



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

**Ruta de la autofagia, MSI2 y miR-7 como nuevas dianas
terapéuticas para la disfunción muscular en distrofia
miotónica tipo 1**

Programa de Doctorado en Fisiología

Tesis Doctoral
Maria Sabater Arcís
Diciembre 2021

Trabajo dirigido por:
Dr. Rubén D. Artero Allepuz
Dra. Ariadna Bargiela Schönbrunn

Tutor académico
Federico Vte. Pallardó Calatayud



Departamento de Genética



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

Dra. **ARIADNA BARGIELA SCHÖNBRUNN**, Doctora en Biotecnología e Investigadora Post-doctoral en la *Universitat de València*

CERTIFICAN

Que Doña María Sabater Arcís, graduada en Bioquímica y Ciencias Biomédicas por la *Universitat de València*, ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo de investigación y artículos originales adjuntos recogidos en la presente memoria titulada “Ruta de la autofagia, MSI2 y miR-7 como nuevas dianas terapéuticas para la disfunción muscular en distrofia miotónica tipo 1”.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo en el Departamento de Genética de la Universidad de Valencia, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctora por la *Universitat de València* dentro del Programa Oficial de Doctorado en Fisiología.

En Valencia, a 29 de diciembre de 2021

Dr. Rubén D. Artero Allepuz

Dra. Ariadna Bargiela Schönbrunn

-Agradecimientos-

No se muy bien por dónde empezar a agradecer a cada uno de los que habéis formado o formáis parte de este camino tan duro, pero a la vez tan “chulo” y que no cambiaría porque cada una de mis decisiones han hecho que esté donde estoy. Y sí, a pesar de lo que podáis pensar muchos, digo “chulo” porque gracias a recorrerlo me he encontrado con personas que me han aportado y me aportan tantas cosas día tras día y que se han convertido, muchos de ellos en fundamentales en mi vida. Si me paro a pensar, he evolucionado tanto, la persona que entró en la carrera mantiene su esencia, pero GRACIAS a las vivencias y puntos de vista tan diferentes a los míos que me habéis aportado cada uno de vosotros en diferentes aspectos he cambiado tantísimo. Cada uno de vosotros sois piezas que conforman mi faro, un faro que SIEMPRE da luz y me guía, cuando ni yo sé dónde estoy. (Me encantaría tener un libro entero para dedicaros a cada uno su momento, pero esto es muy limitado).

Si hablamos de camino no podría empezar por otra persona que no fuera Javi... ¡sí tú titorri, Javixu! Cuando llegué a Valencia para empezar este viaje, el primer día de carrera te conocí en el colegio mayor y como siempre decimos BENDITO DÍA. A partir de ahí te has convertido en un pilar tan fundamental en mi día a día, eres una de las cosas que me ha dado la ciencia y que más agradezco todos los días porque gracias a ella nos cruzamos y me siento tan afortunada de formar parte de tú mundo, un mundo de LUZ. Gracias por SER y ESTAR SIEMPRE a pesar de la distancia, GRACIAS por ser un apoyo INCONDICIONAL y tan fuerte, por escucharme, por soportarme, por hacerme rabiar/reír, por aconsejarme y darle la vuelta a lo que yo pensaba. En definitiva, ser una de las amistades más reales que tengo. Juntos hemos crecido personalmente pero también científicamente, GRACIAS por impulsarme, cogerme de la mano, hacerme volar y darme la confianza día tras días en TODO. ¡Nos quedan millones de islas y mundo por descubrir juntos, es el mejor regalo que nos podemos brindar! Y como bien dice el sombrerero de Alicia, **Sabes cuál es el problema de este mundo? Todos quieren una solución mágica a los problemas, pero todos rehúsan creer en la magia.** Y tú me has enseñado a creer en la magia.

Continuando en este viaje, en la carrera conocí a mi grupo FOLLAPO. A cada uno de vosotros os podría escribir un libro. ¡Aunque fue duro, esos 4 años no los cambiaría por nada porque fueron tan especiales GRACIAS a vosotros... solo nosotros sabemos

todo lo que vivimos y fue ESPECIAL! Vamos, un ESPECTACLE. Y a día de hoy, puedo decir que aún vivimos momentos mágicos cuando nos juntamos. GRACIAS.

