



VNIVERSITAT[̄] DE VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Genética
Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Mejora de la actividad de un hexapéptido anti-DM1 y análisis de las relaciones entre estructura y actividad de hexapéptidos de secuencia similar

Tesis doctoral
Presentada por: **Anna Serafina Rapisarda**
Octubre de 2019

Dirigida por: **Prof. Dr. Rubén D. Artero Allepuz**

Este trabajo se ha enmarcado dentro del proyecto “Análisis de las relaciones entre estructura y actividad de hexapéptidos anti-distrofia miotónica” financiado por la Federación Española Enfermedades Raras (FEDER), Asociación Española contras las Enfermedades Neuromusculares (ASEM) y la Fundación Isabel Gemio dentro del programa “Todos Somos Raros Todos Somos Únicos”.

A mia Mamma
e
alla nostra Vittoria

Índice General

Introducción	1
1. Distrofia miotónica tipo 1: prevalencia y síntomas	3
1.1. Los loci DM1 y DM2: base genética de las Distrofías Miotónicas.....	6
1.2. Anticipación genética.....	8
1.3. Inestabilidad somática de las repeticiones.....	10
2. Mecanismo molecular de patogénesis	11
2.1. Modelo de haploinsuficiencia de DMPK.....	11
2.2. Alteración en Cis de genes vecinos.....	13
2.3. Ganancia de función tóxica del RNA.....	15
2.3.1. Secuestro de factores de transcripción.....	16
2.3.2. Secuestro de factores de splicing y espliceopatía.....	18
2.3.3. Secuestro y alteración de microRNAs en DM1.....	23
3. Las proteínas Muscleblind	24
3.1. Motivos funcionales y reconocimiento de RNA.....	26
3.2. Implicación en el procesamiento de RNAs.....	27
4. Mantenimiento y regeneración muscular en DM1	29
4.1. Rutas autofágicas alteradas en DM1.....	30
4.2. Organización de la estructura muscular en DM1.....	31
5. Modelos animales como herramienta de investigación	32
5.1. Modelos animales en DM.....	33
5.2. Modelos de DM1 en Drosophila.....	34
5.3. Modelos en ratón.....	35
5.4. Modelo en células humanas.....	36
6. Estado actual en el desarrollo de tratamientos para la Distrofia miotónica	39
6.1. Dianas moleculares y conceptos generales del diseño terapéutico en DM1	39
6.2. Estrategias propuestas para la intervención terapéutica en DM1.....	40
6.3. Pequeñas moléculas como terapia para la DM.....	43
7. Los péptidos como terapéuticos	45
7.1. Descubrimiento y caracterización de un péptido anti-DM1: Abp1.....	47

Índices

7.2. Proceso HIT to LEAD.....	49
Objetivos.....	53
Resultados.....	59
I-MEJORA DE LA ACTIVIDAD DE ABP1.....	61
1. Estudio preliminar de Abp1 en célula.....	61
2. Diseño racional y síntesis de moléculas peptídicas derivadas de Abp1.....	64
2.1. Modificaciones que aumentan la estabilidad.....	64
2.2. Modificaciones que aumentan la permeabilidad en la célula.....	66
2.3. Búsqueda de los aminoácidos funcionales de Abp1.....	68
2.3.1. Estudio computacional de la conformación de Abp1 y péptidos relacionados	68
2.3.2. Espectroscopia de Infrarrojos (FTIR) del péptido Abp1, RNA y su interacción	71
3. Evaluación de la actividad de los derivados en Drosophila.....	75
3.1. Rescate del fenotipo de atrofia.....	76
3.2. Rescate funcional.....	78
3.2.1. Rescate funcional de escalada y de vuelo.....	78
4. Evaluación de la actividad en un modelo celular humano.....	80
4.1. Liberación de MBNL1	80
4.2. Rescate de eventos de splicing típicamente alterados en DM1.....	82
II. Estudio de la actividad de hexapéptidos con secuencias relacionada con Abp1	84
1. Evaluación de la actividad en un modelo celular.....	85
1.1. Rescate de eventos de splicing alterados en DM1.....	85
1.2. Evaluación de los niveles de expresión de MBNL1 y MBNL2.....	87
2. Selección de cuatro péptidos y estudio de su actividad anti DM1.....	88
2.1. Especificidad de la actividad observada y toxicidad de los péptidos.....	90
2.2. Liberación de MBNL1 en el citoplasma y niveles de proteína.....	92
2.3. Disminución del número de foci ribonucleares.....	93
2.4. Mejora en la diferenciación muscular.....	95
2.5. Reducción de marcadores de autofagia.....	97
3. Evaluación de la actividad en un modelo de DM1 en Drosophila	98

3.1. Rescate del fenotipo de atrofia.....	98
3.2. Rescate funcional de escalada y de vuelo.....	99
III. Estudio del mecanismo de acción de los péptidos.....	102
1. Interacción de los péptidos con las repeticiones tóxicas.....	102
1.1. Ensayos de Desplazamiento de Tiazol naranja (FID).....	103
1.2. Experimentos de <i>Differential Scanning Fluorimetry</i>	105
2. Modelización computacional de los péptidos: la interacción con el RNA	107
2.1. Análisis estructural de los péptidos.....	107
2.2. Estudio del mecanismo de interacción mediante <i>docking</i> molecular	108
3. Localización subcelular del péptido marcado.....	111
3.1. Colocalización con MBNL1.....	112
3.2. Colocalización con vesículas autofágicas.....	113
Discusión.....	117
1. Evaluación de la actividad anti-DM1 de los compuestos derivados de Abp1	119
1.1. Potencial y límites de las posibles modalidades de administración	120
1.2. El motivo PPII y la actividad biológica de los hexapéptidos.....	122
1.3. Optimización de la actividad biológica afinando las modificaciones.	124
1.3.1. Abp1 de Peptoide a Peptamero.....	124
1.3.2. Incorporación de aminoácidos con carga positiva.....	126
2. Interpretación de la diversidad de los resultados obtenidos en el modelo celular humano.....	127
2.1. Relación entre actividad biológica y secuencia aminoacídica.....	127
2.2. La diversidad de los efectos biológicos puede residir en diferentes mecanismos de acción.....	129
2.2.1. Hipótesis de un posible mecanismo de acción alternativo y novedoso	130
3. Evaluación y calificación de los cuatro péptidos seleccionados según su actividad en los modelos de la enfermedad.....	134

Índices

4. Potencial traslacional de los hexapéptidos.....	135
Conclusiones.....	139
Material y Métodos.....	145
1. Material.....	147
1.1. Material biológico.....	147
1.1.1. Línea celular.....	147
1.1.2. Cepas de Drosophila Melanogaster.....	147
1.2. Enzimas.....	148
1.3. Kits.....	148
1.4. Oligonucleótidos.....	149
1.4.1. Cebadores para PCR.....	149
1.4.2. Cebadores para PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	149
1.5. Anticuerpos.....	150
1.6. Programas informáticos.....	150
1.7. Aparataje.....	151
1.8. Recursos en red.....	151
2. Métodos.....	152
2.1. Métodos moleculares.....	152
2.1.1. Extracción de RNA de células humanas.....	152
2.1.2. Tratamiento con DNasa y Retrotranscripción (RT).....	152
2.1.2.1. PCR convencional	153
2.1.2.2. PCR cuantitativa	153
2.1.3. Extracción de proteína de células humanas.....	153
2.1.3.1. Cuantificación de proteína.....	154
2.1.3.2. Detección de proteínas por Western blot.....	154
2.2. Manejo de Drosophila Melanogaster.....	156
2.2.1. Alimentación con los compuestos a probar.....	156
2.2.2. Ensayos funcionales.....	156
2.2.2.1. Ensayo de escalada.....	156
2.2.2.2. Ensayo de vuelo.....	157
2.2.3. Análisis histológico de secciones semifinas de músculo.....	159
2.2.3.1. Protocolo de inclusión de las muestras en resina.....	159
2.3. Métodos celulares.....	160

2.3.1.	Congelación y descongelación de células.....	160
2.3.2.	Condiciones de cultivos de fibroblastos.....	160
2.3.3.	Recuento de células.....	160
2.3.4.	Siembra.....	161
2.3.6.	Tratamiento con compuestos y fijación.....	162
2.3.7.	Ensayo de toxicidad.....	163
2.3.8.	Hibridación fluorescente in situ (FISH).....	163
2.3.9.	Tinciones inmunohistoquímicas.....	164
2.3.10.	Tinción con LysoTracker	164
2.4.	Ensayos <i>in vitro</i>	165
2.4.1.	Espectroscopia de Infrarrojos.....	165
2.4.2.	Ensayo de Desplazamiento de Intercalante Fluoscente (FID).....	165
2.4.3.	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i> (DSF).....	165
2.5.	Análisis de imágenes.....	166
2.5.1.	Análisis de foci ribonucleares.....	166
2.5.2.	Análisis de la intensidad de bandas.....	167
2.5.3.	Análisis de las secciones de tórax.....	168
2.5.4.	Cuantificación del índice de fusión y niveles de diferenciación muscular	169
2.5.5.	Análisis estadístico.....	169
	Apéndice	171
	Bibliografía	177

Índice De Figuras

Introducción

Figura I-1. Patrón multisistémico de la distrofia miotónica.....	4
Figura I-2. Representación del posible modelo de Haploinsuficiencia de DMPK.....	12
Figura I-3. Representación del modelo de alteración de los genes adyacentes.....	14
Figura I-4. Representación del modelo de ganancia de función toxica del RNA.....	15
Figura I-5. Antagonismo de las proteínas MBNL1 y CELF1.....	22
Figura I-6. Fases de la patogénesis de DM1 y posibles enfoques terapéuticos.....	41
Figura I-7. Mecanismos de acción de compuestos anti-DM1 seleccionados.....	44
Figura I-8. Estado de desarrollo actual de los péptidos terapéuticos.....	46
Figura I-9. Rastros de moléculas para el descubrimiento de fármacos.....	50

Resultados

Figura R-1. Localización subcelular de Abp1 en células de Drosophila y de ratón...	61
Figura R-2. Localización subcelular de Abp1 en células de humano.....	63
Figura R-3. Comparación esquemática entre un péptido y un peptoid.....	65
Figura R-4. El motivo poliprolina (PPII).....	69
Figura R-5. Estudio de la estructura preferente de los nuevos derivados.....	71
Figura R-6. Interacción entre el péptido Abp1 y las repeticiones (CUG) ₆₀	73
Figura R-7. Modelo muscular de DM1 en Drosophila.....	75
Figura R-9. Evaluación del rescate funcional.....	79
Figura R-10. Evaluación de los niveles nucleares de MBNL1 en células DM1.....	81
Figura R-11. Evaluación de <i>splicing</i> tras el tratamiento con los derivados de Abp1.	82
Figura R-12. Evaluación de <i>splicing</i> tras el tratamiento con los péptidos relacionados a Abp1	86
Figura R-13. Variación de los niveles de expresión de MBNL1 y 2 en respuesta al tratamiento.....	87
Figura R-14. Ensayos para caracterizar la especificidad de la actividad de los péptidos seleccionados.....	91

Figura R-15. Efectos de los péptidos seleccionados sobre la proteína MBNL1.....93

Figura R-16. Efecto del tratamiento con los péptidos seleccionados sobre los foci ribonucleares.....94

Figura R-17. Inmunodetección de mioblastos que expresan desmina.....96

Figura R-18. Visualización de vesículas lisosomales como marcador de autofagia.97

Figura R-19. Evaluación de los niveles de atrofia en Drosophila.....99

Figura R-20. Evaluación del rescate funcional de las capacidades de escalada y de vuelo.....101

Figura R-21. Estudio interacción RNA-Péptidos con fluoróforo intercalante.....104

Figura R-22. Estudio interacción RNA-Péptidos con fluoróforo específico por RNA a doble cadena.....108

Figura R-23. Estructura secundaria preferente en los 4 péptidos seleccionados...108

Figura R-24. Modelización de la posible interacción entre los péptidos seleccionados y el RNA.....110

Figura R-25. Caracterización de la localización subcelular del péptido 79 marcado.111

Figura R-26. Colocalización de la proteína MBNL1 con el péptido 79 marcado.....113

Figura R-27. Colocalización del péptido 79 marcado con la proteína autofágica LC3.114

Discusión

Figura D-1. Actividad de los péptidos derivados en modelo de DM1 en Drosophila.119

Figura D-2. Esquema de los diferentes tipos de tratamiento.....121

Figura D-3. Comparación de los ZnF de MBNL y de los péptidos.....131

Figura D-4. Hipótesis de Mecanismo de Acción.....133

Figura D-5. Evaluación general de la actividad anti-DM1 de los cuatro péptidos seleccionados.....134

Figura D-6. Clasificación de los péptidos según su potencial terapéutico136

Índices

Material y métodos

Figura MM- 1. Sistema de transferencia en semi seco.....	155
Figura MM- 2. Representación del ensayo de escalada.....	157
Figura MM- 3. Representación del ensayo de vuelo.....	158
Figura MM-4. Representación esquematizada del sistema Tet-on.....	161
Figura MM-5. Esquema del protocolo de cultivo célula.....	162
Figura MM-6. Cuantificación del número de foci por célula.....	166
Figura MM-7. Cuantificación de bandas.....	167
Figura MM-8. Cuantificación del área muscular.....	168

Índice De Tablas

Tabla I-1. Manifestaciones clínicas en DM1 de inicio adulto.....	6
Tabla I-2. Correlación entre el número de repeticiones CTG y síntomas en DM1.....	7
Tabla I-3. Ejemplos de genes con expresión reducida por expresión de expansiones CUG.....	17
Tabla I-4. Ejemplos de eventos de <i>splicing</i> alternativo desregulados en DM1.....	20
Tabla R-1. Derivados de Abp1.....	74
Tabla R-2. Lista de hexapéptidos obtenidos por deconvolución de la quimioteca...84	
Tabla R-3. Secuencia y actividad de los péptidos relacionados con Abp1.....	89
Tabla D-1. Estudio de la relación entre la actividad biológica y la contribución posicional de los aminoácidos.....	128
Tabla MM-1. Cepas de <i>Drosophila Melanogaster</i> utilizadas en este trabajo.....	147
Tabla MM-2. Enzimas utilizados.....	148
Tabla MM-3. Kit comerciales utilizados.....	148
Tabla MM-4. Cebadores utilizados en PCR convencional para amplificación de cDNA	149
Tabla MM-5. Cebadores utilizados en qPCR.....	149
Tabla MM-6. Anticuerpos y colorantes usados en este trabajo.....	150
Tabla MM-7. Programas informáticos.....	150
Tabla MM-8. Aparatos utilizados para la realización de los experimentos.....	151
Tabla MM-9. Bases de datos	151

INTRODUCCIÓN

1. Distrofia miotónica tipo 1: prevalencia y síntomas

Las distrofias musculares son enfermedades genéticas, progresivas y degenerativas que presentan como síntoma principal la debilidad muscular. Con la transición a la era genética, el número de distrofias musculares identificadas ha aumentado significativamente, pero también lo ha hecho nuestra comprensión de sus patogénesis y las habilidades diagnósticas. Esto ha sido posible gracias a la identificación de características clínicas asociadas con cada tipo de distrofia, lo cual permite perfeccionar cada vez más las correlaciones entre fenotipo y genotipo (Wicklund 2013). Entre todas, la distrofia miotónica de tipo 1 (DM1) se considera hoy como la forma más común de distrofia muscular (seguida por la distrofia muscular de Duchenne y la distrofia muscular facioescapulohumeral), con una prevalencia que oscila entre 0.5 y 18.1 por cada 100.000 habitantes (Theadom *et al.* 2014). Un rango tan amplio se puede justificar por un lado con la diversidad de los métodos elegidos para el cálculo de la prevalencia, por otro con la presencia de casos extremos como el registrado en 1990 en un área geográficamente aislada del Quebec (Mathieu *et al.* 1990; Mathieu and Prevost 2012), en el que se llegó a observar una prevalencia de 189 sobre 100.000 y que seguramente fue debido al fenómeno del efecto fundador.

La Distrofia Miotónica de tipo 1 (DM1, OMIM #160900) fue descrita por primera vez en 1909 por el internista de medicina alemán Hans Gustav Wilhelm Steinert (por eso en un primer momento se llamó enfermedad de Steinert), que la describió como “trastorno neuromuscular caracterizado por progresión distrófica con miotonía en el examen clínico” (Romeo 2012). Desde el primer momento resultó evidente el pleiotropismo que caracteriza la enfermedad cuyos aspectos clínicos son además extremadamente variables.

Gracias a la gran cantidad de estudios que se han completado desde el día de su identificación hasta el día de hoy, la caracterización clínica de la distrofia miotónica

Introducción

está muy avanzada, aunque todavía en continua expansión. Sin duda, el aspecto clínico principal y más evidente es la afectación del tejido muscular, que presenta síntomas como miotonía, debilidad y degeneración progresiva. Entre estos, el fenotipo más característico de la enfermedad es, sin duda, la miotonía, que consiste en la dificultad para relajar un músculo después de su contracción voluntaria (Figura I-1, panel a).

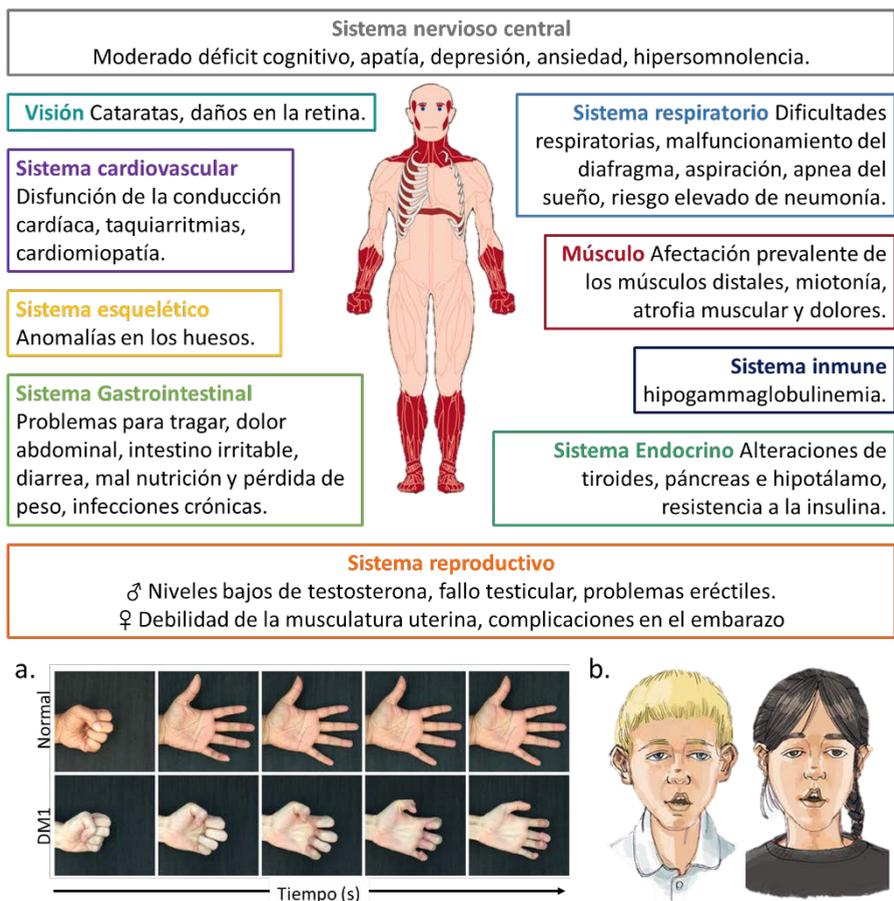


Figura I- 1. Patrón multisistémico de la distrofia miotónica.

En la figura se resumen los sistemas afectados en la distrofia miotónica de tipo 1. Se indican para cada uno de ellos los aspectos clínicos más comunes en la mayoría de los pacientes. **a.** Entre los síntomas mas característicos de DM está la miotonía, que consiste en la relajación lenta de los músculos después de la contracción voluntaria o la estimulación eléctrica. **b.** Representación de las características faciales propias de pacientes DM1, debidas a la debilidad y atrofia de los músculos faciales.

En concomitancia, la degeneración muscular progresiva (o distrofia) causa una debilidad muscular generalizada, que constituye la principal causa de discapacidad para los pacientes, ya que les dificulta realizar los movimientos normales. Durante las primeras fases de la enfermedad, son los músculos distales los que están más comprometidos, pero con la progresión de la patología también puede verse afectada la musculatura proximal. Muy importante es también la afectación del sistema respiratorio, donde los pacientes presentan debilidad evidente de los músculos respiratorios y apnea del sueño. La apariencia facial típica de los pacientes con DM1 ("cara miopática") es una característica prominente y temprana causada por la debilidad y la atrofia de los músculos faciales y la ptosis que pueden dar la falsa impresión de cansancio, tristeza o falta de emoción en los pacientes (Stahl *et al.* 2016). La debilidad grave de los músculos oculares orbiculares no solo causa ptosis, sino también un cierre insuficiente del párpado con riesgo de conjuntivitis recurrente (Figura I-1, panel b).

Los defectos observados en la musculatura esquelética se extienden también al músculo cardíaco, donde se observan disfunciones como la arritmia, el bloqueo de la conducción eléctrica, el síncope cardiogénico y la hipotensión. Un paro cardíaco o respiratorio suelen ser las causas más comunes de mortalidad, ya que pueden causar la muerte súbita del paciente (Mathieu *et al.* 1999).

Después del músculo, el segundo sistema más afectado es el sistema nervioso central (SNC). Entre los síntomas más evidentes destacan la somnolencia diurna excesiva, un déficit cognitivo y trastornos emocionales, comportamentales y sociales. Hasta la fecha no se han establecido relaciones directas entre estos síntomas y los defectos histológicos y moleculares típicamente observados, tales como una reducción del volumen cerebral, atrofia cortical y lesiones en la sustancia blanca.

Introducción

Aunque la sintomatología descrita anteriormente es la más recurrente y relevante, como anticipamos, la DM1 es una enfermedad multisistémica en la que los síntomas implican prácticamente cualquier tejido del cuerpo humano (Figura I-1).

Tabla I-1. Manifestaciones clínicas en DM1 de inicio adulto

Genética	
Herencia	Autosómica dominante
Anticipación	Pronunciada
Cromosoma	19q13.3
Locus	<i>DMPK</i>
Mutación	expansión CTG
Debilidad muscular	
Cara	Sí
Ptosis	Sí
Disfagia	Sí, en edades avanzadas
Distal	Sí
Proximal	En edades avanzadas
Síntomas musculares	
Pérdida de fuerza	Ocasional
Atrofia	Cara, temporal, distal
Atrofia de las fibras	Disminución de tamaño de fibras tipo 1
Síntomas cardíacos	Común
Síntomas neurológicos	
Cambios en comportamiento	Común
Somnolencia	Común
Problemas del SNC en la infancia	Común
Otros	
Diabetes	Ocasional
Cataratas	Común
Calvicie frontal en hombres	Generalmente presente
Expectativa de vida	Reducida

Los síntomas relacionados con el tracto gastrointestinal, el sistema endocrino, el sistema reproductor y otros órganos específicos se resumen en la Tabla I-1 (Thomas *et al.* 2018).

1.1. Los loci DM1 y DM2: base genética de las Distrofías Miotónicas

La Distrofía Miotónica de tipo 1 es una enfermedad genética autosómica dominante que presenta una penetrancia elevada y una expresividad muy variable.

Solo desde 1992 fue posible un diagnóstico molecular gracias al descubrimiento de la mutación que la provoca (Brook *et al.* 1992). En ese año Brook y colaboradores asociaron por primera vez la DM1 a una mutación localizada en la región cromosómica 19q13.2-q13.3, ocupada por el 3' UTR (del inglés *Untranslated Región*) del gen de la *proteína quinasa de la distrofia miotónica (DMPK, Entrez #1760)*. Se trata de una mutación dinámica que consiste en una expansión de repeticiones del trinucleótido CTG. Se observó, además, que el número de tripletes repetidos correlacionaba con la edad de aparición de los síntomas y con la gravedad de los mismos (Harley *et al.* 1992).

La DM1 se clasifica en varias subcategorías, utilizando como parámetro objetivo el número de repeticiones observadas en el paciente, que generalmente está estrechamente relacionado con el cuadro clínico. Se considera paciente de DM1, un individuo en el que el número de repeticiones es mayor de 50, siendo el valor característico de la población sana un número comprendido entre 5 y 35 copias. Cuando el número de repeticiones está entre 50 y 100, se habla de DM1 de inicio adulto, en la que la aparición de los síntomas se produce entre los 20 y los 70 años; si la expansión sube el número de repeticiones hasta 150-1000, se trata de DM1 de inicio infantil, ya que la sintomatología es observable desde los 10 años. Finalmente, existe una forma congénita de la enfermedad con un cuadro clínico

Tabla I-2. Correlación entre el número de repeticiones CTG y síntomas en la DM1

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

Introducción

dramáticamente más grave y presente ya en el momento del nacimiento; en este caso el número de copias puede ser de varios miles (Tabla I-2).

Dos años después de la determinación del diagnóstico genético de DM1, en un trabajo de 1994, Thornton y colaboradores describieron casos clínicos caracterizados por una sintomatología muy parecida a la enfermedad de Steinert, que, sin embargo, muestra un número normal de repeticiones (Thornton *et al.* 1994). La explicación para esta observación se obtuvo poco años después, cuando se identificó una mutación ubicada en el cromosoma 3q21.3. De manera similar a la mutación observada en pacientes con DM1, la nueva mutación consistía en la expansión de repeticiones CCTG en el intrón 1 del gen *ZNF9* (*proteína de dedos de zinc 9*, Entrez # 7555) (Liquori *et al.* 2001). Fue así posible relacionar esta mutación con la patología observada por Thornton y colaboradores, que desde entonces fue llamada Distrofia Miotónica tipo 2 (DM2 o PROMM, OMIM # 602668). Con una prevalencia de 1 en 100.000 (en Europa) la DM2 constituye el 2% de todos los casos de Distrofia Miotónica. Su rango patológico está establecido entre 75 y 11.000 repeticiones CCTG y en general su sintomatología suele ser más leve, careciendo además de una forma congénita. Otra diferencia principal entre las dos enfermedades es que mientras en DM1 se ven primariamente afectados los músculos distales, en DM2 los síntomas se manifiestan prevalentemente en los proximales.

1.2. Anticipación genética

El término anticipación fue acuñado a principios de los años '90 para describir a un patrón de herencia en el que la gravedad de los síntomas de una patología dada puede aumentar generación tras generación y además aparecer a una edad más joven. Aunque ya se había observado a mediados de 1800, la falta de evidencia experimental para explicar este fenómeno hizo que la comunidad científica no lo aceptara hasta muchos años después. Ente 1991 y 1992 se identificaron en rápida

sucesión las mutaciones genéticas responsables de síndrome del X Frágil y la Distrofia miotónica, ambas caracterizadas por la expansión de una región repetitiva de DNA. Quedó claro que este era el mecanismo molecular que subyace a la anticipación genética (Harper *et al.* 1992). En pocas palabras, cuanto más inestables y largas se volvían las expansiones de repeticiones, antes y más gravemente se manifestaba la enfermedad (Friedman 2011).

Una característica de las secuencias repetitivas cortas es su inestabilidad en las células de la línea germinal. De hecho, durante la gametogénesis, el número de tripletes puede aumentar o, en algunos casos, reducirse (McMurray 2010). Como se indicó anteriormente, como consecuencia del aumento en el número de repeticiones, se observa un cuadro clínico progresivamente más grave. Como consecuencia, un ligero aumento en el número de repeticiones podría ser asintomático en los descendientes, pero con el paso de las generaciones el tamaño de la expansión podría aumentar hasta alcanzar valores patológicos. En la DM1, las formas más graves de la enfermedad se transmiten exclusivamente a través de la madre, ya que los alelos con más de 600 repeticiones solo pueden heredarse por vía materna (Dean *et al.* 2006). En la línea germinal masculina, por otro lado, generalmente se generan alelos con alrededor de 100 repeticiones, mientras que los alelos con una cantidad de repeticiones entre 200 y 600 se pueden encontrar en la línea germinal de ambos sexos, pero sobre todo de la madre (Pratte *et al.* 2015; Barbe *et al.* 2017).

Las mutaciones de secuencias repetitivas cortas dentro de genes específicos, son la causa de más de 40 enfermedades solo en humanos y el fenómeno de anticipación genética no siempre está presente y no siempre presenta las mismas características. Fallos relacionados con la recombinación meiótica, replicación y la reparación del DNA en la gametogénesis, han sido propuestos como posibles causas de la inestabilidad de las repeticiones. Aun así, los mecanismos moleculares que

Introducción

dan lugar a diferencias tan drásticas entre diferentes enfermedades y diferentes tipos de repeticiones están todavía por definir (Friedman 2011).

1.3. Inestabilidad somática de las repeticiones

La inestabilidad somática de las repeticiones CTG es otro mecanismo molecular importante para caracterizar la distrofia miotónica ya que contribuye a aumentar significativamente el grado de diversidad sintomática observada en pacientes con DM1. La generación de gametos no es el único proceso durante el que se puede observar una expansión adicional de las repeticiones CTG. Este fenómeno también se ha observado en las células somáticas de los pacientes, en los que el número de repeticiones puede variar de un tejido a otro, aumentando a lo largo de la vida y provocando el empeoramiento progresivo de los síntomas. Los tejidos y los órganos en los que se observa el mayor grado de inestabilidad son el sistema linfático, el páncreas, el hígado, el riñón, el corazón, el cerebro y, sobre todo, el músculo esquelético en el que se puede observar una diferencia de miles de repeticiones con respecto a los leucocitos, por ejemplo (Ashizawa *et al.* 1993). Por lo tanto, se puede afirmar que el número de repeticiones presentes en el genoma de los padres junto con la inestabilidad somática son los factores que más influyen en la edad de aparición de los síntomas.

En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se han utilizado diferentes tipos de sistemas modelo. Los resultados obtenidos de estudios con bacterias, levaduras, moscas, líneas celulares de humano o de ratón han sido altamente heterogéneos, por lo que el o los mecanismos subyacentes a la inestabilidad característica de las repeticiones cuyo número sobrepasa un cierto umbral, sigue siendo un tema controvertido.

La atención de los investigadores se ha centrado sobre todo en los procesos de replicación, transcripción recombinación y reparación del DNA (Kim and Jinks-Robertson 2012; Liu and Wilson 2012; Usdin *et al.* 2015). De hecho, es muy

probable que el correcto funcionamiento de estos procesos pueda ser puesto a prueba por la formación de estructuras secundarias complejas, características de secuencias repetitivas del DNA (Mirkin 2006; Kaushik *et al.* 2016).

Se ha observado que, durante la replicación, el número de repeticiones puede aumentar o disminuir según la hebra en la que se encuentra la mutación: si la mutación se encuentra en la hebra del molde, la formación de horquillas durante la replicación provoca una disminución en el número de repeticiones; si, por el contrario, estas estructuras se encuentran en el hebra copia, se producirá deslizamiento entre las hebras y una expansión de las repeticiones (Mirkin 2007; Liu and Leffak 2012). Evidencias experimentales también han demostrado que el número de repeticiones y la tasa de mutación están relacionadas, lo que confirma la existencia de un mecanismo de mutagénesis inducido por repeticiones llamado RIM (del inglés *Repeat-Induced Mutagenesis*) (Shah *et al.* 2012).

2. Mecanismo molecular de patogénesis

La distrofia miotónica es solo una de las muchas enfermedades causadas por la expansión de una secuencia repetida ubicada en la región no codificante de un gen. Al tratarse de una región de DNA que no se traduce, comprender cómo esta mutación puede dar lugar a una patología tan compleja es un desafío aún más intrigante. A lo largo de los años se han propuesto varios mecanismos, algunos de los cuales han sido refutados posteriormente y otros confirmados. No obstante, el debate sigue abierto para establecer la contribución de los diversos mecanismos a la creación de una sintomatología diversificada (Mateos-Aierdi *et al.* 2015).

2.1. Modelo de haploinsuficiencia de *DMPK*

El bloqueo del transporte al citoplasma del mRNA mutante, transcrito a partir del alelo que lleva la expansión de las repeticiones, se ha indicado en muchos estudios

Introducción

como la principal causa del desarrollo de la distrofia miotónica (Figura I-2). En efecto, a pesar de ser procesados y poliadenilados, los transcritos mutantes de *DMPK* son retenidos en el núcleo donde se acumulan formando agregados insolubles (Carango *et al.* 1993; Fu *et al.* 1993).

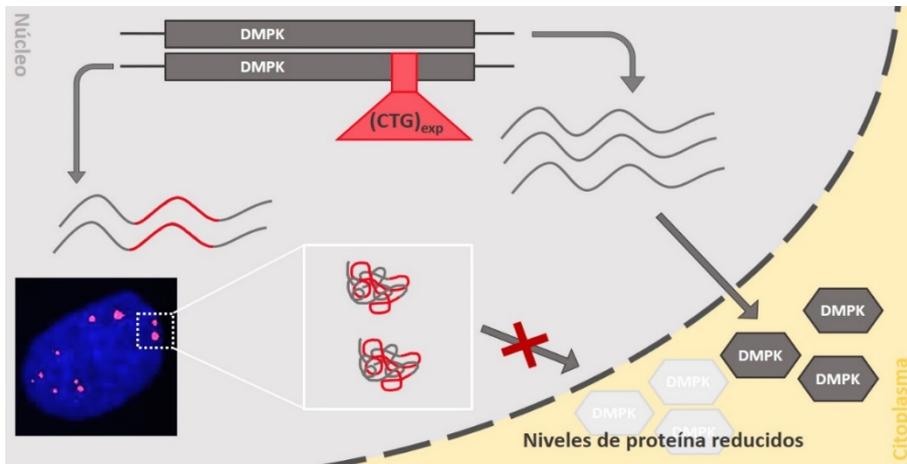


Figura I- 2. Representación del posible modelo de Haploinsuficiencia de DMPK.

En DM1 el alelo mutado del gen *DMPK* viene transcrito en el núcleo. Los mRNAs que llevan las repeticiones CUGs expandidas se acumulan formando los focos ribonucleares y no son traducidos, provocando una disminución de los niveles de proteína.

Esta observación, junto con el hecho de que en muchos estudios se encontraron niveles reducidos de mRNA y proteína en pacientes con DM1, llevó a considerar la haploinsuficiencia de *DMPK* como posible causa de la enfermedad. Sin embargo, esta hipótesis fue objeto de debate durante años ya que estudios posteriores indicaban niveles iguales o incluso mayores de transcritos de *DMPK* (Jansen *et al.* 1996; Carrell *et al.* 2016).

Otro punto en contra de esta hipótesis es el hecho de que en DM2, después del procesamiento del mRNA, el intrón que contiene la mutación permanece en el núcleo donde precipita en agregados. Sin embargo, una diferencia sustancial radica en el hecho de que los transcritos maduros del gen *ZNF9* son transportados al citoplasma y se traducen normalmente. La similitud de los síntomas entre las dos

enfermedades y el destino diferente de los transcritos mutados generó dudas sobre la posibilidad de que la patogénesis de la enfermedad residiera en este proceso molecular.

La explicación para las discrepancias en los datos relativos a los niveles de *DMPK* se obtuvo con un estudio en el que se demostró que estas se deben al tipo de técnica utilizada para su extracción, confirmado además que los niveles de expresión del alelo mutado de *DMPK* se mantienen inalterados en DM1 (Davis *et al.* 1997). Sin embargo, las pruebas definitivas que llevaron a descartar la hipótesis de la haploinsuficiencia derivaron del desarrollo de diferentes modelos animales de la enfermedad. Más en detalle, aunque ratones homocigotos *knockout* de *Dmpk* mostraron una leve miotonía, los ratones heterocigotos *knockout* de *Dmpk* no mostraron síntomas de DM, siendo estos últimos un verdadero modelo de haploinsuficiencia (Jansen *et al.* 1996; Carrell *et al.* 2016).

2.2. Alteración en Cis de genes vecinos

El locus de la mutación DM1 se encuentra en una región con un alto contenido de genes. La presencia de repeticiones expandidas causa cambios en la estructura de la cromatina local influyendo en el posicionamiento normal de los nucleosomas. Además, en los casos de DM1 congénita se observa la hipermetilación de secuencias que corresponden a un elemento aislador de la cromatina situado en *SIX5*. Esto provoca el malfuncionamiento de las proteínas CTCF reguladoras y en consecuencia una disminución de la expresión de los genes cercanos (Cho and Tapscott 2007). La alteración de estos dos mecanismos moleculares podrían ser responsable de la expresión reducida observada en genes adyacentes (Volle and Delaney 2012). El gen *DMPK* está flanqueado por los genes *SIX5* y *DMWD*, respectivamente, en 3' y 5' (Figura I-3). El 3' UTR del gen *DMPK* se superpone al supuesto promotor del gen *SIX5*, cuya expresión se ve reducida en los pacientes

Introducción

con DM1 en proporción a la longitud de las repeticiones y con un patrón específico de alelo (Thornton *et al.* 1997).

Aunque diferentes estudios enfocados a determinar variaciones en los niveles de expresión del gen *DMWD* han proporcionado resultados contradictorios, Alwazzan y colaboradores solucionaron la cuestión en 1999. En su estudio confirmaron finalmente que los niveles de expresión de RNA del gen permanecen inalterados en el núcleo, sin embargo, se ven reducidos de un 20-50 % en el citoplasma de células DM1 (Alwazzan *et al.* 1999). Además, la esterilidad y los defectos neurológicos pueden ser síntomas relacionados con esta disminución de la expresión, considerando que ésta es predominante en los testículos y en el cerebro (Sarkar *et al.* 2000; Westerlaken *et al.* 2003).

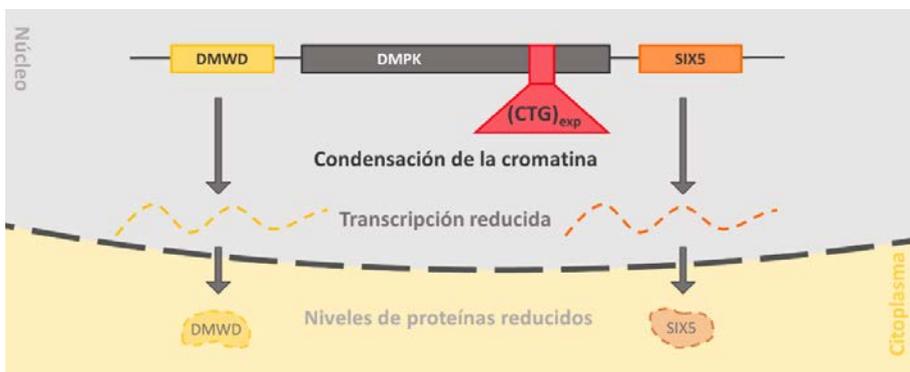


Figura I- 3. Representación del modelo de alteración de los genes adyacentes.

La presencia de la expansión del triplete CTG produce cambios en la cromatina tanto a nivel estructural, modificando el posicionamiento de los nucleosomas, como a nivel epigenético aumentando la metilación. Como efecto de ambas alteraciones, además de la expresión del gen *DMPK*, se vería disminuida también la de los genes adyacentes *DMWD* (que lo precede) y *SIX5* (que lo sigue).

El estudio de ratones homocigotos *knockout* para *Six5* ha evidenciado que estos animales desarrollan cataratas que, sin embargo, no coinciden con el tipo de cataratas que se observan típicamente en pacientes DM1 (Klesert *et al.* 2000; Sarkar *et al.* 2000). Por otro lado, en el modelo *knockout* para el mismo gen pero en heterocigosis, se pueden en ocasiones desarrollar problemas cardíacos aunque

estos no han sido correlacionados con la enfermedad y los animales no presentan ningún otro fenotipo parecido a DM1 (Wakimoto *et al.* 2002).

2.3. Ganancia de función tóxica del RNA

La transcripción de moléculas de RNA que contienen las expansiones de las repeticiones es, sin duda, un proceso que ocurre en todas las enfermedades causadas por esta tipología de mutación y que, por ello, constituye un excelente candidato como un proceso desencadenante de la patogénesis. Por lo tanto, se podría hablar de un mecanismo de ganancia de la función del RNA, en el cual la molécula que lleva la mutación podría interferir con el metabolismo adecuado propio o de otros RNA, o con el funcionamiento adecuado de las proteínas de unión con el RNA (Figura I-4). La exactitud de esta hipótesis se confirmó una vez más gracias al desarrollo de un nuevo modelo de ratón transgénico, en el que se indujo la expresión de la mutación $(CUG)_{exp}$, en el contexto de un gen heterólogo.

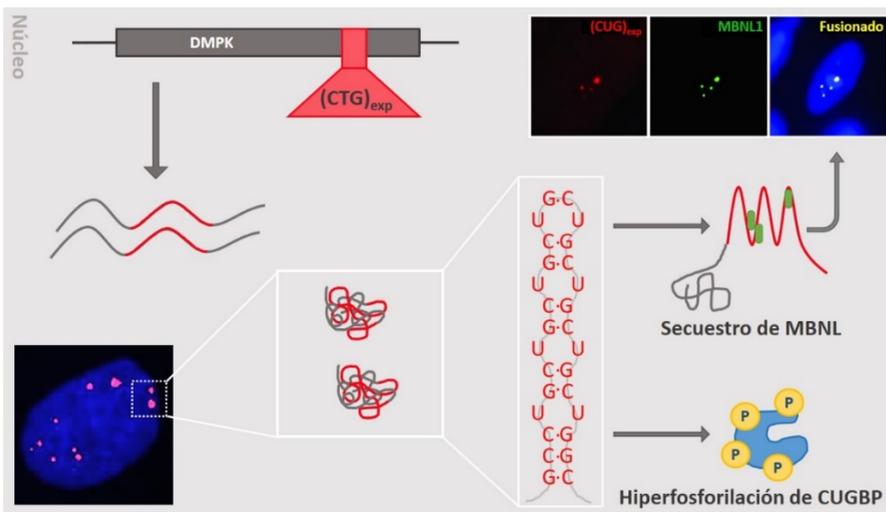


Figura I- 4. Representación del modelo de ganancia de función toxica del RNA.

Según este modelo, el mecanismo molecular propuesto como patogénesis de DM1 es la retención en el núcleo del RNA mutado y su precipitación en foci ribonucleares. Su presencia en el núcleo tiene diversos efectos tóxicos entre los cuales destaca la alteración del equilibrio entre la proteína MBNL y su antagonista CUGBP1. En concreto el secuestro del factor de regulación del *splicing* MBNL1 impide su correcto funcionamiento. Por otro lado, la actividad de CUGBP1 aumenta por su hiperfosforilación por parte de PKC y como resultado de la reducida expresión de miRNAs reguladores.

Introducción

De hecho, los animales desarrollaron miotonía y otros defectos típicos de la DM1, lo que demuestra que la expresión de expansiones CUG, por si mismas, tiene un efecto tóxico intrínseco (Mankodi *et al.* 2000; Orengo *et al.* 2008).

Como se describió anteriormente, los RNA transcritos del alelo mutado permanecen retenidos en el núcleo (Pettersson *et al.* 2015). Ahí, se pliegan formando estructuras secundarias con forma de horquilla. Sin embargo, el efecto patogénico del RNA mutado no deriva de la falta de funcionalidad de la proteína codificada por el gen, sino de su interacción con proteínas que se unen al RNA de doble cadena. Una vez que se determinó el papel del RNA tóxico en la patogénesis de la enfermedad, se realizaron numerosos estudios para identificar el mayor número posible de procesos y factores comprometidos por la interacción con la molécula mutada. Entre estos, los más representados son los factores de transcripción, la regulación del *splicing* alternativo y el microRNA.

2.3.1. Secuestro de factores de transcripción

El uso de microarrays de ratón en numerosos estudios ha permitido identificar muchos genes cuya expresión está comprometida por la presencia en la célula de repeticiones de CUG expandidas (Tabla I-3). Entre ellos, se han descrito al menos 175 transcritos musculares alterados, de acuerdo con el hecho de que el tejido muscular es probablemente el más implicado en la DM1. Otros estudios se han centrado en la caracterización de los genes del sistema nervioso, utilizando biopsias de pacientes DM1 y DM2. Los resultados mostraron que, de los 96 genes analizados, al menos seis estaban alterados en ambas enfermedades, corroborando la teoría de una patogénesis común (Botta *et al.* 2007). Un ejemplo es el gen del *canal de cloruro tipo 1* (CLC-1), que se considera el responsable directo de la miotonía presente en los pacientes. Este característico fenotipo está causado por un funcionamiento anormal de las fibras musculares, cuya membrana permanece hiperexcitada (Gagnon *et al.* 2007; Wenninger *et al.* 2018). Las causas

propuestas para este fenómeno son un mal funcionamiento del canal de cloruro, debido a una reducción de la conductancia o, alternativamente, una inactivación de los canales de sodio (Charlet *et al.* 2002; Mankodi *et al.* 2002). La presencia de estos canales en la membrana de las fibras musculares es necesaria para la propagación de potenciales de acción y se ve significativamente reducida en DM1. La expresión de esta proteína está regulada por el factor de transcripción Sp1 (proteína de especificidad 1), que junto con el receptor gamma del ácido retinoico (RAR γ) y los miembros de la familia de transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT1 y STAT3) se encuentra entre los factores secuestrados en el núcleo de células DM1 (Ebraldize *et al.* 2004). Debido a su elevada afinidad por las horquillas de CUGs, su secuestro puede alcanzar valores de hasta el 90%, lo cual obviamente impide su correcto funcionamiento y la consecuente reducción de la expresión de los genes diana.

Tabla I-3. Ejemplos de genes con expresión reducida por expresión de expansiones CUG

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

Otro ejemplo son los factores de transcripción NKX2-5 y MYOD cuyos niveles están respectivamente aumentados y reducidos en pacientes de DM1 (Amack *et al.* 2002; Yadava *et al.* 2008). Aunque se sabe que NKX2-5 está relacionado con el desarrollo

Introducción

y la conducción cardíacos y que MYOD está involucrado en la diferenciación de los mioblastos, el mecanismo por el cual la presencia de repeticiones afecta sus niveles de expresión se desconoce. A pesar de los muchos estudios enfocados en este sentido, todavía son muchos los genes alterados en DM1 para los que no se han podido establecer vínculos entre los factores de transcripción secuestrados y los fenotipos característicos de la enfermedad.

2.3.2. Secuestro de factores de *splicing* y espliceopatía

El término espliceopatía se ha acuñado específicamente para la distrofia miotónica, ya que representa el primer ejemplo descrito de una enfermedad cuyos pacientes presentan una profunda y generalizada alteración de este proceso molecular. Con más detalle, se ha observado que pacientes con DM1 presentan más de 156 transcritos en la isoforma de la etapa fetal en lugar de en su variante característica de la etapa adulta (algunos ejemplos se incluyen en la Tabla I-4). Algunos de estos eventos de *splicing* alterados se han relacionado con rasgos fisiopatológicos específicos que incluyen miotonía, debilidad/desgaste muscular, bloqueo de la conducción cardíaca y resistencia a la insulina (Sznajder and Swanson 2019).

El mal funcionamiento generalizado de este proceso tan importante se debe al hecho de que, además de los factores de transcripción, también algunos factores reguladores del procesado alternativo del mRNA tienen una alta afinidad por las repeticiones. Entre las proteínas que se unen al RNA tóxico están las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas hnRNP F y hnRNP H (Jiang *et al.* 2004; Kim *et al.* 2005), Staufen1 (Ravel-Chapuis *et al.* 2012) y también las proteínas de la familia Muscleblind MBNL1-3 (Miller *et al.* 2000; Fardaei *et al.* 2001; Mankodi *et al.* 2001).

Entre todos los transcritos alterados en DM1 descritos hasta ahora, se ha visto que la gran mayoría está formada por mRNAs regulados por la proteína MBNL1. Un ejemplo es el gen CLC-1 que, además de ser uno de los genes descritos por su

expresión reducida, debido a los bajos niveles del factor de transcripción Sp1 funcional, también se ha estudiado para determinar la alteración del procesado de su mRNA. En pacientes con DM, se mantiene la isoforma fetal de la proteína ya que en su transcrito se incluye el exón 7a, que contiene un codón de parada prematuro y desencadena la degradación del mRNA por *non-sense mediated decay* (Ranum and Cooper 2006).

Otros ejemplos relacionados con la sintomatología muscular son la alteración del *splicing* del gen que codifica la distrofina (*DMD*) y la codificación de la troponina T cardíaca (*cTNT*). La distrofina es un componente de un gran complejo de glicoproteínas asociado a distrofina que une el citoesqueleto y la matriz extracelular del músculo y proporciona un andamio para la transmisión de fuerza durante la contracción muscular, así como la transducción al citoesqueleto muscular de señales extracelulares. La exclusión aberrante del exón 78 de *DMD* en adultos cambia el marco de lectura abierto

y altera el extremo C-terminal del gen. Este evento compromete la organización de la fibra muscular durante la contracción (Bouge *et al.* 2017).

La TnT cardíaca es la subunidad de unión a la tropomiosina del complejo de troponina, que se encuentra en el filamento delgado de los músculos estriados y regula la contracción muscular en respuesta a las alteraciones en la concentración de iones de calcio intracelular. En DM1 la inclusión del exón fetal 5 podría ser la causa de los problemas cardíacos presentes en los pacientes (Ho *et al.* 2004).

