de *miR-1006*), ni para el intrón 19 del gen *CG43707* (precursor de *miR-1004*) mientras que los transcritos *CG6695* con el intrón 6 (precursor de *miR-1003*) están reducidos en moscas DM1 (A, D). Los niveles de todos los transcritos de *CG6695*, *VhaSFD* y *CG43707* también se analizaron y no se detectaron diferencias entre los genotipos estudiados. n=4, **p-valor<0.01.

2.2. Análisis de la función normal de miRNAs relevantes

2.2.1. Análisis de dianas de los miRNAs alterados en DM1

En músculo esquelético de pacientes DM1 está conservada la alteración de la expresión de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10a*. Para estudiar el efecto de estas alteraciones decidimos analizar la expresión de los mRNAs dianas de estos miRNAs en pacientes DM1. Partimos de unos datos de micromatrices de expresión obtenidos en nuestro laboratorio a partir de 20 biopsias musculares de DM1 y 15 biopsias de individuos sanos. Estos datos se analizaron para detectar diferencias en la expresión de mRNAs mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Para nuestro estudio de dianas de los miRNAs interesantes seleccionamos aquellos mRNAs en los que había un cambio de expresión estadísticamente significativo de más de 10X entre pacientes de DM1 y controles, un total de 139 transcritos. Utilizamos la aplicación web Targetscan para predecir las dianas de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10a* y filtramos los resultados de las micromatrices de expresión con las predicciones de Targetscan utilizando el programa dChip. Encontramos 21 dianas para *miR-1* cuya expresión estaba significativamente alterada en biopsias de pacientes (Tabla R-10), 14 dianas

de *miR-7* (Tabla R-9) y para *miR-10a* encontramos 7 dianas alteradas (Tabla R-11). Dado que la expresión de los miRNAs está reducida en pacientes DM1, esperaríamos que sus dianas estuvieran aumentadas. Para determinar si las dianas de un miRNA están significativamente aumentadas o se comportan como el resto de los datos, comparamos el porcentaje de genes aumentados y disminuidos en los datos totales (95 transcritos aumentados y 44 disminuidos) con esos porcentajes en las dianas de cada miRNA mediante un test F de dos colas. Encontramos que las dianas de los tres miRNAs conservados están significativamente aumentadas en músculo de DM1. 21 dianas de *miR-1* están alteradas en los datos de expresión, 20 tienen su expresión aumentada y una disminuida en los pacientes con DM1 (Fig. R-29, A). Para *miR-7*, las 14 dianas están aumentadas en DM1 (Fig. R-29, B), y lo mismo ocurre con las seis dianas de *miR-10a* (Fig. R-29, C). Como control, analizamos las dianas de 15 miRNAs al azar (Tabla R-8). No detectamos que las dianas aumentadas de estos miRNAs sean significativamente diferentes al total de transcritos alterados. En la figura R-29, D, E y F se ilustran 3 ejemplos: dianas para *let7a*, *miR-340* y *miR-454*. Por lo tanto, el aumento en las dianas de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10a* parece ser específico.

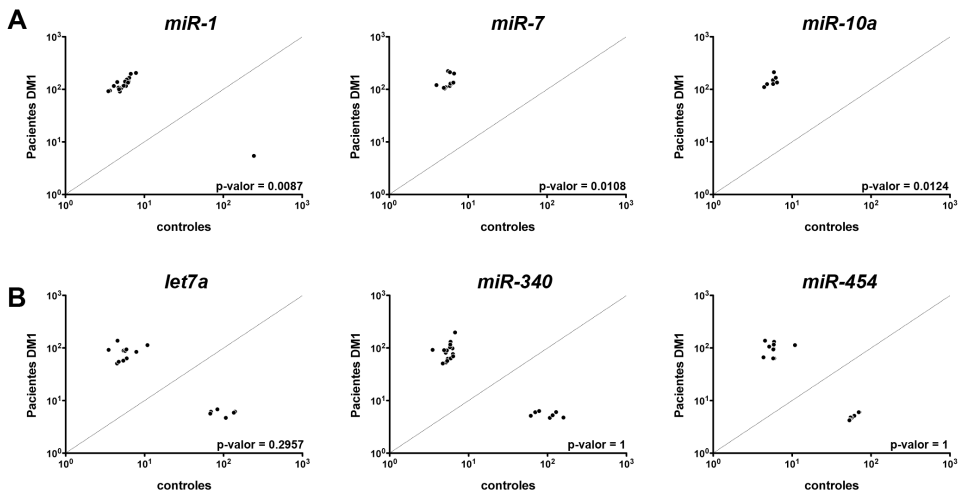


Figura R-29. La expresión de las dianas de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10a* están alteradas en músculo de pacientes DM1.

Gráficos de dispersión de la expresión de dianas de miRNAs en micromatrices de expresión de biopsias de pacientes de DM1 y controles sanos para *miR-1* (A), *miR-7* (B) y *miR-10a* (C) y para tres miRNAs seleccionados al azar: *let7a* (D), *miR-340* (E) y *miR-454* (F). En conjunto, las dianas de *miR-1*, las de *miR-7* y las de *miR-10a* están aumentadas en DM1 mientras que las de los miRNAs que no están alterados no se agrupan significativamente. *p-valor<0.05, **p-valor<0.01 y ***p-valor<0.001.

Tabla R-8. Dianas de miRNAs alteradas en biopsias musculares de pacientes con DM1

miRNA	Dianas predichas alteradas en análisis de expresión		
	Aumentadas	Disminuidas	Total
<i>miR-1</i>	20	1	21
<i>miR-7</i>	14	0	14
<i>miR-10a</i>	7	0	7
<i>let7a</i>	10	8	18
<i>miR-132</i>	2	2	4
<i>miR-29c</i>	12	5	17
<i>miR-99a</i>	1	0	1
<i>miR-122</i>	2	1	3
<i>miR-302</i>	5	1	6
<i>miR-330</i>	3	2	5
<i>miR-340</i>	16	8	24
<i>miR-374a</i>	3	6	9
<i>miR-454</i>	12	6	18
<i>miR-488</i>	2	1	3
<i>miR-541</i>	1	0	1
<i>miR-592</i>	3	1	4
<i>miR-652</i>	0	0	0
<i>miR-1207</i>	2	0	2

2.2.2. Validación de dianas de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10a* en DM1

En los datos de expresión de biopsias musculares de DM1 encontramos 21 dianas alteradas de *miR-1* (Tabla R-10), 14 de *miR-7* (Tabla R-9) y 7 de *miR-10a* (Tabla R-11). Seleccionamos cinco dianas de *miR-1*, cinco de *miR-7* y tres de *miR-10a* para validar su alteración por qRT-PCR (Fig R-30). Analizamos la expresión de estos 13 mRNAs en seis biopsias musculares de pacientes con DM1 y de seis controles (Tabla MM-8). Obtuvimos los datos de expresión relativa de cada gen con el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando la expresión del gen *GAPDH* como gen endógeno. Detectamos un aumento en la expresión de todos los genes aunque solo resultó estadísticamente significativa para tres dianas de *miR-1* (Fig R-30, A), para tres dianas de *miR-7* (Fig R-30, B) y para una diana de *miR-10a* (Fig R-30, C). En

concreto encontramos aumentada la expresión del gen SOD1 que codifica el enzima de la superoóxido dismutasa, del regulador de la transcripción SMARCA4, del factor de intercambio de nucleótidos NET1, de una proteína implicada en la secreción de la proteína amiloide CTSB, del gen ATG4 implicado en la regulación de la autofagia, de la proteína del citoesqueleto VCL y del gen UBE21 que es un miembro de la maquinaria de ubiquitinación. Estas dianas alteradas de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10a* tienen funciones muy diversas por lo que estos datos sugieren que la alteración de miRNAs en músculo de pacientes de DM1 genera alteraciones en un amplio rango de rutas metabólicas contribuyendo a la complejidad de la patología molecular de la DM1.

Tabla R-9. Dianas de *miR-1* alteradas en biopsias musculares de pacientes con DM1

Gen	Nivel de cambio	Límite inferior	Límite superior	p-valor ¹
<i>PDIK1L</i>	22.22	6.59	37.89	0.037748
<i>PEA15</i>	22.03	6.15	37.94	0.042218
<i>GTF2B</i>	22.98	6.36	39.68	0.042403
<i>TAGLN2</i>	26.19	9.72	42.86	0.020954
<i>BPNT1</i>	25.81	9.56	42.15	0.021207
<i>MGAT4A</i>	26.29	10.12	42.50	0.018619
<i>WDR6</i>	21.53	6.02	37.07	0.042270
<i>ZNF148</i>	19.83	5.63	34.16	0.041894
<i>SNX2</i>	20.70	5.82	35.73	0.042245
<i>CITED2</i>	25.73	9.57	41.96	0.020953
<i>SULF1</i>	30.37	13.42	47.34	0.010233
<i>SLC25A25</i>	21.81	6.01	37.74	0.043150
<i>NET1</i>	29.23	12.85	45.63	0.010575
<i>PLEKHA7</i>	21.34	5.98	36.71	0.042196
<i>UNC119B</i>	28.23	10.30	46.29	0.021808
<i>BCL11B</i>	-45.20	-16.44	-73.97	0.035343
<i>HS3ST3B1</i>	18.56	5.26	31.88	0.042715
<i>SLC16A3</i>	25.52	9.43	41.67	0.021396
<i>DLG4</i>	21.02	5.90	36.16	0.042197
<i>SMARCA4</i>	24.71	9.23	40.21	0.020867
<i>SOD1</i>	21.66	5.90	37.69	0.044023

¹ El test FDR se aplicó para corregir los p-valores

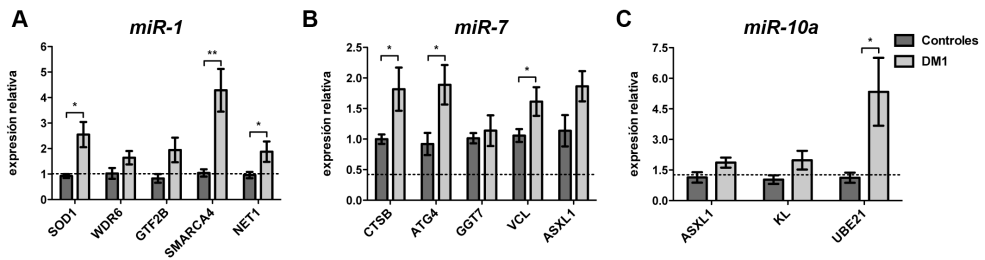


Figura R-30. Validación de dianas específicas de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10a* en biopsias musculares de pacientes DM1.

Análisis de expresión de dianas de *miR-1* (A), *miR-7* (B) y *miR-10a* (C) por qRT-PCR en muestras de músculo esquelético de pacientes DM1 y controles. Utilizamos la expresión de GAPDH como control endógeno. Detectamos un aumento estadísticamente significativo para algunas dianas. (t-student). *p-valor<0.05 **p-valor<0.01.

Tabla R-10. Dianas de *miR-7* alteradas en biopsias musculares de pacientes con DM1

Gen	Nivel de cambio	Límite inferior	Límite superior	p-valor ¹
<i>HPCAL4</i>	21.17	5.90	36.47	0.042617
<i>ZNF148</i>	19.83	5.63	34.16	0.041894
<i>SNCA</i>	39.95	21.93	58.04	0.002100
<i>ATXN1</i>	20.76	5.84	35.71	0.042179
<i>CTSB</i>	30.12	13.30	46.98	0.010266
<i>PAPPA</i>	20.57	5.80	35.34	0.042067
<i>VCL</i>	21.12	5.93	36.35	0.042152
<i>TMEM26</i>	30.36	13.43	47.31	0.010186
<i>SMARCD1</i>	21.52	6.84	36.20	0.032970
<i>PSME3</i>	20.80	5.86	35.78	0.042065
<i>GATA6</i>	20.97	5.88	36.07	0.042312
<i>ASXL1</i>	36.07	18.36	53.80	0.004140
<i>GGT7</i>	20.65	5.78	35.56	0.042626
<i>ATG4A</i>	21.78	6.04	37.59	0.042772

¹ El test FDR se aplicó para corregir los p-valores

Tabla R-11. Dianas de *miR-10a* alteradas en biopsias musculares de pacientes con DM1

Gen	Nivel de cambio	Límite inferior	Límite superior	p-valor ¹
<i>BTRC</i>	26.12	9.70	42.57	0.020996
<i>KL</i>	26.13	10.06	42.24	0.018685
<i>UBE2I</i>	22.06	6.17	37.97	0.042043
<i>GATA6</i>	20.97	5.88	36.07	0.042312
<i>ASXL1</i>	36.07	18.36	53.80	0.004140
<i>MTMR3</i>	26.74	9.87	43.65	0.021248
<i>HS6ST2</i>	25.03	9.31	40.77	0.021054

¹ El test FDR se aplicó para corregir los p-valores

3. Evaluación en *Drosophila* de miRNAs específicos como diana terapéutica para la DM1

Con el fin de evaluar el potencial terapéutico de algunos de los miRNAs alterados en moscas DM1 decidimos realizar ensayos de rescate de fenotipos provocados por la expresión de i(CTG)480 en músculo. En concreto, analizamos la capacidad de rescatar los fenotipos de atrofia muscular y de viabilidad en moscas que expresan i(CTG)480 en músculo bajo el patrón del promotor de la cadena pesada de la miosina (Mhc).

3.1. Rescate del fenotipo de atrofia muscular

La expresión de las repeticiones CTG en músculo origina la atrofia de los músculos indirectos de vuelo de *Drosophila* (IFMs del inglés *Indirect Flight Muscles*). La reducción de estos paquetes musculares provoca incapacidad de vuelo en estas moscas. Este fenotipo se revierte al co-expresar proteínas implicadas en la patogénesis de DM1 como las proteínas Muscleblind (de Haro *et al.* 2006, Bargiela *et al.* 2015). Decidimos co-expresar algunos de los miRNAs alterados en moscas DM1 y comprobar si son capaces de revertir este fenotipo muscular. Seleccionamos los tres miRNAs conservados en humanos, *miR-1*, *miR-7* y *miR-10*, y el miRtrón *miR-1003* para este ensayo. Para analizar el rescate de degeneración muscular, co-expresamos las repeticiones CTG con el miRNA de interés en el músculo (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-miRNA*) y procesamos machos adultos de dos días de edad. Obtuvimos secciones semifinas de tórax de 10 moscas por genotipo y analizamos el tamaño de los paquetes musculares correspondientes a los músculos indirectos del vuelo en cinco secciones diferentes.

Resultados

3.1.1. La expresión de *miR-1* en músculo de moscas DM1 no rescata el fenotipo de degeneración muscular

La co-expresión de *miR-1* con las repeticiones CTG en músculo no incrementa el tamaño de los músculos indirectos del vuelo, comparando con los controles que co-expresan *i(CTG)480* y la proteína GFP (Fig. R-31). Por lo tanto la expresión de este miRNA no es suficiente para rescatar la pérdida de tejido muscular inducido por las repeticiones CTG, al menos en estas condiciones experimentales.

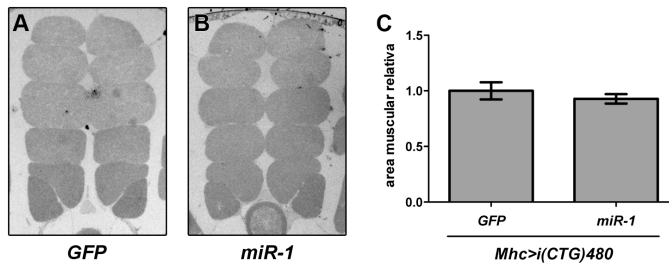


Figura R-31. La sobreexpresión de *miR-1* no rescata el fenotipo de degeneración muscular de las moscas DM1.

Secciones transversales de los IFMs de moscas que co-expresan *miR-1* e *i(CTG)480* (B; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-miR-1 UAS-GFP*) y moscas que expresan las repeticiones CUG y GFP como control (A; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-GFP*). (C) Cuantificación del tamaño de los IFMs en los genotipos de estudio.

3.1.2. La expresión de *miR-7* en músculo de moscas DM1 empeora el fenotipo de atrofia muscular

Para estudiar la capacidad de *miR-7* de rescatar el tamaño de los IFMs utilizamos dos líneas transgénicas: *UAS-miR-7 2A* y *UAS-miR-7 4A*. En estas moscas el precursor de *miR-7* está alojado en la región 3' UTR del gen de la proteína roja fluorescente dsRED, por lo que utilizamos moscas que expresan dsRED como control en este ensayo. Observamos que la co-expresión de *miR-7* y las repeticiones CTG en músculo empeora el fenotipo de atrofia muscular en ambos casos (Fig. R-32). La expresión de *miR-7* redujo el tamaño de los IFMs en un 30 % en el caso de la línea 4A y en un 20 % para la línea 2A, aunque en este caso la reducción no es estadísticamente significativa.

El empeoramiento de la atrofia muscular causado por la expresión de *miR-7* en moscas DM1 podría deberse a alteraciones en el ciclo celular provocadas por un exceso de este miRNA durante la formación de los IFMs en la metamorfosis (Webster *et al.* 2009, Cheng *et al.* 2005). Para descartar esta posibilidad, decidimos co-expresar las repeticiones CTG y *miR-7* tan sólo durante el periodo adulto, cuando los IFM ya se han formado, utilizando una línea Gal4 inducible por choque térmico (*hs-Gal4*). Usando esta línea, activamos la expresión de *i(CTG)480* y *miR-7*

en moscas de dos días de edad, mediante dos choques térmicos de 1 h a 37°C en dos días consecutivos. Transcurridos 3 días tras el último choque térmico, las moscas fueron procesadas para la obtención de secciones semifinas de tórax. Como control expresamos la proteína dsRED. En este caso, la co-expresión de las repeticiones CTG y *miR-7* no produjo diferencias en el tamaño de los paquetes musculares respecto al control (Fig. R-33). En conjunto, estos datos indican que el empeoramiento del fenotipo muscular causado por la expresión de *miR-7* podría deberse a una interacción entre los RNAs tóxicos con repeticiones CTG y *miR-7* que ocurriría durante procesos del desarrollo anteriores al estadio adulto.

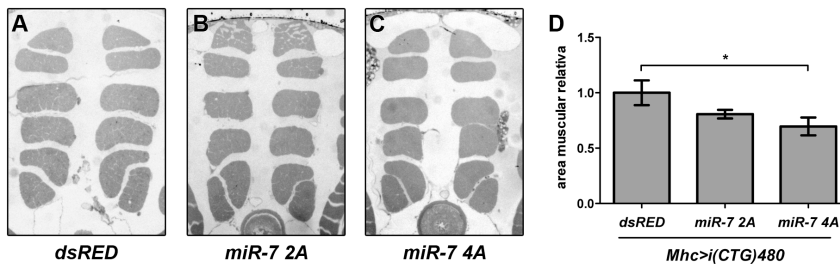


Figura R-32. La sobreexpresión de *miR-7* reduce el tamaño de los músculos indirectos del vuelo en las moscas DM1.

Secciones transversales de los IFMs de moscas que co-expresan *miR-7* y *i(CTG)480* (B y C; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-miR-7*) y moscas que expresan las repeticiones CUG y la proteína dsRED como control (A; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-dsRED*). Utilizamos dos líneas *UAS-miR-7* diferentes: 2A (B) y 4A (C). (D) La cuantificación del tamaño de los IFMs determinó que *miR-7* empeora la atrofia muscular de las moscas DM1. *p-valor<0.05.

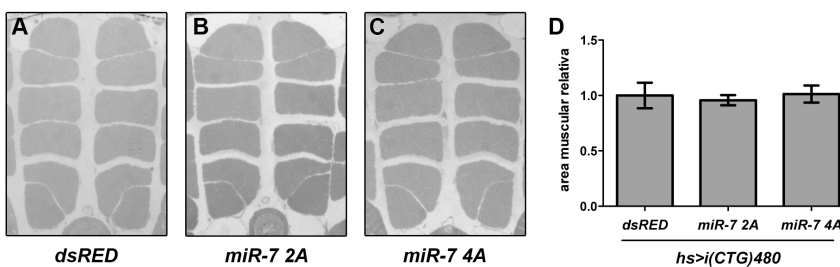


Figura R-33. La expresión de *miR-7* en músculo adulto no altera el fenotipo de atrofia muscular de las moscas DM1.

Secciones transversales de los IFMs de moscas que co-expresan en músculo adulto *miR-7* y *i(CTG)480* (B y C; *hs-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-miR-7*) y moscas que expresan las repeticiones CTG y la proteína dsRED como control (A; *hs-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-dsRED*). Utilizamos dos líneas *UAS-miR-7* diferentes: 2A (B) y 4A (C). (D) La cuantificación del tamaño de los IFMs determinó que *miR-7* no afecta a la atrofia muscular de las moscas DM1.

3.1.3. La expresión de *miR-10* en músculo de moscas DM1 no rescata el fenotipo de atrofia muscular

Utilizamos tres líneas transgénicas diferentes *UAS-miR-10 5A*, *UAS-miR-10 6A* y *UAS-miR-10 7A* para analizar la capacidad de *miR-10* de rescata el fenotipo de atrofia muscular. Al igual que en el transgén para *miR-1*, el precursor de *miR-10* está alojado en la región 3' UTR del gen de GFP, por lo que utilizamos moscas que expresan GFP como control en el ensayo. No observamos aumento en el tamaño de los IFMs en ningún caso (Fig. R-34) y por tanto la expresión de *miR-10* es insuficiente para rescata la atrofia muscular en DM1.

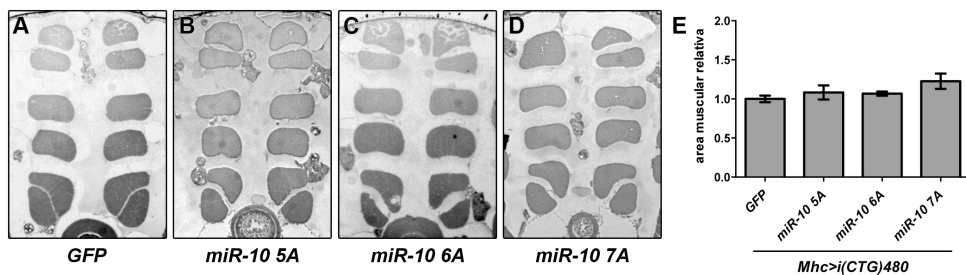


Figura R-34. La sobreexpresión de *miR-10* no rescata el fenotipo de atrofia muscular de las moscas DM1.

Secciones transversales de los IFMs de moscas que co-expresan *miR-10* y *i(CTG)480* (B, C y D; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-miR-10*) y moscas que expresan las repeticiones CTG y la proteína GFP como control (A; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-GFP*). Utilizamos tres líneas *UAS-miR-10* diferentes: 5A (B), 6A (C) y 7A (D). (E) La cuantificación del tamaño de los IFMs determinó que *miR-10* no afecta a la atrofia muscular de las moscas DM1.

3.1.4. La expresión de *CG6695*, el gen hospedador de *miR-1003*, mejora el fenotipo de atrofia muscular en moscas DM1

El miRNA *miR-1003* es un miRtrón que se encuentra hospedado en el intrón 6 del gen *CG6695*. Debido a que no existen reactivos disponibles para sobreexpresar *miR-1003*, utilizamos una línea EP de expresión del gen *CG6695* para analizar el posible efecto de *miR-1003* en la atrofia muscular. Co-expresamos el gen *CG6695* y las repeticiones CTG utilizando la línea EP *CG6695^{EY11917}*, como control utilizamos la proteína GFP. Analizamos secciones transversales de tórax y observamos que *CG6695* rescata el fenotipo de atrofia muscular de las moscas DM1 aumentando la masa de los IFMs al doble del tamaño de los respectivos controles (Fig. R-35).

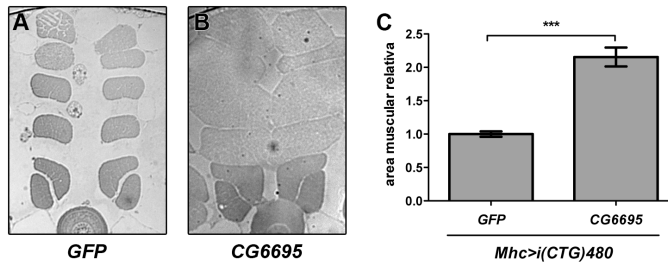


Figura R-35. CG6695, el gen hospedador de *miR-1003*, rescata el fenotipo de atrofia muscular en moscas DM1.

Secciones transversales de los IFMs de moscas que co-expresan el gen CG6695 y *i(CTG)480* (B; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 CG6695^{EY11917}*) y moscas que expresan las repeticiones CTG y la proteína GFP como control (A; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-GFP*). (C) La cuantificación del tamaño de los IFMs determinó que la sobreexpresión de CG6695 rescata la atrofia muscular de las moscas DM1. ***p-valor<0.001.

3.1.5. Análisis del efecto de *miR-1003* en el fenotipo de atrofia muscular de moscas DM1

3.1.5.1. Generación de moscas transgénicas *UAS-miR-1003*

Dado que la expresión del gen hospedador del miRtrón *miR-1003*, CG6695, rescata el fenotipo de atrofia muscular en moscas DM1, nos propusimos analizar si el rescate se debe a la expresión de *miR-1003*. Para ello generamos moscas transgénicas para la expresión del miRtrón bajo el control de las secuencias UAS. Mediante síntesis química obtuvimos un fragmento de 390 pb que corresponde a un minigén del CG6695 formado por parte de los exón 6 (114 pb), el intrón 6 (56 pb) que forma el precursor de *miR-1003* y el exón 7 (220 pb). Insertamos este minigén en la región 3'UTR del gen de la proteína roja fluorescente dsRED que previamente habíamos subclonado en el vector de transformación de la línea germinal de *Drosophila* pUAST para generar moscas transgénicas. Utilizamos el servicio de transgénesis de la empresa BestGene (www.thebestgene.com) y obtuvimos 10 líneas transgénicas para *UAS-miR-1003*.

3.1.5.2. La expresión de *miR-1003* en músculo de moscas DM1 no rescata el fenotipo de atrofia muscular

Para analizar el efecto de *miR-1003* en la atrofia muscular de las moscas DM1 utilizamos dos líneas transgénicas diferentes: *UAS-miR-1003 T4* y *UAS-miR-1003 T5*. Como control utilizamos moscas que co-expresan dsRED. No observamos aumento en el tamaño de los IFMs para ninguna de las dos líneas de *miR-1003* (Fig. R-36, C y D), mientras que la expresión de su gen hospedador si que rescata el fenotipo de atrofia muscular (Fig. R-36, B).

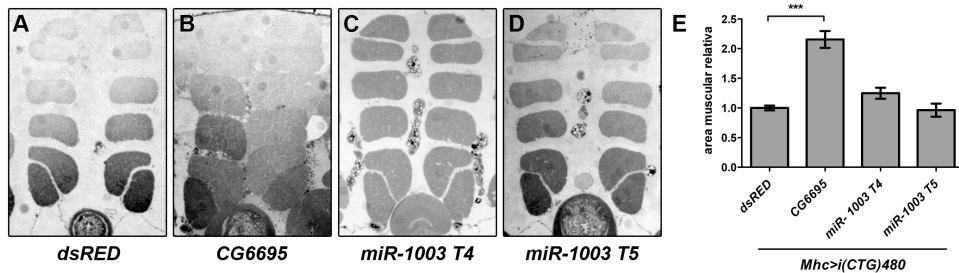


Figura R-36. *miR-1003* no rescata el fenotipo de atrofia muscular en moscas DM1.

Secciones transversales de los IFMs de moscas que co-expresan *miR-1003* y *i(CTG)480* (C y D; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-miR-1003*) y moscas que expresan las repeticiones CTG y la proteína dsRED como control (A; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-GFP*). Utilizamos dos líneas transgénicas diferentes: T4 (C) y T5 (D). Como control positivo expresamos el gen *CG6695* (B; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 CG6695^{EY11917}*). (E) La cuantificación del tamaño de los IFMs determinó que la expresión de *miR-1003* no rescata la atrofia muscular mientras que la expresión de su gen hospedador, *CG6695*, aumenta el tamaño de los IFMs al doble. ***p-valor<0.001.

Estos datos nos indican que el rescate de la atrofia muscular observado al expresar el gen hospedador de *miR-1003* no se debe a la sobreexpresión del miRtrón sino a la expresión de *CG6695*. El gen *CG6695* codifica una proteína rica en serinas y argininas con dominios de unión a RNA, y su ortólogo en humanos es el factor de *splicing CLASPR*. El rescate de la atrofia muscular que observamos en moscas DM1 que expresan *CG6695* sugiere una interacción de la proteína *CG6695* con la toxicidad mediada por el RNA tóxico en músculo apuntando la posible implicación de *CLASPR* en la ruta de patogénesis de la DM1.

3.2. Rescate de la reducción en la vida media en moscas DM1

La expresión de *i(CTG)480* en el músculo de *Drosophila* reduce la viabilidad de las moscas. De manera que la vida media de las moscas DM1 está entre 13 y 15 días, mientras que en los respectivos controles supera los 30 días (García-Lopez *et al.* 2008) (Fig. R-37). La muerte prematura de las moscas DM1 podría deberse a la toxicidad de las repeticiones CTG en los diferentes tipos musculares, en particular el tejido cardíaco y en la musculatura visceral.

Analizamos el efecto de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10* en la vida media de las moscas DM1. Para ello, co-expresamos los tres miRNAs con las repeticiones CTG en todos los tipos musculares (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-miRNA*). Como controles utilizamos las proteínas heterólogas correspondientes con las que se generó cada transgén. dsRED como control de *miR-7* y GFP como control de *miR-1* y *miR-10*. Además, para detectar el posible efecto de los miRNAs en la viabilidad de las moscas expresamos únicamente cada miRNA en músculo sin expresar las

repeticiones CTG (*Mhc-Gal4 UAS-miRNA*). Las curvas de supervivencia de cada genotipo indican que los tres miRNAs tienen diferentes efectos en la viabilidad de las moscas DM1 (Fig. R-37). Mientras la expresión de *miR-1* y *miR-7* tiene un efecto ligeramente deletéreo en la vida media de las moscas DM1 (Fig. R-37, A y B), la expresión de *miR-10* en músculo aumenta la vida media de las moscas que expresan las repeticiones CTG en unos 5 días (Fig. R-37, C). El efecto deletéreo de *miR-7* en la viabilidad de las moscas DM1 podría deberse a un efecto tóxico de su sobreexpresión, ya que la expresión de *miR-7* sin las repeticiones CTG disminuye significativamente la vida media de las moscas (Fig. R-37, B). Sin embargo, la expresión de *miR-1* y *miR-10* no tiene efecto en la viabilidad de moscas normales (Fig. R-37, A y C). En conclusión, aunque son necesarios más estudios para entender el efecto de la alteración en DM1 de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10*, estos datos indican que la disminución de *miR-10* en moscas DM1 tiene un efecto negativo en la viabilidad de las moscas, que es rescatado por su sobreexpresión y por lo tanto *miR-10* es una posible diana terapéutica para DM1.

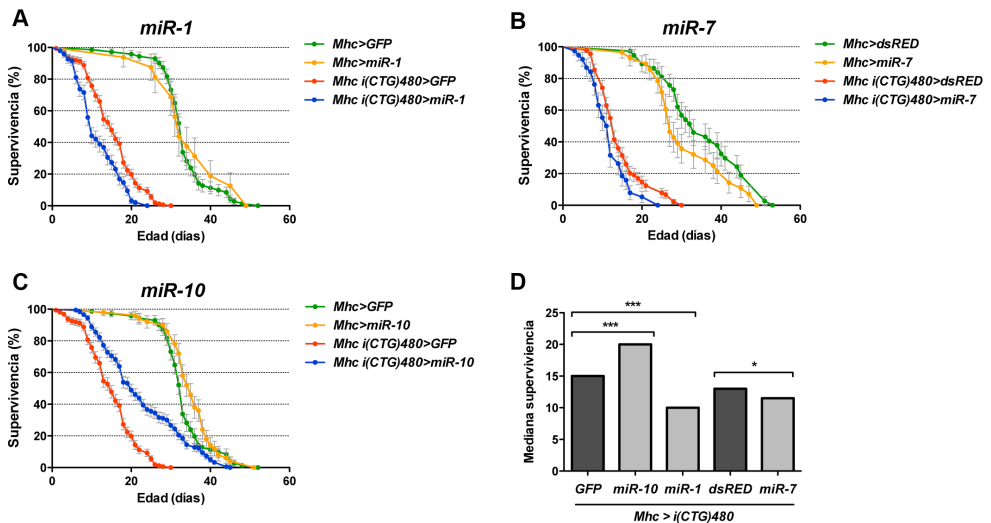


Figura R-37. La sobreexpresión de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10* tiene diferentes efectos en la supervivencia de moscas DM1.

Curvas de supervivencia de moscas que sobreexpresan las repeticiones CUG en músculo y *miR-1* (A; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-miR-1*, n=100); *miR-7* (B; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-miR-7*, n=38) y *miR-10* (C; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480 UAS-miR-10*, n=180). Observamos una pequeña reducción de la supervivencia en moscas que co-expresan las repeticiones CUG y *miR-1* (A) o *miR-7* (B), aunque este cambio no es estadísticamente significativo. *miR-10* rescató el fenotipo de supervivencia de las moscas DM1 (C y D). La sobreexpresión de *miR-1* solo (n=32, A) o *miR-10* (n=35, C) no es tóxica comparada con los controles *Mhc-Gal4 UAS-GFP* (n=33), mientras que la expresión de *miR-7* en músculo redujo la supervivencia (n=27). En este caso utilizamos moscas *Mhc-Gal4 UAS-dsRed* como control (n=33). La gráfica D muestra las medianas de las curvas de supervivencia. *p-valor<0.05 ***p-valor<0.001.

Discusión

1. Caracterización del miRNoma de moscas adultas

La gran cantidad de datos que se obtienen de las técnicas de secuenciación masiva permiten determinar no solo los genes que se expresan en un contexto biológico determinado sino también su nivel de expresión relativo en cada muestra. Además, estos datos permiten la identificación de nuevos genes. En nuestro proyecto utilizamos esta capacidad de la secuenciación masiva para analizar diferencias en la expresión de miRNAs mediadas por la toxicidad de RNAs con repeticiones del trinucleótido CUG.

Como paso previo analizamos el miRNoma de moscas silvestres para determinar qué miRNAs se expresan en moscas adultas e identificar nuevos miRNAs no descritos hasta la fecha. Detectamos lecturas para 104 miRNAs de los 153 conocidos hasta la fecha del análisis (miRBase v. 13.0), por lo tanto aproximadamente un 70 % de los miRNAs descritos se expresan en adulto. Además observamos que existen grandes diferencias en la expresión de estos miRNAs de manera que existe un grupo pequeño de siete miRNAs con una expresión muy elevada respecto al resto, un grupo de 29 miRNAs con una expresión media y dos grupos de 33 y 35 miRNAs con expresión muy baja. El miRNA con mayor expresión en moscas adultas, *miR-1*, está implicado en los procesos de miogénesis y cardiogénesis. Por otro lado cinco de los miRNAs pertenecientes a este grupo de elevada expresión, *bantam*, *miR-8*, *miR-276a*, *miR-277*, y *miR-279*, participan en procesos neuronales. Además *miR-14*, el miRNA que completa este grupo, y *bantam*, están implicados en la regulación de la muerte celular programada. Por lo tanto, al parecer los tejidos en los que hay más expresión de miRNAs en moscas adultas son el tejido nervioso y el muscular.

Para identificar miRNAs nuevos en *Drosophila* utilizamos el algoritmo de predicción miRDeep (Friedlander *et al.* 2008). Este algoritmo busca en las lecturas de secuenciación masiva e identifica posibles miRNAs basándose en la actividad nucleasa de Dicer-1 en la biogénesis de los miRNAs. Brevemente, detecta las secuencias correspondientes al miRNA maduro, al miRNA* y al lazo de la horquilla del pre-miRNA que se generan después de procesado de Dicer-1 (Fig. D-1, A). De manera que otras lecturas que corresponden a RNAs pequeños producto de horquillas de RNA pero que no tienen el patrón de corte de Dicer-1 no son identificadas como posibles miRNAs (Fig. D-1, B). Los autores del algoritmo analizaron datos de secuenciación masiva de *C. elegans* y humanos para validar el modelo y detectaron el 89 % de los miRNAs conocidos de *C. elegans* y el 72 % de humanos. Como límite de detección utilizaron un score de 0. En nuestro análisis, decidimos utilizar un límite de score menos conservativo y lo fijamos en -2.5, valor que corresponde al menor score de los miRNAs conocidos de *Drosophila*. Con este límite de score identificamos 64 miRNAs nuevos aunque cabe destacar que once de

Discusión

estos miRNAs tienen un score mayor de 0 y dentro de los nueve miRNAs seleccionados para la validación cuatro de ellos tenían un score mayor de 1. De los nueve miRNAs seleccionados para la validación solo confirmamos la expresión de uno, *miR-3R_25*. Este miRNA tiene el score de miRDeep mayor de todos los miRNAs predichos (score = 3.7) lo que apunta a que el uso de un score negativo genera una gran proporción de falsos positivos.