Mi núcleo familiar.... Poyis que decirte a ti que ya no sepas, 12 años ya.... me has salvado tantas tantas veces de la locura con una tarde de cerves, con un simple aaais Maria, con tantos consejos, con el hecho de estar SIEMPRE cuando lo necesito, con escucharme, hacerme reir tantísimo y olvidarme de todo, de verdad eres uno de los apoyos más fuertes que tengo y creo que todos lo saben... pocas personas he conocido tan transparentes y con el corazón tan grande como el tuyo... estar a tu lado es símbolo de TRANQUILIDAD y casa. Gracias por ser tan DISFRUTÓN y transmitírmelo. Gracias por escucharme y hablar de ciencia con unas cerves de más, cuando todos nos decían que pesaos. Nos hemos desahogado tantas veces de cosas de ciencia y de todo el general, y verte crecer también como persona está siendo BRUTAL. Lo sabes todo, pero una vez más te digo que GRACIAS por cruzarte y mantenerte en mi vida amigo. Alvarito que quieres que te diga a tí también, pues lo mismo que a Poyis, no puedo decirte otra cosa que no sea GRACIAS en mayúscula, compartir millones de momentos en la carrera, aguantarme a mi viviendo juntos en BCN y estos años en el doctorado en Valencia pues ya me dirás lo afortunada que me puedo sentir. Gracias por quitarle hierro a muchos problemas y transformarlos en soluciones, o simplemente en darme un abrazo que soluciona todo. Gracias por cuidarme en la sombra. Vicky a ti más de lo mismo, como te digo siempre sois familia para mí y de las cosas más bonitas que me llevo en este camino... una amistad para siempre. Han sido tantos momentos con vosotros y todos al final buenos y de aprendizaje. Sed conscientes que me habéis dado un doctorado de VIDA. GRACIAS por hacer los días más cortos y las sonrisas más largas. (Águeda tú después).

Als meus inmunitos (Noemi, la judi, Marta, Jon y Arnau), només dir-vos GRÀCIES per ser tan com jo i per fer-me sentir tan agust al vostre costat, trobar a personas tan complementaries és molt difícil. Barcelona ni el màster hagueren sigut el mateix sense vosaltres. Pot ser que la pàndemia ha fet que veure'ns siga més difícil i també que cada un ha agafa't camins diferents. Però la magia està que en el moment de unir-mos, és com si no passés el temps. ¡Os vull Pavas unidas!

Siguiendo el camino me encontré a unas personitas en el labo que han transformado estos años de doctorado un camino de dificultad máxima a un camino

INCREIBLE/ÚNICO. He pasado más horas con ellas que casi en mi casa y puedo asegurar que me han visto conforme es Maria al 100% en toda su plenitud para bien y para mal... y por ello solo puedo decir que GRACIAS. Fany, pues es que diga lo que te diga me puedo quedar más que corta. Empezaste siendo una persona súper guay que me enseñó y me acogió al completo (vamos una mami), y te convertiste en un pilar crucial no solo a nivel laboral sino lo más importante, a nivel personal... en una AMIGA. Me faltarían hojas para expresar todo. Hemos vivido momentos tan diferentes con charlas interminables con momentos duros que hemos sabido salir más reforzadas, risas, viajes, fiesta, momentos de escucharnos y compartir mucha mierda porque ambas sabemos que esto es un camino duro, pero siempre has sabido darle la vuelta a la tortilla y acabar haciendo tonterías y riéndonos hasta más no poder. Me has visto evolucionar desde el inicio y sobre todo me has impulsado y dado confianza, y es algo que no olvidaré nunca porque en ese aprendizaje científico, pero sobre todo personal, me has aportado mucho. Nere (mi hermana) no puedo decir otra cosa que GRACIAS por ser una AMIGA que SIEMPRE estás ahí para todo, y científicamente gracias por ayudarme tantísimo y ser uno de los apoyos más fuertes que tengo, gran parte de este trabajo es gracias a ti. Gracias por enseñarme que el trabajo en equipo es el mejor, "team". Descubrirte ha sido una suerte para mí, porque todos los momentos vividos contigo han sido tan espectaculares y los has hecho tan especiales (festis, viajes, momentos de apoyo, de fiesta, momentos de estar). Gracias por cada uno de ellos, has hecho que este camino fuera muy fácil. Y quiero decirte que tienes una fuerza interior que vas a llegar donde te propongas. Ire, gracias por abrirte tanto a mí, por enseñarme parte de tu corazoncito, también por estar siempre en los momentos clave y hacerme partícipe de todo. Gracias por los momentos de vida, porque has hecho que más allá de lo científico este camino sea muy divertido. Eres una persona clara y eso es super especial. Anna gracias por aportar esa naturalidad. Naty, creo eres una persona con un corazón enorme y me apetece mucho conocerte más, gracias por aportar tanta calidez. Andrea, me encanta tú espontaneidad y molas mucho. Piotr, gracias por tus bizcochitos, por tus momentos de estar ahí prontito y aconsejar siempre, y las fiestas que nos hemos pegado.