La proteína *Bridging Integrator 1* (BIN1) se expresa en muchos tejidos y funciona como un regulador de la dinámica de actina y membrana. A medida que los miotubos nacientes se convierten en miofibras funcionales, diferenciadas terminalmente, se desarrollan estructuras especializadas que incluyen el retículo sarcoplásmico (SR), los túbulos transversales y los componentes miofibrilares. BIN1 es un mediador esencial de la invaginación y el desarrollo de los túbulos transversales. El exón 11 de BIN1, que codifica el dominio de unión a fosfoinositido

Introducción

de la proteína, se excluye de manera anormal en el músculo esquelético DM1

Tabla I-4. Ejemplos de eventos de *splicing* alternativo desregulados en DM1

Pre-mRNA	Exón/Intrón desregulado	Inclusión/Exclusión	Referencia
Músculo esquelético y cardíaco			
<i>IR</i>	Exón 11	Exclusión	Renna et al. 2017
<i>CLC-1</i>	Intrón 2	Inclusión	Mankodi et al. 2002
	Exón 7 ^a	Inclusión	Wheeler et al., 2009
<i>BIN1</i>	Exón 11	Exclusión	Fugier et al. 2011
<i>Ca_v1.1</i>	Exón 29	Exclusión	Tang et al. 2012
<i>TNNT3</i>	Exón fetal	Inclusión	Kanadia et al. 2003a
<i>RyR1</i>	Exón 70	Exclusión	Kimura et al. 2005
<i>SERCA1</i>	Exón 22	Exclusión	
<i>SERCA2</i>	Intrón 19	Inclusión	
<i>ZASP</i>	Exón 11	Inclusión	
<i>Titin</i>	Exón Zr4	Inclusión	Lin et al. 2006
	Exón Zr5	Inclusión	
<i>CAPN3</i>	Exón 16	Exclusión	
<i>FHOS</i>	Exón 11 ^a	Exclusión	
<i>GFPT1</i>	Exón 10	Exclusión	
<i>MBNL1</i>	Exón7	Inclusión	
	Exón 6	Inclusión	Yamashita et al. 2012
<i>MBNL2</i>	Exón7	Inclusión	Lin et al. 2006
	Exón8	Inclusión	Yamashita et al. 2012
<i>SMYD1</i>	Exón 39	Inclusión	Du et al. 2010
Antígeno 9 asoc. Esperma	Exón 39	Inclusión	
<i>MTMR1</i>	Exón 2.1, 2.3	Exclusión	Buj-Bello et al. 2002
<i>DTNA</i>	Exón 11a, 12	Inclusión	Nakamori et al. 2008
<i>MYOM1</i>	Exón 17a	Inclusión	Koebis et al. 2011
<i>ATPG2</i>	Exón 1	Inclusión	Yamashita et al. 2012
<i>MXRA7</i>	Exón 4	Inclusión	
<i>NCOR2</i>	Exón 10	Inclusión	
<i>NEB</i>	Exón 116	Inclusión	
<i>TTN</i>	Exón 45	Inclusión	
<i>PKM</i>	Exón 10	Inclusión	Gao y Cooper 2013b
<i>SOS1</i>	Exón 25	Exclusión	Nakamori et al. 2013
<i>ATP2A1</i>	Exón 22	Exclusión	
<i>ALPK3</i>	Exón 2	Inclusión	
<i>NFIX</i>	Exón 7	Inclusión	
<i>LDB3</i>	Exón 11	Inclusión	Yamashita et al. 2014
Cerebro			
<i>TAU</i>	Exón 2, 3	Exclusión	Sergeant et al. 2001
	Exón 6	Exclusión 6c, inclusión 6d	Leroy et al. 2006
	Exón 10	Exclusión	Sergeant et al. 2001; Jiang et al.
<i>NMDAR1</i>	Exón 5	Inclusión	Jiang et al. 2004
<i>APP</i>	Exón 7	Exclusión	
<i>GRIN1</i>	Exón 4	Inclusión	Suenaga et al. 2012
<i>MAPT</i>	Exón 3, 12	Exclusión	
<i>SORBS1</i>	Exón 26	Exclusión	
<i>DCLK1</i>	Exón 19	Exclusión	
<i>CAMK2D</i>	Exón 14, 15	Exclusión	

(Fugier *et al.* 2011; Nakamori *et al.* 2013).

Datos a favor de que la falta de actividad de MBNL1 es la causa del procesamiento erróneo de los genes mencionados anteriormente (entre muchos otros), provinieron de la caracterización de ratones *knockout* para MBNL1. De hecho, estos animales presentan muchos de los síntomas característicos de la enfermedad, como la aparición de cataratas iridiscentes, miotonía y defectos histológicos en los músculos (Kanadia *et al.* 2003). También se confirmaron efectos parecidos en un modelo en embriones de *Drosophila* mutantes *mbl* (Machuca-Tzili *et al.* 2006). Sin embargo, la confirmación definitiva de esta hipótesis provino del hecho de que tras la sobreexpresión de la proteína MBNL1 en modelos animales que expresan repeticiones, se observa una mejora general de los fenotipos característicos de la DM1 (Kanadia *et al.* 2006; Chamberlain and Ranum 2012).

Para entender el papel patogénico de MBNL en DM, es muy importante evidenciar que la proteína antagoniza la acción de otra proteína reguladora, involucrada en el *splicing* y en la degradación de mRNAs, miembro de la familia CELF (CELF1-6, del inglés *CUG-BP and ETR-3-like factor*)(Berger and Ladd 2012). Aunque la proteína CELF1 no se una a las horquillas de (CUG)_{exp} de manera estable, sus niveles de expresión también se ven alterados en DM, así como su estabilidad y su localización citoplasmática. En concreto, en DM1 los niveles de CELF1 pueden llegar a ser de 3 a 5 veces más altos en mioblastos, músculo esquelético y corazón (Figura I-5, panel a). Esto se debe a una hiperfosforilación de la proteína por parte de la proteína quinasa C (PKC), que también presenta un aumento de actividad en pacientes (Tian *et al.* 2000).

En DM si por un lado la actividad de MBNL1 disminuye por el secuestro por parte de las repeticiones CUGs, por otro lado, los niveles de CELF1 aumentan provocando en los pacientes un desequilibrio entre ambas actividades. Esto da origen a alteraciones en el procesado alternativo de un elevado número de genes, ya que la inclusión o la exclusión de exones alternativos en determinados pre-mensajeros

Introducción

depende del balance entre las proteínas MBNL1 y CELF1, asegurando la transición de las isoformas fetales a las adultas (Figura I-5, panel b). En un estudio de 2015 se han utilizado modelos de DM1 en ratón, en corazón y músculo esquelético, para analizar cambios en el transcriptoma como consecuencia de cambios en la expresión de CELF. Se han identificado cientos de mRNA que en su región 3' UTR presentan sitios de unión tanto para CELF como para MBNL1 (Figura I-5, panel c). Se ha observado, además, que el número de mRNAs dianas comunes a ambas proteínas es tres veces mayor de lo esperado estadísticamente e incluye numerosos mensajeros involucrados en el desarrollo y la diferenciación celular (Wang *et al.* 2015).

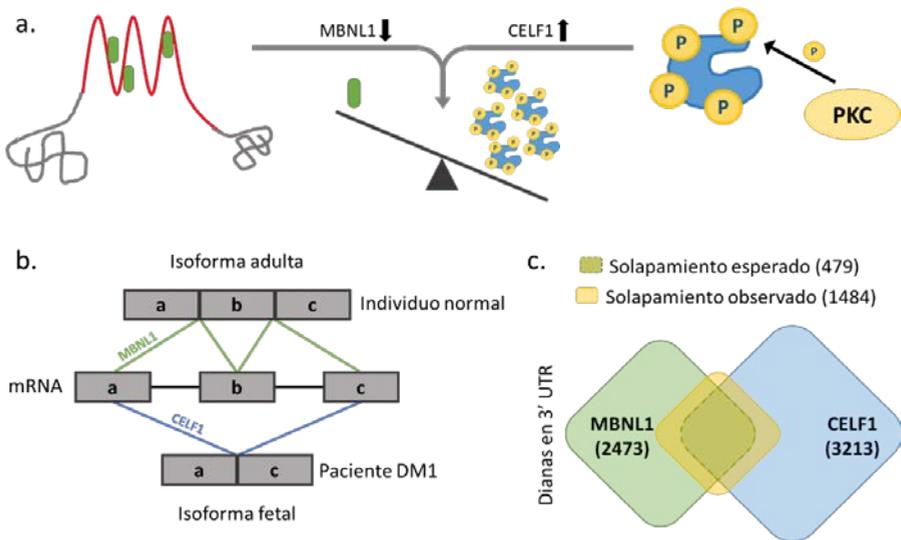


Figura I-5. Antagonismo de las proteínas MBNL1 y CELF1.

Mientras que los niveles de expresión de MBNL1 disminuyen por su retención a nivel de los focos, los niveles de CELF1 aumentan debido a su hiperfosforilación. Esto provoca la pérdida del equilibrio entre los dos reguladores, alterando los eventos dependientes de su actividad (a). En DM1 se observa la desregulación del procesamiento de muchos mRNA. En pacientes DM1 se conserva la isoforma fetal que suele producir una proteína no funcional (b). CELF1 y MBNL1 se unen muy cerca en los mismos 3' UTR y ejercen efectos opuestos sobre la estabilidad del mRNA. Se muestra la superposición esperada y observada entre las dianas de CELF1 y MBNL1. La superposición observada es aproximadamente tres veces mayor de lo esperado (panel c adaptado de Wang *et al.* 2015) (c).

Por lo tanto, el uso regulado durante el desarrollo de algunos exones alterados en DM se puede restaurar modulando los niveles de MBNL1 y CELF1. El patrón de *splicing* en músculo esquelético y cardiaco, característicos de DM1, se reproduce en modelos en ratón *knockout* por *Mbnl1* y de sobreexpresión transgénica de *Celf1* (Kanadia *et al.* 2003; Du *et al.* 2010; Koshelev *et al.* 2010; Ward *et al.* 2010). Sin embargo, estos modelos no son representativos de los cambios asociados a DM que se observan en el cerebro (Suenaga *et al.* 2012). Un estudio de 2012 demostró que los ratones *knockout* por *Mbnl2* representan un modelo válido del patrón de *splicing* observado en cerebro de pacientes DM1. En condiciones fisiológicas, la expresión de MBNL2 se observa predominantemente en el cerebro, donde la proteína regula el procesado del mRNA durante el desarrollo del cerebro en el período postnatal. La pérdida de *Mbnl2* en los ratones produce una serie de alteraciones del *splicing* comparables en un alto porcentaje a las que se observan en muestras de autopsias de cerebro de pacientes con DM1, además de fenotipos característicos como la somnolencia diurna excesiva (Charizanis *et al.* 2012).

2.3.3. Secuestro y alteración de microRNAs en DM1

Los microRNAs son pequeñas moléculas (21-25 nucleótidos) que pueden regular la expresión de genes concretos a nivel post-transcripcional. En concreto, en el extremo 5' de estas moléculas está situada una región, llamada región semilla, que es complementaria a secuencias cortas situadas en el 3' UTR de sus transcritos diana. Uniéndose a esta secuencia, los microRNAs pueden reprimir la expresión del gen. Se ha observado que la región semilla de algunos microRNAs contiene sitios de unión a repeticiones CUG y que interaccionan preferentemente con secuencias con repeticiones de CUG largas. Esta observación sugirió un posible papel para los miRNAs en los trastornos de expansión de repeticiones como la distrofia miotónica: por un lado, la cantidad de miRNA no unido que normalmente regularía otros genes se reduce y ya no puede reprimir a otros genes objetivo; por otro lado, la fuerza de

Introducción

la represión debida a largas repeticiones de CUG podría resultar en el secuestro de grandes cantidades de maquinaria de miRNA y prevenir la represión normal por parte de miRNA en general (Hon and Zhang 2007).

Diversos estudios confirmaron la alteración de varios miRNAs, y en consecuencia de la expresión de sus dianas, tanto en modelos de la enfermedad como en biopsias y plasma de pacientes DM1 (Perbellini *et al.* 2011; Fernandez-Costa *et al.* 2013; Perfetti *et al.* 2014). En la mayoría de los casos todavía no ha sido posible asignar un mecanismo molecular que provoca directamente la alteración de cada miRNA. Una excepción entre todos es *miR-1* cuya expresión se ve disminuida en corazón de pacientes DM1. Un estudio de Rau y colegas ha demostrado que en este órgano el secuestro de MBNL1 por las repeticiones CTG provoca directamente la disminución de los niveles de *miR-1*, estando implicado en la biogénesis del microRNA (Rau *et al.* 2011).

En otro estudio, examinando la unión de varios miRNAs al 3'UTR de DMPK mediante ensayos de luciferasa, se demostró la interacción entre el transcrito de DMPK y miR-16, asociando además una reducción de la actividad del microRNA directamente proporcional al tamaño de la expansión de CUGs (Koscianska *et al.* 2015).

3. Las proteínas Muscleblind

Tras la observación de que un alto porcentaje de los eventos de *splicing* alterados en la DM1 estaban regulados por la actividad de la proteína MBNL1, muchos estudios eligieron como objetivo principal la caracterización del papel de esta familia de proteínas en la patogénesis de la enfermedad. Fue en nuestro laboratorio donde describimos por primera vez una nueva familia de proteínas involucradas en el desarrollo del ojo y del músculo de *Drosophila* (Begemann *et al.* 1997; Artero *et al.* 1998). En *Drosophila* se han descrito al menos catorce isoformas que derivan de un solo gen Mbl se expresa a partir de la segunda mitad de la embriogénesis en la

musculatura somática, faríngea y visceral, en el cordón nervioso ventral, en los fotorreceptores de la larva (Irion 2012) y en el cerebro y ojos de moscas adultas, entre otros tejidos (www.flyatlas.com). En cambio, en humanos, como también en la mayoría de los vertebrados, existen tres genes parálogos (Fardaei *et al.* 2002). Los genes MBNL1, MBNL2 y MBNL3 (del inglés *Muscleblind-Like*) codifican para al menos 18 isoformas diferentes, y cada uno de ellos presenta un patrón de expresión y una función característicos (Holt *et al.* 2009; Sznajder *et al.* 2016). Entre los tres miembros de la familia, el mRNA de MBNL1 se expresa en la mayoría de los tejidos (Konieczny *et al.* 2014). El nivel de proteína MBNL1 aumenta durante la diferenciación, lo que facilita las transiciones de los patrones de *splicing* embrionario-fetal y fetal-adulto en mamíferos (Miller *et al.* 2000; Fernandez-Costa *et al.* 2011). Aunque se ha descrito que la proteína MBNL2 desempeña un papel preferente en el cerebro su patrón de expresión suele ser superponible al de MBNL1, pudiendo así compensar su falta de función (Charizanis *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012a; Lee *et al.* 2013). En cuanto a la proteína MBNL3, esta se expresa predominantemente en la placenta durante el desarrollo embrionario, mientras que es difícil detectarla en tejidos adultos en los que solo se expresa de forma transitoria durante la regeneración del músculo esquelético adulto inducida por lesiones. Además, se ha observado un papel antagonista al de MBNL1 en la diferenciación celular, proceso en el que el nivel de expresión de MBNL1 crece de manera inversamente proporcional con respecto al de MBNL3 (Squillace *et al.* 2002; Lee *et al.* 2007; Lee *et al.* 2008). En trabajos más recientes se ha utilizado un modelo de ratón que expresa una isoforma truncada de la proteína Mbnl3 (Mbnl3^{ΔE2}), para estudiar su papel en la enfermedad. Los ratones presentan retrasos dependientes de la edad en la regeneración muscular inducida por lesiones y una función muscular comprometida (Poulos *et al.* 2013). Además, los ratones Mbnl3^{ΔE2} demuestran un inicio anticipado de un subconjunto de fenotipos asociados a la edad típicamente observados en pacientes DM1. Específicamente, los déficits de

Introducción

Mbnl3_{38kD} desencadenan la aparición temprana de un metabolismo anormal de la glucosa, niveles elevados de insulina, disfunción de la sístole cardíaca que progresa a hipertrofia del ventrículo izquierdo y una alta incidencia de formación de cataratas subcapsulares y corticales (Choi *et al.* 2016).

3.1. Motivos funcionales y reconocimiento de RNA

Una característica común a todas las proteínas que pertenecen a la familia MBNL es la presencia, en su extremo N-terminal, de dominios de dedos de zinc, mediante los cuales interaccionan con el RNA (Grammatikakis *et al.* 2011; Park *et al.* 2017). Más específicamente, estos son dominios del tipo CCCH, en los cuales tres residuos de cisteína y uno de histidina interactúan con un átomo de zinc (Vicente-Crespo *et al.* 2008; Irion 2012; Oddo *et al.* 2016; Hale *et al.* 2018).

Las tres proteínas MBNL humanas contienen cuatro motivos de dedos de zinc CCCH (ZF1–4), y no solo las secuencias de aminoácidos de los propios motivos están muy bien conservadas, sino también las longitudes de las secuencias que separan ZF1-ZF2 y ZF3-ZF4 son idénticas entre los miembros de la familia MBNL (14 residuos para ZF1-ZF2, y 16 residuos para ZF3-ZF4). Además, dentro de cada miembro de la familia MBNL, ZF1 y ZF3 comparten homología de secuencia entre sí, y tienen un espaciado idéntico entre los residuos del ligando Cys e His (CX₇CX₆CX₃H). Este es también el caso de ZF2 y ZF4 (CX₇CX₄CX₃H). Por lo tanto, se considera que ZF1-ZF2 y ZF3-ZF4 en las proteínas MBNL constituyen motivos tándem dedo de zinc CCCH (TZF) (CX₇CX₆CX₃H – CX₇CX₄CX₃H), denominados TZF12 y TZF34, respectivamente (Fu *et al.* 2012; Purcell *et al.* 2012). La actividad de unión a mRNA de la familia MBNL reside en los dos dominios TZF altamente conservados (TZF12 y TZF34) (He *et al.* 2009). Varios estudios con distintos enfoques han contribuido a entender la importancia de estos dominios para el correcto funcionamiento de MBNL1. Por ejemplo, con estudios de dicroísmo celular se demostró que la integridad de sus dedos de zinc es fundamental para la unión al RNA (Cass *et al.* 2011; Grammatikakis

et al. 2011). Por otro lado, se ha podido establecer que MBNL1 reconoce motivos estructurales en el RNA, como desapareamientos pirimidina-pirimidina y el posicionamiento de pares C-G y G-C en la horquilla (Teplova and Patel 2008; Goers *et al.* 2010). Recientemente se ha demostrado, además, que los tres parálogos de MBNL se unen a motivos de RNA similares con una afinidad ligeramente diferente y controlan el splicing de los mismos exones alternativos con diferente fuerza. Las diferencias entre los parálogos de MBNL en el reconocimiento de los motivos de unión y la organización estructural de los RNA diana puede ser la base de la importancia de expresar los parálogos de MBNL (Taylor *et al.* 2018).

3.2. Implicación en el procesamiento de RNAs

Los numerosos estudios sobre la caracterización de MBNL1 realizados en los últimos años han puesto de relieve una amplia gama de aspectos del procesamiento de RNA a los que está vinculada la actividad de la proteína. Por ejemplo, un análisis transcriptómico de los distintos compartimentos subcelulares evidenció el papel de Mbnl en la regulación de la localización de los mRNA en células de ratón y de *Drosophila*, y se observó una traducción y la secreción de proteínas dependiente de Mbnl para un subconjunto de mRNA con localización dependiente de Mbnl (Wang *et al.* 2012a). Así mismo, durante un estudio de caracterización de los sitios de unión al RNA de MBNL1, se observó que la proteína se une preferentemente en la región 3'UTR y que desestabiliza los mRNA diana (Masuda *et al.* 2012).

La poliadenilación alternativa (PA) es un proceso que, al crear regiones 3'UTR diversificadas, puede modificar la interacción con varios factores, como las proteínas de unión de RNA y los microRNA. De este modo, la PA puede modular la localización del RNA, así como su traducción y su vida media. En el curso de un estudio en el que se llevó a cabo un análisis detallado de la PA en fibroblastos de embrión de ratón, se mostró una desregulación extensa del proceso tras la pérdida

Introducción

de la proteína Mbnl. Posteriormente, se confirmó la misma desregulación en un modelo de ratón de DM1 y en modelos de células obtenidos de pacientes de DM1 y DM2, que mostraban el mantenimiento de un patrón de PA neonatal, revelando una nueva función para las proteínas MBNL (Batra *et al.* 2014; Batra *et al.* 2015).

Un papel adicional de MBNL en el metabolismo del RNA se identificó tratando de entender a qué se debe la alteración del procesamiento de miR-1 observada en DM. En este caso, se utilizó una horquilla corta de RNA (shRNA, del inglés *short hairpin RNA*) para imitar la función de las repeticiones CUG en la célula. Se obtuvo así la reducción de MBNL1 y se observó un procesamiento alterado de pri-miR-1 expresado de manera ectópica. Posteriormente se verificó que también en cardiomiocitos de rata (H9C2), la disminución de MBNL1 provoca una reducción drástica de miR-1 maduro endógeno. Los niveles de otros microRNAs también se observaron en paralelo, como control negativo, y no se observaron cambios, lo que demuestra la especificidad de la regulación de MBNL1 en miR-1 (Rau *et al.* 2011).

Todo lo anteriormente descrito demuestra que la DM se caracteriza por una regulación errónea del procesamiento del pre-mRNA en múltiples niveles, en los que en muchos casos se ve involucrado MBNL. Sin embargo, el aspecto más estudiado es su función de regulador de *splicing* alternativo específico de tejido en el músculo esquelético, corazón y sistema nervioso.

Como se ha anticipado, se ha observado que la proteína MBNL regula casi 200 eventos de *splicing* relacionados con DM1, y entre ellos se puede contar un número similar de inclusiones o exclusiones de exones, demostrando que la proteína puede desempeñar un papel tanto activador como represor del *splicing* alternativo de exones específicos (Du *et al.* 2010).

En organismos superiores, los sitios de *splicing* no contienen toda la información necesaria para el reconocimiento preciso de intrones. Mas en el detalle, la especificidad de *splicing* está determinada principalmente por el sitio de *splicing* 5', el sitio de *splicing* 3', las secuencias de punto de ramificación y también por

múltiples elementos reguladores de *splicing* que actúan en cis. Estos motivos de reconocimiento están clasificados como potenciadores o silenciadores exónicos de *splicing* y potenciadores o silenciadores intrónicos del *splicing*. Estos elementos de regulación de *splicing* generalmente funcionan reclutando factores en trans para controlar el *splicing* a través de diversos mecanismos, aunque su actividad suele depender de la ubicación (Hiller *et al.* 2007; Wang *et al.* 2012b; Dvinge 2018). Así mismo se ha observado que el papel como regulador del *splicing* de MBNL depende de su sitio de unión con respecto al exón regulado (Goers *et al.* 2010; Fu *et al.* 2012). Brevemente, la unión de MBNL1 y 2 dentro del exón alternativo y las regiones intrónicas aguas arriba, generalmente facilitan la exclusión del exón, mientras que la unión a las regiones intrónicas aguas abajo promueve la inclusión del exón (Witten and Ule 2011). Esta configuración indica que la represión de la inclusión del exón es una consecuencia de que los MBNL bloquean directamente los *enhancers* exónicos, los sitios de *splicing* 3', las regiones ricas en polipirimidina o elementos de la región intrónica; la activación por otro lado, podría deberse a la competencia de MBNL con silenciadores de *splicing*, la activación de *enhancers* intrónicos o mejorando el reconocimiento del sitio de *splicing* en 5' por parte del spliceosoma (Goers *et al.* 2010; Echeverria and Cooper 2014; Konieczny *et al.* 2014). MBNL puede interactuar con una variedad de diferentes estructuras de RNA que contienen motivos de secuencia YGCY, como por ejemplo a través del enlace y la estabilización de una estructuras de tipo horquillas (Kino *et al.* 2009; Warf *et al.* 2009).

4. Mantenimiento y regeneración muscular en DM1

Como hemos visto, aunque la distrofia miotónica es una enfermedad multisistémica, no hay duda de que el músculo esquelético es el tejido más comprometido. La pérdida progresiva de masa muscular y debilidad se encuentran

Introducción

entre los síntomas que más contribuyen a la discapacidad de los pacientes, pero su causa directa aún se desconoce.

La miogénesis es el proceso de diferenciación necesario para el desarrollo del músculo. Este término se refiere tanto al proceso de desarrollo como al proceso de regeneración muscular. A pesar de presentar diferencias, ambos procesos empiezan con una extensa proliferación de los mioblastos hasta que, tras haber salido del ciclo celular, estos se fusionan para generar nuevas miofibras o se unen a miotubos preexistentes (Abmayr and Pavlath 2012).

En los últimos años, varios estudios han propuesto la interrupción tardía de la diferenciación muscular y un defecto en la regeneración, como posibles causas con un mecanismo básico común. Se trataría de un defecto a nivel de los precursores miogénicos o células satélite, cuyos niveles están incrementado significativamente en la musculatura distal de los pacientes, siendo ésta la musculatura más afectada (Vattemi *et al.* 2005; Andre *et al.* 2018). En condiciones fisiológicas, el buen funcionamiento de las células satélite garantiza el mantenimiento de la reparación y la regeneración de la musculatura esquelética. En caso de daño muscular, estas células se activan y comienzan un camino de proliferación y diferenciación, necesario para reemplazar las células dañadas y asegurar la homeostasis de las fibras musculares. En biopsias y en líneas celulares de pacientes con DM1, este proceso ocurre a un nivel tan bajo que no es suficiente para recuperar las fibras perdidas. Uno de los mecanismos propuestos es una entrada prematura de las células en senescencia, debida a una acumulación anormal de p16, independientemente del acortamiento de los telómeros (Bigot *et al.* 2009; Thornell *et al.* 2009).

4.1. Rutas autofágicas alteradas en DM1

Se ha descrito que los niveles de autofagia están aumentados en los mioblastos DM1. Este proceso se considera de vital importancia para la supervivencia de la

célula, ya que elimina proteínas tóxicas y orgánulos dañados. Sin embargo, se sabe que su aumento provoca una pérdida excesiva de las proteínas, causando la muerte celular y la atrofia en la musculatura esquelética (Masiero *et al.* 2009; Bargiela *et al.* 2015).

Se ha observado que las células embrionarias DM1 tienen una capacidad de proliferación reducida y un nivel de autofagia más alto de lo normal. El hecho de que las células control desarrollen el mismo fenotipo después del silenciamiento de MBNL1 y que su sobreexpresión revierta el fenotipo, confirma la relación directa entre la autofagia y la reducida disponibilidad de MBNL1 en DM1 (Denis *et al.* 2013). Estudios posteriores contribuyeron a confirmar esta observación, por ejemplo, con la detección en células DM1 de marcadores autofágicos como LC3, vesículas autofágicas y evidencia de apoptosis (Beffy *et al.* 2010). También en las biopsias musculares de pacientes se observó un aumento de casi el doble del gen regulador de la autofagia Atg4 (Fernandez-Costa *et al.* 2013). Además, genes identificados durante un rastreo genético en el que se utilizó un modelo de DM1 en *Drosophila* para buscar genes relacionados con apoptosis, fueron capaces de modificar los fenotipos causados por la expresión de las expansiones CTG (Tanida *et al.* 2005; Garcia-Lopez *et al.* 2008; Lee and Lee 2016).

4.2. Organización de la estructura muscular en DM1

El músculo esquelético está organizado en unidades estructurales altamente interconectadas y organizadas en un patrón importante para su correcta función. Cada músculo está compuesto de muchos fascículos musculares rodeados por una capa de tejido conectivo. Dentro de cada uno de ellos se encuentran las células musculares, las miofibras, que contienen las unidades funcionales de contracción muscular (sarcómeros) que comprenden los filamentos delgados (actina) y gruesos (miosina). Las miofibras maduras contienen cientos de mionúcleos ubicados debajo del sarcolema (Schiaffino and Reggiani 2011). El posicionamiento subsarcolemaico

Introducción

de los mionúcleos es un sello distintivo del músculo maduro. Típicamente, están regularmente espaciados dentro de una miofibra y la desviación de estos patrones de organización normales afecta la función muscular (Bruusgaard *et al.* 2003). Estudiando biopsias musculares, es suficiente una tinción con hematoxilina y eosina para evidenciar características histológicas típicas de DM como la atrofia de las miofibras y la presencia de núcleos centralizados. De hecho tales características son suficientes para distinguir una muestra de un paciente DM de otras miopatías e incluso diferenciar entre la DM1 y la DM2 (Pisani *et al.* 2008). Además de ser un marcador para la miopatía, la presencia de núcleos centrales puede contribuir directamente a la disfunción muscular interrumpiendo la organización del sarcómero y afectando la contracción de la miofibrilla (Folker and Baylies 2013).

5. Modelos animales como herramienta de investigación

Las notables similitudes anatómicas y fisiológicas entre humanos y animales, particularmente los mamíferos, han llevado a los investigadores a estudiar una gran variedad de mecanismos y evaluar terapias en modelos animales antes de aplicar sus descubrimientos a los humanos. Los biólogos interrogan a los organismos en múltiples niveles: moléculas, células, órganos y funciones fisiológicas, en condiciones sanas o enfermas. Se requieren todos los niveles de investigación para obtener una descripción completa y la comprensión de los mecanismos. Los primeros dos, y en algunos casos tres, niveles de organización pueden estudiarse utilizando enfoques *in vitro* (por ejemplo, cultivos celulares). Estas técnicas se han vuelto muy sofisticadas para imitar las complejas estructuras de los tejidos. Representan importantes avances científicos y han sustituido en algún caso el uso de animales. Por otro lado, la exploración de las funciones fisiológicas y las interacciones sistémicas entre órganos requiere un organismo completo (Barre-Sinoussi and Montagutelli 2015).

Por otro lado, los modelos animales son esenciales para cerrar la brecha traslacional entre la investigación preclínica y clínica. Un modelo es una representación simple de un sistema complejo. En consecuencia, un modelo animal para una enfermedad humana no pretende en absoluto intentar reproducir la enfermedad humana con todas sus complejidades en un animal, sino más bien modelar aspectos específicos de una enfermedad. Cuando se utiliza un modelo animal, es de suma importancia definir una pregunta específica y garantizar que el modelo elegido sea adecuado para su propósito (Denayer T. 2014).

5.1. Modelos animales en DM

En el caso específico de la DM1, los modelos animales generados hasta ahora han sido muy útiles para reconstruir el complejo mecanismo de patogénesis de esta enfermedad multisistémica. Se han generado modelos tanto en invertebrados como en vertebrados. Entre los invertebrados, los modelos de *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* son los más relevantes y poseen ventajas considerables, como la gran cantidad de herramientas de expresión génica y la facilidad de cultivo. El hecho de que se compone de menos de 1000 células y que su cuerpo es transparente, hace que *C. elegans* sea un organismo perfecto para la observación directa de fenotipos. En los modelos generados para el estudio de los efectos de la expresión de expansiones CTG observamos defectos en el desarrollo y la presencia de foci que resultan en el secuestro de CeMbl (Chen *et al.* 2007; Wang *et al.* 2011). Además, el uso de un modelo de nemátodo en un análisis genético ha permitido la identificación de 15 nuevos genes involucrados con la toxicidad de las repeticiones (Garcia *et al.* 2014).

Aunque el animal más usado entre los modelos en vertebrados sea el *Mus musculus* (ratón), también se generó un modelo en *Danio rerio* (pez cebra) que expresa 91 repeticiones en el contexto del gen DMPK fusionado con la proteína reportera GFP (Todd *et al.* 2014).

Introducción

5.2. Modelos de DM1 en *Drosophila*

El primer modelo que se puso a punto en *Drosophila* permitió determinar que la formación de los foci y el consiguiente secuestro de Mbl no son tóxicos en sí mismos. En estas moscas se usó el sistema de expresión de transgenes Gal4 / UAS (Brand and Perrimon 1993) para inducir la expresión de (CTG)₁₆₂ en la UTR 3' del transcrito GFP. A pesar de la presencia de foci y la colocalización de Mbl, las moscas no mostraron fenotipo deletéreo (Houseley *et al.* 2005).

Posteriormente, un nuevo modelo generado en nuestro laboratorio y en el que se expresaron 60 repeticiones en un transcrito sin ORF, mostró que además de no poseer una función patógena intrínseca, la presencia de foci ni siquiera es necesaria para la aparición de los síntomas. De hecho, en este modelo de mosca se observaron defectos en más de un evento de *splicing* relacionado con DM1, pero no se detectaron foci (Machuca-Tzili *et al.* 2006; Garcia-Lopez *et al.* 2008; Vicente-Crespo *et al.* 2008).

Un modelo más completo se obtuvo con la expresión de repeticiones más largas. En nuestro laboratorio, de hecho, se generaron modelos en los que la expresión de 480 repeticiones de CUG interrumpidas cada 20 tripletes se dirigió a los precursores del ojo y al tejido muscular. En estas moscas se pueden observar varios fenotipos reconducibles a la expresión dirigida de las repeticiones tóxicas, como la rugosidad del ojo (en el modelo del ojo) y la progresiva degeneración de los músculos indirectos del vuelo (en el modelo muscular) y, más en general, la formación de foci, la retención de Mbl, alteraciones en varios eventos de *splicing* y una reducción en la vida media (de Haro *et al.* 2006; Garcia-Lopez *et al.* 2008).

Más recientemente, se ha generado un modelo inducible con un número mayor de repeticiones interrumpidas, para imitar la progresión de la enfermedad. Dirigiendo la expresión de estas repeticiones a los músculos de larva se puede observar la aparición de los principales síntomas de DM1. En este modelo tanto la hipercontracción muscular, como la división de las fibras musculares, el tamaño

reducido de las fibras o los defectos de fusión de los mioblastos se pueden observar de forma dependiente del tamaño de la repetición (Picchio *et al.* 2013). Finalmente, el año pasado se ha presentado un nuevo modelo en el que la expresión de repeticiones se dirige específicamente al corazón de la mosca. La expresión de 250 repeticiones CTGs puras, hace que se reproduzcan en este modelo muchos aspectos cardíacos encontrados en pacientes con DM1, como arritmia y defectos de contractilidad. Además, la caracterización de este modelo se ha llevado a cabo a nivel funcional, evidenciando una reducción de la vida media de las moscas y sobre todo a nivel molecular dando prueba de la presencia de foci, del secuestro de Mbl y de defectos de *splicing* (Chakraborty *et al.* 2018).

5.3. Modelos en ratón

Con los múltiples modelos en ratones desarrollados hasta ahora, se pretendió arrojar luz sobre la patogenia de la distrofia miotónica utilizando distintos enfoques. Se observaron las consecuencias de la reducción en la expresión de *Dmpk* (Reddy *et al.* 1996; Carrell *et al.* 2016) y del gen adyacente *Six5* (Klesert *et al.* 2000; Wakimoto *et al.* 2002), con la intención de verificar la hipótesis de un mecanismo patogénico debido a haploinsuficiencia y finalmente excluirla (Hamshere *et al.* 1997). Se han creado diferentes modelos para estudiar el efecto de las repeticiones de varias longitudes y se han insertado en diferentes contextos genéticos. Obviamente, también el papel de las proteínas de la familia MBNL se ha estudiado ampliamente con el desarrollo de modelos específicos. De hecho, disponemos modelos de ratones *knock-out* para todos los parálogos de MBNL1 2 y 3 (Hao *et al.* 2008; Charizanis *et al.* 2012; Lee *et al.* 2013; Poulos *et al.* 2013; Thomas *et al.* 2017). También se han puesto a punto modelos que sobreexpresan tanto MBNL1 como su antagonista CELF (Koshelev *et al.* 2010; Ward *et al.* 2010; Chamberlain and Ranum 2012).

Introducción

Entre todos los modelos mencionados anteriormente, destacan algunos que han sido fundamentales para lograr grandes avances en la caracterización de la enfermedad. Por ejemplo, la línea de ratones HSA^{LR} es hoy en día uno de los modelos más utilizados en los estudios de DM1 (Mankodi *et al.* 2000). Su nombre deriva del hecho de que la inserción de 250 repeticiones se dirigió a la región 3'UTR del gen de la actina esquelética humana (del inglés *Human Skeletal Actin Long Repeat*). Estos ratones constituyeron la primera evidencia de la adquisición de la función del RNA tóxico y del papel de MBNL1. La sobreexpresión de la proteína en este ratón fue, de hecho, capaz de mejorar síntomas como la miotonía y la miopatía. Sin embargo, estos ratones no presentan algunos de los síntomas básicos de la enfermedad, como la inestabilidad somática y la anticipación genética, ni un aumento en los niveles de expresión de la proteína Cugbp1 (Kanadia *et al.* 2006). Un modelo más completo, se obtuvo con el desarrollo de un modelo inducible en el que 960 repeticiones se expresan en el contexto del exón 15 de DMPK humano. Estos ratones no solo muestran un aumento en los niveles de expresión de Cugbp1, sino también fenotipos estrechamente relacionados e independientes de MBNL1. También presentan un desgaste muscular típico de la DM1, que hasta ahora no se ha observado en ningún otro modelo (Wang *et al.* 2007; Orengo *et al.* 2008).

5.4. Modelo en células humanas

Debido a que la DM es una enfermedad multisistémica que afecta a muchos tejidos y tipos de células, se requieren varios modelos celulares para abordar las diversas cuestiones relacionadas con la enfermedad, como longitudes de mutación, inestabilidad, polimorfismos o mecanismos específicos de tejidos, alteraciones moleculares y el efecto de los enfoques terapéuticos (Matloka *et al.* 2018). Una metodología ampliamente usada es la expresión de repeticiones CTGs, insertadas en el 3' UTR de DMPK u otros cDNAs, en diferentes tipos celulares. Aunque carecen del entorno genómico natural, tanto los constructos de repeticiones interrumpidas

como los de repeticiones puras reproducen muchos aspectos característicos de la enfermedad. Su expresión ha sido frecuentemente empleada en diferentes líneas celulares para estudios enfocados al rastreo de moléculas y de validación de tratamientos (Rolfmeier and Lahue 2000; Lee *et al.* 2012; Ho *et al.* 2015; Nakamori *et al.* 2016).

Otros modelos de gran interés son los que consisten en líneas celulares derivadas de pacientes DM1. Los cultivos de algunos tipos de células primarias, constituyen un desafío importante debido a la disponibilidad limitada de biopsias y la dificultad para obtener material que refleje las primeras etapas del proceso de la enfermedad. Para cubrir estas exigencias se pueden utilizar células madre embrionarias (hESCs) aisladas de la masa interna del blastocisto. Estas células se distinguen por su notable potencial proliferativo a largo plazo junto con la capacidad para diferenciarse en prácticamente cualquier tipo de célula. Hasta la fecha la mayor parte del trabajo en el campo DM1 se ha realizado en células madre neurales y ha permitido la identificación de nuevas vías alteradas (Marteyn *et al.* 2011; Denis *et al.* 2013). Sin embargo, la investigación de hESC plantea varios problemas éticos y ha sido objeto de controversia en los últimos 15 años (Dumevska *et al.* 2016; Kalra *et al.* 2016; Martineau *et al.* 2018). Actualmente en el campo DM1, los cultivos celulares primarios consisten principalmente en fibroblastos dérmicos y células del músculo esquelético, también llamados mioblastos y aislados directamente del tejido del paciente. Dada la dificultad relativa de tener acceso a biopsias musculares de pacientes distróficos, se diseñó una fuente alternativa de células musculares. Como solución a la dificultad de obtener biopsias musculares de pacientes, se usan fibroblastos transducidos con una construcción viral que fuerza la entrada al proceso miogénico a través de la expresión del factor miogénico MYOD1. Las células musculares obtenidas tras la transdiferenciación expresan transcritos musculares específicos que presentan anomalías de *splicing* similares a las que se encuentran en los mioblastos primarios DM1 y los músculos de los

Introducción

pacientes (Kuyumcu-Martinez and Cooper 2006; Ravel-Chapuis *et al.* 2012). Finalmente, para evitar la limitación de la senescencia replicativa y mantener las células en un estado proliferativo, se recurre al proceso de inmortalización de los fibroblastos humanos. Para ello se requiere la expresión estable de la telomerasa humana (hTERT) para evitar el acortamiento excesivo de los telómeros que desencadena la entrada en la senescencia replicativa. Como resultado, las líneas celulares DM1 inmortalizadas muestran un número potencialmente ilimitado de divisiones mientras mantienen la mayoría de las características específicas de tejido y enfermedad. Además, la selección clonal conduce a cultivos celulares homogéneos, que permiten proporcionar resultados más consistentes y reproducibles. Las células inmortalizadas debido a su vida útil ilimitada son de especial interés cuando se necesitan cantidades considerablemente grandes de material celular, por ejemplo, para exámenes de alto rendimiento (O'Leary *et al.* 2010; Ketley *et al.* 2014).

En este trabajo se han utilizado dos líneas celulares cedidas por el doctor Denis Furling del Centro de Investigación en Myología de la Universidad La Sorbona de Paris. Se trata de fibroblastos obtenidos de biopsias de un individuo sano (células de control) y de un paciente con DM1 (célula DM1). Las dos líneas celulares se diseñaron posteriormente con la construcción para la expresión de MYOD1 que permite la transdiferenciación a mioblastos. Las células también se inmortalizaron con el sistema descrito anteriormente. Como descrito en un trabajo publicado en 2017, el estudio de caracterización de la línea celular demuestra que se mantienen las características moleculares asociadas con el mecanismo de ganancia de función de RNA tóxico, como los agregados de RNA nuclear y los defectos de *splicing*. Estos fenotipos representan parámetros objetivos muy valiosos para evaluar la eficacia de los compuestos terapéuticos, validando esta línea de células musculares como modelo de DM1 (Arandel *et al.* 2017).

6. Estado actual en el desarrollo de tratamientos para la Distrofia miotónica

Con una prevalencia de 1 sobre 8000 individuos afectados en Europa, la distrofia miotónica es el tipo de distrofia más frecuente en la población adulta; sin embargo, está clasificada como enfermedad rara. Con este término se indica una patología que afecta a un pequeño número de personas en comparación con otras enfermedades prevalentes en la población general.

En el caso específico de la DM, casi treinta años después de su primera descripción y a pesar de los esfuerzos de la investigación científica, todavía no existe una cura y el tratamiento paliativo de los síntomas es actualmente la única opción para los pacientes (Kumar and Agarwal 2015). En concreto se ha intentado intentando poner a punto tratamientos para los síntomas más característicos tanto de DM1 como de DM2, como por ejemplo la miotonía (Grant *et al.* 1987; Sugino *et al.* 1998; Furuya *et al.* 2005; Vita *et al.* 2019) y la debilidad muscular (Schneider-Gold *et al.* 2003; Matsumura *et al.* 2004). Además, se han buscado soluciones para las manifestaciones sistémicas de la enfermedad tales como la aparición de cataratas (tratadas con cirugía), el tratamiento de la arritmia cardiaca (Folkers *et al.* 1985; Lazarus *et al.* 2002; Petri *et al.* 2012), el tratamiento de la diabetes (Kashiwagi *et al.* 1999; Kouki *et al.* 2005; Takeshima *et al.* 2018) y de la somnolencia diurna (MacDonald *et al.* 2002; West *et al.* 2016).

6.1. Dianas moleculares y conceptos generales del diseño terapéutico en DM1

La Figura I-6 muestra un resumen de las etapas de la cascada patogénica de DM1, indicando además los conceptos generales de las estrategias de diseño terapéutico. Dirigirse a la etapa más temprana de la fisiopatología, es decir, en este caso a la expansión CTG del DNA, es la estrategia que posee el potencial para el mayor beneficio terapéutico ya que todos los efectos posteriores se anularían. Sin embargo, a menudo es el enfoque más difícil y técnicamente desafiante.

Introducción

Por otro lado, moviéndose aguas abajo en la cascada patogénica de la DM1, el diseño y la ejecución de las potenciales terapias parece ser más accesible. No obstante, el aumento en el número de procesos celulares comprometidos disminuye la cantidad de efectos beneficiosos que se pueden obtener.

Por ejemplo, un enfoque dirigido a la alteración del procesado del mRNA del canal de cloruro en pacientes con DM1 puede ser más factible que uno dirigido a la expansión de repeticiones a nivel del DNA. El efecto resultante, sin embargo, se observaría solo a nivel de la miotonía en el músculo esquelético, mientras que otras complicaciones sistémicas permanecerían. Por lo tanto, la terapia ideal sería la que permite mantener un equilibrio entre los beneficios producidos, una relativa facilidad técnica y un efecto mínimo en los mecanismos celulares no relacionados (Kumar and Agarwal 2015). Teóricamente, y en la práctica, cada una de las etapas alteradas en la patogénesis de la DM1 podría ser objeto de modificación y de intervención. A continuación, analizaremos los diversos enfoques terapéuticos, así como sus posibles aplicaciones y limitaciones a las enfermedades humanas.

6.2. Estrategias propuestas para la intervención terapéutica en DM1

Desde el descubrimiento de la mutación que causa DM1, el objetivo principal ha sido la corrección de la expansión de las repeticiones de CTG a través de la manipulación genética. Solo recientemente, los avances realizados en el campo de la ingeniería molecular, como las nucleasas de dedo de zinc (ZFN), las nucleasas de actividad similar a activador de transcripción (TALEN, del inglés *Transcription Activator-Like Effector Nuclease*) y el revolucionario sistema CRISPR/Cas, han hecho que esta estrategia sea posible (Doudna and Charpentier 2014; Tebas *et al.* 2014; Raaijmakers *et al.* 2019). Sin embargo, se trata de metodologías técnicamente complejas.

En DM, los TALEN se han utilizado para corregir las células madre derivadas del paciente mediante la inserción de una señal de poliadenilación aguas arriba de las repeticiones CTG (Xia *et al.* 2015; Gao *et al.* 2016). De esa manera se obtiene la terminación prematura de la transcripción de RNA tóxico, evitando así la formación de foci, la retención de MBNL en el núcleo y rescatando los eventos de *splicing* alterados.

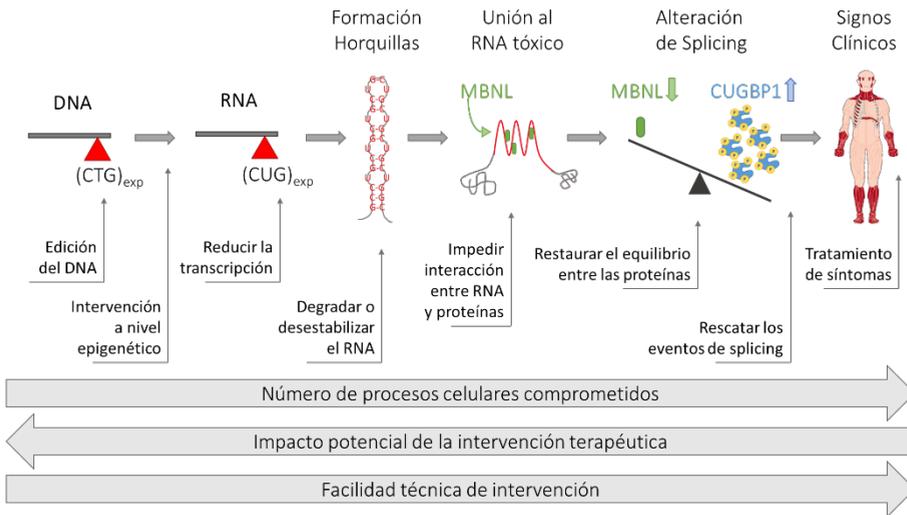


Figura I- 6. Fases de la patogénesis de DM1 y posibles enfoques terapéuticos.
 En el gen DMPK la expansión de las repeticiones de CTG conlleva la transcripción del RNA mutante. Los efectos tóxicos de esta molécula tienen origen de la formación de agregados nucleares y la alteración de los niveles de expresión de proteínas reguladoras a través de varios mecanismos. La pérdida del balance entre MBNL1 y CELF1 da como resultado la alteración del procesamiento de numerosos transcritos, favoreciendo el mantenimiento de las isoformas fetales y causando muchos, si no todos, los fenotipos observados. Se indican las posibles estrategias terapéuticas dirigidas a cada una de las etapas patogénicas buscando un equilibrio entre la dificultad de ejecución y los efectos alcanzables (adaptada de Kumar *et al.* 2015).

La mayor limitación en la utilización de esta estrategia en DM1 es la naturaleza multisistémica de la enfermedad. Con la tecnología actual la idea de corregir todos los tejidos afectados no es viable ya que la distribución sistémica es muy dificultosa. Por lo tanto, por el momento los estudios se están centrando en optimizar la distribución local, específicamente a la musculatura esquelética, con el uso de

Introducción

diferentes metodologías que se encuentran actualmente en la fase de estudio preclínico (Ran *et al.* 2015; Tabebordbar *et al.* 2016).

Otro enfoque estudiado intensamente en los últimos años consiste en el uso de fragmentos cortos de ácido nucleico que pueden actuar sobre un RNA de interés que posea una secuencia complementaria. Al modificar de manera específica la química de estos oligonucleótidos anti sentido (ASO, del inglés *AntiSense Oligonucleotides*) es posible controlar su mecanismo de acción. En concreto los ASOs pueden potencialmente restaurar el correcto funcionamiento de MBNL1, ya sea bloqueando estéricamente su interacción con CUGexp (Wheeler *et al.* 2012) o mediante la degradación del RNA tóxico mediada por RNasa-H (Lee *et al.* 2012; Gao and Cooper 2013).

Los anticuerpos también se han utilizado para bloquear la señalización TWEAK / Fn14 en DM1, con efectos deseables, en un modelo de enfermedad (Yadava *et al.* 2015).

Otro campo altamente innovador y que ha crecido enormemente en los últimos años consiste en el uso de micro-RNA como diana terapéutica. El estudio realizado por la doctora Estefania Cerro-Herreros y colaboradores en nuestro laboratorio es un ejemplo del uso de esta estrategia emergente en DM. En concreto, se han identificado dos microRNAs que regulan los transcritos de MBNL1 y 2 reprimiendo su expresión. Además se ha demostrado que, tras la eliminación de estos microRNAs, la expresión de MBNL1 vuelve a aumentar acompañada por el rescate de varios fenotipos patológicos característicos de DM1 tanto en un modelo de mosca como en uno de ratón (Cerro-Herreros *et al.* 2016; Cerro-Herreros *et al.* 2018).

Los modelos de la enfermedad de células y moscas se han utilizado junto con estudios computacionales de la estructura de CUGexp, en rastreos de alto rendimiento para explorar posibles estrategias terapéuticas (Chen *et al.* 2012; Garcia-Alcover *et al.* 2014; Ketley *et al.* 2014; Yildirim *et al.* 2015).

6.3. Pequeñas moléculas como terapia para la DM

Para el propósito de este trabajo, resultan de particular interés los fármacos basados en moléculas pequeñas. En una revisión de 2017 titulada “Distrofia miotónica: pequeñas moléculas candidatas a terapéuticos” y de la que soy coautora, discutimos en detalle los compuestos que pertenecen a esta categoría y que se han identificado en varios estudios en los últimos 5 años (Konieczny *et al.* 2017). Los compuestos se clasificaron según su mecanismo de acción y la metodología que condujo a su descubrimiento. Entre los más comunes se encuentran el reposicionamiento de fármacos y el uso de rastreos de alto rendimiento. A continuación, enumeramos algunos ejemplos de compuestos cuyo MOA (del inglés *Mechanism Of Action*) está esquematizado en la Figura I-7. La mayoría de los compuestos actúan compitiendo con MBNL1 para unirse a CUG_{exp} y liberan la proteína secuestrada. Otras moléculas actúan directamente sobre la conformación del RNA tóxico y despliegan o comprimen la estructura de la horquilla alterando su afinidad por las proteínas con las que interacciona.