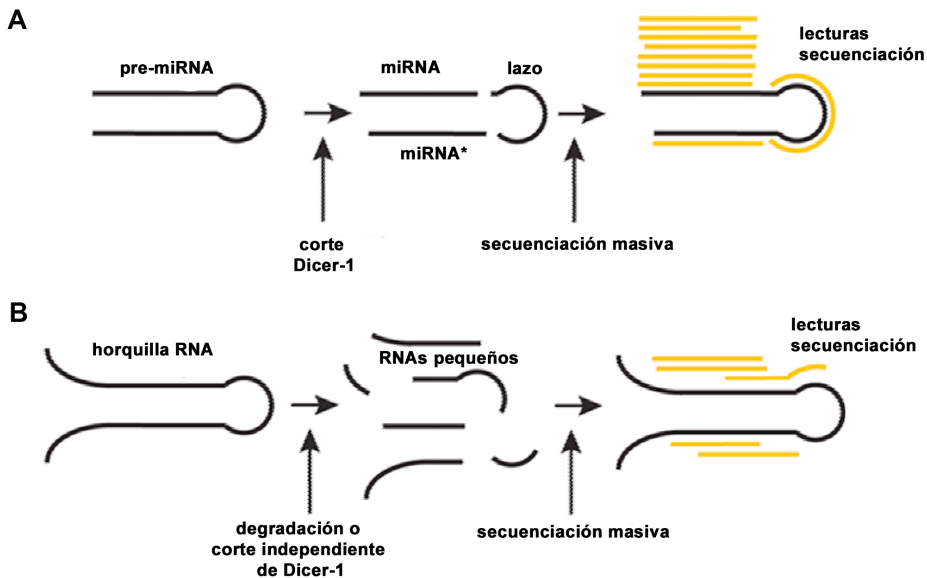


Figura D-1. El algoritmo miRDeep está basado en la biogénesis de los miRNAs.

(A) Los pre-miRNAs son procesados por Dicer-1 y como resultado se genera el miRNA maduro, su miRNA* y un fragmento de RNA que corresponde al lazo de la horquilla precursora. miRDeep mapea las lecturas de secuenciación masiva en el genoma para identificar estos tres componentes de la horquilla precursora y la frecuencia de las lecturas de cada uno de ellos para identificar nuevos miRNAs. (B) En las células eucariotas existen otras horquillas de RNA que no son precursores de miRNAs pero que pueden generar RNAs de pequeño tamaño. Como las lecturas correspondientes a estas horquillas no mapean en el genoma de manera consistente al procesado por Dicer-1, estos RNAs no son identificados como miRNAs por miRDeep. Imagen tomada de Friedlander *et al.* 2008.

El hecho de que el único miRNA de los predichos que se validó tenga el mayor score de predicción sugiere que el resto de candidatos no corresponden a miRNAs reales y que por lo tanto no existen nuevos miRNAs en el miRNoma de *Drosophila*. Sin embargo, en la última versión de la base de datos de miRNAs, miRBase (v. 21.0) encontramos 725 miRNAs para *Drosophila melanogaster* frente a los 153 miRNAs que había en la versión disponible en el momento del análisis (miRBase v. 13.0). Gran parte de los nuevos miRNAs incluidos en la última versión corresponden a los miRNA de la hebra opuesta al miRNA maduro (miRNA*). Estos miRNAs

estrella se han incluido en las bases de datos porque varios estudios apuntan a que, al contrario a lo que se pensaba, también son funcionales y pueden actuar como miRNAs maduros. miRDeep utiliza las lecturas del miRNA* para identificar los miRNAs maduros de manera que en nuestro análisis no pudimos identificar miRNAs estrella funcionales. Además, el hecho de que miRDeep base su algoritmo de predicción en la actividad de la nucleasa Dicer-1 impide identificar miRNAs con rutas de biogénesis alternativas. Por otro lado, la mayoría de los nuevos miRNAs incluidos en la última versión de miRBase corresponden a predicciones bioinformáticas de manera que no podemos asumir que estos miRNAs sean funcionales.

En los northern blots realizados para validar los potenciales nuevos miRNAs solo detectamos la banda del tamaño esperado para el miRNA *miR-3R_25*. Para el resto de candidatos observamos bandas de tamaño superior, por lo tanto, podríamos estar detectando otros RNAs no codificantes de mayor tamaño que los miRNAs como tRNAs, snRNAs o snoRNAs y las lecturas de 21 nucleótidos que detectamos mediante secuenciación masiva podrían corresponder a fragmentos de degradación de estos RNAs.

1.1. *miR-3R_25* no proviene de la región genómica precursora predicha por miRDeep

El análisis de las lecturas de secuenciación masiva correspondientes al nuevo miRNA, *miR-3R_25*, reveló un cambio de tres nucleótidos en la zona central del miRNA respecto a la secuencia del genoma en la mayoría de sus lecturas de secuenciación. En un primer momento pensamos que podría deberse a un error de secuenciación. Si así fuera debería ocurrir al azar y aparecer en mayor medida en los miRNAs que más se expresan. Sin embargo, el análisis en profundidad de las lecturas de todos los miRNAs determinó que no todos los miRNAs presentan cambios, de hecho más del 60 % de miRNAs no presentan ninguna lectura con cambios, incluidos los miRNAs con mayor nivel de expresión: *miR-1*, *miR-14*, *miR-8*, *miR-276a* y *bantam*. Además solo un 2 % de los miRNAs tienen cambios de tres nucleótidos y en todos los casos, excepto para *miR-3R_25*, las lecturas con cambios suponen una fracción minoritaria. Por lo tanto el cambio en la secuencia de *miR-3R_25* detectado en la secuenciación masiva no se debe a errores de lectura.

Los miRNAs pueden sufrir modificaciones postranscripcionales que afectan a su secuencia. Aunque no se han estudiado en profundidad, se han descrito eventos de editado del precursor primario, uridilación, adenilación o ubiquitinación, entre otras (revisado en Siomi y Siomi 2010). Estas modificaciones regulan la función de los miRNAs afectando a su biogénesis, estabilidad o al reconocimiento de sus transcritos diana. En el caso de la modificación de *miR-3R_25*, no la detectamos en su horquilla precursora por lo tanto no se produce ni en su transcrito primario ni

Discusión

en el pre-miRNA. Además, la sobreexpresión de la horquilla precursora sin la modificación no se tradujo en un aumento del miRNA maduro con el cambio de tres nucleótidos por lo que descartamos que este cambio en la secuencia se deba a una modificación postranscripcional.

El análisis de la expresión de *miR-3R_25* en embriones mutantes apunta a que este miRNA no proviene de la región genómica predicha ya que detectamos la presencia de *miR-3R_25* maduro en embriones homocigotos para una delección de su región precursora. Debido a la alta homología entre *miR-3R_25* y *miR-1*, la sonda utilizada es capaz de detectar a ambos miRNAs lo que puede enmascarar estos resultados. Sin embargo, la sobreexpresión de los precursores de *miR-3R_25* tanto con modificación como sin ella no resultó en un aumento del miRNA maduro por lo que concluimos que *miR-3R_25* no proviene de la región predicha por miRDeep.

En el genoma de *Drosophila* además de la región predicha como precursora de *miR-3R_25* existe otra región con homología, que corresponde con *miR-1*. Las secuencias de los miRNAs maduros de *miR-3R_25* y *miR-1* coinciden en los 16 primeros nucleótidos incluyendo la región semilla. Los miRNAs que tienen la misma región semilla se agrupan en familias de miRNAs por lo tanto *miR-3R_25* pertenecería a la familia de *miR-1*. Dado que no hemos podido confirmar que *miR-3R_25* se genere a partir del precursor predicho por miRDeep cabe la posibilidad de que este miRNA sea una variante de *miR-1*. En concreto sería una modificación de cuatro nucleótidos en el extremo 3' de *miR-1* maduro. Generalmente, la mayoría de modificaciones postranscripcionales en miRNAs se producen en este extremo. Las modificaciones en 3' no alteran el reconocimiento de sus transcritos diana sino que suelen afectar a la estabilidad de los miRNAs. Sin embargo, hasta la fecha no se han descrito modificaciones de tantos nucleótidos en miRNAs maduros sino que generalmente se trata de cambios de un nucleótido o de adición de nucleótidos en el extremo 3'.

2. La disregulación de miRNAs específicos en DM1 es debida a la expresión de RNAs con repeticiones CUG

En paralelo a la realización de este trabajo se describió la disregulación de miRNAs específicos en pacientes de DM1. El análisis de miRNAs concretos en músculo esquelético y cardiaco de pacientes determinó cambios tanto en la expresión como en la localización subcelular de algunos miRNAs. En el presente trabajo realizamos un análisis global de expresión de miRNAs en un modelo en *Drosophila* de DM1 mediante secuenciación masiva. Observamos que la expresión de RNAs con repeticiones CUG en músculo de *Drosophila* provoca la disregulación de 20 miRNAs. 19 de estos miRNAs tenían una expresión inferior en moscas DM1 mientras que uno estaba aumentado. Por lo tanto, la toxicidad de

RNAs con repeticiones CUG suele producir una reducción en los niveles de expresión de miRNAs específicos. Un análisis de expresión de miRNAs en corazón de ratones modelo para DM1 determinó que el 80 % de los miRNAs desregulados tienen su expresión reducida (Kalsotra *et al.* 2014). La mayoría de estos miRNAs son dianas transcripcionales de Mef2. Los niveles de proteína de Mef2 son inferiores en tejidos DM1 que en controles por lo que la reducción en la expresión de miRNAs específicos podría estar mediada por la alteración en los niveles de Mef2. Es probable que en *Drosophila* se esté dando el mismo mecanismo, lo que explicaría que la mayoría de alteraciones que detectamos en moscas DM1 sean reducciones en los niveles de miRNAs maduros.

En pacientes también observamos una reducción en los niveles de expresión de los miRNAs conservados en humanos: *miR-1*, miRNA que ya había sido relacionado con DM1 en otros estudios (Perbellini *et al.* 2011, Rau *et al.* 2011) y *miR-7* y *miR-10* cuya alteración en pacientes de DM1 no había sido descrita hasta la fecha. La conservación de la desregulación de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10* entre el modelo en *Drosophila* y pacientes de DM1 confirma, por un lado, que la reducción en los niveles de miRNAs que describimos en *Drosophila* es específico y no es una consecuencia de la reducción de la contribución del transcriptoma muscular al total de RNAs debida a la atrofia muscular en las moscas DM1. Por otro lado, la desregulación de estos tres miRNAs ocurre en presencia de RNAs con repeticiones CUG y por lo tanto es independiente de *DMPK*. Aunque es posible que *DMPK* o el efecto de la mutación en su contexto genómico participe en la alteración de otros miRNAs en pacientes, nuestros resultados apuntan, por primera vez, a que la desregulación de miRNAs en DM1 está provocada directamente por la expansión del trinucleótido CTG.

El modelo de *Drosophila* utilizado en este trabajo consiste en la expresión de 480 repeticiones CTG en músculo. Estas repeticiones CTG están interrumpidas cada 20 unidades por la secuencia CTCGA (*i*(CTG)480). La estructura de doble cadena que forman las *i*(CTG)480 es similar a la horquilla formada por las repeticiones puras y sus energías de ensamblaje son parecidas (Fig. D-2). La existencia de expansiones complejas con interrupciones en el locus de *DMPK* se ha descrito para varios pacientes de DM1 (Braidia *et al.* 2010, Musova *et al.* 2009, Santoro *et al.* 2015, Santoro *et al.* 2013). Estos estudios han determinado que estas interrupciones atenúan la sintomatología de estos pacientes. Aunque la interrupción CTCGA del transgén *i*(CTG)480 no coincide con ninguna de las variantes descrita en los pacientes de DM1, es posible que su presencia en el transgén pueda modificar algunos fenotipos en las moscas DM1. Por ejemplo, podría afectar a la traducción RAN, en el caso que se produzca en *Drosophila*. En este caso las repeticiones CTG interrumpidas generarían homopolímeros peptídicos poliS, poliQ y poliA de 20 aminoácidos unidos por separaciones de uno a dos aminoácidos diferentes

Discusión

mientras que las repeticiones puras producen polipéptidos poliS, poliQ y poliA individuales. Aunque tenemos que contemplar el posible efecto atenuante de las interrupciones en nuestro transgén *i(CTG)480*, la conservación de la desregulación de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10* entre nuestro modelo en *Drosophila* y pacientes de DM1 representa una evidencia importante de que la desregulación de al menos estos tres miRNAs es independiente de la interrupción CTGGA en el transgén *i(CTG)480*.

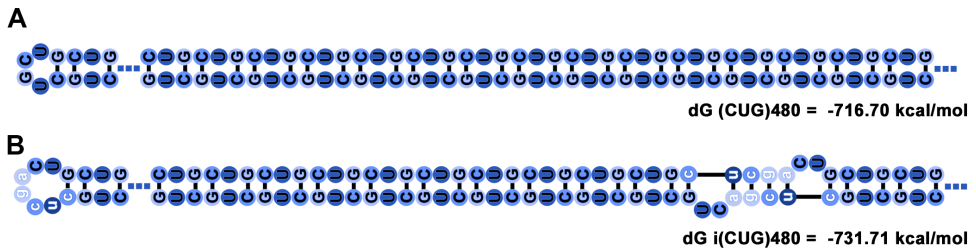


Figura D-2. Las repeticiones CUG interrumpidas forman horquillas similares a las repeticiones puras.

(A) Horquilla predicha para las 480 repeticiones CUG puras. (B) Horquilla predicha para las 480 repeticiones con interrupciones de la secuencia CUCGA cada 20 unidades. Ambas horquillas tienen una estructura y una energía de ensamblaje similares.

3. La desregulación de miRNAs mediada por RNAs con repeticiones CUG está conservada en pacientes DM1

El análisis de expresión de los tres miRNAs conservados tanto en biopsias musculares como en cultivos celulares de pacientes de DM1 determinó que la expresión de los tres miRNAs está reducida en DM1. Por lo tanto la alteración de miRNAs mediada por la toxicidad de RNAs con repeticiones CUG está conservada entre *Drosophila* y humanos. Además, parece que los mecanismos responsables de la desregulación de miRNAs específicos también están conservados. En *Drosophila*, la alteración de *miR-7* se produce a nivel de su transcrito primario ya que observamos una disminución de *pri-miR-7* en moscas DM1 mientras que los niveles de *pri-miR-1* y *pri-miR-10* no varían respecto a los controles. En humanos, *miR-7* tiene tres transcritos primarios precursores diferentes y al menos dos de ellos tienen una expresión reducida en biopsias musculares de pacientes de DM1. El mecanismo que provoca la disminución en los niveles de *miR-1* en moscas de DM1 también parece estar conservado en humanos. Se ha descrito que *miR-1* está infraexpresado en corazón de pacientes de DM1 como consecuencia de la falta de función de MBNL1 (Rau *et al.* 2011). En condiciones no patológicas, MBNL1 reconoce y se une a un motivo UGC en las horquillas precursoras de *miR-1* y bloquea la unión de LIN28 (Fig. D-3, A). Sin embargo, en las células cardíacas de pacientes de DM1, MBNL1 está secuestrado en el núcleo en los *foci* ribonucleares

que forman las repeticiones CUG. En este escenario, LIN28 tiene acceso a los pre-miRNAs de *miR-1*. LIN28 promueve la uridilación de los precursores de miRNAs por el enzima TUT4. Los pre-miRNAs uridilados son resistentes al corte de Dicer de manera que en células DM1 se acumulan las horquillas precursoras de *miR-1* con la consecuente reducción del miRNA maduro y aumento de sus transcritos diana (Fig. D-3, B). En *Drosophila*, la reducción de *miR-1* mediada por la toxicidad de RNAs con repeticiones CUG parece ser dependiente de Muscleblind ya que la sobreexpresión de la isoforma C de Muscleblind en músculo de moscas DM1 rescata los niveles de *miR-1*. Además el silenciamiento de *muscleblind* en un fondo silvestre produce una reducción de *miR-1* maduro lo que apunta a su participación en la biogénesis de *miR-1* en *Drosophila*.

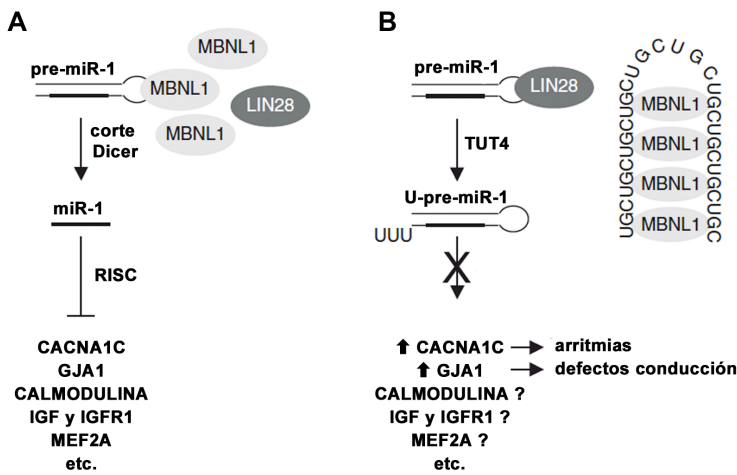


Figura D-3. MBNL1 participa en la biogénesis de *miR-1*.

(A) MBNL1 y LIN28 compiten por la unión al *pre-miR-1*. En presencia de MBNL1 el pre-miRNA de *miR-1* es procesado a miRNA maduro que reprime a sus dianas. (B) En DM1, MBNL1 está secuestrado en los *foci* ribonucleares y LIN28 se une al pre-miRNA y favorece su uridilación por TUT4. El *pre-miR-1* uridilado no puede ser procesado por Dicer y como consecuencia disminuye el miRNA maduro de *miR-1* y aumentan los niveles de sus transcritos dianas CACNA1C y GJA1. Figura tomada de Rau *et. al* 2011.

A pesar de que nuestros resultados son congruentes con el modelo descrito para la alteración de *miR-1* en DM1 por Rau y colaboradores, otros estudios describen situaciones diferentes para *miR-1* en DM1. Perbellini y colaboradores analizaron la expresión de *miR-1* en biopsias de bíceps de pacientes de DM1 y observaron que tanto su miRNA maduro como ocho de sus transcritos dianas estaban aumentados (Perbellini *et al.* 2011). Esta diferencia con nuestros resultados puede deberse al tipo de músculo analizado o que en su estudio utilizaron biopsias de otras enfermedades neuromusculares como controles. En otro estudio no detectaron

Discusión

cambios en los niveles de *miR-1* en biopsias de *vastus lateralis* mientras que sí que detectaron un aumento del miRNA maduro de un miembro de su familia, *miR-206* (Gambardella *et al.* 2010). Por lo tanto, es probable que la desregulación de *miR-1* sea particularmente sensible al contexto celular el cual puede incluir factores como el número de repeticiones en las expansiones del trinucleótido CTG o la edad de los pacientes.

4. Las alteraciones de miRNAs en DM1 tienen diferentes orígenes

Algunos de los miRNAs encontrados alterados en DM1 hasta la fecha están codificados en intrones de otros transcritos. Dado que la *esplíceopatía* es una característica molecular de la DM1, las alteraciones en el *splicing* y en miRNAs podrían tener un origen común. En nuestro análisis de expresión global de miRNAs en *Drosophila* encontramos dos miRtrones desregulados por la toxicidad mediada por RNAs con repeticiones CUG, *miR-1003* y *miR-1006*. El intrón precursor de *miR-1006* se encuentra completamente escindido tanto en moscas DM1 como en controles lo que sugiere que la reducción de *miR-1006* maduro observada en moscas DM1 no se debe a defectos en el *splicing* de su transcrito hospedador sino que ocurre en alguna etapa aguas abajo en la ruta de biogénesis de los miRtrones. Para *miR-1003*, observamos que su intrón hospedador es escindido en mayor grado en las moscas que expresan las 480 repeticiones CTG que en los controles. Sin embargo, el miRNA maduro de *miR-1003* está reducido en moscas DM1. El aumento en la escisión de su intrón hospedador podría deberse a un mecanismo para compensar la falta de miRNA maduro y por lo tanto la desregulación de *miR-1003* debe ocurrir en una etapa posterior de la biogénesis.

Varios miRNAs desregulados en las moscas DM1 forman parte de clústers génicos. El análisis de los transcritos primarios de los clústers *miR-310~313* y *miR-959~964* determinó que los pri-miRNAs de ambos clústers tienen niveles reducidos en moscas que expresan RNAs con repeticiones CUG respecto a los controles. De manera que la desregulación de los miRNAs de estos clústers debe producirse a nivel de transcrito primario. Además, el pri-miRNA de *miR-7* está reducido tanto en moscas DM1 como en músculo esquelético de pacientes. Sin embargo, los transcritos primarios de *miR-1* y *miR-10* tienen el mismo nivel de expresión en moscas DM1 y controles. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la desregulación de la transcripción y/o la estabilidad de los transcritos primarios es la causa de algunas de las alteraciones en la expresión de miRNAs maduros, apoyando la idea de que la desregulación de miRNAs en DM1 tiene diferentes orígenes.

El silenciamiento de *muscleblind* redujo levemente los niveles de *miR-7* lo que contrasta con la fuerte reducción observada para *miR-1*. Además, la sobreexpresión de Muscleblind C no rescató los niveles de *miR-7* en moscas que expresan las repeticiones CTG. Los análisis en el modelo celular de transdiferenciación

determinaron que *miR-7* está reducido tanto antes como después de la inducción del programa de miogénesis. Sin embargo, la reducción en los niveles de *miR-1* y *miR-10* solo se produce después de la diferenciación. Este resultado es congruente con la observación de que Muscleblind participa en la biogénesis de *miR-1* ya que los niveles de las proteínas Muscleblind aumentan durante la diferenciación muscular y la falta de función de MBNL1 que provoca la *esplíceopatía* se hace patente en mioblastos pero no en fibroblastos de DM1. Además, hemos demostrado que la alteración de *miR-7* se produce a nivel de transcrito primario mientras que los pri-miRNAs de *miR-1* y *miR-10* no están alterados en DM1. En conjunto estas observaciones demuestran que la desregulación de miRNAs mediada por la toxicidad de RNAs con repeticiones CUG se produce por diferentes mecanismos y por lo tanto serán necesarios nuevos estudios para determinar los factores implicados en la desregulación de cada miRNA específico.

5. Las alteraciones en los transcritos diana de los miRNAs podrían contribuir a la sintomatología de la DM1

Analizando las dianas de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10* en datos de expresión de mRNAs a partir de muestras de biopsias de músculo esquelético de pacientes observamos que 42 dianas estaban desreguladas en DM1, 41 tenían niveles de expresión aumentados respecto a los controles, mientras que solo una tenía niveles de expresión menores en músculo de DM1. El aumento de estos transcritos diana es congruente con la reducción de los niveles de los miRNAs maduros en DM1. Mediante PCR a tiempo real confirmamos esta tendencia en la expresión de al menos siete dianas cuya alteración en DM1 no estaba descrita previamente. Aunque el mecanismo mayoritario de represión de los miRNAs en mamíferos es la degradación de sus transcritos diana (Guo *et al.* 2010), también pueden actuar inhibiendo su traducción. Por lo tanto, la desregulación de miRNAs en DM1 podría tener un mayor impacto en la expresión génica alterando dianas adicionales a nivel de proteína.

Las dianas alteradas en DM1 no se agrupan en grupos funcionales sino que están implicadas en diferentes procesos celulares. Por ejemplo, una de las dianas de *miR-1* es la superóxido dismutasa (SOD1). En músculo esquelético de pacientes, los niveles del transcrito de SOD1 están aumentados 2.5 veces respecto a músculo de individuos sanos. Análisis bioquímicos demostraron que la actividad enzimática de SOD1 está aumentada en sangre de pacientes y que este aumento correlaciona con la diabetes y con los niveles de creatinina quinasa muscular, un marcador de daño muscular (Kumar *et al.* 2014, Comim *et al.* 2015). En pacientes de Síndrome de Down, el gen de SOD1 está triplicado y se ha relacionado el aumento de su actividad enzimática con el retraso mental y el envejecimiento prematuro de los pacientes (Patterson 2009). Los pacientes de DM1 también sufren envejecimiento prematuro y aunque las causas concretas se desconocen, podría deberse, al menos

Discusión

en parte, al aumento de la actividad de SOD1 mediada por la disminución de *miR-1* maduro en DM1.

Otra diana de los miRNAs desregulados que hemos detectado aumentada en músculo de pacientes es el transcrito de la vinculina (VCL). VCL es una diana de *miR-7* y codifica para una proteína del citoesqueleto. En dos rastreos genéticos independientes se identificaron varios genes implicados en adhesión celular y en la dinámica del citoesqueleto como modificadores de la toxicidad mediada por RNAs con repeticiones CUG en *Drosophila*. Entre ellos varios que codifican proteínas de unión a actina como el gen *coro*, *signed* y *Mical*; proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto como *fear of intimacy* y *capulet*; así como proteínas estructurales del citoesqueleto como β -*Tubulina*, *zormin* y *Arp6* (Garcia-Lopez *et al.* 2008, Llamusi *et al.* 2013). Además, estudios de expresión global en ratones DM1 describieron cambios en los niveles de expresión y alteraciones en el *splicing* alternativo de varios componentes del citoesqueleto (Du *et al.* 2010). Defectos en componentes del citoesqueleto se han relacionado con la degeneración muscular en otras enfermedades degenerativas como la Distrofia muscular de Duchenne (Rahimov y Kunkel 2013), por lo tanto, estas alteraciones en componentes del citoesqueleto podrían participar en el mecanismo que lleva a los problemas musculares en DM1.

Los niveles del transcrito del regulador de la autofagia ATG4 están aumentados en el músculo esquelético de pacientes de DM1. ATG4 es una diana de *miR-7* y su aumento correlaciona con la disminución de *miR-7* maduro en DM1. En *Drosophila*, la sobreexpresión de *miR-7* continua en el desarrollo empeora el fenotipo de atrofia muscular y la vida media de las moscas DM1. Sin embargo, la sobreexpresión de *miR-7* en moscas adultas no modifica el fenotipo de atrofia muscular. La autofagia es un mecanismo necesario en el proceso de morfogénesis de *Drosophila* y la sobreexpresión de *miR-7* en tejido muscular podría estar inhibiéndola lo que explicaría el empeoramiento del fenotipo de atrofia muscular.

La autofagia está considerada como un mecanismo de supervivencia celular ya que actúa eliminando proteínas tóxicas y orgánulos dañados en las células. Sin embargo, el aumento de la activación de la autofagia puede resultar patológica produciendo la alteración de la homeostasis de las proteínas, atrofia muscular y muerte celular (Zhao *et al.* 2007, Mammucari *et al.* 2007). Diferentes estudios sugieren una activación patogénica de la autofagia en DM1. En cultivos primarios de mioblastos de DM1 se detectó una correlación entre el tamaño de las expansiones CTG en *DMPK* y la activación de la autofagia (Loro *et al.* 2010). Además, en ensayos en células madre neuronales derivadas de células madre embrionarias de un paciente de DM1 se observó una disminución en la proliferación y un aumento de la autofagia asociado a la ruta de señalización de

mTOR (Denis *et al.* 2013). La sobreexpresión de MBNL1 en estas células rescata la autofagia lo que demuestra una relación directa entre la falta de función de MBNL1 y la activación de la autofagia en DM1. La activación de la autofagia se ha confirmado tanto en músculo de moscas DM1 como en músculo esquelético de pacientes con DM1 (Bargiela *et al.* 2015). Además, ensayos de rescate en *Drosophila* demostraron que la autofagia es uno de los mecanismos responsables de la atrofia muscular y que puede ser inhibida por la expresión de Muscleblind C en moscas DM1. Por lo tanto la autofagia es una buena diana terapéutica y serán necesarios ensayos adicionales para aclarar el mecanismo de activación de la autofagia en DM1 y la implicación de *miR-7* en este proceso.

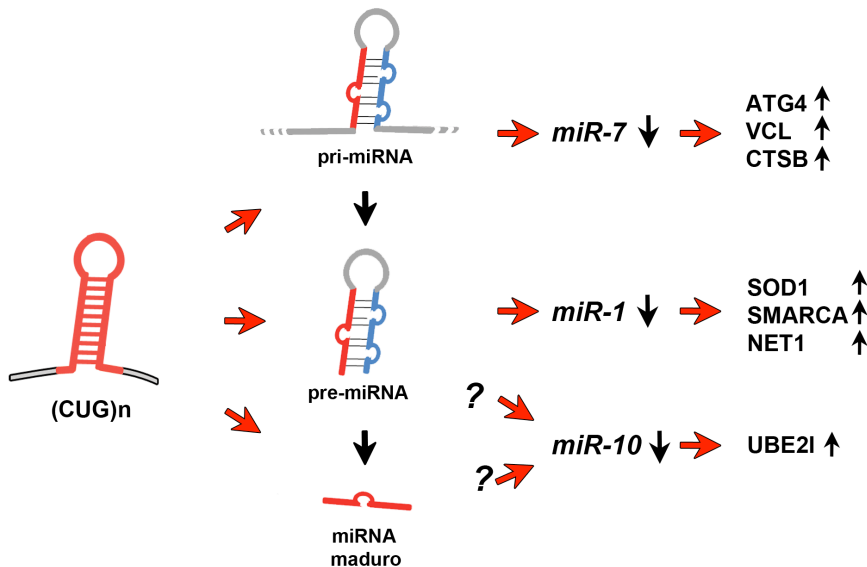


Figura D-4. Desregulación de miRNAs mediada por la expresión de RNAs con repeticiones CUG en DM1.

La expresión de RNAs con repeticiones CUG altera la expresión de miRNAs específicos a diferentes niveles. En el caso de *miR-7* la desregulación se produce a nivel de precursor primario mientras que para *miR-1* se produce a nivel de su horquilla precursora. Se desconoce el origen de la alteración para *miR-10* aunque se sabe que no se produce a nivel de pri-miRNA. En los tres casos, las repeticiones CUG provocan una disminución de los niveles de los miRNAs maduros y como consecuencia el aumento de sus transcritos diana.

Por lo que respecta a *miR-10a*, es el miRNA cuyas dianas están menos representadas dentro de los transcritos alterados en músculo de DM1. De las 21 dianas de los tres miRNAs desregulados cuyos niveles encontramos aumentados en los datos de expresión global de biopsias de pacientes, solo siete son dianas de *miR-10a*. Entre ellas encontramos el gen Klotho (KL) que se ha relacionado con el

Discusión

envejecimiento, GATA6 que está implicado en diferenciación celular y las proteínas BTRC y UBE2I que participan en los mecanismos de ubiquitinación de proteínas. En músculo de pacientes, los niveles del transcrito de UBE2I son 5 veces superiores a los encontrados en controles por lo que la ubiquitinación podría estar activada en DM1. Además, en ratones DM1 se ha observado un aumento de la actividad del sistema ubiquitina/proteosoma en músculo esquelético (Vignaud *et al.* 2010). La ubiquitinación se ha relacionado con la activación de la apoptosis y la autofagia (revisado en Chen y Qiu 2013). Dado que los procesos de apoptosis y autofagia se han relacionado con la atrofia muscular, el aumento de los niveles del transcrito de UBE2I podría contribuir a la muerte celular que produce la atrofia muscular en DM1. Por lo tanto el estudio de la ubiquitinación en DM1 podría aportar luz sobre los mecanismos moleculares desencadenantes de la atrofia muscular en pacientes y aportar nuevas dianas terapéuticas para la DM1.

6. Potencial terapéutico de los miRNAs en DM1

La relevancia patológica de la desregulación de los miRNAs no está clara, de manera que la disminución en los niveles de miRNAs maduros mediada por la toxicidad de RNAs con repeticiones CUG podría deberse a un mecanismo de protección, ser una consecuencia patológica directa o una consecuencia secundaria. En el caso de *miR-1*, las proteínas Muscleblind participan en su biogénesis y la sobreexpresión de Muscleblind C rescata sus niveles de expresión en músculo de moscas DM1. Por lo tanto, la desregulación de *miR-1* en DM1 está asociada a la falta de función de Muscleblind y la reducción de los niveles de su miRNA maduro no responde a un mecanismo de protección. Por otro lado, si la reducción de los niveles de *miR-10* se debiese a un mecanismo de protección de las células musculares, su sobreexpresión en moscas DM1 no debería rescatar la vida media de estas moscas sino todo lo contrario. Por lo tanto, la desregulación de *miR-10* forma parte de la ruta de patogénesis molecular de la DM1. En el caso de *miR-7*, los resultados obtenidos no permiten concluir su relevancia patológica. Sin embargo, la relación que existe entre la disminución de *miR-7* y el aumento de la autofagia y el hecho de que la autofagia sea uno de los mecanismos responsables de la atrofia muscular en pacientes sugieren un papel importante en el mecanismo molecular de patogénesis DM1 para *miR-7*.

Para estudiar la relevancia fisiológica de algunos de los miRNAs alterados en moscas DM1 analizamos el efecto de su sobreexpresión sobre los fenotipos de atrofia muscular y viabilidad provocados por la expresión de repeticiones CTG en músculo. Ninguno de los miRNAs ensayados rescató el fenotipo de atrofia muscular. Sin embargo, la expresión del gen hospedador del miRtrón *miR-1003*, CG6695, en moscas DM1 aumentó el tamaño de los músculos indirectos del vuelo

al doble que en los controles, a pesar de que la expresión únicamente del precursor de *miR-1003* no cambió el fenotipo de atrofia muscular. El gen *CG6695* es ortólogo al factor de *splicing* CLASPR humano y codifica una proteína rica en serinas y argininas con dominios de unión a RNA. El rescate de la atrofia muscular que observamos en moscas DM1 que expresan *CG6695* sugiere una interacción de la proteína *CG6695* con la toxicidad mediada por el RNA con repeticiones CUG en músculo posiblemente, rescatando alguna alteración en el *splicing* de transcritos implicados en la atrofia muscular. Estos resultados sugieren la posible implicación de *CG6695* en la ruta de patogénesis molecular de la DM1.

La expresión en moscas DM1 de *miR-1* y *miR-7* no rescató el fenotipo de viabilidad sino que redujo su vida media. Para *miR-7*, puede deberse a un efecto aditivo tóxico ya que la expresión de *miR-7* por sí sola también redujo la vida media de las moscas. Sin embargo, el caso de *miR-1* es más intrigante ya que la expresión de este miRNA no es tóxica *per se*. Dado que se ha descrito que MBNL1 se une a la horquilla precursora de *miR-1*, es probable que el efecto de la sobreexpresión de *miR-1* en moscas que expresan RNAs con repeticiones CUG se deba a un secuestro adicional de Muscleblind por un exceso de *pre-miR-1*.

La restauración de los niveles de *miR-10* por sobreexpresión en moscas DM1 rescata el fenotipo de viabilidad aumentando la vida media de las moscas, demostrando que la reducción de los niveles de *miR-10* maduro contribuye a la toxicidad mediada por las repeticiones CTG en DM1. Por lo tanto, *miR-10* constituye una nueva diana terapéutica a explorar con profundidad.

Hasta la fecha no existe una terapia efectiva para la DM1 sino que los tratamientos que se aplican a los pacientes son paliativos y ayudan a frenar el desarrollo de síntomas pero no evitan su aparición. En la actualidad se está trabajando en el desarrollo de fármacos cuya diana sea el secuestro de MBNL1 por las repeticiones CUG en los RNAs tóxicos o basadas en la degradación de estos RNA tóxicos, encontrándose algunos de estos estudios en las primeras etapas de fase clínica de desarrollo. Sin embargo, dado que la ruta de patogénesis molecular de la DM1 es muy compleja e implica a muchos procesos celulares es necesario desarrollar terapias contra otras dianas terapéuticas.

Los miRNAs, como reguladores de la expresión genética, controlan muchos procesos celulares de manera indirecta. Lo cual es una ventaja a la hora de desarrollar una terapia, ya que restableciendo los niveles normales de un miRNA desregulado en DM1 se rescataría la expresión normal de sus dianas moleculares. Los miRNAs pueden ser modulados *in vivo* mediante la administración de

Discusión

oligonucleótidos sintéticos tanto para reducir su actividad (anti-miRs) como para aumentarla (pro-miRs o miRNAs miméticos) de manera que estos moduladores afectan directamente a la expresión génica de las dianas de miRNAs específicos. Actualmente se están desarrollando modificaciones químicas de estos oligonucleótidos sintéticos para aumentar su estabilidad dentro de la célula, su permeabilidad y su distribución sistémica. El uso de estas químicas en modelos animales de la enfermedad permitirá determinar su potencial como posibles tratamientos para pacientes de DM1.