También agradecer a la gente que ya no está pero que han hecho muchos momentos inolvidables Anna, Mouli, Juanma. A mis chicos Marc y Alejandro, gracias

por toda la ayuda que me habéis dado. María Ángeles, no podrías faltar, tu voccita diciendo "bichito 2" todas las mañanas no sabes cuanto me has alegrado y dado fuerzas. Carmen gracias por toda la ayuda y tú alegría, hiciste que las cosas fueran fáciles los primeros años en cultivos. Inma, gracias por tu pasión y por toda la ayuda con los ratoncitos.

Mi familia paralela de la fe (Jessi (gracias por ser tan cercana), Inma, Elisa, Roger, Adri, Lorena, Marta, Raquel), gracias por que en estos últimos años me habéis integrado como una más de allí. Gracias por esos almuerzitos, cervecitas, risas y sobre todo por los consejos. Sois personas muy guays, vivir en Valencia mola más desde que os cruzasteis en mi camino. Aportáis siempre cosas buenas.

Y de momento.... Me encontré con alguien en este camino y nuestras flechas se fusionaron...Mi SIAMESA, Águeda. Los que me conocéis sabéis porque somos siamesas. Una de las personas que más agradezco a la ciencia por ponérmela en mi camino, y chocarnos de cara (PUUUUM). Podría escribir una tesis entera agradeciéndote cada momento vivido contigo, pero creo que esa tesis no la quiero escribir porque vamos a seguir sumando momentos. Me has hecho dar un giro a mi forma de ver las cosas de 360º en cuanto a ciencia, pero sobre todo en cuanto a VIDA. GRACIAS por confiar siempre en mí, valorarme como la que más, ser uno de los apoyos más fuertes que he tenido/tengo y darme ese aliento cuando ya estaba en un punto de asqueamiento máximo, de hacerme ver que la ciencia me gusta. Gracias por llegar al punto que con una mirada nos comunicamos, gracias por entenderme tan bien y saber siempre hacer ese CLICK que siempre hace falta. Gracias por esa sincronizació que solo nosotras sabemos. En definitiva, como siempre decimos GRACIAS por aparecer, ser, estar, permanecer y hacerme crecer como 100tífica y sobre todo como PERSONA. Tú también tienes una fuerza interior que sé que la estás descubriendo, pero cuando eclosiones del tot va a ser BRUTAL, confía en ti y harás cosas impresionantes.

Mi trébol (Ana, Ángela y Sheila). GRACIAS por estar SIEMPRE para escucharme, aconsejarme o simplemente estar a mi lado, aunque no tuvierais ni idea de nada de lo que os contara de ciencia. Gracias por ser esa parte del faro que no podría faltar sino se derrumba. Gracias por conocerme como las que más. Gracias por ser mi vía de escape. Vosotras sí que habéis visto mi evolución en todos los sentidos y os puedo

asegurar que, aunque no tengáis que ver con nada de la ciencia, este trabajo en parte es gracias a vosotras, porque cada una de vosotras me habéis enseñado muchos valores. GRACIAS por caminar junto a mi y no soltarme de la mano. Por toda una vida juntas en todas las etapas que nos vengán.

Rubén, gracias por transmitirme esa curiosidad y pasión por la ciencia. Gracias por confiar en mí, y sobre todo gracias por hacer que yo haya ganado confianza científicamente. Gracias por dejarme libre en cuanto a pensar, proponer y probar cosas porque, aunque fueran tonterías o locuras, tú siempre me has escuchado y me has aconsejado. Gracias por hacerme ver que hay que ser ambiciosos que, si se tiene una idea, hay que apostar por ella e intentarlo. Gracias por ver mi evolución y apostar por mí.