En algunos casos, los fármacos actúan modulando la expresión génica endógena. La Mexiletina, la Prilocaína y la Procainamida inhiben la transcripción DMPK normal y mutante (Logigian *et al.* 2010; Witherspoon *et al.* 2015), mientras que la Actinomicina D y la Heptamidina disminuyen específicamente el nivel de mRNA que contiene CUG_{exp} (Coonrod *et al.* 2013; Siboni *et al.* 2015).

La Dilomofungina se identificó durante un cribado farmacológico de alto rendimiento y se seleccionó como un potente inhibidor de la unión entre MBNL1 y las repeticiones CUGs, por las que tiene una alta afinidad (17 veces mayor que la del monómero correspondiente, Lomofungina). Sorprendentemente, los resultados obtenidos de un ensayo en el modelo celular mostraron que la actividad anti-DM del dímero es menor que la del monómero. En este caso, la razón de esta diferencia radica en el hecho de que la Dilomofungina reduce la tasa de

Introducción

degradación de DMPK aumentando su nivel de expresión, y, en consecuencia, incrementando el número de foci (Hoskins *et al.* 2014).

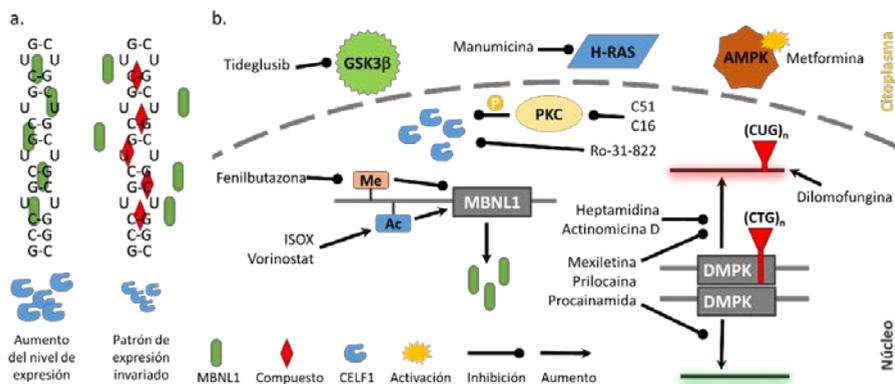


Figura I- 7. Mecanismos de acción de compuestos anti-DM1 seleccionados.

a. En DM1 el RNA tóxico está caracterizado por una estructura secundaria a horquilla que secuestra la proteína MBNL1 y activa CELF1 a través de una vía no bien establecida (izquierda). Los compuestos candidatos contra DM1 pueden actuar compitiendo con MBNL1 para unirse a CUG_{exp} y liberar así la proteína secuestrada (derecha); también pueden desplegar o apretar la estructura de horquilla (no se muestra). **b.** Ejemplos de mecanismos de acción conocidos de compuestos anti-DM1 (Adaptada de Konieczny *et al.* 2017).

La Fenilbutazona es un antiinflamatorio no esteroideo que es muy relevante en DM1 ya que actúa a través de dos mecanismos: además de competir por la unión de MBNL1 a CUG_{exp}, actúa a nivel epigenético reduciendo la metilación de un potenciador del gen y esto hace que la transcripción de MBNL1 aumente de manera proporcional a la dosis suministrada (Chen *et al.* 2016). ISOX y Vorinostat inhiben las histonas desacetilasas, que reprimen la expresión de MBNL1, por lo que los niveles de proteína MBNL1 disponibles aumentan (Zhang *et al.* 2017). Otros compuestos afectan las vías de señalización celular y tienen un efecto indirecto y beneficioso sobre la DM1. Tideglusib inhibe la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), que afecta indirectamente la fosforilación de CELF1, probablemente a través de la ruta de la ciclina D3 / CD4 (clinicaltrials.gov: NCT02858908). La Metformina, que actúa a través de la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)

(Laustriat *et al.* 2015); En el marco de un ensayo clínico aleatorio controlado, el tratamiento de pacientes DM1 con este conocido fármaco anti-diabético, ha producido una mejora de las capacidades deambulatorias y un incremento de la distancia recorrida en 6 minutos (Bassez *et al.* 2018).

7. Los péptidos como terapéuticos

Los péptidos representan una clase única de compuestos farmacéuticos, molecularmente ubicados entre moléculas pequeñas y proteínas, pero bioquímicamente y terapéuticamente distintos de ambos. Dado su atractivo perfil farmacológico y sus propiedades intrínsecas, los péptidos representan un excelente punto de partida para el diseño de nuevas terapias y se ha visto que su especificidad se traduce en excelentes perfiles de seguridad, tolerabilidad y eficacia en humanos (Yang and Hinner 2015). Este aspecto también podría ser el principal factor de diferenciación de los péptidos en comparación con las moléculas pequeñas tradicionales. Además, las terapias peptídicas se asocian típicamente con una menor complejidad de producción en comparación con los productos biofarmacéuticos basados en proteínas y, por lo tanto, los costes de producción también son más bajos, los cuales en general se acercan a los de las moléculas pequeñas. Los fármacos peptídicos han desempeñado un papel notable en la práctica médica desde la llegada de la terapia con insulina en la década de 1920 (Banting *et al.* 1922). Desde entonces la utilización de péptidos como terapéuticos ha evolucionado junto con los cambios en los paradigmas de desarrollo y tratamiento con fármacos. Los péptidos aislados de fuentes naturales, como la insulina y la ACTH (Hoefer and Glaser 1950), proporcionaron medicamentos vitales en la primera mitad del siglo XX. Cuando la elucidación de la secuencia y la síntesis química de los péptidos se hicieron factibles en la década de 1950, la oxitocina sintética y la vasopresina también entraron en uso clínico (Douglas *et al.* 1957). El

Introducción

entusiasmo por la terapéutica peptídica se vio atenuado posteriormente por ciertas limitaciones de los péptidos nativos, como la semivida plasmática corta y la biodisponibilidad oral reducida. De hecho, las enzimas digestivas diseñadas para romper los enlaces amida de las proteínas ingeridas son efectivas para dividir los mismos enlaces en las hormonas peptídicas, y la alta polaridad y el peso molecular de los péptidos limitan fuertemente la permeabilidad intestinal. Dado que la administración oral a menudo se considera atractiva para respaldar el cumplimiento del paciente, la necesidad de inyección hace que los péptidos sean una opción menos atractiva para las patologías que requieren tratamiento crónico (Lau and Dunn 2018).

Las nuevas estrategias sintéticas permiten la modulación de las propiedades farmacocinéticas y la especificidad de la diana mediante la modificación de aminoácidos o esqueletos, la incorporación de aminoácidos no naturales y la conjugación a moléculas que prolongan la vida media o mejoran la solubilidad.

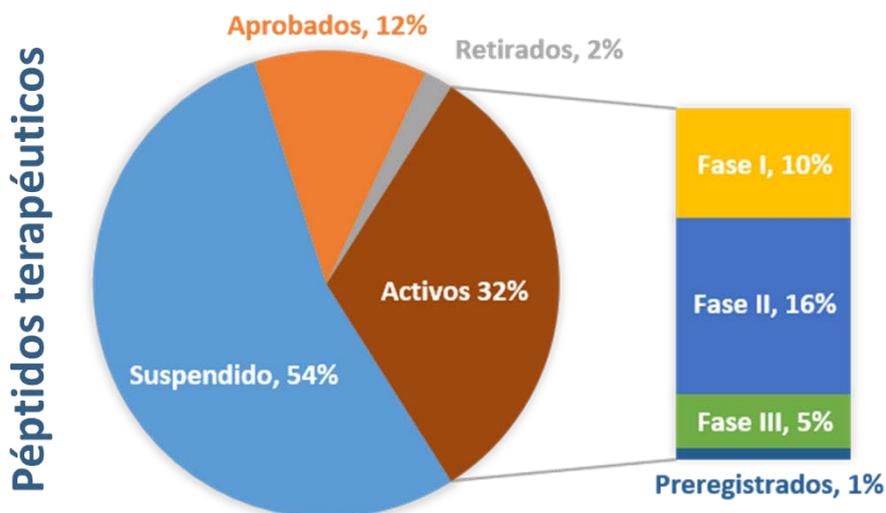


Figura I- 8. Estado de desarrollo actual de los péptidos terapéuticos.

Los porcentajes se refieren a todos los péptidos en la categoría dada. "Retirados" se refiere a productos previamente aprobados que ya no están en el mercado; "suspendido" se refiere a los programas terminados antes de la aprobación, y la categoría "Activos" abarca todos los péptidos en desarrollo clínico activo. (Adaptada de Lau *et al.* 2018).

Además del diseño de péptidos tradicional, ha surgido una gama de tecnologías de péptidos que representan las oportunidades y direcciones futuras dentro del campo de péptidos. Estos incluyen péptidos multifuncionales y de penetración celular, así como conjugados de fármacos peptídicos y tecnologías que se centran en vías alternativas de administración (Fosgerau and Hoffmann 2015). Hasta la fecha, más de 60 medicamentos peptídicos han sido aprobados en los Estados Unidos, Europa y Japón; más de 150 están en desarrollo clínico activo, y 260 adicionales se han probado en ensayos clínicos en humanos (Figura I-8).

7.1. Descubrimiento y caracterización de un péptido anti-DM1: Abp1

En la última década, el entorno competitivo para el descubrimiento de nuevos fármacos ha creado la necesidad de estrategias que aceleren el proceso de identificación de entidades químicas que interactúen con *target* moleculares conocidos. El proceso de identificación de nuevos compuestos candidatos a fármaco, se basa en una variedad de nuevas tecnologías que incluyen bioinformática, química combinatoria y los rastreos de alto rendimiento.

Un rastreo de alto rendimiento, junto con un modelo de DM1 en *Drosophila*, fueron las herramientas indispensables para un estudio que se llevó a cabo hace años en nuestro laboratorio y que llevó a la identificación de un péptido con una actividad anti-DM1 significativa. Con más detalle, la doctora Amparo García llevó a cabo el rastreo de una quimioteca combinatoria sintética de barrido posicional (PS-SCL, del inglés *Positional Scanning-Syntetic Combinatorial Library*) de hexapéptidos compuestos por D-aminoácido (Pinilla *et al.* 1995; Blondelle *et al.* 1996). La quimioteca comprendía 120 viales, cada uno de los cuales contenía aproximadamente 2.5 millones de hexapéptidos (por un total de 300 millones de hexapéptidos). Las moléculas fueron evaluadas por su capacidad de rescatar un fenotipo semiletal específico de las hembras en estado pupa de un modelo neuronal de DM1 en *Drosophila*. En este modelo, la expresión de 480 repeticiones

Introducción

de CTG interrumpidas, *UAS-i(CTG)480*, fue dirigida a una estructura cerebral de *Drosophila*, los cuerpos de seta (MB, del inglés *Mushroom Bodies*) con el *driver* *103Y-Gal4*. El efecto tóxico de las repeticiones era letal ya que hace que las moscas no sean capaces de llevar a cabo los movimientos necesarios para eclosionar de la pupa (García-López *et al.* 2008).

La fase final del rastreo, llevó a la identificación de 16 hexapéptidos con secuencia relacionada, que mostraban una actividad positiva sobre el fenotipo de referencia (García-López *et al.* 2008, tabla S1 material suplementario). Entre ellos el péptido Ac-ppyawe-NH₂, denominado Abp1, destacó por presentar la mayor capacidad de rescate del fenotipo y fue seleccionado por un estudio detallado de su actividad (García-López *et al.* 2011).

Los efectos del tratamiento con el hexapéptido Abp1 se estudiaron en detalle en un modelo muscular de DM1 en *Drosophila*, en el que la expresión de las repeticiones está bajo el control del promotor de la cadena pesada de la miosina. Las moscas alimentadas con el péptido mostraron una reducción significativa en el número de foci ribonucleares, acompañados por la liberación de Mbl desde el núcleo. También fue posible observar un mejor fenotipo de atrofia de los músculos indirectos del vuelo característico de este modelo.

El estudio del mecanismo de acción del péptido, mostró que Abp1 presenta una afinidad por las repeticiones (CUG)_n superior a la que presenta por otros tipos de secuencias repetitivas. También se estableció que el péptido se une a las repeticiones *in vitro*, abriendo las características horquillas y estabilizando el RNA tóxico en su conformación de cadena sencilla, sin competir con la proteína MBNL1 en su unión al RNA.

Posteriormente, la actividad de Abp1 también se estudió en un modelo de ratón de la enfermedad. Tras la inyección intramuscular de Abp1, fue posible observar en los ratones HSA^{LR} la mejora de varios fenotipos, incluido el rescate de diversos eventos de *splicing* alternativo típicamente alterados en la DM1. A nivel histológico fue

posible observar una reducción en el número de fibras musculares con núcleos centrales y un aumento de los canales de cloruro presentes en la membrana plasmática.

Los resultados obtenidos fueron tan prometedores que se propuso que Abp1 pudiera representar un punto de partida en la generación de nuevos tratamientos efectivos para la DM1. Una ventaja importante de ABP1 es que está compuesta de D-aminoácidos, que no son reconocidos por las proteasas (Borek *et al.* 1965). Esto, junto con su pequeño peso molecular (<900 Da), confiere a Abp1 una biodisponibilidad sistémica potencialmente mayor en comparación con los péptidos de L-aminoácidos más grandes. La resistencia a proteasas de Abp1 también confiere estabilidad en el organismo y, por lo tanto, puede exhibir efectos duraderos.

7.2. Proceso *HIT* to *LEAD*

En el largo proceso de desarrollo de fármacos se suele identificar con el término molécula "*HIT*" un compuesto seleccionado en el marco de un rastreo por tener la actividad deseada y cuya actividad se confirma al volver a realizar la prueba o tras una segunda ronda de ensayos más específicos.

Para que un compuesto se pueda proponer como un medicamento real, primero se deberá llevar a cabo un largo proceso de caracterización y refinamiento con el fin de obtener el máximo de los efectos positivos administrando la menor dosis posible. Este camino se denomina proceso "*HIT TO LEAD*" donde el término *Lead* indica un compuesto candidato para ingresar en fase de estudio clínico (Figura I-9). Una fase muy importante de esta ruta es, sin duda, un estudio en profundidad del mecanismo de acción del compuesto seleccionado, a través de ensayos *in vitro*. Durante el desarrollo de "*LEAD*", además, las moléculas se suelen analizar en ensayos basados en células que predicen el estado de la enfermedad y en modelos animales de la enfermedad para caracterizar tanto la eficacia del compuesto como su probable perfil de seguridad (Hughes *et al.* 2011).

Introducción

En farmacología, el acrónimo ADME significa Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción y se utiliza para describir la disponibilidad de un compuesto farmacéutico en el organismo. Esos cuatro criterios tienen una influencia directa sobre el nivel del fármaco y su farmacocinética al ser expuesto a los tejidos y por tal razón, influyen en el rendimiento y actividad farmacológica del compuesto medicamentoso. Por lo tanto, otra fase muy importante será la de averiguar si las características ADME del compuesto en estudio son apropiadas o si será necesario mejorar una o alguna de ellas.

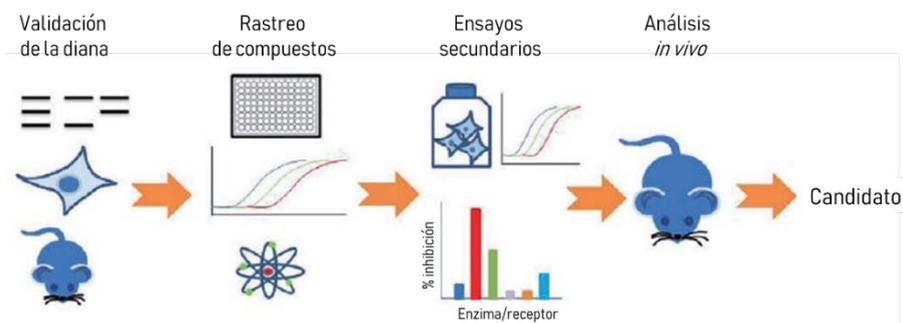


Figura I-9. Rastros de moléculas para el descubrimiento de fármacos.

Modelos experimentales de diferentes tipologías (genéticas, celulares o *in vivo*) se utilizan para establecer y validar la diana terapéutica; los rastros de librerías preceden la fase de diseño y síntesis reiterativa de compuestos que serán estudiados con ensayos *in vitro* y *ex vivo*. Sigue el estudio preliminar *in vivo* en el que, además de caracterizar la actividad del o de los compuestos seleccionados, se estudia su toxicidad y su farmacocinética. Este proceso lleva a la identificación de un candidato adecuado a un estudio preclínico (Adaptada de Hugues *et al.* 2010).

En el caso específico de los péptidos, estos suelen estar caracterizados por una baja permeabilidad, inestabilidad metabólica, vida media corta y tiempo de residencia limitado en los tejidos. La mayoría de los péptidos tienen una baja permeabilidad a través de las membranas celulares debido a la alta capacidad de enlace del hidrógeno y la baja lipofilia (Rezai *et al.* 2006). La baja biodisponibilidad oral de los péptidos se debe principalmente a la baja absorción y la alta extracción de primer paso debido a la hidrólisis enzimática y mediada por pH en el tracto gastrointestinal

(GI) y el hígado (Mahato *et al.* 2003). En consecuencia, los fármacos peptídicos se administran con frecuencia como inyectables o por otras vías alternativas como inhalado, intranasal y transdérmico. Los péptidos no modificados generalmente tienen vidas medias muy cortas (por ejemplo, minutos) que resultan en proteólisis total sangre, riñones o hígado y/o aclaramiento renal rápido (Diao and Meibohm 2013). Se han desarrollado herramientas *in silico*, *in vitro* e *in vivo* para abordar los desafíos ADME de los péptidos. Existen estrategias de modificación estructural para mejorar el desarrollo de péptidos (Di 2015). El hecho de que nuestro Abp1 esté compuesto completamente de D-aminoácidos es en sí mismo una ventaja para una vida media más alta de la molécula, ya que este tipo de aminoácido es más resistente a las proteasas. Un estudio piloto de sus características ADME demostró que la molécula tiene una buena solubilidad, una elevada estabilidad en plasma y que no presenta toxicidad. Sin embargo, evidenció una baja permeabilidad de Abp1 en células, con lo cual este será el punto de partida del proceso de optimización “*HIT to LEAD*” del hexapéptido.

OBJETIVOS

La distrofia miotónica es la forma más común de distrofia muscular en adultos. A pesar de la gravedad, la incidencia y relevancia de la distrofia miotónica ningún tratamiento eficaz ha sido encontrado. No obstante, la cantidad de estudios ha aumentado exponencialmente en los últimos años y la falta de un tratamiento efectivo hace que el descubrimiento del péptido ABP1 sea de gran importancia en el campo.

Debido a su perfil farmacológico atractivo y a sus propiedades intrínsecas, los péptidos representan un excelente punto de partida para el diseño de nuevas terapias ya que se ha visto que su elevada especificidad se traduce en una excelente seguridad, tolerabilidad y eficacia en humanos (Fosgerau and Hoffmann 2015).

Por estas razones y a la luz del enorme potencial observado en los datos sobre la actividad anti-DM1 del péptido Abp1, existe la necesidad de profundizar en el estudio de este candidato prometedor. Nuestro propósito ha sido caracterizar la actividad anti DM1 de Abp1 y de sus derivados para así comenzar estudios posteriores en modelos de ratón que serán el primer paso hacia la evaluación preclínica de las moléculas más prometedoras.

Con todo lo anteriormente expuesto, los objetivos que se persiguieron durante el desarrollo de la presente tesis doctoral son los siguientes:

Objetivo 1 – Optimizar la actividad anti-DM1 del hexapéptido Abp1 a través del diseño racional y síntesis de péptidos derivados cuyos efectos se estudiarán en un modelo de la enfermedad en *Drosophila melanogaster* y en mioblastos de pacientes DM1.

Objetivo 2 – Evaluar la actividad de hexapéptidos con secuencia relacionada a Abp1 en un modelo de la enfermedad en *Drosophila melanogaster* y en mioblastos de

Objetivos

pacientes DM1; analizar las relaciones entre la actividad biológica observada y la secuencia aminoacídica de los péptidos.

Objetivo 3 – Estudiar con diferentes aproximaciones el mecanismo de acción de los compuestos con actividad optimizada que se habrán seleccionado como nuevos candidatos a terapéuticos anti-DM.

RESULTADOS

I-MEJORA DE LA ACTIVIDAD DE ABP1

1. Estudio preliminar de Abp1 en células

El estudio piloto sobre la actividad del hexapéptido Abp1 estuvo enfocado a la evaluación de su actividad anti-DM1 en modelos en sistema nervioso y muscular de la enfermedad en *Drosophila* y en un modelo en ratón (Garcia-Lopez *et al.* 2011). Sin embargo, además de destacar numerosos efectos beneficiosos en ambos modelos, también surgieron algunas limitaciones que dejaron abierto un margen de mejora sobre el que seguir investigando.

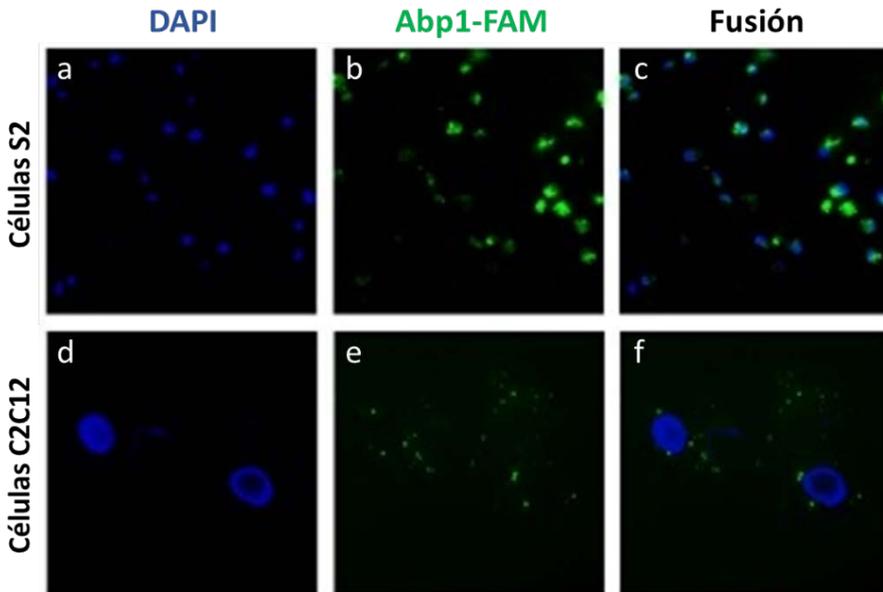


Figura R-1. Localización subcelular de Abp1 en células de *Drosophila* y de ratón. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de línea celular S2 de *Drosophila* (a, b y c) y C2C12 de ratón (d, e y f). Los núcleos se tiñeron con Dapi (azul) y la localización subcelular de Abp1 se observó a través de la detección directa de la señal propia del fluoróforo FAM (verde) con el que se encuentra marcado.

En concreto, se pudo observar que la expresión endógena del hexapéptido en su versión retroinversa y constituido por L-aminoácidos, producía rescates

Resultados

definitivamente más significativos de los fenotipos distróficos observados; esto sugirió que la administración oral de una concentración no tóxica no puede garantizar que un porcentaje suficiente de péptido alcance el tejido diana. De modo similar, la inyección intramuscular de Abp1 en el músculo tibial anterior de los ratones HSA^{LR} produjo una significativa mejora de la histopatología del tejido muscular y un rescate parcial de algunos eventos de *splicing*. A pesar de ello, los efectos observados en la pata no inyectada eran casi nulos, sugiriendo problemas de difusión del péptido en los tejidos.

Esta interpretación fue confirmada tiempo después con unos ensayos que se llevaron a cabo con la supervisión y colaboración del Doctor Juan Manuel Fernández Costa, durante la fase inicial de este proyecto. Brevemente, utilizando Abp-1 marcado con el fluoróforo FAM y tiñendo el núcleo celular con DAPI, se estudió la localización subcelular del péptido en diferentes tipos celulares. En primer lugar, se utilizaron células Schneider 2, generalmente abreviadas como células S2. Estas células se derivaron de un cultivo primario de embriones de *Drosophila melanogaster* en etapa tardía (20-24 horas) por el Dr. Schneider, probablemente de un linaje similar a los macrófagos y representan una de las líneas celulares de *Drosophila melanogaster* más comúnmente utilizadas (Ceriani 2007). Como demuestran las imágenes de la Figura R-1 (paneles a, b y c), tras una incubación de 24 horas con 100 μ M de Abp1, la señal verde correspondiente al péptido marcado, se pudo observar tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células. A continuación, el mismo experimento se llevó a cabo en células C2C12, una línea celular de mioblastos de ratón inmortalizados (McMahon *et al.* 1994); de manera congruente con los datos anteriormente publicados en este caso la señal verde se observó en el citoplasma de las células y alrededor del núcleo, pero no en su interior (Figura R-1, paneles d, e y f), proporcionando así una posible explicación a la actividad reducida en el modelo de ratón y apoyando la hipótesis de una reducida permeabilidad. Tras este hallazgo, surgió lógicamente la necesidad de

estudiar si la incapacidad de entrar en el núcleo era limitada a las células de ratón o si pertenecía a las células de mamífero en general. Por lo tanto, se repitió una vez más el mismo experimento, empleando esta vez dos líneas celulares de humano. Desafortunadamente lo observado en células de ratón se reprodujo tanto en los fibroblastos DM1 (Figura R-2, paneles a, b y c) como en células HeLa (Figura R-2, paneles d, e y f). Cabe destacar que los análisis de sangre que García y colaboradores llevaron a cabo tras el sacrificio de los ratones tratados con Abp1, evidenciaron alteraciones en marcadores de daño de órgano, como la creatinina y el GTP (García-López 2010). Por lo tanto, existía la necesidad de mejorar las características farmacológicas del hexapéptido con el fin de mejorar por un lado su permeabilidad y su biodistribución y por el otro de reducir su toxicidad.

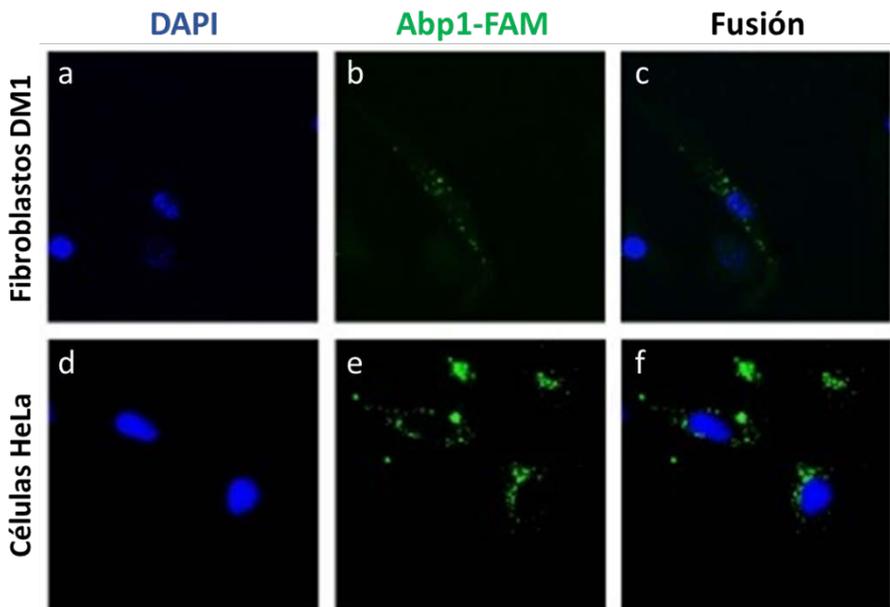


Figura R-2. Localización subcelular de Abp1 en células de humano.

Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de línea celular de fibroblastos DM1 de paciente (a, b y c) y de células HeLa (d, e y f). Los núcleos se tiñeron con Dapi (azul) y la localización subcelular de Abp1 se observó a través de la detección directa de la señal propia del fluoróforo FAM (verde) con el que se encuentra marcado.

Resultados

Además de las evidencias experimentales obtenidas en el estudio anterior y durante la fase preliminar de este trabajo, es sabida la estabilidad reducida y la escasa biodisponibilidad de todos los péptidos no modificados propuestos como terapéuticos (Latham 1999; Patch and Barron 2002). Adicionalmente, como la mayoría de los medicamentos se administran lejos del tejido diana, deben ser capaces de alcanzar el tejido diana que generalmente implica la penetración de varias barreras biológicas (Adessi and Soto 2002). Por estas razones, a pesar de las numerosas ventajas del uso de péptidos como terapéuticos, se sigue investigando para identificar estrategias alternativas: intentando mejorar la biodisponibilidad de los péptidos o bien a través del diseño de péptido-miméticos (Saini A. 2017).

2. Diseño racional y síntesis de moléculas peptídicas derivadas de Abp1

Este primer propósito se llevó a cabo con el asesoramiento de químicos expertos en diseño molecular *in silico* y en síntesis de péptidos y de biofísicos expertos en el estudio de la estructura de macromoléculas. Juntos seleccionamos algunas modificaciones que pudieran optimizar las características químico-físicas y consecuentemente biológicas de Abp1, como su estabilidad enzimática y su biodisponibilidad, preservando o incluso potenciando al mismo tiempo su actividad biológica.

2.1. Modificaciones que aumentan la estabilidad

Reemplazar algunos o todos los L-aminoácidos de una secuencia peptídica con los D-aminoácidos correspondientes, suele ser la primera modificación propuesta para la mejora de los parámetros biológicos de un péptido que se utilizará como fármaco. De hecho, se sabe desde hace muchos años que este simple cambio puede dar al péptido candidato una resistencia a la degradación proteolítica, además de

hacerlo significativamente menos inmunogénico con respecto al péptido no modificado.

La quimioteca de la que proviene Abp1 incluía solo hexapéptidos compuestos por D-aminoácidos; por lo tanto, para mejorar aún más sus características tuvimos que elegir otra estrategia y decidimos proceder a la síntesis de un pseudopéptido. Con este término se indica una molécula generada a través de la alteración del enlace peptídico, como por ejemplo la sustitución de algunos de los átomos o de algunos grupos químicos que participan en el esqueleto peptídico. Se trata por lo tanto de derivados que son solo parcialmente peptídicos en su naturaleza química (Adessi and Soto 2002).

La identificación de andamios químicos bioinspirados, pero no naturales, de bajo coste y estables, ha sido un objetivo a largo plazo para una gran cantidad de aplicaciones, que abarcan desde la química médica hasta la ciencia de los materiales. Entre los varios tipos de moléculas derivadas de péptidos, el uso de los peptoides ha sido uno de los enfoques más simbólicos de las últimas dos décadas, debido a su capacidad para adoptar nanoestructuras plegadas y, por lo tanto, estar diseñado para solucionar algunas de las complicaciones más comunes asociadas con las terapias con péptidos, como por ejemplo su inmunogenicidad potencial y la escasa estabilidad metabólica *in vivo* (Patch and Barron 2002; Dohm *et al.* 2011).

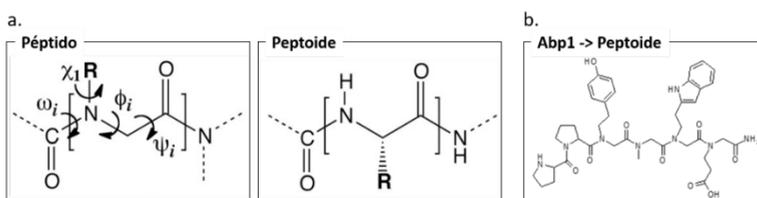


Figura R-3. Comparación esquemática entre un péptido y un peptoid.

Los peptoides, o glicinas poli-N-sustituidas, son una clase de peptidomiméticos cuyas cadenas laterales están unidas al átomo de nitrógeno del esqueleto peptídico, en lugar de a los carbonos α (como ocurre en los péptidos); **a.** En la representación se puede observar el parecido de la distancia entre las cadenas laterales en los dos tipos de moléculas y la ausencia de quiralidad del monómero peptoides. En **b** se representa Abp1 en su versión de peptoides.

Resultados

Los peptoides son oligómeros basados en una cadena principal de poliglicina en la que las cadenas laterales están unidas al nitrógeno de la amida (glicinas poli-N-sustituidas) (Figura R-3, panel a). La presentación de las cadenas laterales de péptidos y peptoides es aproximadamente isostérica, lo que permite potencialmente un mimetismo adecuado de la separación entre los grupos funcionales críticos de los péptidos bioactivos. Además, esta modificación otorga resistencia a la proteasa, ya que las proteasas naturales no reconocen el enlace amida n-sustituido, confiriendo así una mayor estabilidad metabólica a la molécula. Su estabilidad térmica varía hasta $> 75^{\circ}\text{C}$, y son generalmente estables a las variaciones de sal y pH (Lim *et al.* 2009; Zuckermann and Kodadek 2009). Además, los peptoides son más hidrófobos que los péptidos y, por lo tanto, poseen una permeabilidad celular superior (Simon *et al.* 1992; Fowler and Blackwell 2009). En definitiva, Abp1 en su versión de peptoide (Abp1-peptoide) fue la primera molécula elegida y sintetizada con el fin de caracterizar su actividad anti-DM1 (Figura R-3, panel b).

2.2. Modificaciones que aumentan la permeabilidad en la célula

En los últimos años se han ido acumulando los casos de moléculas prometedoras que no han podido alcanzar el estadio de ensayo clínico debido a su reducida biodisponibilidad. Por esta razón la capacidad de cualquier compuesto candidato de llegar hasta el sitio de acción (*molecular delivery*) se ha convertido en uno de los puntos centrales del desarrollo de fármacos.

Entre las diversas estrategias estudiadas, una de las más investigadas es el uso de péptidos penetrantes de células (CPPs, del inglés *Cell Penetrating Peptides*). Con este término se suelen definir aquellos péptidos, generalmente catiónicos, que interaccionan con los glicosaminoglicanos asociados a la membrana celular y son internalizados por endocitosis (Abes *et al.* 2007). Históricamente, la primera descripción de un péptido con esas características es del año 1988, cuando Frankel

y Pabo (Frankel and Pabo 1988) demostraron que la proteína transactivadora de la transcripción génica (TAT, del inglés *Trans-Activator of Transcription*) del virus HIV era capaz de entrar en las células y translocar al núcleo (Green and Loewenstein 1988; Heitz *et al.* 2009). En los años siguientes, la conjugación covalente o no de diferentes fragmentos de dicha proteína con candidatos terapéuticos de diversa naturaleza, fue en muchos casos una estrategia exitosa (Abes *et al.* 2007). Más adelante otros estudios demostraron que secuencias compuestas solo de residuos de arginina o lisina son suficientes para dirigir moléculas en la célula tanto al citoplasma como al núcleo. Finalmente, y casi contemporáneamente, en otros estudios se describían péptidos con características análogas, derivados de la secuencia de localización nuclear (NLS) del antígeno T del virus SV40 y que contenían un dominio hidrófilo rico en lisinas (Morris *et al.* 2001; Park *et al.* 2002; Takechi *et al.* 2012).

El mecanismo de internalización propuesto para los CPPs catiónicos es el modelo de micela invertida. Los residuos cargados positivamente inicialmente se unen a los fosfolípidos cargados negativamente de la membrana celular selectivamente permeable. Dado que el CPP es capaz de fusionarse con esta membrana, se forman micelas tipo bolsillo que contienen el CPP, que atraviesa la membrana celular dentro de esta micela hacia el citoplasma. Cuando estas micelas atraviesan la membrana, se invierten, liberando el CPP y su carga en las células (Prochiantz 2011; Raucher and Ryu 2015).

Con todo lo anteriormente expuesto y tras el estudio atento de la bibliografía se propuso la síntesis de otros 5 derivados de Abp1. En los primeros dos, con la intención de preservar la secuencia y la estructura del péptido original, simplemente se sustituyó su último aminoácido, un ácido glutámico de carga negativa, con una arginina o una lisina ambas de carga positiva: ppyawr (Abp1-e6r) y ppyawk (Abp1-e6k). En cuanto a los otros tres derivados se decidió sintetizar Abp1, Abp1-e6r y Abp1-e6k añadidos con un fragmento de la secuencia TAT del

Resultados

virus de HIV (TAT⁴⁸⁻⁵⁷): GRKKRRQRRR-ppyawe (TAT-Abp1), GRKKRRQRRR-ppyawr (TAT-Abp1-e6r) y GRKKRRQRRR-ppyawk (TAT-Abp1-e6k). Con estas modificaciones nos propusimos mejorar la permeabilidad celular de Abp1 y solucionar sus limitaciones debidas a una reducida biodistribución.

2.3. Búsqueda de los aminoácidos funcionales de Abp1

Gracias al carácter multidisciplinar de este trabajo doctoral, hemos podido abordar la cuestión de la mejora de Abp1 con diferentes aproximaciones. En concreto se llevaron a cabo un estudio computacional de la estructura del péptido y un estudio de las características físico-químicas de la unión de Abp1 con las repeticiones tóxicas empleando técnicas de Infrarrojo. Ambos estudios llevaron a la formulación de dos hipótesis independientes cuya veracidad fue comprobada con la síntesis de dos nuevos péptidos derivados.

2.3.1. Estudio computacional de la conformación de Abp1 y péptidos relacionados

Con el objetivo de estudiar el modo de interacción del péptido Abp1 con las repeticiones CUGs, se ha trabajado en colaboración con el grupo del Prof. Roger Estrada (Laboratori de Disseny Molecular, Grup d'Enginyeria Molecular, GEM) bajo la hipótesis que la estructura peptídica juega un papel primordial en el reconocimiento e interacción con las repeticiones CUGs. Por este motivo, se ha modelizado computacionalmente la estructura tridimensional en condiciones fisiológicas de los 16 hexapéptidos (incluido Abp1), cuya secuencia había sido seleccionada en la fase final del rastreo llevado a cabo por Amparo Garcia (Garcia-Lopez *et al.* 2011).

Debido al elevado coste computacional de este tipo de cálculos, las simulaciones se han realizado utilizando recursos de la Red Española de Supercomputación. El espacio conformacional accesible para este tipo de compuestos es muy extenso y se ha requerido el uso de metodologías que permitieran explorar todas las posibles geometrías e identificar las más probables. El comportamiento dinámico de todos

los péptidos se ha estudiado por dinámica molecular. Se han realizado simulaciones de 100 ns y 1 ns, utilizando el programa AMBER (D.A. Case *et al.* 2014).

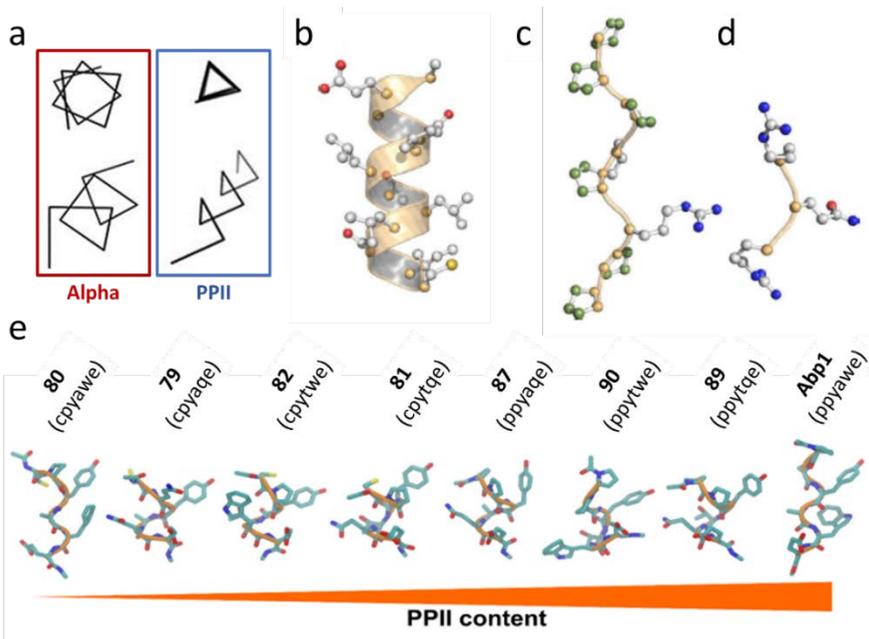


Figura R-4. El motivo poliprolina (PPII)

Representación de la orientación y la organización estructural de los diferentes tipos de hélice. **a** hélice α y hélice PPII, modeladas como la proyección del eje helicoidal y la proyección en perspectiva (adaptado de Adzhubei *et al.* 2013). **b** α -hélice: los aminoácidos en una hélice α están dispuestos en una estructura helicoidal dextrógira, con unos 3,6 aminoácidos por vuelta. **c** Hélice de poliprolina de sentido antihorario; los residuos de prolina están marcados en amarillo. **d** Hélice PPII compuesta por el menor número de aminoácidos posible (son suficientes tres residuos). En este ejemplo, ninguno de los residuos es una prolina (imagen adaptada de Narwani *et al.* 2017). **e** Modelización computacional de los 8 péptidos que presentan motivo PPII; se representan los péptidos que presentan mayormente la conformación PPII en orden creciente de izquierda a derecha. Para las simulaciones se ha utilizado el programa Amber 14.

Los resultados obtenidos de la evolución temporal de Abp1 demostraron que el péptido tiende a presentar dos conformaciones preferentes: alfa hélice y la hélice de poliprolina II (PPII) (Figura R-4, panel a, b, c y d). Esta última es una estructura helicoidal extendida hacia la izquierda con tres residuos por vuelta cuya forma general se asemeja a un prisma triangular (Hicks and Hsu 2004). Aunque no se

Resultados

relaciona únicamente con este residuo, es un motivo característico de secuencias ricas en prolina y en muchos casos se piensa que funciona como sitio de acoplamiento para módulos de señalización (Zarrinpar *et al.* 2003). Se sugiere que este motivo molecular pueda tener un importante papel funcional, particularmente en las interacciones y el reconocimiento proteína-proteína o proteína-ácido nucleico (Narwani *et al.* 2017).

Aunque otros de los hexapéptidos estudiados presenten este motivo, Abp1 es el que muestra un mayor porcentaje de forma PPII, dentro de las conformaciones estructurales identificadas para cada uno de ellos (Figura R-4, panel e).

El estudio se ha extendido a algunos de los nuevos derivados de Abp1 propuestos. Los resultados muestran que el intercambio del aminoácido terminal no afecta significativamente a la dinámica de la estructura del péptido (Figura R-5), por lo tanto, no se espera que la sustitución del último aminoácido altere de forma relevante la geometría del hexapéptido y en consecuencia que pueda comprometer su actividad.

Recapitulando, además de avalar el diseño y la síntesis de los péptidos Abp1-e6r y Abp1-e6k, los datos del estudio *in silico* llevaron a formular la hipótesis que el motivo poliprolina fuera importante para conservar la actividad biológica de Abp1. Como se mencionó previamente para que un péptido presente una conformación de PPII no es necesaria la presencia de prolina. Por lo tanto, nos pareció de gran interés comprobar si la actividad de Abp1 está vinculada a su secuencia aminoacídica o a la estructura secundaria que el péptido puede adquirir.

La sustitución sistemática de alanina (en inglés *Alanine-Scanning*), es un método particularmente útil para la identificación de los aminoácidos funcionales en proteínas o péptidos de interés. La sustitución con alanina elimina todos los átomos de la cadena lateral más allá del carbono β , permitiendo por lo tanto inferir el papel de los grupos funcionales de la cadena lateral del aminoácido remplazado (Morrison and Weiss 2001).

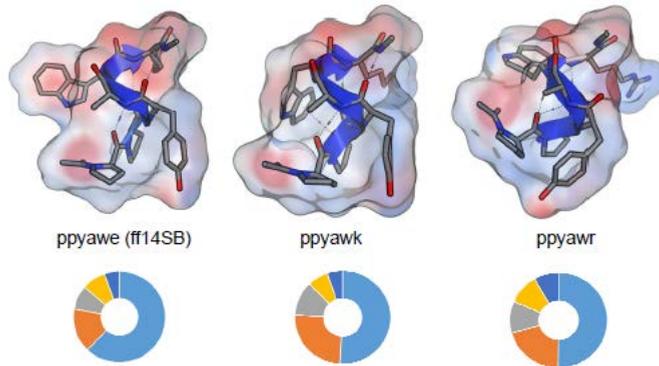


Figura R-5. Estudio de la estructura preferente de los nuevos derivados.

Modelización computacional del péptido Abp1 y se los derivados Abp1-e6k (ppyawk) y Abp1-e6r (ppyawr). En los diagramas circulares se representa el porcentaje de las conformaciones preferentes de los péptidos: en azul claro se representa el % de PPII; en naranja el % de α hélice. Al igual que Abp1 los hexapéptidos derivados conservan la estructura secundaria de PPII como conformación preferente;

En otros estudios, además, se ha confirmado el hecho que el aminoácido alanina es uno de los que puede fácilmente asumir conformación de PPII, con lo cual su presencia en lugar de la segunda prolina modificaría la secuencia, pero no la estructura secundaria (Adzhubei *et al.* 2013; Narwani *et al.* 2017). Para ello se sintetizó un péptido con secuencia igual a la de Abp1, pero en el que el segundo residuo de prolina se sustituyó con una alanina: payawe (Abp1-p2a).

2.3.2. Espectroscopía de Infrarrojos (FTIR) del péptido Abp1, RNA y su interacción

En paralelo al análisis computacional abordamos el estudio con otro enfoque y comenzamos el estudio de la interacción entre Abp1 y el RNA tóxico con el apoyo técnico del grupo de expertos en péptidos del laboratorio de Josep Bartomeu Cladera Cerdá (Centre d'Estudis en Biofísica, Unitat de Biofísica, Universitat Autònoma de Barcelona). Para ello, se han adquirido espectros de infrarrojo utilizando un espectrómetro con transformada de Fourier (FTIR). Los resultados obtenidos se han analizado con la intención de descubrir cuáles son los

Resultados

aminoácidos que están involucrados en la interacción con el RNA, para así asegurarnos de no alterarlos a la hora de elegir otras posibles modificaciones.

Los espectros del péptido Abp1, tratados con la técnica matemática de deconvolución de bandas, muestran una amida I con tres componentes principales: una banda centrada en 1674 cm^{-1} , debida a restos de TFA provenientes de la síntesis peptídica y no atribuible, por tanto, a estructura secundaria del péptido; una banda centrada en 1654 cm^{-1} , asignable a estructuras α -helicoidales; y una banda centrada en 1637 cm^{-1} , características de estructuras hoja β . En general, el espectro del péptido en la zona de la amida I es compatible con un péptido con una estructura secundaria predominantemente en forma de hélice α , con algún componente de lámina β (Figura R-6, panel a).

Los espectros de RNA se obtuvieron usando una sonda de 60 repeticiones CUG y muestran en general las bandas características de este ácido nucleico, probando así la pureza de la muestra. Los resultados han permitido la identificación y asignación de los siguientes componentes en la región entre 800 y 1800 cm^{-1} : 1692 (Guanina), 1651 (Uracilo), 1600 (Adenina), 1489 (Citosina), 1246 y 1080 (fosfatos). Además, se ha identificado una banda centrada en 966 cm^{-1} debida al RNA a una frecuencia a la que no absorbe el péptido. Esta banda es importante para poder realizar las operaciones de normalización de intensidad que son necesarias para el análisis de las mezclas Péptido/RNA (Figura R-6, panel b.). Los resultados explicados más arriba pueden ser útiles para analizar la influencia de la interacción Péptido-RNA en los elementos estructurales identificados.

Para ello se ha procedido del siguiente modo: por una parte, a partir de espectros puros de péptido a diferentes concentraciones y de un espectro puro de RNA se han generado los espectros compuestos a las relaciones péptido/RNA descritas más arriba, es decir, la suma matemática que dará el espectro que tendría una mezcla real de péptido-RNA si las dos moléculas no interaccionan entre ellas (Figura R-6, panel c, línea azul). Por otra parte, se han adquirido los espectros de mezclas reales

de péptido-RNA a las mismas ratios. Para poder proceder a la comparación de los espectros compuestos y los de las mezclas reales se trabaja con las segundas derivadas de los espectros de infrarrojo en la región 800-1800 cm^{-1} (Figura R-6, panel c línea roja).

El análisis comparativo de los espectros compuestos teóricos y de los de las mezclas reales sugirió la participación de un residuo de tirosina en la interacción péptido/RNA. Por lo tanto, tras la formulación de esta segunda hipótesis decidimos comprobarla con un procedimiento análogo al anteriormente detallado. Es decir, planteamos la síntesis de otro péptido derivado en el que el residuo de tirosina fuera remplazado por uno de alanina y utilizar el nuevo péptido como control de

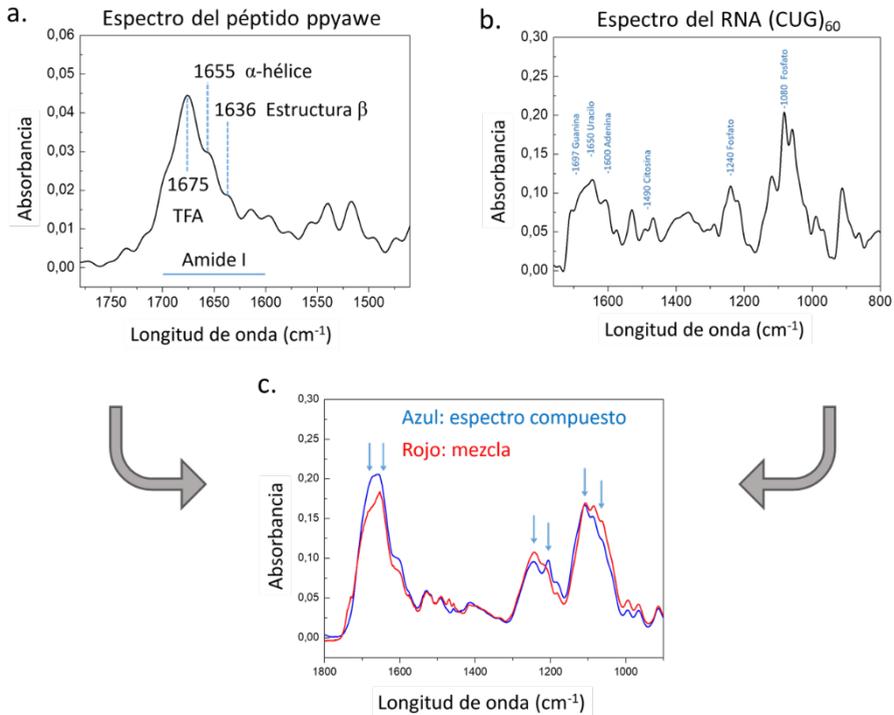


Figura R-6. Interacción entre el péptido Abp1 y las repeticiones (CUG)₆₀.