Conclusiones

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

1. Mediante secuenciación masiva de RNAs de pequeño tamaño hemos caracterizado el miRNoma adulto de *Drosophila* detectando 104 de los 153 miRNAs conocidos hasta la fecha del análisis.
2. La expansión de las repeticiones CTG, independientemente de *DMPK*, son capaces de alterar el miRNoma. En músculo de *Drosophila*, producen la desregulación de 20 miRNAs. En la mayoría de los casos, estos miRNAs tienen una expresión reducida respecto a las moscas control.
3. Tres de los miRNAs desregulados en moscas DM1 están conservados en humanos: *miR-1*, *miR-7* y *miR-10*. La expresión de estos tres miRNAs está reducida en músculo esquelético de pacientes. Por lo tanto, las alteraciones en la expresión de miRNAs producidas por la toxicidad de las repeticiones CTG en *Drosophila* está conservada en humanos.
4. La desregulación de miRNAs en DM1 tiene orígenes diferentes. La activación del programa de diferenciación miogénica induce la reducción de *miR-1* y *miR-10* en células DM1, mientras que la reducción de *miR-7* en DM1 es independiente de la diferenciación muscular. Además, la alteración de *miR-7* se produce a nivel de sus transcritos primarios mientras que la de *miR-1* y *miR-10* se origina aguas abajo en la ruta de biogénesis.
5. Las proteínas Muscleblind regulan la expresión de *miR-1* en *Drosophila*. El silenciamiento de *muscleblind* en el músculo provoca la reducción de *miR-1* maduro. Además, la sobreexpresión de MblC en moscas DM1 rescata la desregulación de *miR-1* mientras que no afecta a los niveles de *miR-7*.
6. La expresión de transcritos diana de *miR-1*, *miR-7* y *miR-10* está aumentada en músculo esquelético de pacientes DM1. Estas dianas participan en diferentes procesos metabólicos por lo que la desregulación de miRNAs contribuye a la complejidad de la patología molecular de la DM1.
7. La sobreexpresión de *miR-10* en músculo prolonga la vida media de moscas DM1 por lo que *miR-10* es una potencial diana terapéutica.

Material y Métodos

1. Material

1.1. Material biológico

1.1.1. Cepas de *Escherichia coli*

Cepa XL1-Blue (STRATAGENE)

- II Genotipo y fondo genético¹: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]*.
- II Método de transformación y eficiencia: Transformación por choque térmico. Eficiencia de transformación: $\geq 1 \times 10^8$ ufc/ μ g de DNA (plásmido pUC18).
- II Características: Las células XL1-Blue no tienen actividad endonucleasa (*endA1*) lo que mejora la calidad de la extracción del DNA plasmídico, también son deficientes en recombinasas (*recA1*), lo que estabiliza el inserto. La mutación *hsdR* previene el corte del DNA clonado por el sistema endonucleasa *EcoK*. El gen *lacIqZΔM15*, incluido en el episoma F', permite la detección colonias recombinantes por el fenómeno de α -complementación con los plásmidos de la serie pUC (sistema de detección blanco-azul). Además presenta un gen de resistencia a tetraciclina lo que permite cultivarla en un medio selectivo y evitar contaminaciones con otras cepas bacterianas.

Cepa SURE 2 (*Stop Unwanted Rearrangement Events type 2*) (STRATAGENE)

- II Genotipo y fondo genético¹: *e14(McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Camr]*.
- II Método de transformación y eficiencia: Transformación por choque térmico. Eficiencia de transformación: $\geq 1 \times 10^9$ ufc/ μ g de DNA (plásmido pUC18).
- II Características: Las células SURE están diseñadas para la clonación eficiente de fragmentos de DNA con estructuras no convencionales y/o estructuras repetitivas. Carecen de componentes de rutas que catalizan las reorganizaciones y deleciones de estructuras de DNA no estándares (tanto secundarias como terciarias), incluyendo repeticiones invertidas y Z-DNA. Además presenta las características típicas de la cepa XL1-Blue: son deficientes en endonucleasa (*endA1*) y recombinasas (*recA1*). Permiten el sistema de detección blanco-azul y son resistentes a tetraciclina.

¹ La lista de genes corresponde con sus alelos mutantes excepto en el caso de los genes del episoma F'. En este caso corresponde al alelo silvestre excepto que se indique lo contrario.

Ambas cepas se utilizaron para la amplificación y selección de plásmidos con los insertos de interés. Utilizamos la cepa XL1-Blue en todos los casos excepto en aquellos en los que los insertos podían formar estructuras secundarias como las

Material y Métodos

construcciones de RNA de interferencia o los pre-miRNAs. En estos casos los plásmidos se propagaron en la cepa SURE 2.

1.1.2. Líneas celulares

Fibroblastos humanos

Tanto la línea de fibroblastos de un paciente de DM1 como la línea de un individuo sano fueron cedidas por el Dr. Adolfo López de Munain (Hospital de Donostia). Los fibroblastos fueron aislados de biopsias de piel de un individuo sano y un paciente con 333 repeticiones CTG en el momento del diagnóstico (2010). Ambas líneas de fibroblastos fueron transformadas con lentivirus con una construcción del gen *MyoD* de ratón bajo el control del sistema inducible Tet-on. Las muestras fueron obtenidas bajo el consentimiento informado de los pacientes de acuerdo con las directrices del comité ético de investigación clínica del Hospital de Donostia.

1.1.3. Cepas de *Drosophila melanogaster*

Las cepas de *Drosophila* utilizadas en este trabajo se detallan en las siguientes tablas. Todas las cepas fueron generadas en nuestro laboratorio, cedidas por los autores o obtenidas de los centros *Bloomington Stock Center* (<http://flystocks.bio.indiana.edu>) y *Vienna Drosophila RNAi Center* (<http://stockcenter.vdrc.at>). Todos los cruces se realizaron a 25 °C a no ser que se especifique lo contrario.

Tabla MM-1. Cepas de referencia

Genotipo	Origen
<i>Or-R</i>	Departamento de Genética (<i>Universitat de València</i>)
<i>y^l w¹¹¹⁸</i>	Departamento de Genética (<i>Universitat de València</i>)
<i>y^l; Gr22b^l Gr22d^l cn^l CG33964^{R4.2} bw^l sp^l; LysC^l MstProx^l GstD5^l Rh6^l</i>	<i>Bloomington Stock Center (Indiana University)</i> ; (Rubin <i>et al.</i> 2000, Brizuela <i>et al.</i> 1994)

Tabla MM-2. Cepas equilibradoras

Genotipo	Origen
<i>w¹¹¹⁸; If/CyO ftz-Gal4; MKRS/TM6B</i>	<i>Bloomington Stock Center (Indiana University)</i>
<i>w¹¹¹⁸; TM3/TM6B</i>	<i>Bloomington Stock Center (Indiana University)</i>
<i>w¹¹¹⁸; TM3-GFP/TM6B</i>	Dr. Máximo Ibo Galindo, Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC)

Tabla MM-3. Cepas mutantes

Genotipo	Origen
$w^{1118}; mbl^{E27}/CyO$	(Begemann <i>et al.</i> 1997)
$y^l w^{1118}; CG6695^{EY11917}$	Bloomington Stock Center (Indiana University)
$w^{1118}; Df(3R)Exel6186/TM6B$	Bloomington Stock Center (Indiana University)
$w^{1118}; Df(3R)ED6076/TM6C$	Bloomington Stock Center (Indiana University)

Tabla MM-4. Cepas UAS

Genotipo	Origen
$w^{1118}; UAS-GFP$	Bloomington Stock Center (Indiana University)
$w^{1118}; UAS-DsRed$	Bloomington Stock Center (Indiana University)
$w^{1118}; UAS-dicer2$	Vienna Drosophila RNAi Center
$y^l w^{1118}; UAS-i(CTG)_{480}$	Generada en nuestro laboratorio; (Garcia-Lopez <i>et al.</i> 2008)
$y^l w^{1118}; UAS-IR-mbl$	Generada en este trabajo
$y^l w^{1118}; UAS-MblC$	Generada en nuestro laboratorio; (Garcia-Casado <i>et al.</i> 2002)
$y^l w^{1118}; UAS-dicer1$	(Dietzl <i>et al.</i> 2007)
$y^l w^{1118}; UAS-IR-dicer1$	(Karr <i>et al.</i> 2009)
$w^{1118}; UAS-miR-1; UAS-GFP$	(Sokol y Ambros 2005)
$w^{1118}; UAS-DsRed-miR-7$	(Stark <i>et al.</i> 2003)
$w^{1118}; UAS-miR-10$	(Gehrke <i>et al.</i> 2010)
$w^{1118}; UAS-DsRed-miR-1003$	Generada en este trabajo
$y^l w^{1118}; UAS-DsRed-miR-3R_{25}(S)$	Generada en este trabajo
$y^l w^{1118}; UAS-DsRed-miR-3R_{25}(G)$	Generada en este trabajo

Tabla MM-5. Cepas Gal4

Genotipo	Origen
$Act5C-Gal4/TM6B$	Bloomington Stock Center (Indiana University)
$sev-Gal4$	Dr. Marek Mlodzik (Mount Sinai School of Medicine)
$Mhc-Gal4/Cyo$	Dr. G Davis (University of California)

Tabla MM-6. Cepas recombinantes

Genotipo	Origen
$sev-Gal4 UAS-i(CTG)_{480}/TM3$	Generada en nuestro laboratorio; (Garcia-Lopez <i>et al.</i> 2008)
$Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)_{480}/TM6B$	Generada en nuestro laboratorio; (Garcia-Lopez <i>et al.</i> 2011)
$Act5C-Gal4 UAS-IR-mbl/TM6B$	Generada en este trabajo
$hs-Gal4 UAS-i(CTG)_{480}/TM6B$	Generada en nuestro laboratorio; (Bargiela <i>et al.</i> 2015)

Material y Métodos

1.1.4. Biopsias musculares

Las biopsias musculares utilizadas para la validación de alteraciones de miRNAs en pacientes con DM1 fueron cedidas por el Dr. Adolfo López de Munain (Hospital de Donostia) y fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de enfermedades neurodegenerativas del instituto Biodonostia. Analizamos 10 biopsias, de 5 pacientes y 5 controles sanos. Las características de los sujetos de estudio se describen en la tabla MM-7. Por otro lado, las biopsias musculares utilizadas en la validación de las dianas de miRNAs y el estudio del origen de las alteraciones de los miRNAs provienen del Dr. Juan Vilchez Padilla del Hospital La Fe (Valencia). En todos los casos las muestras se obtuvieron bajo el consentimiento informado de los pacientes siguiendo las directrices los comités éticos de investigación clínica respectivos.

Tabla MM-7. Biopsias musculares del Hospital de Donostia

	Nº biopsia	Sexo	Edad	Músculo	CTGs
pacientes	B09-66	♂	33	Deltoides izdo.	1000
	B10-29	♀	59	Biceps izdo.	333
	B10-31	♀	35	Biceps izdo.	1333
	B10-51	♂	56	-	400
	EXP-43	♀	50	Vasto externo	500
controles	EXP-29	♀	76	Vasto externo	
	EXP-30	♂	87	Vasto externo	
	EXP-31	♂	49	Vasto externo	
	EXP-33	♂	56	Deltoides izdo.	
	B10-36	♂	22	-	

Tabla MM-8. Biopsias musculares del Hospital La Fe (Valencia)

	Nº biopsia	Sexo	Edad	CTGs
pacientes	P08-78	♀	69	150
	P08-71	♂	28	300
	P08-160	♂	27	1100
	P08-70	♂	29	1500
	P09-90	♂	30	750
	P09-57	♂	53	800
controles	C08-25	♂	31	
	C08-129	♂	31	
	C08-60	♂	24	
	C08-105	-	-	
	C08-117	♂	58	
C08-145	♂	48		

1.2. Oligonucleótidos

1.2.1. Cebadores para PCR

En las siguientes tablas se recogen las parejas de cebadores utilizadas para la amplificación de DNA por PCR así como la polimerasa empleada (Pol), la temperatura de hibridación (T) y la concentración de magnesio empleadas en cada caso ($[Mg^{2+}]$).

Tabla MM-10. Cebadores para PCR

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Pol	T	$[Mg^{2+}]$
3R_25d	GTTTCGAGCACCCCTTCATAGC	Pwo	60 °C	2 mM
3R_25r	CTGCCAAGATGGCAAAAAG			
2L_2d	GCCCACCATCTCTATCCCTA	Pwo	55 °C	2 mM
2L_2r	GAAAATCTATCCCGGGCAGT			
3L_17d	ATAAGCGACGAAGCGTGAAG	Pwo	55 °C	2 mM
3L_17r	TGCATTTAACGCAGGAACAG			
3R_47d	ATGAAAATGCCTGGTGGTGT	Pwo	60 °C	2 mM
3R_47r	TCAGCCTTGTCTTCTCTTGTCTC			
3L_27d	CCGCCAGAGTTTGGAAATC	Pwo	55 °C	3 mM
3L_27r	TTTGGATCGTATCATATCGGAAC			
3L_1d	GAAAGCCAGGTGCATTGATT	Pwo	55 °C	2 mM
3L_1r	TCTCGATTACGTGCAACAC			
3R25-hpd	CACCATCCACCTCAGACAG	GO	65 °C	2 mM
3R25-hpr	CAAGTTCCACCCCTGGTTC			
miR-1003d	TCGAAAAGACCGAGCGTGAA	Net	60 °C	2 mM
miR-1003r	TTCCGATGCCACAGATTCCGG			
CG6695d	CGTGCATCAATGCCAGTAGC	Net	60 °C	2 mM
CG6695r	TGATAGCTTCTACTGCGGCG			
miR-1006d	TTCTCCTTGGCACAATCGCT	Net	60 °C	2 mM
miR-1006r	CTTTGTGGGAGTCGACGGAA			
VhaSFDd	ACTTGGGCATGGTCTCATGG	Net	60 °C	2 mM
VhaSFDr	CAGGACGATCAACTGGGCTT			
miR-1004d	CTCCGATGAGATGGCGAACA	Net	60 °C	2 mM
miR-1004r	GACTCTGGTACAAGCACCGT			
CG43707d	GGCGATTGCATAGTCCAAGG	Net	60 °C	2 mM
CG43707r	GCCTTTGCCTGGATTTGAGC			

Net: Netzyme, Pwo: Pwo polimerase y GO: GO-taq enzyme (sección 1.4).

Tabla MM-11. Cebadores para PCR anidada

Nombre	Secuencia (5' → 3')
IR-mbl-anid1d	TCAGCGGAAAAGGTGAATTATACC
IR-mbl-anid2r	GCGGACTTGAAGAAGTCGGGGATCCCCGTACTTTTACGCCGATGG
IR-mbl-anid3r	CAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGTACTTTTACGCCGATGG
IR-mbl-anid4d	GTGAATTATACCAGAGCCTGC
IR-mbl	gaagatcttcTACCAGAGCCTGAA
GFPfrgd	cgggatccccgACTTCTTCAAGTCCGCC
GFPfrgr	CGGGATCCCGAGctgcacGCTGCCGTCTCT
GFPfrg2r	ctgcacGCTGCCGTCTCTCGATGTTG

Pareja de cebadores	T	[Mg2+]
IR-mbl-anid1d – IR-mbl-anid2r	65 °C	2 mM
IR-mbl-anid1d – IR-mbl-anid3r	65 °C	2 mM
IR-mbl-anid4d – GFPfrg2r	65 °C	2 mM
IR-mbl	65 °C	3 mM
GFPfrgd – GFPfrgr	55 °C	2 mM

En mayúsculas se indica la secuencia del gen diana y en minúsculas adaptadores para enzimas de restricción.

1.2.2. Cebadores para PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

En la tabla MM-10 se recogen los cebadores utilizados para la cuantificación por PCR en tiempo real así como la concentración final a la que se utilizaron en cada reacción de PCR. Para el diseño de estos cebadores se utilizó el programa *Primer Express® Software v. 3.0*.

Tabla MM-12. Cebadores para qPCR de genes de *Drosophila*

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Concentración
qmbld	TTGAATCAAAAATTATAGCCCAAGCT	300 nM
qmblr	CGATTTTGCTCGTTAGCGTTT	300 nM
qTub84Bd	CACTACACCATCGCAAGGA	900 nM
qTub84Br	GCAGACCGGTGCACTGATC	300 nM
cluster_310_f	CACACGACCCGCCCTGCAAA	250 nM
cluster_310_r	TTGCACATTCACCGGCCTGAAA	250 nM
cluster_959_f	GCTCATGGGCTCCGGAACGTG	250 nM
cluster_959_r	ACGTGGCAAAGTGGGGGTCCT	250 nM
CG31646_f	GCCGGCTGGCCCATCCTTTG	250 nM
CG31646_r	CGGCGCCTCTTATCGCTCCG	250 nM

cluster_2a_f	TGGCTGTGATATGCCGCGCAA	250 nM
cluster_2a_r	TGGCGCATTTCATGCTGGGCT	250 nM
tub84B_f	CACTACACCATCGGCAAGGA	250 nM
tub84B_r	GCAGACCGGTGCACTGATC	250 nM
pri-miR1_f	GGCAGCGAACACCCGCACAAC	250 nM
pri-miR1_r	ACTTTGTGCGCGGCAAATCCT	250 nM
pri-miR7_f	CGTCCCGGTCCCGAGTGTTA	250 nM
pri-miR7_r	ATGCACTCCCAGGAGGACCAAT	250 nM
pri-miR10-f	AGGGTAGACGTGGAGCAAACCTGA	250 nM
pri-miR10_r	CCGCGATTGCCTAGCGGACTT	250 nM

Tabla MM-13. Cebadores para qPCR de genes humanos

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Concentración
pri-miR7-1_f	TGGTAAAACTGCTGCCAAAACCA	2 μM
pri-miR7-1_r	CCACACAGAACTAGGCCAACATCCA	2 μM
pri-miR7-2_f	CGCCTCGCCTGAAGGAGCAT	2 μM
pri-miR7-2_r	TGCAAGGCGTTCGAGGACCA	2 μM
pri-miR7-3_f	CAGCGGGCTCCGTTTCGTCT	2 μM
pri-miR7-3_r	TGCCAGGCACCTCAGACCAC	2 μM
SOD1_f	TGGCCGATGTGTCTATTGAA	2 μM
SOD1_r	GACTTCCAGCGTTTCCTGTC	2 μM
WDR6_f	GCTTTCTGGGATCTCACCAC	2 μM
WDR6_r	AAGGTGTGCAGGCTGTTGAT	2 μM
GTF2B_f	GGCATCAGCTGAAAAGAGGA	2 μM
GTF2B_r	AGTTTGTCCACTGGGGTGTC	2 μM
SMARCA4_f	CGTGAGTGACGATGACAGTG	2 μM
SMARCA4_r	TGCTAAGGCCTATGCCATCT	2 μM
NET1_f	GGATGGAGATGTGAGAATGG	2 μM
NET1_r	CTTGTGGAACACGTCATTGG	2 μM
CTSB_f	AGAATGGCACACCCTACTGG	2 μM
CTSB_r	AATCCAGCCACCACTTCTG	2 μM
ATG4_f	CAAGCCAGAAGTGACAACCA	2 μM
ATG4_r	TTATGGTGCCAGATGGAAGA	2 μM
GGT7_f	AACCGGAACCTGAGTGACAG	2 μM
GGT7_r	TGGCTTCCAGGAACCTCAATC	2 μM

1.2.1. Cebadores para secuenciación

Todas las construcciones y amplicones obtenidos durante este trabajo se comprobaron mediante secuenciación estándar. Para la secuenciación de DNA clonado se utilizaron los cebadores descritos en la tabla MM-8. Los amplicones de PCR se secuenciaron utilizando el cebador directo empleado para su amplificación. En los casos en los que la reacción de secuenciación fue improductiva, se clonaron en vectores de clonación (sección 1.3.1) y se secuenciaron utilizando los cebadores específicos del vector (tabla MM-8). Las reacciones de secuenciación se realizaron en la empresa Sistemas Genómicos, Paterna (Valencia).

Tabla MM-9. Cebadores para secuenciación de DNA clonado

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Vector diana
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	pBlueScript, pGEM-T easy
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	pBlueScript, pGEM-T easy
M13d	TGTTAAAACGACGGCCAGT	pTOPO
M13r	CAGGAAACAGCTATGACC	pTOPO
pUASTd	CACCACAGAAGTAAGGTTCC	pUAST
pUASTr	CTGCAACTACTGAAATCTGCC	pUAST

1.2.2. Sondas

Para la detección de miRNAs mediante *northern blot* (sección 2.1.8) utilizamos sondas miRCURY LNA de EXIQON. Estas sondas incluyen nucleótidos modificados, LNAs (*Locked-Nucleid Acid*), en posiciones determinadas. La presencia de estos LNAs aumenta la especificidad de la sonda e impide la formación de estructuras secundarias. Como control de carga detectamos en las mismas membranas el RNA pequeño nuclear U6 (*U6 snRNA*). Como sonda para la detección de *U6 snRNA* se empleó un oligonucleótido de DNA sin nucleótidos modificados. Todas las sondas presentaban una Digoxigenina en su extremo 5'.

Tabla MM-14. Sondas para *northern blot*

Nombre	Secuencia (5' → 3')	T
miR-1	CTCCATACTTCTTTACATTCCA	52 °C
miR-7	ACAACAAAATCACTAGTCTTCCA	52 °C
miR-1003	CTGTGAATATGTAAATGTGAGA	45 °C
3R_25	TTCCACTTCTTTACATTCCA	52 °C
2L_7	AGAAGCAGGAGGGCAGCTCCA	52 °C

3L_11	GGCGGTGAGCAGCTCGAGGA	52 °C
2L_2	ACATGCTCCACCGCTTGTC	52 °C
2L_19	TCAGCTCATTGGAGCATTAC	52 °C
3L_17	CTGTCTGTCTCGCAGTCAAGC	52 °C
3R_47	CTTACATAACGACAACATTAAC	52 °C
3L_27	GTTCCATTCAAACACTGTTG	52 °C
3L_1	CAGCCCGGCTCGAGTGGCT	52 °C
3R_25	TTCCACTTCTTTACATTCCA	52 °C
2L_7	AGAAGCAGGAGGGCAGCTCCA	52 °C
3L_1	GGCGGTGAGCAGCTCGAGGA	52 °C
U6 snRNA	GGCCATGCTAATCTTCTCTGTA	52 °C

1.2.3. Otros oligonucleótidos

Para determinar la especificidad de la sonda del miRNA 3R_25, utilizamos dos oligonucleótidos con las dos secuencias mayoritarias detectadas de este miRNA en la secuenciación masiva (tabla MM-15).

Tabla MM-15. Oligonucleótidos 3R_25

Nombre	Secuencia (5' → 3')
miR-3R_25 genómico	TGGAATGTAGGAAAGTGGAA
miR-3R_25 SOLiD	TGGAATGTAAAGAAGTGGAA

En negrita se resaltan las diferencias entre ambas secuencias.

1.3. Vectores y construcciones

1.3.1. Vectores de clonación

Utilizamos tres vectores de clonación diferentes para clonación de amplicones de PCR o la subclonación de fragmentos de restricción. Los tres vectores presentan el sitio de clonación múltiple insertado dentro de la región codificante del α -péptido del enzima β -galactosidasa lo que permite la detección colonias recombinantes por el fenómeno de α -complementación (blanco-azul) al transformarlos en las cepas XL1-Blue y SURE2 (sección 1.1.1).

pBlueScript II SK+ (Stratagene)

Es un vector derivado del pUC19. El sitio de clonación múltiple está flanqueado por los promotores de las RNA polimerasas T3 y T7 lo que permite la transcripción *in vitro* del inserto. Este vector se empleó para la clonación de fragmentos de

Material y Métodos

restricción y de amplicones de PCR fosforilados tanto con extremos romos como protuberantes.

pTOPO (Invitrogen) y pGEM-T easy (Promega)

Ambos vectores están linearizados y presentan una desoxitimidina protuberante en los extremos 3' lo que aumenta la eficiencia de la clonación de productos de PCR sintetizados por algunas *Taq* polimerasas que incorporan una desoxiadenina terminal. Para la clonación en pTOPO se utiliza la Topoisomera I mientras que en pGEM-T easy una ligasa. Estos vectores se emplearon para clonar fragmentos de PCR para su posterior secuenciación o subclonación en vectores destino.

1.3.2. Vectores de transformación de la línea germinal de *Drosophila*

pUAST (Brand y Perrimon, 1993)

Vector derivado del pCaSpeR3 que incluye los extremos del elemento P de *Drosophila*. Contiene cinco sitios de unión para la proteína GAL4 (secuencia UAS) y un inicio de la transcripción aguas arriba del sitio de clonación múltiple. Para la selección de moscas transgénicas incluye el gen *miniwhite*. Se ha utilizado en la clonación de construcciones para la transformación en la línea germinal de *Drosophila*.

1.3.3. Construcciones y otros vectores

Tabla MM-16. Construcciones y otros vectores

Nombre	Origen
pUAST-IR-mbl	Generada en este trabajo
pBlueScript-IR-mbl	Generada en este trabajo
peGFP-N3	Clontech
pDsred2	Clontech
pre-miR-3R_25(S)	Síntesis química (GenScript)
pre-miR-3R_25(G)	Síntesis química (GenScript)
pre-miR-1003	Síntesis química (GenScript)
pUAST-DsRed	Generada en este trabajo
pUAST-DsRed-miR-3R_25(S)	Generada en este trabajo
pUAST-DsRed-miR-3R_25(G)	Generada en este trabajo
pUAST-DsRed-miR-1003	Generada en este trabajo

1.3.3.1.1. Construcciones generadas por síntesis química

La región genómica del *miRNA 3R_25* y su versión modificada fueron generadas por síntesis química por la empresa GenScript, EEUU. Del mismo modo

se generó la secuencia precursora del miRtrón *miR-1003*. A estas regiones se le fusionaron secuencias de enzimas de restricción para su clonación en pUAST.

```
>pre-miR-3R_25 (G)
GCGGCCGCagcccgaagaagcacccttaaaggaaaaacaaaaaataatagtagtaagtagcagtagtgcga
gcacccttcatagcaaccaacatcttccactccgcacctcgctttccaccatccacttcagacagttcccgcgct
gctggaatgtaggaaagtggaacgaaccaggggtggaactgggcgaggggtgagacgtggggtgcagcctgc
aaatgtcgcgctttttgccatcttggcagggtcctttagggcacttacgtaatgtcccgccttcagagagggtt
tgtaagccctggggtCTCGAG

>pre-miR-3R_25 (S)
GCGGCCGCagcccgaagaagcacccttaaaggaaaaacaaaaaataatagtagtaagtagcagtagtgcga
gcacccttcatagcaaccaacatcttccactccgcacctcgctttccaccatccacttcagacagttcccgcgct
gctggaatgtaagaaagtggaacgaaccaggggtggaactgggcgaggggtgagacgtggggtgcagcctgc
aaatgtcgcgctttttgccatcttggcagggtcctttagggcacttacgtaatgtcccgccttcagagagggtt
tgtaagccctggggtCTCGAG

>pre-miR-1003
GCGGCCGCataaagccgataagcgtgcggaatcgaaaagaccgagcgtgaacgactgcaacagcaggaacgc
gaggatgagatgcgcgaaactggccctcaagctgcccagaaaggtgggtatctggatgtggttggctctggcgggt
cctctcacatttacatattcacaggcgcgctgagctgcgtcacaaaatggaacgccctcgagtggaagctc
tcggacagcgatgccgaatctgtgcatcggaagccagctggcaagtcgctcagcgcctcgagtcgcagca
gatcggagagtcgtagggcgtgcaccgcggaaacacagcacagcagcggagcagcagcgaacggaag
gaggagacgcacaaggacgCTCGAG
```

Secuencia de reconocimiento de *NotI* (azul) y *XhoI* (naranja). La región subrayada corresponde al pre-miRNA predicho. En rojo se resaltan las diferencias entre ambas secuencias.

1.4. Enzimas

Todas las enzimas se usaron siguiendo las instrucciones del proveedor a no ser que se especifique lo contrario. Todas las enzimas de restricción utilizadas durante este trabajo provenían de la casa comercial Roche.

Tabla MM-17. Enzimas

Nombre	Referencia
Polimerasa <i>Netzyme</i>	NEED (NE002)
<i>Pwo</i> polimerasa	Roche (11 644 955 001)
<i>GO-taq</i> polimerasa	Promega (M3171)
<i>SuperScript II</i> , Transcriptasa reversa	Invitrogen (18064-022)
<i>TermoScript</i> , Transcriptasa reversa	Invitrogen (12236-022)
Fosfatasa alcalina	Roche (10 713 023 001)
Polinucleótido kinasa	Roche (10 174 645 001)
T4 DNA ligasa	Roche (481 220)
DNAsa I	Invitrogen (18068-015)
RNAsa A	Roche (10 109 142 001)

Material y Métodos

1.5. Anticuerpos

Tabla MM-18. Anticuerpos primarios

Nombre	Animal hospedador	Concentración de uso	Referencia
anti-Dicer-1	Conejo	wb: 1/500	Abcam (AB4735)
anti- α -Tub	Ratón	wb: 1/5000	Sigma (T9026)
anti-DIG-PA	Oveja	nb:1/10000	Roche (11093274910)
anti- conejo-HRP	Cabra	wb: 1/200	Sigma (A0545)
anti-ratón-HRP	Cabra	wb: 1/5000	Sigma (A9309)

wb: Western blot, nb: Northern blot, PA: fosfatasa alcalina, HRP: peroxidasa de rábano.

1.6. Kits comerciales

Tabla MM-19. Kits

Nombre	Aplicación	Referencia
<i>High Pure Plasmid Isolation Kit</i>	Extracción de DNA plasmídico	Roche (1754785)
<i>Nucleo Bond Xtra Maxi Plus</i>	Extracción de DNA plasmídico	Cultek (740416)
<i>AxyPrep DNA Gel Extraction</i>	Purificación de DNA (banda agarosa)	Axigen (AP-GX)
<i>GFX PCR DNA Purification</i>	Purificación de DNA (productos PCR)	GE (28-9034-70)
<i>Topo TA Cloning Kit</i>	Clonación con vector pTOPO	Invitrogen (4500)
<i>mirVana miRNA isolation</i>	Extracción de RNA de pequeño tamaño	Ambion (AM1560)
<i>MEGAclear</i>	Purificación de RNA	Ambion (AM1908)
<i>ECL Western blotting substrate</i>	Detección de peroxidasa	Pierce (32106)
<i>CDP-star</i>	Detección de fosfatasa alcalina	Roche (12041677001)
<i>MEGAscript T7</i>	Transcripción <i>in vitro</i>	Ambion (AM1334)
<i>VECTASTAIN ABC kit</i>	Ensayo ABC	Vector (PK-6100)
<i>In situ cell death detection TMR</i>	Tinción TUNEL	Roche (12156792001)

1.7. Programas informáticos

Tabla MM-20. Programas informáticos

Programa	Aplicación	Referencia
<i>ClustalX v. 2.0</i>	Alineamiento de secuencias	(Larkin <i>et al.</i> 2007)
<i>GeneDoc</i>	Visualización y edición de alineamientos	(Nicholas <i>et al.</i> 1997)
<i>ImageJ v.1.43u</i>	Análisis de imagen	(Abramoff <i>et al.</i> 2004)
<i>Graphpad prism 5</i>	Representación gráfica y análisis estadístico	GraphPad Software
<i>Primer Express Software v 3.0</i>	Diseño de cebadores para qPCR	Applied Biosystems
<i>SDS software v 2.3</i>	Análisis de PCR a tiempo real	Applied Biosystems
<i>dChip analysis software</i>	Análisis de datos de expresión	(Li y Wong 2001)
<i>Cluster v 3.0</i>	Análisis de agrupamiento	(Eisen <i>et al.</i> 1998)
<i>Java TreeView</i>	Visualización de análisis de agrupamiento	(Saldanha 2004)

1.8. Recursos en red

En las siguientes tablas se detallan las bases de datos consultadas y las aplicaciones en red utilizadas durante este trabajo.

Tabla MM-21. Bases de datos

Base de datos	Descripción	Dirección en la red	Referencia
<i>FlyBase</i>	Genómica y genética de diferentes especies de <i>Drosophila</i>	<i>flybase.org</i>	(Tweedie <i>et al.</i> 2009)
<i>miRBase</i>	Secuencias de miRNAs	<i>www.mirbase.org</i>	(Kozomara y Griffiths-Jones 2011)
<i>GenBank</i>	Secuencias nucleotídicas y de proteínas	<i>www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank</i>	(Benson <i>et al.</i> 2011)
<i>Ensembl</i>	Genética, genómica y biología molecular de diferentes organismos	<i>www.ensembl.org</i>	(Flicek <i>et al.</i> 2011)
<i>PubMed</i>	Consulta bibliográfica	<i>www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</i>	(Lu 2011)

Tabla MM-22. Aplicaciones en red

Aplicación	Descripción	Dirección en la red	Referencia
<i>E-RNAi</i>	Diseño y evaluación de fragmentos de siRNAs	<i>www.dkfz.de/signaling/e-rnai3</i>	(Arziman <i>et al.</i> 2005)
<i>UCSC Genome Browser</i>	Visualización de genomas	<i>genome.ucsc.edu</i>	(Kent <i>et al.</i> 2002)
<i>RNAfold</i>	Análisis de estructura secundaria de RNAs	<i>rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold</i>	(Hofacker 2009)
<i>TargetScan</i>	Análisis de dianas de miRNAs	<i>www.targetscan.org</i>	(Lewis <i>et al.</i> 2005)

2. Métodos

2.1. Métodos moleculares

2.1.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

2.1.1.1. Extracción de DNA genómico

2.1.1.1.1. Extracción de DNA genómico de moscas adultas

Se homogenizaron 30 individuos en 200 μ L de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 0.5 %). Los homogenados se incubaron durante 30 min a 65 °C. Se añadieron 800 μ L de tampón AcK/LiCl (1 parte de KAc 5 M y 2.5 partes de LiCl 6 M) y tras incubar 10 min en hielo se

Material y Métodos

centrifugó a 12000 g a 4°C durante 15 min. Se recogió el sobrenadante y se añadió el mismo volumen de isopropanol. Se centrifugó a 12000 g 15 min para recoger el DNA precipitado. Se eliminó el precipitado y se lavó con etanol al 70 % centrifugando a 7500 g durante 5 min. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 400 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM) con RNasa A (2 µg/ml). El DNA genómico se purificó mediante extracción fenol/cloroformo. Se añadió el mismo volumen de una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente durante 15 s en un vortex. Se centrifugó a 12000 g durante 5 min y el sobrenadante se purificó esta vez con cloroformo y alcohol isoamílico (24:1). El sobrenadante resultante se precipitó añadiendo 2 volúmenes de etanol y AcNa a una concentración final de 0.3 M. Tras centrifugar para recoger el DNA precipitado y lavar con etanol al 70%, el DNA se resuspendió en 150 µL de agua miliQ y se comprobó su integridad en un gel de agarosa al 0.8 %.

2.1.1.1.2. Extracción de DNA genómico de embriones de *Drosophila*

La extracción de DNA genómico de embriones para su genotipado se realizó con el reactivo *DNAreleasy* (Nippon Genetics). Se añadió 50 µL del reactivo a una alícuota de los embriones a genotipar y se incubó en un termociclador durante 5 min a 75 °C y 2 min a 96 °C. El lisado resultante se usó directamente en las PCRs para genotipar.

2.1.1.2. Extracción de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico a pequeña escala se llevó a cabo utilizando el kit *Pure Plasmid Isolation* (Roche), con el que se obtiene una concentración media de 200 ng/µl. Para las extracciones de DNA plasmídico a gran escala se utilizó el kit *Nucleobond Xtra Maxi plus* (Macherey-Nagel), obteniéndose entre 0.5-2 µg/µl. En los dos casos se siguieron las instrucciones del proveedor.

2.1.1.3. Purificación de amplicones de PCR y de fragmentos de restricción

Para purificación de fragmentos de DNA provenientes de reacciones enzimáticas tanto en solución como incluidos en agarosa se empleó el kit *GFX PCR DNA and Gel purification* (GE healthcare). En el caso de los fragmentos de DNA menores de 300 pb se purificaron mediante electroelución de gel de agarosa (2.1.1.4.).

2.1.1.4. Purificación de DNA en agarosa por electroelución

La purificación por electroelución de agarosa se empleó para los fragmentos de DNA menores de 300 pb. El DNA se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 2 %. La banda del tamaño de interés se cortó y se introdujo en una membrana de

diálisis de poro inferior a 25 Å con 300 µL de TBE 0.5X. La membrana se colocó en una cubeta de electroforesis que contenía TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM) con la banda de agarosa en el extremo que corresponde al polo positivo. Tras someter a un campo eléctrico de 100 V durante 30 min se colocó la membrana de diálisis con el fragmento de agarosa en el polo negativo y se volvió a someter a un campo eléctrico de 100 V durante 10 s. La solución de TBE 0.5X que contenía el DNA se recogió y se purificó con fenol/cloroformo (ver sección 2.1.1.1.1).