Espectro de infrarrojo del péptido ppyawe en la zona de la amida I. **b.** Espectro de infrarrojo del RNA de 60 repeticiones CUG. **c.** Espectro compuesto (el espectro suma que resultaría de una mezcla sin interacciones) y espectro mezcla (espectro de una mezcla real de RNA y péptido). Las flechas señalan zonas con pares de bandas para las cuales se detectan cambios en la ratio de intensidades que serían debidos a la interacción.

Resultados

unión en los experimentos siguientes; el péptido con secuencia ppaawe se indicará con el nombre de Abp1-y3a.

Finalmente, para poder confirmar que la actividad biológica de Abp1 y sus derivados fuese directamente relacionada con el orden de los aminoácidos que los componen, necesitábamos disponer de otro péptido que se pudieran usar como control negativo en los ensayos de evaluación de la actividad anti-DM1. Así mismo se procedió a la síntesis del péptido *Scramble* (Sc), con secuencia pypaew, compuesto por los mismos aminoácidos que Abp1 dispuestos en secuencia aleatoria.

Recapitulando, los estudios realizados y las hipótesis formuladas en esta primera fase del proyecto llevaron a la síntesis de 9 nuevos péptidos (Tabla R-1): 6 nuevos derivados de Abp1, con la misma secuencia, pero con modificaciones y/o sustituciones propuestas para mejorar sus propiedades biológicas (Abp1-Peptide, TAT-Abp1, Abp1-e6r, TAT-Abp1-e6r, Abp1-e6k, TAT-Abp1-e6k); 2 hexapéptidos sintetizados para comprobar las hipótesis formuladas en los estudios computacional y físico-químico (Abp1-p2a y Abp1-y3a) y un control negativo a utilizar en todos los ensayos de caracterización (Sc, del inglés *Scramble*).

Tabla R-1: Derivados de Abp1

		Modificación - Nombre - Sustitución	Secuencia
	0 -	Abp1	Ac- ppyawe -NH ₂
Derivados	1 -	Abp1 - Peptide	Ac- NproNproNtyrNalaNtrpNglu -NH ₂
	2 -	TAT - Abp1	Ac- GRKKRRQRRR-ppyawe -NH ₂
	3 -	Abp1 - e6r	Ac- ppyawr -NH ₂
	4 -	TAT - Abp1 - e6r	Ac- GRKKRRQRRR-ppyawr -NH ₂
	5 -	Abp1 - e6k	Ac- ppyawk -NH ₂
	6 -	TAT - Abp1 - e6k	Ac- GRKKRRQRRR-ppyawk -NH ₂
Controles	7 -	Abp1 - p2a control de estructura	Ac- payawe -NH ₂
	8 -	Abp1 - y3a control de unión	Ac- ppaawe -NH ₂
	9 -	Sc control negativo	Ac- pypaew -NH ₂

Letra mayúscula indica L-aminoácidos
Letra minúscula indica D-aminoácidos

3. Evaluación de la actividad de los derivados en *Drosophila*

La síntesis de los derivados de Abp1 con las modificaciones elegidas y de los controles se ha llevado a cabo en el laboratorio de Isabel Haro (Consejo Superior de Investigaciones Científicas – CSIC). Una vez obtenidos los péptidos, procedimos a la evaluación de la mejora de su actividad biológica, análogamente a como se hizo con Abp1, testando los derivados en el modelo muscular en *Drosophila*.

Siendo el tejido muscular uno de los más afectados en pacientes de DM1, elegimos un modelo desarrollado en nuestro laboratorio en el que la expresión de (CUG)₄₈₀ está controlada por el promotor de la cadena pesada de la miosina (Mhc). Las moscas recombinantes de esta línea (a las que nos referiremos como moscas DM1) presentan muchos defectos moleculares, histológicos y funcionales característicos de la enfermedad (Garcia-Lopez *et al.* 2008), cuyo rescate se puede utilizar para evaluar la actividad de los compuestos a probar. Entre ellos uno de los fenotipos más evidentes es el estado atrófico de los músculos indirectos del vuelo (IFMs, del inglés *Indirect Flight Muscles*) (Figura R-7). Los IFMs son lo más parecido que hay en

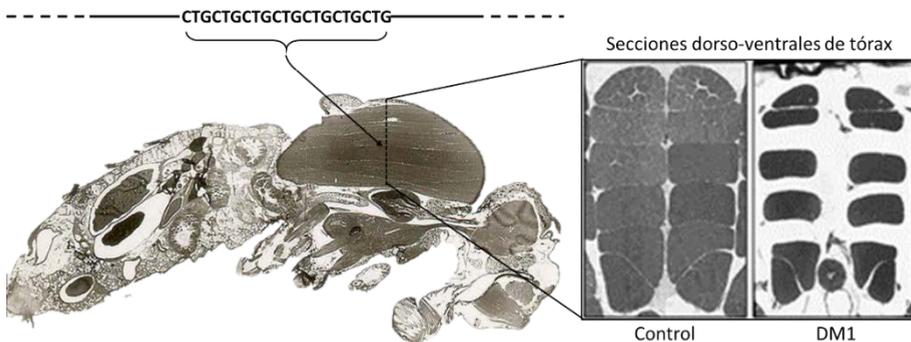


Figura R-7. Modelo muscular de DM1 en *Drosophila*.

Imagen representativa de una sección longitudinal de *Drosophila* en la que se pueden observar los músculos indirectos del vuelo ubicados en el tórax. En el modelo muscular de DM1 en *Drosophila* usado en este trabajo, la expresión de las repeticiones (CUG)₄₈₀ se encuentra bajo el control del promotor de la cadena pesada de la miosina (*Myosin Heavy Chain*, Mhc) y es dirigida específicamente a la musculatura somática que incluye los músculos indirectos del vuelo (IFMs). Esto provoca un fenotipo atrófico, que conlleva a la reducción de los paquetes musculares de las moscas DM1 (imagen a la derecha) con respecto a moscas control (imagen a la izquierda).

Resultados

Drosophila a la musculatura esquelética humana (Taylor 2006), por lo tanto, representan una herramienta perfecta para la evaluación de defectos característicos de la enfermedad. El estado atrófico observado a nivel histológico se refleja a nivel funcional en una capacidad motora reducida y a la pérdida de la capacidad de volar. Además, en estas moscas se reproducen otros importantes aspectos de DM1, especialmente la acumulación nuclear de transcritos de expansiones, la regulación errónea del *splicing* y la disminución de la función de Muscleblind en los músculos *in vivo*, debida a su retención en el núcleo por parte de las repeticiones tóxicas (Garcia-Lopez *et al.* 2008).

Se pusieron cruces a 25°C y al momento de la eclosión se recogieron suficientes individuos para llevar a cabo todos los experimentos planteados. Todas las moscas se trataron durante 7 días con 10 μ M de cada compuesto disuelto en la comida. Como controles se utilizaron moscas sanas (control) y moscas DM1 alimentadas con comida normal y con comida suplementada con 0.1% de DMSO, respectivamente, siendo este el disolvente de los compuestos.

3.1. Rescate del fenotipo de atrofia

El ensayo de evaluación del nivel de atrofia se llevó a cabo mediante el análisis de secciones transversales del tórax de moscas hembras de 7-8 días de edad, tratadas y control. Se embebieron en resina 10 tórax por genotipo, se obtuvieron secciones semifinas y en 5 de ellas analizamos el tamaño de los paquetes musculares correspondientes a los músculos indirectos del vuelo. Tras la adquisición de imágenes con el microscopio y su procesamiento, se pudo observar que varios tratamientos podían mejorar las condiciones de atrofia de los IFM, cuantificado como un aumento del área de cada paquete muscular (Figura R-8, panel a). En concreto, una vez analizadas las imágenes pudimos establecer que el tratamiento con los derivados TAT-Abp1-e6r, Abp1-e6k, TAT-Abp1-e6k y Abp1-peptide produjo una mejora significativa de la atrofia a nivel histológico. Además, también

se observó un aumento significativo del tamaño muscular en moscas tratadas con el péptido Abp1-p2a (Figura R-8, panel b).

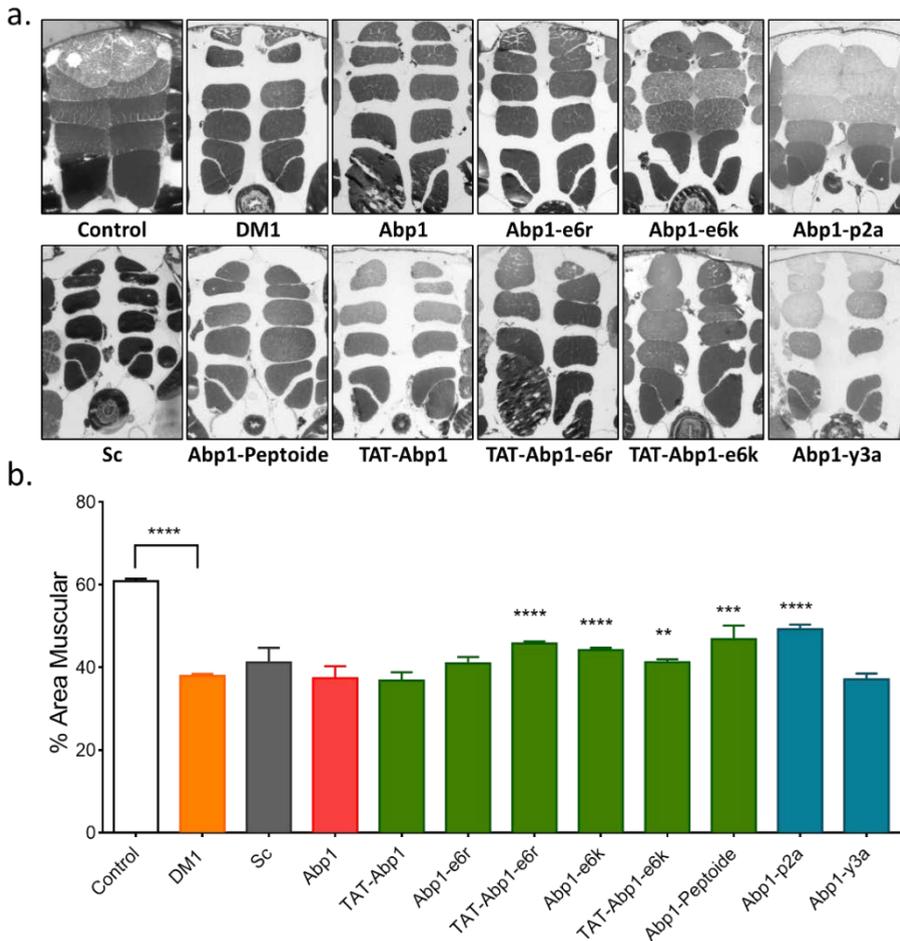


Figura R-8. Evaluación de los niveles de atrofia en *Drosophila*.

Secciones transversales (1.5 μ m) de los IFMs de moscas *Mhc-Gal4* (Sanas) y de moscas *Mhc-Gal4 UAS-CTG_{48Q}/TM6b* (DM1) tratadas con 0,1% DMSO y de moscas DM1 alimentadas durante 7 días con 10 μ M de cada compuesto (a). Cuantificación del porcentaje de área ocupado por los paquetes de los IFMs obtenida a través del análisis de las imágenes adquiridas. Los datos obtenidos en las moscas alimentadas con los péptidos se han comparado con los valores observados en moscas las DM1 (b).

Recordamos que este último se había diseñado como control de estructura, con la intención de establecer si la presencia de los dos residuos de prolina es necesaria

Resultados

para conservar el motivo estructural de PPII y en consecuencia la actividad biológica del péptido. El rescate del fenotipo atrofico tras el tratamiento con el péptido Abp1-p2a sugiere que la segunda prolina no es indispensable para mantener el motivo estructural de PPII y la actividad biológica.

3.2. Rescate funcional

Las moscas DM1 presentan problemas locomotores y de vuelo como consecuencia de las alteraciones moleculares e histológicas provocadas por la expresión del RNA tóxico en la musculatura. Para poder estudiar de forma objetiva estos cambios, se ha puesto a punto un ensayo de escalada y uno de vuelo, que se llevaron a cabo para establecer si el rescate a nivel histológico de la atrofia alcanzado con alguno de los péptidos se refleja en una mejora funcional.

3.2.1. Rescate funcional de escalada y de vuelo

Cuando se colocan en un espacio cerrado, las moscas siempre tienden a ir hacia arriba debido a geotropismo negativo (Carpenter 1905; Hirsch 1959). Dicho fenotipo característico es muy útil a la hora de evaluar las capacidades motoras de las moscas, puesto que permite calcular su velocidad de escalada (Gargano *et al.* 2005).

El análisis de los videos grabados durante el ensayo, evidenció ligeros cambios en la movilidad de moscas tratadas con alguno de los péptidos con respecto a las no tratadas. En concreto, las moscas tratadas con los péptidos TAT-Abp1, Abp1-e6k, TAT-Abp1-e6k y con el Abp1 en su forma de peptoides mostraron una ligera tendencia a aumentar la velocidad con respecto a las tratadas con Abp1 lo cual, sin embargo, no resultó ser significativo tras el análisis estadístico de los datos obtenidos (Figura R-9, panel a). Asimismo, para la ejecución y cuantificación del ensayo de vuelo se utilizaron machos de la misma edad y tratamiento. Tras la ejecución del ensayo se consideró tanto el número de moscas caídas al fondo como la altura de aterrizaje de las que se quedaron en las paredes. Del análisis de los

datos obtenidos resultó evidente que ninguno de los tratamientos era suficiente para restaurar la capacidad de vuelo (Figura R-9, panel b).

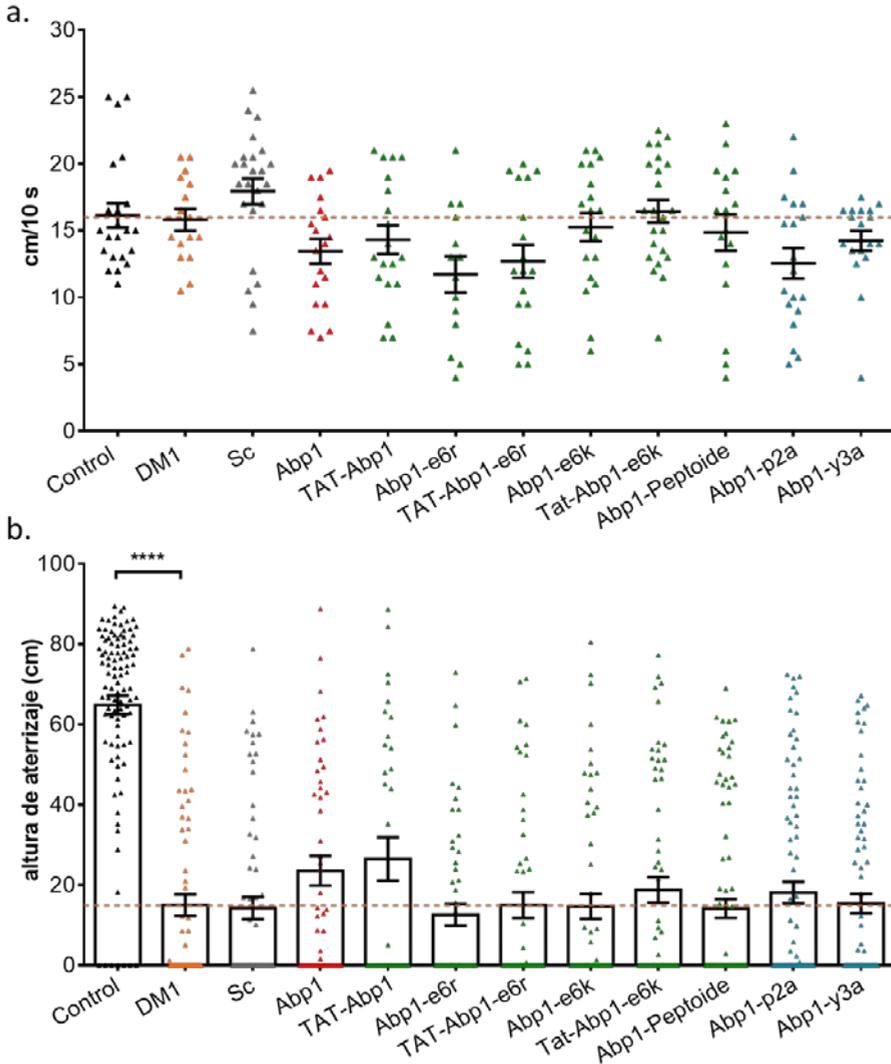


Figura R-9. Evaluación del rescate funcional.

Los ensayos funcionales se realizaron en moscas de siete días alimentadas con 10 μ M de cada compuesto o con la cantidad correspondiente de disolvente. **a.** Para el ensayo de escalada se utilizaron 30 machos por cada tratamiento y en la gráfica se representa la velocidad como distancia recorrida en 10 segundos. **b.** Para el ensayo de evaluación del vuelo se utilizaron 100 machos por cada tratamiento y los datos obtenidos tras el análisis de las imágenes adquiridas están representados en la gráfica; una altura de aterrizaje elevada refleja una buena capacidad de vuelo (moscas control); una altura de aterrizaje reducida o la caída al suelo representan capacidad de vuelo reducida o ausente. Los datos relativos a las moscas tratadas se han comparado con los de las moscas DM1.

Resultados

Cabe destacar que en el estudio previo de Abp1 en *Drosophila*, se utilizó un tipo de tratamiento diferente ya que este se empezaba en estadio larval de la mosca. Esta modalidad de tratamiento, de hecho, hace que la acción beneficiosa del péptido sea concomitante con el desarrollo del tejido muscular. En el caso del tratamiento de la mosca adulta, en cambio, se espera que los beneficios sean tales que mejoren el estado de un músculo ya formado y con un defecto histológico y funcional evidente. En esta ocasión quisimos que las condiciones de tratamiento fuesen más restrictivas ya que nuestro objetivo era seleccionar moléculas que tuvieran una actividad notablemente mejorada.

4. Evaluación de la actividad en un modelo celular humano

4.1. Liberación de MBNL1

En la transición de un estudio *in vivo* (modelo en *Drosophila*) al estudio en un modelo celular humano, nos encontramos con la necesidad de establecer cuál era la concentración óptima de compuesto para llevar a cabo los experimentos planteados. Para ello decidimos proceder con un ensayo de respuesta a dosis en el que probamos todas las nuevas versiones de Abp1 a cuatro concentraciones (0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M). Debido al elevado número de trabajos que evidencian la importancia de su papel en la enfermedad, elegimos la retención de la proteína MBNL1 en el núcleo como parámetro característico de la distrofia miotónica a mejorar (Lee and Cooper 2009; Lee *et al.* 2013; Sznajder *et al.* 2016).

En primer lugar, se diferenciaron los fibroblastos a mioblastos durante 4 días, ya que en este tipo celular los niveles de expresión de la proteína son mayores con respecto a los de los fibroblastos. A mitad del proceso de diferenciación (día 2) se sustituyó el medio por medio de diferenciación fresco suplementando con los diferentes compuestos o el porcentaje de DMSO correspondiente. A continuación, se procedió con una tinción inmunofluorescente de MBNL1 y se utilizó el

microscopio automático InCell Analyzer para la adquisición de imágenes y un programa de análisis asociado para la cuantificación objetiva del aumento de señal nuclear de la proteína.

El ensayo se repitió a 24, 48 y 72 h de incubación con los compuestos. Los datos obtenidos tras 24 h de incubación no evidenciaron ningún cambio significativo; por otro lado, tras 72 horas resultó evidente un efecto tóxico seguramente debido al DMSO presente en el medio (datos no mostrados).

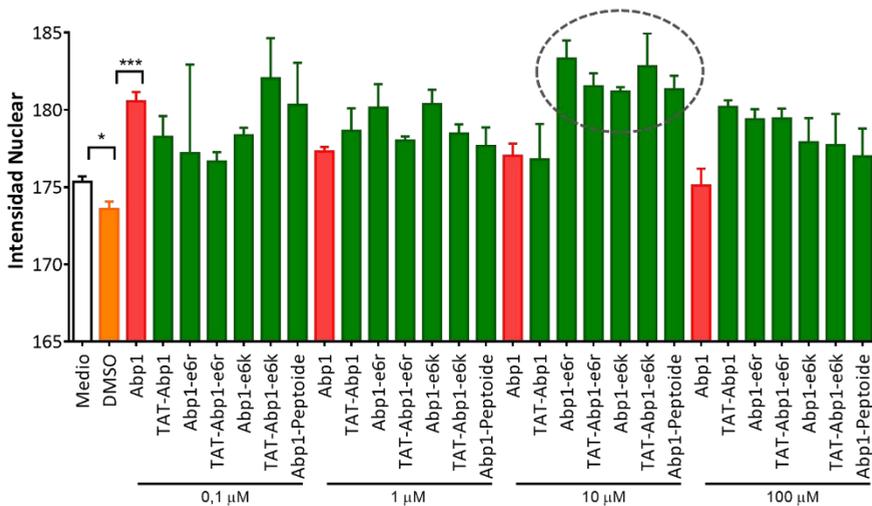


Figura R-10. Evaluación de los niveles nucleares de MBNL1 en células DM1.

Representación gráfica de los datos obtenidos del análisis computarizado de imágenes inmunofluorescentes. Mioblastos DM1 tratados con los diversos compuestos, con DMSO y no tratados (medio) se incubaron con un anticuerpo anti-MBNL1, se hizo una tinción inmunocitoquímica y las imágenes se adquirieron con el microscopio InCell-Analyzer. Los niveles de la señal fluorescente relativa a MBNL1 presentes en el núcleo se analizaron con un programa específicamente configurado. Los datos relativos a las diferentes concentraciones de Abp1 han sido comparados con los de las células tratadas únicamente con DMSO. Los datos relativos a los valores observados en células tratadas con los péptidos derivados, han sido comparados con los de células tratadas con Abp1 a la misma concentración.

Por estas razones se eligió 48 h como tiempo de incubación eficaz. Además, la elevada resolución del microscopio InCell Analyzer evidenció, en este conjunto de datos, ligeros pero significativos aumentos de intensidad de la fluorescencia relativa a MBNL1 en el núcleo. En particular, llamó la atención el hecho que a la

Resultados

concentración de 10 μ M el tratamiento con todos los derivados, excluido TAT-Abp1, producen un aumento significativo de MBNL1 en el núcleo si es comparado con el tratamiento con Abp1 (Figura R-10). Por lo tanto, decidimos comprobar si este aumento era suficiente para producir otros cambios aguas abajo en el mecanismo de patogénesis de la distrofia miotónica.

4.2. Rescate de eventos de *splicing* típicamente alterados en DM1

Una de las principales funciones de las proteínas pertenecientes a la familia MBNL es la de regular el patrón de *splicing* de numerosos mRNAs. En concreto, MBNL1 es responsable de la transición de un patrón de *splicing* del mRNA que genera las isoformas fetales o adultas de una elevada cantidad de transcritos. En DM1 la falta de su función hace que se sigan produciendo las isoformas fetales de dichas proteínas en la etapa adulta, lo cual está directamente relacionado con algunos de los síntomas de la enfermedad.

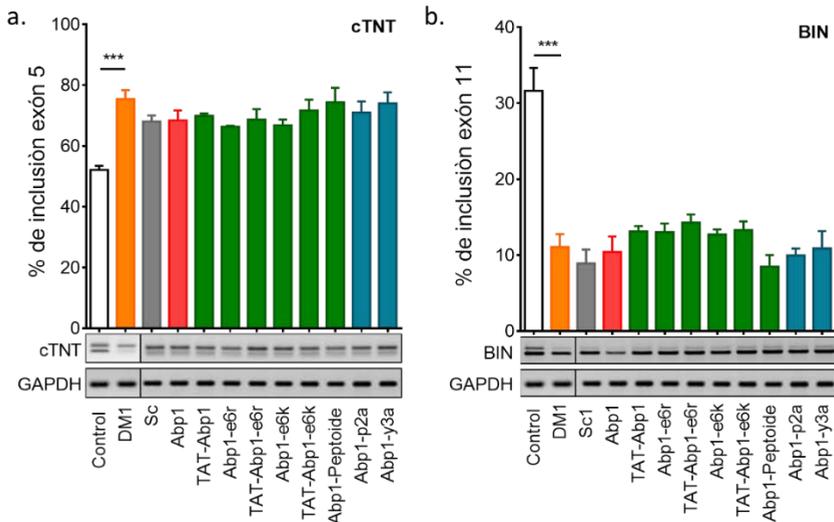


Figura R-11. Evaluación de *splicing* tras el tratamiento con los derivados de Abp1. La evaluación de la actividad en células DM1, estudiando el cDNA de mioblastos DM1 tratados y control. Se eligieron dos eventos de *splicing* típicamente alterados en DM1 y ambos dependientes de MBNL1. Tanto en el caso de la exclusión del exón 5 del gen cTNT (a) como en el caso de la inclusión del exón 11 del gen BIN (b) ninguno de los péptidos provocó un rescate tras 48 h de incubación.

Con la intención de comprobar si el aumento de MBNL1 observado fuese suficiente para rescatar los sucesos de *splicing* alterados, elegimos dos eventos a probar: la inclusión del exón 5 del gen cTNT (Philips *et al.* 1998) y la exclusión del exón 11 del gen BIN (Fugier *et al.* 2011). Se trataron las células con las condiciones preestablecidas (incubación con 10 μ M de cada compuesto durante 48 h, tras 4 días de diferenciación), se recogió y retrotranscribió el RNA y se analizaron los productos de PCR calculando el porcentaje de inclusión del exón de interés. Aunque se llegaron a observar pequeños cambios, ninguno de ellos resultó ser significativo tras el análisis estadístico de los datos. Probablemente los pequeños aumentos de los niveles de MBNL1 en el núcleo, observados en el ensayo anterior, no son suficientes para causar una mejora de los defectos en el control de *splicing* alternativo (Figura R-11).

Resultados

II. Estudio de la actividad de hexapéptidos con secuencias relacionada con Abp1

Como ya se ha mencionado en la introducción, la deconvolución final del rastreo en *Drosophila* de la quimioteca de hexapéptidos, llevó a la selección y síntesis de 16 péptidos de secuencia relacionada. Entre ellos, Abp1 fue el que destacó por ser el más prometedor por rescatar varios fenotipos de DM1 tanto en mosca como en ratón y por eso fue elegido para profundizar el estudio de su potencial como terapia anti-DM1. Sin embargo, Abp1 no fue el único en producir un rescate del fenotipo estudiado, siendo el rescate producido por los otros péptidos menor pero todavía significativo. Esto, junto con el parecido de las secuencias nos hizo suponer que podía existir alguna conexión con la actividad biológica de los compuestos y que profundizar el estudio de los otros 15 péptidos podría proporcionar datos relevantes (Tabla R-2, adaptada de Garcia-Lopez *et al.* 2008, material suplementario).

Tabla R-2: Lista de hexapéptidos obtenidos por deconvolución de la quimioteca

	Secuencia	Concentración testada	Tratadas nacidas/control nacidas
79	Ac-cpyaqe-NH ₂	80 µM	0.3
80	Ac-cpyawe-NH ₂	80 µM	-
81	Ac-cpytqe-NH ₂	80 µM	0.8
82	Ac-cpytwe-NH ₂	62 µM	-
83	Ac-cqyaqe-NH ₂	25 µM	2
84	Ac-cqyawe-NH ₂	25 µM	-
85	Ac-cqytqe-NH ₂	80 µM	1.4
86	Ac-cqytwe-NH ₂	57 µM	0.9
87	Ac-ppyaqe-NH ₂	80 µM	2
(Abp1) 88	Ac-ppyawe-NH ₂	80 µM	4
89	Ac-ppytqe-NH ₂	80 µM	0.8
90	Ac-ppytwe-NH ₂	80 µM	3
91	Ac-pqyaqe-NH ₂	80 µM	0.8
92	Ac-pqyawe-NH ₂	40 µM	1.8
93	Ac-pqytqe-NH ₂	40 µM	0.5
94	Ac-pqytwe-NH ₂	38.5 µM	0.4

"-" indica que el número de hembras emergidas fue de 0 en tubos tratados y controles

1. Evaluación de la actividad en un modelo celular

Estudiando el conjunto de datos obtenidos hasta el momento y evaluando las mejoras de la actividad anti-DM1 alcanzadas por los péptidos modificados, era evidente que la falta de actividad en el modelo mamífero seguía constituyendo el mayor impedimento para sobrepasar las limitaciones de la actividad de Abp1. Por lo tanto, para la evaluación de la actividad de los 15 péptidos con secuencia parecida a Abp1 decidimos empezar directamente con los ensayos en modelo celular humano (Arandel *et al.* 2017).

1.1. Rescate de eventos de *splicing* alterados en DM1

Tras haber tratado las células siguiendo el mismo protocolo usado para el estudio de los péptidos derivados, procedimos a la extracción del RNA y su retrotranscripción. El cDNA así obtenido se utilizó para la evaluación de dos sucesos de *splicing* regulados por la proteína MBNL1: cTNT como suceso de exclusión y BIN como suceso de inclusión (Figura R-12, panel a). Los resultados obtenidos tras el análisis de los productos de PCR demostraron que los péptidos 79, 80, 81, 82, 91 y 92 eran capaces de rescatar de forma significativa el *splicing* del gen cTNT, pero no el de BIN (Figura R-12, paneles b y c). A su vez, los péptidos 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 93 y 94 produjeron un rescate del procesado del gen BIN alrededor del 100%, empeorando por otro lado el procesado del gen cTNT (Figura R-12 paneles b. y c.). Estos datos fueron inesperados, no solo porque por primera vez observábamos una mejora de un fenotipo característico de DM1 en el modelo celular humano tras el tratamiento con los péptidos en estudio, sino también porque la actividad anti-DM1 parecía estar firmemente vinculada con la secuencia de los péptidos ya que grupos de péptidos de secuencia parecida eran capaces de provocar el rescate de un evento de *splicing*, pero no de otro y viceversa. Con la intención de aclarar este asunto decidimos obtener más datos ampliando el número de eventos de *splicing* observados. Extendimos el estudio con el análisis de otro suceso de *splicing*

Resultados

regulado por MBNL1, en concreto del exón 79 del gen DMD (Figura R-12, panel d), y otros dos, ADD y SPTAN1, regulados por la proteína MBNL2 (Figura R-12, panel e y f) (Charizanis *et al.* 2012). Análogamente a los resultados obtenidos previamente, se observaron rescates significativos en los tres sucesos, producidos por péptidos diferente y que confirmaban, además, la posible división en subgrupos de los péptidos vinculados la actividad biológica de cada uno de ellos con su secuencia.

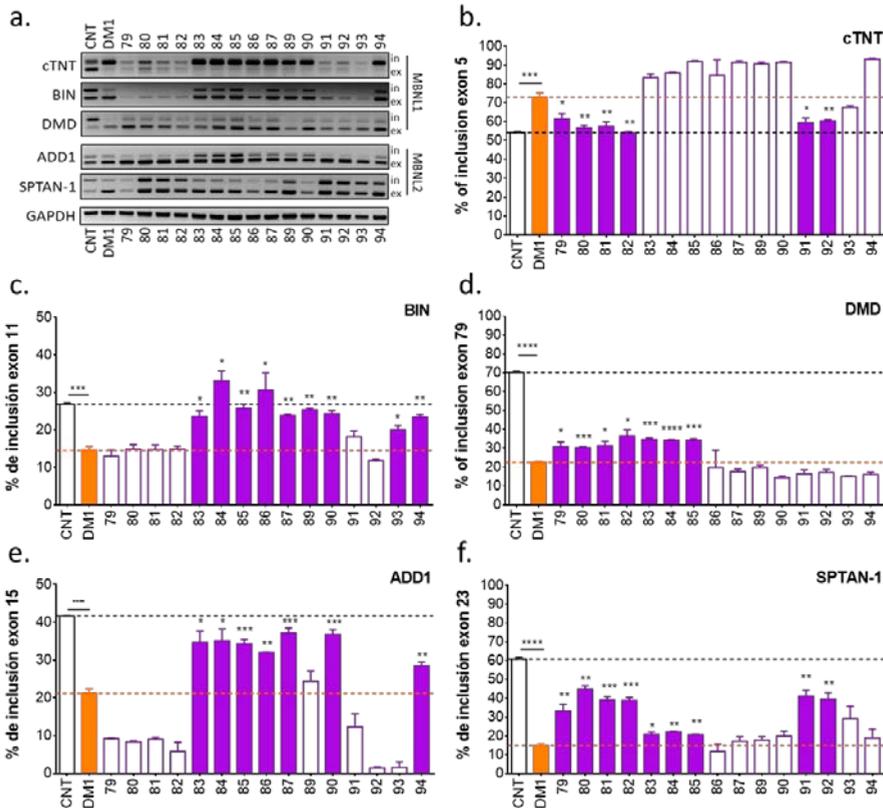


Figura R-12. Evaluación de *splicing* tras el tratamiento con los péptidos relacionados a Abp1.

Estudio de los efectos de los diferentes tratamientos sobre 5 eventos de *splicing* típicamente alterados en DM1 y de los que se muestran imágenes representativas (a). En las gráficas se representan los porcentajes de inclusión del exón 5 del gen cTNT (b), del exón 11 de BIN (c) y del exón 79 del gen DMD (d) controlados por MBNL1. Además, se analizó la inclusión del exón 15 del gen ADD1 (e) y el exón 23 del gen SPTAN-1 (f), ambos regulados por la proteína MBNL2. Para el análisis de los datos el valor de inclusión obtenido por cada péptido se ha comparado con el valor relativo a DM1.

1.2. Evaluación de los niveles de expresión de MBNL1 y MBNL2

El aumento de las concentraciones de MBNL1 y MBNL2 durante la diferenciación terminal del músculo humano induce un cambio en el patrón de *splicing* de varios genes promoviendo el paso de isoformas fetales a adultas en los mRNAs (Fernandez-Costa *et al.* 2011; Han *et al.* 2013; Konieczny *et al.* 2014). En DM1 la retención de las proteínas MBNLs a nivel nuclear por parte de los RNAs portadores de las expansiones CUG altera esta transición provocando la espliceopatía. Por lo tanto, siendo la proteína MBNL1 y su parálogo MBNL2 los responsables directos de la regulación de los eventos de *splicing* analizados, decidimos averiguar si los cambios observados ocurren como consecuencia de las variaciones en la expresión de los dos genes de interés.

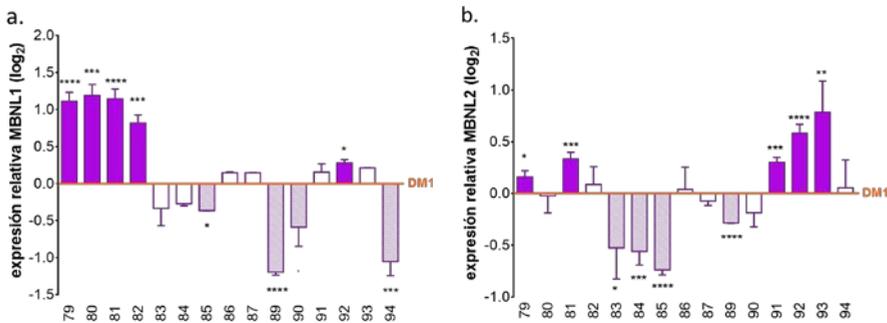


Figura R-13. Variación de los niveles de expresión de MBNL1 y 2 en respuesta al tratamiento.

Resultados obtenidos por RT-qPCR, que demuestran variaciones en los niveles de expresión relativa de ambos genes estudiados, en respuesta al tratamiento con péptidos si comparados con los niveles de expresión observados en células DM1 incubadas con DMSO. Los péptidos 79, 81, 81, 82 y 92 suben los niveles de expresión de MBNL1 (a); Los péptidos 79, 81, 91, 92 y 93 suben la expresión relativa de MBNL2 (b). Se evidencian con morado claro las barras relativas a los péptidos que reducen significativamente los niveles relativos de los transcritos.

Tras la cuantificación de los niveles de mRNA por PCR cuantitativa, pudimos observar que al tratamiento con los péptidos 79, 80, 81 y 82 corresponde un aumento en los niveles de expresión de MBNL1 en casi dos veces y que el péptido

Resultados

92 produce un aumento pequeño pero estadísticamente significativo (Figura R-13, panel a).

En el caso del gen MBNL2, por otro lado, fueron los péptidos 92 y 93 los que provocaron el mayor aumento, seguidos por los péptidos 79, 81 y 91 que también producen un aumento significativo, aunque más limitado (Figura R-13, panel b).

En cuanto a los otros péptidos, cabe destacar que el péptido 94 produjo una disminución significativa de la expresión relativa de MBNL1. Además, tras el tratamiento con los péptidos 83, 84, 85, 89 y 90 se pudo observar una tendencia a disminuir los niveles de expresión de ambos genes que en algún caso llegó a ser estadísticamente significativa (Figura R-13, paneles a y b).

2. Selección de cuatro péptidos y estudio de su actividad anti DM1

Tras esta primera tanda de experimentos nos encontramos con un conjunto de resultados muy prometedores, ya que por primera vez se observó una actividad anti-DM1 significativa en el modelo celular humano. Sin embargo, la interpretación de los datos no fue unívoca debido a la heterogeneidad de los efectos producidos por cada péptido. Lo que sí resultó evidente fue que la actividad de los péptidos está relacionada con su secuencia aminoacídica ya que hexapéptidos con solo uno o dos aminoácidos diferentes producen los mismos rescates. Para simplificar el análisis recopilamos todos los datos (Tabla R-3) e intentamos agrupar péptidos con actividad y secuencias similares.

Considerando todo el conjunto, los datos que nos parecieron más relevantes fueron los relativos a los primeros 7 péptidos, de 79 a 85 (resaltado en verde en la Tabla R-3).

Sin embargo, estos péptidos pueden ser repartidos en otros dos subgrupos según sus efectos. En el caso de los compuestos 79-82 (resaltado en verde oscuro en la Tabla R-3) el aspecto que inmediatamente resultó de mucho interés fue la

presencia de una sola prolina en la región inicial de los 4 péptidos. En este sentido hay que recordar que, en el marco del estudio computacional, la actividad de Abp1 había sido anteriormente relacionada con su estructura secundaria caracterizada por el motivo PPII (apartado 1.3.1), y que este está conservado en los péptidos 79-82 a pesar de la sustitución del primer residuo de prolina con uno de cisteína (Figura R-4, panel d). Además, el estudio de la actividad biológica del péptido control de estructura (Abp1-p2a) en el modelo atrófico en mosca, había dado prueba de que la falta de una de las dos prolinas mejora la capacidad de rescatar este fenotipo con respecto a Abp1 (Figura R-8). Finalmente, los péptidos 79, 80, 81 y 82 destacaron también en la evaluación de su actividad en el modelo celular humano de DM1 por producir el rescate de tres eventos de *splicing* y por su capacidad de duplicar la cantidad de mRNA de MBNL1 y 2.

Tabla R-3: Secuencia y actividad de los péptidos relacionados con Abp1

Nombre	Secuencia					MBNL1			MBNL2		qPCR		
						Exclusión	Inclusión		Inclusión		MBNL1	MBNL2	
							cTNT	BIN	DMD	ADD			SPTAN1
79	c	p	y	a	q	e	✓	-	✓	-	✓	↑	↑
80	c	p	y	a	w	e	✓	-	✓	-	✓	↑	-
81	c	p	y	t	q	e	✓	-	✓	-	✓	↑	↑
82	c	p	y	t	w	e	✓	-	✓	-	✓	↑	-
83	c	q	y	a	q	e	-	✓	✓	✓	✓	-	↓
84	c	q	y	a	w	e	-	✓	✓	✓	✓	-	↓
85	c	q	y	t	q	e	-	✓	✓	✓	✓	↓	↓
86	c	q	y	t	w	e	-	✓	-	✓	-	-	-
87	p	p	y	a	q	e	-	✓	-	✓	-	-	-
88 (Abp1)	p	p	y	a	w	e	-	-	-	-	-	-	-
89	p	p	y	t	q	e	-	✓	-	-	-	↓	↓
90	p	p	y	t	w	e	-	✓	-	✓	-	↓	-
91	p	q	y	a	q	e	✓	-	-	-	✓	-	↑
92	p	q	y	a	w	e	✓	-	-	-	✓	↑	↑
93	p	q	y	t	q	e	-	✓	-	-	-	-	↑
94	p	q	y	t	w	e	-	✓	-	✓	-	↓	-

✓: efecto positivo; -: ningún efecto positivo; ↑: sube la expresión; ↓: baja la expresión

Por otro lado, los péptidos 83, 84 y 85 (evidenciados con verde claro en la Tabla R-3) rescataron hasta cuatro de los cinco eventos de *splicing* analizados, provocando,

Resultados

sin embargo, una inesperada disminución de los niveles de expresión relativa de los transcritos de MBNL2 en el caso de los péptidos 83 y 84 y de MBNL1 y 2 en el caso del péptido 85.

En los últimos años han sido publicados muchos trabajos en los que se propone el aumento de la expresión de MBNL1 como posible terapia para la Distrofia Miotónica (Cerro-Herreros *et al.* 2016; Wagner *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2017; Cerro-Herreros *et al.* 2018). Entre los diferentes enfoques planteados hasta la fecha y la diversidad de estrategias propuestas en la literatura, el uso de un hexapéptido como modulador positivo de MBNL es algo definitivamente muy novedoso además que técnicamente viable.

Por todas estas razones decidimos focalizar nuestra atención sobre un estudio más detallado de los cambios producidos por el tratamiento de las células con los péptidos 79, 80, 81 y 82 y en la determinación de su mecanismo de acción (MOA) deduciendo en base a todo lo hasta aquí descrito, que este debía de ser diferente con respecto al mecanismo de acción de Abp1.

2.1. Especificidad de la actividad observada y toxicidad de los péptidos

Como primer paso decidimos comprobar que la actividad de los péptidos seleccionados fuese específica para DM1 y que no se tratase de una modulación general del *splicing*.

Para esto realizamos dos tipos de pruebas: por un lado, examinamos el gen CAPZB, cuyo procesado se encuentra típicamente alterado en DM1 siendo dependiente de la proteína reguladora CELF1, y el gen DLG1 que no sufre cambios en DM1 (Figura R-14, paneles a, b y c). Añadimos a la evaluación el péptido 89 como control negativo y el análisis de los datos obtenidos no evidenció ningún cambio. Por otro lado, quisimos asegurarnos que la actividad de los péptidos está restringida a células DM1. Para eso sembramos células control y las diferenciamos como anteriormente descrito y las incubamos durante dos días con el péptido 80 (elegido

como ejemplo de los 4 péptidos). Seguidamente extrajimos el RNA y utilizamos el cDNA así obtenido para la evaluación de los *splicing* de los genes cTNT y SPTAN-1 (Figura R-14, paneles d, e y f) y una vez más no se produjo ninguna variación.

Por lo tanto, pudimos establecer que la actividad de los péptidos 79, 80, 81 y 82 está fuertemente vinculada a la de las proteínas MBNL y a la presencia en la célula de las repeticiones CUGs ya que sus efectos se limitan a eventos de *splicing* regulados directamente por MBNL1 y 2 y que desaparecen si utilizados para tratar células control.

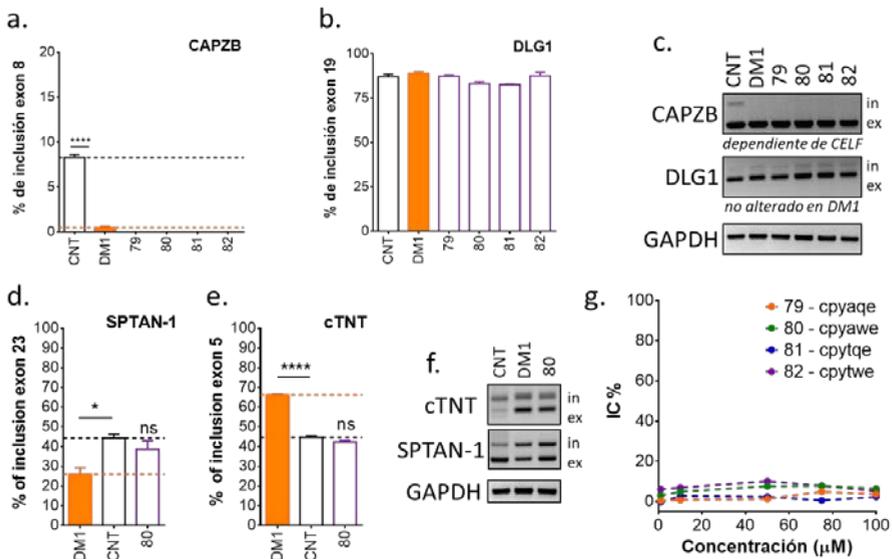


Figura R-14. Ensayos para caracterizar la especificidad de la actividad de los péptidos seleccionados.

La evaluación del evento de *splicing* del gen CAPZB, dependiente de la proteína CELF1 y el del gen DLG1, que no sufre modificaciones en DM1, se utiliza para confirmar correlación de la actividad anti-DM1 de los péptidos seleccionados con MBNL1 (a y b). Después del tratamiento con los cuatro péptidos, no se registra ninguna actividad en ambos eventos estudiados (c). El tratamiento con el péptido 80 de células sanas no produce algún cambio en los eventos de *splicing* de los genes cTNT y SPTAN-1 (d, e y f). Ensayo de toxicidad realizado tratando fibroblastos DM1 con concentraciones creciente de cada péptido (10 µM, 50 µM, 75 µM y 100 µM). No se detectó ningún efecto negativo incluso a una concentración 4 veces mayor que la dosis efectiva (g).

Resultados

Antes de seguir con la caracterización de la actividad de los péptidos seleccionados averiguamos su toxicidad en mioblastos DM1 utilizando concentraciones hasta 10 veces superiores a la utilizada en los ensayos, y no se observó ningún efecto tóxico (Figura R-14, panel g).

2.2. Liberación de MBNL1 en el citoplasma y niveles de proteína

A continuación, decidimos investigar otros aspectos característicos de la enfermedad que concurren para comprometer la correcta funcionalidad de MBNL. Puesto que la interacción de la proteína con las repeticiones tóxicas y su consecuente retención nuclear está entre los fenotipos más caracterizados y que más claramente obstaculiza su función, ejecutamos un ensayo de inmunofluorescencia para visualizar la proteína en mioblastos tratados con los péptidos seleccionados. Como era esperado, la señal relativa al anticuerpo anti-MBNL1 marcado con fluoresceína es elevada, difusa y prevalentemente citoplasmática en los mioblastos sanos, mientras que en mioblastos DM1 se observa una señal muy reducida y casi completamente nuclear, además de concentrada en puntos concretos debido a su secuestro en los foci ribonucleares (Figura R-15, paneles a).

En las imágenes adquiridas en los pocillos con mioblastos tratados se observó, en todos los casos, un evidente aumento tanto de la señal citoplasmática como de la nuclear y en el caso de los péptidos 80 y 81 la localización nuclear de la proteína de interés pareció ser más difusa en vez que acumulada en foci (Figura R-15, paneles 79, 80, 81 y 82). A continuación, quisimos averiguar si este aumento de señal era debido a una redistribución de la proteína o bien a un aumento de la cantidad total. Como fue demostrado anteriormente, los cuatro péptidos producen un aumento de la expresión relativa del mRNA de MBNL1 (Figura R-13), por lo que procedimos a confirmar si dicho aumento se observaba también a nivel de proteína. El

experimento de Western Blot evidenció una tendencia de aumento en todos los casos, que llegó a ser significativa para los péptidos 80 y 81 (Figura R-15, panel b).

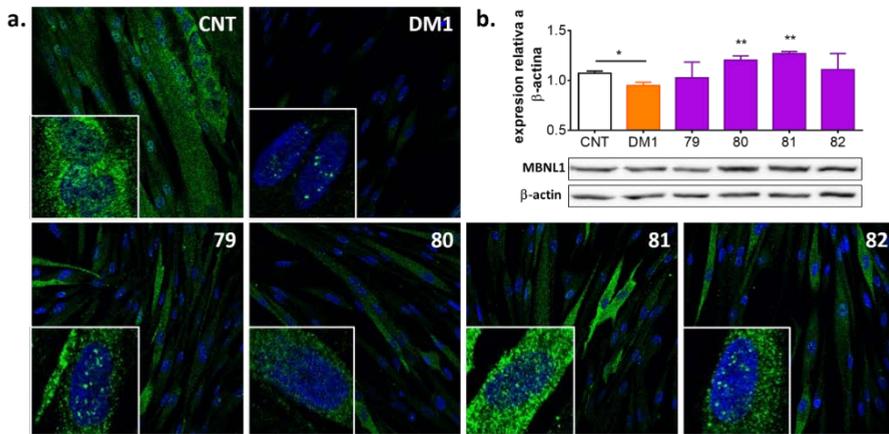


Figura R-15. Efectos de los péptidos seleccionados sobre la proteína MBNL1.

Detección de la proteína MBNL1 con un anticuerpo fluorescente. En los mioblastos control, la señal relativa a MBNL1 (verde) es alta y está distribuida homogéneamente entre el núcleo (en azul, tinción con Hoechst 33342) y el citoplasma (CNT). En los mioblastos DM1 la señal es muy reducida y está presente casi exclusivamente en el núcleo concentrado en puntos discretos (DM1). El tratamiento con los 4 péptidos seleccionados produce en mioblastos DM1 un notable aumento general de la señal. En el caso de péptidos 80 y 81 la cantidad de proteína MBNL1 asociada a los foci en el núcleo parece reducida. El ensayo de western blot ha evidenciado un aumento de MBNL1 a nivel de proteína significativo para los péptidos 80 y 81 (b).

2.3. Disminución del número de foci ribonucleares

Visto el sutil aumento de los niveles de proteína tras el tratamiento con los péptidos, contemplamos la posibilidad de que los rescates observados podrían tener como causa principal algún otro cambio aguas arriba en el patrón de la enfermedad. Por lo tanto, decidimos proceder con la evaluación de cambios en el número de foci en células tratadas. Utilizando esta vez una técnica de hibridación in situ con sonda fluorescente (FISH), en la que los foci ribonucleares se pueden visualizar como puntos rojos en el núcleo de las células de DM1 mientras que están totalmente ausentes en las control (Figura R-16, panel a).

Resultados

Para obtener un dato más objetivo y aumentar considerablemente el número de células analizadas utilizamos el microscopio InCell Analyzer y un programa de análisis asociado para su cuantificación.