2.1.1.5. Extracción de RNA total de moscas

Para la extracción de RNA se partió de un total de hasta 50 moscas adultas por extracción o de unos 100 µL de embriones. El material se homogenizó en 1 mL de TriReagent (Sigma). Los homogenizados se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se les añadió 200 µL de cloroformo. La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 s 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 1 mL de isopropanol y 20 µL de glicógeno (150 µg/mL) (GlycoBlue, Ambion). Tras 10 min a temperatura ambiente se centrifugó de nuevo durante 10 min. El sobrenadante se eliminó y el RNA precipitado se lavó con 500 µL de etanol al 75% centrifugando a 7500 g. Se secó el RNA a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µL agua libre de RNasas a 65 °C. Todos los RNAs se almacenaron a -80 °C. El RNA se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Eppendor BioPhotometer). Para comprobar la calidad del RNA unos 250 ng de RNA se analizaron en un bioanalizador (Experion bioanalyzer, BioRad).

2.1.1.6. Extracción de RNA de pequeño tamaño de moscas

Para la extracción y purificación de RNAs pequeños (entre 15 y 30 nt) pusimos a punto un proceso en que utilizamos kits comerciales de extracción de RNA y purificación de RNAs pequeños en gel de poliacrilamida (Figura MM-1). Extrajimos el RNA total de 50 moscas adultas mediante el kit *miRVana miRNA isolation kit* (Ambion) para enriquecer la fracción de RNAs pequeños. El RNA total se separó por electroforesis en un gel de acrilamida al 15 % desnaturalizante (sección 2.8). Se seleccionó una región correspondiente a los 2/3 superiores entre los marcadores azul de bromofenol (~10 nt) y el xilenocianol (~30 nt). La banda escindida se fragmentó y se incubó en 10 mL NaCl 1 M durante toda la noche a 4 °C en agitación para eluir los RNAs pequeños del gel. Se recogió el sobrenadante y se añadieron 2 mL de NaCl 1 M. Tras incubar a temperatura ambiente en agitación se juntaron ambos sobrenadantes y se añadieron 18 mL de etanol y 1.5 µL de acrilamida lineal (5 mg/mL). La mezcla se pasó por una columna del kit *MEGAclean* (Ambion) que retiene los RNAs pequeños. Lavamos con 4 mL de

Material y Métodos

etanol al 80% y tras eliminar el etanol residual por centrifugación añadimos 50 μ L de solución de elución del kit *MEGAclean* a 95 °C. Incubamos durante 2 min y recogimos los RNAs eluidos por centrifugación a 10000 g durante 1 min. La elución se repitió con 50 μ L más de solución de elución y almacenamos los RNAs de pequeño tamaño a -80 °C. Los RNAs obtenidos fueron analizados en un bioanalizador *Agilent 2100* (Agilent Biotechnologies) para determinar la cantidad y calidad de los mismos. Este análisis lo realizó Sistemas Genómicos, Paterna (Valencia).

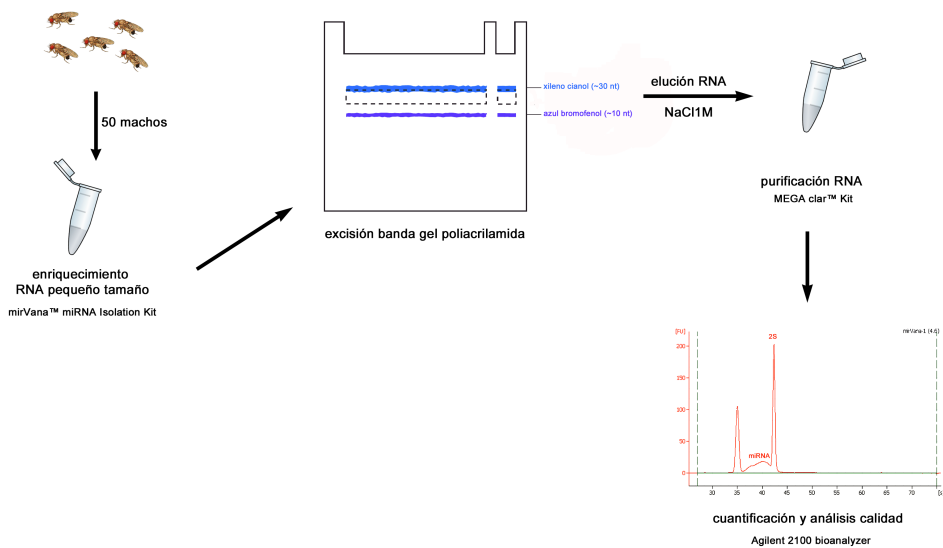


Figura MM-1. Extracción y purificación de RNAs pequeños.

Se extrajo el RNA de pequeño tamaño de 50 machos de cada genotipo enriqueciendo en la fracción de RNAs pequeños mediante el kit *miRvana* (AMBION). El RNA se separó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y se seleccionó la fracción de 15 a 30 nucleótidos. El RNA se eluyó de la acrilamida con NaCl 1M durante toda la noche a 4°C y fue purificado mediante el kit *MEGAclean* (AMBION). Finalmente, el RNA purificado se analizó en el bioanalizador 2100 de Agilent.

2.1.1.7. Extracción de RNA de biopsias musculares

Para el análisis de expresión de los microRNAs en músculo humano por qPCR realizamos extracciones de RNA total enriqueciendo la fracción de RNA pequeños. Trasferimos las biopsias musculares a 700 μ L de *QIAzol* (Qiagen) y homogenizamos el tejido con una bola de acero en un *Tissuelyser II* (Qiagen) durante 30 s a 30 Hz. El homogenado se transfirió a un nuevo tubo y se le añadió 140 μ L de cloroformo. La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 s y se dejó incubar 2 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 12000 g durante 15 min y

a 4 °C, se transfirieron 350 µL de la fase acuosa a un nuevo tubo para su purificación. El RNA se purificó en el sistema automático *QIAcube* (Qiagen) con el kit *miRNeasy mini kit* (Qiagen) que enriquece la fracción de RNAs pequeños.

2.1.2. Extracción de proteínas de moscas

Para la extracción de proteínas totales se homogenizaron 30 moscas en 200 µL de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM, pH 8). El homogenado se centrifugó a 12000 g durante 5 min a 4°C para eliminar el material no homogenizado y los restos celulares. Se recogió el sobrenadante y se almacenó a - 20 °C. La cantidad de proteínas totales se cuantificó mediante el método de Bradford (Bradford 1976).

2.1.3. Amplificación de DNA por PCR

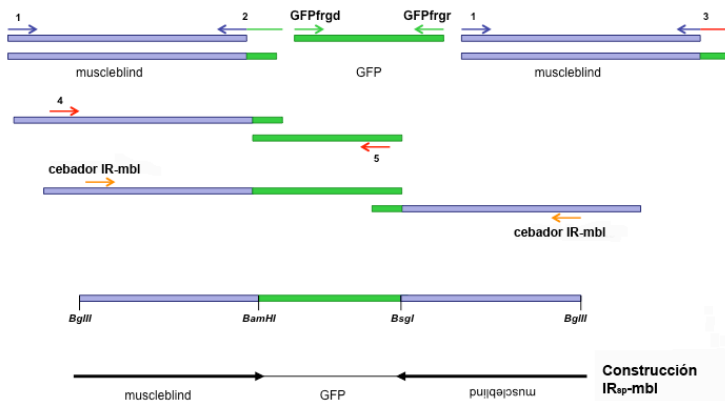
La tabla MM-10 recoge los diferentes cebadores utilizados para amplificar DNA por PCR estándar. En esta tabla también se detallan las polimerasas empleadas en cada caso. Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las condiciones de cada pareja de cebadores se detallan en la tabla MM-9.

2.1.3.1. PCR anidada

Para generar las construcciones IR_{sp} (*inverted repeat spaced*) que silenciaran la expresión de *muscleblind* realizamos PCRs anidadas y solapantes. Los fragmentos específicos de *muscleblind* se amplificaron a partir del cDNA de la isoforma *mblA* clonada en el vector *pBlueScriptII* (clon AF001625; (Begemann *et al.* 1997)). Se amplificaron mediante PCR las secuencias específicas de *muscleblind* y una secuencia exógena (del gen GFP) que utilizaremos como espaciador, para facilitar que se forme la horquilla de RNA de doble cadena que generará la interferencia. Mediante PCRs anidadas solapantes (Figura MM-2) fusionamos dos fragmentos invertidos de *mbl* y el espaciador para obtener la construcción que nos va a permitir interferir la expresión de *muscleblind*. Todas las PCRs se realizaron con la polimerasa Pwo (Roche) siguiendo las instrucciones del proveedor y optimizando la temperatura de hibridación y la concentración de magnesio para cada pareja de cebadores (Tabla MM-10). Para facilitar la clonación de los productos de la PCR anidada por extremos romos, fosforilamos el cebador IR-*mbl* con el enzima polinucleótido quinasa (PNK, Roche) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Figura MM-2. Esquema de la generación de la construcción IR_{sp}-*muscleblind* por fusión de fragmentos de DNA mediante PCRs anidadas y solapantes.

Mediante PCRs solapantes sucesivas, usando cebadores anidados, generamos una construcción que constará de 2 fragmentos del gen *mbl* dispuestos de manera invertida y separados por un fragmento del gen GFP. 1: IR-*mbl*-anid1d, 2: IR-*mbl*-anid3r, 3: IR-*mbl*-anid3r, 4: IR-*mbl*-anid4d y 5: GFPfrg2r (tabla MM-10).



2.1.3.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

2.1.3.2.1. qPCR de mRNAs

El análisis de expresión de *muscleblind* se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real. La síntesis de cDNA se realizó con la retrotranscriptasa *SuperScriptII* (Invitrogen) a partir de 1 µg de RNA total previamente digeridos con DNasa I (Invitrogen) (sección 2.1.4). Se analizaron 10 ng de cDNA por reacción usando el *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Para cada muestra se realizaron 3 réplicas, se incluyó un control negativo y como control endógeno se utilizó el gen de la *Tubulina 84B*. Tanto los cebadores para *muscleblind* como para la *Tubulina84B* (tabla MM-12) fueron diseñados para amplificar fragmentos de 79 pb. El hecho de analizar amplicones de tamaño similar es importante para que la eficiencia de las dos reacciones sea similar. La reacción se llevó a cabo en el termociclador *ABI 7000 sequence detection system* (Applied Biosystems). Las condiciones de la reacción fueron: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min y 40 ciclos de 15 s desnaturalización a 95°C seguidos de 1 min de hibridación y amplificación a 60°C. Al final de cada reacción, se llevó a cabo un protocolo de disociación para asegurar la presencia de un único amplicón. La expresión relativa de *muscleblind* se calculó mediante el método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen 2001, Pfaffl *et al.* 2002). La expresión de las dianas de miRNAs en biopsias musculares, así como de los pri-miRNAs se analizaron siguiendo el mismo procedimiento y utilizando los cebadores de la tabla MM-13. En este caso se utilizó el gen GAPDH como control endógeno.

2.1.3.2.2. qPCR de miRNAs

Para la validación en pacientes de los miRNAs conservados se realizaron ensayos *Taqman* específicos para cada gen. La síntesis de cDNA se realizó con el kit *Taqman microRNAs RT* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del

fabricante (sección 2.1.4.4). Para las PCRs cuantitativas a tiempo real se realizaron ensayos *Taqman miRNA* (Applied Biosystems) empleando cebadores y sondas específicas para cada miRNA. Las reacciones se realizaron en un volumen total de 10 μ L en placas de 384 pocillos utilizando un termociclador 7900 HT Fast de Applied Biosystems con el software SDS versión 2.2.2. Cada miRNA se ensayó por triplicado a partir 12 ng de cDNA por reacción. Para cada miRNA se incluyó un control negativo con agua libre de RNasas y se analizaron los RNA pequeños nucleolares RNU44 y RNU48 como controles endógenos. La expresión relativa de cada miRNA se calculó mediante el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ considerando el gen RNU48 como control endógeno. Las diferencias entre pacientes y controles se analizaron estadísticamente mediante el test t de Student.

2.1.4. Retrotranscripción (RT)

2.1.4.1. Tratamiento con DNasa I

El RNA empleado para la retrotranscripción de mRNAs y de precursores de miRNAs fue digerido con DNasa I para evitar contaminación con DNA genómico. En el caso de la retrotranscripción de mRNAs 1 μ g de RNA total fue digerido con *DNase I* (Invitrogen) durante 15 min a temperatura ambiente. El enzima fue inactivado con 1 μ L de EDTA 25 mM incubando a 65°C durante 10 min. Para la retrotranscripción de precursores de miRNAs la digestión se escaló para digerir 100 μ g de RNA total. En ambos casos se añadieron 40 unidades de inhibidor de RNasas, *RNaseOUT* (Invitrogen), en las reacciones de digestión para evitar la degradación del RNA.

2.1.4.2. RT de mRNAs

Como molde para la síntesis de cDNA partimos del volumen total de la digestión con DNasa (10 μ L, 1 μ g de RNA total). Añadimos 1 μ L dNTPs 10 mM (Roche) y 1 μ L Hexámeros (Roche) al RNA y desnaturalizamos a 65°C durante 5 min. Los tubos se colocaron inmediatamente en hielo y se añadieron 7 μ L del Mix (4 μ L tampón 5X, 2 μ L DTT 0.1 M, 1 μ L *RNaseOUT* (Invitrogen)) a cada uno. Por último, se añadieron 2 U de retrotranscriptasa *SuperScript II* (Invitrogen). Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción la mezcla se atemperó a 25°C durante 3 min, se incubó 1 h a 42°C y se inactivó el enzima a 70°C durante 15 min. Como controles se llevaron a cabo las mismas reacciones bien sin retrotranscriptasa en la mezcla de reacción o sin RNA.

2.1.4.3. RT de precursores de miRNAs

El volumen de digestión con DNasa del que partíamos era grande por ello precipitamos el RNA con acetato de amonio 5 M y etanol al 100% y resuspendimos en 20 μ L de agua libre de RNasas. Para la retrotranscripción de precursores de miRNAs utilizamos la retrotranscriptasa termoestable *TermoScript* (Invitrogen) ya

Material y Métodos

que la reacción con *SuperScript* era improductiva, debido posiblemente a la formación de estructuras secundarias en el RNA durante la reacción. Añadimos 1 μL dNTPs 10 mM (Roche) y 1 μL del primer reverso 3R-25 hpr 10 μM a 50 μg de RNA y desnaturalizamos a 65°C durante 5 min. Los tubos se colocaron inmediatamente en hielo y se añadieron 6 μL del Mix (4 μL tampón 5X, 1 μL DTT 0.1 M, 1 μL *RNAseOUT* (Invitrogen)) a cada uno. Por último, se añadieron 2 U del enzima *TermoScript* (Invitrogen). Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción la mezcla se incubó durante 1 h a 65°C y se inactivó el enzima a 85°C durante 5 min. Como controles se llevaron a cabo las mismas reacciones sin retrotranscriptasa en la mezcla.

2.1.4.4. RT de miRNAs maduros

Para la síntesis de cDNA de miRNAs maduros utilizamos el kit *Taqman miRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). A partir de 40 ng de RNA total se realizó una retrotranscripción para cada miRNA con un cebador específico tipo *stem-loop RT primer* para cada gen en un volumen de 7.5 μL . Añadimos a 4 μL de RNA 3.5 μL del mix de reacción (0.075 μL dNTPs 100 mM, 0.75 μL tampón RT 10X, 0.1 μL inhibidor de RNasas, 0.5 μL MultiScribe, 0.95 μL agua libre de RNasas, 1.5 μL *stem-loop RT primer* específico). En un termociclador, incubamos durante 30 min a 16 °C, 30 min a 42 °C y 5 min a 85 °C para inactivar el enzima.

2.1.5. Transcripción *in vitro*

La transcripción *in vitro* se realizó a partir de la construcción pBlueScript-IR_{sp}-*mb1*. Linearizamos el vector digiriendo con el enzima de restricción *PstI*. La transcripción se realizó a partir del promotor T7 del vector utilizando el kit MEGAscript (Ambion). La mezcla de reacción consistió en: 1 μg del DNA molde linearizado, 2 μL de ATP, 2 μL de CTP, 2 μL de GTP, 2 μL de UTP, 2 μL de tampón 10X, 2 μL de T7 RNA polimerasa en un volumen total de 20 μL . Siguiendo las indicaciones del fabricante, incubamos la reacción a 37 °C durante 4 h. El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro (Eppendorf BioPhotometer) y se almacenó a -80°C.

2.1.6. Digestión con RNasa A

Para comprobar si la construcción IR_{sp}-*mb1* generaba una horquilla de doble cadena, realizamos digestiones con RNasa A. Este enzima, en condiciones de baja concentración de sal (0 a 100 mM) digiere RNA de doble cadena y de simple cadena, pero a una concentración igual o mayor de 0.3 M NaCl corta específicamente fragmentos de simple cadena (Ausubel *et al.* 2002). Diluimos 2 μg de RNA en tampón (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 300 mM) y lo dividimos en dos tubos, a uno le añadimos 1 μL de RNasa A (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y el otro lo

utilizamos de control negativo. Incubamos la reacción durante 1 h a temperatura ambiente y la cargamos en un gel de agarosa al 2%.

2.1.7. Clonación

2.1.7.1. Clonación de la construcción IR_{sp}-*muscleblind* en pUAST y pBlueScript

Mediante PCRs anidadas y solapantes generamos la construcción IR_{sp}-*muscleblind* con los extremos fosforilados (figura MM-2). Para la clonación en el vector pBlueScriptII insertamos la construcción en el sitio *EcoRV* mediante ligación de extremos romos, con el enzima T4 ligasa (Roche) a 16 °C toda la noche. Debido a la naturaleza de las construcciones IR_{sp}, el DNA forma estructuras secundarias y es inestable en las células competentes *XL-1 Blue* por lo que transformamos en células de la cepa SURE siguiendo las recomendaciones del fabricante (Stratagene). Para la subclonación en pUAST, digerimos con el enzima *BglIII* ambos vectores, purificamos el DNA y realizamos una reacción de ligación de extremos cohesivos a 4 °C durante toda la noche. En todos los casos se utilizaron células de la cepa SURE para propagar los vectores con las construcciones IR_{sp}.

2.1.7.2. Obtención de los transgenes UAS-*DsRed*-miRNA

La región codificante del gen *DsRed2* se subclonó del vector p*DsRed2* a pUAST utilizando los sitios de restricción *EcoRI* y *NotI*. Las regiones precursoras de miRNAs fueron generadas por síntesis química y clonadas en pUC57 por la empresa GeneScript (EEUU). Estas regiones se insertaron en la región 3'UTR del gen *DsRed2* en los sitios *NotI* y *XhoI* (Fig. MM-3) y aguas arriba del terminador de la transcripción del SV40 (STOP). Para la transformación y propagación de los transgenes UAS-*DsRed*-miRNA se utilizaron células de la cepa SURE.

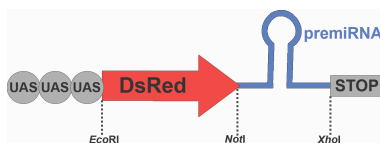


Figura MM-3. Transgén UAS-*DsRed*-miRNA

Esquema de la construcción generada para expresar miRNAs en *Drosophila*. La región precursora del miRNA de interés se insertó en la región 3'UTR del gen reportero *DsRed2*.

2.1.8. Detección de RNAs pequeños por *northern blot*

Electroforesis

Para la detección de RNAs pequeños mediante *northern blot* se analizaron entre 10 y 40 µg de RNA por muestra. A cada muestra de RNA total se le añadió tampón de carga tipo II para geles desnaturizantes 2X (Ambion) en cantidades iguales, a un volumen final de 20 µL. El RNA se desnaturizó durante 5 min a 70 °C y se dejó enfriar en hielo. Tras lo cual se cargó en un gel de poliacrilamida al 15 %

Material y Métodos

desnaturalizante (TBE 1X, Urea 7M, 15 % acrilamida:bisacrilamida (19:1)) que previamente había sido sometido a una corriente de 300 V (~25 mA/gel) durante 1 h. La electroforesis se llevó a cabo en TBE 1X a 180 V durante 1 hora.

Electrotransferencia

La inmovilización de los RNAs en membranas de nylon (Roche) se realizó por electrotransferencia en TBE 0.5 X a un corriente de 80 V durante 1 h y a 4 °C. Tras la transferencia la membrana se lavó con TBE 0.5 X y los RNAs se entrecruzaron a la membrana con luz UV a 1200 mJ.

Hibridación

Las membranas se prehibridaron en 10 mL de tampón de hibridación (Na_2HPO_4 0.36 M NaH_2PO_4 0.14 M, EDTA 1 mM, SDS 7 %, pH 7.2) durante 1 hora a la temperatura indicada en la tabla MM-12. La hibridación de las sondas se realizó durante toda la noche a la concentración y temperaturas indicadas en la tabla MM-12. Tras la hibridación las membranas se lavaron 2 veces en SSC 0.5 X con 0.1 % de SDS durante 30 min a la temperatura de hibridación.

Detección

Para la detección, las membranas se incubaron en tampón de bloqueo (1 % de Blocking reagent (Roche), ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5) durante 30 min a temperatura ambiente y durante una hora con el anticuerpo *anti-DIG-AP fab fragment* (Roche) a concentración 1:10000 en tampón de bloqueo. Tras la incubación del anticuerpo se lavaron las membranas 3 veces durante 15 min con tampón de lavado (ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M, Tween 20 al 0.3 %, pH 7.5) y 3 veces durante 5 min con tampón de detección (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH 9.5). Se añadió el reactivo *CDP-star ready to use* (Roche) y se la señal se detectó con el captador de imágenes *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare).

Desnudado de membranas

En aquellos casos en los cuales debíamos detectar un segundo RNA, desnudamos las membranas para eliminar la sonda de la primera detección. Para lo cual, introdujimos las membranas en SDS al 1% a 100 °C durante 10 min. Tras esta incubación lavamos las membranas en tampón de lavado y procedimos a la hibridación con la segunda sonda.

2.1.9. Detección de proteínas por *Western blot*

Electroforesis

Para la separación de proteínas por electroforesis usamos el sistema discontinuo de Laemmli (1970). Desnaturalizamos 40 µg de proteína total en tampón de carga 2X (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2 %, azul de bromofenol 0.1 %, β-mercaptoetanol 5 %, glicerol 10 %) hirviendo las muestras durante 5 min. En el

caso de las extracciones procedentes de cultivos celulares utilizamos 20 μ L de la extracción. Separamos las proteínas mediante electroforesis en geles SDS-PAGE discontinuos en el sistema *Mini-protean Electrophoresis System* (Bio-Rad) siguiendo las indicaciones de Bio-Rad. Las concentraciones de acrilamida que se emplearon en los geles fue distinta (del 8 al 15 %) dependiendo del tamaño de la proteína a detectar. Las electroforesis se realizaron a amperaje constante (10-12 mA/gel), durante 2 h y en tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0.1 %)

Electrotransferencia

La inmovilización de las proteínas en membranas PVDF (Roche) se realizó por electrotransferencia en el sistema *Mini-Trans blot* (Bio-Rad). La transferencia se realizó a un amperaje constante de 300 mA durante 1 hora y a 4°C en tampón de electroforesis (Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.0375 %).

Inmunodetección

Tras la electrotransferencia, las membranas se equilibraron en PBST (fosfato sódico 10 mM, NaCl 0.9 %, Tween 20 1 %) y se bloquearon durante 1 h en solución de bloqueo. Como solución de bloqueo se utilizó, generalmente, leche desnatada al 5 % en PBST excepto en la inmunodetección de las proteínas Muscleblind. En este caso usamos BSA al 3 % en PBST como solución de bloqueo. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4 °C. Las concentraciones de uso de cada anticuerpo se detallan en la tabla MM-17. Tras la incubación con el anticuerpo primario lavamos las membranas 3 veces con PBST durante 5 min. Para detectar por quimioluminiscencia utilizamos anticuerpos secundarios conjugados a la peroxidasa del rábano (HRP). Incubamos el anticuerpo secundario (tabla MM-18) durante una hora a temperatura ambiente y lavamos 3 veces con PBST durante 5 min. Todas las incubaciones se realizaron en agitación suave. Para la detección quimioluminiscente en películas *Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film* (Roche) se usó el sustrato *ECL Western blotting substrate* (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2. Métodos celulares

2.2.1. Condiciones de cultivo de fibroblastos y transdiferenciación

Los fibroblastos humanos se cultivaron en medio DMEM con 4.5 g/L de glucosa (Gibco) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Gibco) y estreptomomicina y 1 % de penicilina/estreptomomicina (Invitrogen) (medio completo). Las células se crecieron en botellas de 25 cm² y 75 cm² a 37 °C en una estufa con 5 % de CO₂.

Material y Métodos

Para inducir el programa de diferenciación miogénica, se cambió el medio completo por medio de diferenciación (DMEM suplementado con suero de caballo al 2 %, 1 % penicilina/estreptomicina, transferrina (100µg/ml), insulina (10 µg/mL; Sigma-Aldrich) y doxiciclina (2 µg/ml; Sigma-Aldrich)). La inducción del programa miogénico se produce por la expresión del gen MyoD de ratón bajo el sistema Tet-on, inducible por doxiciclina. Las células se recogieron a día 0 y día 10 de diferenciación.

2.2.2. Recuento de células

Para calcular el número de células en cultivo hicimos una dilución del cultivo 1:20 en medio completo. Introdujimos 10 µL de la dilución en una cámara de Neubauer (0.1 mm de profundidad y 0.0025 mm² de superficie) y contamos el número de células presentes en las 4 cuadrículas de los extremos en cada una de las 2 cámaras. La media del recuento de las 2 cámaras (\bar{N}) se multiplicó por el factor de dilución y el factor de la cámara para obtener el número de células por mililitro del cultivo ($n/\text{mL} = \bar{N} \times 5 \times 10^4$).

2.2.3. Congelación y descongelación de células

Las células se almacenaron congeladas en un tanque de N₂ líquido (Servicio de cultivos celulares, SCSIE, Universitat de València). Para la congelación, aproximadamente 10⁸ células se recogieron por centrifugación a 100 g durante 5 min. Resuspendimos las células en 10 mL de medio de congelación (medio completo y 10 % de DMSO). Tras lo cual se alicuotaron en crioviales de 1 mL y se introdujeron en un criocontenedor (Nalgene) con isopropanol. Tras almacenar el criocontenedor en un arcón de -80 °C durante toda la noche transferimos las células al tanque de N₂ líquido. El isopropanol proporciona una tasa de congelación constante de -1 °C/min. Al día siguiente, una alicuota se descongeló para comprobar la viabilidad del cultivo.

Para descongelar los cultivos, sacamos un vial del tanque de N₂ líquido y lo descongelamos parcialmente a temperatura ambiente. Pasamos las células a un frasco de 25 cm² y añadimos 5 mL de medio completo. A las 2 horas sustituimos el medio por medio completo para eliminar los restos de DMSO y las células inviables.

2.3. Métodos histológicos

2.3.1. Preparación de secciones semifinas de tórax

El área muscular de los músculos indirectos del vuelo se cuantificó a partir de imágenes de secciones semifinas de tórax. Para preparar estas secciones, anestesiábamos las moscas con CO₂ y se les eliminaron las patas, alas, cabeza y parte del abdomen con el fin de facilitar la penetración del fijador. Colocamos los tórax

en un tubo con 200 μL de la solución 1 ($\frac{1}{4}$ paraformaldehído 4 %, $\frac{1}{4}$ glutaraldehído 8 %, $\frac{1}{4}$ Na_2HPO_4 0.2 M y $\frac{1}{4}$ NaH_2PO_4 0.2 M) en hielo. A continuación, se añadieron 200 μL de la solución 2 (mezcla 1:1 solución 1 y tetraóxido de osmio) e incubamos 30 min en hielo. A continuación, sustituimos la mezcla por 200 μL de la solución 2 e incubamos en hielo durante 1-2 h. Tras la fijación, deshidratamos las muestras mediante pases de 5 min en etanol al 30 %, 50 % y 70 % en hielo, y al 90 % y 100 % (2X) a temperatura ambiente. A continuación, se llevaron a cabo dos pases de 10 min en óxido de propileno. Por último, las muestras se dejaron toda la noche en una mezcla 1:1 de óxido de propileno y resina epoxi. Al día siguiente, el líquido se sustituyó por resina epoxi pura, y ésta se dejó penetrar en las muestras durante al menos 4 h. Pasado este tiempo, las moscas fueron colocadas y orientadas en moldes con resina y se dejaron polimerizar toda la noche en un horno Pasteur a 70 °C. Tanto el tetraóxido de osmio como el óxido de propileno y la resina son extremadamente tóxicos por lo que se manipularon en campana de extracción de flujo en todo momento. Una vez polimerizada la resina, los bloques fueron tallados para dar a las muestras la orientación adecuada. Las muestras fueron cortadas con una cuchilla de diamante en secciones transversales de 1.5 μm en un ultramicrotomo REICHERT & JUNG modelo ULTRACUT E. Las secciones se colocaron en portas gelatinizados con una gota de medio de montaje DPX y se cubrieron con un cubreobjetos para su posterior observación al microscopio óptico. Las imágenes de músculo se tomaron a un aumento de 10 X en campo claro.

2.3.2. Análisis de la morfología de ojos de *Drosophila*

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

2.4. Selección de embriones por citometría de flujo

Para las extracciones de RNA de embriones para *Northern blot*, necesitábamos un número elevado de embriones. Por lo que la selección manual de los embriones

Material y Métodos

mutantes resultaba inviable. Por ello, utilizamos un citómetro de flujo adaptado para embriones de *Drosophila*. En concreto utilizamos el modelo *embryo sorter* COPAS *select* (Union biometrica) en la empresa Valentia Biopharma del parque científico de la Universitat de València. Este citómetro permite seleccionar embriones por su tamaño y por la fluorescencia que emiten.

Para poder seleccionar los embriones homocigotos para las deleciones en el *embryo sorter*, sustituimos el cromosoma equilibrador por uno que contiene la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo un promotor ubicuo (tabla MM-2).

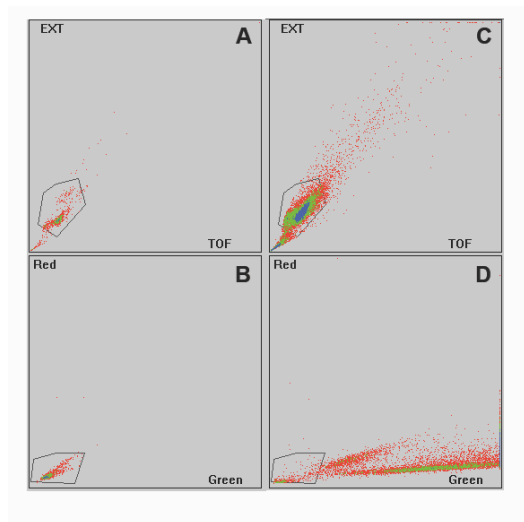


Figura MM-7. Selección de embriones por citometría de flujo.

Las gráficas representan los embriones que han pasado por el detector. En A y C se detecta el tamaño y en B y D la fluorescencia de embriones normales (A y B) y cepa con el cromosoma equilibrador (C y D). La línea gris representa la población seleccionada.

Dejamos las moscas depositando huevos a 25 °C durante 20 horas en un sistema de puesta. Se retiraron las placas y se incubaron 2 h a 25 °C para que se expresara la GFP en todos los embriones que portaban el cromosoma equilibrador. Transcurrido este tiempo, recogimos los embriones y los descorionizamos durante 3 min con lejía al 50 % y los separamos en el *embryo sorter*. La correcta separación se controló observando los embriones en una lupa de fluorescencia (Leica). Estos embriones se genotiparon para comprobar que eran portadores de la deleción.

Para determinar los parámetros de selección (tamaño y fluorescencia) se separaron en el *embryo sorter* embriones de una cepa silvestre (Fig. MM-4 A y B) y

se seleccionaron los valores de tamaño (A) y fluorescencia (B) como valores que debían cumplir aquellos embriones no portadores de cromosoma equilibrador para separar los embriones mutantes (C y D).

2.5. Análisis de la vida media de *Drosophila*

La vida de media de las moscas se analizó mediante curvas de supervivencia. Entre 100 y 150 moscas adultas recién emergidas de la pupa se recogieron por genotipo y se mantuvieron en comida estándar a 25 °C. Se cuantificó en número de moscas muertas diariamente y la comida se cambió cada 3 días. Las curvas de supervivencia se obtuvieron con el programa GraphPad usando el método de Kaplan-Meier (Kaplan y Meier 1958) y las diferencias entre las curvas se analizaron con el test de Mantel-Cox ($\alpha=0.05$).

2.6. Análisis de imágenes

2.6.1. Cuantificación de la expresión de miRNAs por densitometría

Para la cuantificación de miRNAs mediante *Northern blot* analizamos la intensidad de las bandas mediante el programa *ImageJ* (tabla MM-20). Utilizamos el capturador de imágenes *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare) para obtener una imagen digital de los *Northern blots*. El *software* de *ImageQuant* detecta la saturación de la señal, de modo que aquellas imágenes en las que la señal estaba saturada fueron desechadas para el análisis. Guardamos las imágenes como archivos *Tagged Image File Format* (TIFF) y las abrimos con el programa *ImageJ*. Para seleccionar las carreras realizamos un rectángulo lo más ajustado posible a la primera calle y la seleccionamos con los comandos: *Analyze/Gels/Select First Lane*. Desplazamos el rectángulo a la segunda calle y la seleccionamos con los comandos: *Analyze/Gels/Select Next Lane* y repetimos el proceso para todas las carreras (Fig. MM-5A). Para generar los perfiles de cada calle (Fig. MM-5B) utilizamos el comando: *Analyze/Gels/Plot Lanes*. El área de cada pico en estos perfiles es proporcional a la intensidad de las bandas. Para obtener el valor del área se seleccionaron los picos, uno a uno, con la varita mágica. Estos valores de área fueron utilizados como valores de expresión de cada miRNA. Para normalizar los datos los valores de expresión de los miRNAs se dividieron por la expresión del gen de referencia *U6 snRNA* detectada en las mismas membranas.

2.6.2. Cuantificación del área muscular de los músculos indirectos del vuelo (IFMs)

La imágenes se tomaron con un microscopio óptico Leica DM2500 con el objetivo 10X. Se examinaron al menos 5 imágenes por mosca y 10 moscas por genotipo. El análisis de las imágenes se realizó con el programa *ImageJ*. Seleccionamos un área de 450 x 720 píxeles correspondiente a la región en la que se encuentran los IFMs (Fig. MM-6 A y B). Binarizamos las imágenes mediante el

Material y Métodos

comando: *Process/Binary/Make binary* y eliminamos aquellas estructuras que no correspondían a IFMs (Fig. MM-7 A' y B'). Para obtener el porcentaje de área analizamos la imágenes (*Analyze/Measurement*) seleccionando la opción “*area fraction*”. Este porcentaje de área es una estima de la masa muscular de los IFMs de cada mosca. Las diferencias entre genotipos se analizaron con un test t-Student de 2 colas.

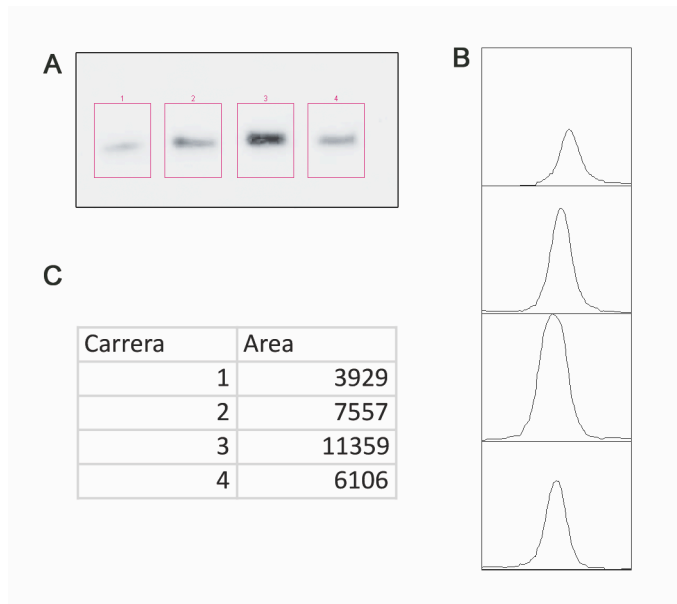


Figura MM-5. Análisis densitométrico de la señal de Northern blots.

Utilizamos el programa *ImageJ* para cuantificar la intensidad de la señal por densitometría. Seleccionamos las carreras a cuantificar en cada imagen TIFF (A) y obtenemos los perfiles densitométricos (B). El área de estos picos es proporcional a la intensidad de la señal y por lo tanto a la expresión de un miRNA en cada carrera (C).