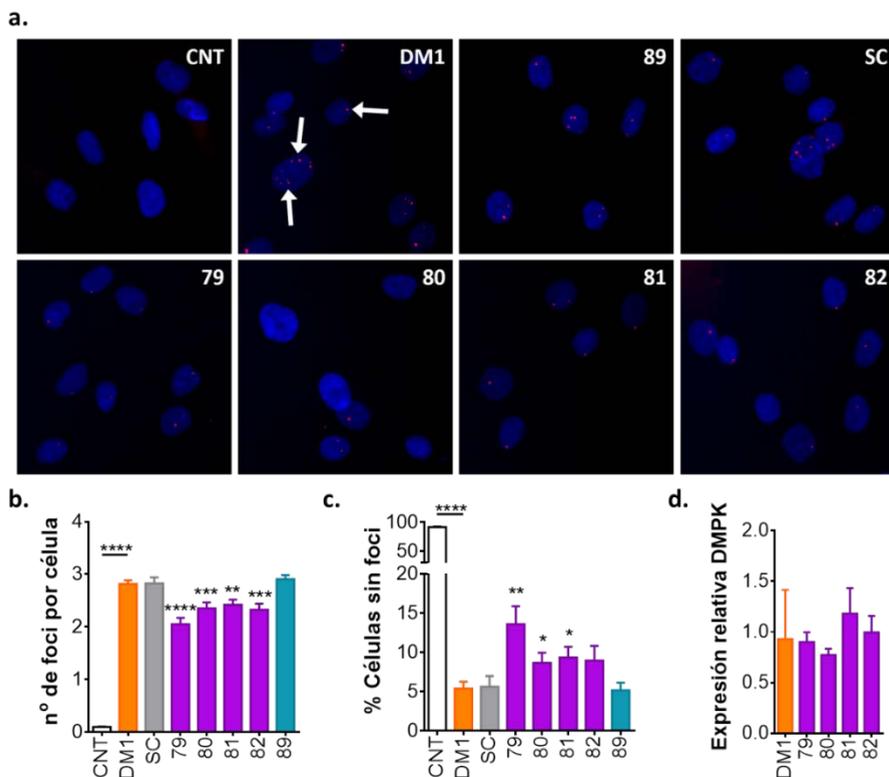


Figura R-16. Efecto del tratamiento con los péptidos seleccionados sobre los foci ribonucleares.

La detección de los foci se hizo mediante hibridación in situ (FISH) de las repeticiones tóxicas y una sonda complementaria marcada con un fluoróforo. En las imágenes representativas podemos observar los núcleos coloreados con HOECHST (azul) y los foci ribonucleares en el núcleo celular (rojo) (a). La cuantificación muestra que el número de foci por célula disminuye después del tratamiento con los cuatro péptidos (b) y que también aumenta el porcentaje de núcleos sin foci observados (c). Los niveles de expresión del gen DMPK se analizaron por qPCR y no mostraron alteraciones significativas debido al tratamiento con péptidos (d). Los péptidos 89 y Sc, usados como control negativo, no producen cambios significativos en ninguno de los parámetros analizados.

De esa forma conseguimos una estimación de diferentes parámetros: entre ellos, el número de células por pocillo, el tamaño medio de los foci y su intensidad (datos

no mostrados), que se mantuvieron invariables. Sin embargo, el número de foci por célula resultó significativamente disminuido en las células tratadas con todos los péptidos seleccionados (Figura R-16, panel b) y el porcentaje de células sin foci subió marcadamente en el caso del péptido 79 y de forma más reducida en caso de los péptidos 80 y 81, sin alcanzar un aumento significativo tras el tratamiento con el péptido 82 (Figura R-16, panel c). Por último, la cuantificación por PCR cuantitativa de la expresión del gen DMPK mutado, nos permitió excluir que la reducción del número de foci por célula fuera una consecuencia de una disminución de mRNA tóxico transcrito, ya que en ningún caso se observaron cambios (Figura R-16, panel d).

2.4. Mejora en la diferenciación muscular

Entre los fenotipos característicos de DM1 y directamente relacionados con los defectos musculares, se incluye la maduración tardía de miotubos primarios (Furling *et al.* 2001; Buj-Bello *et al.* 2002). Dicho fenotipo, se puede visualizar como un retraso en la formación de miotubos tras la inducción del proceso de transdiferenciación de fibroblastos a mioblastos y se puede corroborar a través de la evaluación de las diferencias en el índice de fusión que existen entre células control y células DM1. Este parámetro calcula el número de células multinucleadas (células con dos o más núcleos) dividido por el número total de núcleos de células que expresan desmina, siendo esta un marcador de diferenciación. Asimismo, tras haber incubado con medio de diferenciación miogénica (MDM) tanto fibroblastos control como DM1 durante cuatro y siete días, mientras que a la vez se les trataba con los péptidos durante 48 horas, llevamos a cabo una tinción con un anticuerpo anti-desmina y procedimos al recuento de los núcleos.

Una vez analizadas las imágenes adquiridas pudimos apreciar que a los cuatro días de incubación con MDM el estadio de la diferenciación seguía inalterado (datos no mostrados); en cambio a los siete días de diferenciación (Figura R-17, panel a), el

Resultados

porcentaje de células DM1 positivas para desmina (índice de diferenciación) era significativamente superior tras el tratamiento con los péptidos 79 y 81 (Figura R-17, panel c). A pesar de esto, evaluando el índice de fusión, vimos que este no sufrió ningún cambio positivo; de hecho tras el tratamiento con los péptidos 81 y 82 se observa una ligera reducción de las células multinucleadas (Figura R-17, panel b).

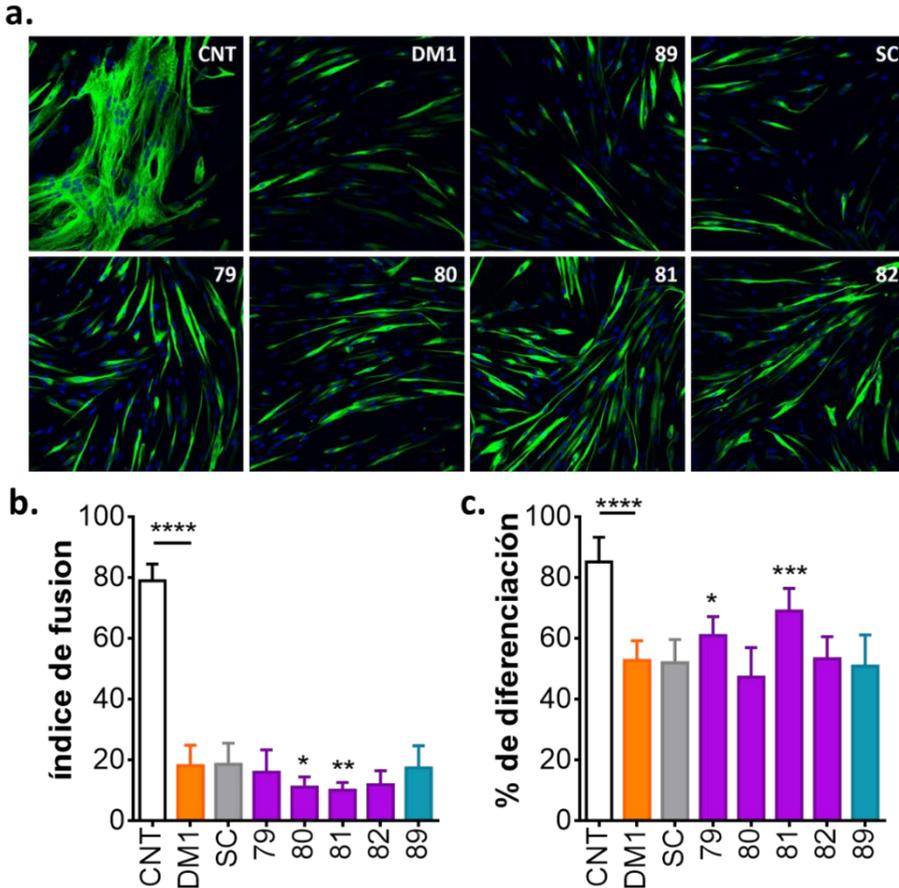


Figura R-17. Inmunodetección de mioblastos que expresan desmina.

Imágenes representativas de la inmunodetección de mioblastos positivos para desmina, gracias al uso de un anticuerpo anti-Desmina, en las que se puede apreciar la diferencia entre el estado de las células de control y el de la célula DM, después de 7 días de diferenciación. Después del tratamiento con los péptidos parece haber un aumento en la señal relacionada con la proteína (verde) (a). El análisis de los datos muestra que el porcentaje del índice de fusión no aumenta en ninguno de los casos (b), pero el tratamiento con los péptidos 79 y 81 provoca un aumento significativo en el número de células que expresan desmina (c).

2.5. Reducción de marcadores de autofagia

Un estudio reciente que se llevó a cabo en nuestro laboratorio, demostró que los mioblastos DM1 presentan niveles de autofagia aumentados y que la inhibición tanto de este proceso molecular como de la apoptosis, resultan en una mejora del fenotipo de atrofia (Bargiela *et al.* 2015). Se comprobó, además, que el fenotipo de pérdida muscular podría ser rescatado en *Drosophila* a través de la inhibición o el silenciamiento de genes reguladores de la autofagia y de la apoptosis, entre los cuales también se encuentra el gen muscleblind.

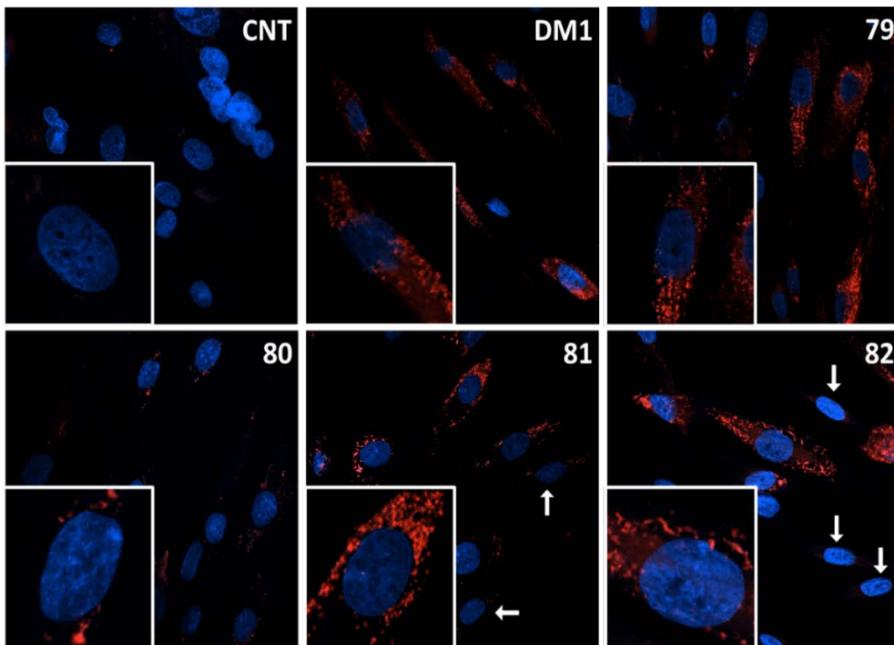


Figura R-18. Visualización de vesículas lisosomales como marcador de autofagia.

Tinción de vesículas lisosomales con el colorante Lysotracker. En las imágenes representativas se puede ver cómo la señal relacionada con las vesículas (rojo) está casi ausente en las células de control (CNT), mientras que es extremadamente evidente en las células DM1 (DM1) donde se ven concentradas en el área perinuclear. Los núcleos están coloreados con Hoechts (azul). Solo en el caso del péptido 80 se puede observar una disminución general en la señal, mientras que en el caso de los péptidos 81 y 82 la cantidad de células con señal reducida parece aumentar (flechas blancas).

Resultados

Por lo tanto, empleamos un colorante específico para las vesículas lisosomales para una evaluación rápida y sencilla de los niveles autofágicos de nuestros fibroblastos tratados. Solamente en el caso de las células tratadas con el péptido 80 se registró una disminución evidente de las vesículas autofágicas presentes alrededor de los núcleos, aproximándose bastante a la situación presente en células control. En cuanto a los péptidos 79, 81 y 82 seguían visibles numerosas vesículas, aunque también incrementó el número de células sin vesículas con respecto a las muestras DM1 sin tratamiento (Figura R-18).

3. Evaluación de la actividad en un modelo de DM1 en *Drosophila*

El retraso en el proceso de diferenciación muscular y los niveles aumentados de autofagia se encuentran entre los fenotipos que causan la atrofia muscular característica de la enfermedad. Puesto que el tratamiento con los péptidos producía cambios positivos, aunque leves, en ambos aspectos, quisimos averiguar si eran suficientes para conseguir una mejora de la atrofia. Para ello, se probaron los péptidos seleccionados en el modelo muscular de DM1 en *Drosophila* considerando que el ensayo *in vivo* además nos proporcionaría información importante sobre la toxicidad y la actividad de nuestros compuestos.

3.1. Rescate del fenotipo de atrofia

Las moscas se alimentaron durante los 7 días tras el nacimiento con comida suplementada con 10 μM de cada péptido y pasado ese tiempo se recogieron sus tórax y fueron procesados para la inclusión en resina y sucesivamente cortados en secciones transversales. Se adquirieron imágenes de los paquetes musculares y se cuantificó el área del tejido de interés (Figura R-19). El análisis de las imágenes reveló que los cuatro candidatos provocaban un rescate significativo del área muscular, acercándose mucho a los valores observados en moscas sanas en el caso

de los péptidos 80, 81 y 82. El tratamiento con el péptido 89, utilizado como control negativo, no produjo ningún cambio.

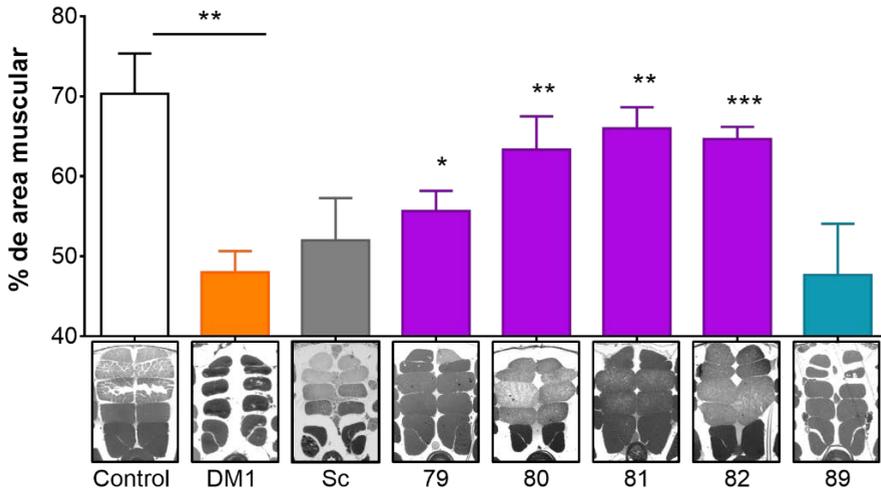


Figura R-19. Evaluación de los niveles de atrofia en *Drosophila*.

Secciones transversales (1.5 μm) de los IFMs de moscas Mhc-Gal4 (Control) y de moscas Rec2 tratadas con 0,1% DMSO (DM1) y de moscas DM1 alimentadas durante 7 días con 10 μM de cada compuesto. En la gráfica se muestra la cuantificación del área ocupada por los paquetes musculares de los músculos indirectos del vuelo. Los cuatro péptidos producen un aumento estadísticamente significativo del tamaño de los músculos siendo comparados con los de las moscas DM1.

3.2. Rescate funcional de escalada y de vuelo

A la luz de lo anteriormente expuesto quisimos averiguar si esa excelente recuperación de tejido se reflejaba también en la posibilidad de recobrar funcionalidad muscular. Para eso recurrimos a los ensayos funcionales de escalada y de vuelo en los que anteriormente, durante el testeo de los derivados de Abp1, no se había conseguido ningún cambio favorable.

Por esta misma razón, decidimos en este caso mantener el protocolo de la prueba sin variar, eligiendo por otra parte una forma diferente de tratar las moscas. Brevemente, las moscas empezaron a ser alimentadas con los péptidos a partir de su estadio larval L1 en vez que después de la eclosión. Con esto nuestra intención era que la acción beneficiosa de los compuestos pudiera acompañar todas las fases

Resultados

del desarrollo en vez que actuar directamente sobre un músculo adulto ya comprometido. Empezamos en primer lugar con el ensayo de escalada en el que se observó un incremento indudable de la velocidad de las moscas tratadas con los cuatro péptidos, aunque fue con el péptido 82 que se observó el máximo progreso (Figura R-20, panel a).

Cabe destacar el resultado obtenido tras el tratamiento de las moscas con los péptidos de control negativo Sc (*scramble*) y 89. Si bien en los anteriores experimentos el tratamiento con estos dos péptidos no había producido ningún efecto, en el caso del ensayo de escalada se pudo observar un aumento significativo de la velocidad de las moscas DM1 tratadas con el péptido Sc y 89 con respecto a moscas DM1 no tratadas. Aun así, la mejora obtenida tras el tratamiento con los péptidos seleccionados (excepto el péptido 79) es significativamente mayor con respecto a la del péptido control, como demuestra el análisis estadístico de los datos.

Observando los datos representados en la gráfica de la Figura R-19 se puede apreciar que el tratamiento con los péptidos control se refleja, a nivel histológico, en una leve tendencia hacia la mejora del fenotipo atrófico. Una posible explicación para estos resultados es que en mosca exista un efecto positivo debido únicamente a la química de los hexapéptidos y no a su secuencia.

En cuanto al ensayo de vuelo, en este caso el tratamiento con el péptido 82 produjo un marcado aumento del porcentaje de moscas capaces de volar. En la gráfica obtenida tras el análisis de la altura de aterrizaje se puede apreciar un leve aumento con respecto a los datos relativos a las moscas DM1 sin tratamiento, aunque este no llega a ser estadísticamente significativo (Figura R-20, panel b).

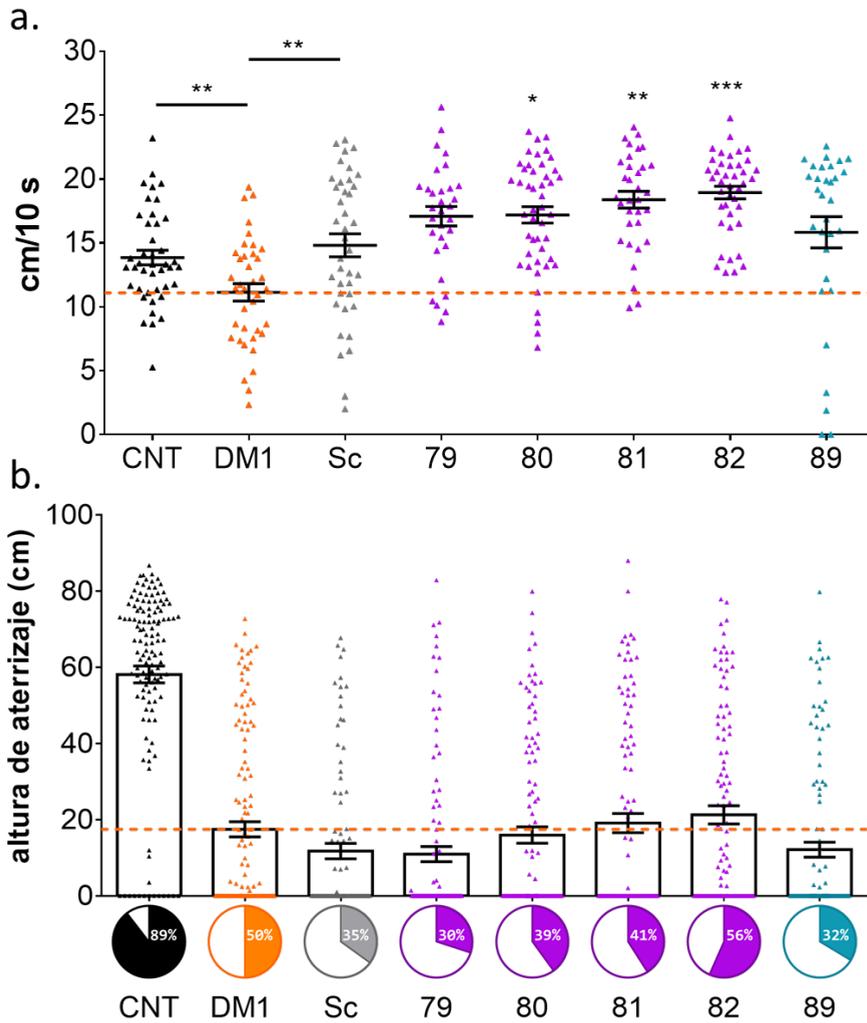


Figura R-20. Evaluación del rescate funcional de las capacidades de escalada y de vuelo.

Los ensayos funcionales se realizaron con moscas de siete días alimentadas con 10 μ M de cada compuesto o con la cantidad correspondiente de disolvente. Para el ensayo de escalada se utilizaron 30 machos por cada tratamiento y en la gráfica se representa la velocidad como distancia recorrida en 10 segundos; las moscas alimentadas con los 4 péptidos presentan un aumento de la velocidad significativo con respecto a las moscas DM1 (a). Para el ensayo de evaluación del vuelo se utilizaron 100 machos por cada tratamiento y los datos obtenidos tras el análisis de las imágenes adquiridas muestran una tendencia a una mejora que no llega a ser significativa; en correspondencia de cada barra se añade el porcentaje de moscas capaces de volar (que no caen al suelo) con cada tratamiento (b).

Resultados

III. Estudio del mecanismo de acción de los péptidos

Como última fase de este trabajo, nos propusimos estudiar el mecanismo de acción de los compuestos seleccionados. De hecho, esta tarea es de vital importancia tanto para seguir con la caracterización de los efectos anti-DM1 de los compuestos como para la identificación de posibles nuevas dianas terapéuticas y estrategias de tratamiento.

1. Interacción de los péptidos con las repeticiones tóxicas

En primer lugar, queríamos centrar nuestra atención en las posibles modalidades de interacción entre nuestros compuestos y el RNA. El motivo de esta decisión radica en el hecho de que durante el estudio de Abp1 se estableció que su actividad anti-DM1 se debía a la capacidad del péptido para interactuar con el RNA tóxico y estabilizarlo en su conformación de cadena sencilla. Dada la similitud entre la naturaleza y la secuencia de Abp1 con la de nuestros compuestos, era lógico suponer que las moléculas podrían actuar a través de un mecanismo de acción igual o, por lo menos, similar. Además, también los resultados observados en el experimento de hibridación in situ sugirieron que podría existir una interacción con el RNA, ya que el número de foci por célula se ve significativamente reducido después del tratamiento con péptidos.

La capacidad intrínseca del RNA para plegarse en estructuras terciarias complejas produce una gran variedad de conformaciones que son necesarias para la hibridación, la unión con proteínas o la catálisis de procesos enzimáticos. En general, las estructuras de RNA se estabilizan por el emparejamiento de las bases, por su apilamiento o por la interacción con iones y moléculas (Silvers *et al.* 2015). Las funciones de estos RNA a menudo se asocian con su conformación, cuya

estabilidad se ve casi siempre afectada por la presencia de mutaciones. Esto es exactamente lo que sucede en la distrofia miotónica, en la cual la región del gen DMPK, que contiene la expansión de trinucleótido CUG, una vez transcrita forma horquillas metaestables que secuestran proteínas de varios tipos, adquiriendo una función tóxica. Por esta razón, el despliegue de estas horquillas siempre ha estado entre las estrategias terapéuticas más prometedoras.

En nuestro caso quisimos usar dos técnicas que en nuestra opinión son las más adecuadas para el objetivo de estudiar la interacción entre los péptidos y el RNA, ya que ambas usan intercalantes fluorescentes que interaccionan específicamente con la conformación de doble cadena del ácido nucleico. La emisión de fluorescencia se puede estudiar, analizando sus variaciones en relación con el cambio de temperatura y asociar los datos obtenidos a una conformación de doble cadena o de cadena sencilla de la sonda de RNA.

1.1. Ensayos de Desplazamiento de Tiazol naranja (FID)

El ensayo de desplazamiento del intercalante fluorescente (FID assay, del inglés *fluorescent intercalator displacement*) se llevó a cabo en colaboración con los expertos en química supramolecular del laboratorio del Prof. Enrique García España (Instituto de Ciencias Moleculares, ICMOL). Más específicamente se utilizó el tiazol naranja (TO), un intercalante de cianina asimétrico, el cual tiene apenas fluorescencia cuando está libre en solución acuosa, mientras que produce una señal fluorescente al formar complejos de diferente naturaleza con ácidos nucleicos. Estas características se pueden aprovechar para estudiar los cambios en la interacción entre el tinte y el ácido nucleico de interés en respuesta a factores externos (Nygren *et al.* 1998; Kang *et al.* 2016). El indicador fluorescente interacciona con la sonda de RNA (CUG)₂₃ dando lugar a emisión fluorescente. Al añadir el péptido, este puede desplazar al TO haciendo que su fluorescencia disminuya. De esta forma, analizando la emisión de fluorescencia a diferentes ratios

Resultados

de RNA-péptido, se puede calcular el valor de la constante de afinidad del péptido por la secuencia CUG de manera indirecta (Tran *et al.* 2011).

Una vez completado el experimento con los cuatro péptidos, se analizaron los datos obtenidos y se calcularon las constantes de afinidad de cada uno. En todas las ocasiones fue posible observar una reducción progresiva de la fluorescencia en respuesta a concentraciones crecientes de cada péptido (Figura R-21); en el caso del péptido 79 ($k_{log}=5.27$) se observó la mayor disminución de fluorescencia (Figura R-21, panel a), seguido por el péptido 80 ($K_{log}=5.04$) y el cambio menor se observó con los péptidos 82 y 81 (respectivamente $k_{log}=4.74$ y $k_{log}=4.61$). Sin embargo, cabe especificar que en ninguno de los casos el nivel de fluorescencia observado alcanza

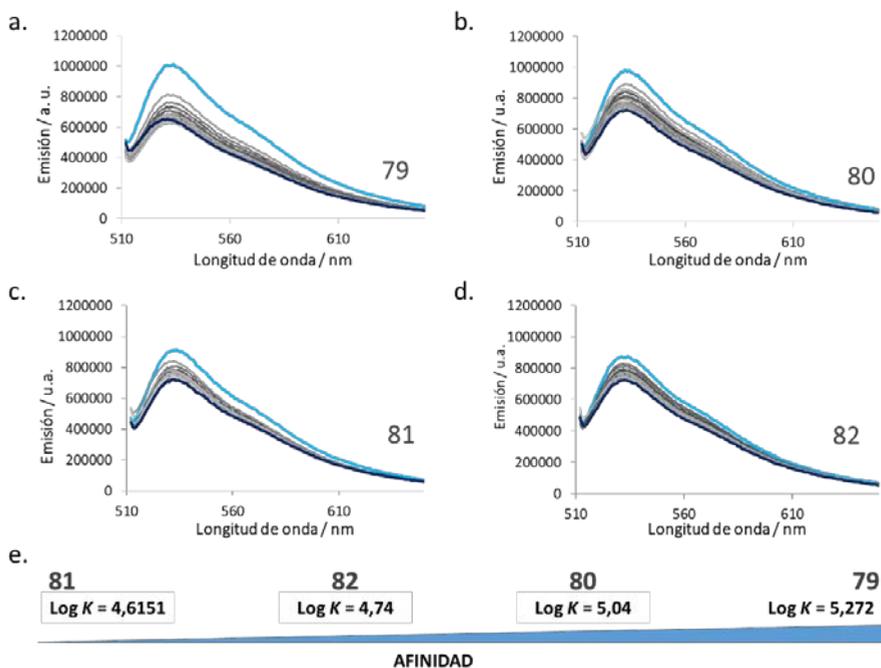


Figura R-21. Estudio interacción RNA-Péptidos con fluoróforo intercalante.

Valoración de fluorescencia del complejo (CUG)₂₃ y Tiazol Orange en presencia de concentraciones crecientes de cada péptido (a-d). La intensidad de fluorescencia disminuye progresivamente al aumentar la concentración. Se han añadido alícuotas de una disolución de 0.125 mM (hasta una concentración máxima de 8.5 mM) de péptido y los espectros de emisión se registraron a longitudes de onda desde 510 a 660 nm. Las constantes de afinidad (K) calculadas a partir de los datos obtenidos en los experimentos de FID indican que el péptido 79 es el que interacciona con mayor afinidad con la sonda de RNA (CUG)₂₃, a la que se une sin alterar su estructura secundaria (e).

los valores característicos de un RNA de cadena sencilla. Esto podría significar que, aunque existe una clara interacción entre los péptidos y la molécula de RNA, estos no interfieren con la estabilidad de su estructura secundaria.

1.2. Experimentos de *Differential Scanning Fluorimetry*

La fluorimetría de barrido diferencial de alto rendimiento (en inglés *Differential Scanning Fluorimetry*, DSF) es una técnica ampliamente utilizada para analizar la estabilidad de las proteínas en respuesta a factores ambientales como el pH, las sales o la presencia de ligandos. En esta técnica se usa un colorante indicador que cambia su fluorescencia en respuesta a un cambio en las cadenas laterales hidrófobas de los aminoácidos expuestas al medio ambiente. A medida que aumenta la temperatura, las proteínas se desnaturalizan gradualmente y una mayor cantidad de cadenas laterales hidrófobas se vuelven accesibles. El aumento concomitante de la fluorescencia permite determinar la estabilidad de la proteína en cuestión.

En los últimos años se han desarrollado fluoróforos con particular afinidad por el RNA que se pueden usar para llevar a cabo experimentos de naturaleza similar a los utilizados para las proteínas. Dado que se ha observado que los colorantes intercalantes como el TO pueden alterar la estabilidad de la estructura secundaria (Boger and Tse 2001; Tang *et al.* 2015), quisimos confirmar los resultados obtenidos en el experimento exhibido anteriormente, con los derivados de un experimento complementario como el DSF.

Recientemente se ha demostrado que, aprovechando la especificidad de algunos fluoróforos para el RNA en su conformación de cadena sencilla, se puede seguir indirectamente y caracterizar la transición entre la conformación de cadena doble y la de cadena simple. De hecho, esta transición suele ir acompañada de un aumento en los sitios de unión disponibles para el tinte, lo que provoca un aumento de la fluorescencia (Silvers *et al.* 2015).

Resultados

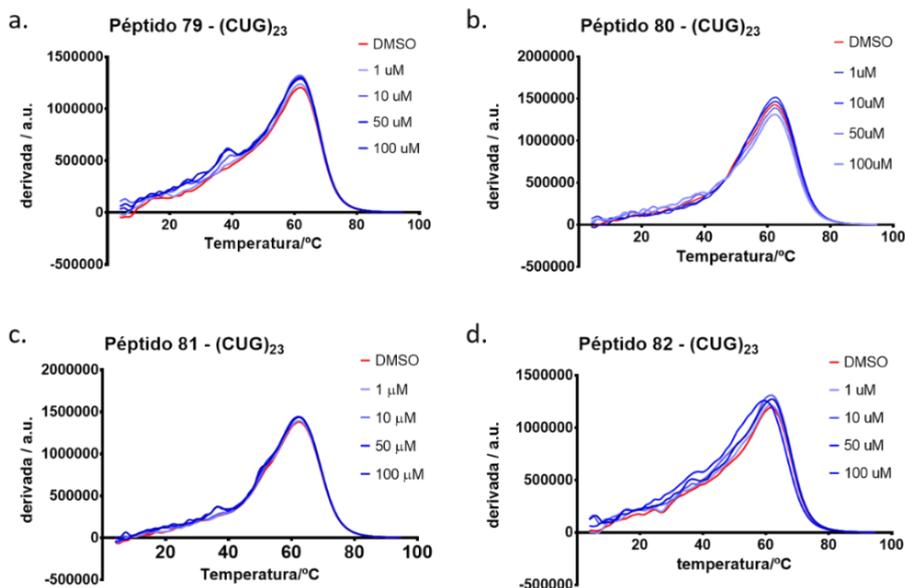


Figura R-22. Estudio interacción RNA-Péptidos con fluoróforo específico por RNA de doble cadena.

En las gráficas se representa la derivada de la señal fluorescente del fluoróforo RiboGreen en relación al aumento progresivo de la temperatura (hasta 100° C); las mediciones se han llevado a cabo incubando una sonda de RNA (CUG)₂₃ con concentraciones crecientes de cada péptido (de 1 a 100 μM, líneas azules) y con DMSO como control negativo (línea roja).

En este experimento, utilizamos el intercalante fluorescente Quant-iT RiboGreen, para estudiar los efectos del aumento de las concentraciones de cada péptido (1-100 μM) en la estructura secundaria de una sonda de RNA compuesta por 23 repeticiones de CUG. Los resultados obtenidos se muestran en un gráfico en el que la temperatura se correlaciona con la intensidad de la fluorescencia. En los gráficos relativos a los péptidos 79, 80 y 82 (Figura R-22, paneles a, b y d), se puede observar una disminución del pico de fluorescencia, casi ausente en el gráfico del péptido 81 (Figura R-22, panel c) y que sugiere una interacción entre el compuesto y la sonda de RNA. Solo en el caso del péptido 82 (Figura R-22, panel d) se puede observar un ligero desplazamiento de la curva hacia la derecha, lo que indica una reducción en la temperatura a la que el RNA comienza a desplegarse.

Obtuvimos así la confirmación de que la estabilización del RNA en su conformación de cadena sencilla no parece ser el mecanismo de acción más probable, a pesar de los experimentos *in vitro* que sugieren la existencia de una interacción entre los péptidos y las repeticiones tóxicas.

2. Modelización computacional de los péptidos: la interacción con el RNA

Aprovechando nuevamente el asesoramiento de nuestros colaboradores expertos en química computacional, hemos utilizado sus herramientas *in silico* para abordar el estudio del mecanismo de acción de los 4 péptidos seleccionados desde un punto de vista diferente. El modelado molecular abarca todos los métodos teóricos y las técnicas computacionales utilizadas para reproducir y estudiar la estructura y el comportamiento de las moléculas, lo cual nos permitió obtener datos interesantes sobre las posibles interacciones entre los péptidos y una molécula modelizada de RNA tóxico.

2.1. Análisis estructural de los péptidos

Para empezar el estudio computacional se ha evaluado el comportamiento de los hexapéptidos a lo largo de 10 ns mediante simulaciones de dinámica molecular.

De esa manera es posible determinar las conformaciones admitidas por cada péptido y estimar su prevalencia. Los datos indican que el péptido 79 (cpyaqe) es el péptido que muestra mayor conformación helicoidal, seguido por el péptido 80. Por lo tanto, la presencia del tándem ^DTyr-^DAla en la parte central de la secuencia sería requisito necesario para aumentar la conformación tipo hélice (Figura R-23, panel a).

Se observa además que los péptidos 81 y 82, los que poseen la secuencia central ^DTyr-^DThr, presentan el menor porcentaje de conformación helicoidal (mayor contribución del Turn) y corresponden a aquellos con la constante de unión más

Resultados

baja calculada experimentalmente. Efectivamente, comparando los datos computacionales con los resultados experimentales de constante de unión se observa una correlación positiva de los resultados obtenidos para cada uno de los péptidos (Figura R-23, panel b).

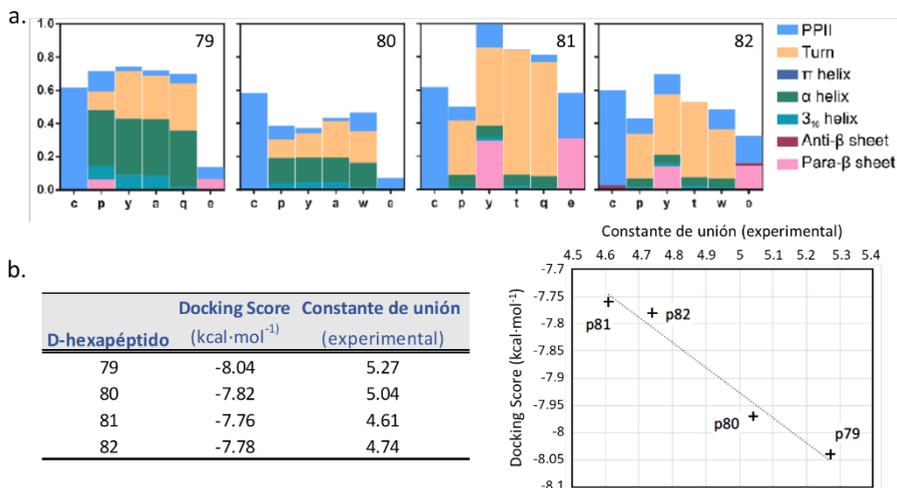


Figura R-23. Estructura secundaria preferente en los 4 péptidos seleccionados.

Estudio de la estructura secundaria de los péptidos 79-82 mediante simulaciones por dinámica molecular. En las gráficas se representan con barras de diferentes colores los porcentajes de las posibles conformaciones que caracterizan cada péptido (a). Se observa que 79 (c p y a q e) es el péptido que muestra mayor conformación en forma de hélice (teniendo en cuenta las contribuciones de PPII, hélices $\alpha\alpha$ y 3-10). En la tabla se resumen los valores de *score* obtenidos en el estudio *in silico* y las constantes de unión determinadas *in vitro*. En la gráfica es posible apreciar la existencia de una correlación positiva de los datos experimentales y computacionales obtenidos de manera independiente (b).

2.2. Estudio del mecanismo de interacción mediante *docking* molecular

En el campo del modelado molecular, el acoplamiento (*docking*) es un método que predice la orientación preferida de una molécula a una segunda cuando se unen entre sí para formar un complejo estable. Con la finalidad de obtener datos adicionales, se han realizado múltiples estudios de *docking* mediante el programa Autodock VINA y la plataforma de diseño molecular MOE (*Molecular Operating*

Environment). Para evaluar el efecto de la estructura del RNA se han usado distintas condiciones de cálculo y distintos protocolos de simulación. A continuación, se han comparados los resultados obtenidos con las técnicas de *docking* ciego y de *docking* orientado a 10 y 16 repeticiones CUGs; en este último caso se han hecho pruebas manteniendo el RNA rígido o admitiendo una cierta flexibilidad.

El análisis sugiere que los péptidos 79 y 80 son los péptidos que presentan mayor tendencia a interactuar en la parte expuesta del RNA (Figura R-24). Además, se ha analizado la estructura secundaria de cada conformación propuesta por el *docking*, y los péptidos 79 y 80 son los únicos que admiten complejos de interacción en los que el hexapéptido mantiene una cierta estructura de hélice.

Más en el detalle el péptido 79 sería el único D-hexapéptido capaz de reconocer dos uracilos de las dos cadenas de RNA por medio de los dos aminoácidos terminales. Esta situación podría explicar el hecho que presente una mayor constante de unión al RNA.

El hexapéptido 80 seguiría interactuando con las dos hebras del RNA, pero presentando únicamente el reconocimiento de un uracilo. Según los resultados, el Trp no se dispondría de forma favorable para la interacción con el esqueleto del RNA. Este resultado podría estar de acuerdo con los datos experimentales en los que se aprecia que la presencia de Trp no contribuye al aumento de la constante de unión a RNA (c_{pyaqe} > c_{pyawe}, c_{pytqe} ~ c_{pytwe}). Si bien esta conclusión podría deberse a una limitación del protocolo de simulación usado, que sólo contempla una ligera flexibilidad del RNA, se puede inferir que el Trp no interactuaría por $\pi\pi$ -stacking (interacciones atractivas y no covalentes entre anillos aromáticos).

En cuanto a los dos péptidos con menor energía de interacción experimental, sorprende el hecho que el mecanismo de unión obtenido, tanto para el péptido 81 como el 82, sólo presenta interacción con una hebra del RNA. De los dos, el 82 es capaz de interactuar con tres nucleótidos consecutivos, lo cual le podría aportar una ligera estabilización adicional.

Resultados

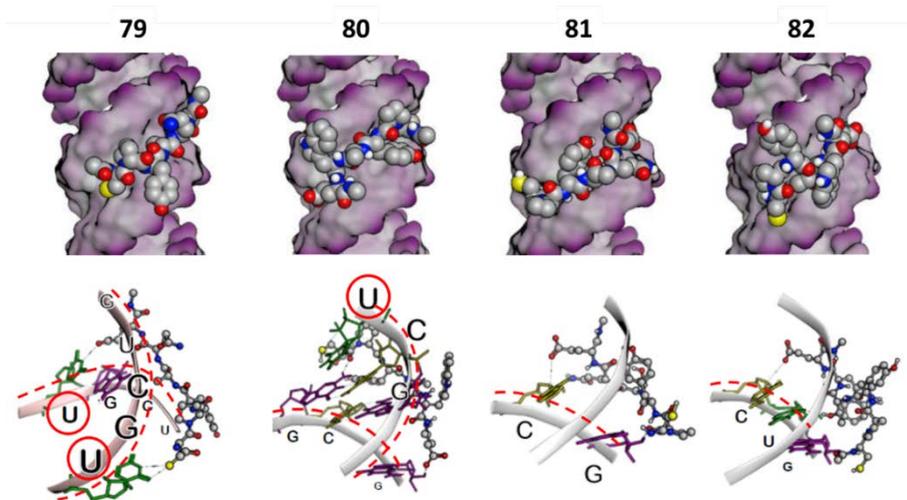


Figura R-24. Modelización de la posible interacción entre los péptidos seleccionados y el RNA.

Representación de los resultados obtenidos mediante un docking flexible dirigido a la zona del RNA expuesta al solvente. Se evidencian dos diferentes mecanismos de unión: los péptidos 79 y 80 interaccionan con las dos hebras de RNA (lineas rojas), reconociendo respectivamente dos y un uracilo (círculos rojos); los péptidos 81 y 82 interaccionan solo con una hebra (línea roja).

Dada la conocida flexibilidad del RNA en estudio, no sorprende que las interacciones observadas puedan presentar fluctuaciones. Aun así, los resultados indican que las dos interacciones establecidas por el péptido 81 con C y G son más lábiles que las tres que presenta el péptido 82, hecho que podría justificar su constante de unión ligeramente mayor. Se observa además que el péptido 80 mantiene su interacción con el RNA de forma significativa, aunque el Trp no sea capaz de establecer una interacción permanente. De manera similar, las interacciones definidas inicialmente por el péptido 79 con los uracilos de CUG consecutivos se muestran lábiles, pero se recuperan durante la simulación.

3. Localización subcelular del péptido marcado

Para complementar los datos sobre el mecanismo de acción obtenido con experimentos *in vitro* e *in silico*, pusimos a punto una última serie de experimentos con la intención de examinar el proceso desde el punto de vista molecular. En concreto, decidimos centrarnos en la determinación de la localización subcelular de nuestros compuestos, considerando que podría proporcionarnos información importante para comprender cómo se producen los efectos anti-DM1 observados en la caracterización de la actividad biológica. Para este propósito, diseñamos un estudio exploratorio y ordenamos la síntesis del péptido 79 marcado con biotina

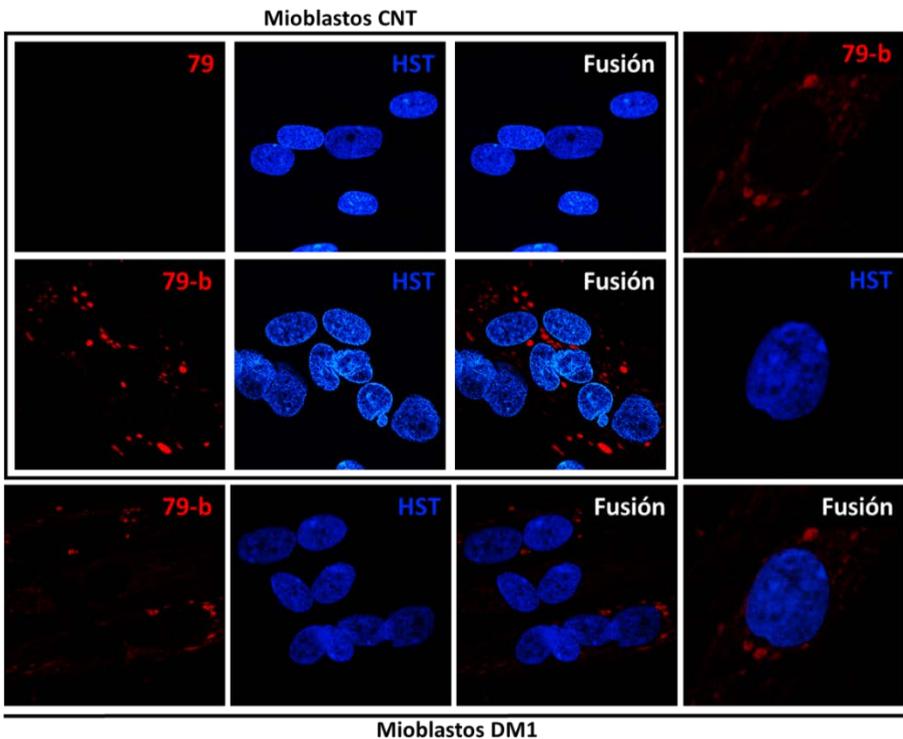


Figura R-25. Caracterización de la localización subcelular del péptido 79 marcado.

La visualización del péptido 79-b se obtuvo por incubación con el sistema de amplificación de señal avidina-estreptavidina Texas Red. Se llevó a cabo la tinción siguiendo el mismo protocolo en células control tratadas con péptido 79 o péptido 79-biotina y en células DM1 tratadas con péptido 79-biotina.

Resultados

(79-b), lo que facilitaría su visualización en la célula sin comprometer su actividad (Jiao *et al.* 2010).

Primero quisimos verificar que la señal que estábamos detectando era específica y si había una ubicación diferente entre las células sanas y las células de los pacientes de DM1. Ejecutamos el mismo protocolo de tinción en muestras de células sanas tratadas con el péptido marcado 79-b o con el péptido 79 solo y células DM1 tratadas con el péptido marcado 79-b (Figura R-25). Pudimos así confirmar que el protocolo de inmunofluorescencia era efectivo y que la señal roja correspondiente al péptido 79-b era específica, ya que no era detectable en las imágenes con las células tratadas con el péptido 79 solo. Además, la ubicación subcelular del péptido no parece ser diferente entre células sanas y DM1. En cuanto a la localización subcelular del péptido, observamos que, contrariamente a lo esperando, dicha señal se podía detectar en el citoplasma, más en detalle en el área perinuclear, pero no en el núcleo.

3.1. Colocalización con MBNL1

Los datos sobre la actividad biológica de los péptidos demuestran una clara relación entre su actividad anti-DM1 y el papel de MBNL1 en la distrofia miotónica. Por lo tanto, resulta interesante saber si existe una colocalización de estas moléculas. Por esta razón, decidimos llevar a cabo un ensayo de doble inmunofluorescencia utilizando un sistema de amplificación de señal de avidina-estreptavidina para visualizar el péptido 79-b y un anticuerpo anti-MBNL1 para visualizar una posible colocalización. La tinción se realizó tanto en mioblastos control como en mioblastos DM1 y en ambos casos no se pudo observar un solapamiento significativo de las señales roja y verde, relativas respectivamente al péptido marcado y a MBNL1 (Figura R-26).

Estos datos indican que algunos de los resultados observados, como la disminución en el número de foci por célula, el aumento en la expresión y la liberación de

MBNL1, deben explicarse con un mecanismo indirecto en lugar que con acción directa de los péptidos sobre el RNA tóxico o sobre la proteína MBNL1.

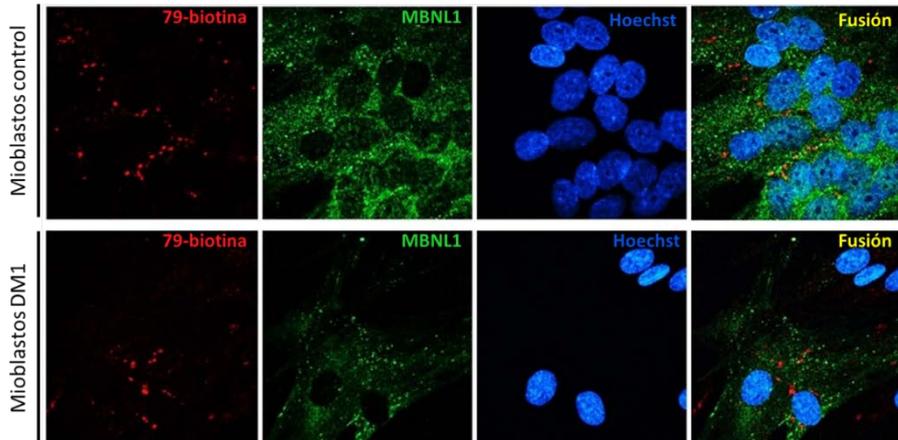


Figura R-26. Colocalización de la proteína MBNL1 con el péptido 79 marcado.
 Ensayo de doble inmunofluorescencia para la visualización de la proteína MBNL1 y del péptido 79-biotina en células control y DM1. En ambas líneas celulares se puede observar que la señal relativa MBNL1 (verde) no co-localiza con la señal relativa al péptido 79 marcado con biotina (rojo).

3.2. Colocalización con vesículas autofágicas

Como ya se ha mencionado, la señal del péptido marcado se podía visualizar en el área que rodea el núcleo y, en algunos casos, acumulada en puntos discretos que recuerdan la forma de vesículas. Por eso, volvimos a considerar los resultados obtenidos durante la caracterización de la acción anti-DM1, en la cual la actividad de los compuestos se correlacionaba con atrofia y más detalladamente con el estado de diferenciación celular y los niveles de autofagia. Quisimos estudiar la posibilidad de que fuera esta la vía en la que los compuestos actuaban, desencadenando todos los otros efectos observados como consecuencia.

Con este propósito, pusimos a punto otra inmunofluorescencia doble, en la cual, además de detectar el péptido biotilado, siguiendo el protocolo establecido, se detectó la proteína LC3 que se encuentra típicamente en vesículas autofágicas

Resultados

(Tanida *et al.* 2004). Observando las imágenes, resulta evidente que las dos señales colocalizan en mioblastos DM1 (Figura R-27, panel a). Además, pudimos confirmar objetivamente y cuantificar lo observado, analizando las imágenes obtenidas con el programa de procesamiento de imágenes del microscopio. Pudimos así representar gráficamente la superposición de las dos señales (Fig.R-27, panel b).