2.7. Métodos bioinformáticos

2.7.1. Alineamiento de secuencias

Para la búsqueda de secuencias ortólogas de *muscleblind*, realizamos un *Blast* (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) contra la base de datos de nucleótidos de GenBank. En concreto, realizamos un *tblastx* en el que se realiza una búsqueda por identidad en una base de datos de nucleótidos traduciendo a sus seis ORFs posibles. Las secuencias resultantes del *Blast* se seleccionaron por especies taxonómicas y se alinearon utilizando el programa ClustalX utilizando una matriz de sustitución de bloques (BLOSUM62) y alineamientos múltiples. Los alineamientos fueron

editados con el programa Genedoc para mostrar la conservación de los nucleótidos y obtener las secuencias consenso.

En el caso de RNAs no codificantes, se realizó un alineamiento de secuencias nucleotídicas. En todos los casos se realizaron alineamientos múltiples con el programa ClustalX empleando la matriz IUB.

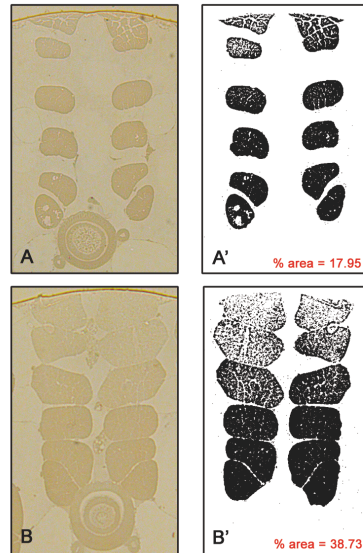


Figura MM-6. Análisis de imagen y cuantificación del área muscular de los IFMs.

En A y B se muestran dos ejemplos de imágenes de secciones transversales de tórax. A' y B' son el resultado de la binarización y la eliminación de las regiones que no corresponden a los IFMs. Se muestra el valor del área de A' y B'.

2.7.2. Búsqueda de dianas de miRNAs

Para analizar si las dianas de miRNAs alterados están afectadas en DM1, analizamos datos de expresión generados previamente en nuestro laboratorio a partir de micromatrices de exones (Human Exon 1.0 ST Array, Affymetrix) de 20 biopsias de pacientes y 15 controles. Seleccionamos los genes que presentaban diferencias de expresión de más de 10 veces filtrando los datos con el programa dChip. Por otro lado, utilizamos la aplicación web TargetScan para predecir las posibles dianas de los miRNAs de interés y filtramos los datos de expresión utilizando las predicciones de TargetScan con el programa dChip. Para de terminar si las dianas de los miRNAs seleccionados estaban aumentadas respecto al total de sucesos de expresión alterados utilizamos el test exacto de Fisher.

Apéndice

1. Código IUPAC para ácidos nucleicos y aminoácidos

Tabla A-1. Código de ácidos nucleicos

Código de ácido nucleico	Significado
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
U	Uracilo
R	G A (puRina)
Y	T C (pirimidina/pYrimidine)
K	G T (cetona/Ketone)
M	A C (grupo aMino)
S	G C (interacción fuerte/Strong interaction)
W	A T (interacción débil/Weak interaction)
B	G T C (no A) (B viene tras la A)
D	G A T (no C) (D viene tras la C)
H	A C T (no G) (H viene tras la G)
V	G C A (no T, no U) (V viene tras la U)
N	A G C T (cualquiera/aNy)
X	máscara
-	hueco (gap) de longitud indeterminada

Tabla A-2. Código de aminoácidos

Código de Aminoácido	Significado
A	Alanina
B	Ácido aspártico o Asparagina
C	Cisteína
D	Ácido aspártico
E	Ácido glutámico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
N	Asparagina
O	Pirrolisina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
U	Selenocisteína
V	Valina
W	Triptófano
Y	Tirosina
Z	Ácido glutámico o Glutamina
X	cualquiera
*	parada de traducción
-	hueco (<i>gap</i>) de longitud indeterminada

2. El sistema binario UAS/GAL4

El sistema UAS/GAL4 de expresión de transgenes en *Drosophila* permite la expresión ectópica de genes bajo un patrón de expresión determinado (Brand y Perrimon 1993). La proteína GAL4 es un factor de transcripción de *Saccharomyces cerevisiae* que activa la expresión de genes u otras secuencias de DNA que estén bajo el control de secuencias UAS (*Upstream Activation Sequences*). En *Drosophila* se ha empleado el reconocimiento de las secuencias UAS por la proteína GAL4 para generar este sistema binario de expresión. Por un lado, se genera una línea de moscas transgénicas que contiene 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*). 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 (Figura A-1). Al cruzar estas dos líneas de moscas se obtienen descendientes que contienen ambas construcciones (GAL4 y UAS). En estas moscas la proteína GAL4 se expresará según el patrón determinado por el *enhancer Z*. La 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.

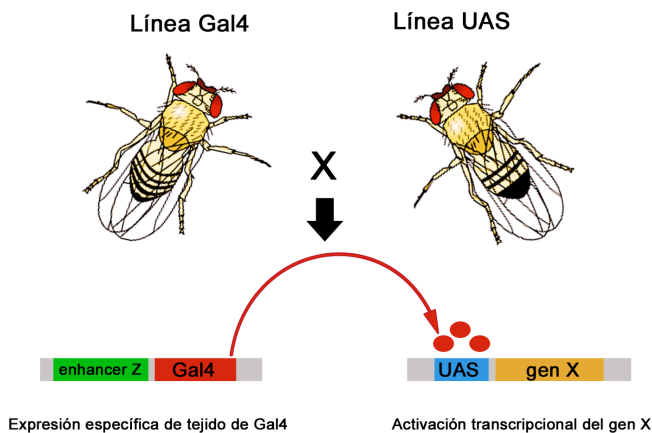


Figura A-1. Sistema de expresión UAS/GAL4.

La línea Gal4 expresa la proteína Gal4 bajo el patrón de expresión de una región reguladora determinada (*enhancer Z*). Cuando se cruzan una línea Gal4 con una línea UAS, el gen X se expresará en aquellas células en las que haya proteína GAL4. De manera que lo que se obtiene con este sistema es que el gen X se exprese en el patrón determinado por el *enhancer Z*.

Bibliografía

- ABRAMOFF M. D., MAGELHAES P. J. y RAM S. J. (2004). "Image Processing with ImageJ." *Biophotonics International* **11**(7): 36-42.
- ADERETH Y., DAMMAI V., KOSE N., LI R. y HSU T. (2005). "RNA-dependent integrin alpha3 protein localization regulated by the Muscleblind-like protein MLPI." *Nature Cell Biology* **7**(12): 1240-1247.
- ALWAZZAN M., NEWMAN E., HAMSHERE M. G. y 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**(8): 1491-1497.
- AMBROS V. (2004). "The functions of animal microRNAs." *Nature* **431**(7006): 350-355.
- ARAMBULA J. F., RAMISETTY S. R., BARANGER A. M. y ZIMMERMAN S. C. (2009). "A simple ligand that selectively targets CUG trinucleotide repeats and inhibits MBNL protein binding." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(38): 16068-16073.
- ARAVIN A. y TUSCHL T. (2005). "Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing." *FEBS Lett* **579**(26): 5830-5840.
- ARTERO R., PROKOP A., PARICIO N., BEGEMANN G., PUEYO I., MLODZIK M., PEREZ-ALONSO M. y BAYLIES M. K. (1998). "The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by *Dmef2*." *Developmental Biology* **195**(2): 131-143.
- ARZIMAN Z., HORN T. y BOUTROS M. (2005). "E-RNAi: a web application to design optimized RNAi constructs." *Nucleic Acids Research* **33**(Web Server issue): W582-588.
- AUSUBEL F. M., BRENT R., KINGSTON R. E., MOORE D. D., SEIDMAN J. G., SMITH J. A. y STRUHL K. (2002). "Current protocols in Molecular Biology." John & sons, Inc.
- BABIARZ J. E., RUBY J. G., WANG Y., BARTEL D. P. y BLELLOCH R. (2008). "Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs." *Genes Dev* **22**(20): 2773-2785.
- BAGGA S., BRACHT J., HUNTER S., MASSIRER K., HOLTZ J., EACHUS R. y PASQUINELLI A. E. (2005). "Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation." *Cell* **122**(4): 553-563.
- BARGIELA A., CERRO-HERREROS E., FERNANDEZ-COSTA J. M., VILCHEZ J. J., LLAMUSI B. y ARTERO R. (2015). "Increased autophagy and apoptosis contribute to muscle atrophy in a myotonic dystrophy type 1 *Drosophila* model." *Dis Model Mech* **8**(7): 679-690.
- BARTEL D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." *Cell* **136**(2): 215-233.
- BASKERVILLE S. y BARTEL D. P. (2005). "Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes." *RNA* **11**(3): 241-247.
- BATRA R., CHARIZANIS K., MANCHANDA M., MOHAN A., LI M., FINN D. J., GOODWIN M., ZHANG C., SOBCZAK K., THORNTON C. A. y SWANSON M. S. (2014). "Loss of MBNL leads to disruption of developmentally regulated alternative polyadenylation in RNA-mediated disease." *Mol Cell* **56**(2): 311-322.
- BATRA R., CHARIZANIS K. y SWANSON M. S. (2010). "Partners in crime: bidirectional transcription in unstable microsatellite disease." *Human Molecular Genetics* **19**(R1): R77-82.
- BEGEMANN G., PARICIO N., ARTERO R., KISS I., PEREZ-ALONSO M. y MLODZIK M. (1997). "muscleblind, a gene required for

Bibliografía

photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins." *Development* **124**(21): 4321-4331.

BEHM-ANSMANT I., REHWINKEL J. y IZAURRALDE E. (2006). "MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**: 523-530.

BENSON D. A., KARSCH-MIZRACHI I., LIPMAN D. J., OSTELL J. y SAYERS E. W. (2011). "GenBank." *Nucleic Acids Research* **39**(Database issue): D32-37.

BEREZIKOV E., CHUNG W. J., WILLIS J., CUPPEN E. y LAI E. C. (2007). "Mammalian mirtron genes." *Mol Cell* **28**(2): 328-336.

BERG J., JIANG H., THORNTON C. A. y CANNON S. C. (2004). "Truncated *CIC-1* mRNA in myotonic dystrophy exerts a dominant-negative effect on the *Cl* current." *Neurology* **63**(12): 2371-2375.

BERUL C. I., MAGUIRE C. T., ARONOVITZ M. J., GREENWOOD J., MILLER C., GEHRMANN J., HOUSMAN D., MENDELSON M. E. y REDDY S. (1999). "DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model." *J Clin Invest* **103**(4): R1-7.

BERUL C. I., MAGUIRE C. T., GEHRMANN J. y REDDY S. (2000). "Progressive atrioventricular conduction block in a mouse myotonic dystrophy model." *J Interv Card Electrophysiol* **4**(2): 351-358.

BOHNSACK M. T., CZAPLINSKI K. y GORLICH D. (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." *RNA* **10**(2): 185-191.

BORCHERT G. M., LANIER W. y DAVIDSON B. L. (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." *Nat Struct Mol Biol* **13**(12): 1097-1101.

BOUHOUB F., BOST M. y VIAL C. (2007). "[Steinert disease]." *Presse Med* **36**(6 Pt 2): 965-971.

BRADFORD M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal of Biochemistry* **72**: 248-254.

BRAIDA C., STEFANATOS R. K., ADAM B., MAHAJAN N., SMEETS H. J., NIEL F., GOIZET C., ARVEILER B., KOENIG M., LAGIER-TOURENNE C., MANDEL J. L., FABER C. G., DE DIE-SMULDERS C. E., SPAANS F. y MONCKTON D. G. (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**(8): 1399-1412.

BRAND A. H. y PERRIMON N. (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* **118**(2): 401-415.

BRENNECKE J., STARK A., RUSSELL R. B. y COHEN S. M. (2005). "Principles of microRNA-target recognition." *PLoS Biol* **3**(3): e85.

BRIZUELA B. J., ELFRING L., BALLARD J., TAMKUN J. W. y KENNISON J. A. (1994). "Genetic analysis of the brahma gene of *Drosophila melanogaster* and polytene chromosome subdivisions 72AB." *Genetics* **137**(3): 803-813.

BROOK J. D., MCCURRACH M. E., HARLEY H. G., BUCKLER A. J., CHURCH D., ABURATANI H., HUNTER K., STANTON V. P., THIRION J. P., HUDSON T. y 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**(2): 385.

- BROUWER J. R., HUGUET A., NICOLE A., MUNNICH A. y GOURDON G. (2013). "Transcriptionally Repressive Chromatin Remodelling and CpG Methylation in the Presence of Expanded CTG-Repeats at the *DM1 Locus*." *J Nucleic Acids* **2013**: 567435.
- BUXTON J., SHELBOURNE P., DAVIES J., JONES C., VAN TONGEREN T., ASLANIDIS C., DE JONG P., JANSEN G., ANVRET M., RILEY B. y ET AL. (1992). "Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy." *Nature* **355**(6360): 547-548.
- CAI X., HAGEDORN C. H. y CULLEN B. R. (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." *RNA* **10**(12): 1957-1966.
- CARPENTIER C., GHANEM D., FERNANDEZ-GOMEZ F. J., JUMEAU F., PHILIPPE J. V., FREYERMUTH F., LABUDECK A., EDDARKAOUI S., DHAENENS C. M., HOLT I., BEHM-ANSMANT I., MARMIER-GOURRIER N., BRANLANT C., CHARLET-BERGUERAND N., MARIE J., SCHRAEN-MASCHKE S., BUEE L., SERGEANT N. y CAILLET-BOUDIN M. L. (2014). "Tau exon 2 responsive elements deregulated in myotonic dystrophy type I are proximal to exon 2 and synergistically regulated by *MBNL1* and *MBNL2*." *Biochim Biophys Acta* **1842**(4): 654-664.
- CARTHEW R. W. y SONTHEIMER E. J. (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." *Cell* **136**(4): 642-655.
- CAZALLA D., XIE M. y STEITZ J. A. (2011). "A primate herpesvirus uses the integrator complex to generate viral microRNAs." *Mol Cell* **43**(6): 982-992.
- CHAMBERLAIN C. M. y RANUM L. P. (2012). "Mouse model of muscleblind-like 1 overexpression: skeletal muscle effects and therapeutic promise." *Hum Mol Genet* **21**(21): 4645-4654.
- CHARIZANIS K., LEE K. Y., BATRA R., GOODWIN M., ZHANG C., YUAN Y., SHIUE L., CLINE M., SCOTTI M. M., XIA G., KUMAR A., ASHIZAWA T., CLARK H. B., KIMURA T., TAKAHASHI M. P., FUJIMURA H., JINNAI K., YOSHIKAWA H., GOMES-PEREIRA M., GOURDON G., SAKAI N., NISHINO S., FOSTER T. C., ARES M., JR., DARNELL R. B. y SWANSON M. S. (2012). "Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy." *Neuron* **75**(3): 437-450.
- CHARLET B. N., SAVKUR R. S., SINGH G., PHILIPS A. V., GRICE E. A. y COOPER T. A. (2002). "Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing." *Mol Cell* **10**(1): 45-53.
- CHELOUFI S., DOS SANTOS C. O., CHONG M. M. y HANNON G. J. (2010). "A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis." *Nature* **465**(7298): 584-589.
- CHEN I. C., LIN H. Y., LEE G. C., KAO S. H., CHEN C. M., WU Y. R., HSIEH-LI H. M., SU M. T. y LEE-CHEN G. J. (2009). "Spinocerebellar ataxia type 8 larger triplet expansion alters histone modification and induces RNA foci." *BMC Mol Biol* **10**: 9.
- CHEN K. Y., PAN H., LIN M. J., LI Y. Y., WANG L. C., WU Y. C. y HSIAO K. M. (2007). "Length-dependent toxicity of untranslated CUG repeats on *Caenorhabditis elegans*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **352**(3): 774-779.
- CHEN Y. S. y QIU X. B. (2013). "Ubiquitin at the crossroad of cell death and survival." *Chin J Cancer* **32**(12): 640-647.
- CHENDRIMADA T. P., FINN K. J., JI X., BAILLAT D., GREGORY R. I., LIEBHABER S. A., PASQUINELLI A. E. y SHIEKHATTAR R. (2007). "MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6." *Nature* **447**(7146): 823-828.

Bibliografía

- CHENG A. M., BYROM M. W., SHELTON J. y FORD L. P. (2005). "Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis." *Nucleic Acids Res* **33**(4): 1290-1297.
- CHILDS-DISNEY J. L., STEPNIAK-KONIECZNA E., TRAN T., YILDIRIM I., PARK H., CHEN C. Z., HOSKINS J., SOUTHALL N., MARUGAN J. J., PATNAIK S., ZHENG W., AUSTIN C. P., SCHATZ G. C., SOBCZAK K., THORNTON C. A. y DISNEY M. D. (2013). "Induction and reversal of myotonic dystrophy type 1 pre-mRNA splicing defects by small molecules." *Nat Commun* **4**: 2044.
- CHO D. H., THIENES C. P., MAHONEY S. E., ANALAU E., FILIPPOVA G. N. y TAPSCOTT S. J. (2005). "Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF." *Mol Cell* **20**(3): 483-489.
- CHONG M. M., ZHANG G., CHELOUFI S., NEUBERT T. A., HANNON G. J. y LITTMAN D. R. (2010). "Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery." *Genes Dev* **24**(17): 1951-1960.
- CIFUENTES D., XUE H., TAYLOR D. W., PATNODE H., MISHIMA Y., CHELOUFI S., MA E., MANE S., HANNON G. J., LAWSON N. D., WOLFE S. A. y GIRALDEZ A. J. (2010). "A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity." *Science* **328**(5986): 1694-1698.
- COMIM C. M., MATHIA G. B., HOEPERS A., TUON L., KAPCZINSKI F., DALPIZZOL F., QUEVEDO J. y ROSA M. I. (2015). "Neurotrophins, cytokines, oxidative parameters and functionality in Progressive Muscular Dystrophies." *An Acad Bras Cienc* **87**(3): 1809-1818.
- DAUGHTERS R. S., TUTTLE D. L., GAO W., IKEDA Y., MOSELEY M. L., EBNER T. J., SWANSON M. S. y RANUM L. P. (2009). "RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8." *PLoS Genetics* **5**(8): e1000600.
- DAVIS B. M., MCCURRACH M. E., TANEJA K. L., SINGER R. H. y HOUSMAN D. E. (1997). "Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7388-7393.
- DE HARO M., AL-RAMAHI I., DE GOUYON B., UKANI L., ROSA A., FAUSTINO N. A., ASHIZAWA T., COOPER T. A. y BOTAS J. (2006). "MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy type 1." *Human Molecular Genetics* **15**(13): 2138-2145.
- DE MEZER M., WOJCIECHOWSKA M., NAPIERALA M., SOBCZAK K. y KRZYZOSIAK W. J. (2011). "Mutant CAG repeats of Huntingtin transcript fold into hairpins, form nuclear foci and are targets for RNA interference." *Nucleic Acids Res* **39**(9): 3852-3863.
- DEJESUS-HERNANDEZ M., MACKENZIE I. R., BOEVE B. F., BOXER A. L., BAKER M., RUTHERFORD N. J., NICHOLSON A. M., FINCH N. A., FLYNN H., ADAMSON J., KOURI N., WOJTAS A., SENGDY P., HSIUNG G. Y., KARYDAS A., SEELEY W. W., JOSEPHS K. A., COPPOLA G., GESCHWIND D. H., WSZOLEK Z. K., FELDMAN H., KNOPMAN D. S., PETERSEN R. C., MILLER B. L., DICKSON D. W., BOYLAN K. B., GRAFF-RADFORD N. R. y RADEMAKERS R. (2011). "Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS." *Neuron* **72**(2): 245-256.
- DENIS J. A., GAUTHIER M., RACHDI L., AUBERT S., GIRAUD-TRIBOULT K., POYDENOT P., BENCHOUA A., CHAMPON B., MAURY Y., BALDESCHI C., SCHARFMANN R., PIETU G., PESCHANSKI M. y MARTINAT C. (2013). "mTOR-dependent proliferation defect in

human ES-derived neural stem cells affected by myotonic dystrophy type 1." *J Cell Sci* **126**(Pt 8): 1763-1772.

DENLI A. M., TOPS B. B., PLASTERK R. H., KETTING R. F. y HANNON G. J. (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." *Nature* **432**(7014): 231-235.

DHAENENS C. M., SCHRAEN-MASCHKE S., TRAN H., VINGTDEUX V., GHANEM D., LEROY O., DELPLANQUE J., VANBRUSSEL E., DELACOURTE A., VERMERSCH P., MAURAGE C. A., GRUFFAT H., SERGEANT A., MAHADEVAN M. S., ISHIURA S., BUEE L., COOPER T. A., CAILLET-BOUDIN M. L., CHARLET-BERGUERAND N., SABLONNIERE B. y SERGEANT N. (2008). "Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of Tau in the DM1 brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats." *Exp Neurol* **210**(2): 467-478.

DIETZL G., CHEN D., SCHNORRER F., SU K. C., BARINOVA Y., FELLNER M., GASSER B., KINSEY K., OPPEL S., SCHEIBLAUER S., COUTO A., MARRA V., KELEMAN K. y DICKSON B. J. (2007). "A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*." *Nature* **448**(7150): 151-156.

DJURANOVIC S., ZINCENKO M. K., HUR J. K., NAHVI A., BRUNELLE J. L., ROGERS E. J. y GREEN R. (2010). "Allosteric regulation of Argonaute proteins by miRNAs." *Nat Struct Mol Biol* **17**(2): 144-150.

DOENCH J. G. y SHARP P. A. (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." *Genes Dev* **18**(5): 504-511.

DU H., CLINE M. S., OSBORNE R. J., TUTTLE D. L., CLARK T. A., DONOHUE J. P., HALL M. P., SHIUE L., SWANSON M. S., THORNTON C. A. y ARES M., JR. (2010). "Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse

models of myotonic dystrophy." *Nature Structural & Molecular Biology* **17**(2): 187-193.

EBRALIDZE A., WANG Y., PETKOVA V., EBRALIDSE K. y JUNGHANS R. P. (2004). "RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy." *Science* **303**(5656): 383-387.

ECHEVERRIA G. V. y COOPER T. A. (2012). "RNA-binding proteins in microsatellite expansion disorders: mediators of RNA toxicity." *Brain Res* **1462**: 100-111.

EISEN M. B., SPELLMAN P. T., BROWN P. O. y BOTSTEIN D. (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14863-14868.

EISENBERG I., ERAN A., NISHINO I., MOGGIO M., LAMPERTI C., AMATO A. A., LIDOV H. G., KANG P. B., NORTH K. N., MITRANI-ROSENBAUM S., FLANIGAN K. M., NEELY L. A., WHITNEY D., BEGGS A. H., KOHANE I. S. y KUNKEL L. M. (2007). "Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(43): 17016-17021.

ENDER C., KREK A., FRIEDLANDER M. R., BEITZINGER M., WEINMANN L., CHEN W., PFEFFER S., RAJEWSKY N. y MEISTER G. (2008). "A human snoRNA with microRNA-like functions." *Mol Cell* **32**(4): 519-528.

ERIKSSON M., ANSVED T., EDSTROM L., ANVRET M. y CAREY N. (1999). "Simultaneous analysis of expression of the three myotonic dystrophy locus genes in adult skeletal muscle samples: the CTG expansion correlates inversely with DMPK and 59 expression levels, but not DMAHP levels." *Hum Mol Genet* **8**(6): 1053-1060.

EULALIO A., BEHM-ANSMANT I. y IZAURRALDE E. (2007). "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(1): 9-22.

- FAGHIHI M. A. y WAHLESTEDT C. (2009). "Regulatory roles of natural antisense transcripts." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(9): 637-643.
- FARDAEI M., ROGERS M. T., THORPE H. M., LARKIN K., HAMSHERE M. G., HARPER P. S. y BROOK J. D. (2002). "Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells." *Human Molecular Genetics* **11**(7): 805-814.
- FERNANDES J. M., KINGHORN J. R. y JOHNSTON I. A. (2007). "Characterization of two paralogous muscleblind-like genes from the tiger pufferfish (*Takifugu rubripes*)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **146**(2): 180-186.
- FERNANDEZ-COSTA J. M. y ARTERO R. (2010). "A conserved motif controls nuclear localization of *Drosophila* Muscleblind." *Molecules and Cells* **30**(1): 65-70.
- FERNANDEZ-COSTA J. M., LLAMUSI M. B., GARCIA-LOPEZ A. y ARTERO R. (2011). "Alternative splicing regulation by Muscleblind proteins: from development to disease." *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*.
- FILIPOWICZ W., BHATTACHARYYA S. N. y SONENBERG N. (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" *Nat Rev Genet* **9**(2): 102-114.
- FLICEK P., AMODE M. R., BARRELL D., BEAL K., BRENT S., CHEN Y., CLAPHAM P., COATES G., FAIRLEY S., FITZGERALD S., GORDON L., HENDRIX M., HOURLIER T., JOHNSON N., KAHARI A., KEEFE D., KEENAN S., KINSELLA R., KOKOCINSKI F., KULESHA E., LARSSON P., LONGDEN I., MCLAREN W., OVERDUIN B., PRITCHARD B., RIAT H. S., RIOS D., RITCHIE G. R., RUFFIER M., SCHUSTER M., SOBRAL D., SPUDICH G., TANG Y. A., TREVANION S., VANDROVCOVA J., VILELLA A. J., WHITE S., WILDER S. P., ZADISSA A., ZAMORA J., AKEN B. L., BIRNEY E., CUNNINGHAM F., DUNHAM I., DURBIN R., FERNANDEZ-SUAREZ X. M., HERRERO J., HUBBARD T. J., PARKER A., PROCTOR G., VOGEL J. y SEARLE S. M. (2011). "Ensembl 2011." *Nucleic Acids Research* **39**(Database issue): D800-806.
- FOFF E. P. y MAHADEVAN M. S. (2011). "Therapeutics development in myotonic dystrophy type 1." *Muscle Nerve* **44**(2): 160-169.
- FORSTEMANN K., TOMARI Y., DU T., VAGIN V. V., DENLI A. M., BRATU D. P., KLATTENHOFF C., THEURKAUF W. E. y ZAMORE P. D. (2005). "Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein." *PLoS Biol* **3**(7): e236.
- FRIEDLANDER M. R., CHEN W., ADAMIDI C., MAASKOLA J., EINSPANIER R., KNESPEL S. y RAJEWSKY N. (2008). "Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep." *Nat Biotechnol* **26**(4): 407-415.
- FU Y. H., FRIEDMAN D. L., RICHARDS S., PEARLMAN J. A., GIBBS R. A., PIZZUTI A., ASHIZAWA T., PERRYMAN M. B., SCARLATO G., FENWICK R. G., JR. y ET AL. (1993). "Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy." *Science* **260**(5105): 235-238.
- FU Y. H., PIZZUTI A., FENWICK R. G., JR., KING J., RAJNARAYAN S., DUNNE P. W., DUBEL J., NASSER G. A., ASHIZAWA T., DE JONG P. y ET AL. (1992). "An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy." *Science* **255**(5049): 1256-1258.
- FUGIER C., KLEIN A. F., HAMMER C., VASSILOPOULOS S., IVARSSON Y., TOUSSAINT A., TOSCH V., VIGNAUD A., FERRY A., MESSADDEQ N., KOKUNAI Y., TSUBURAYA R., DE LA GRANGE P.,

- DEMBELE D., FRANCOIS V., PRECIGOUT G., BOULADE-LADAME C., HUMMEL M. C., LOPEZ DE MUNAIN A., SERGEANT N., LAQUERRIERE A., THIBAUT C., DERYKERE F., AUBOEU F., GARCIA L., ZIMMERMANN P., UDD B., SCHOSER B., TAKAHASHI M. P., NISHINO I., BASSEZ G., LAPORTE J., FURLING D. y CHARLET-BERGUERAND N. (2011). "Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy." *Nat Med* **17**(6): 720-725.
- FUKUNAGA R., HAN B. W., HUNG J. H., XU J., WENG Z. y ZAMORE P. D. (2012). "Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals." *Cell* **151**(3): 533-546.
- GAGNON C., NOREAU L., MOXLEY R. T., LABERGE L., JEAN S., RICHER L., PERRON M., VEILLETTE S. y MATHIEU J. (2007). "Towards an integrative approach to the management of myotonic dystrophy type 1." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **78**(8): 800-806.
- GAMBARDELLA S., RINALDI F., LEPORE S. M., VIOLA A., LORO E., ANGELINI C., VERGANI L., NOVELLI G. y BOTTA A. (2010). "Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients." *J Transl Med* **8**: 48.
- GARCIA-ALCOVER I., COLONQUES-BELLMUNT J., GARIJO R., TORMO J. R., ARTERO R., ALVAREZ-ABRIL M. C., LOPEZ CASTEL A. y PEREZ-ALONSO M. (2014). "Development of a *Drosophila melanogaster* spliceosensor system for in vivo high-throughput screening in myotonic dystrophy type 1." *Dis Model Mech* **7**(11): 1297-1306.
- GARCIA-CASADO M. Z., ARTERO R. D., PARICIO N., TEROL J. y PEREZ-ALONSO M. (2002). "Generation of GAL4-responsive muscleblind constructs." *Genesis* **34**: 111-114.
- GARCIA-LOPEZ A., LLAMUSI B., ORZAEZ M., PEREZ-PAYA E. y ARTERO R. D. (2011). "In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(29): 11866-11871.
- GARCIA-LOPEZ A., MONFERRER L., GARCIA-ALCOVER I., VICENTE-CRESPO M., ALVAREZ-ABRIL M. C. y ARTERO R. D. (2008). "Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*." *PLoS ONE* **3**(2): e1595.
- GAREISS P. C., SOBCZAK K., MCNAUGHTON B. R., PALDE P. B., THORNTON C. A. y 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)." *Journal of the American Chemical Society* **130**(48): 16254-16261.
- GATES D. P., COONROD L. A. y BERGLUND J. A. (2011). "Autoregulated splicing of muscleblind-like 1 (MBNL1) Pre-mRNA." *J Biol Chem* **286**(39): 34224-34233.
- GEHRKE S., IMAI Y., SOKOL N. y LU B. (2010). "Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression." *Nature* **466**(7306): 637-641.
- GIORDANO E., RENDINA R., PELUSO I. y FURIA M. (2002). "RNAi triggered by symmetrically transcribed transgenes in *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **160**(2): 637-648.
- GIRALDEZ A. J., MISHIMA Y., RIHEL J., GROCOCK R. J., VAN DONGEN S., INOUE K., ENRIGHT A. J. y SCHIER A. F. (2006). "Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs." *Science* **312**(5770): 75-79.
- GOERS E. S., PURCELL J., VOELKER R. B., GATES D. P. y BERGLUND J. A. (2010). "MBNL1 binds GC motifs embedded in pyrimidines to regulate alternative splicing." *Nucleic Acids Research* **38**(7): 2467-2484.

Bibliografía

- GOERS E. S., VOELKER R. B., GATES D. P. y BERGLUND J. A. (2008). "RNA binding specificity of *Drosophila* muscleblind." *Biochemistry* **47**(27): 7284-7294.
- GOODWIN M., MOHAN A., BATRA R., LEE K. Y., CHARIZANIS K., GOMEZ F. J., EDDARKAOUI S., SERGEANT N., BUEE L., KIMURA T., CLARK H. B., DALTON J., TAKAMURA K., WEYN-VANHENTENRYCK S. M., ZHANG C., REID T., RANUM L. P., DAY J. W. y SWANSON M. S. (2015). "MBNL Sequestration by Toxic RNAs and RNA Misprocessing in the Myotonic Dystrophy Brain." *Cell Rep* **12**(7): 1159-1168.
- GREGORY R. I., CHENDRIMADA T. P., COOCH N. y SHIEKHATTAR R. (2005). "Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing." *Cell* **123**(4): 631-640.
- GREGORY R. I., YAN K. P., AMUTHAN G., CHENDRIMADA T., DORATOTAJ B., COOCH N. y SHIEKHATTAR R. (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." *Nature* **432**(7014): 235-240.
- GRIMSON A., FARH K. K., JOHNSTON W. K., GARRETT-ENGELE P., LIM L. P. y BARTEL D. P. (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." *Mol Cell* **27**(1): 91-105.
- GUO H., INGOLIA N. T., WEISSMAN J. S. y BARTEL D. P. (2010). "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." *Nature* **466**(7308): 835-840.
- HA T. Y. (2011). "MicroRNAs in Human Diseases: From Cancer to Cardiovascular Disease." *Immune Netw* **11**(3): 135-154.
- HAMMOND S. M., BOETTCHER S., CAUDY A. A., KOBAYASHI R. y HANNON G. J. (2001). "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi." *Science* **293**(5532): 1146-1150.
- HAN J., LEE Y., YEOM K. H., KIM Y. K., JIN H. y KIM V. N. (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." *Genes Dev* **18**(24): 3016-3027.
- HAO M., AKRAMI K., WEI K., DE DIEGO C., CHE N., KU J. H., TIDBALL J., GRAVES M. C., SHIEH P. B. y CHEN F. (2008). "Muscleblind-like 2 (*Mbnl2*) -deficient mice as a model for myotonic dystrophy." *Developmental Dynamics* **237**(2): 403-410.
- HARLEY H. G., BROOK J. D., RUNDLE S. A., CROW S., REARDON W., BUCKLER A. J., HARPER P. S., HOUSMAN D. E. y SHAW D. J. (1992). "Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy." *Nature* **355**(6360): 545-546.
- HARPER P. (2001). "Myotonic dystrophy." Saunders.
- HARPER P. S., HARLEY H. G., REARDON W. y SHAW D. J. (1992). "Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem." *Am J Hum Genet* **51**(1): 10-16.
- HEBERT S. S. y DE STROOPER B. (2009). "Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease." *Trends Neurosci* **32**(4): 199-206.
- HO T. H., CHARLET B. N., POULOS M. G., SINGH G., SWANSON M. S. y COOPER T. A. (2004). "Muscleblind proteins regulate alternative splicing." *EMBO Journal* **23**(15): 3103-3112.
- HOFACKER I. L. (2009). "RNA secondary structure analysis using the Vienna RNA package." *Current Protocols in Bioinformatics* **Chapter 12**: Unit12 12.
- HSU R. J., HSIAO K. M., LIN M. J., LI C. Y., WANG L. C., CHEN L. K. y PAN H. (2011). "Long tract of untranslated CAG repeats is deleterious in transgenic mice." *PLoS ONE* **6**(1): e16417.
- HUGUET A., MEDJA F., NICOLE A., VIGNAUD A., GUIRAUD-DOGAN C., FERRY A., DECOSTRE V., HOGREL J. Y.,

- METZGER F., HOEFLICH A., BARAIBAR M., GOMES-PEREIRA M., PUYMIRAT J., BASSEZ G., FURLING D., MUNNICH A. y GOURDON G. (2012). "Molecular, physiological, and motor performance defects in DMSXL mice carrying >1,000 CTG repeats from the human DMI locus." *PLoS Genet* **8**(11): e1003043.
- HUMPHREYS D. T., WESTMAN B. J., MARTIN D. I. y PREISS T. (2005). "MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(47): 16961-16966.
- HUTVAGNER G., MCLACHLAN J., PASQUINELLI A. E., BALINT E., TUSCHL T. y ZAMORE P. D. (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." *Science* **293**(5531): 834-838.
- IAKOVA P., WANG G. L., TIMCHENKO L., MICHALAK M., PEREIRA-SMITH O. M., SMITH J. R. y TIMCHENKO N. A. (2004). "Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate." *EMBO J* **23**(2): 406-417.
- IORIO M. V. y CROCE C. M. (2012). "microRNA involvement in human cancer." *Carcinogenesis* **33**(6): 1126-1133.
- JANSEN G., GROENEN P. J., BACHNER D., JAP P. H., COERWINKEL M., OERLEMANS F., VAN DEN BROEK W., GOHLSCH B., PETTE D., PLOMP J. J., MOLENAAR P. C., NEDERHOFF M. G., VAN ECHELD C. J., DEKKER M., BERNS A., HAMEISTER H. y WIERINGA B. (1996). "Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice." *Nat Genet* **13**(3): 316-324.
- JIANG H., MANKODI A., SWANSON M. S., MOXLEY R. T. y 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**(24): 3079-3088.
- KALSOTRA A., SINGH R. K., GURHA P., WARD A. J., CREIGHTON C. J. y COOPER T. A. (2014). "The Mef2 transcription network is disrupted in myotonic dystrophy heart tissue, dramatically altering miRNA and mRNA expression." *Cell Rep* **6**(2): 336-345.
- KALSOTRA A., XIAO X., WARD A. J., CASTLE J. C., JOHNSON J. M., BURGE C. B. y COOPER T. A. (2008). "A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(51): 20333-20338.
- KANADIA R. N., JOHNSTONE K. A., MANKODI A., LUNGU C., THORNTON C. A., ESSON D., TIMMERS A. M., HAUSWIRTH W. W. y SWANSON M. S. (2003). "A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy." *Science* **302**(5652): 1978-1980.
- KANADIA R. N., SHIN J., YUAN Y., BEATTIE S. G., WHEELER T. M., THORNTON C. A. y SWANSON M. S. (2006). "Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(31): 11748-11753.
- KAPLAN E. L. y MEIER P. (1958). "Nonparametric Estimation from Incomplete Observations." *Journal of the American Statistical Association* **53**(282): 457-481.
- KARAGIANNIDES I., THOMOU T., TCHKONIA T., PIRTSKHALAVA T., KYPREOS K. E., CARTWRIGHT A., DALAGIORGOU G., LASH T. L., FARMER S. R., TIMCHENKO N. A. y KIRKLAND J. L. (2006). "Increased CUG triplet repeat-binding protein-1 predisposes to impaired adipogenesis with aging." *J Biol Chem* **281**(32): 23025-23033.
- KARR J., VAGIN V., CHEN K., GANESAN S., OLENKINA O., GVOZDEV V. y

Bibliografia

- FEATHERSTONE D. E. (2009). "Regulation of glutamate receptor subunit availability by microRNAs." *Journal of Cell Biology* **185**(4): 685-697.
- KATAYAMA S., TOMARU Y., KASUKAWA T., WAKI K., NAKANISHI M., NAKAMURA M., NISHIDA H., YAP C. C., SUZUKI M., KAWAI J., SUZUKI H., CARNINCI P., HAYASHIZAKI Y., WELLS C., FRITH M., RAVASI T., PANG K. C., HALLINAN J., MATTICK J., HUME D. A., LIPOVICH L., BATALOV S., ENGSTROM P. G., MIZUNO Y., FAGHIHI M. A., SANDELIN A., CHALK A. M., MOTTAGUITABAR S., LIANG Z., LENHARD B., WAHLESTEDT C., GROUP R. G. E. R., GENOME SCIENCE G. y CONSORTIUM F. (2005). "Antisense transcription in the mammalian transcriptome." *Science* **309**(5740): 1564-1566.
- KENT W. J., SUGNET C. W., FUREY T. S., ROSKIN K. M., PRINGLE T. H., ZAHLER A. M. y HAUSSLER D. (2002). "The human genome browser at UCSC." *Genome Research* **12**(6): 996-1006.
- KIM D. H., LANGLOIS M. A., LEE K. B., RIGGS A. D., PUYMIRAT J. y 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**(12): 3866-3874.
- KIM Y. K., MANDAL M., YADAVA R. S., PAILLARD L. y MAHADEVAN M. S. (2014). "Evaluating the effects of CELF1 deficiency in a mouse model of RNA toxicity." *Hum Mol Genet* **23**(2): 293-302.
- KIMURA T., LUECK J. D., HARVEY P. J., PACE S. M., IKEMOTO N., CASAROTTO M. G., DIRKSEN R. T. y DULHUNTY A. F. (2009). "Alternative splicing of RyR1 alters the efficacy of skeletal EC coupling." *Cell Calcium* **45**(3): 264-274.
- KIMURA T., NAKAMORI M., LUECK J. D., POULIQUIN P., AOIKE F., FUJIMURA H., DIRKSEN R. T., TAKAHASHI M. P., DULHUNTY A. F. y SAKODA S. (2005). "Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1." *Hum Mol Genet* **14**(15): 2189-2200.
- KINO Y., MORI D., OMA Y., TAKESHITA Y., SASAGAWA N. y ISHIURA S. (2004). "Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats." *Hum Mol Genet* **13**(5): 495-507.
- KINO Y., WASHIZU C., KUROSAWA M., OMA Y., HATTORI N., ISHIURA S. y NUKINA N. (2015). "Nuclear localization of MBNL1: splicing-mediated autoregulation and repression of repeat-derived aberrant proteins." *Hum Mol Genet* **24**(3): 740-756.
- KINO Y., WASHIZU C., OMA Y., ONISHI H., NEZU Y., SASAGAWA N., NUKINA N. y ISHIURA S. (2009). "MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1." *Nucleic Acids Research*.
- KOZOMARA A. y GRIFFITHS-JONES S. (2011). "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." *Nucleic Acids Research* **39**(Database issue): D152-157.
- KROL J., FISZER A., MYKOWSKA A., SOBCZAK K., DE MEZER M. y KRZYZOSIAK W. J. (2007). "Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets." *Mol Cell* **25**(4): 575-586.
- KUMAR A., KUMAR V., SINGH S. K., MUTHUSWAMY S. y AGARWAL S. (2014). "Imbalanced oxidant and antioxidant ratio in myotonic dystrophy type 1." *Free Radic Res* **48**(4): 503-510.
- KUYUMCU-MARTINEZ N. M., WANG G. S. y COOPER T. A. (2007). "Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation." *Molecular Cell* **28**(1): 68-78.

- LADEWIG E., OKAMURA K., FLYNT A. S., WESTHOLM J. O. y LAI E. C. (2012). "Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data." *Genome Res* **22**(9): 1634-1645.
- LAEMMLI U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- LAI E. C. (2002). "Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation." *Nat Genet* **30**(4): 363-364.
- LARKIN M. A., BLACKSHIELDS G., BROWN N. P., CHENNA R., MCGETTIGAN P. A., MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I. M., WILM A., LOPEZ R., THOMPSON J. D., GIBSON T. J. y HIGGINS D. G. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948.
- LATRONICO M. V. y CONDORELLI G. (2009). "MicroRNAs and cardiac pathology." *Nat Rev Cardiol* **6**(6): 419-429.
- LAWLOR K. T., O'KEEFE L. V., SAMARAWEEERA S. E., VAN EYK C. L., MCLEOD C. J., MALONEY C. A., DANG T. H., SUTER C. M. y RICHARDS R. I. (2011). "Double-stranded RNA is pathogenic in *Drosophila* models of expanded repeat neurodegenerative diseases." *Hum Mol Genet* **20**(19): 3757-3768.
- LAWLOR K. T., O'KEEFE L. V., SAMARAWEEERA S. E., VAN EYK C. L. y RICHARDS R. I. (2012). "Ubiquitous expression of CUG or CAG trinucleotide repeat RNA causes common morphological defects in a *Drosophila* model of RNA-mediated pathology." *PLoS ONE* **7**(6): e38516.
- LEE E., MARCUCCI M., DANIELL L., PYPART M., WEISZ O. A., OCHOA G. C., FARSAK K., WENK M. R. y DE CAMILLI P. (2002a). "Amphiphysin 2 (*Bin1*) and T-tubule biogenesis in muscle." *Science* **297**(5584): 1193-1196.
- LEE H. Y. y DOUDNA J. A. (2012). "TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro." *RNA* **18**(11): 2012-2019.
- LEE J. E., LEE J. Y., WILUSZ J., TIAN B. y WILUSZ C. J. (2010a). "Systematic analysis of cis-elements in unstable mRNAs demonstrates that CUGBP1 is a key regulator of mRNA decay in muscle cells." *PLoS ONE* **5**(6): e11201.
- LEE L. W., ZHANG S., ETHERIDGE A., MA L., MARTIN D., GALAS D. y WANG K. (2010b). "Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing." *RNA* **16**(11): 2170-2180.
- LEE M. M., PUSHECHNIKOV A. y DISNEY M. D. (2009). "Rational and modular design of potent ligands targeting the RNA that causes myotonic dystrophy 2." *ACS Chem Biol* **4**(5): 345-355.
- LEE S. T., CHU K., IM W. S., YOON H. J., IM J. Y., PARK J. E., PARK K. H., JUNG K. H., LEE S. K., KIM M. y ROH J. K. (2011). "Altered microRNA regulation in Huntington's disease models." *Exp Neurol* **227**(1): 172-179.
- LEE Y., AHN C., HAN J., CHOI H., KIM J., YIM J., LEE J., PROVOST P., RADMARK O., KIM S. y KIM V. N. (2003). "The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing." *Nature* **425**(6956): 415-419.
- LEE Y., HUR I., PARK S. Y., KIM Y. K., SUH M. R. y KIM V. N. (2006). "The role of PACT in the RNA silencing pathway." *EMBO J* **25**(3): 522-532.
- LEE Y., JEON K., LEE J. T., KIM S. y KIM V. N. (2002b). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." *EMBO J* **21**(17): 4663-4670.
- LEE Y., KIM M., HAN J., YEOM K. H., LEE S., BAEK S. H. y KIM V. N. (2004a). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." *EMBO J* **23**(20): 4051-4060.

Bibliografía

- LEE Y. S., NAKAHARA K., PHAM J. W., KIM K., HE Z., SONTHEIMER E. J. y CARTHEW R. W. (2004b). "Distinct roles for *Drosophila* *Dicer-1* and *Dicer-2* in the siRNA/miRNA silencing pathways." *Cell* **117**(1): 69-81.
- LEWIS B. P., BURGE C. B. y BARTEL D. P. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." *Cell* **120**(1): 15-20.
- LEWIS B. P., SHIH I. H., JONES-RHOADES M. W., BARTEL D. P. y BURGE C. B. (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." *Cell* **115**(7): 787-798.
- LI C. y WONG W. H. (2001). "Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1): 31-36.
- LI L. B., YU Z., TENG X. y BONINI N. M. (2008). "RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*." *Nature* **453**(7198): 1107-1111.
- LIM L. P., LAU N. C., GARRETT-ENGELE P., GRIMSON A., SCHELTER J. M., CASTLE J., BARTEL D. P., LINSLEY P. S. y JOHNSON J. M. (2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." *Nature* **433**(7027): 769-773.
- LIN X., MILLER J. W., MANKODI A., KANADIA R. N., YUAN Y., MOXLEY R. T., SWANSON M. S. y THORNTON C. A. (2006). "Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy." *Human Molecular Genetics* **15**(13): 2087-2097.
- LIQUORI C. L., RICKER K., MOSELEY M. L., JACOBSEN J. F., KRESS W., NAYLOR S. L., DAY J. W. y RANUM L. P. (2001). "Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9." *Science* **293**(5531): 864-867.
- LIU Y. F., LIU H. Y., TU L. C., LIN C. W., HSIAO K. M. y PAN H. (2008). "Zebrafish muscleblind-like genes: identification, structural features and expression." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **151**(1): 118-124.
- LIVAK K. J. y SCHMITTGEN T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- LLAGOSTERA E., CATALUCCI D., MARTI L., LIESA M., CAMPS M., CIARALDI T. P., KONDO R., REDDY S., DILLMANN W. H., PALACIN M., ZORZANO A., RUIZ-LOZANO P., GOMIS R. y KALIMAN P. (2007). "Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action." *PLoS ONE* **2**(11): e1134.
- LLAMUSI B., BARGIELA A., FERNANDEZ-COSTA J. M., GARCIA-LOPEZ A., KLIMA R., FEIGUIN F. y ARTERO R. (2013). "Muscleblind, BSF and TBPH are mislocalized in the muscle sarcomere of a *Drosophila* myotonic dystrophy model." *Dis Model Mech* **6**(1): 184-196.
- LONDIN E., LOHER P., TELONIS A. G., QUANN K., CLARK P., JING Y., HATZIMICHAEL E., KIRINO Y., HONDA S., LALLY M., RAMRATNAM B., COMSTOCK C. E., KNUDSEN K. E., GOMELLA L., SPAETH G. L., HARK L., KATZ L. J., WITKIEWICZ A., ROSTAMI A., JIMENEZ S. A., HOLLINGSWORTH M. A., YEH J. J., SHAW C. A., MCKENZIE S. E., BRAY P., NELSON P. T., ZUPO S., VAN ROOSBROECK K., KEATING M. J., CALIN G. A., YEO C., JIMBO M., COZZITORTO J., BRODY J. R., DELGROSSO K., MATTICK J. S., FORTINA P. y RIGOUTSOS I. (2015). "Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(10): E1106-1115.

- LOPEZ CASTEL A., NAKAMORI M., THORNTON C. A. y PEARSON C. E. (2011a). "Identification of restriction endonucleases sensitive to 5-cytosine methylation at non-CpG sites, including expanded (CAG)*n*/(CTG)*n* repeats." *Epigenetics* **6**(4): 416-420.
- LOPEZ CASTEL A., NAKAMORI M., TOME S., CHITAYAT D., GOURDON G., THORNTON C. A. y PEARSON C. E. (2011b). "Expanded CTG repeat demarcates a boundary for abnormal CpG methylation in myotonic dystrophy patient tissues." *Hum Mol Genet* **20**(1): 1-15.
- LORO E., RINALDI F., MALENA A., MASIERO E., NOVELLI G., ANGELINI C., ROMEO V., SANDRI M., BOTTA A. y VERGANI L. (2010). "Normal myogenesis and increased apoptosis in myotonic dystrophy type-1 muscle cells." *Cell Death Differ* **17**(8): 1315-1324.
- LU Z. (2011). "PubMed and beyond: a survey of web tools for searching biomedical literature." *Database (Oxford)* **2011**: baq036.
- LUND E., GUTTINGER S., CALADO A., DAHLBERG J. E. y KUTAY U. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." *Science* **303**(5654): 95-98.
- LYTLE J. R., YARIO T. A. y STEITZ J. A. (2007). "Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(23): 9667-9672.
- MACHUCA-TZILI L., THORPE H., ROBINSON T. E., SEWRY C. y BROOK J. D. (2006). "Flies deficient in Muscleblind protein model features of myotonic dystrophy with altered splice forms of Z-band associated transcripts." *Human Genetics* **120**: 487-499.
- MAHADEVAN M., TSILFIDIS C., SABOURIN L., SHUTLER G., AMEMIYA C., JANSEN G., NEVILLE C., NARANG M., BARCELO J., O'HOY K. y ET AL. (1992). "Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene." *Science* **255**(5049): 1253-1255.
- MAHADEVAN M. S., YADAVA R. S., YU Q., BALIJEPALLI S., FRENZEL-MCCARDELL C. D., BOURNE T. D. y PHILLIPS L. H. (2006). "Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy." *Nature Genetics* **38**(9): 1066-1070.
- MAMMUCARI C., MILAN G., ROMANELLO V., MASIERO E., RUDOLF R., DEL PICCOLO P., BURDEN S. J., DI LISI R., SANDRI C., ZHAO J., GOLDBERG A. L., SCHIAFFINO S. y SANDRI M. (2007). "FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo." *Cell Metab* **6**(6): 458-471.
- MANKODI A., LOGIGIAN E., CALLAHAN L., MCCLAIN C., WHITE R., HENDERSON D., KRYM M. y THORNTON C. A. (2000). "Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat." *Science* **289**(5485): 1769-1773.
- MANKODI A., TAKAHASHI M. P., JIANG H., BECK C. L., BOWERS W. J., MOXLEY R. T., CANNON S. C. y THORNTON C. A. (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**(1): 35-44.
- MANKODI A., URBINATI C. R., YUAN Q. P., MOXLEY R. T., SANSONE V., KRYM M., HENDERSON D., SCHALLING M., SWANSON M. S. y THORNTON C. A. (2001). "Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2." *Human Molecular Genetics* **10**(19): 2165-2170.
- MASUDA A., ANDERSEN H. S., DOKTOR T. K., OKAMOTO T., ITO M., ANDRESEN B. S. y OHNO K. (2012). "CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay." *Sci Rep* **2**: 209.
- MELO S. A. y ESTELLER M. (2011). "Dysregulation of microRNAs in cancer:

Bibliografía

playing with fire." FEBS Lett **585**(13): 2087-2099.

MILLER J. W., URBINATI C. R., TENG-UMNUAY P., STENBERG M. G., BYRNE B. J., THORNTON C. A. y SWANSON M. S. (2000). "Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy." EMBO J **19**(17): 4439-4448.

MONFERRER L. y ARTERO R. (2006). "An interspecific functional complementation test in *Drosophila* for introductory genetics laboratory courses." J Hered **97**(1): 67-73.

MOOERS B. H., LOGUE J. S. y 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**(46): 16626-16631.

MOORE K. J., RAYNER K. J., SUAREZ Y. y FERNANDEZ-HERNANDO C. (2010). "microRNAs and cholesterol metabolism." Trends Endocrinol Metab **21**(12): 699-706.

MORIN R. D., O'CONNOR M. D., GRIFFITH M., KUCHENBAUER F., DELANEY A., PRABHU A. L., ZHAO Y., MCDONALD H., ZENG T., HIRST M., EAVES C. J. y MARRA M. A. (2008). "Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells." Genome Res **18**(4): 610-621.

MOSELEY M. L., ZU T., IKEDA Y., GAO W., MOSEMILLER A. K., DAUGHTERS R. S., CHEN G., WEATHERSPOON M. R., CLARK H. B., EBNER T. J., DAY J. W. y RANUM L. P. (2006). "Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8." Nature Genetics **38**(7): 758-769.

MUSOVA Z., MAZANEC R., KREPELOVA A., EHLER E., VALES J., JAKLOVA R., PROCHAZKA T., KOUKAL P., MARIKOVA T., KRAUS J., HAVLOVICOVA M. y SEDLACEK Z. (2009). "Highly unstable

sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene." Am J Med Genet A **149A**(7): 1365-1374.

NAKAMORI M., SOBCZAK K., PUWANANT A., WELLE S., EICHINGER K., PANDYA S., DEKDEBRUN J., HEATWOLE C. R., MCDERMOTT M. P., CHEN T., CLINE M., TAWIL R., OSBORNE R. J., WHEELER T. M., SWANSON M. S., MOXLEY R. T., 3RD y THORNTON C. A. (2013). "Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy." Ann Neurol **74**(6): 862-872.

NAPIERALA M. y KRZYZOSIAK W. J. (1997). "CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable "slippery" hairpins." J Biol Chem **272**(49): 31079-31085.

NARANG M. A., WARING J. D., SABOURIN L. A. y KORNELUK R. G. (2000). "Myotonic dystrophy (DM) protein kinase levels in congenital and adult DM patients." Eur J Hum Genet **8**(7): 507-512.

NEUMANN M., SAMPATHU D. M., KWONG L. K., TRUAX A. C., MICSENYI M. C., CHOU T. T., BRUCE J., SCHUCK T., GROSSMAN M., CLARK C. M., MCCLUSKEY L. F., MILLER B. L., MASLIAH E., MACKENZIE I. R., FELDMAN H., FEIDEN W., KRETZSCHMAR H. A., TROJANOWSKI J. Q. y LEE V. M. (2006). "Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." Science **314**(5796): 130-133.

NICHOLAS K. B., NICHOLAS H. B. J. y DEERFIELD D. W. (1997). "Genedoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation." EMBNEW.NEWS **4**(14).

NIELSEN C. B., SHOMRON N., SANDBERG R., HORNSTEIN E., KITZMAN J. y BURGE C. B. (2007). "Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs." RNA **13**(11): 1894-1910.

NOVELLI G., GENNARELLI M., ZELANO G., PIZZUTI A., FATTORINI C., CASKEY C.

- T. y DALLAPICCOLA B. (1993). "Failure in detecting mRNA transcripts from the mutated allele in myotonic dystrophy muscle." *Biochem Mol Biol Int* **29**(2): 291-297.
- OBAD S., DOS SANTOS C. O., PETRI A., HEIDENBLAD M., BROOM O., RUSE C., FU C., LINDOW M., STENVANG J., STRAARUP E. M., HANSEN H. F., KOCH T., PAPPIN D., HANNON G. J. y KAUPPINEN S. (2011). "Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs." *Nat Genet* **43**(4): 371-378.
- OKAMURA K., HAGEN J. W., DUAN H., TYLER D. M. y LAI E. C. (2007). "The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*." *Cell* **130**(1): 89-100.
- ONISHI H., KINO Y., MORITA T., FUTAI E., SASAGAWA N. y ISHIURA S. (2008). "MBNL1 associates with YB-1 in cytoplasmic stress granules." *Journal of Neuroscience Research* **86**(9): 1994-2002.
- OSBORNE R. J., LIN X., WELLE S., SOBCZAK K., O'ROURKE J. R., SWANSON M. S. y THORNTON C. A. (2009). "Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy." *Hum Mol Genet* **18**(8): 1471-1481.
- OSBORNE R. J. y THORNTON C. A. (2006). "RNA-dominant diseases." *Human Molecular Genetics* **15 Suppl 2**: R162-169.
- PALL G. S., JOHNSON K. J. y SMITH G. L. (2003). "Abnormal contractile activity and calcium cycling in cardiac myocytes isolated from DMPK knockout mice." *Physiological Genomics* **13**(2): 139-146.
- PARKER R. y SHETH U. (2007). "P bodies and the control of mRNA translation and degradation." *Mol Cell* **25**(5): 635-646.
- PARKER R. y SONG H. (2004). "The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover." *Nat Struct Mol Biol* **11**(2): 121-127.
- PASCUAL M., VICENTE M., MONFERRER L. y ARTERO R. (2006). "The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing." *Differentiation* **74**(2-3): 65-80.
- PATTERSON D. (2009). "Molecular genetic analysis of Down syndrome." *Hum Genet* **126**(1): 195-214.
- PERBELLINI R., GRECO S., SARRA-FERRARIS G., CARDANI R., CAPOGROSSI M. C., MEOLA G. y MARTELLI F. (2011). "Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1." *Neuromuscul Disord* **21**(2): 81-88.
- PETER M. E. (2010). "Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step." *Oncogene* **29**(15): 2161-2164.
- PETERSEN C. P., BORDELEAU M. E., PELLETIER J. y SHARP P. A. (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." *Mol Cell* **21**(4): 533-542.
- PFAFFL M. W., HORGAN G. W. y DEMPFFLE L. (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." *Nucleic Acids Res* **30**(9): e36.
- PFEFFER S., SEWER A., LAGOS-QUINTANA M., SHERIDAN R., SANDER C., GRASSER F. A., VAN DYK L. F., HO C. K., SHUMAN S., CHIEN M., RUSSO J. J., JU J., RANDALL G., LINDENBACH B. D., RICE C. M., SIMON V., HO D. D., ZAVOLAN M. y TUSCHL T. (2005). "Identification of microRNAs of the herpesvirus family." *Nat Methods* **2**(4): 269-276.
- PHILIPS A. V., TIMCHENKO L. T. y COOPER T. A. (1998). "Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy." *Science* **280**(5364): 737-741.
- PICCHIO L., PLANTIE E., RENAUD Y., POOVTHUMKADAVIL P. y JAGLA K.

Bibliografía

- (2013). "Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression." *Hum Mol Genet* **22**(14): 2795-2810.
- POULOS M. G., BATRA R., LI M., YUAN Y., ZHANG C., DARNELL R. B. y SWANSON M. S. (2013). "Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice." *Hum Mol Genet* **22**(17): 3547-3558.
- PUSHECHNIKOV A., LEE M. M., CHILDS-DISNEY J. L., SOBCZAK K., FRENCH J. M., THORNTON C. A. y DISNEY M. D. (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." *Journal of the American Chemical Society* **131**(28): 9767-9779.
- RAHIMOV F. y KUNKEL L. M. (2013). "The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy." *J Cell Biol* **201**(4): 499-510.
- RAMALINGAM P., PALANICHAMY J. K., SINGH A., DAS P., BHAGAT M., KASSAB M. A., SINHA S. y CHATTOPADHYAY P. (2014). "Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing." *RNA* **20**(1): 76-87.
- RAU F., FREYERMUTH F., FUGIER C., VILLEMEN J. P., FISCHER M. C., JOST B., DEMBELE D., GOURDON G., NICOLE A., DUBOC D., WAHBI K., DAY J. W., FUJIMURA H., TAKAHASHI M. P., AUBOEUF D., DREUMONT N., FURLING D. y CHARLET-BERGUERAND N. (2011). "Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy." *Nat Struct Mol Biol* **18**(7): 840-845.
- RAVEL-CHAPUIS A., BELANGER G., YADAVA R. S., MAHADEVAN M. S., DESGROSEILLERS L., COTE J. y JASMIN B. J. (2012). "The RNA-binding protein *Staufen1* is increased in *DM1* skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing." *J Cell Biol* **196**(6): 699-712.
- REDDY S., SMITH D. B., RICH M. M., LEFEROVICH J. M., REILLY P., DAVIS B. M., TRAN K., RAYBURN H., BRONSON R., CROSBY D., BALICE-GORDON R. J. y HOUSMAN D. (1996). "Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy." *Nat Genet* **13**(3): 325-335.
- RUBIN G. M., YANDELL M. D., WORTMAN J. R., GABOR MIKLOS G. L., NELSON C. R., HARIHARAN I. K., FORTINI M. E., LI P. W., APWEILER R., FLEISCHMANN W., CHERRY J. M., HENIKOFF S., SKUPSKI M. P., MISRA S., ASHBURNER M., BIRNEY E., BOGUSKI M. S., BRODY T., BROKSTEIN P., CELNIKER S. E., CHERVITZ S. A., COATES D., CRAVCHIK A., GABRIELIAN A., GALLE R. F., GELBART W. M., GEORGE R. A., GOLDSTEIN L. S., GONG F., GUAN P., HARRIS N. L., HAY B. A., HOSKINS R. A., LI J., LI Z., HYNES R. O., JONES S. J., KUEHL P. M., LEMAITRE B., LITTLETON J. T., MORRISON D. K., MUNGALL C., O'FARRELL P. H., PICKERAL O. K., SHUE C., VOSSHALL L. B., ZHANG J., ZHAO Q., ZHENG X. H. y LEWIS S. (2000). "Comparative genomics of the eukaryotes." *Science* **287**(5461): 2204-2215.
- RUBY J. G., JAN C., PLAYER C., AXTELL M. J., LEE W., NUSBAUM C., GE H. y BARTEL D. P. (2006). "Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*." *Cell* **127**(6): 1193-1207.
- RUBY J. G., JAN C. H. y BARTEL D. P. (2007). "Intronic microRNA precursors that bypass *Drosha* processing." *Nature* **448**(7149): 83-86.
- RUDNICKI D. D., HOLMES S. E., LIN M. W., THORNTON C. A., ROSS C. A. y MARGOLIS R. L. (2007). "Huntington's disease-like 2 is associated with CUG repeat-containing RNA foci." *Annals of Neurology* **61**(3): 272-282.

- SAITO K., ISHIZUKA A., SIOMI H. y SIOMI M. C. (2005). "Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells." *PLoS Biol* **3**(7): e235.
- SALDANHA A. J. (2004). "Java Treeview--extensible visualization of microarray data." *Bioinformatics* **20**(17): 3246-3248.
- SALISBURY E., SAKAI K., SCHOSER B., HUICHALAF C., SCHNEIDER-GOLD C., NGUYEN H., WANG G. L., ALBRECHT J. H. y TIMCHENKO L. T. (2008). "Ectopic expression of cyclin D3 corrects differentiation of DM1 myoblasts through activation of RNA CUG-binding protein, CUGBP1." *Exp Cell Res* **314**(11-12): 2266-2278.
- SALVATORI S., FANIN M., TREVISAN C. P., FURLAN S., REDDY S., NAGY J. I. y ANGELINI C. (2005). "Decreased expression of DMPK: correlation with CTG repeat expansion and fibre type composition in myotonic dystrophy type 1." *Neurol Sci* **26**(4): 235-242.
- SALVATORI S., FURLAN S., FANIN M., PICARD A., PASTORELLO E., ROMEO V., TREVISAN C. P. y ANGELINI C. (2009). "Comparative transcriptional and biochemical studies in muscle of myotonic dystrophies (DM1 and DM2)." *Neurol Sci* **30**(3): 185-192.
- SANTORO M., FONTANA L., MASCIULLO M., BIANCHI M. L., ROSSI S., LEONCINI E., NOVELLI G., BOTTA A. y SILVESTRI G. (2015). "Expansion size and presence of CCG/CTC/CGG sequence interruptions in the expanded CTG array are independently associated to hypermethylation at the DMPK locus in myotonic dystrophy type 1 (DM1)." *Biochim Biophys Acta* **1852**(12): 2645-2652.
- SANTORO M., MASCIULLO M., PIETROBONO R., CONTE G., MODONI A., BIANCHI M. L., RIZZO V., POMPONI M. G., TASCIA G., NERI G. y SILVESTRI G. (2013). "Molecular, clinical, and muscle studies in myotonic dystrophy type 1 (DM1) associated with novel variant CCG expansions." *J Neurol* **260**(5): 1245-1257.
- SARKAR P. S., APPUKUTTAN B., HAN J., ITO Y., AI C., TSAI W., CHAI Y., STOUT J. T. y REDDY S. (2000). "Heterozygous loss of *Six5* in mice is sufficient to cause ocular cataracts." *Nat Genet* **25**(1): 110-114.
- SASAGAWA N., OHNO E., KINO Y., WATANABE Y. y ISHIURA S. (2008). "Identification of *Caenorhabditis elegans* K02H8.1 (CeMBL), a functional ortholog of mammalian MBNL proteins." *Journal of Neuroscience Research*.
- SAVKUR R. S., PHILIPS A. V. y COOPER T. A. (2001). "Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy." *Nature Genetics* **29**(1): 40-47.
- SELLIER C., RAU F., LIU Y., TASSONE F., HUKEMA R. K., GATTONI R., SCHNEIDER A., RICHARD S., WILLEMSSEN R., ELLIOTT D. J., HAGERMAN P. J. y CHARLET-BERGUERAND N. (2010). "Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients." *EMBO J* **29**(7): 1248-1261.
- SEN S., TALUKDAR I., LIU Y., TAM J., REDDY S. y WEBSTER N. J. (2010). "Muscleblind-like 1 (*Mbnl1*) promotes insulin receptor exon 11 inclusion via binding to a downstream evolutionarily conserved intronic enhancer." *Journal of Biological Chemistry* **285**(33): 25426-25437.
- SERGEANT N., SABLONNIERE B., SCHRAEN-MASCHKE S., GHESTEM A., MAURAGE C. A., WATTEZ A., VERMERSCH P. y DELACOURTE A. (2001). "Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1." *Hum Mol Genet* **10**(19): 2143-2155.
- SEZNEC H., AGBULUT O., SERGEANT N., SAVOURET C., GHESTEM A., TABTI N., WILLER J. C., OURTH L., DUROS C., BRISSON E., FOUQUET C., BUTLER-BROWNE G., DELACOURTE A., JUNIEN C. y GOURDON G. (2001). "Mice transgenic

Bibliografía

- for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities." *Hum Mol Genet* **10**(23): 2717-2726.
- SEZNEC H., LIA-BALDINI A. S., DUROS C., FOUQUET C., LACROIX C., HOFMANN-RADVANYI H., JUNIEN C. y GOURDON G. (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**(8): 1185-1194.
- SIOMI H. y SIOMI M. C. (2010). "Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals." *Mol Cell* **38**(3): 323-332.
- SOKOL N. S. y AMBROS V. (2005). "Mesodermally expressed *Drosophila* microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth." *Genes and Development* **19**(19): 2343-2354.
- SONI K., CHOUDHARY A., PATOWARY A., SINGH A. R., BHATIA S., SIVASUBBU S., CHANDRASEKARAN S. y PILLAI B. (2013). "miR-34 is maternally inherited in *Drosophila melanogaster* and *Danio rerio*." *Nucleic Acids Res* **41**(8): 4470-4480.
- STARK A., BRENNECKE J., RUSSELL R. B. y COHEN S. M. (2003). "Identification of *Drosophila* MicroRNA targets." *PLoS Biology* **1**(3): E60.
- SUENAGA K., LEE K. Y., NAKAMORI M., TATSUMI Y., TAKAHASHI M. P., FUJIMURA H., JINNAI K., YOSHIKAWA H., DU H., ARES M., JR., SWANSON M. S. y KIMURA T. (2012). "Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain." *PLoS ONE* **7**(3): e33218.
- TANEJA K. L., MCCURRACH M., SCHALLING M., HOUSMAN D. y SINGER R. H. (1995). "Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues." *J Cell Biol* **128**(6): 995-1002.
- TASSONE F., IWAHASHI C. y HAGERMAN P. J. (2004). "FMR1 RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)." *RNA Biol* **1**(2): 103-105.
- TERENZI F. y LADD A. N. (2010). "Conserved developmental alternative splicing of muscleblind-like (MBNL) transcripts regulates MBNL localization and activity." *RNA Biology* **7**(1): 43-55.
- THORNTON C. A., GRIGGS R. C. y MOXLEY R. T., 3RD. (1994). "Myotonic dystrophy with no trinucleotide repeat expansion." *Ann Neurol* **35**(3): 269-272.
- THORNTON C. A., WYMER J. P., SIMMONS Z., MCCLAIN C. y MOXLEY R. T., 3RD. (1997). "Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene." *Nat Genet* **16**(4): 407-409.
- TIAN B., WHITE R. J., XIA T., WELLE S., TURNER D. H., MATHEWS M. B. y THORNTON C. A. (2000). "Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR." *RNA* **6**(1): 79-87.
- TIMCHENKO N. A., CAI Z. J., WELM A. L., REDDY S., ASHIZAWA T. y TIMCHENKO L. T. (2001). "RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1." *Journal of Biological Chemistry* **276**(11): 7820-7826.
- TIMCHENKO N. A., PATEL R., IAKOVA P., CAI Z. J., QUAN L. y TIMCHENKO L. T. (2004). "Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis." *J Biol Chem* **279**(13): 13129-13139.
- TODD P. K., ACKALL F. Y., HUR J., SHARMA K., PAULSON H. L. y DOWLING J. J. (2014). "Transcriptional changes and developmental abnormalities in a zebrafish model of myotonic dystrophy type 1." *Dis Model Mech* **7**(1): 143-155.

- TRAN H., GOURRIER N., LEMERCIER-NEUILLET C., DHAENENS C. M., VAUTRIN A., FERNANDEZ-GOMEZ F. J., ARANDEL L., CARPENTIER C., OBRIOT H., EDDARKAOUI S., DELATRE L., VAN BRUSSELS E., HOLT I., MORRIS G. E., SABLONNIERE B., BUEE L., CHARLET-BERGUERAND N., SCHRAEN-MASCHKE S., FURLING D., BEHM-ANSMANT I., BRANLANT C., CAILLET-BOUDIN M. L. y SERGEANT N. (2011). "Analysis of exonic regions involved in nuclear localization, splicing activity, and dimerization of *Muscleblind-like-1* isoforms." *J Biol Chem* **286**(18): 16435-16446.
- TWEEDIE S., ASHBURNER M., FALLS K., LEYLAND P., MCQUILTON P., MARYGOLD S., MILLBURN G., OSUMI-SUTHERLAND D., SCHROEDER A., SEAL R. y ZHANG H. (2009). "FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations." *Nucleic Acids Research* **37**(Database issue): D555-559.
- ULE J., STEFANI G., MELE A., RUGGIU M., WANG X., TANERI B., GAASTERLAND T., BLENCOWE B. J. y DARNELL R. B. (2006). "An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation." *Nature* **444**(7119): 580-586.
- VICENTE M., MONFERRER L., POULOS M. G., HOUSELEY J., MONCKTON D. G., O'DELL K M., SWANSON M. S. y ARTERO R. D. (2007). "Muscleblind isoforms are functionally distinct and regulate alpha-actinin splicing." *Differentiation* **75**(5): 427-440.
- VICENTE-CRESPO M., PASCUAL M., FERNANDEZ-COSTA J. M., GARCIA-LOPEZ A., MONFERRER L., MIRANDA M. E., ZHOU L. y ARTERO R. D. (2008). "*Drosophila* muscleblind is involved in troponin T alternative splicing and apoptosis." *PLoS ONE* **3**(2): e1613.
- VIGNAUD A., FERRY A., HUGUET A., BARAIBAR M., TROLLET C., HYZEWICZ J., BUTLER-BROWNE G., PUYMIRAT J., GOURDON G. y FURLING D. (2010). "Progressive skeletal muscle weakness in transgenic mice expressing CTG expansions is associated with the activation of the ubiquitin-proteasome pathway." *Neuromuscul Disord* **20**(5): 319-325.
- VOLLE C. B. y DELANEY S. (2012). "CAG/CTG repeats alter the affinity for the histone core and the positioning of DNA in the nucleosome." *Biochemistry* **51**(49): 9814-9825.
- WAKAMIYA M., MATSUURA T., LIU Y., SCHUSTER G. C., GAO R., XU W., SARKAR P. S., LIN X. y ASHIZAWA T. (2006). "The role of ataxin 10 in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 10." *Neurology* **67**(4): 607-613.
- WANG E. T., CODY N. A., JOG S., BIANCOLELLA M., WANG T. T., TREACY D. J., LUO S., SCHROTH G. P., HOUSMAN D. E., REDDY S., LECUYER E. y BURGE C. B. (2012). "Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins." *Cell* **150**(4): 710-724.
- WANG G. S., KEARNEY D. L., DE BIASI M., TAFFET G. y 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**(10): 2802-2811.
- WANG L. C., CHEN K. Y., PAN H., WU C. C., CHEN P. H., LIAO Y. T., LI C., HUANG M. L. y HSIAO K. M. (2011). "Muscleblind participates in RNA toxicity of expanded CAG and CUG repeats in *Caenorhabditis elegans*." *Cell Mol Life Sci* **68**(7): 1255-1267.
- WANG L. C., HUNG W. T., PAN H., CHEN K. Y., WU Y. C., LIU Y. F. y HSIAO K. M. (2008). "Growth-dependent effect of muscleblind knockdown on *Caenorhabditis elegans*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **366**(3): 705-709.
- WANG Y. H., AMIRHAERI S., KANG S., WELLS R. D. y GRIFFITH J. D. (1994). "Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene." *Science* **265**(5172): 669-671.