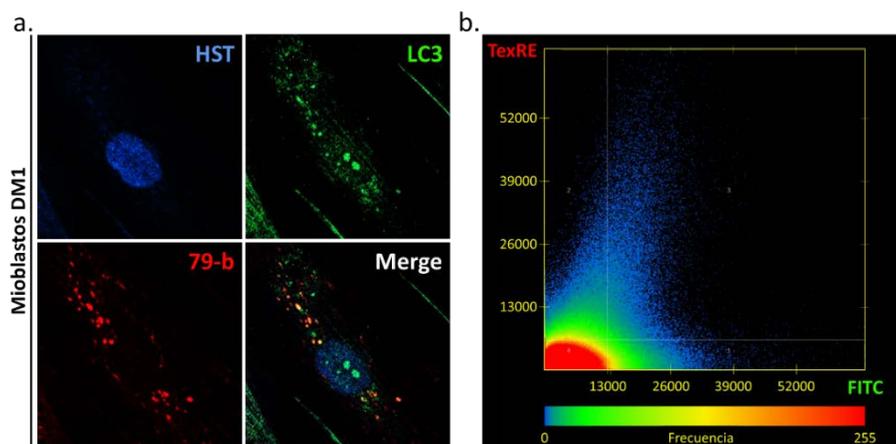


Figura R-27. Colocalización del péptido 79 marcado con la proteína autofágica LC3. Inmunofluorescencia doble para la visualización del péptido marcado y de la proteína autofágica LC3. Alrededor del núcleo (azul) se puede observar como la señal relativa al péptido (rojo) y la relativa a la proteína LC3 (verde) colocalizan (a). El grado de colocalización se cuantifica en la gráfica a la derecha (b).

Esta colocalización no tiene una interpretación unívoca. De hecho, por un lado, podría significar que el péptido se incluye en las vesículas autofágicas que se eliminarán por la célula. Por otro lado, podría ser que los péptidos puedan llevar a cabo su acción interviniendo en la vía de la autofagia a través de la interacción con la proteína LC3 o con otra proteína que se encuentra en el mismo compartimento intracelular. La última hipótesis es, sin duda, la más interesante, ya que abriría el camino para un estudio detallado de este aspecto, que, sin embargo, podría culminar con la identificación de un mecanismo de acción innovador y nuevas dianas terapéuticas.

DISCUSIÓN

1. Evaluación de la actividad anti-DM1 de los compuestos derivados de Abp1

Para establecer los primeros pasos en el camino de este proyecto de investigación, se requirió una evaluación cuidadosa de los datos obtenidos previamente y un extenso estudio sobre las estrategias más eficaces para la mejora de los péptidos terapéuticos. Los conocimientos adquiridos en esta primera fase de estudio, acompañados por la experiencia multidisciplinaria de nuestros colaboradores, llevaron a la selección de tres estrategias de mejora y a la síntesis de 9 péptidos derivados de Abp1 (Tabla R-1) con las modificaciones necesarias para enmendar sus limitaciones.

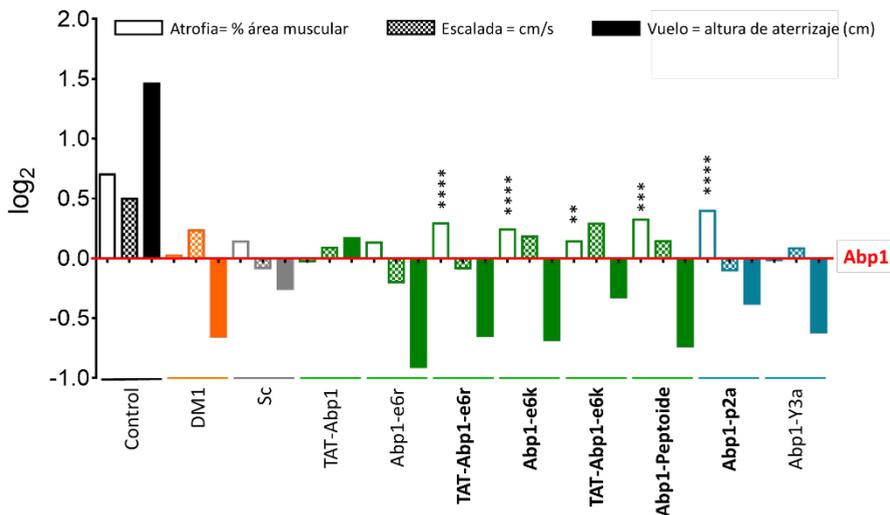


Figura D- 1. Actividad de los péptidos derivados en modelo de DM1 en Drosophila.

En la gráfica se resume del conjunto de datos obtenidos tras el tratamiento de moscas control y DM1 con los péptidos derivados de Abp1. Todos los valores han sido normalizados con respecto a los valores relativos a las moscas tratadas con Abp1 (línea roja). De esa manera todos los valores por encima del eje x representan una mejora de los resultados obtenidos mientras que los que se encuentran por debajo representan un empeoramiento.

Los datos obtenidos tras la evaluación del estado atrófico en moscas DM1, nos permitieron identificar 5 derivados (evidenciados en negrita en la gráfica de la

Discusión

Figura D-1) que poseen una actividad biológica mejorada con respecto a la de Abp1. El rescate del estado atrófico de los IFMs de las moscas modelo adultas demuestra que esas modificaciones realizadas sobre el péptido original producen un refinamiento de sus capacidades terapéuticas.

Con el fin de caracterizar mejor la actividad de los nuevos compuestos en mosca, se completaron otros dos experimentos, dirigidos, esta vez, a estudiar una posible mejora funcional: las pruebas de escalada y vuelo (Figura R-9, paneles a y b). El conjunto de datos obtenidos en los tres experimentos, se resume en la Figura D-1 para facilitar la visualización y evaluación del conjunto de datos. En la gráfica, todos los valores relativos a los controles y a los derivados se han normalizado con respecto a los valores obtenidos por Abp1; de esta manera, resulta más fácil observar que la recuperación observada a nivel histológico se tradujo en una ligera corrección funcional aunque no llega a ser estadísticamente significativa.

Por lo tanto, se puede concluir que las modificaciones realizadas en el péptido original son evidentemente efectivas para la mejora de la actividad anti-DM1 de Abp1. Por otro lado, la mejora limitada a nivel funcional y la falta de actividad biológica en las células humanas dejan abierto un margen adicional de mejora.

A continuación, analizamos las posibles explicaciones para los datos observados y las diferentes propuestas que planteamos para mejorarlos.

1.1. Potencial y límites de las posibles modalidades de administración

La elección de la mosca como primer modelo de la enfermedad para probar los nuevos compuestos tiene múltiples ventajas. De hecho, aparte de los diversos aspectos positivos desde el punto de vista económico, práctico y técnico, la principal ventaja proviene del hecho de que Abp1 fue identificado y caracterizado precisamente en este modelo. Por lo tanto, es indiscutible que usar el modelo muscular de DM1 en *Drosophila* fuese la forma más inmediata de comparar de manera fácil y objetiva los efectos de los nuevos derivados con los del péptido

original. En cambio, el tiempo de administración, la dosis y la duración del tratamiento son parámetros que deben considerarse cuidadosamente. Se precisa la evaluación de todos los pros y los contras de cada estrategia posible con el fin de alcanzar ese equilibrio que nos permita aprovechar al máximo el potencial de los compuestos permaneciendo dentro de la ventana terapéutica.

Anteriormente, la mejora del estado de atrofia muscular, debida a la acción del péptido Abp1, pudo observarse como consecuencia de la administración del tratamiento a las moscas desde su etapa de larva L1 (Figura D-2, panel a), acompañando así el proceso de desarrollo muscular y actuando desde su inicio (Figura D-2, panel b). Sin embargo, este tipo de tratamiento no sería viable en pacientes.

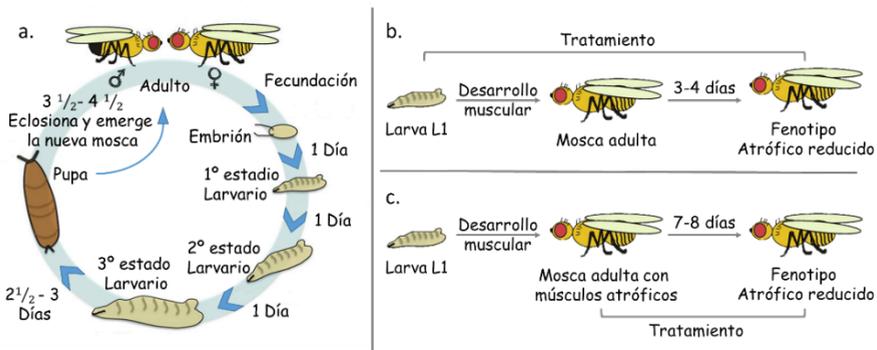


Figura D- 2. Esquema de los diferentes tipos de tratamiento.

Representación esquemática del ciclo vital de *Drosophila*; Entre la fecundación del embrión y la eclosión de la mosca adulta de la pupa hay un marco de tiempo de diez días durante el cual los individuos pasan por tres etapas larvales: 1º, 2º y 3º estadio larvario (a). La primera estrategia de tratamiento consiste en la administración del compuesto desde la primera etapa larvaria (L1) hasta 3-4 días después de la eclosión, para un total de 13-14 días de tratamiento (b). En la segunda estrategia, en cambio, el tratamiento comienza directamente en la mosca adulta desde el primer día de vida hasta el 7º-8º día (c).

Por otro lado, la administración de los compuestos a partir del día 1 después del nacimiento es una estrategia que está más cerca de la realidad y aún proporciona una forma efectiva de identificar cualquier compuesto con actividad biológica potenciada.

Discusión

De hecho, consideramos que los rescates observados tras el tratamiento en adulto sean mucho más significativos ya que indican la capacidad de los compuestos de mejorar el estado de un músculo atrófico ya formado (Figura D-2, panel c).

Aunque la identificación de los 5 compuestos mejorados ya es un gran paso adelante, ciertamente existe la posibilidad de obtener resultados más relevantes al explorar los posibles regímenes de administración. Entre las diversas opciones encontramos la de extender el período de tratamiento o modificar el comienzo del mismo. Sin embargo, el aumento en la dosis administrada podría ser la solución más efectiva, especialmente considerando el hecho de que los péptidos no son tóxicos hasta una concentración 10 veces mayor que la utilizada.

1.2. El motivo PPII y la actividad biológica de los hexapéptidos

En los experimentos en el modelo de *Drosophila* se observó una mejora considerable también tras el tratamiento de moscas adultas DM1 con el péptido Abp1-p2a (Figura D-2). Recordamos que se trata del péptido sintetizado como control estructural y que su síntesis se propuso con la intención de corroborar los datos generados en el marco del estudio computacional. De hecho, los datos obtenidos *in silico* sugirieron que la actividad biológica del péptido Abp1 estaba vinculada a su estructura secundaria caracterizada por la presencia del motivo PPII. Se ha establecido que este motivo estructural se puede encontrar en secuencias peptídicas compuestas por diferentes aminoácidos, además de por residuos de prolina, como en el ejemplo de la Figura R-4, panel c (Narwani *et al.* 2017). En diversos estudios, además, se ha observado que la presencia del motivo estructural de PPII en las proteínas es más frecuente de lo esperado y han sugerido que pueda tener un importante papel funcional, particularmente en las interacciones y el reconocimiento proteína-proteína o proteína-ácido nucleico (Hicks and Hsu 2004; Narwani *et al.* 2017). De ahí surgió la hipótesis de que la sustitución de la segunda prolina con una alanina en la secuencia de Abp1, podría ayudar a entender si la

actividad se asocia a la secuencia aminoacídica o a la estructura secundaria que puede asumir el hexapéptido (Morrison and Weiss 2001).

Los datos experimentales indican no solo que la segunda prolina no es necesaria para la actividad del compuesto Abp1, sino también que su ausencia se asocia con una mejora en la actividad del hexapéptido. Una posible explicación es que la compleja cadena lateral del residuo de prolina entorpezca el contacto entre el péptido y el ácido nucleico. Por otro lado, la presencia de la alanina en segunda posición hace que el péptido Abp1-p2a mantenga el motivo de la estructura secundaria y que pueda interactuar de manera más eficiente con las repeticiones. Análogamente, los estudios computacionales han confirmado que el motivo PPII está presente también en los péptidos 81, 82, 79 y 80 (Figura R-4, panel d) cuya secuencia se diferencia de la de Abp1 por la presencia de una cisteína en lugar de la primera de las dos prolinas. Esta información se suma a los datos a favor del hecho que a pesar de la ausencia de una de las dos prolinas, la conformación helicoidal de PPII se mantiene siendo la cisteína compatible con ella (Jha *et al.* 2005). Además, confirma que este motivo está fuertemente vinculado con la actividad biológica ya que estos 4 péptidos son los que se han seleccionado por la relevancia de su actividad biológica en células de paciente.

Finalmente, resulta de particular interés la asociación entre péptidos caracterizados por el motivo PPI y PPII y diversas categorías de péptidos de penetración celular. Más en el detalle lo que tienen en común estos péptidos es la presencia de uno o más grupos funcionales pirrolidina (presente en la cadena lateral de la prolina) que por sus características químicas ha sido relacionada positivamente con una mayor permeabilidad celular (MacArthur and Thornton 1991; Williamson 1994; Pujals and Giralt 2008).

Los datos de literatura junto con los datos experimentales obtenidos contribuyen a confirmar y respaldar la hipótesis formulada después del estudio computacional preliminar. La correlación entre la actividad biológica y el motivo de poliprolina se

Discusión

convierte en un punto fijo importante a tener en cuenta durante la fase de diseño de las próximas modificaciones. Se precisa dar prioridad a todas las estrategias que preservan o favorecen la estructura secundaria helicoidal del péptido original.

1.3. Optimización de la actividad biológica afinando las modificaciones.

Los resultados obtenidos utilizando los derivados de Abp1 para tratar las moscas distróficas, muestran que casi todas las modificaciones realizadas otorgan una mejora en la actividad anti-DM1 con respecto a la del hexapéptido original. Sin embargo, la falta de rescate funcional y la ausencia de actividad significativa en el modelo celular humano sugiere que pueden ser necesarias modificaciones adicionales para lograr un resultado óptimo.

1.3.1. Abp1 de Peptoide a Peptámero

La síntesis de Abp1 en su versión de peptoide se llevó a cabo para alcanzar el objetivo de aumentar su biodisponibilidad, aprovechando las características distintivas de los peptidomiméticos que hemos detallado en el apartado 2.2 de la introducción. Entre ellas la que más nos interesa es su elevada flexibilidad; la estructura de glicina poli-N-sustituida de los peptoides elimina la quiralidad del esqueleto y la ausencia de hidrógenos de amida impide la formación de enlaces de hidrógeno. Esto minimiza la posibilidad de que los peptoides adopten motivos regulares de estructura secundaria, ya que aumenta notablemente el espacio de conformación que pueden ocupar. Dicha característica ha sido aprovechada para generar quimiotecas con una inmensa variedad de nuevas moléculas y puede ser muy útil a la hora de estudiar el mecanismo de interacción entre el péptido original y su target. Sin embargo, un exceso de permisividad estructural puede afectar la actividad biológica cuando ésta está estrictamente relacionada con un determinado motivo molecular (Adessi and Soto 2002).

En nuestro caso la conversión del péptido Abp1 en peptoide ha sido beneficiosa para conseguir una mejora de la actividad biológica como demuestran los

resultados de los experimentos que hemos descrito en el capítulo 3.1 de resultados. No obstante, la alteración de la estructura secundaria característica de Abp1 podría ser la causa de la falta de un resultado óptimo.

De hecho, en la literatura se refiere que la transformación de monómero a monómero de los residuos peptídicos a residuos peptoides puede, a veces, cambiar drásticamente la conformación plegada del oligómero; en consecuencia es probable que la construcción de un peptoide con la misma secuencia de cadenas laterales que el péptido original provoque una alteración de la actividad biológica (Fowler and Blackwell 2009).

Asumiendo que este sea el caso de nuestro Abp1-peptoide, para que su actividad anti-DM1 alcance el máximo potencial, se debería por lo tanto realizar algunos cambios que tengan en cuenta este aspecto.

Por ejemplo, numerosos estudios han demostrado que los peptoides pueden ser inducidos a formar estructuras secundarias helicoidales a través de una incorporación periódica de cadenas laterales voluminosas y quirales. Más en el detalle, se ha demostrado que la incorporación de al menos un tercio de cadenas laterales homoquirales y aromáticas puede hacer que el peptoide adopte una conformación helicoidal tipo poliprolina (Wu *et al.* 2001; Hara *et al.* 2006; Chongsiriwatana *et al.* 2008).

En un estudio de 2006 Hoffmann y colaboradores describen un proceso de transformación sistemático iterativo de un péptido biológicamente activo a un peptoide que retiene la actividad peptídica original. En este proceso la transformación se logra mediante sustituciones sucesivas de cada aminoácido con bloques de construcción peptoides apropiados (Hoffmann *et al.* 2006). En algunos casos el perfeccionamiento de la actividad se puede lograr incluso intercalando residuos de ambas naturalezas, sintetizando unos compuestos híbridos llamados peptámeros (Ostergaard and Holm 1997).

Discusión

1.3.2. Incorporación de aminoácidos con carga positiva

Otro de los retos que nos propusimos fue el aumento de la cantidad de péptido capaz de difundir al interior de la célula y para lograrlo se utilizaron dos estrategias diferentes, aunque basadas en el mismo principio. Aprovechando el hecho de que los péptidos cargados positivamente cruzan la membrana más fácilmente, ambas resultaron ser beneficiosas ya que se pudieron observar efectos positivos en mosca, pero no se encontró actividad biológica en las células humanas.

En primer lugar se procedió a la conjugación de Abp1 con el fragmento ⁴⁸GRKKRRQRRR⁵⁷ del péptido TAT, siendo esta la unidad mínima funcional del péptido, como han establecido por Park y colaboradores (Park *et al.* 2002). En la literatura, se han descrito casos en los que la conjugación ha producido una alteración de la actividad tanto del TAT como del péptido cargo. Esto se debe al hecho de que los aminoácidos adyacentes pueden limitar mutuamente su espacio conformacional, modificando así la estructura secundaria de la molécula resultante. De hecho, se ha observado que la presencia de unos aminoácidos espaciadores, como por ejemplo una serie de glicinas, resulta a menudo conveniente para que esto no suceda. (Zhang *et al.* 2014; Matsumoto *et al.* 2015). Así, es muy probable que la adición de un espaciador entre el TAT y el hexapéptido sea suficiente para incrementar la permeabilidad de los derivados.

Otros trabajos afirman que los péptidos de poliargininas son más eficientes que los de lisina y que el mismo TAT (cuya secuencia consiste principalmente en arginina). Esto se debe al hecho de que el mecanismo de internalización en la célula depende del grupo guanidino de la cadena lateral de la arginina, indispensable para la interacción con la membrana plasmática. En concreto, este grupo funcional cargado positivamente establece un enlace de hidrógeno con un grupo fosfato de la membrana (con carga negativa) activando el mecanismo de internalización (Futaki *et al.* 2001; Guidotti *et al.* 2017).

Como última modificación se intentó favorecer la entrada en la célula sustituyendo la carga negativa del aminoácido terminal de Abp1 (ácido glutámico, E) con una carga positiva proporcionada por un residuo de arginina (R) o de lisina (K). En la fase de diseño se propuso esta solución para tener una alternativa menos invasiva a la conjugación con TAT, y para eso se tomó la decisión de no añadir más aminoácidos, sino de limitarse a una sustitución. Sin embargo, varios estudios en literatura sugieren que para alcanzar los niveles de internalización deseados podría ser necesario añadir al menos 5 residuos de carga positiva (Tunnemann *et al.* 2008; Borrelli *et al.* 2018).

Así mismo se podría plantear como solución la conjugación de un péptido de poli-argininas “R₅” al extremo terminal de Abp1.

2. Interpretación de la diversidad de los resultados obtenidos en el modelo celular humano

La existencia y el descubrimiento de la actividad biológica de los 15 péptidos en el modelo celular humano constituye un gran paso adelante en el contexto de este estudio. Sin embargo, la heterogeneidad de los efectos que cada uno produce, ha dificultado una interpretación unívoca de los datos obtenidos. Se decidió centrar la atención en los 4 péptidos que producen los efectos más prometedores, y estos se han sometido a una caracterización más completa. Aun así, se necesitan mayores esfuerzos para dilucidar los diversos aspectos de su actividad, para aclarar el mecanismo de acción subyacente y para determinar su potencial terapéutico.

2.1. Relación entre actividad biológica y secuencia aminoacídica

Los efectos anti-DM1 obtenidos tratando células de paciente con los 15 péptidos con secuencia relacionada a Abp1 (resumidos en la Tabla R-2), merecen un análisis más profundo debido a la diversidad de los resultados obtenidos tanto a nivel de *splicing* como a nivel de la expresión relativa de MBNL1 y 2.

DM1, aunque el número de rescates de eventos de *splicing* dependientes de MBNL1 es igual para ambos aminoácidos. Finalmente, en quinta posición (X_5) es la glutamina la que presenta la mayor relación de eventos positivos, aunque la diferencia entre los dos aminoácidos no es muy evidente.

Aunque probablemente serían necesarias más pruebas para llegar a una lectura unívoca y definitiva de estos datos tan heterogéneos, es seguramente interesante observar que este análisis preliminar corrobora los resultados obtenidos en los estudios computacionales. Estudiando la estructura de los péptidos se había sugerido que el tándem Y-A es importante para el mantenimiento del motivo helicoidal y que el triptófano no favorece la interacción con el RNA.

2.2. La diversidad de los efectos biológicos puede residir en diferentes mecanismos de acción

Los experimentos llevados a cabo con el fin de aclarar el mecanismo de acción de los 4 péptidos seleccionados nos han permitido sacar varias conclusiones, aunque estas no han sido suficientes para determinar cómo funciona cada uno de los péptidos.

Anteriormente, en el estudio de Abp1, se había determinado que el péptido posee la capacidad de interactuar con el RNA tóxico (CUG)_n de cadena sencilla, evitando las horquilla, cuya estructura secundaria es necesaria para la unión de MBNLs. Estabilizando el mRNA en su conformación de cadena sencilla, se previene el secuestro de MBNL1 en los foci permitiendo su normal funcionamiento.

Dada la semejanza de todos los péptidos utilizados en este proyecto era de esperar un mecanismo común para todos ellos. Sin embargo, los resultados de los experimentos de FID y DFS indican que los péptidos 79-82 interactúan con el RNA, pero no provocan su despliegue. Los ensayos computacionales han proporcionado más pruebas sobre la diversidad estructural de los péptidos a pesar de su secuencia parecida y apoyan la hipótesis de que existan grupos de péptidos que interactúan con el RNA de manera diferente.

Discusión

Todo esto proporciona una explicación tanto en cuanto a las diferencias de actividad entre Abp1 y los otros péptidos, como a la variedad de efectos observados en la célula.

2.2.1. Hipótesis de un posible mecanismo de acción alternativo y novedoso

La actividad de las proteínas de la familia MBNL depende de la acción simultánea y coordinada de los 4 dedos de zinc que las caracterizan. Estos motivos estructurales están organizados en tándem y se encuentran en la región N-terminal (ZnF1 y 2) y en la región central (ZnF3 y 4) de la proteína (Teplova and Patel 2008). Dentro de cada segmento en tándem, las proteínas de vertebrados son 99% idénticas y los aminoácidos que los componen están altamente conservados en los homólogos humanos. Los dedos de zinc muestran un grado de conservación muy alto también con las proteínas de insectos e invertebrados con casi un 80% de similitud de aminoácidos (Figura D-3). La única diferencia significativa es el espaciado entre dos residuos Cys en el segundo dedo de zinc del primer motivo ZnF, con dos aminoácidos adicionales en proteínas de insecto (Oddo *et al.* 2016).

Debido a su elevada complejidad, la identificación de los motivos de RNA reconocidos por MBNL y el mecanismo por el cual se une a los transcritos regulando el *splicing* sigue siendo objeto de estudio desde hace muchos años. Varios estudios han demostrado que la actividad es finamente regulada ya que pequeñas mutaciones en las regiones más conservadas son suficientes para producir cambios significativos en la actividad reguladora de la proteína. Gracias a este enfoque se ha podido determinar que ZnF1–2 controla la regulación del *splicing* mediante el reconocimiento de los motivos del RNA YGCY, mientras que ZnF3–4 actúa como un dominio de unión al RNA general (Hale *et al.* 2018).

También ha sido establecido que otras regiones de la proteína contribuyen a su actividad, entre ellas las secuencias espaciadoras entre un dedo de Zinc y el siguiente, complicando aún más las posibles variables (Grammatikakis *et al.* 2011).

Razonando sobre el posible mecanismo de acción de los péptidos y estudiando la secuencia de aminoácidos del sitio funcional de las proteínas MBNL, observamos que existe una similitud entre los aminoácidos que forman nuestros hexapéptidos y aquellos que participan activamente en la interacción con los RNA diana (Figura D-3, aminoácidos evidenciados con colores).

En concreto, las versiones directa y reversa de Abp1 y su derivado Abp1-e6k comparten respectivamente 3 y 4 aminoácidos con la porción final del ZnF1 de humano y de *Drosophila*. Verosímilmente el motivo de la mejora de actividad observada en el derivado Abp1-e6k podría deberse al aminoácido de más que comparte con la secuencia de la proteína (Figura D-3, panel a), y que podría incrementar su afinidad para las potenciales dianas moleculares.

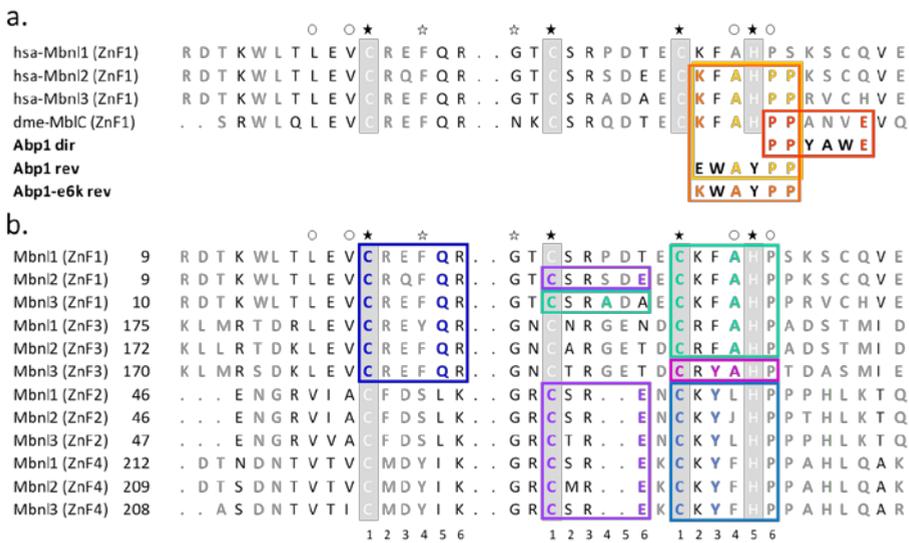


Figura D- 3. Comparación de los ZnF de MBNL y los péptidos.
a. Alineamiento de las secuencias del ZnF1 de Mbn1, 2, y 3 de humano (hsa) y de MblC de *Drosophila* (dme); se evidencian en los paneles coloreados las coincidencias con la secuencia de Abp1 directo y reverso (rojo y naranja) y el derivado Abp1-e6k (amarillo). **b.** Alineamiento múltiple de motivos de ZnF1-2-3-4 de las proteínas humanas. Los tres residuos de Cys y uno de His involucrados en la coordinación de átomo de zinc están marcados por estrellas negras. Otros residuos fuertemente conservados en los dedos de zinc tipo CCCH están marcados por estrellas blancas. Los residuos involucrados en interacciones hidrófobas dentro de los dominios ZnF están marcados con círculos blancos; se evidencian en los paneles coloreados las coincidencias con la secuencia los péptidos con Cis en X₁ (Figura adaptada de He *et al.*, 2008).

Discusión

Los péptidos con Cys en X_1 , por otro lado, comparten dos o tres aminoácidos (según el caso) a lo largo de toda la región CCCH de los cuatro ZnF de MBNL1-3. Se trata en su mayoría de aminoácidos altamente conservados, que a veces pueden ser específicos de un dedo de ZnF más que de otro o de uno solo de los homólogos de MBNL (Figura D-3, panel b). Las coincidencias indicadas con el marco azul marino y verde claro en el panel b de la Figura D-3, apoyan además las conclusiones alcanzadas tanto en el estudio computacional como en el análisis presentado en el párrafo 2.1. De hecho, en ambos casos se indicaba que la presencia de residuos de alanina (en X_4) y glutamina (en X_5) es preferible con respecto a la presencia de residuos de treonina y triptófano, respectivamente.

Como anteriormente mencionado MBNL presenta elevada afinidad para el motivo YCGY que, además de estar presente en las repeticiones tóxicas, caracteriza las secuencias de sus RNA diana. Así mismo los péptidos podrían tener afinidad por las dianas naturales de MBNL además de por las expansiones CUGs e, interactuando con ellas podrían influenciar el procesado alternativo de los mRNAs.

Un ejemplo de mecanismo parecido es el estudio presentado por Warf y colaboradores. En este trabajo se demuestra que MBNL1 controla el *splicing* del exón 5 en el pre-mRNA de troponina T cardíaca (cTNT), compitiendo directamente con el factor de *splicing* esencial U2AF65 para la unión en el extremo 3' del intrón 4. Cuando se impide que U2AF65 se una al pre-mRNA, la ribonucleoproteína (que es parte del espliceosoma) ya no se puede reclutar, provocando la exclusión del exón siguiente (Figura D-4).

Se ha demostrado, además, que MBNL1 y U2AF65 parecen competir uniéndose a estructuras del RNA mutuamente excluyentes. En concreto MBNL1 se une a una porción del intrón con estructura de horquilla, mientras que U2AF65 se une a la misma región con una estructura de cadena sencilla. Las mutaciones que estabilizan la horquilla disminuyen la afinidad de unión de U2AF65 y también reprimen la inclusión del exón 5, independientemente de MBNL1 (Warf *et al.* 2009).

Así mismo, la unión de U2AF65 podría bloquearse si la interacción de los péptidos con el RNA provocase la estabilización de una conformación del mRNA no conforme con la unión del factor de splicing.

Es posible que las pequeñas diferencias de secuencias entre los péptidos produzcan variaciones en la afinidad por las múltiples secuencias diana, siendo por lo tanto este mecanismo la raíz de la diversidad de los efectos observados en la célula.

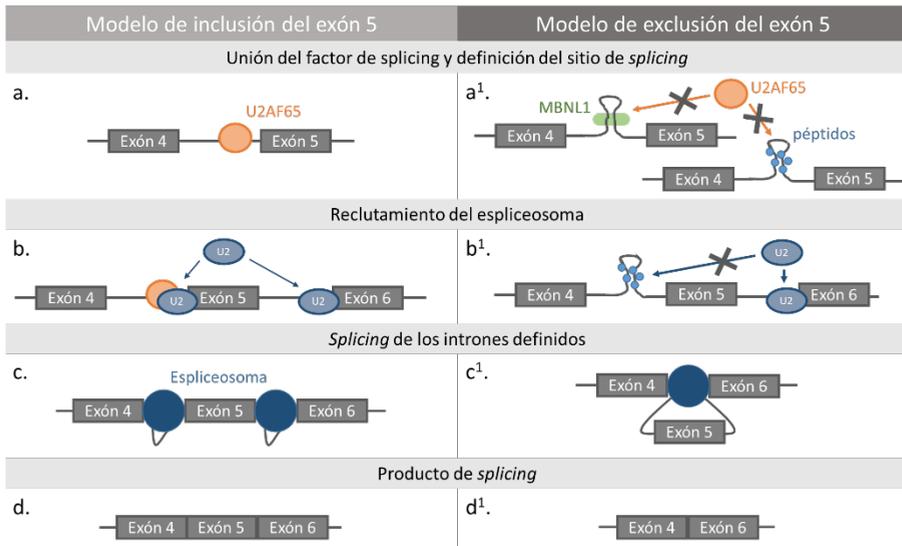


Figura D- 4. Hipótesis de Mecanismo de Acción.

a. El factor de transcripción U2AF65 se une al intrón con conformación de cadena sencilla; **a¹.** la unión de MBNL1 (o de los péptidos) provoca la estabilización de una horquilla en el intrón bloqueando la unión de U2AF65. **b.** La unión de U2AF65 al intrón recluta U2 a nivel del intrón 4 y 5; **b¹.** sin la unión de U2AF65 en el intrón, U2 solo se une al intrón 5. **c.** Los intrones 4 y 5 son procesados separadamente; **c¹.** el intrón 4, el exón 5 y el intrón 5 son procesados juntos. **d.** y **d¹.** Representan los dos posibles productos de *splicing*.

Repetir los ensayos de unión (FID y DSF) sustituyendo la sonda (CUG)_n con sondas representativas de alguna diana natural debería ser, por lo tanto, uno de los siguientes pasos para seguir con el estudio del mecanismo de acción de estos péptidos (Cywoniuk *et al.* 2017)

Discusión

3. Evaluación y calificación de los cuatro péptidos seleccionados según su actividad en los modelos de la enfermedad.

Para proceder a la planificación de los pasos futuros de este estudio, se procedió a una evaluación general de los datos experimentales obtenidos para los cuatro péptidos seleccionados. Para este propósito, se asignó una puntuación (de 1 a 4, donde 1 es el peor resultado y 4 el mejor) al resultado logrado por cada péptido en cada experimento, lo que genera una calificación parcial de las moléculas. Los valores así obtenidos se han insertado en una gráfica “araña”, ya que esto permite una representación altamente visual de la situación general (Figura D-4).

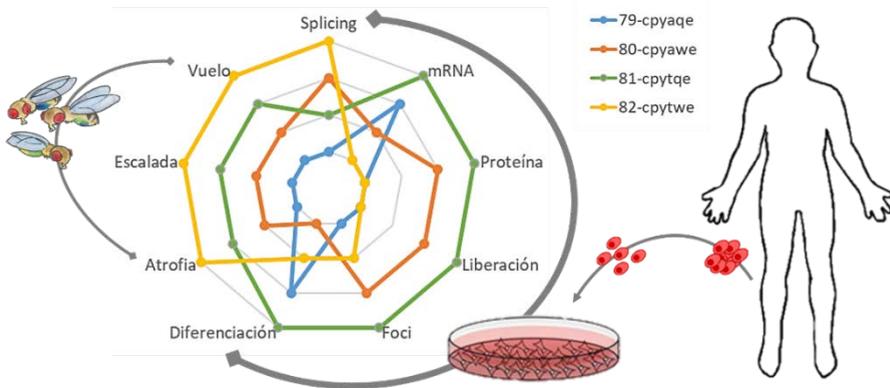


Figura D-5. Evaluación general de la actividad anti-DM1 de los cuatro péptidos seleccionados.

En la gráfica araña se resume el conjunto de datos obtenidos durante la caracterización de los péptidos 79-82. A cada efecto provocado por cada péptido se ha asignado una puntuación de 1 a 4, siendo 1 el resultado peor (zona central de la gráfica) y 4 el mejor (zona exterior de la gráfica). En la figura se indican los ensayos que se han llevado a cabo en el modelo muscular de la enfermedad en *Drosophila* (izquierda) y los que se han llevado a cabo utilizando una línea celular de paciente DM1.

Siendo los mejores resultados los que se representan en el área externa de la telaraña y los peores los que se sitúan en su interior, se puede fácilmente apreciar que los péptidos 81 y 82 son los que poseen la actividad anti-DM1 más eficaz. Además, se puede observar como el péptido 81 presenta el mejor potencial

terapéutico en células de paciente DM1 mientras que el péptido 82 es más efectivo en el modelo de la enfermedad en *Drosophila*. Esta última consideración se puede añadir a los datos que soportan la hipótesis de la existencia de diferentes mecanismos de acción según la secuencia de los péptidos y el modelo en el que se evalúa su actividad.

4. Potencial traslacional de los hexapéptidos

Desde su inicio, el atractivo de este estudio se ha atribuido a las muchas características de los péptidos que hacen de ellos candidatos adecuados como posibles fármacos. A esto se suma el hecho de que el potencial terapéutico de Abp1, anteriormente demostrado, ya era un buen punto de partida para el desarrollo de una nueva molécula con actividad biológica optimizada y posiblemente una nueva terapia anti-DM1.

Tal como se había previsto, el carácter multidisciplinar de este proyecto ha permitido obtener una gran cantidad de información nueva sobre los derivados de Abp1, sobre péptidos con secuencias relacionadas y sobre el mecanismo de acción de todas las moléculas estudiadas.

Durante el estudio, nos hemos enfrentado en varias ocasiones a datos completamente inesperados, como la actividad de los 15 péptidos en el modelo celular humano, la subdivisión de los mismos en subgrupos con diferentes efectos anti-DM1 y, finalmente, la diferencia entre el mecanismo de acción de Abp1 y el de los otros péptidos.

Para continuar el proceso de mejora de la molécula inicial (HIT) y alcanzar el objetivo de identificar un nuevo compuesto candidato a fármaco (LEAD), hay más estrategias posibles que se pueden emprender en paralelo.

Por un lado, de hecho, se podría proceder al estudio de una segunda generación de derivados de Abp1, sintetizados haciendo uso de los nuevos datos obtenidos para

Discusión

diseñar modificaciones más específicas y, por lo tanto, más eficientes, como se propone en los párrafos del capítulo 2 de la discusión.

Por otro lado, se podría profundizar el estudio de los otros péptidos, considerándolos como un nuevo punto de partida. De hecho, la presencia de actividades en la célula representa por sí mismo un gran paso adelante. Llevar a cabo los experimentos de unión de hexapéptidos con los que representan los objetivos naturales de MBNL1, podría llevar a la identificación de un mecanismo de acción absolutamente innovador y, sin duda, brindará información importante sobre los procesos que subyacen a su funcionamiento.

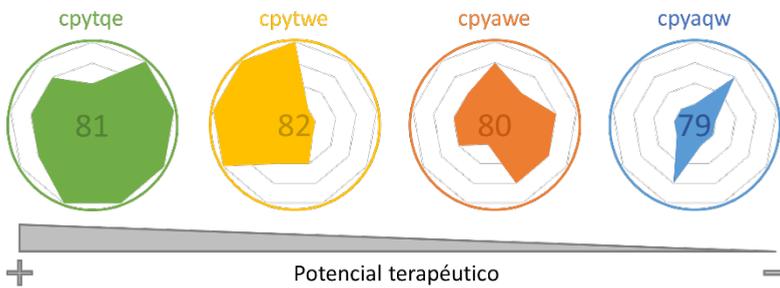


Figura D-6. Clasificación de los péptidos según su potencial terapéutico.

Los datos relativos a cada uno de los péptidos, representados en la figura D-4 se han separado en cuatro gráficas araña; estas han sido ordenadas en orden de potencial terapéutico decreciente (de izquierda a derecha).

Finalmente, entre los cuatro péptidos seleccionados, el 81 es el más prometedor, ya que posee la mayor eficacia en célula humana y efectos positivos significativos también en *Drosophila*. Esto nos permite definirlo como el péptido más completo y por lo tanto el mejor candidato para un perfeccionamiento adicional (Figura D-5). Por estas razones, a partir de ahora, nos referiremos al péptido 81 con el nombre de Abp2.

El uso de Abp2 como base para realizar modificaciones similares a las realizadas en Abp1 es otra estrategia extremadamente interesante. Por ejemplo, realizar en su secuencia la modificación “e6r” aumentaría la coincidencia de aminoácidos con

la región de la primera cisteína de los ZnF1 y 3 (Figura D-3, panel b, rectángulo azul marino), mejorando verosímilmente su afinidad por los RNA diana. Así mismo, cualquiera de las otras modificaciones beneficiosas para Abp1 conllevaría un beneficio mayor si se aplicara a Abp2 que ya presenta actividad en la célula.

Todo lo anteriormente descritos indica posibles caminos que preceden el estudio preliminar en el modelo de la enfermedad en ratón, tal y como se hizo por Abp1. Posteriormente, si se consiguieran los resultados esperados, considerando la ausencia total de toxicidad y de posibles efectos secundarios debidos a la administración de los péptidos, sería posible aspirar a las etapas subsiguientes en el proceso de desarrollo de un fármaco, acercándose cada vez más al descubrimiento de un tratamiento curativo para la distrofia miotónica.

CONCLUSIONES

Conclusiones

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

1. Las modificaciones diseñadas sobre la secuencia de Abp1 han llevado a la síntesis de 5 péptidos derivados con actividad anti-DM1 mejorada, como demuestra el potenciamiento del rescate del fenotipo atrófico en el modelo de la enfermedad en *Drosophila*.
2. La evaluación del conjunto de datos obtenidos tratando células de pacientes DM1 con los péptidos derivados de Abp1, permite el planteamiento de las siguientes modificaciones, potencialmente necesarias para el perfeccionamiento de la actividad de los compuestos: la síntesis de Abp1 en su versión de peptámero; la incorporación de un espaciador de glicinas entre el péptido original y el fragmento TAT; la conjugación de Abp1 con un fragmento peptídico de poli-arginina.
3. En un grupo de hexapéptidos, con secuencia parecida a Abp1 péptidos (79-94), se ha evidenciado la presencia de actividad anti-DM1 en células de pacientes. El tratamiento de las células con los péptidos rescata el *splicing* alternativo de varios transcritos típicamente alterados en la enfermedad e influencia los niveles de expresión de las proteínas MBNL1 y MBNL2 responsables de su regulación.
4. La evaluación de los diversos efectos producidos por el tratamiento de células de pacientes DM1 con los hexapéptidos ha evidenciado la presencia de subgrupos de compuestos: los péptidos 79, 80, 81 y 82, que presentan una cisteína en primera posición, produce rescates en *splicing* y sube los niveles de transcrito de MBNL1; los péptidos 83, 84 y 85, que presentan una cisteína y

Conclusiones

glutamina en primera y segunda posición, rescatan eventos de splicing reduciendo los niveles de transcrito de MBNL2.

5. Los péptidos seleccionados 79-82 poseen una significativa actividad anti-DM1 en el modelo celular de la enfermedad, la cual está ausente en Abp1. Esta diferencia de actividad se refleja en un distinto modo de interacción entre los compuestos y las expansiones CUGs. En concreto el péptido Abp1 estabiliza las repeticiones en su conformación de cadena sencilla mientras que los péptidos seleccionados 79-82 interaccionan con el RNA sin provocar su linearización.
6. Para los péptidos de la selección (79-82) se proponen diferentes modelos de interacción con el RNA tóxico. El estudio computacional indica que los péptidos 79 y 80 pueden interaccionar con varios nucleótidos de las dos hebras de la horquilla; en cambio los péptidos 81 y 82 reconocen nucleótidos de una cadena sencilla.
7. Comparando las secuencias aminoacídicas de los péptidos con las de las regiones CCCH de MBNL, se han detectado coincidencias en posiciones altamente conservadas de la proteína, los cuales son fundamentales para la interacción tanto con el RNA tóxico como con sus dianas naturales. Las relaciones entre la estructura y la actividad de los péptidos seleccionados pueden orientar los futuros programas de mejora de las moléculas.
8. La caracterización de la actividad biológica de los péptidos 79-82 ha evidenciado efectos anti-DM1 significativos tanto en el modelo celular como en el modelo en *Drosophila* de la enfermedad. Sin embargo, el tratamiento de células de pacientes con el hexapéptido 81 produce los rescates mejores en la mayoría de los fenotipos DM1 estudiados, sugiriendo que su actividad biológica pueda ser

terapéuticamente útil. Por lo tanto, el péptido 81, que se indicará a partir de ahora con el nombre de Abp2, se propone como candidato a compuesto *LEAD*, siendo su estructura el mejor punto de partida para el desarrollo de un tratamiento que pueda ser testado clínica mente.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material

1.1. Material biológico

1.1.1. Línea celular

Hemos trabajado con dos líneas celulares distintas de fibroblastos humanos. Una de las dos líneas está constituida por células derivadas de un paciente de DM1 (~2600 CTG) y la otra por células de una persona libre de la enfermedad, ambas proporcionadas por el Dr. Denis Furling (*Institute of Myology*, París, Francia). El laboratorio cuenta con el permiso necesario del Comité de Ética de Investigación Clínica de Incliva (CEIC) para la utilización de muestras humanas. Este modelo celular consiste en células inmortalizadas que muestran defectos moleculares característicos de DM1, tales como agregados de RNA en el núcleo o defectos en el *splicing* alternativo y, por tanto, son útiles para probar compuestos terapéuticos (Arandel *et al.*, 2017). Estos fibroblastos aislados de una biopsia de piel se inmortalizaron mediante la reexpresión de TERT y de CDK4. Además, para conseguir líneas de células musculares se utiliza el sistema de inducción Tet-on para inducir la expresión del factor de regulación miogénica (MYOD1) con doxiciclina, mediante la activación del programa miogénico, y así tener mioblastos y, de ahí miotubos. Por lo tanto, se trata de células modificadas genéticamente para poder ser transdiferenciado, cuando necesario, simplemente añadiendo en el medio de diferenciación doxiciclina (detallado en la Introducción capítulo 5.4.)

1.1.2. Cepas de *Drosophila melanogaster*

Las siguientes líneas de mosca, resumidas en la Tabla MM-1, fueron utilizadas a lo largo de este trabajo.

Tabla MM-1. Cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas en este trabajo

	Genotipo	Origen
Cepa de referencia	<i>w¹¹¹⁸</i>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center, Universidad de Indiana
Línea Gal-4	<i>Mhc-Gal4 (cr.2)</i>	Dr. G. Davis (University of California San Francisco, California, EEUU) (Control)
Línea recombinante	<i>Mhc-Gal4 UAS-CTG₄₈₀/TM6b</i>	(Garcia-Lopez 2011) (DM1)

Material y Métodos

Todos los ensayos se llevaron a cabo a 25°C en medio nutritivo estándar, preparado según la siguiente receta:

Cantidades para 80 tubos/40 botellas:

H ₂ O	1L
Agar	10.5 g
Levadura	60 g
Harina de soja	10 g
Harina de maíz	60 g
Azúcar	50 g
Extracto de malta	80 g

Antifúngico:

Ác. Propiónico	5 mL
Etanol	10 mL
Nipagín	3 g

Preparación:

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

1.2. Enzimas

En la Tabla MM-2 se detallan los enzimas utilizados a lo largo del presente trabajo, así como su procedencia.

Tabla MM-2. Enzimas utilizados

Enzimas	Casa comercial
Go Taq	Promega
DNasal	Invitrogen
RNasaA	Roche
TaqMan	Thermo Fisher
SuperScript II Transcriptasa Reversa	Invitrogen

1.3. Kits

En la tabla MM-3 se nombran los kits comerciales usados en este trabajo.

Tabla MM-3. Kit comerciales utilizados

Kit	Casa comercial
BCA Protein Assay	Pierce
ECL Western Blotting Substrate	Pierce
CellTiter 96®	Promega
VECTASTAIN ABC	Vector

1.4. Oligonucleótidos

Todos los cebadores utilizados fueron sintetizados por la compañía Sigma Aldrich.

1.4.1. Cebadores para PCR

En la Tabla MM-4 se muestran los cebadores utilizados en PCR convencional.

Tabla MM-4. Cebadores utilizados en PCR convencional para amplificación de cDNA				
Cebador	Secuencia (5' -> 3')	Exón	Temperatura (°C)	n° de Ciclos
GAPDH D	CATCTCCAGGAGCGAGATC	5	57	29
GAPDH R	GTTACACCCATGACGAACAT			
BIN1 D	CTCAACCAGAACCTCAATGATGTG	11	63	30
BIN1 R	CTGAGATGGGGACTTGGGGAG			
cTNT D	ATAGAAGAGGTGGTGGAAAGAGTAC	5	55	27
cTNT R	GTCTCAGCCTCTGCTTCAGCATCC			
DMD D	GTGAGGAAGATCTTCTCAGTCC	79	59	30
DMD R	CTCCATCGCTCGCCAAATC			
ADD D	GGACGAGGCTAGAGAACAGAAAGAAAAGA	15	60	30
ADD R	TTGGGAAGCCGAGTGCTTCTGAA			
SPTAN-1 D	GATTGGTGGAAAGTGGAAAGTGAACGAT	23	60	30
SPTAN-1 R	TGATCCATTGCTGTAGTTCATTGCT			
CAPZB D	GGAGAAGGATGAAACTGTGAGTG	8	60	30
CAPZB R	CAGAGGTTTAGCATTGCTGCT			
DLG1 D	AGCCCGATTAAAAAACAAGTGA	19	55	30
DLG1 R	CGTATTCTTCTCGACCACGGT			

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

En la Tabla MM-5 se muestran los cebadores utilizados para cuantificar los niveles de mRNA mediante qPCR usando la enzima Taqman;

Tabla MM-5. Cebadores utilizados en qPCR		
Cebador	Secuencia (5' -> 3')	Concentración
GAPDH -MAX	/5MAXN/CGCTGGTCCACAGGGCTGCT/3BHQ_1/	5 μM
GAPDH D	CAACGGATTTGGTCGTATTGG	3 μM
GAPDH R	TGATGGCAACAATATCCACTTTACC	3 μM
MBNL1 -FAM	/56-FAM/ACCGATTGCACCACCAAACCTCCATTGCA/3IAbRQSp/	5 μM
MBNL1 D	CTGCATCTGTCTATGCCAAACT	6 μM
MBNL1 R	GGGAATCTCCTCACAGCTGAAT	6 μM
MBNL2 -FAM	/56-FAM/ACCGGTCACTGTCCCGGGCTCAACT/3IAbRQSp/	5 μM
MBNL2 D	CCACCAGCCTGTTATTGTT	6 μM
MBNL2 R	CAGTCTGAGAAGTTTCTGAGTTG	6 μM

Material y Métodos

1.5. Anticuerpos

En la Tabla MM-6 se presentan todos los anticuerpos primarios y secundarios, así como otros reactivos utilizados para realizar tinciones. También se especifica la procedencia de cada uno, los tiempos de incubación y la concentración utilizada según la aplicación.

Tabla MM-6. Anticuerpos y colorantes usados en este trabajo						
Anticuerpo	Animal hospedador	Concentración	Tiempo incubación	Temperatura (°C)	Uso	Casa comercial
Anticuerpos primarios						
anti-MBNL1	ratón	1:1000	TN	4°C	WB	Abcam (ab77017)
anti-MBNL1	ratón	1:200	TN	4°C	IF	Sigma-Aldrich (clon HL-1822)
anti-β-actina	ratón	1:5000	1 hora	TA	WB	Sigma-Aldrich (clon AC-15)
anti-Desmina	conejo	1:200	2 horas	TA	IF	Abcam (ab15200)
anti-LC3	conejo	1:200	TN	4°C	IF	Sigma-Aldrich (clon 12K5)
Anticuerpos secundarios						
anti-ratón-IgG-POD	cabra	1:5000	1 hora	TA	WB	Sigma-Aldrich
anti-ratón-biotin	cabra	1:200	1 hora	TA	IF	Sigma-Aldrich
anti-conejo-biotin	cabra	1:200	1 hora	TA	IF	Sigma-Aldrich
anti-ratón-FITC	cabra	1:100	1 hora	TA	IF	Sigma-Aldrich
anti-conejo-FITC	cabra	1:100	1 hora	TA	IF	Sigma-Aldrich
Otros colorantes						
DAPI		2 µg/ml	20 min	TA	IF	Vector
Hoechst 33342		5 µg/ml	30 min	TA	IF	Sigma
Estreptavidina-FITC		1:200	2 hora	TA	IF	Vector
Estreptavidina-TR		1:1000	45 min	TA	IF	Vector
LysoTracker		1:10000	30 min	37°C	-	Invitrogen

1.6. Programas informáticos

Los programas nombrados en la Tabla MM-7 se han utilizado tanto para el procesado y el análisis de imágenes como para la generación de gráficas, tablas y para el análisis estadístico de los datos.

Tabla MM-7. Programas informaticos		
Programa	Aplicación	Referencia
<i>Primer Express Software v 3.0</i>	Diseño de cebadores para qPCR	Applied Biosystems
<i>ImageJ v.1.43u</i>	Análisis de imagen	(Abramoff et al. 2004)
<i>Photoshop</i>	Procesado de imágenes para análisis	Adobe
<i>INCell Investigator analysis software v 1.3</i>	Análisis de imagen INCell	GE Healthcare
<i>Zen (Blue Edition)</i>	Análisis de imagen Confocal	Carl Zeiss Microscopy GmbH
<i>Excel 2016</i>	Elaboración y almacenaje de datos	Microsoft
<i>Graphpad prism 5</i>	Representación gráfica y análisis estadístico	GraphPad Software

1.7. Aparataje

Los siguientes aparatos se utilizaron durante este trabajo.

Tabla MM-8. Aparatos utilizados para la realización de los experimentos	
Aparato	Modelo
Centrifugas	5430, Eppendorf 5804 R, Eppendorf 5413 R, Eppendorf
Contador de células	Countess, Invitrogen
Criostato	CM 1510S, Leica
Espectrofotómetro	NanoDrop 2000, Thermo Scientific
Lector de placas	Infinite 200 Pro, TECAN
Lupa	MZ APO, Leica
Microscopios	DM2500, Leica DM4000 B LED, Leica Confocal LSM 900, ZEISS GE In Cell Analyzer 2000
Nutator	Clay Adams® Brand
Sistema para digitalización de imágenes	ImageQuant LAS 4000, HealthCare
Sistema purificación de agua	Milli-Q, Millipore
Sistema transferencia de proteínas	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell
Termocicladores	GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems Step-One Real Time PCR, Applied Biosystems
Ultramicrotomo	UltracutE, Reichert & Jung

1.8. Recursos en red

En la Tabla MM-9 se detallan las bases de datos consultadas y las aplicaciones en red utilizadas durante este trabajo.

Tabla MM-9. 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>	flybase.org	(Tweedie et al. 2009)
<i>GenBank</i>	Secuencias nucleotídicas y de proteínas	www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank	(Benson et al. 2011)
<i>Ensembl</i>	Genética, genómica y biología molecular de diferentes organismos	www.ensembl.org	(Flicek et al. 2011)
<i>PubMed</i>	Consulta bibliográfica	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	(Lu 2011)

Material y Métodos

2. Métodos

2.1. Métodos moleculares

2.1.1. Extracción de RNA de células humanas

Para la extracción de RNA se siguió el protocolo de aislamiento de RNA, específico para células en monocapa, con el reactivo Trizol (Thermo Fisher). Antes de empezar se procede a retirar el medio de cultivo y lavar rápidamente los pocillos con PBS. La lisis celular se obtiene agregando un volumen adecuado de Trizol directamente al pocillo (en nuestro caso 0.5 ml) y utilizando un raspador para recoger todo el material. Las muestras se transfieren en viales donde se añaden 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol. Se remueve vigorosamente la mezcla durante 15 segundos, se deja reposar 2-3 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga durante 15 minutos a 12.000 x g a 4°C. Tras este pasaje la mezcla se separa en tres capas: una parte inferior roja, una interfase y una fase acuosa e incolora superficial donde se encuentra el RNA. La fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo prestando atención a no tocar las otras dos fases para no contaminar la muestra. Se añaden 0.5 ml de isopropanol por cada ml de trizol, para provocar la precipitación del RNA. Las muestras se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos y seguidamente se centrifuga a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El RNA se encuentra como un pellet blanquecino que tiene que ser separado del sobrenadante y lavado dos veces con etanol al 75%, centrifugando a 7.500 x g durante 5 minutos a 4°C. Se deja que las muestras se sequen al aire y a continuación se pueden disolver con agua milliQ y se cuantifica de RNA presente en cada vial con el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher).

2.1.2. Tratamiento con DNasa y Retrotranscripción (RT)

El primer paso en la retrotranscripción es el tratamiento con DNasa I para eliminar restos de DNA genómico que pudiera estar contaminando las extracciones. Para ello, se partió de 1 µg de RNA total al que se le añadió 1 µl de DNasa I (Invitrogen), 1 µl de tampón 10X y agua hasta un volumen total de 10 µl. La reacción se incubó 15 min a temperatura ambiente. La enzima se inactivó por adición de 1 µl de EDTA 25 mM seguido de un paso de 10 min a 65°C. A continuación, para la síntesis de cDNA se añadió en el tubo de la digestión 1 µl dNTP 10 mM (Biotools) y 1 µl de hexámeros (Roche). La mezcla se incubó 5 min a 65°C para desnaturalizar el RNA. Los tubos se introdujeron inmediatamente en hielo y se añadieron 8

μl del mix formado por 1 μl retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen), 4 μl del tampón 5X, 2 μl DTT 0,1 M y 1 μl de inhibidor de RNasa (Invitrogen). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador con un paso inicial de 25°C, 3 min seguido de 1 h a 42°C y 15 min a 70°C.

2.1.2.1. PCR convencional

Las reacciones de PCR se realizaron con el enzima goTaq siguiendo las recomendaciones del fabricante. En la Tabla MM-4 se enumeran los diferentes cebadores utilizados para amplificar cDNA por PCR estándar y las condiciones de cada pareja de cebadores. Los productos de PCR se separaron por electroforesis utilizando geles de agarosa al 2-3%.

2.1.2.2. PCR cuantitativa

Para este tipo de ensayo se utilizó como molde el cDNA obtenido de la retrotranscripción. Los cebadores y las sondas utilizadas en este experimento están detalladas en la tabla MM5. Para la cuantificación de niveles de transcrito de MBNL1 y MBNL2 se utilizaron los mix para sondas Taqman de Solis BioDyne siguiendo las instrucciones del fabricante. Como molde, se partió de 4 ng de cDNA. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Step-One Real Time PCR (Applied Biosystems). En todos los casos se realizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas por muestra biológica. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto al gen de referencia utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.1.3. Extracción de proteína de células humanas

Para la extracción de la proteína total de las células tratadas con los diferentes péptidos, se colocaron las placas en hielo y se sustituyó el medio de cultivo por 500 μl de tampón de lisis RIPA (NaCl 150 mM, IGEPAL al 1%, desoxicolato de sodio al 0.5%, SDS al 0.1%, Tris-HCl 50 mM, pH de 8.0) suplementado con los inhibidores de proteasas y de fosfatasa (*Protease Inhibitor* y phosStop; Roche). Se raspó el fondo de la placa con un raspador de células para despegar las células y se recogió el sobrenadante en un tubo vacío y se procedió al sonicado de la muestra. Tras haber sonicado las células para facilitar la ruptura de las membranas, se centrifugó a 12000 g durante 5 min a 4°C para eliminar los restos celulares. Se recogió el sobrenadante y se almacenó a -20°C.

Material y Métodos

2.1.3.1. Cuantificación de proteína

La cantidad de proteína de las muestras se cuantificó con el kit *BCA Protein Assay* (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.1.3.2. Detección de proteínas por *Western blot*

Electroforesis

En primer lugar, se prepararon las muestras calculando el volumen correspondiente a 35 µg de proteína de células tratadas con cada uno de los péptidos. A cada vial se le añadieron 3.7 µl de tampón de carga para proteínas 8X y agua hasta un volumen final de 30 µl. Los tubos se taparon con *Parafilm*, se hirvieron durante 5 min, y se colocaron inmediatamente en hielo. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida discontinuos SDS-PAGE en el sistema *Mini-protean Electrophoresis System* (Bio-Rad) en tampón de electroforesis (27 mM Tris, 200 mM glicina, 0.1% SDS). El amperaje utilizado fue constante y de 12 mA/gel. Como referencia se cargó el patrón de peso molecular *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (Bio-Rad).

El gel separador (*resolving gel*) se preparó siguiendo las indicaciones del proveedor con los siguientes componentes y proporciones:

- 0.37 M Tris-Cl pH 8,8
- 32.5% Acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)
- 0.1% SDS
- 0.05% APS
- 0.05% TEMED

Las proporciones utilizadas para el gel empaquetador (*stacking gel*) fueron:

- 0.08 M Tris-Cl pH 6,8
- 12.4% Acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)
- 0.1% SDS
- 0.05% APS
- 0.01% TEMED

Electrotransferencia

Tras la electroforesis, se procedió a la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 micras (GE Healthcare) utilizando un sistema de transferencia

semiseco (Bio Rad). Este proceso se llevó a cabo con un amperaje constante de 45 mA durante 1 h siguiendo las indicaciones del fabricante.

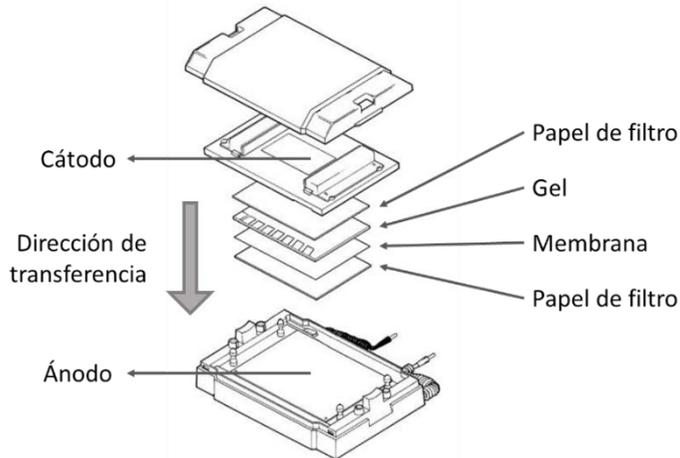


Figura MM- 1. Sistema de transferencia en semi seco.

La celda de transferencia semiseca Trans-Blot SD permite una transferencia rápida, eficiente y económica. Las transferencias se pueden completar en 15-60 min con un gasto mínimo de buffer.

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 leche desnatada al 5 % en PBST. Seguidamente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-MBNL1 durante toda la noche a 4°C a una concentración de 1:1000. Tras la incubación con el anticuerpo primario lavamos las membranas 3 veces con PBST durante 5 min. Para detectar por quimioluminiscencia utilizamos el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa del rábano (HRP) a una concentración de 1:5000. Incubamos el anticuerpo secundario 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 se usó el sustrato *ECL Western blotting substrate* (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las imágenes se obtienen con el ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) y la cuantificación se lleva a cabo mediante ImageJ Software (NIH).

Material y Métodos

2.2. Manejo de *Drosophila melanogaster*

Las moscas se cultivaron en medio estándar a 25°C, y se cambiaron a recipientes con medio fresco cada 10-15 días. Para establecer cruces genéticos, se seleccionaron hembras vírgenes (6-10 individuos/cruce), de la línea *w¹¹¹⁸* y se colocaron junto con machos *Mhc-Gal4* o *Mhc-Gal4 UAS-CTG₄₈₀/TM6b* en tubos con comida fresca a 25°C. A los 2 días, se pasaron los progenitores a nuevos tubos con la finalidad de amplificar el cruce establecido. A los 10-11 días, se recogieron los adultos.

2.2.1. Alimentación con los compuestos a probar

Se prepararon diluciones de cada compuesto utilizando DMSO 10%. Se pipeteó el mismo volumen de cada dilución en cada tubo y rápidamente se añadió comida recién hecha y todavía líquida. Enseguida se agitaron vigorosamente los tubos con un vórtex durante 10 segundos. El tiempo de agitación necesario para obtener una mezcla uniforme se determinó con ayuda de un colorante.

En el caso de suministro del compuesto en estadio larvario L1, los cruces se pusieron directamente en tubos con comida mezclada con los péptidos, para que así las larvas ya injirieran la comida desde el nacimiento.

Si la administración de tratamiento se empezaba en adulto, los cruces se pusieron en comida estándar y los individuos de la F1 se recogieron el día 1 después de la eclosión y se pasaron a tubos con comida mezclada con compuestos.

2.2.2. Ensayos funcionales

Para la ejecución de los ensayos funcionales se utilizaron moscas adultas de 7 días alimentadas con los hexapéptidos como descrito anteriormente.

2.2.2.1. Ensayo de escalada

El ensayo de escalada de las moscas se basa en su característico geotropismo negativo que hace que se muevan siempre hacia arriba en un espacio limitado (Figura MM-2). Se recogieron 30 machos por cada tratamiento (incluyendo los controles negativos) y se repartieron en tres tubos. Cada tubo tiene un diámetro de 1 centímetro y una altura de 25 centímetros y se coloca en posición vertical. Tras haber esperado unos minutos para que las moscas se acostumbren al nuevo espacio, se empezó la grabación y se dieron ligeros y

repetidos golpes para que todas las moscas cayesen al fondo del tubo. Se grabó durante 30 segundos y los videos obtenidos se analizaron como se explica en el apartado 2.5.5. (Madabattula *et al.* 2015).

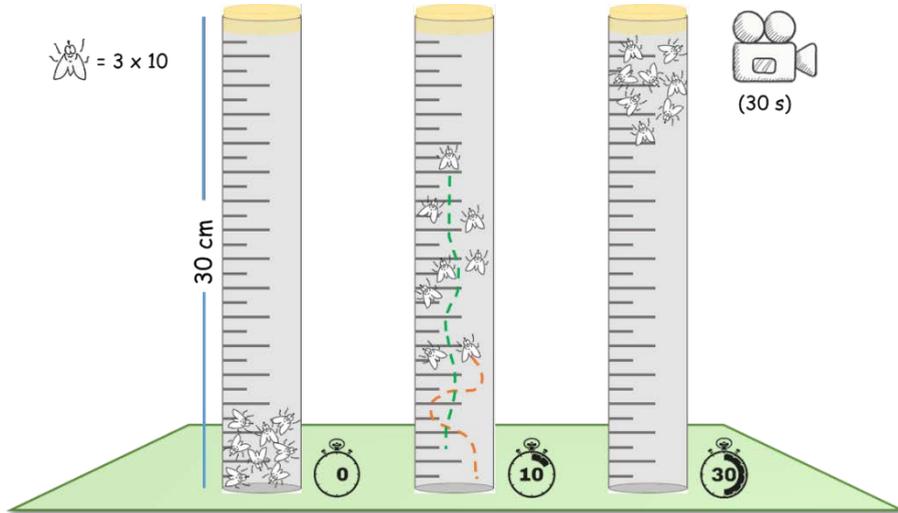


Figura MM- 2. Representación del ensayo de escalada.

Se considera T_0 de la grabación el momento en el que todas las moscas están en el fondo del tubo y empiezan a subir en su interior. Tras 30 segundos las moscas suelen estar en la parte superior del tubo y se interrumpe la grabación. Cada mosca sube cuando todas las moscas suben. El fermo imagen del T_{10} se utiliza para calcular la velocidad de escalada de las moscas que han recibido cada tratamiento.

2.2.2.2. Ensayo de vuelo

Para la evaluación de las capacidades de vuelo se necesita de un cilindro de plástico rígido, con un diámetro de 25 cm aproximadamente y 90 cm de alto. En su interior se coloca una lámina de tamaño suficiente para forrarlo, untada con pegamento de manera uniforme. En la base del cilindro se pone una lámina circular de plástico, con pegamento como anteriormente descrito y al otro extremo se posicionan un embudo y otro cilindro rígido con diámetro suficiente para acoger un tubo de moscas.

Se recogieron 100 machos por genotipo y se separaron en 4 tubos. Tras retirar el tapón del tubo, rápidamente se suelta el tubo en el primer cilindro dejándolo caer. Este chocará contra la parte interior del embudo y las moscas saldrán acabando en el cilindro de tamaño mayor. Aquellas que puedan volar irán a apoyarse en la parte superior de la lámina con

Material y Métodos

pegamento. Por otro lado, las que tengan dificultad en cumplir los movimientos necesarios para mover las alas, tardarán más en volar y se pegarán más abajo tras una breve caída. Por último las que no sean capaces de coordinar los movimientos alares caerán al suelo pegándose en la lámina inferior.

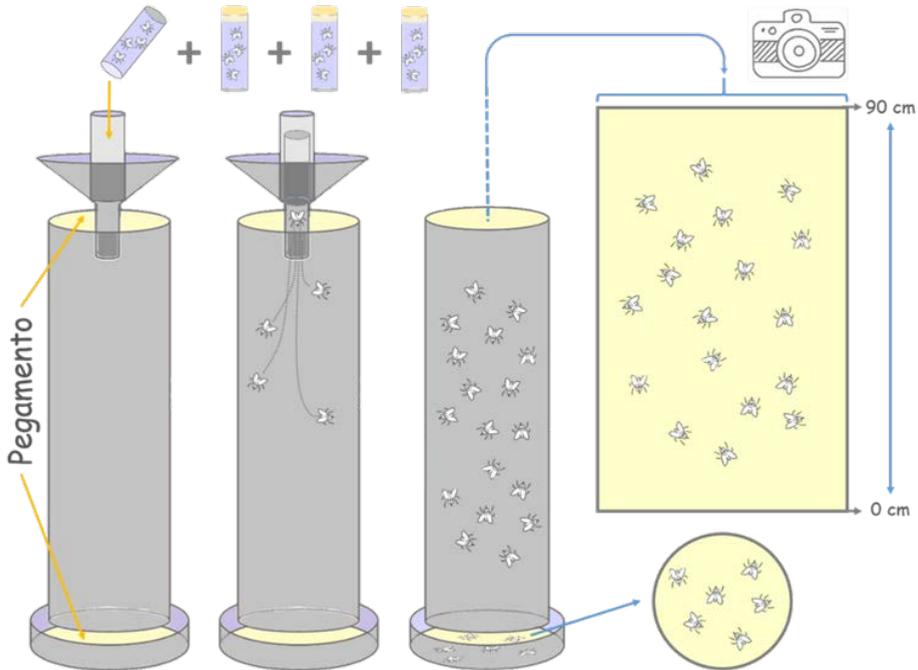


Figura MM- 3. Representación del ensayo de vuelo.

Cada tubo con 25 moscas se suelta con fuerza en el tubo de lanzamiento y a través del embudo entra en el cilindro cubierto de pegamento. las moscas que pueden volar se pegan en las paredes a una altura directamente proporcional a su capacidad de reaccionar después de la caída. Las que no pueden volar caen en el círculo colocado en el suelo y se quedan atrapadas en el pegamento. se adquiere una foto de la lámina para el cálculo de la altura de aterrizaje.

Una vez lanzados los 4 tubos se retirarán el cilindro pequeño y el embudo para poder extraer la lámina con el pegamento, apoyarla en una superficie plana y adquirir una foto que incluya todos los márgenes. Para mejor comprensión véase la Figura MM-3 (Babcock and Ganetzky 2014).

2.2.3. Análisis histológico de secciones semifinas de músculo

2.2.3.1. Protocolo de inclusión de las muestras en resina

Doce moscas hembras por genotipo se anestesiaron bajo la lupa y con ayuda de un bisturí se les eliminaron las patas, alas y cabeza y se les realizó un corte en la parte inferior del abdomen, para facilitar la penetración del fijador. Las moscas así preparadas se pasaron inmediatamente a hielo. Se colocaron 6 moscas en cada tubo anteriormente relleno con 200 μ l de la solución A formada a partes iguales por paraformaldehído 4%, glutaraldehído 8%, Na_2HPO_4 0.2 M y NaH_2PO_4 0.2 M, por un tiempo máximo de 30 minutos. A continuación, se añadieron (en campana de extracción de gases) 200 μ l de la solución B formada por el 50% de solución A y el 50% de OsO_4 (tetraóxido de osmio) y se incubaron por otros 30 minutos en hielo. Seguidamente, se retiró todo el líquido y se reemplazó por 200 μ l de la solución B y se dejó durante 1 o 2 horas en hielo. Se retiró el líquido y las muestras se deshidrataron mediante pases de 5 min en hielo de etanol al 30%, 50% y 70%. Los tres últimos se realizaron a temperatura ambiente con etanol al 90% y 100% (2X). Los siguientes pases se realizaron a temperatura ambiente con óxido de propileno (2 pases 10 min). Las muestras se dejaron toda la noche en una mezcla formada por partes iguales de óxido de propileno y resina epoxi (Sigma). Al día siguiente, la mezcla se reemplazó por resina epoxi donde se dejaron durante un mínimo de 4 h. A continuación, se rellenaron moldes con resina y se colocaron las moscas. La resina se dejó polimerizar parcialmente introduciendo los moldes 45 min en una estufa a 70°C, tiempo tras el cual se recolocaron las moscas y se orientaron en la dirección deseada. Luego se dejaron toda la noche en la estufa hasta su completa polimerización. Todo el protocolo se llevó a cabo con dos pares de guantes y en campana de extracción de gases debido a la gran toxicidad de los materiales utilizados. Al día siguiente se extrajeron los bloques de resina polimerizada de los moldes y se tallaron bajo la lupa con una cuchilla para orientar los tórax y para eliminar el material sobrante. Los cortes semifinos de 1.5 μ m se realizaron en un ultramicrotomo (Reichert & Jung) y se colocaron en portaobjetos gelatinizados. Las muestras se tiñeron con azul de toluidina ya que el contraste generado por el ósmio a veces no es suficiente. Para ello, sobre el portaobjetos con las muestras se colocan algunas gotas de azul de toluidina suficientes para cubrir el tejido. El portaobjetos se coloca sobre una placa a 60°C durante 2 min.

Material y Métodos

Seguidamente se realizan sucesivos lavados con agua destilada sobre la placa caliente para eliminar el excedente de azul de toluidina. Una vez secos, se montaron con DEPX y se cubrieron con un cubreobjetos. Las imágenes se tomaron en microscopio con un aumento de 100x en campo claro (Selma-Soriano *et al.* 2018).

2.3. Métodos celulares

2.3.1. 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. Tras la centrifugación resuspendimos las células en 10 mL de medio de congelación (medio completo y 10 % de DMSO). Seguidamente se prepararon alícuotas 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 alícuota 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 75 cm² y añadimos 12.5 mL de medio completo. Al día siguiente sustituimos el medio por medio completo para eliminar los restos de DMSO y las células inviables.

2.3.2. Condiciones de cultivos de fibroblastos

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

2.3.3. 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 ($n/mL = \bar{N} \times 5 \times 10^4$).

2.3.4. Siembra

Se sembraron en todos los casos y por triplicado: (1) células DM1 tratadas con los péptidos, (2) células DM1 con y sin DMSO y (3) células sanas con y sin DMSO. Para la extracción de RNA y proteína las células se sembraron en placas de seis pocillos cada una. A cada pocillo se añadieron 2 ml de células diluidas con medio de cultivo a una densidad de 80.000 cel/ml y se dejaron crecer a 37°C.

En cuanto a la preparación de las muestras para la inmunofluorescencia la siembra de las células se realizó en placas de 24 pocillos en los que se sembramos 500 μ l de células a una densidad de 80.000 cel/ml diluidas con medio de cultivo.

2.3.5. Transdiferenciación a mioblastos

En las líneas celulares utilizadas, la inducción del programa miogénico se produce por la expresión del gen MyoD de ratón bajo el sistema Tet-on. La activación transcripcional controlada por tetraciclina es un método de expresión génica inducible donde la

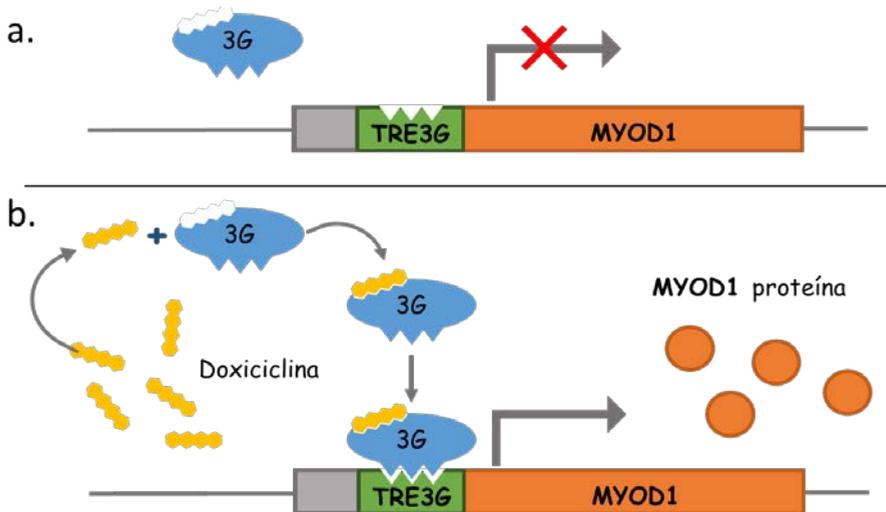


Figura MM- 4. Representación esquematizada del sistema Tet-on.
 En condiciones no permisivas, las células inmortalizadas pueden proliferar indefinidamente, pero cuando se complementan con doxiciiclina, las células expresan MYOD1 que activa el programa miogénico y su fusión en miotubos.

Material y Métodos

transcripción se activa reversiblemente en presencia del antibiótico tetraciclina o uno de sus derivados, en nuestro caso usamos doxiciclina (Figura MM-4).

En nuestro protocolo la transdiferenciación se empieza 24 horas después de haber sembrado las células. Para la inducción del 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)). Las células se dejaron durante 48 h a 37°C transdiferenciándose a mioblastos.

2.3.6. Tratamiento con compuestos y fijación

Para asegurar la total reproducibilidad de los ensayos y minimizar posibles errores técnicos el tratamiento de las células se llevó a cabo siguiendo un estricto protocolo de disolución y suministro de los hexapéptidos (Figura MM-5). Las alícuotas de péptidos liofilizados se disolvieron en el volumen de DMSO 100% necesario en cada uno de los casos para obtener una concentración de 10 mM. A partir de esta solución madre se prepararon, según la necesidad de uso, diluciones a la concentración de 1 mM en 10% DMSO. Para el tratamiento de las células se calcula el volumen a añadir al medio de cultivo, para que la concentración final sea 10 µM. El volumen calculado se preparó en un vial de 1.5 ml o 5 ml según la

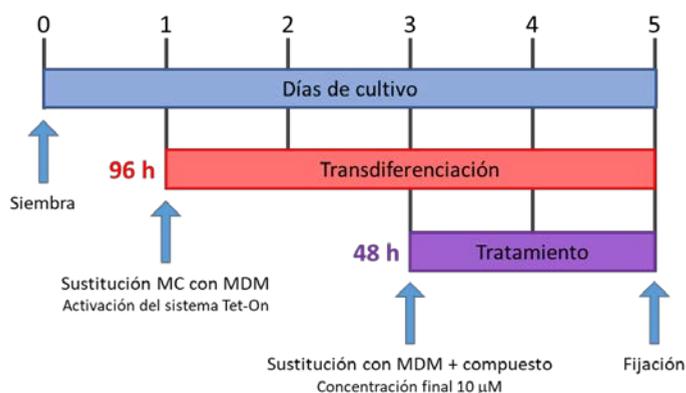


Figura MM- 5. Esquema del protocolo de cultivo célula.

En la figura se representan los pasos del protocolo de transdiferenciación y tratamiento de las células con los compuestos desde el día de la siembra (día 0) al día de la fijación (día 5). El periodo de transdiferenciación de 4 días se solapa en su parte final con los dos días de tratamiento.

necesidad, se añadió el correspondiente volumen de medio de cultivo y se mezcló vigorosamente con el vórtex para asegurar una solución homogénea.

Transcurridas 48 h desde la administración de los compuestos, se procedió al fijado las células con PFA (paraformaldehído) al 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Las células fueron guardadas con PBS (tampón fosfato salino) a 4°C hasta el ensayo de inmunofluorescencia.

2.3.7. Ensayo de toxicidad

El ensayo de toxicidad se realizó utilizando el ensayo de proliferación celular no radioactiva acuosa CellTiter 96® (Promega). Para eso, los fibroblastos de la línea control se sembraron en placas de 96 pocillos con 1.0×10^4 células por pocillo y se incubaron durante 24 h. Los compuestos se agregaron en un rango de concentración (ver Figura R-12) en DMEM y las células se incubaron durante 48 h. La viabilidad celular se midió con sal de tetrazolio MTS, que se añadió a cada pocillo y se incubó durante 4 horas a 37°C en una cámara humidificada con 5% de CO₂. La conversión de MTS en formazan soluble, realizada por células metabólicamente activas, se midió por absorbancia a 490 nm.

2.3.8. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

En el ensayo de hibridación *in situ* se utilizó una sonda de RNA (CAG₇) complementaria a las repeticiones CUGs marcada con el fluoróforo Cy3 para la detección de los foci en el núcleo de los fibroblastos. Tras la fijación de las células se procedió a una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con una solución 2x de SSC en formamida al 30%. A continuación, se preparó el tampón de hibridación (8 ml formamida, 2 ml SSC 20X, 4 ml BSA 1%, 2 gr dextran sulfato, 2 ml *vanadyl complex* 20 Mm, 2 ml Trna 10 µg/ml, 2 ml *Herring Sperm*) y se añadió la sonda a una concentración 1:100. Tras una incubación de 2 horas a 37°C, las muestras se lavaron dos veces con el tampón SSC 2x con formamida, durante 15 minutos a 45°C. Se procedió con la tinción de los núcleos con HOECHST disuelto en PBS 1x durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavó dos veces más con PBS 1x y finalmente se aplicó el medio de montaje MOWIOL.

Material y Métodos

2.3.9. Tinciones inmunohistoquímicas

El protocolo de la inmunofluorescencia empieza, después de haber fijado las células, permeabilizando con PBS-T (PBS y Tritón-X al 0.3%) durante 5 minutos y bloqueándolas (PBS-T, BSA al 0.5% y suero de burro al 1%) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, añadimos el anticuerpo primario anti-MBNL1 humano producido en ratón (ab77017, Abcam) o el anti-desmina producido en conejo (ab15200, Abcam) a una concentración de 1:200 disuelto en buffer de bloqueo y lo dejamos toda la noche a 4°C. Al día siguiente, tras haber lavado las muestras con PBS-T, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con biotina, anti-mouse-IgG (Sigma-Aldrich) a una concentración 1:200 con buffer de bloqueo que se deja actuar durante una hora a temperatura ambiente. Con el fin de amplificar la señal se utiliza el *Elite ABC kit* (VECTASTAIN) que requiere un período de pre-incubación de 45 min. A continuación, se lavan con PBS-T y se procede con otro periodo de incubación con estreptavidina-FITC (Vector) diluida 1:200 durante 2 h. Finalmente se lavan las muestras con PBS y se utiliza un medio de montaje que lleva DAPI (Vector) para teñir los núcleos en azul.

Para el estudio de localización subcelular del péptido 79 marcado con biotina se ha puesto a punto un protocolo de inmunofluorescencia doble. En concreto, para la visualización de las proteínas MBNL1 y LC3 se llevó a cabo una inmunofluorescencia directa en la que los anticuerpos primarios anti-MBNL1 o anti-LC3 se añadieron a una concentración 1:200, durante toda la noche a 4°C; mientras que los anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo marcados con el fluoróforo FITC (señal verde) se añadieron a una concentración de 1:200, pero durante 1 hora a temperatura ambiente. Por otro lado, la señal relativa al péptido 79 biotinilado fue amplificada usando el *ABC kit* e incubando 45 minutos a temperatura ambiente con estreptavidina-texas red (señal roja) 1:200.

2.3.10. Tinción con LysoTracker

Para analizar los niveles de autofagia se sembraron 50.000 células por pocillo en placas de 24 en las que previamente se colocaron cubreobjetos. Al día siguiente, se cambió el medio por MDM. A los tres días, se retiró el MDM, se lavaron las células 2x con PBS y se añadió 300 µl de LysoTracker 1:10000 y Hoechst 1:2000 diluidos en PBS. Se incubó durante 30 min

a 37°C, a continuación, se volvieron a lavar 2x con PBS y se colocaron los portaobjetos en cubreobjetos con una gota de medio de montaje para fluorescencia (Dako).

2.4. Ensayos *in vitro*

2.4.1. Espectroscopia de Infrarrojos

Para la adquisición de los espectros utilizó un accesorio de ATR (Reflectancia total atenuada) con un cristal de diamante de 2 reflexiones. Las muestras, tanto de péptido como de RNA, se prepararon por secado de disoluciones en agua sobre el cristal de diamante y se adquirieron los espectros de las muestras secas.

Espectros del péptido Abp1: se adquirieron espectros de muestras de péptido preparadas a partir de disoluciones a concentración 20, 70, 120 y 215 μM . Se utilizó análisis de la amida I en el espectro de infrarrojo para averiguar que el péptido estuviera en estado monomérico (no agregado, ausencia de banda a 1620 cm^{-1}).

Espectros de RNA obtenido por transcripción *in vitro*: se adquirieron espectros de RNA de tres longitudes diferentes: 10, 20 y 60 repeticiones CUG.

Los espectros de mezclas Péptido/RNA: se adquirieron espectros a las siguientes ratios Péptido/RNA: 2, 9, 15, 25.

2.4.2. Ensayo de Desplazamiento de Intercalante Fluorescente (FID)

En una cubeta se preparó 1 mL de disolución 0.25 μM de oligonucleótido (CUG) y 0.5 o 0.75 μM de Tiazol Orange (TO), utilizando el tampón cacodilato. Después de un tiempo de estabilización de 6 minutos se midió el espectro de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 495\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}650\text{ nm}$, slits = 5-5, 750 mV). A continuación, se fueron añadiendo alícuotas de una disolución 0.125 mM del péptido, dejando pasar 1 minuto para registrar la fluorescencia. El equipo utilizado para el ensayo es un fluorímetro PTI modular con lámpara de xenón y geometría en ángulo recto.

2.4.3. Differential Scanning Fluorimetry (DSF)

Esta técnica se emplea para medir la estabilidad de la unión del RNA. Hemos seguido el protocolo descrito en Silvers *et al.*, 2015. Los agentes intercalantes empleados han sido: SYBR Green II (SYBR, life technologies), QuantiFluor RNA (QRNA, Promega) y cuanto-iT RiboGreen (RIBO, life technologies), a fin de distinguir entre RNA de doble y simple cadena.

Material y Métodos

La sonda de RNA empleada es (CrUrGr) 12. Se ha utilizado un sistema de PCR a tiempo real con un software de curvas de fusión. Hemos probado 4 concentraciones para cada péptido: 1 μM , 10 μM (concentración a la que se han tratado las células), 50 μM y 100 μM , y un control con el disolvente DMSO. Se han realizado 4 réplicas experimentales. Los resultados generados se analizaron con el programa GraphPad Prism5, el cual nos construye un gráfico que representa la absorbancia frente a la temperatura para cada concentración del péptido. Después generamos la derivada, donde el punto de inflexión en las curvas de transición indica la temperatura de fusión del RNA (T_m , *Melting temperature*).

2.5. Análisis de imágenes

2.5.1. Análisis de foci ribonucleares

Tras la ejecución del protocolo de hibridación *in situ* para la visualización de los agregados de RNA tóxico en los núcleos (foci ribonucleares), se procedió a la adquisición de imágenes

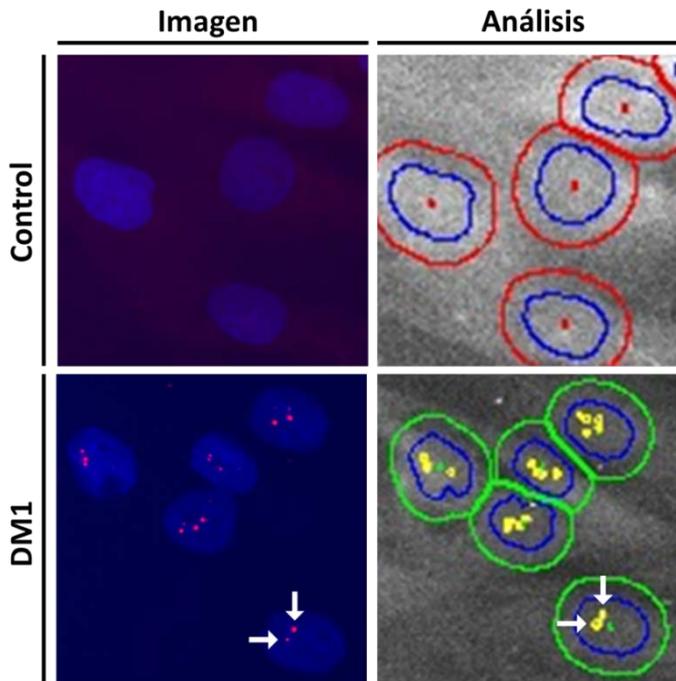


Figura MM- 6. Cuantificación del número de foci por célula.

En cada imagen el programa detecta y cuenta todos los núcleos y los clasifica como núcleos sin foci (rojo) y núcleos con foci (verde). Al mismo tiempo el programa detecta en el núcleo la señal relativa al fluoróforo Cy3 (rojo) y cuantifica el número de puntos (flechas blancas).

de alta resolución con el microscopio automatizado InCell Analyzer 2000. Para la evaluación de los efectos producidos por el tratamiento con los péptidos se utilizó el programa de análisis, *InCell investigator*, asociado al microscopio.

Mediante el uso de comandos personalizados, es posible configurar el programa para identificar una señal particular, detectar su ubicación subcelular, analizarla cualitativa y cuantitativamente (Figura MM-6). El programa produce una enorme cantidad de información (analiza miles de células por cada condición) y crea una hoja Excel en la que es posible consultar, organizar y elaborar los datos.

2.5.2. Análisis de la intensidad de bandas

Para el análisis de los datos obtenidos en los ensayos de PCR semicuantitativa se capturaron imágenes de los gels con un transiluminador UV con sistema de captura de imágenes. Para la cuantificación de MBNL1 mediante *Western blot* Utilizamos el capturador de imágenes *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare) para obtener una imagen digital de la membrana. 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. Las imágenes se guardaron como archivos *Tagged Image File Format* (TIFF) y la intensidad de las bandas de ambos ensayos se analizó mediante el programa *ImageJ* (tabla MM-8) y con la misma metodología de procesamiento. Para seleccionar las carreras realizamos un rectángulo lo

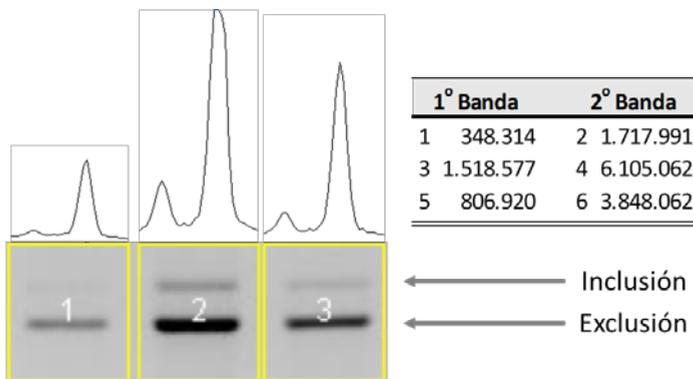


Figura MM- 7. Cuantificación de bandas.
 Utilizamos el programa ImageJ para cuantificar la intensidad de la señal por densitometría. Seleccionamos las carreras a cuantificar en cada imagen TIFF y obtenemos los perfiles densitométricos. El área de los picos es proporcional a la intensidad de la señal y por lo tanto se puede utilizar para calcular el porcentaje de inclusión exónico.

Material y Métodos

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-7).

Para generar los perfiles de cada calle 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 la proteína MBNL1 tras el tratamiento con los péptidos seleccionados. Para normalizar los datos los valores de expresión de MBNL1 se dividieron por la expresión del gen de referencia β -Actina detectada en las mismas membranas.

2.5.3. Análisis de las secciones de tórax

Las 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) Binarizamos las imágenes mediante el comando: *Process/Binary/Make binary* y eliminamos aquellas estructuras que no correspondían a IFMs. Para obtener el porcentaje de área analizamos las 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.

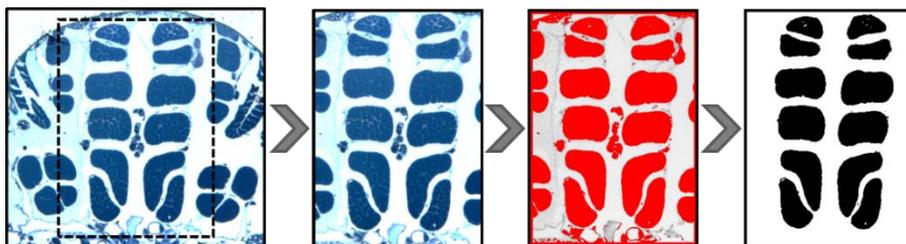


Figura MM- 8. Cuantificación del área muscular.

Se muestra un ejemplo de una imagen de sección transversal de tórax y las fases del procesamiento de la imagen. El resultado de la binarización y la eliminación de las regiones que no corresponden a los IFMs se utilizan para el cálculo del porcentaje del área ocupada por los paquetes musculares.

2.5.4. Cuantificación del índice de fusión y niveles de diferenciación muscular

Para la cuantificación del índice de fusión se abrieron dos copias de la misma imagen en Photoshop y se utilizó el instrumento pincel para marcar con un punto cada núcleo en la primera imagen y los núcleos en células multinucleadas en la segunda. Tras haber ejecutado esta operación para por lo menos 5 imágenes de diferentes campos por cada tratamiento, se calculó el índice de fusión como sigue:

$$\frac{n \text{ núcleos en células multinucleadas}}{n \text{ núcleos por campo}} \times 100 = \% \text{ de fusión}$$

Así mismo para la evaluación del estado de diferenciación se procedió de la misma forma, considerando como marcador de diferenciación la expresión de la proteína desmina y usando la siguiente función:

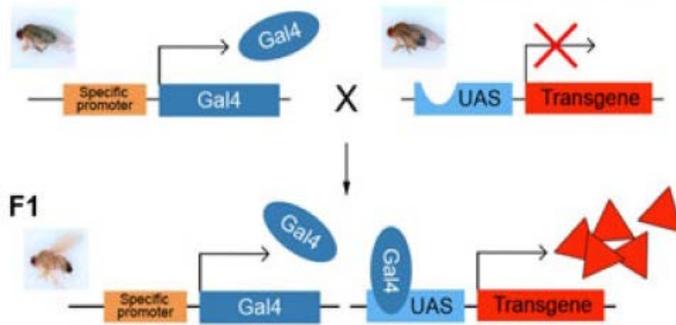
$$\frac{n \text{ células que expresan desmina}}{n \text{ células por campo}} \times 100 = \% \text{ células diferenciadas}$$

2.5.5. Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico fue realizado con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software). Asumimos que todos los parámetros analizados siguen una distribución normal, por lo que las muestras fueron comparadas con el test t de Student con corrección de Welch para comparar grupos con diferente tamaño utilizando un valor de significatividad $\alpha = 0.05$ (*), $\alpha = 0.01$ (**), $\alpha = 0.001$ (***) o $\alpha = 0.0001$ (****)

APÉNDICE

∞ El sistema UAS / Gal4.



El sistema binario UAS / Gal4 consiste en el factor de transcripción de levadura Gal4 y sus sitios de unión específicos, denominados secuencias UAS (del inglés *Upstream Activating Sequences*). Tras la unión de Gal4 a los sitios UAS, se activa la expresión de secuencias que siguen. El genoma de *Drosophila* está desprovisto del gen Gal4 y los sitios UAS, y los factores de transcripción de la mosca no activan la expresión de secuencias bajo el control de UAS. Por lo tanto, este sistema de activación transcripcional se modificó genéticamente para generar un sistema de expresión artificial en *Drosophila* (Brand y Perrimon 1993; Ito *et al.* 1997; Osterwalder *et al.* 2001). Se generan así dos líneas de moscas transgénicas. La primera es la llamada línea de drivers Gal4. En estas moscas, la expresión de Gal4 está controlada por un promotor endo o exógeno específico que da como resultado un patrón de expresión espacio-temporal característico de Gal4. Cientos de diferentes líneas de *drivers* Gal4 están disponibles para investigadores en centros públicos. En cuanto a las líneas UAS, casi no hay límites con respecto a las secuencias que se pueden ubicar bajo el control de una secuencia UAS. Al aparear moscas transgénicas para un driver Gal4 y un constructo UAS, respectivamente, Gal4 y sus sitios de unión UAS afines estarán presentes en la descendencia. En consecuencia, solo la generación F1 mostrará la expresión activada por Gal4 de las secuencias controladas por UAS. Por lo tanto, al elegir un *driver* Gal4 específico, la expresión de secuencias controladas por UAS puede dirigirse a diversos tejidos o tipos de células incluso con resolución temporal.

Códigos de Aminoácidos

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

BIBLIOGRAFÍA

Referencias

- Abes R, Arzumanov AA, Moulton HM, Abes S, Ivanova GD, Iversen PL, Gait MJ, Lebleu B. 2007. Cell-penetrating-peptide-based delivery of oligonucleotides: an overview. *Biochemical Society transactions* **35**: 775-779.
- Abmayr SM, Pavlath GK. 2012. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* **139**: 641-656.
- Adessi C, Soto C. 2002. Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Current medicinal chemistry* **9**: 963-978.
- Adzhubei AA, Sternberg MJ, Makarov AA. 2013. Polyproline-II helix in proteins: structure and function. *Journal of molecular biology* **425**: 2100-2132.
- Alwazzan M, Newman E, Hamshere MG, Brook JD. 1999. Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Human molecular genetics* **8**: 1491-1497.
- Amack JD, Reagan SR, Mahadevan MS. 2002. Mutant DMPK 3'-UTR transcripts disrupt C2C12 myogenic differentiation by compromising MyoD. *The Journal of cell biology* **159**: 419-429.
- Andre LM, Ausems CRM, Wansink DG, Wieringa B. 2018. Abnormalities in Skeletal Muscle Myogenesis, Growth, and Regeneration in Myotonic Dystrophy. *Frontiers in neurology* **9**: 368.
- Arandel L, Polay Espinoza M, Matloka M, Bazinet A, De Dea Diniz D, Naouar N, Rau F, Jollet A, Edom-Vovard F, Mamchaoui K *et al.* 2017. Immortalized human myotonic dystrophy muscle cell lines to assess therapeutic compounds. *Disease models & mechanisms* **10**: 487-497.
- Artero R, Prokop A, Paricio N, Begemann G, Pueyo I, Mlodzik M, Perez-Alonso M, Baylies MK. 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**: 131-143.
- Ashizawa T, Dubel JR, Harati Y. 1993. Somatic instability of CTG repeat in myotonic dystrophy. *Neurology* **43**: 2674-2678.
- Babcock DT, Ganetzky B. 2014. An improved method for accurate and rapid measurement of flight performance in *Drosophila*. *Journal of visualized experiments : JoVE*: e51223.
- Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. 1922. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Canadian Medical Association journal* **12**: 141-146.
- Barbe L, Lanni S, Lopez-Castel A, Franck S, Spits C, Keymolen K, Seneca S, Tome S, Miron I, Letourneau J *et al.* 2017. CpG Methylation, a Parent-of-Origin Effect for Maternal-Biased Transmission of Congenital Myotonic Dystrophy. *American journal of human genetics* **100**: 488-505.

Bibliografía

- Bargiela A, Cerro-Herreros E, Fernandez-Costa JM, Vilchez JJ, Llamusi B, Artero R. 2015. Increased autophagy and apoptosis contribute to muscle atrophy in a myotonic dystrophy type 1 *Drosophila* model. *Disease models & mechanisms* **8**: 679-690.
- Barre-Sinoussi F, Montagutelli X. 2015. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future science OA* **1**: FSO63.
- Bassez G, Audureau E, Hogrel JY, Arrouasse R, Baghdoyan S, Bhugaloo H, Gourlay-Chu ML, Le Corvoisier P, Peschanski M. 2018. Improved mobility with metformin in patients with myotonic dystrophy type 1: a randomized controlled trial. *Brain : a journal of neurology* **141**: 2855-2865.
- Batra R, Charizanis K, Manchanda M, Mohan A, Li M, Finn DJ, Goodwin M, Zhang C, Sobczak K, Thornton CA *et al.* 2014. Loss of MBNL leads to disruption of developmentally regulated alternative polyadenylation in RNA-mediated disease. *Molecular cell* **56**: 311-322.
- Batra R, Manchanda M, Swanson MS. 2015. Global insights into alternative polyadenylation regulation. *RNA biology* **12**: 597-602.
- Beffy P, Del Carratore R, Masini M, Furling D, Puymirat J, Masiello P, Simili M. 2010. Altered signal transduction pathways and induction of autophagy in human myotonic dystrophy type 1 myoblasts. *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**: 1973-1983.
- Begemann G, Paricio N, Artero R, Kiss I, Perez-Alonso M, Mlodzik M. 1997. muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* **124**: 4321-4331.
- Berger DS, Ladd AN. 2012. Repression of nuclear CELF activity can rescue CELF-regulated alternative splicing defects in skeletal muscle models of myotonic dystrophy. *PLoS currents* **4**: RRN1305.
- Bigot A, Klein AF, Gasnier E, Jacquemin V, Ravassard P, Butler-Browne G, Mouly V, Furling D. 2009. Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells. *The American journal of pathology* **174**: 1435-1442.
- Blondelle SE, Houghten RA, Perez-Paya E. 1996. Identification of inhibitors of melittin using nonsupport-bound combinatorial libraries. *The Journal of biological chemistry* **271**: 4093-4099.
- Boger DL, Tse WC. 2001. Thiazole orange as the fluorescent intercalator in a high resolution fid assay for determining DNA binding affinity and sequence selectivity of small molecules. *Bioorganic & medicinal chemistry* **9**: 2511-2518.
- Borek F, Stupp Y, Fuchs S, Sela M. 1965. Relation between optical configuration and immunogenicity of synthetic polypeptides. *The Biochemical journal* **96**: 577-582.