- WANG Y. H. y GRIFFITH J. (1995). "Expanded CTG triplet blocks from the myotonic dystrophy gene create the strongest known natural nucleosome positioning elements." *Genomics* **25**(2): 570-573.
- WARF M. B. y 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*.
- WARF M. B., DIEGEL J. V., VON HIPPEL P. H. y BERGLUND J. A. (2009a). "The protein factors MBNL1 and U2AF65 bind alternative RNA structures to regulate splicing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(23): 9203-9208.
- WARF M. B., NAKAMORI M., MATTHYS C. M., THORNTON C. A. y BERGLUND J. A. (2009b). "Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(44): 18551-18556.
- WEBSTER R. J., GILES K. M., PRICE K. J., ZHANG P. M., MATTICK J. S. y LEEDMAN P. J. (2009). "Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7." *J Biol Chem* **284**(9): 5731-5741.
- WESTERLAKEN J. H., VAN DER ZEE C. E., PETERS W. y 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**(1): 116-127.
- WONG C. H., NGUYEN L., PEH J., LUU L. M., SANCHEZ J. S., RICHARDSON S. L., TUCCINARDI T., TSOI H., CHAN W. Y., CHAN H. Y., BARANGER A. M., HERGENROTHER P. J. y ZIMMERMAN S. C. (2014). "Targeting toxic RNAs that cause myotonic dystrophy type 1 (DM1) with a bisamidinium inhibitor." *J Am Chem Soc* **136**(17): 6355-6361.
- WU L., FAN J. y BELASCO J. G. (2006). "MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(11): 4034-4039.
- WU S., HUANG S., DING J., ZHAO Y., LIANG L., LIU T., ZHAN R. y HE X. (2010). "Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region." *Oncogene* **29**(15): 2302-2308.
- XIE M., LI M., VILBORG A., LEE N., SHU M. D., YARTSEVA V., SESTAN N. y STEITZ J. A. (2013). "Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA." *Cell* **155**(7): 1568-1580.
- YANG J. S., MAURIN T., ROBINE N., RASMUSSEN K. D., JEFFREY K. L., CHANDWANI R., PAPAPETROU E. P., SADELAIN M., O'CARROLL D. y LAI E. C. (2010). "Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(34): 15163-15168.
- YEO G. W., COUFAL N. G., LIANG T. Y., PENG G. E., FU X. D. y GAGE F. H. (2009). "An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells." *Nature Structural & Molecular Biology* **16**(2): 130-137.
- YI R., QIN Y., MACARA I. G. y CULLEN B. R. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." *Genes Dev* **17**(24): 3011-3016.
- YODA M., CIFUENTES D., IZUMI N., SAKAGUCHI Y., SUZUKI T., GIRALDEZ A. J. y TOMARI Y. (2013). "Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of Argonaute2-cleaved precursor microRNAs." *Cell Rep* **5**(3): 715-726.
- YU Z., TENG X. y BONINI N. M. (2011). "Triplet repeat-derived siRNAs enhance RNA-mediated toxicity in a Drosophila model for myotonic dystrophy." *PLoS Genet* **7**(3): e1001340.

YUAN Y., COMPTON S. A., SOBCZAK K., STENBERG M. G., THORNTON C. A., GRIFFITH J. D. y SWANSON M. S. (2007). "*Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs.*" *Nucleic Acids Research* **35**(16): 5474-5486.

ZHANG C., FRIAS M. A., MELE A., RUGGIU M., EOM T., MARNEY C. B., WANG H., LICATALOSI D. D., FAK J. J. y DARNELL R. B. (2010). "*Integrative modeling defines the Nova splicing-regulatory network and its combinatorial controls.*" *Science* **329**(5990): 439-443.

ZHAO J., BRAULT J. J., SCHILD A., CAO P., SANDRI M., SCHIAFFINO S., LECKER S. H. y GOLDBERG A. L. (2007). "*FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells.*" *Cell Metab* **6**(6): 472-483.

ZU T., GIBBENS B., DOTY N. S., GOMES-PEREIRA M., HUGUET A., STONE M. D., MARGOLIS J., PETERSON M., MARKOWSKI T. W., INGRAM M. A., NAN Z., FORSTER C., LOW W. C., SCHOSER B., SOMIA N. V., CLARK H. B., SCHMECHEL S., BITTERMAN P. B., GOURDON G., SWANSON M. S., MOSELEY M. y RANUM L. P. (2011). "*Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(1): 260-265.

Anexo

Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in *Drosophila* that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients

Juan M. Fernandez-Costa^{1,†}, Amparo Garcia-Lopez¹, Sheila Zuñiga², Victoria Fernandez-Pedrosa³, Amelia Felipo-Benavent¹, Manuel Mata⁴, Oihane Jaka^{5,10}, Ana Aiastui^{5,10}, Francisco Hernandez-Torres^{7,‡}, Begoña Aguado⁷, Manuel Perez-Alonso¹, Jesus J. Vilchez^{8,9,10}, Adolfo Lopez de Munain^{5,6,10,11} and Ruben D. Artero^{1,*}

¹Department of Genetics, University of Valencia, Burjasot 46100, Spain, ²Department of Bioinformatics and ³Department of New Technologies, Sistemas Genomicos Ltd, Paterna 46980, Spain, ⁴Research Foundation of the University General Hospital of Valencia, Valencia 46014, Spain, ⁵Neuroscience Area, Biodonostia Institute and ⁶Department of Neurology, University Hospital Donostia, San Sebastian 20014, Spain, ⁷Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid 28049, Spain, ⁸Neurology Section, Hospital Universitari La Fe, Valencia 46026, Spain, ⁹Department of Internal Medicine, University of Valencia, Valencia 46010, Spain, ¹⁰Centro de Investigaciones Biomedicas en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Institute Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness, Madrid 28049, Spain and ¹¹Department of Neurosciences, University of Basque Country, San Sebastian 20014, Spain

Received June 14, 2012; Revised October 25, 2012; Accepted November 1, 2012

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is caused by the expansion of CTG repeats in the 3' untranslated region of the *DMPK* gene. Several missplicing events and transcriptional alterations have been described in DM1 patients. A large number of these defects have been reproduced in animal models expressing CTG repeats alone. Recent studies have also reported miRNA dysregulation in DM1 patients. In this work, a *Drosophila* model was used to investigate miRNA transcriptome alterations in the muscle, specifically triggered by CTG expansions. Twenty miRNAs were differentially expressed in CTG-expressing flies. Of these, 19 were down-regulated, whereas 1 was up-regulated. This trend was confirmed for those miRNAs conserved between *Drosophila* and humans (*miR-1*, *miR-7* and *miR-10*) in muscle biopsies from DM1 patients. Consistently, at least seven target transcripts of these miRNAs were up-regulated in DM1 skeletal muscles. The mechanisms involved in dysregulation of *miR-7* included a reduction of its primary precursor both in CTG-expressing flies and in DM1 patients. Additionally, a regulatory role for Muscleblind (Mbl) was also suggested for *miR-1* and *miR-7*, as these miRNAs were down-regulated in flies where Mbl had been silenced. Finally, the physiological relevance of miRNA dysregulation was demonstrated for *miR-10*, since over-expression of this miRNA in *Drosophila* extended the lifespan of CTG-expressing flies. Taken together, our results contribute to our understanding of the origin and the role of miRNA alterations in DM1.

*To whom correspondence should be addressed at: Departamento de Genética, C/ Doctor Moliner, 50, E-46100 Burjasot, Spain. Tel: +34 963543028; Fax: +34 963543029; Email: ruben.artero@uv.es

[†]Present address: Valentia BioPharma, Paterna 46980, Spain.

[‡]Present address: Department of Experimental Biology, University of Jaen, Jaen 23071, Spain.

INTRODUCTION

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a chronic, slowly progressing multisystemic disease, with symptoms that include loss of muscle strength, myotonia and excessive fatigue (OMIM #160900). DM1 is caused by a dynamic expansion of CTG repeats in the 3' untranslated region of the *dystrophia myotonica-protein kinase* (*DMPK*) gene (for a recent review, see 1). Characteristic molecular features of the disease have been associated with a toxic RNA gain of function of the CUG expansions. Expanded CUG repeats have been demonstrated to be toxic *per se* in several cell types and animal models (2–4), disrupting transcription and alternative splicing of at least 175 genes and 156 defined pre-mRNAs in mice, respectively (5). Expanded CUG repeats sequester nuclear proteins and accumulate into distinctive foci within muscle and neuronal nuclei (6–8). The alternative splicing factor Muscleblind-like 1 (MBNL1) is recruited into these foci, causing loss-of-function of the protein, which has been linked to critical DM1 features (5,9). An antagonistic splicing factor of MBNL1 activity, CUGBP Elav-like family member 1 (CELF1), is hyper-phosphorylated and subsequently stabilized in DM1 (10). Despite its ability to bind to CUG triplets, CELF1 is not sequestered into CUG-RNA foci (11,12). Instead, CELF1-mediated alterations in DM1 models require the presence of *DMPK* (11,13). Together, MBNL1 and CELF1 regulate critical alternative splicing transitions during heart and skeletal muscle development, which are dysregulated in DM1 (14–16).

In addition to alternative splicing, several other mechanisms have been recently found, which add complexity to the molecular pathology of DM1. These include repeat-associated non-ATG translation (RAN) (17), bidirectional transcription (18), aberrant DNA methylation (19,20) or microRNA (miRNA) dysregulation, among others (21,22). miRNAs are short non-coding RNAs present in all eukaryotes, which regulate gene expression by decreasing their target mRNA levels, or by blocking their translation (23,24). miRNA biogenesis is well understood. In the canonical biogenesis, miRNAs are produced from long primary transcripts (pri-miRNA) that are first processed by Drosha in the nucleus to generate one or more hairpin structures known as pre-miRNA. Then, Dicer orchestrates another cut to generate the mature miRNA in the cytoplasm (Supplementary Material, Fig. S1). Computational methods have predicted that miRNAs account for ~1% of all eukaryotic genes, and that one-third of the transcriptome may be regulated by miRNAs (25). In animals, miRNAs participate in virtually all cell functions, including the regulation of differentiation, proliferation and apoptosis. A subset of miRNAs known as myomiRs are highly enriched in heart and skeletal muscles, where they can regulate muscle function in development and disease (26–28). Eisenberg *et al.* (29) described an miRNA expression profile from 10 human muscle disorders and identified 185 miRNAs that were dysregulated in almost all cases, further demonstrating the importance of miRNAs in muscle function. In DM1, some studies using muscle biopsies have described that *miR-206*, *miR-210*, *miR-1* and *miR-335* are over-expressed in skeletal muscle, whereas *miR-29b*, *miR-29c* and *miR-33* are down-regulated. However, independent studies have found either

no changes in *miR-1* levels or a reduction of this miRNA, as well as an altered cellular distribution of muscle-specific *miR-1*, *miR-133b* and *miR-206* (21,22,30).

Given that the origin of miRNA alterations in DM1 remains uncertain, in this work we have used a *Drosophila* model expressing CTG repeats in the absence of an ATG start codon, in order to study the contribution of CTG expansions to miRNA defects. We have found that the expression of 20 miRNAs is affected by expression of CTG repeats in DM1 flies. Dysregulation of conserved miRNAs *miR-1*, *miR-7* and *miR-10a* also occurred in DM1 patients, where a number of target transcripts were consistently up-regulated. For some of these miRNAs, reduced levels originated from down-regulation of their pri-miRNA precursors and/or Muscleblind loss-of-function. Importantly, over-expression of *miR-10* in *Drosophila* extended the lifespan of model flies. All together, these results contribute to our understanding of the nature and pathological implications of miRNA dysregulation in DM1.

RESULTS

Expression of expanded CTG repeats in *Drosophila* causes reduction of defined miRNAs

An increasing number of miRNAs have been found altered in DM1 patients, where CTG repeats are present in the context of full-length *DMPK* transcripts. In order to identify miRNA alterations directly caused by CTG expansions, we targeted the expression of 480 interrupted CTG repeats, *UAS-i(CTG)480*, to the *Drosophila* muscles with the *Myosin heavy chain* (*Mhc-Gal4*) driver line. We obtained the miRNA transcriptome (miRNome) profile of two independent *i(CTG)480* transgenic lines (*Mhc-Gal4>UAS-i(CTG)480 1.1* and *Mhc-Gal4>UAS-i(CTG)480 2.2*), using SOLiD™ 3 sequencing of small-RNA libraries. Small-RNA libraries from *Mhc-gal4/+* flies were used as controls. Statistical analysis revealed 20 miRNAs differentially expressed in DM1 flies versus control individuals (Fig. 1A and Supplementary Material, Table S1). Nineteen of these were down-regulated in the presence of CTG expansions, whereas one was up-regulated.

Among the 20 miRNAs altered in DM1 flies, we chose to validate the effect of CTG repeats on *miR-1*, *miR-7* (given their conservation in humans) and on *miR-1003* (given its miRtronic nature) by northern blot of small RNAs, using LNA probes and normalizing against the endogenous small nuclear RNA (snRNA) U6. Consistent with our SOLiD™ 3 sequencing data, northern blot analysis revealed expression values for *miR-1*, *miR-7* and *miR-1003* that were reduced by 30% ($P = 0.0047$), 50% ($P = 0.0052$) and 30% ($P = 0.0384$), respectively, compared with control flies (Fig. 1B and C). Therefore, these results demonstrate that expanded CTG-repeat expression affects the *Drosophila* miRNome mainly by causing a reduction in the level of specific miRNAs.

CTG-induced down-regulation of *miR-1*, *miR-7* and *miR-10* is conserved between *Drosophila* and DM1 patients

Among the 20 miRNAs that we found altered in CTG-expressing flies, *miR-1*, *miR-7* and *miR-10* were conserved between *Drosophila* and humans (Supplementary

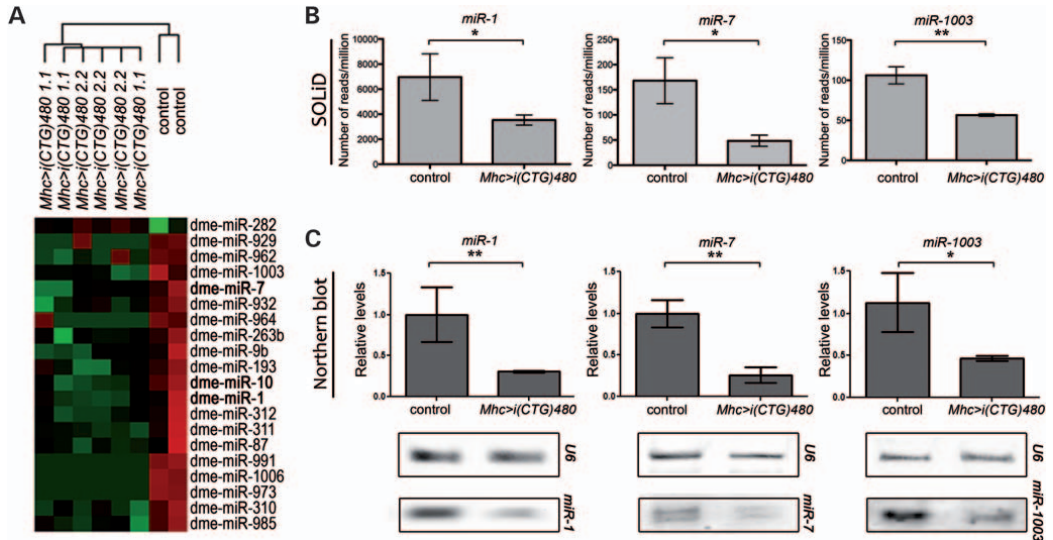


Figure 1. Expression of expanded CTG repeats in the *Drosophila* muscles reduced the levels of specific miRNAs. (A) Heat map graphical representation and clustering analysis of miRNA expression from two independent *UAS-i(CTG)480* lines (*Mhc-Gal4>UAS-i(CTG)480 1.1* and *Mhc-Gal4>UAS-i(CTG)480 2.2*) and control flies (*Mhc-Gal4/+*). Two biological replicates of each genotype ($n = 50$ per replicate) and two technical replicates were analyzed (Supplementary Material, Table S1). Data are presented as a dendrogram, with the closest branches of the tree showing samples with less dissimilar expression patterns. Green and red indicate statistically significant down- and up-regulated miRNAs compared with controls, respectively (ANOVA, $\alpha = 0.05$). These miRNAs represented ~13% of the *Drosophila* miRNome at the time the SOLiD data were processed (miRBase release 13.0; containing 152 miRNAs). Conserved miRNAs between *Drosophila* and humans appear in bold font. (B) Graphic representation of the *miR-1*, *miR-7* and *miR-1003* expression data from SOLiD™ 3 sequencing showing a similar reduction in miRNA levels from *Mhc-Gal4>i(CTG)480* flies compared with *Mhc-Gal4/+* individuals. Expression levels are given as number of reads per million. (C) Validation of the results shown in (B) by northern blot of small RNAs and densitometry analysis of the bands showing a reduction for *miR-1*, *miR-7* and *miR-1003*, respectively. Endogenous U6 was used for normalization in northern blot experiments, and miRNA expression levels are shown relative to control flies. Four biological replicates ($n = 50$ per replicate) and two technical replicates per biological sample were analyzed. All graph bars represent average fold changes and their standard errors. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Material, Fig. S2). In order to validate the relevance of our findings in DM1, we used qRT-PCR to study the levels of human *miR-1*, *miR-7*, and *miR-10* (*miR-10a* and *miR-10b*) in skeletal muscle biopsies (biceps, vastus and deltoid) from five DM1 patients (aged 47 ± 5) compared with biopsies from three healthy individuals (aged 58 ± 11) and normalized against endogenous snoRNA U48. Statistical analysis revealed a significant reduction in the levels of *miR-1* (72%; $P = 0.0022$), *miR-7* (80%; $P = 0.0004$) and *miR-10a* (60%; 0.0271) in DM1 patients compared with control individuals (Fig. 2A). *miR-10b*, which is less similar to *Drosophila miR-10* than human *miR-10a*, showed a non-significant increase. Therefore, these results demonstrate the conservation of miRNA dysregulation triggered by expanded CTG repeats between our *i(CTG)480 Drosophila* model and humans. Interestingly, *miR-1* levels had been previously studied in DM1 patients by independent groups, which found either no changes in *miR-1* levels (22), a 2.1-fold reduction (21), or a 1.9-fold up-regulation (30); whereas *miR-7* and *miR-10* had not been tested, nor associated with the disease before.

To investigate whether *miR-1*, *miR-7* and *miR-10a* dysregulation had an effect on their mRNA targets, we used gene microarray data from muscle biopsies of DM1 patients previously generated in our laboratory, where a number of mis-

expressed genes had been identified (unpublished data). Of all Targetscan (25) predictions that were represented among these genes, we found 21 *miR-1* targets, 14 *miR-7* targets and 7 *miR-10* targets. All of them but one were significantly up-regulated (>10-fold) in DM1 muscle biopsies (Supplementary Material, Table S2 and Fig. 2B; upper graphs). However, the target transcripts of three randomly selected control miRNAs (*let7a*, *miR-340* and *miR-454*) showed changes in their expression levels that indistinctly included up- and down-regulation, ruling out an miRNA-mediated effect, and further supporting the specificity of our results (Fig. 2B; lower graphs). Among the total of up-regulated targets of *miR-1*, *miR-7* and *miR-10*, a subset of 13 were chosen for their validation by qRT-PCR from muscle biopsies of six DM1 patients. An apparent up-regulation of mRNA levels was observed in each case, although only seven of these changes were statistically significant (Fig. 2C–E; Supplementary Material, Table S3). Confirmed genes encoded proteins that participated in a mixed range of cellular processes, including antioxidant enzyme SOD1, transcriptional regulator SMARCA4 and nucleotide exchange factor NET1 (*miR-1*; Fig. 2C); amyloid precursor protein secretase CTSB, autophagy regulator ATG4 or cytoskeletal protein VCL (*miR-7*; Fig. 2D); and the member of the SUMOylation

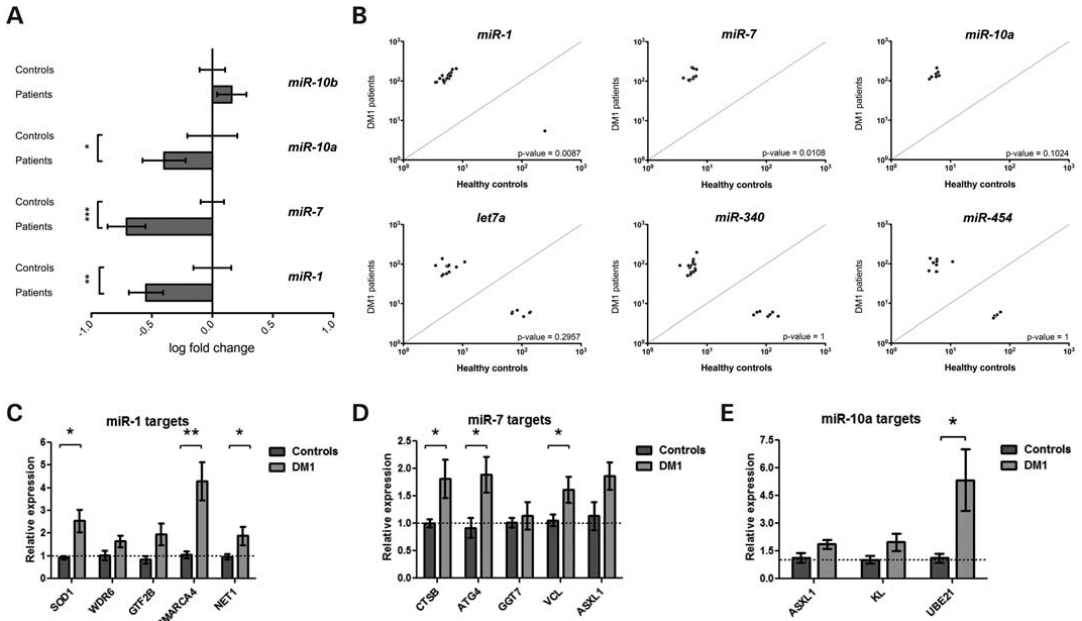


Figure 2. miRNA alterations are conserved between *Drosophila* and DM1 patients. (A) miRNA log fold change values of *miR-1*, *miR-7*, *miR-10a* and *miR-10b* based on qRT-PCR expression data from adult skeletal muscle biopsies of five DM1 patients and three healthy individuals (control). Graph bars represent average fold changes of miRNA expression in logarithmic scale, calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, and their confidence intervals. sno-RNA RNU48 was used as the endogenous control. (B) Scattered plot representation of the microarray signal values of the altered transcripts predicted to be regulated by *miR-1*, *miR-7* and *miR-10a* (TargetsScan; upper row). Altered transcript targets of a subset of three randomly chosen miRNAs (*let7a*, *miR-340* and *miR-454*) are also shown (lower row). Consistent with a decrease in *miR-1*, *miR-7* and *miR-10a*, an up-regulation of their predicted targets was observed, whereas both up- and down-regulations were detected for *let7a*, *miR-340* and *miR-454* (Fisher's exact test, $\alpha = 0.05$). (C-E) qRT-PCR validation analysis from adult skeletal muscle biopsies of six DM1 patients and six healthy (control) biopsies. The expression levels of 13 selected *miR-1* (C), *miR-7* (D) and *miR-10a* (E) targets are shown relative to the control individuals. An up-regulation trend was observed in all cases, although only the indicated seven were statistically significant. In this case, *GADPH* was used as the endogenous control. Graph bars represent average fold changes of gene expression, calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, and their standard errors. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

machinery UBE21 (*miR-10*; Fig. 2E). Thus, our results suggest a wide pathologic potential of miRNA dysregulation in DM1.

Finally, to assess whether *miR-1*, *miR-7* and *miR-10* alterations originated during muscle differentiation, we also studied the levels of *miR-1*, *miR-7*, *miR-10a* and *miR-10b* in control and DM1-derived human skin fibroblasts before and after they had been induced to turn on the myogenic program by expression of the murine MyoD (31). Before myogenesis was induced, the levels of *miR-1* or *miR-10b* did not differ between control and DM1 fibroblasts ($P = 0.6534$ and $P = 0.8049$, respectively); whereas *miR-10a* was slightly increased ($P = 0.0048$), and *miR-7* was notably reduced in DM1 fibroblasts compared with controls ($P = 0.0009$) (Fig. 3A; Supplementary Material, Table S4). After the induction of myogenesis, however, all four miRNAs were significantly reduced in DM1 cells (*miR-1*, $P = 0.0248$; *miR-7*, $P = 0.0312$; *miR-10a*, $P = 0.0002$; and *miR-10b*, $P = 0.0166$). Interestingly, for *miR-7*, this reduction was less marked in muscle cells than in fibroblasts (Fig. 3B and Supplementary Material, Table S4). These results suggest that different

miRNA alterations in DM1 muscle cells may originate from different mechanisms.

Expanded CTG repeats alter the levels of defined pri-miRNA precursors

SOLIDTM 3 sequencing identified *Drosophila* *miR-310*, *miR-311* and *miR-312* among the initial 19 miRNAs that were reduced in CTG-expressing flies. Interestingly, these miRNAs formed an miRNA cluster (i.e. a group of miRNAs contained within the same gene) (32) denominated cluster *miR-310-313*, which is transcribed as a polycistronic primary precursor, *miR-313*, which completes the cluster, showed a similar trend, although its reduction was not statistically significant (Fig. 4A and Supplementary Material, Table S5). *miR-960*, *miR-962* and *miR-964*, which were also altered in DM1 flies, were part of a second miRNA cluster (cluster *miR-959-964*) located in the antisense (-) strand of the *CG31646* gene. *miR-959*, *miR-961* and *miR-963*, the rest of the members of this cluster, also showed a mild reduction in CTG-expressing flies (Fig. 4B and Supplementary Material,

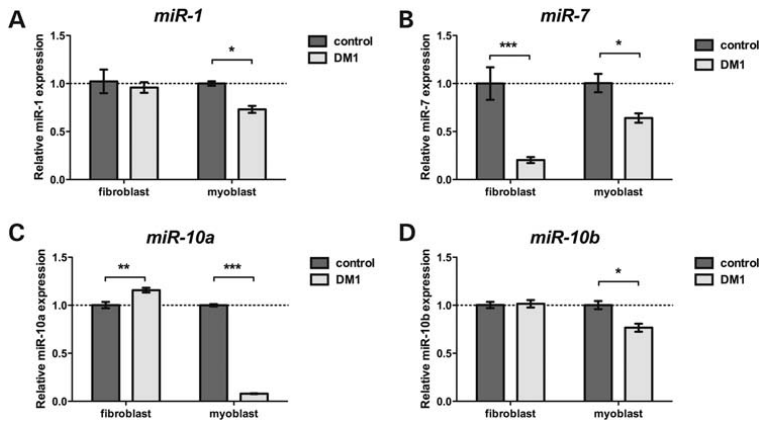


Figure 3. *miR-1*, *miR-7* and *miR-10* are down-regulated in DM1 cells. (A–D) qRT–PCR amplification of mature *miR-1*, *miR-7*, *miR-10a* and *miR-10b* miRNAs from healthy and DM1 patient-derived fibroblasts (having 333 CTGs at the time of diagnosis, in 2010). miRNA levels were measured before and after cell induction to activate myogenic transdifferentiation (MT). *miR-7* was reduced in both DM1 fibroblasts and DM1 transdifferentiated myoblasts (B), whereas *miR-1* (A), *miR-10a* (C) and *miR-10b* (D) were down-regulated only after the myogenic program had been activated in DM1 cells. *snoRNA U48* was used as the endogenous gene, and all data were normalized relative to the control group. Two biological samples and three technical replicates per biological sample were used. All graph bars represent average fold changes of miRNA expression, calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, and their standard errors. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Additional statistical data are shown in Supplementary Material, Table S4.

Table S5). Therefore, these results suggested that the changes in the expression levels of these miRNAs could originate from a reduction in their pri-miRNAs. To confirm this hypothesis, we measured the pri-miRNA levels of both clusters by qRT–PCR from *Mhc-Gal4>UAS-i(CTG)480* and *Mhc-gal4/+* (control) flies (Fig. 4D and E). *Mhc-Gal4>UAS-i(CTG)480* flies showed a significant reduction in the pri-miRNA levels of *miR-310–313* ($P = 0.0077$) and *miR-959–964* ($P = 0.0368$) clusters when compared with controls, demonstrating a CTG-mediated effect on both transcription units. We also measured the levels of sense (+) strand mRNA from the *CG31646* gene and found no significant changes compared with controls ($P = 0.5330$), ruling out a non-specific effect on *miR-959–964* caused by a reduction of the expression of this gene (Fig. 4E). The pri-miRNA levels of the cluster *miR-2a-1–2b-2*, which encodes miRNAs that were not modified by CTG expression in our SOLiD™ 3 analysis, were also studied. No significant differences in the pri-miRNA of this cluster were detected in CTG-expressing flies when compared with controls (Fig. 4C and F; $P = 0.2368$), further confirming the specificity of the effect of CTG repeats on pri-miRNA production of defined miRNAs. Molecular mapping of the i(CTG)480 1.1 and 2.2 insertions used in this study showed no proximity to the *miR-310–313* or *miR-959–964* clusters, excluding the possibility of a transcriptional repression caused by CTG-induced alterations of the local chromatin structure (Supplementary Material, Table S6).

Based on these findings, we next investigated whether the pri-miRNA levels of conserved miRNAs *miR-1*, *miR-7* and *miR-10* could also be affected by expression of expanded CTG repeats. In *Drosophila*, qRT–PCR analysis revealed that the pri-miRNAs of *miR-1* and *miR-10* were comparable

with control flies ($P = 0.3435$ and 0.7095 , respectively). However, the pri-miRNA of *miR-7* was significantly reduced (Fig. 4G; $P = 0.0420$). This effect was also observed in skeletal muscle biopsies from six DM1 patients, where the pri-miRNA levels from human *miR-7* genes *pri-miR-7-1* and *pri-miR-7-2*, but not *pri-miR-7-3*, were significantly reduced compared with healthy controls ($P = 0.0339$, $P = 0.0209$ and $P = 0.0917$, respectively, Fig. 4H). Therefore, these results demonstrate that, at least partly, *miR-7* is reduced in *Drosophila* and in DM1 patients due to a down-regulation of its pri-miRNA precursor.

Muscleblind is necessary for the regulation of *miR-1* and *miR-7* in *Drosophila*

In addition to the down-regulation of specific primary precursors, changes in miRNA levels may also occur at a downstream level, including the regulation of their biogenesis or their stability. Human MBNL1 has been described to participate in the biogenesis of *miR-1* (21) by binding to a UGC motif located within its pre-miRNA, favoring the generation of mature *miR-1*. To confirm whether the *Drosophila* homolog of MBNL1 (*Mbl*) was also involved in the differential expression of *miR-1* in *Drosophila*, we used transgenic flies carrying an RNAi construct targeted against all *Mbl* isoforms (*UAS-IR-mbl*). In a wild-type background, *mbl* silencing using an *Mhc-Gal4* driver line (*Mhc-Gal4>UAS-IR-mbl*) caused a significant reduction of *miR-1* levels as detected by northern blot ($P = 0.0102$). On the contrary, over-expression of *MblC* isoform did not induce changes in *miR-1* (Fig. 5A and B; Supplementary Material, Fig. 3A). This indicates that (i) other *Mbl* isoforms may also be important in regulating the levels of *miR-1*, or (ii) that the amount of miRNA

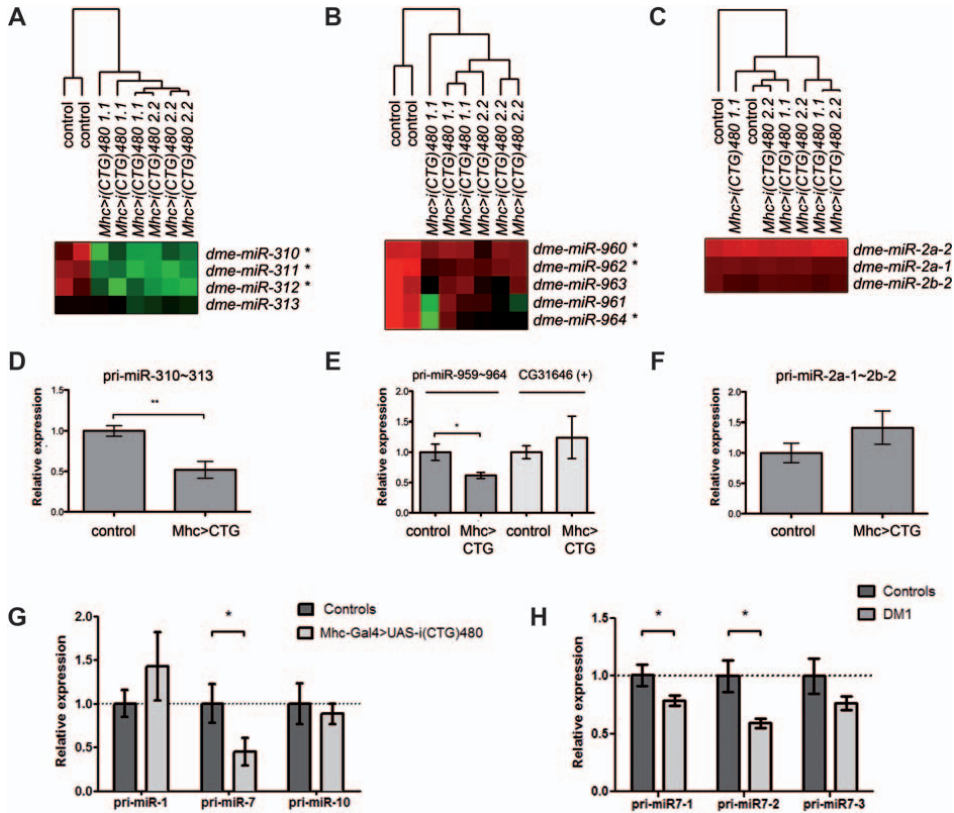


Figure 4. Expanded CTG repeats cause down-regulation of specific pri-miRNAs. (A–C) Heat map graphical representation of expression levels of clusters *miR-310-313* (A), *miR-959-964* (B) and *miR-2a-1-2b-2* (C). Hierarchical clustering analysis revealed significantly reduced levels of miRNAs from clusters *miR-310-313* (A) and *miR-959-964* (B) in CTG-expressing flies (*Mhc-Gal4>UAS-i(CTG)480 1.1* and *2.2*) compared with controls (*Mhc-Gal4>+*). No differences between groups were detected for the miRNA cluster *miR-2a-1-2b-2*, which was used as a negative control (C). (D–F) qRT-PCR amplification of the pri-miRNAs from clusters *miR-310-313*, *miR-959-964* and *miR-2a-1-2b-2* from adult flies confirmed a CTG-dependent reduction in the expression levels of the pri-miRNAs of clusters *miR-310-313* (D) and *miR-959-964* (E), but not *miR-2a-1-2b-2* (F), when compared with controls. The strand of the *CG31646* gene opposite to the strand that contains the cluster *miR-959-964* was used as an additional control, for which no expression differences were observed (E). (G) The pri-miRNAs of conserved miRNAs *miR-1*, *miR-7* and *miR-10* were also measured in *Drosophila* by qRT-PCR. Only the pri-miRNA of *miR-7* was significantly reduced in CTG-expressing flies. In (D–G), four biological replicates ($n = 50$ per replicate), and three technical replicates per biological sample, were used. Biological samples included two female groups and two male groups, and normalization was carried out relative to the corresponding gender controls. *tubulin84B* was used as the endogenous gene. (H) In human skeletal muscle biopsies, qRT-PCR revealed that the pri-miRNAs from two of the three genes encoding human *miR-7* were down-regulated in DM1 patients ($n = 6$ individuals; three technical replicates per individual) compared with healthy individuals ($n = 6$ individuals; three technical replicates per individual). In this case, *GADPH* was used as the endogenous gene. All graph bars represent average fold changes of gene expression, calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, and their standard errors. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

precursor available might be the limiting factor during biogenesis, with endogenous Mbl levels being sufficient to saturate the process. Supporting the second hypothesis, *mblC* overexpression significantly rescued *miR-1* levels in DM1 flies, where endogenous Mbl function is compromised (Fig. 5A and B; $P = 0.0435$). *mbl* silencing in a wild-type background also reduced *miR-7* levels, although this change was not statistically significant ($P = 0.1978$). However, in this case, *mblC* over-expression did not affect this miRNA even in the presence of CTG repeats (Fig. 5C and D and Supplementary Material, Fig. S3B; $P = 0.7751$). Therefore, the relative

contribution of Mbl to the generation of *miR-1* and *miR-7* seems to be different; and additional factors that are independent of Mbl would participate in the regulation of *miR-7*.

Interestingly, two of the miRNAs that we found down-regulated in *Drosophila*, *miR-1003* and *miR-1006*, were miRtrons (i.e. miRNAs that arise from spliced-out introns). Given that splicing alterations are a hallmark of DM1, we also analyzed the splicing of the introns that host *miR-1003* and *miR-1006* (intron 6 of the *CG6695* gene, and intron 4 of the *VhaSFD* gene, respectively). Analysis of *miR-1004*, an miRtron not found altered in CTG-expressing flies, was also

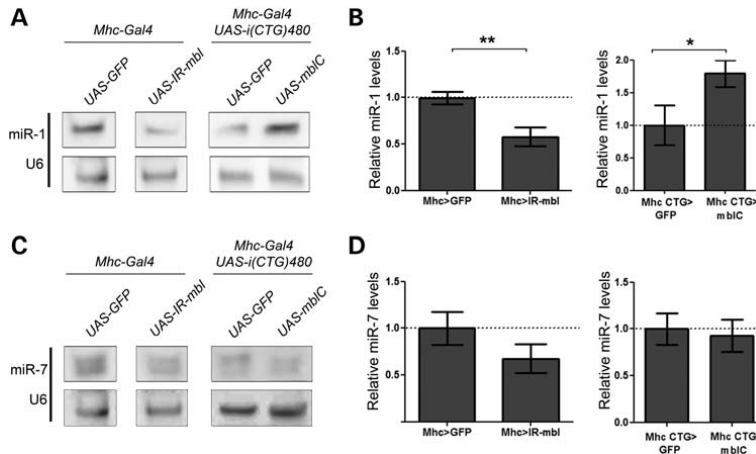


Figure 5. *Drosophila* Mbl regulates the levels of *miR-1* and *miR-7*. (A) Detection of *miR-1* by northern blot from adult fly males of the indicated genotypes, using LNA probes and densitometric quantification of the bands. (B) *mbl* silencing (*Mhc-Gal4*>*UAS-IR-mbl*) caused a 48% reduction in *miR-1* levels compared with control flies (*Mhc-Gal4*>*UAS-GFP*) (left). Co-expression of MblC and i(CTG)480 (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480*>*UAS-MblC*) resulted in a 55% rescue of the CTG-induced *miR-1* reduction when compared with flies co-expressing GFP and i(CTG)480 (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480*>*UAS-GFP*) (right). (C–D) *mbl* silencing also caused a 33% reduction of *miR-7* compared with control flies (left). However, MblC over-expression did not suppress the CTG-induced effect on *miR-7* levels (right). Endogenous U6 was used for normalization, and miRNA expression levels are shown relative to control flies. For each genotype, four biological replicates (50 individuals) and two technical replicates per biological sample were analyzed. All graph bars show average values and their standard errors. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

included as a control. As expected, the splicing of intron 19 of the *CG43707* gene (*miR-1004* precursor) was unaffected (Supplementary Material, Fig. S4A and B). We did not detect *VhaSFD* transcripts containing intron 4 (*miR-1006* precursor), either in control or in DM1 flies (Supplementary Material, Fig. S4A), suggesting that this intron is completely spliced out in both cases. However, the levels of *CG6695* transcripts containing intron 6 (*miR-1003* precursor) were reduced by 24% in CTG-expressing flies compared with controls ($P = 0.0080$; Supplementary Material, Fig. S4A and B), indicating that intron 6 is spliced out at higher levels in DM1 flies than in controls. Taken together, the reduced levels of mature *miR-1003* and *miR-1006* in CTG-expressing flies cannot be explained by reduced splicing of their host transcripts, and would instead occur at a more downstream level.

Over-expression of *miR-10*, but not *miR-1* or *miR-7*, increases lifespan in CTG-expressing flies

To date, the pathogenicity of miRNA alterations in DM1 remains unclear. We studied the physiological relevance of CTG-induced miRNA down-regulation by performing a series of phenotypic rescue experiments using our DM1 *Drosophila* model, where we over-expressed *miR-1*, *miR-7* or *miR-10* under the control of the *Mhc-Gal4* driver line. We previously described that flies expressing i(CTG)480 in the musculature had a reduced lifespan compared with control individuals (2). Here, *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480*>*UAS-GFP* flies showed a median survival (MS) of 15 days at 25°C, whereas control flies (*Mhc-Gal4*>*UAS-GFP*) showed an MS of 33 days at the same temperature (Fig. 6; $P < 0.0001$).

Flies co-expressing i(CTG)480 and *miR-1* (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480*>*UAS-miR-1*) showed an intriguingly reduced MS (10 days; $P < 0.0001$) compared with CTG-expressing flies (Fig. 6A and D). This effect was not due to the toxicity of *miR-1*, as flies over-expressing *miR-1* alone (*Mhc-Gal4*>*UAS-miR-1*) showed a lifespan comparable with *Mhc-Gal4*>*UAS-GFP* controls (Fig. 6A).

The survival curves of flies co-expressing i(CTG)480 and *miR-7* (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480*>*UAS-miR-7*) also showed a mild but significant reduction in lifespan (MS of 11.5 days) compared with their controls, which co-expressed i(CTG)480 and dsRED (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480*>*UAS-dsRED*; MS of 13 days) (Fig. 6B and D; $P = 0.0109$). In this case, this effect could be explained by the toxicity of *miR-7*, as over-expression of *miR-7* alone (*Mhc-Gal4*>*UAS-miR-7*) resulted in an MS of 27 days, significantly lower than that of individuals expressing dsRED (*Mhc-Gal4*>*UAS-dsRED*; MS of 29.5 days; $P = 0.0310$) (Fig. 6B).

Finally, co-expression of i(CTG)480 with *miR-10* (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480*>*UAS-miR-10*) significantly increased lifespan compared with controls that co-expressed i(CTG)480 and GFP, resulting in an MS of 18 days (Fig. 6C and D; $P < 0.0001$). In addition, over-expression of *miR-10* alone (*Mhc-Gal4*>*UAS-miR-10*) did not affect the lifespan of flies (MS of 35 days; Fig. 6C).

Taken together, although further studies are required to fully understand the implications of *miR-1*, *miR-7* and *miR-10* dysregulation in CTG-mediated toxicity, our results demonstrate that *miR-10* down-regulation triggered by CTG expansions has a negative, but partially reversible,

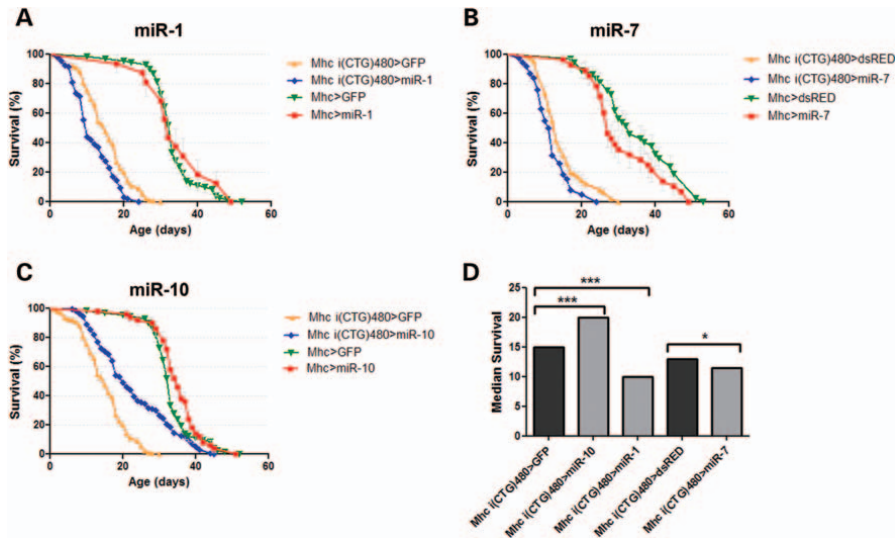


Figure 6. Overexpression of *miR-1*, *miR-7* or *miR-10* has different effects on the lifespan of CTG-expressing flies. Survival curves of flies co-expressing i(CTG)480 and *miR-1* ($n = 100$; **A**), *miR-7* ($n = 38$; **B**) or *miR-10* ($n = 180$; **C**), compared with control flies that co-express i(CTG)480 and GFP ($n = 161$; **A** and **C**) or i(CTG)480 and dsRED ($n = 89$; **B**). A mild but significant survival reduction was observed upon co-expression of i(CTG)480 and *miR-1* (**A**) or *miR-7* (**B**), whereas *miR-10* significantly extended the lifespan of CTG-expressing flies (**C**). Over-expression of *miR-1* ($n = 32$; **A**) or *miR-10* alone ($n = 35$; **C**) was not toxic compared with GFP ($n = 33$), whereas over-expression of *miR-7* alone reduced survival ($n = 27$; **B**) compared with dsRED ($n = 33$). (**D**) The graph showing the MS values obtained in (A)–(C). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

physiological impact, supporting the pathologic role and therapeutic potential of this miRNA in DM1.

DISCUSSION

Dysregulation of specific miRNAs in DM1 patients had been previously described (21,22,30). Here, we have studied the contribution of CTG expansions to miRNA defects in DM1, by analyzing changes in the muscle miRNome of a *Drosophila* model of CTG toxicity (2). Using SOLiD™ 3 sequencing, we have identified 20 miRNA alterations caused by expression of CTG repeats. Of these, 19 were specifically down-regulated in our *Drosophila* model, whereas only 1 was up-regulated. Therefore, the alterations on miRNA regulation caused by CTG expression seem to trigger a reduction, rather than an increase, of miRNA expression levels. This effect was also observed in DM1 patients for all altered miRNAs that were conserved between *Drosophila* and humans: *miR-1*, an miRNA previously associated with DM1 (21,30); and *miR-7* and *miR-10a*, for which no previous link had been described.

Importantly, the conservation of *miR-1*, *miR-7* and *miR-10* defects between our fly model and DM1 patients confirms that: (i) the miRNA down-regulation found in *Drosophila* is specific, and not the consequence of a reduced contribution of the muscle transcriptome to the total transcriptome; and (ii) the dysregulation of these three miRNAs occurs in the presence of CUG-repeat transcripts devoid of additional *DMPK* sequences. Although it is possible that other coding

or non-coding regions within the *DMPK* gene contribute to miRNA defects in DM1, this is the first demonstration that CTG expansions are directly linked to alterations in miRNA regulation. Of note, the fly model used in this work contains 480 CTG repeats interrupted every 20 units by the CTCGA sequence: i(CTG)480. The i(CUG)480 RNA is predicted to form a double-stranded structure that closely resembles the hairpin formed by 480 pure repeats, both of them having similar folding energies (Supplementary Material, Table S7). The existence of complex repeat interruptions at the DM1 locus has been reported to attenuate the severity of symptoms in patients (31–33). Although the CTCGA interruption in the i(CTG)480 transgene does not resemble any of these variant repeat alleles, it is possible that its presence might also modify CTG-induced phenotypes in our flies. For example, the CUCGA interruption would determine the length of any putative repeat-associated non-ATG (RAN) translation products, should these be generated in *Drosophila*, as i(CAG)480 transcripts would produce polyS, polyA and polyQ peptides in consecutive tracts of 20 amino acids linked by 1–2 amino acids. Note that RAN translation from pure CAG repeats produces individual polyS, polyA and polyQ peptides [Supplementary Material, Table S7 and (17,34)]. Bearing all this in mind, the conservation of *miR-1*, *miR-7* and *miR-10* defects between our fly model and DM1 patients represents important evidence that dysregulation of at least these three miRNAs occurs independently of the CUCGA repeat interruption in the *UAS-i(CTG)480* transgene.

By studying the expression levels of the predicted target genes of *miR-1*, *miR-7* and *miR-10* in skeletal muscles from DM1 patients, we identified a total of 42 targets that were down-regulated, 41 of them being up-regulated and only 1 down-regulated. The up-regulation of these targets is consistent with a reduced degradation by their respective miRNA regulators. qRT-PCR analysis confirmed this general trend, and validated at least seven of these alterations in DM1 patients, which had not been previously described to be triggered by miRNA dysregulation. Affected genes did not fall into related functional categories, but instead involved multiple cellular processes. Moreover, *miR-1*, *miR-7* and *miR-10* down-regulation could have an even higher impact on gene expression, if we take into consideration that these miRNAs might also affect the translation of additional gene targets, without affecting the levels of their messenger transcripts. Therefore, our results highlight the wide number of cellular mechanisms potentially affected by CTG-mediated disruption of miRNA regulation.

A number of miRNAs found altered in DM1 to date are encoded in introns, thus suggesting a link between pre-mRNA splicing and miRNA processing. Given that splicing alterations are a hallmark of DM1, both defects could have a common origin. In our study, two *Drosophila* miRNAs affected by CTG expression, *miR-1003* and *miR-1006*, are miRtrons. The precursor intron of *miR-1006* was completely spliced out both in control and in DM1 flies, suggesting that *miR-1006*-reduced levels in CTG-expressing flies do not originate from defects in the splicing regulation of its host transcript, but would instead occur at a more downstream level. For *miR-1003*, we found that its precursor intron is spliced out at higher levels in DM1 flies than in control individuals. However, mature *miR-1003* levels are reduced in DM1 flies. Increased levels of spliced-out *miR-1003* precursor could arise from a response mechanism triggered by the cells to compensate for the reduced levels of mature *miR-1003*, whereas the mature miRNA reduction itself would occur at a downstream level. In this study, we have also found altered miRNAs that belong to the same cluster (i.e. single-transcription units containing several miRNAs regulated by an upstream promoter) (35). In *Drosophila*, the pri-miRNA levels of clusters *miR-310-313* and *miR-959-964* were reduced in CTG-expressing flies compared with controls. Additionally, the levels of pri-miRNA for *miR-7*, but not for *miR-1* or *miR-10*, were down-regulated in CTG-expressing flies and in skeletal muscle of DM1 patients. Therefore, our results demonstrate that pri-miRNA transcription/stability is involved in at least part of the miRNA defects described in this work, supporting the idea of different origins for miRNA dysregulation in DM1.

In our DM1 model flies, the CTG-mediated reduction of *miR-1* seemed to be dependent on Mbl, as over-expression of MblC in CTG-expressing flies rescued *miR-1* levels. Moreover, *mbl* silencing in a wild-type background caused a strong reduction of *miR-1*. These results are consistent with previous reports that described a direct implication of MBNL1 in the biogenesis of human *miR-1* (21). In that study, the authors reported that MBNL1 binds to a UGC motif located within the loop of the pre-miRNA, facilitating the Dicer processing

that generates the mature *miR-1*. According to this model, MBNL1 sequestration by CUG repeats would lead to a reduction of *miR-1* levels in DM1, which the authors validated in cardiac muscle from DM1 patients (2.1-fold reduction) (21), and is consistent with our results in flies and DM1 muscle biopsies. However, other reports have described a different situation for *miR-1*. When Perbellini *et al.* (30) measured *miR-1* from biceps muscles of DM1 patients, a 1.9-fold up-regulation of this miRNA, together with an increase in eight of its predicted targets, was found. This difference may be explained by the different types of muscles analyzed and/or their use of controls with suspected neuromuscular disorders. Intriguingly, another recent study reported no changes in *miR-1* levels in the *vastus lateralis* muscle of DM1 patients (22). It is, therefore, possible that *miR-1* dysregulation is particularly sensitive to cellular contexts, which could include factors such as the number of CTG repeats or the age of the patients.

In our experiments, *mbl* silencing also reduced *miR-7* levels. However, this reduction was weaker than that observed for *miR-1*. Moreover, over-expression of MblC did not rescue the effect of CTG expansions on *miR-7* levels. In our transdifferentiation cell model, *miR-7* levels were reduced both before and after myogenesis, whereas *miR-1* and *miR-10* were only significantly affected after differentiation. In addition, pri-miRNA down-regulation occurred for *miR-7*, but not for *miR-1* or *miR-10*. These observations further suggest that *miR-7* alterations in DM1 occur via a different mechanism, although further studies will be required to clarify the specific factors involved in each case.

The different behavior of *miR-1*, *miR-7* and *miR-10* in the presence of CTG expansions might translate into different consequences to the homeostasis of the cells. The pathological relevance of miRNA dysregulation in DM1 is unclear, as alterations previously described in miRNA levels could correspond either to a response mechanism or to a pathogenic consequence. Here we have shown that partial restoration of *miR-10* levels by over-expression of this miRNA in the *Drosophila* muscles partially rescued the reduced lifespan phenotype of DM1 flies. This demonstrates that *miR-10* down-regulation contributes to CTG-mediated toxicity. On the other hand, not all miRNA alterations triggered by CTG expression seemed to have a phenotypic impact, as over-expression of *miR-1* or *miR-7* did not rescue the CTG-induced phenotype, and even reduced the survival of flies. For *miR-7*, this effect could originate from additive toxicity, as *miR-7* over-expression alone affected the lifespan of flies. However, the case of *miR-1* is more intriguing, since this miRNA was not toxic *per se*. Given that human MBNL1 has been described to bind to *miR-1* directly, it would be possible that the CTG-specific detrimental effect observed for *miR-1* over-expression resulted from a sequestration of *Drosophila* Mbl by excess of *miR-1*.

In summary, this study sheds light onto our understanding of the molecular mechanisms behind gene expression dysregulation in DM1 and CTG toxicity, providing a direct link between miRNA dysregulation and RNA toxicity in DM1, identifying a number of mechanisms and predicted target genes that are affected by CTG expansions and supporting the pathogenic potential of at least part of them.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila stocks

yw and *UAS-GFP* strains were obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (Indiana University). *UAS-i(CTG)480* and *Mhc-Gal4* flies were described in Garcia-Lopez *et al.* (2). Briefly, *UAS-i(CTG)480* flies expressed 480 synthetic CTG repeats interrupted every 20 units by the CTCGA sequence (Supplementary Material, Table S7). *UAS-MblC* flies were described in Garcia-Casado *et al.* (36). *UAS-IR-mbl* flies will be described elsewhere (37). *UAS-miR-1* flies were a gift from Dr Sokol (Dartmouth Medical School, USA) (38). *UAS-miR-7* flies were a gift from Prof. Cohen (Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore, Singapore) (39). *UAS-miR-10* flies were a gift from Dr Gehrke (Stanford University School of Medicine, USA) (40). Flies used for SOLiD™ 3 sequencing were fed with commercial instant *Drosophila* food (Carolina Biological Supply Company) in order to avoid variations in home-made food. All crosses were carried out at 25°C.

Small RNA library generation and next-generation sequencing

Two biological replicates per genotype were used (control: *Mhc-Gal4/+*; DM1: *Mhc-Gal4>UAS-i(CTG)480*), each of which containing 50 *Drosophila* males of the same age (2-day-old flies; state of muscle degeneration ~45%). Two different DM1 lines were used (*UAS-i(CTG)480 1.1* and *UAS-i(CTG)480 2.2*) to rule out any transgene-specific effect (Supplementary Material, Table S1). Total RNA was extracted from each group and the small RNA fraction was enriched using the miRVana kit (Ambion). Small RNA was run in 15% acrylamide:bisacrylamide 19:1 gels and the 15–30 nt fraction was sliced out and eluted with 1 M NaCl overnight at 4°C. Purification was carried out using the MEGAclear Kit (Ambion). The quality of purified small RNAs (50 ng) was analyzed by capillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer). Libraries for SOLiD™ 3 sequencing were prepared following the manufacturer's protocol (Small RNA Expression Kit, Applied Biosystems), and two technical replicates were conducted for *UAS-i(CTG)480 1.1* and *UAS-i(CTG)480 2.2* as a control of reproducibility (Supplementary Material, Table S1). Briefly, small RNA samples (15 ng) were hybridized and ligated overnight with the adapter mix, reverse-transcribed and PCR-amplified (15 cycles). The primers used in this PCR included a unique six-nucleotide barcode for each sample. A single emulsion PCR reaction was used to couple the barcoded libraries to P1-coated beads as per the standard Applied Biosystems protocol. After emulsion PCR, template beads were enriched in a glycerol gradient and deposited onto the surface of glass slides for SOLiD sequencing. Sequencing was performed using 35 bp chemistry on a version 3.0 SOLiD machine (SOLiD™ 3). Approximately 200 million of 35 nt reads were produced for all barcoded samples.

Bioinformatic analysis

From the SOLiD™ 3 sequencing data, low-quality reads were first removed from the data set (at least $QV \geq 10$ in the first 10 bases). Filtered reads were then mapped against the *Drosophila melanogaster* genome (version r5.23), using the software Small_RNA_Tool_v0.5.0 (<http://solidsoftwaretools.com/gf/>) and allowing up to two mismatches in the first 18 nt and up to three mismatches in the entire read. A custom pipeline was then used to select reads that mapped uniquely to a point of the *Drosophila* genome, which represented the usable sequence data. miRBase (version 13.0) and custom scripts were applied in order to identify known miRNAs. Contaminations by protein-coding genes or other ncRNAs (rRNAs, tRNAs, snoRNAs, etc.) were discarded from the final data set. miRNA counts were normalized per million of reads that mapped uniquely, in order to yield the relative transcript abundance in the original sample. Normalized miRNA counts were used to analyze significant changes in expression profiles between *Mhc-Gal4>i(CTG)480* and *Mhc-Gal4/+* flies, using the dCHIP Analysis Software. Non-agglomerative hierarchical clustering was carried out using UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) analysis as previously reported (41). Statistically significant down- and up-regulated miRNAs were obtained using an ANOVA test with false discovery rate (FDR) correction ($\alpha = 0.05$).

Northern blot

For each biological replicate, total RNA from 50 adult male flies was extracted using Tri-Reagent (Sigma). The quality of the RNA was analyzed by capillary electrophoresis. Ten micrograms of total RNA was fractionated on a denaturing 15% polyacrylamide gel (7 M urea), electrotransferred to a Hybond-N⁺ membrane (Roche) and fixed by ultraviolet cross-linking (1200 mJ). Membranes were probed with DIG-labeled LNA probes (EXIQON) complementary to the mature miRNAs or with 5'-DIG-labeled DNA probes (snoRNA U6, loading control) (Supplementary Material, Table S8) at 52°C overnight in hybridization buffer (36 mM Na₂HPO₄, 14 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA and 7% SDS, pH 7.2). Anti-DIG-AP Fab fragment (Roche) was incubated at 1:10 000 for 1 h at room temperature. CDP-Star chemiluminescent substrate for AP (Roche) was used for detection. Images were taken in an ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare). Quantification of band intensity was carried out using the ImageJ software. Pairs of samples were compared using a two-tailed *t*-test ($\alpha = 0.05$), applying Welch's correction when necessary.

qRT-PCR from flies

For each biological replicate, total RNA from 50 adult flies was extracted using Trizol (Sigma). One microgram of RNA was digested with DNaseI (Invitrogen) and retrotranscribed with SuperScriptII (Invitrogen), using random hexanucleotides. For each biological replicate, qRT-PCR reactions from 10 ng of cDNA were carried out per triplicate using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems; Supplementary Material, Table S8). *tubulin84B* was used as the

endogenous control. Thermal cycling was performed in an ABI 7000 sequence detection system (Applied Biosystems). Relative expression to the endogenous gene and the control group was obtained by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Pairs of samples were compared using a two-tailed *t*-test ($\alpha = 0.05$), applying Welch's correction when necessary.

Drosophila lifespan analysis

A total of 100–150 newly hatched flies per genotype were collected, placed in tubes containing standard nutritive medium and kept at 25°C. The number of deceases was scored on a daily basis, and flies were transferred into fresh medium every 3–4 days. Survival curves were obtained using the Kaplan–Meier method, and statistical curve comparisons were carried out according to the log-rank (Mantel–Cox) test ($\alpha = 0.05$).

DM1 patients and skeletal muscle biopsies

All biopsy specimens were taken after informed consent was obtained. Muscle biopsies used for qRT–PCR studies were collected at the University Hospital Donostia (San Sebastian, Spain) and at the University Hospital La Fe (Valencia, Spain), using institutionally approved protocols by an ethical board. A detailed description on muscle type, sex, age and number of repeats is provided in Supplementary Material, Table S9. For the determination of the CTG repeat size, genomic DNA isolated from peripheral blood leukocytes (42) and Southern blots probed with 32 P-labeled cDNA25 or PCR amplification of CTG-repeat regions (DM101 and DM102 primers) (43–45) were performed. Muscle biopsies used for the analysis of HUMAN EXON 1.0 ST arrays and subsequent qRT–PCR validation of mRNA targets will be published elsewhere.

qRT–PCR from human samples

Human muscle biopsies were homogenized in a TissueLyser II (Qiagen), using QIAzol (Qiagen). RNA was then purified with a QIAcube (Qiagen), and the small RNA fraction was enriched using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen). For mature miRNA analysis, 40 ng of RNA from five DM1 patients and three controls were used as a template for cDNA synthesis with TaqMan microRNAs RT (Applied Biosystems), following the manufacturer's recommendations. Twelve nanograms of the cDNA template was then amplified per triplicate by qRT–PCR, using specific stem–loop RT-type primers and TaqMan miRNA probes (Applied Biosystems; Supplementary Material, Table S8). qRT–PCRs assays were carried out in a 7900 HT Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems) using the SDS software (version 2.2.2.). sno-RNA RNU48 was used as the endogenous control. For the analysis of human pri-miRNA and mRNA target levels, 1 µg of RNA from six DM1 patients and six healthy controls was used as a template for cDNA synthesis (RETROscript® Kit; Applied Biosystems). An amount of 20 ng of the cDNA template was then amplified per triplicate by qRT–PCR using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems; Supplementary Material, Table S8). In this case, *GADPH* was used as

the endogenous control. In all cases, relative expression to the endogenous gene and the control group was obtained by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Pairs of samples were compared using a two-tailed *t*-test ($\alpha = 0.05$), applying Welch's correction when necessary.

Cell culture and qRT–PCR from transdifferentiated cells

Human fibroblasts were isolated from skin biopsies of a DM1 patient with 333 CTG repeats at the time of diagnosis (2010) and healthy individuals (Supplementary Material, Materials and Methods), after informed consent was obtained, according to the guidelines of the Committee on the Use of Human Subjects in Research of the Donostia Hospital (San Sebastian, Spain). Fibroblasts were cultivated in DMEM (Invitrogen), 10% FBS (Invitrogen) and antibiotics, in humidified incubators at 37°C in 5% CO₂. Transdifferentiation into myoblast-like cells was induced by turning on the myogenic program, using retroviral-mediated expression of murine MyoD under the control of the Tet-on inducible construct (42). Transduction experiments using lentiviral vectors were performed overnight in the presence of polybrene (4 mg/ml; Sigma-Aldrich), and transduction efficiency was confirmed by MyoD immunostaining 1 day after inducing differentiation. More than 80% of the cells expressed MyoD, using a multiplicity of infection (MOI) of 20 without vector-associated cytotoxicity (not shown). The lentiviral vector titer was determined by qRT–PCR. To induce differentiation, cells in confluence were transferred to DMEM supplemented with 2% horse serum, 1% penicillin/streptomycin, transferrin (100 µg/ml) and insulin (10 µg/ml; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), and doxycycline (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) was added in the differentiation medium. Before (day 0) and after (day 10) transdifferentiation was induced, cells were collected, and RNA extracted with the miRNeasy Mini Kit (Qiagen). qRT–PCR was performed using specific stem–loop RT-type primers and TaqMan miRNA probes as described above and in Supplementary Material, Table S8. Relative expression to the endogenous gene and to the control group was obtained by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Pairs of samples were compared using a two-tailed *t*-test ($\alpha = 0.05$), applying Welch's correction when necessary.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank A. Lopez-Castel, A. Saenz, A. Bargiela, E. O'Connor and M.B. Llamusi for feedback on the manuscript, and C. Collado and M. Zulaica for technical support. Emissions generated by the University of Valencia during this work, estimated at some 5.5 CO₂ tones, have been compensated through a reforestation project.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported by research grants from Fundacion Ramon Areces, Generalitat Valenciana (Prometo/2010/081) and Ministerio de Ciencia e Innovacion (SAF2006-09121) to R.D.A. in collaboration with the biotechnology company Sistemas Genomicos S.L., by an FIS grant (FIS09-00660) and an Isabel Gemio Foundation grant to A.L.M., and an Acci3n Especial de Enfermedades Raras 'Cetegen' by Genoma Espa1a Foundation to R.D.A. and B.A. J.M.F.-C. was supported by a predoctoral fellowship from the Generalitat Valenciana and grants from Fundacion Ramon Areces and Banca Civica (Tu eliges tu decides initiative). A.G.-L. was supported by an FPU fellowship from Ministerio de Educacion y Ciencia and Banca Civica. O.J. was supported by a predoctoral fellowship from the Basque Government (AE-BFI-08.164). A.A. was supported by a Tecnico-FIS contract from the ISCIII, Ministerio de Economia y Competitividad. F.H.-T. was funded by Genoma Espa1a, and B.A. held a Ramon y Cajal (MEC) contract and an Amaroito (Comunidad Madrid-Fundaci3n Severo Ochoa) contract.

REFERENCES

- Sicot, G., Gourdon, G. and Gomes-Pereira, M. (2011) Myotonic dystrophy, when simple repeats reveal complex pathogenic entities: new findings and future challenges. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, R116–R123.
- Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Garcia-Alcover, L., Vicente-Crespo, M., Alvarez-Abril, M.C. and Artero, R.D. (2008) Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*. *PLoS One*, **3**, e1595.
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M. and Thornton, C.A. (2000) Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science*, **289**, 1769–1773.
- Chen, K.Y., Pan, H., Lin, M.J., Li, Y.Y., Wang, L.C., Wu, Y.C. and Hsiao, K.M. (2007) Length-dependent toxicity of untranslated CUG repeats on *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **352**, 774–779.
- Du, H., Cline, M.S., Osborne, R.J., Tuttle, D.L., Clark, T.A., Donohue, J.P., Hall, M.P., Shiue, L., Swanson, M.S., Thornton, C.A. *et al.* (2010) Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 187–193.
- Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M.S., Moxley, R.T. and Thornton, C.A. (2004) Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 3079–3088.
- Fardaei, M., Rogers, M.T., Thorpe, H.M., Larkin, K., Hamshere, M.G., Harper, P.S. and Brook, J.D. (2002) Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 805–814.
- Miller, J.W., Urbini, C.R., Teng-Umuay, P., Stenberg, M.G., Byrne, B.J., Thornton, C.A. and Swanson, M.S. (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J.*, **19**, 4439–4448.
- Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W. and Swanson, M.S. (2003) A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science*, **302**, 1978–1980.
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.S. and 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.
- Timchenko, L.T., Miller, J.W., Timchenko, N.A., DeVore, D.R., Datar, K.V., Lin, L., Roberts, R., Caskey, C.T. and Swanson, M.S. (1996) Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4407–4414.
- Lu, X., Timchenko, N.A. and Timchenko, L.T. (1999) Cardiac elav-type RNA-binding protein (ETR-3) binds to RNA CUG repeats expanded in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 53–60.
- Mahadevan, M.S., Yadava, R.S., Yu, Q., Balijepalli, S., Frenzel-McCardell, C.D., Bourne, T.D. and Phillips, L.H. (2006) Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.*, **38**, 1066–1070.
- Kalsotra, A., Xiao, X., Ward, A.J., Castle, J.C., Johnson, J.M., Burge, C.B. and Cooper, T.A. (2008) A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 20333–20338.
- Lin, X., Miller, J.W., Mankodi, A., Kanadia, R.N., Yuan, Y., Moxley, R.T., Swanson, M.S. and Thornton, C.A. (2006) Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 2087–2097.
- Ho, T.H., Bundman, D., Armstrong, D.L. and Cooper, T.A. (2005) Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 1539–1547.
- Zu, T., Gibbens, B., Doty, N.S., Gomes-Pereira, M., Hugueta, A., Stone, M.D., Margolis, J., Peterson, M., Markowski, T.W., Ingram, M.A. *et al.* (2011) Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **108**, 260–265.
- Moseley, M.L., Zu, T., Ikeda, Y., Gao, W., Mosemiller, A.K., Daughters, R.S., Chen, G., Weatherspoon, M.R., Clark, H.B., Ebner, T.J. *et al.* (2006) Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8. *Nat. Genet.*, **38**, 758–769.
- Lopez Castel, A., Nakamori, M., Thornton, C.A. and Pearson, C.E. (2011) Identification of restriction endonucleases sensitive to 5-cytosine methylation at non-CpG sites, including expanded (CAG)_n/(CTG)_n repeats. *Epigenetics*, **6**, 416–420.
- Lopez Castel, A., Nakamori, M., Tome, S., Chitayat, D., Gourdon, G., Thornton, C.A. and Pearson, C.E. (2011) Expanded CTG repeat demarcates a boundary for abnormal CpG methylation in myotonic dystrophy patient tissues. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 1–15.
- Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemin, J.P., Fischer, M.C., Jost, B., Dembele, D., Gourdon, G., Nicole, A., Duboc, D. *et al.* (2011) Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 840–845.
- Gambardella, S., Rinaldi, F., Lepore, S.M., Viola, A., Loro, E., Angelini, C., Vergani, L., Novelli, G. and Botta, A. (2010) Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *J. Transl. Med.*, **8**, 48.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S. and Bartel, D.P. (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, **466**, 835–840.
- Ambros, V. (2001) microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, **107**, 823–826.
- Lewis, B.P., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, **120**, 15–20.
- Fasanaro, P., Greco, S., Ivan, M., Capogrossi, M.C. and Martelli, F. (2010) microRNA: emerging therapeutic targets in acute ischemic diseases. *Pharmacol. Ther.*, **125**, 92–104.
- van Rooij, E., Liu, N. and Olson, E.N. (2008) MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet.*, **24**, 159–166.
- Latronico, M.V. and Condorelli, G. (2009) MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat. Rev. Cardiol.*, **6**, 419–429.
- Eisenberg, I., Eran, A., Nishino, I., Moggio, M., Lamperti, C., Amato, A.A., Lidov, H.G., Kang, P.B., North, K.N., Mitrani-Rosenbaum, S. *et al.* (2007) Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 17016–17021.
- Perbellini, R., Greco, S., Sarra-Ferraris, G., Cardani, R., Capogrossi, M.C., Meola, G. and Martelli, F. (2011) Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul. Disord.*, **21**, 81–88.
- Braida, C., Stefanatos, R.K., Adam, B., Mahajan, N., Smeets, H.J., Niel, F., Goizet, C., Arveiler, B., Koenig, M., Lagier-Tourenne, C. *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.
- Musova, Z., Mazanec, R., Krepelova, A., Ehler, E., Vales, J., Jaklova, R., Prochazka, T., Koukal, P., Marikova, T., Kraus, J. *et al.* (2009) Highly

- unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *Am. J. Med. Genet. A*, **149A**, 1365–1374.
33. Leeflang, E.P. and Arnheim, N. (1995) A novel repeat structure at the myotonic dystrophy locus in a 37 repeat allele with unexpectedly high stability. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 135–136.
 34. 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.
 35. Ryazansky, S.S., Gvozdev, V.A. and Berezikov, E. (2011) Evidence for post-transcriptional regulation of clustered microRNAs in *Drosophila*. *BMC Genomics*, **12**, 371.
 36. Garcia-Casado, M.Z., Artero, R.D., Paricio, N., Terol, J. and Perez-Alonso, M. (2002) Generation of GAL4-responsive muscleblind constructs. *Genesis*, **34**, 111–114.
 37. Llamusi, B., Bargiela, A., Fernandez-Costa, J.M., Garcia-Lopez, A., Klima, R., Feiguin, F. and Artero, R. (2012) Muscleblind, BSF, and TBPB are mis-localized in the muscle sarcomere of a *Drosophila* myotonic dystrophy model. *Dis. Model. Mech.*, doi:10.1242/dmm.009563.
 38. Sokol, N.S. and Ambros, V. (2005) Mesodermally expressed *Drosophila* microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. *Genes. Dev.*, **19**, 2343–2354.
 39. Stark, A., Brennecke, J., Russell, R.B. and Cohen, S.M. (2003) Identification of *Drosophila* microRNA targets. *PLoS Biol.*, **1**, E60.
 40. Gehrke, S., Imai, Y., Sokol, N. and Lu, B. (2010) Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature*, **466**, 637–641.
 41. Sobrino, A., Mata, M., Laguna-Fernandez, A., Novella, S., Oviedo, P.J., Garcia-Perez, M.A., Tarin, J.J., Cano, A. and Hermenegildo, C. (2009) Estradiol stimulates vasodilatory and metabolic pathways in cultured human endothelial cells. *PLoS One*, **4**, e8242.
 42. Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 1215.
 43. Aslanidis, C., Jansen, G., Amemiya, C., Shutler, G., Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Chen, C., Alleman, J., Wormskamp, N.G., Vooijs, M. *et al.* (1992) Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. *Nature*, **355**, 548–551.
 44. Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.P., Hudson, T. *et al.* (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, **68**, 799–808.
 45. Buxton, J., Shelbourne, P., Davies, J., Jones, C., Van Tongeren, T., Aslanidis, C., de Jong, P., Jansen, G., Anvret, M., Riley, B. *et al.* (1992) Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature*, **355**, 547–548.