- Borrelli A, Tornesello AL, Tornesello ML, Buonaguro FM. 2018. Cell Penetrating Peptides as Molecular Carriers for Anti-Cancer Agents. *Molecules* **23**.
- Botta A, Vallo L, Rinaldi F, Bonifazi E, Amati F, Biancolella M, Gambardella S, Mancinelli E, Angelini C, Meola G *et al.* 2007. Gene expression analysis in myotonic dystrophy: indications for a common molecular pathogenic pathway in DM1 and DM2. *Gene expression* **13**: 339-351.
- Bouge AL, Murauer E, Beyne E, Miro J, Varilh J, Taulan M, Koenig M, Claustres M, Tuffery-Giraud S. 2017. Targeted RNA-Seq profiling of splicing pattern in the DMD gene: exons are mostly constitutively spliced in human skeletal muscle. *Scientific reports* **7**: 39094.
- Brand AH, Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401-415.
- Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, 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.
- Bruusgaard JC, Liestol K, Ekmark M, Kollstad K, Gundersen K. 2003. Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied *in vivo*. *The Journal of physiology* **551**: 467-478.
- Buj-Bello A, Furling D, Tronchere H, Laporte J, Lerouge T, Butler-Browne GS, Mandel JL. 2002. Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells. *Human molecular genetics* **11**: 2297-2307.
- Carango P, Noble JE, Marks HG, Funanage VL. 1993. Absence of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) mRNA as a result of a triplet repeat expansion in myotonic dystrophy. *Genomics* **18**: 340-348.
- Carpenter FW. 1905. The Reaction of the Pomace Fly (*Drosophila ampelophila* Loew) to Light, Gravity, and Mechanical Stimulation. *The American Naturalist* **39, No. 459 (Mar., 1905)**: 157-171.
- Carrell ST, Carrell EM, Auerbach D, Pandey SK, Bennett CF, Dirksen RT, Thornton CA. 2016. Dmpk gene deletion or antisense knockdown does not compromise cardiac or skeletal muscle function in mice. *Human molecular genetics* **25**: 4328-4338.
- Cass D, Hotchko R, Barber P, Jones K, Gates DP, Berglund JA. 2011. The four Zn fingers of MBNL1 provide a flexible platform for recognition of its RNA binding elements. *BMC molecular biology* **12**: 20.
- Ceriani MF. 2007. Basic protocols for *Drosophila* S2 cell line: maintenance and transfection. *Methods in molecular biology* **362**: 415-422.
- Cerro-Herreros E, Fernandez-Costa JM, Sabater-Arcis M, Llamusi B, Artero R. 2016. Derepressing muscleblind expression by miRNA sponges ameliorates myotonic dystrophy-like phenotypes in *Drosophila*. *Scientific reports* **6**: 36230.

Bibliografía

- Cerro-Herreros E, Sabater-Arcis M, Fernandez-Costa JM, Moreno N, Perez-Alonso M, Llamusi B, Artero R. 2018. miR-23b and miR-218 silencing increase Muscleblind-like expression and alleviate myotonic dystrophy phenotypes in mammalian models. *Nature communications* **9**: 2482.
- Coonrod LA, Nakamori M, Wang W, Carrell S, Hilton CL, Bodner MJ, Siboni RB, Docter AG, Haley MM, Thornton CA *et al.* 2013. Reducing levels of toxic RNA with small molecules. *ACS chemical biology* **8**: 2528-2537.
- Cywoniuk P, Taylor K, Sznajder LJ, Sobczak K. 2017. Hybrid splicing minigene and antisense oligonucleotides as efficient tools to determine functional protein/RNA interactions. *Scientific reports* **7**: 17587.
- Chakraborty M, Llamusi B, Artero R. 2018. Modeling of Myotonic Dystrophy Cardiac Phenotypes in Drosophila. *Frontiers in neurology* **9**: 473.
- Chamberlain CM, Ranum LP. 2012. Mouse model of muscleblind-like 1 overexpression: skeletal muscle effects and therapeutic promise. *Human molecular genetics* **21**: 4645-4654.
- Charizanis K, Lee KY, Batra R, Goodwin M, Zhang C, Yuan Y, Shiue L, Cline M, Scotti MM, Xia G *et al.* 2012. Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* **75**: 437-450.
- Chen CZ, Sobczak K, Hoskins J, Southall N, Marugan JJ, Zheng W, Thornton CA, Austin CP. 2012. Two high-throughput screening assays for aberrant RNA-protein interactions in myotonic dystrophy type 1. *Analytical and bioanalytical chemistry* **402**: 1889-1898.
- Chen G, Masuda A, Konishi H, Ohkawara B, Ito M, Kinoshita M, Kiyama H, Matsuura T, Ohno K. 2016. Phenylbutazone induces expression of MBNL1 and suppresses formation of MBNL1-CUG RNA foci in a mouse model of myotonic dystrophy. *Scientific reports* **6**: 25317.
- Chen KY, Pan H, Lin MJ, Li YY, Wang LC, Wu YC, Hsiao KM. 2007. Length-dependent toxicity of untranslated CUG repeats on *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and biophysical research communications* **352**: 774-779.
- Cho DH, Tapscott SJ. 2007. Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2. *Biochimica et biophysica acta* **1772**: 195-204.
- Choi J, Dixon DM, Dansithong W, Abdallah WF, Roos KP, Jordan MC, Trac B, Lee HS, Comai L, Reddy S. 2016. Muscleblind-like 3 deficit results in a spectrum of age-associated pathologies observed in myotonic dystrophy. *Scientific reports* **6**: 30999.
- Chongsiriwatana NP, Patch JA, Czyzewski AM, Dohm MT, Ivankin A, Gidalevitz D, Zuckermann RN, Barron AE. 2008. Peptoids that mimic the structure, function, and mechanism of helical antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 2794-2799.

- D.A. Case VB, J.T. Berryman, R.M. Betz, Q. Cai, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E., Duke HG, A.W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko,, T.S. Lee SL, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M. Merz, F. Paesani, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui,, R. Salomon-Ferrer GS, C.L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X., Kollman WaPA. 2014. AMBER 14.
- Davis BM, McCurrach ME, Taneja KL, Singer RH, Housman DE. 1997. Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 7388-7393.
- de Haro M, Al-Ramahi I, De Gouyon B, Ukani L, Rosa A, Faustino NA, Ashizawa T, Cooper TA, Botas J. 2006. MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy type 1. *Human molecular genetics* **15**: 2138-2145.
- Dean NL, Tan SL, Ao A. 2006. Instability in the transmission of the myotonic dystrophy CTG repeat in human oocytes and preimplantation embryos. *Fertility and sterility* **86**: 98-105.
- Denayer T. ST, Van Roy M. 2014. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine*.
- Denis JA, Gauthier M, Rachdi L, Aubert S, Giraud-Triboult K, Poydenot P, Benchoua A, Champon B, Maury Y, Baldeschi C *et al.* 2013. mTOR-dependent proliferation defect in human ES-derived neural stem cells affected by myotonic dystrophy type 1. *Journal of cell science* **126**: 1763-1772.
- Di L. 2015. Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties. *The AAPS journal* **17**: 134-143.
- Diao L, Meibohm B. 2013. Pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides. *Clinical pharmacokinetics* **52**: 855-868.
- Dohm MT, Kapoor R, Barron AE. 2011. Peptoids: bio-inspired polymers as potential pharmaceuticals. *Current pharmaceutical design* **17**: 2732-2747.
- Doudna JA, Charpentier E. 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**: 1258096.
- Douglas RG, Kramer EE, Bonsnes RW. 1957. Oxytocin, newer knowledge and present clinical usage. *American journal of obstetrics and gynecology* **73**: 1206-1217.
- Du H, Cline MS, Osborne RJ, Tuttle DL, Clark TA, Donohue JP, Hall MP, Shiue L, Swanson MS, Thornton CA *et al.* 2010. Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nature structural & molecular biology* **17**: 187-193.

Bibliografía

- Dumevska B, Main H, McKernan R, Goel D, Schmidt U. 2016. Derivation of DM1 affected human embryonic stem cell line Genea067. *Stem cell research* **16**: 437-439.
- Dvinge H. 2018. Regulation of alternative mRNA splicing: old players and new perspectives. *FEBS letters* **592**: 2987-3006.
- Ebralidze A, Wang Y, Petkova V, Ebralidse K, Junghans RP. 2004. RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* **303**: 383-387.
- Echeverria GV, Cooper TA. 2014. Muscleblind-like 1 activates insulin receptor exon 11 inclusion by enhancing U2AF65 binding and splicing of the upstream intron. *Nucleic acids research* **42**: 1893-1903.
- Fardaei M, Larkin K, Brook JD, Hamshere MG. 2001. In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic acids research* **29**: 2766-2771.
- Fardaei M, Rogers MT, Thorpe HM, Larkin K, Hamshere MG, Harper PS, Brook JD. 2002. Three proteins, MBNL, MBL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Human molecular genetics* **11**: 805-814.
- Fernandez-Costa JM, Garcia-Lopez A, Zuniga S, Fernandez-Pedrosa V, Felipo-Benavent A, Mata M, Jaka O, Aiastui A, Hernandez-Torres F, Aguado B *et al.* 2013. Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in Drosophila that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Human molecular genetics* **22**: 704-716.
- Fernandez-Costa JM, Llamusi MB, Garcia-Lopez A, Artero R. 2011. Alternative splicing regulation by Muscleblind proteins: from development to disease. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **86**: 947-958.
- Folker ES, Baylies MK. 2013. Nuclear positioning in muscle development and disease. *Frontiers in physiology* **4**: 363.
- Folkers K, Wolaniuk J, Simonsen R, Morishita M, Vadhanavikit S. 1985. Biochemical rationale and the cardiac response of patients with muscle disease to therapy with coenzyme Q10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 4513-4516.
- Fosgerau K, Hoffmann T. 2015. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today* **20**: 122-128.
- Fowler SA, Blackwell HE. 2009. Structure-function relationships in peptoids: recent advances toward deciphering the structural requirements for biological function. *Organic & biomolecular chemistry* **7**: 1508-1524.
- Frankel AD, Pabo CO. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**: 1189-1193.
- Friedman JE. 2011. Anticipation in hereditary disease: the history of a biomedical concept. *Human genetics* **130**: 705-714.

- Fu Y, Ramisetty SR, Hussain N, Baranger AM. 2012. MBNL1-RNA recognition: contributions of MBNL1 sequence and RNA conformation. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **13**: 112-119.
- Fu YH, Friedman DL, Richards S, Pearlman JA, Gibbs RA, Pizzuti A, Ashizawa T, Perryman MB, Scarlato G, Fenwick RG, Jr. *et al.* 1993. Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* **260**: 235-238.
- Fugier C, Klein AF, Hammer C, Vassilopoulos S, Ivarsson Y, Toussaint A, Tosch V, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N *et al.* 2011. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nature medicine* **17**: 720-725.
- Furling D, Lemieux D, Taneja K, Puymirat J. 2001. Decreased levels of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and delayed differentiation in human myotonic dystrophy myoblasts. *Neuromuscular disorders : NMD* **11**: 728-735.
- Furuya H, Shinnoh N, Ohyagi Y, Ikezoe K, Kikuchi H, Osoegawa M, Fukumaki Y, Nakabeppu Y, Hayashi T, Kira J. 2005. Some flavonoids and DHEA-S prevent the cis-effect of expanded CTG repeats in a stable PC12 cell transformant. *Biochemical pharmacology* **69**: 503-516.
- Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y. 2001. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *The Journal of biological chemistry* **276**: 5836-5840.
- Gao Y, Guo X, Santostefano K, Wang Y, Reid T, Zeng D, Terada N, Ashizawa T, Xia G. 2016. Genome Therapy of Myotonic Dystrophy Type 1 iPS Cells for Development of Autologous Stem Cell Therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **24**: 1378-1387.
- Gao Z, Cooper TA. 2013. Antisense oligonucleotides: rising stars in eliminating RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Human gene therapy* **24**: 499-507.
- Garcia-Alcover I, Colonques-Bellmunt J, Garijo R, Tormo JR, Artero R, Alvarez-Abril MC, Lopez Castel A, Perez-Alonso M. 2014. Development of a Drosophila melanogaster spliceosensor system for in vivo high-throughput screening in myotonic dystrophy type 1. *Disease models & mechanisms* **7**: 1297-1306.
- García-López A. 2010. Búsqueda de supresores químicos de la toxicidad de las expansiones CTG en Drosophila. Universidad de Valencia.
- Garcia-Lopez A, Llamusi B, Orzaez M, Perez-Paya E, Artero RD. 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**: 11866-11871.

Bibliografía

- Garcia-Lopez A, Monferrer L, Garcia-Alcover I, Vicente-Crespo M, Alvarez-Abril MC, Artero RD. 2008. Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*. *PLoS one* **3**: e1595.
- Garcia SM, Tabach Y, Lourenco GF, Armakola M, Ruvkun G. 2014. Identification of genes in toxicity pathways of trinucleotide-repeat RNA in *C. elegans*. *Nature structural & molecular biology* **21**: 712-720.
- Gargano JW, Martin I, Bhandari P, Grotewiel MS. 2005. Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Experimental gerontology* **40**: 386-395.
- Goers ES, Purcell J, Voelker RB, Gates DP, Berglund JA. 2010. MBNL1 binds GC motifs embedded in pyrimidines to regulate alternative splicing. *Nucleic acids research* **38**: 2467-2484.
- Grammatikakis I, Goo YH, Echeverria GV, Cooper TA. 2011. Identification of MBNL1 and MBNL3 domains required for splicing activation and repression. *Nucleic acids research* **39**: 2769-2780.
- Grant R, Sutton DL, Behan PO, Ballantyne JP. 1987. Nifedipine in the treatment of myotonia in myotonic dystrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **50**: 199-206.
- Green M, Loewenstein PM. 1988. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **55**: 1179-1188.
- Guidotti G, Brambilla L, Rossi D. 2017. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends in pharmacological sciences* **38**: 406-424.
- Hale MA, Richardson JI, Day RC, McConnell OL, Arboleda J, Wang ET, Berglund JA. 2018. An engineered RNA binding protein with improved splicing regulation. *Nucleic acids research* **46**: 3152-3168.
- Hamshere MG, Newman EE, Alwazzan M, Athwal BS, Brook JD. 1997. Transcriptional abnormality in myotonic dystrophy affects DMPK but not neighboring genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 7394-7399.
- Han H, Irimia M, Ross PJ, Sung HK, Alipanahi B, David L, Golipour A, Gabut M, Michael IP, Nachman EN *et al.* 2013. MBNL proteins repress ES-cell-specific alternative splicing and reprogramming. *Nature* **498**: 241-245.
- Hao M, Akrami K, Wei K, De Diego C, Che N, Ku JH, Tidball J, Graves MC, Shieh PB, Chen F. 2008. Muscleblind-like 2 (Mbnl2) -deficient mice as a model for myotonic dystrophy. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **237**: 403-410.
- Hara T, Durell SR, Myers MC, Appella DH. 2006. Probing the structural requirements of peptoids that inhibit HDM2-p53 interactions. *Journal of the American Chemical Society* **128**: 1995-2004.

- Harley HG, Brook JD, Rundle SA, Crow S, Reardon W, Buckler AJ, Harper PS, Housman DE, Shaw DJ. 1992. Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* **355**: 545-546.
- Harper PS, Harley HG, Reardon W, Shaw DJ. 1992. Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem. *American journal of human genetics* **51**: 10-16.
- He F, Dang W, Abe C, Tsuda K, Inoue M, Watanabe S, Kobayashi N, Kigawa T, Matsuda T, Yabuki T *et al.* 2009. Solution structure of the RNA binding domain in the human muscleblind-like protein 2. *Protein science : a publication of the Protein Society* **18**: 80-91.
- Heitz F, Morris MC, Divita G. 2009. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British journal of pharmacology* **157**: 195-206.
- Hicks JM, Hsu VL. 2004. The extended left-handed helix: a simple nucleic acid-binding motif. *Proteins* **55**: 330-338.
- Hiller M, Zhang Z, Backofen R, Stamm S. 2007. Pre-mRNA secondary structures influence exon recognition. *PLoS genetics* **3**: e204.
- Hirsch J. 1959. Studies in experimental behavior genetics: II. Individual differences in geotaxis as a function of chromosome variations in synthesized Drosophila populations. . *Journal of Comparative and Physiological Psychology* **52(3)**: 304-308.
- Ho G, Cardamone M, Farrar M. 2015. Congenital and childhood myotonic dystrophy: Current aspects of disease and future directions. *World journal of clinical pediatrics* **4**: 66-80.
- Ho TH, Charlet BN, Poulos MG, Singh G, Swanson MS, Cooper TA. 2004. Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *The EMBO journal* **23**: 3103-3112.
- Hoefer PF, Glaser GH. 1950. Effects of pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) therapy; electroencephalographic and neuropsychiatric changes in fifteen patients. *Journal of the American Medical Association* **143**: 620-624.
- Hoffmann B, Ast T, Polakowski T, Reineke U, Volkmer R. 2006. Transformation of a biologically active Peptide into peptoid analogs while retaining biological activity. *Protein and peptide letters* **13**: 829-833.
- Holt I, Jacquemin V, Fardaei M, Sewry CA, Butler-Browne GS, Furling D, Brook JD, Morris GE. 2009. Muscleblind-like proteins: similarities and differences in normal and myotonic dystrophy muscle. *The American journal of pathology* **174**: 216-227.
- Hon LS, Zhang Z. 2007. The roles of binding site arrangement and combinatorial targeting in microRNA repression of gene expression. *Genome biology* **8**: R166.
- Hoskins JW, Ofori LO, Chen CZ, Kumar A, Sobczak K, Nakamori M, Southall N, Patnaik S, Marugan JJ, Zheng W *et al.* 2014. Lomofungin and dilomofungin:

Bibliografía

- inhibitors of MBNL1-CUG RNA binding with distinct cellular effects. *Nucleic acids research* **42**: 6591-6602.
- Houseley JM, Wang Z, Brock GJ, Soloway J, Artero R, Perez-Alonso M, O'Dell KM, Monckton DG. 2005. Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Human molecular genetics* **14**: 873-883.
- Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. 2011. Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology* **162**: 1239-1249.
- Irion U. 2012. *Drosophila* muscleblind codes for proteins with one and two tandem zinc finger motifs. *PLoS one* **7**: e34248.
- Jansen G, Groenen PJ, Bachner D, Jap PH, Coerwinkel M, Oerlemans F, van den Broek W, Gohlsch B, Pette D, Plomp JJ *et al.* 1996. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nature genetics* **13**: 316-324.
- Jha AK, Colubri A, Zaman MH, Koide S, Sosnick TR, Freed KF. 2005. Helix, sheet, and polyproline II frequencies and strong nearest neighbor effects in a restricted coil library. *Biochemistry* **44**: 9691-9702.
- Jiang H, Mankodi A, Swanson MS, Moxley RT, Thornton CA. 2004. Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Human molecular genetics* **13**: 3079-3088.
- Jiao CY, Alves ID, Point V, Lavielle S, Sagan S, Chassaing G. 2010. Comparing lipid photo-cross-linking efficacy of penetratin analogues bearing three different photoprobes: dithienyl ketone, benzophenone, and trifluoromethylaryldiazirine. *Bioconjugate chemistry* **21**: 352-359.
- Kalra S, Montanaro F, Denning C. 2016. Can Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Advance Understanding of Muscular Dystrophies? *Journal of neuromuscular diseases* **3**: 309-332.
- Kanadia RN, Johnstone KA, Mankodi A, Lungu C, Thornton CA, Esson D, Timmers AM, Hauswirth WW, Swanson MS. 2003. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* **302**: 1978-1980.
- Kanadia RN, Shin J, Yuan Y, Beattie SG, Wheeler TM, Thornton CA, Swanson MS. 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**: 11748-11753.
- Kang BH, Gao ZF, Li N, Shi Y, Li NB, Luo HQ. 2016. Thiazole orange as a fluorescent probe: Label-free and selective detection of silver ions based on the structural change of i-motif DNA at neutral pH. *Talanta* **156-157**: 141-146.
- Kashiwagi K, Nagafuchi S, Sekiguchi N, Yamagata A, Iwata I, Furuya H, Kato M, Niho Y. 1999. Troglitazone not only reduced insulin resistance but also improved

- myotonia in a patient with myotonic dystrophy. *European neurology* **41**: 171-172.
- Kaushik M, Kaushik S, Roy K, Singh A, Mahendru S, Kumar M, Chaudhary S, Ahmed S, Kukreti S. 2016. A bouquet of DNA structures: Emerging diversity. *Biochemistry and biophysics reports* **5**: 388-395.
- Ketley A, Chen CZ, Li X, Arya S, Robinson TE, Granados-Riveron J, Udosen I, Morris GE, Holt I, Furling D *et al.* 2014. High-content screening identifies small molecules that remove nuclear foci, affect MBNL distribution and CELF1 protein levels via a PKC-independent pathway in myotonic dystrophy cell lines. *Human molecular genetics* **23**: 1551-1562.
- Kim DH, Langlois MA, Lee KB, Riggs AD, Puymirat J, Rossi JJ. 2005. HnRNP H inhibits nuclear export of mRNA containing expanded CUG repeats and a distal branch point sequence. *Nucleic acids research* **33**: 3866-3874.
- Kim N, Jinks-Robertson S. 2012. Transcription as a source of genome instability. *Nature reviews Genetics* **13**: 204-214.
- Kino Y, Washizu C, Oma Y, Onishi H, Nezu Y, Sasagawa N, Nukina N, Ishiura S. 2009. MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic acids research* **37**: 6477-6490.
- Klesert TR, Cho DH, Clark JI, Maylie J, Adelman J, Snider L, Yuen EC, Soriano P, Tapscott SJ. 2000. Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nature genetics* **25**: 105-109.
- Konieczny P, Selma-Soriano E, Rapisarda AS, Fernandez-Costa JM, Perez-Alonso M, Artero R. 2017. Myotonic dystrophy: candidate small molecule therapeutics. *Drug discovery today* **22**: 1740-1748.
- Konieczny P, Stepniak-Konieczna E, Sobczak K. 2014. MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation. *Nucleic acids research* **42**: 10873-10887.
- Koscianska E, Witkos TM, Kozłowska E, Wojciechowska M, Krzyzosiak WJ. 2015. Cooperation meets competition in microRNA-mediated DMPK transcript regulation. *Nucleic acids research* **43**: 9500-9518.
- Koshelev M, Sarma S, Price RE, Wehrens XH, Cooper TA. 2010. Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. *Human molecular genetics* **19**: 1066-1075.
- Kouki T, Takasu N, Nakachi A, Tamanaha T, Komiya I, Tawata M. 2005. Low-dose metformin improves hyperglycaemia related to myotonic dystrophy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* **22**: 346-347.
- Kumar A, Agarwal S. 2015. Myotonic Dystrophy: Sum and Substance. *Journal of Genetics and Genomic Research* **2**.
- Kuyumcu-Martinez NM, Cooper TA. 2006. Misregulation of alternative splicing causes pathogenesis in myotonic dystrophy. *Progress in molecular and subcellular biology* **44**: 133-159.

Bibliografía

- Latham PW. 1999. Therapeutic peptides revisited. *Nature biotechnology* **17**: 755-757.
- Lau JL, Dunn MK. 2018. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & medicinal chemistry* **26**: 2700-2707.
- Laustriat D, Gide J, Barrault L, Chautard E, Benoit C, Auboeuf D, Boland A, Battail C, Artiguenave F, Deleuze JF *et al.* 2015. In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin. *Molecular therapy Nucleic acids* **4**: e262.
- Lazarus A, Varin J, Babuty D, Anselme F, Coste J, Duboc D. 2002. Long-term follow-up of arrhythmias in patients with myotonic dystrophy treated by pacing: a multicenter diagnostic pacemaker study. *Journal of the American College of Cardiology* **40**: 1645-1652.
- Lee JE, Bennett CF, Cooper TA. 2012. RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 4221-4226.
- Lee JE, Cooper TA. 2009. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochemical Society transactions* **37**: 1281-1286.
- Lee KS, Smith K, Amieux PS, Wang EH. 2008. MBNL3/CHCR prevents myogenic differentiation by inhibiting MyoD-dependent gene transcription. *Differentiation; research in biological diversity* **76**: 299-309.
- Lee KS, Squillace RM, Wang EH. 2007. Expression pattern of muscleblind-like proteins differs in differentiating myoblasts. *Biochemical and biophysical research communications* **361**: 151-155.
- Lee KY, Li M, Manchanda M, Batra R, Charizanis K, Mohan A, Warren SA, Chamberlain CM, Finn D, Hong H *et al.* 2013. Compound loss of muscleblind-like function in myotonic dystrophy. *EMBO molecular medicine* **5**: 1887-1900.
- Lee YK, Lee JA. 2016. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB reports* **49**: 424-430.
- Lim HS, Reddy MM, Xiao X, Wilson J, Wilson R, Connell S, Kodadek T. 2009. Rapid identification of improved protein ligands using peptoid microarrays. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **19**: 3866-3869.
- Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, Day JW, Ranum LP. 2001. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* **293**: 864-867.
- Liu G, Leffak M. 2012. Instability of (CTG) n^* (CAG) n trinucleotide repeats and DNA synthesis. *Cell & bioscience* **2**: 7.
- Liu Y, Wilson SH. 2012. DNA base excision repair: a mechanism of trinucleotide repeat expansion. *Trends in biochemical sciences* **37**: 162-172.

- Logigian EL, Martens WB, Moxley RTt, McDermott MP, Dilek N, Wiegner AW, Pearson AT, Barbieri CA, Annis CL, Thornton CA *et al.* 2010. Mexiletine is an effective antimyotonia treatment in myotonic dystrophy type 1. *Neurology* **74**: 1441-1448.
- MacArthur MW, Thornton JM. 1991. Influence of proline residues on protein conformation. *Journal of molecular biology* **218**: 397-412.
- MacDonald JR, Hill JD, Tarnopolsky MA. 2002. Modafinil reduces excessive somnolence and enhances mood in patients with myotonic dystrophy. *Neurology* **59**: 1876-1880.
- Machuca-Tzili L, Thorpe H, Robinson TE, Sewry C, Brook JD. 2006. Flies deficient in Muscleblind protein model features of myotonic dystrophy with altered splice forms of Z-band associated transcripts. *Human genetics* **120**: 487-499.
- Madabattula ST, Strautman JC, Bysice AM, O'Sullivan JA, Androschuk A, Rosenfelt C, Doucet K, Rouleau G, Bolduc F. 2015. Quantitative Analysis of Climbing Defects in a Drosophila Model of Neurodegenerative Disorders. *Journal of visualized experiments : JoVE*: e52741.
- Mahato RI, Narang AS, Thoma L, Miller DD. 2003. Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* **20**: 153-214.
- Mankodi A, Logigian E, Callahan L, McClain C, White R, Henderson D, Krym M, Thornton CA. 2000. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* **289**: 1769-1773.
- Mankodi A, Urbinati CR, Yuan QP, Moxley RT, Sansone V, Krym M, Henderson D, Schalling M, Swanson MS, Thornton CA. 2001. Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Human molecular genetics* **10**: 2165-2170.
- Marteyn A, Maury Y, Gauthier MM, Lecuyer C, Vernet R, Denis JA, Pietu G, Peschanski M, Martinat C. 2011. Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell stem cell* **8**: 434-444.
- Martineau L, Racine V, Benichou SA, Puymirat J. 2018. Lymphoblastoids cell lines - Derived iPSC line from a 26-year-old myotonic dystrophy type 1 patient carrying (CTG)²⁰⁰ expansion in the DMPK gene: CHUQi001-A. *Stem cell research* **26**: 103-106.
- Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, Metzger D, Reggiani C, Schiaffino S, Sandri M. 2009. Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell metabolism* **10**: 507-515.
- Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, Ohno K. 2012. CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Scientific reports* **2**: 209.

Bibliografía

- Mateos-Aierdi AJ, Goicoechea M, Aiastui A, Fernandez-Torron R, Garcia-Puga M, Matheu A, Lopez de Munain A. 2015. Muscle wasting in myotonic dystrophies: a model of premature aging. *Frontiers in aging neuroscience* **7**: 125.
- Mathieu J, Allard P, Potvin L, Prevost C, Begin P. 1999. A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* **52**: 1658-1662.
- Mathieu J, De Braekeleer M, Prevost C. 1990. Genealogical reconstruction of myotonic dystrophy in the Saguenay-Lac-Saint-Jean area (Quebec, Canada). *Neurology* **40**: 839-842.
- Mathieu J, Prevost C. 2012. Epidemiological surveillance of myotonic dystrophy type 1: a 25-year population-based study. *Neuromuscular disorders : NMD* **22**: 974-979.
- Matloka M, Klein AF, Rau F, Furling D. 2018. Cells of Matter-In Vitro Models for Myotonic Dystrophy. *Frontiers in neurology* **9**: 361.
- Matsumoto R, Okochi M, Shimizu K, Kanie K, Kato R, Honda H. 2015. Effects of the properties of short peptides conjugated with cell-penetrating peptides on their internalization into cells. *Scientific reports* **5**: 12884.
- Matsumura T, Yokoe M, Nakamori M, Hattori N, Saito T, Nozaki S, Fujimura H, Shinno S. 2004. [A clinical trial of creatine monohydrate in muscular dystrophy patients]. *Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology* **44**: 661-666.
- McMahon DK, Anderson PA, Nassar R, Bunting JB, Saba Z, Oakeley AE, Malouf NN. 1994. C2C12 cells: biophysical, biochemical, and immunocytochemical properties. *The American journal of physiology* **266**: C1795-1802.
- McMurray CT. 2010. Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nature reviews Genetics* **11**: 786-799.
- Miller JW, Urbinati CR, Teng-Umnuaay P, Stenberg MG, Byrne BJ, Thornton CA, Swanson MS. 2000. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *The EMBO journal* **19**: 4439-4448.
- Mirkin SM. 2006. DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders. *Current opinion in structural biology* **16**: 351-358.
- . 2007. Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* **447**: 932-940.
- Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G. 2001. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nature biotechnology* **19**: 1173-1176.
- Morrison KL, Weiss GA. 2001. Combinatorial alanine-scanning. *Current opinion in chemical biology* **5**: 302-307.
- Nakamori M, Sobczak K, Puwanant A, Welle S, Eichinger K, Pandya S, Dekdebrun J, Heatwole CR, McDermott MP, Chen T *et al.* 2013. Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy. *Annals of neurology* **74**: 862-872.

- Nakamori M, Taylor K, Mochizuki H, Sobczak K, Takahashi MP. 2016. Oral administration of erythromycin decreases RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Annals of clinical and translational neurology* **3**: 42-54.
- Narwani TJ, Santuz H, Shinada N, Melarkode Vattekatte A, Ghouzam Y, Srinivasan N, Gelly JC, de Brevern AG. 2017. Recent advances on polyproline II. *Amino acids* **49**: 705-713.
- Nygren J, Svanvik N, Kubista M. 1998. The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. *Biopolymers* **46**: 39-51.
- O'Leary DA, Vargas L, Sharif O, Garcia ME, Sigal YJ, Chow SK, Schmedt C, Caldwell JS, Brinker A, Engels IH. 2010. HTS-Compatible Patient-Derived Cell-Based Assay to Identify Small Molecule Modulators of Aberrant Splicing in Myotonic Dystrophy Type 1. *Current chemical genomics* **4**: 9-18.
- Oddo JC, Saxena T, McConnell OL, Berglund JA, Wang ET. 2016. Conservation of context-dependent splicing activity in distant Muscleblind homologs. *Nucleic acids research* **44**: 8352-8362.
- Orengo JP, Chambon P, Metzger D, Mosier DR, Snipes GJ, Cooper TA. 2008. Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 2646-2651.
- Ostergaard S, Holm A. 1997. Peptomers: a versatile approach for the preparation of diverse combinatorial peptidomimetic bead libraries. *Molecular diversity* **3**: 17-27.
- Park J, Ryu J, Kim KA, Lee HJ, Bahn JH, Han K, Choi EY, Lee KS, Kwon HY, Choi SY. 2002. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. *The Journal of general virology* **83**: 1173-1181.
- Park S, Phukan PD, Zeeb M, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. 2017. Structural Basis for Interaction of the Tandem Zinc Finger Domains of Human Muscleblind with Cognate RNA from Human Cardiac Troponin T. *Biochemistry* **56**: 4154-4168.
- Patch JA, Barron AE. 2002. Mimicry of bioactive peptides via non-natural, sequence-specific peptidomimetic oligomers. *Current opinion in chemical biology* **6**: 872-877.
- Perbellini R, Greco S, Sarra-Ferraris G, Cardani R, Capogrossi MC, Meola G, Martelli F. 2011. Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscular disorders : NMD* **21**: 81-88.
- Perfetti A, Greco S, Bugiardini E, Cardani R, Gaia P, Gaetano C, Meola G, Martelli F. 2014. Plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscular disorders : NMD* **24**: 509-515.

Bibliografía

- Petri H, Vissing J, Witting N, Bundgaard H, Kober L. 2012. Cardiac manifestations of myotonic dystrophy type 1. *International journal of cardiology* **160**: 82-88.
- Pettersson OJ, Aagaard L, Jensen TG, Damgaard CK. 2015. Molecular mechanisms in DM1 - a focus on foci. *Nucleic acids research* **43**: 2433-2441.
- Philips AV, Timchenko LT, Cooper TA. 1998. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* **280**: 737-741.
- Picchio L, Plantie E, Renaud Y, Poovthumkadavil P, Jagla K. 2013. Novel Drosophila model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Human molecular genetics* **22**: 2795-2810.
- Pinilla C, Appel J, Blondelle S, Dooley C, Dorner B, Eichler J, Ostresh J, Houghten RA. 1995. A review of the utility of soluble peptide combinatorial libraries. *Biopolymers* **37**: 221-240.
- Pisani V, Panico MB, Terracciano C, Bonifazi E, Meola G, Novelli G, Bernardi G, Angelini C, Massa R. 2008. Preferential central nucleation of type 2 myofibers is an invariable feature of myotonic dystrophy type 2. *Muscle & nerve* **38**: 1405-1411.
- Poulos MG, Batra R, Li M, Yuan Y, Zhang C, Darnell RB, Swanson MS. 2013. Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Human molecular genetics* **22**: 3547-3558.
- Pratte A, Prevost C, Puymirat J, Mathieu J. 2015. Anticipation in myotonic dystrophy type 1 parents with small CTG expansions. *American journal of medical genetics Part A* **167A**: 708-714.
- Prochiantz A. 2011. Homeoprotein intercellular transfer, the hidden face of cell-penetrating peptides. *Methods in molecular biology* **683**: 249-257.
- Pujals S, Giralt E. 2008. Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides. *Advanced drug delivery reviews* **60**: 473-484.
- Purcell J, Oddo JC, Wang ET, Berglund JA. 2012. Combinatorial mutagenesis of MBNL1 zinc fingers elucidates distinct classes of regulatory events. *Molecular and cellular biology* **32**: 4155-4167.
- Raaijmakers RHL, Ripken L, Ausems CRM, Wansink DG. 2019. CRISPR/Cas Applications in Myotonic Dystrophy: Expanding Opportunities. *International journal of molecular sciences* **20**.
- Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS *et al.* 2015. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* **520**: 186-191.
- Ranum LP, Cooper TA. 2006. RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annual review of neuroscience* **29**: 259-277.
- Rau F, Freyermuth F, Fugier C, Villemin JP, Fischer MC, 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. *Nature structural & molecular biology* **18**: 840-845.

- Raucher D, Ryu JS. 2015. Cell-penetrating peptides: strategies for anticancer treatment. *Trends in molecular medicine* **21**: 560-570.
- Ravel-Chapuis A, Belanger G, Yadava RS, Mahadevan MS, DesGroseillers L, Cote J, Jasmin BJ. 2012. The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *The Journal of cell biology* **196**: 699-712.
- Reddy S, Smith DB, Rich MM, Leferovich JM, Reilly P, Davis BM, Tran K, Rayburn H, Bronson R, Cros D *et al.* 1996. Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nature genetics* **13**: 325-335.
- Rezai T, Bock JE, Zhou MV, Kalyanaraman C, Lokey RS, Jacobson MP. 2006. Conformational flexibility, internal hydrogen bonding, and passive membrane permeability: successful in silico prediction of the relative permeabilities of cyclic peptides. *Journal of the American Chemical Society* **128**: 14073-14080.
- Rolfsmeier ML, Lahue RS. 2000. Stabilizing effects of interruptions on trinucleotide repeat expansions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **20**: 173-180.
- Saini A. VG. 2017. Peptoids: tomorrow's therapeutics. in *Nanostructures for Novel Therapy* (ed. E Inc.), pp. 151-180, Panjab University, Chandigarh, India.
- Sarkar PS, Appukuttan B, Han J, Ito Y, Ai C, Tsai W, Chai Y, Stout JT, Reddy S. 2000. Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nature genetics* **25**: 110-114.
- Schiaffino S, Reggiani C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews* **91**: 1447-1531.
- Schneider-Gold C, Beck M, Wessig C, George A, Kele H, Reiners K, Toyka KV. 2003. Creatine monohydrate in DM2/PROMM: a double-blind placebo-controlled clinical study. Proximal myotonic myopathy. *Neurology* **60**: 500-502.
- Selma-Soriano E, Artero R, Llamusi B. 2018. Optical Cross-Sectional Muscle Area Determination of *Drosophila Melanogaster* Adult Indirect Flight Muscles. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Shah KA, Shishkin AA, Voineagu I, Pavlov YI, Shcherbakova PV, Mirkin SM. 2012. Role of DNA polymerases in repeat-mediated genome instability. *Cell reports* **2**: 1088-1095.
- Siboni RB, Nakamori M, Wagner SD, Struck AJ, Coonrod LA, Harriott SA, Cass DM, Tanner MK, Berglund JA. 2015. Actinomycin D Specifically Reduces Expanded CUG Repeat RNA in Myotonic Dystrophy Models. *Cell reports* **13**: 2386-2394.
- Silvers R, Keller H, Schwalbe H, Hengesbach M. 2015. Differential scanning fluorimetry for monitoring RNA stability. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **16**: 1109-1114.

Bibliografía

- Simon RJ, Kania RS, Zuckermann RN, Huebner VD, Jewell DA, Banville S, Ng S, Wang L, Rosenberg S, Marlowe CK *et al.* 1992. Peptoids: a modular approach to drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 9367-9371.
- Squillace RM, Chenault DM, Wang EH. 2002. Inhibition of muscle differentiation by the novel muscleblind-related protein CHCR. *Developmental biology* **250**: 218-230.
- Stahl K, Wenninger S, Schuller A, Montagnese F, Schoser B. 2016. [Educational and Professional Qualifications of Adults With Myotonic Dystrophies - A Misleading Perception by the Myopathic Face?]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* **84**: 211-216.
- Suenaga K, Lee KY, Nakamori M, Tatsumi Y, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Du H, Ares M, Jr. *et al.* 2012. Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. *PLoS one* **7**: e33218.
- Sugino M, Ohsawa N, Ito T, Ishida S, Yamasaki H, Kimura F, Shinoda K. 1998. A pilot study of dehydroepiandrosterone sulfate in myotonic dystrophy. *Neurology* **51**: 586-589.
- Sznajder LJ, Michalak M, Taylor K, Cywoniuk P, Kabza M, Wojtkowiak-Szlachcic A, Matloka M, Konieczny P, Sobczak K. 2016. Mechanistic determinants of MBNL activity. *Nucleic acids research* **44**: 10326-10342.
- Sznajder LJ, Swanson MS. 2019. Short Tandem Repeat Expansions and RNA-Mediated Pathogenesis in Myotonic Dystrophy. *International journal of molecular sciences* **20**.
- Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JKW, Chew WL, Widrick JJ, Yan WX, Maesner C, Wu EY, Xiao R, Ran FA *et al.* 2016. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* **351**: 407-411.
- Takechi Y, Tanaka H, Kitayama H, Yoshii H, Tanaka M, Saito H. 2012. Comparative study on the interaction of cell-penetrating polycationic polymers with lipid membranes. *Chemistry and physics of lipids* **165**: 51-58.
- Takeshima K, Ariyasu H, Ishibashi T, Kawai S, Uraki S, Koh J, Ito H, Akamizu T. 2018. Myotonic dystrophy type 1 with diabetes mellitus, mixed hypogonadism and adrenal insufficiency. *Endocrinology, diabetes & metabolism case reports* **2018**.
- Tang GY, Pribisko MA, Henning RK, Lim P, Termini J, Gray HB, Grubbs RH. 2015. An in vitro enzymatic assay to measure transcription inhibition by gallium(III) and H₃ 5,10,15-tris(pentafluorophenyl)corroles. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. 2005. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **1**: 84-91.

- Tanida I, Ueno T, Kominami E. 2004. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**: 2503-2518.
- Taylor K, Sznajder LJ, Cywoniuk P, Thomas JD, Swanson MS, Sobczak K. 2018. MBNL splicing activity depends on RNA binding site structural context. *Nucleic acids research* **46**: 9119-9133.
- Taylor M. 2006. Comparison of muscle development in *Drosophila* and vertebrates. in *Muscle Development in Drosophila* (ed. H Sink), pp. 169-203. Landes Bioscience / Springer, Georgetown, TX/New York, NY.
- Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, Spratt SK, Surosky RT, Giedlin MA, Nichol G *et al.* 2014. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *The New England journal of medicine* **370**: 901-910.
- Teplova M, Patel DJ. 2008. Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nature structural & molecular biology* **15**: 1343-1351.
- Theadom A, Rodrigues M, Roxburgh R, Balalla S, Higgins C, Bhattacharjee R, Jones K, Krishnamurthi R, Feigin V. 2014. Prevalence of muscular dystrophies: a systematic literature review. *Neuroepidemiology* **43**: 259-268.
- Thomas JD, Oliveira R, Sznajder LJ, Swanson MS. 2018. Myotonic Dystrophy and Developmental Regulation of RNA Processing. *Comprehensive Physiology* **8**: 509-553.
- Thomas JD, Sznajder LJ, Bardhi O, Aslam FN, Anastasiadis ZP, Scotti MM, Nishino I, Nakamori M, Wang ET, Swanson MS. 2017. Disrupted prenatal RNA processing and myogenesis in congenital myotonic dystrophy. *Genes & development* **31**: 1122-1133.
- Thornell LE, Lindstrom M, Renault V, Klein A, Mouly V, Ansved T, Butler-Browne G, Furling D. 2009. Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1. *Neuropathology and applied neurobiology* **35**: 603-613.
- Thornton CA, Griggs RC, Moxley RT, 3rd. 1994. Myotonic dystrophy with no trinucleotide repeat expansion. *Annals of neurology* **35**: 269-272.
- Thornton CA, Wymer JP, Simmons Z, McClain C, Moxley RT, 3rd. 1997. Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nature genetics* **16**: 407-409.
- Tian B, White RJ, Xia T, Welle S, Turner DH, Mathews MB, Thornton CA. 2000. Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Rna* **6**: 79-87.
- Todd PK, Ackall FY, Hur J, Sharma K, Paulson HL, Dowling JJ. 2014. Transcriptional changes and developmental abnormalities in a zebrafish model of myotonic dystrophy type 1. *Disease models & mechanisms* **7**: 143-155.

Bibliografía

- Tran PL, Largy E, Hamon F, Teulade-Fichou MP, Mergny JL. 2011. Fluorescence intercalator displacement assay for screening G4 ligands towards a variety of G-quadruplex structures. *Biochimie* **93**: 1288-1296.
- Tunnemann G, Ter-Avetisyan G, Martin RM, Stockl M, Herrmann A, Cardoso MC. 2008. Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **14**: 469-476.
- Usdin K, House NC, Freudenreich CH. 2015. Repeat instability during DNA repair: Insights from model systems. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **50**: 142-167.
- Vattemi G, Tomelleri G, Filosto M, Savio C, Rizzuto N, Tonin P. 2005. Expression of late myogenic differentiation markers in sarcoplasmic masses of patients with myotonic dystrophy. *Neuropathology and applied neurobiology* **31**: 45-52.
- Vicente-Crespo M, Pascual M, Fernandez-Costa JM, Garcia-Lopez A, Monferrer L, Miranda ME, Zhou L, Artero RD. 2008. Drosophila muscleblind is involved in troponin T alternative splicing and apoptosis. *PLoS one* **3**: e1613.
- Vita G, Vita GL, Musumeci O, Rodolico C, Messina S. 2019. Genetic neuromuscular disorders: living the era of a therapeutic revolution. Part 2: diseases of motor neuron and skeletal muscle. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* **40**: 671-681.
- Volle CB, Delaney S. 2012. CAG/CTG repeats alter the affinity for the histone core and the positioning of DNA in the nucleosome. *Biochemistry* **51**: 9814-9825.
- Wagner SD, Struck AJ, Gupta R, Farnsworth DR, Mahady AE, Eichinger K, Thornton CA, Wang ET, Berglund JA. 2016. Dose-Dependent Regulation of Alternative Splicing by MBNL Proteins Reveals Biomarkers for Myotonic Dystrophy. *PLoS genetics* **12**: e1006316.
- Wakimoto H, Maguire CT, Sherwood MC, Vargas MM, Sarkar PS, Han J, Reddy S, Berul CI. 2002. Characterization of cardiac conduction system abnormalities in mice with targeted disruption of Six5 gene. *Journal of interventional cardiac electrophysiology : an international journal of arrhythmias and pacing* **7**: 127-135.
- Wang ET, Cody NA, Jog S, Biancolella M, Wang TT, Treacy DJ, Luo S, Schroth GP, Housman DE, Reddy S *et al.* 2012a. Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell* **150**: 710-724.
- Wang ET, Ward AJ, Cherone JM, Giudice J, Wang TT, Treacy DJ, Lambert NJ, Freese P, Saxena T, Cooper TA *et al.* 2015. Antagonistic regulation of mRNA expression and splicing by CELF and MBNL proteins. *Genome research* **25**: 858-871.

- Wang GS, Kearney DL, De Biasi M, Taffet G, Cooper TA. 2007. Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *The Journal of clinical investigation* **117**: 2802-2811.
- Wang LC, Chen KY, Pan H, Wu CC, Chen PH, Liao YT, Li C, Huang ML, Hsiao KM. 2011. Muscleblind participates in RNA toxicity of expanded CAG and CUG repeats in *Caenorhabditis elegans*. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**: 1255-1267.
- Wang Y, Ma M, Xiao X, Wang Z. 2012b. Intronic splicing enhancers, cognate splicing factors and context-dependent regulation rules. *Nature structural & molecular biology* **19**: 1044-1052.
- Ward AJ, Rimer M, Killian JM, Dowling JJ, Cooper TA. 2010. CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Human molecular genetics* **19**: 3614-3622.
- Warf MB, Diegel JV, von Hippel PH, Berglund JA. 2009. The protein factors MBNL1 and U2AF65 bind alternative RNA structures to regulate splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 9203-9208.
- West SD, Lochmuller H, Hughes J, Atalaia A, Marini-Bettolo C, Baudouin SV, Anderson KN. 2016. Sleepiness and Sleep-related Breathing Disorders in Myotonic Dystrophy and Responses to Treatment: A Prospective Cohort Study. *Journal of neuromuscular diseases* **3**: 529-537.
- Westerlaken JH, Van der Zee CE, Peters W, Wieringa B. 2003. The DMWD protein from the myotonic dystrophy (DM1) gene region is developmentally regulated and is present most prominently in synapse-dense brain areas. *Brain research* **971**: 116-127.
- Wheeler TM, Leger AJ, Pandey SK, MacLeod AR, Nakamori M, Cheng SH, Wentworth BM, Bennett CF, Thornton CA. 2012. Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature* **488**: 111-115.
- Wicklund MP. 2013. The muscular dystrophies. *Continuum* **19**: 1535-1570.
- Williamson MP. 1994. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *The Biochemical journal* **297 (Pt 2)**: 249-260.
- Witherspoon L, O'Reilly S, Hadwen J, Tasnim N, MacKenzie A, Farooq F. 2015. Sodium Channel Inhibitors Reduce DMPK mRNA and Protein. *Clinical and translational science* **8**: 298-304.
- Witten JT, Ule J. 2011. Understanding splicing regulation through RNA splicing maps. *Trends in genetics : TIG* **27**: 89-97.
- Wu CW, Sanborn TJ, Huang K, Zuckermann RN, Barron AE. 2001. Peptoid oligomers with alpha-chiral, aromatic side chains: sequence requirements for the formation of stable peptoid helices. *Journal of the American Chemical Society* **123**: 6778-6784.

Bibliografía

- Xia G, Gao Y, Jin S, Subramony SH, Terada N, Ranum LP, Swanson MS, Ashizawa T. 2015. Genome modification leads to phenotype reversal in human myotonic dystrophy type 1 induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells. *Stem cells* **33**: 1829-1838.
- Yadava RS, Foff EP, Yu Q, Gladman JT, Kim YK, Bhatt KS, Thornton CA, Zheng TS, Mahadevan MS. 2015. TWEAK/Fn14, a pathway and novel therapeutic target in myotonic dystrophy. *Human molecular genetics* **24**: 2035-2048.
- Yadava RS, Frenzel-McCardell CD, Yu Q, Srinivasan V, Tucker AL, Puymirat J, Thornton CA, Prall OW, Harvey RP, Mahadevan MS. 2008. RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression. *Nature genetics* **40**: 61-68.
- Yang NJ, Hinner MJ. 2015. Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. *Methods in molecular biology* **1266**: 29-53.
- Yildirim I, Chakraborty D, Disney MD, Wales DJ, Schatz GC. 2015. Computational investigation of RNA CUG repeats responsible for myotonic dystrophy 1. *Journal of chemical theory and computation* **11**: 4943-4958.
- Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, Lim WA. 2003. The structure and function of proline recognition domains. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2003**: RE8.
- Zhang F, Bodycombe NE, Haskell KM, Sun YL, Wang ET, Morris CA, Jones LH, Wood LD, Pletcher MT. 2017. A flow cytometry-based screen identifies MBNL1 modulators that rescue splicing defects in myotonic dystrophy type 1. *Human molecular genetics* **26**: 3056-3068.
- Zhang P, Lock LL, Cheetham AG, Cui H. 2014. Enhanced cellular entry and efficacy of tat conjugates by rational design of the auxiliary segment. *Molecular pharmaceutics* **11**: 964-973.
- Zuckermann RN, Kodadek T. 2009. Peptoids as potential therapeutics. *Current opinion in molecular therapeutics* **11**: 299-307.