Ari, mi team desde que llegué, mi mami científica diría yo. Allá por 2013-14 cuando empecé las prácticas, cuando era una "xiqueta" me conociste, y ya empezamos a congeniar. Después del máster, me animaste a volver al labo. y desde ahí siempre has estado detrás en la sombra apoyándome, protegiéndome y apostando por mí. Poco a poco hemos formado un equipo y me siento muy afortunada. Hemos sacado cosas muy chulas, espero seguir sumando. Has sabido conocerme y saber cuando estaba bien o no. También has visto mi evolución en todos los sentidos y me has dado confianza en muchas ocasiones para hacer cosas que no me atrevía, la mini investigadora que soy ahora, pero le queda mucho por aprender, es en parte gracias a ti.

No podía terminar de otra forma que no fuera con el apoyo más grande de todos, la base de este faro y la luz, los que han hecho que yo sea la persona que soy, los que más me han visto reír, llorar y han sabido escuchar cosas de ciencia sin tener ni idea mi FAMILIA (Peter (papa), Mama, tete, Susana y Júlia). A la gente que lea esto, solo puedo decir una cosa, soy la persona más afortunada del mundo, y lo sabréis si conocéis a estas personas.

-Mamá: la conexión que tenemos es indescriptible. Simplemente sentir un abrazo tuyo ha sido suficiente para resolver todos los problemas científicos del mundo y los no científicos. GRACIAS por enseñarme los valores más importantes para llegar donde quiera en ciencia, vida o donde sea.... El AMOR, el respeto, el ser buena persona, la

empatía, el soñar, y disfrutar de cada momento y de las pequeñas cosas, como un amanecer, atardecer (los que me conocéis sabéis que me encanta, pues es gracias a ella), es decir estar en el presente. Gracias por tener la capacidad de levantarme cuando yo no podía y de repetirme tantas veces... “María lluita per lo que t’agrada i els teus somnis, nosaltres estarem así SEMPRE al teu costat en tot el que elegisques”. Gràcies mamá per no soltar-me la mà mai però deixar que vole al meu ritme.

-Papa (Peter): mi debilidad, un referente para mí. Siempre me he visto muy reflejada en ti. Gracias por enseñarme valores de esfuerzo, constancia, a ser libre, a decir lo que uno piensa siempre con respeto, ser sincero con uno mismo y no perder la esencia. Gracias por mostrarme que en la paciencia está la virtud, que hay veces que el camino no es fácil, pero si se quiere algo hay que ir a por ello y que al final todo tiene su resultado. Por que tú eres el que has puesto en mí la semillita de la ciencia (no em sigut molt de lletres nosaltres, jajja). Verte trabajar con esa pasión, dedicación y esfuerzo, contar lo que hacías cuando era algo nuevo que diseñabas tú con esos ojitos de transmitir ilusión y ganas ha sido una fuente de inspiración para mí en este camino. Gracias por mostrarme el mundo de la ciencia. Te puedo asegurar que gracias a ti estoy aquí. Gràcies papa per dir-me SEMPRE la frase “Confia en tú caxorreta, vals moltíssim, el que faces estarà bé per que ho has triat tú i anirà tot bé” i abraçar-me amb una calidesa que mai m’han donat. Gràcies per donar seny a la meua vida.

I als dos gràcies per LLUITAR de forma incondicional per nosaltres.

-Marc (tete): voy a ser breve, sé que tú eres una persona más de demostrar que decir, y eso justo me has demostrado durante todo este camino. Has estado ahí SIEMPRE que he necesitado. Desde pequeña para mí has sido un referente, una persona transparente con un corazón enorme que cuida como el que más a los que quiere, que arriesga por las oportunidades sin plantearse si puede salir mal porque, como bien dices, eso nunca se puede saber sino lo pruebas, y si esa no es la oportunidad, ya vendrán otras. Gracias también por enseñarme a disfrutar y hacer que no sea tan cuadrículada (en eso he cambiado mucho). En definitiva, ¡gràcies per estar al meu costat tete!

-Susana: gràcies per formar part de la familia. Gracias por ser una persona que transmite una tranquilidad impresionante. Sin tú saberlo he aprendido muchísimas

cosas de ti que me han servido en este camino. Aunque lo más destacable sería tú pasión por tú trabajo. Eres una persona que haces que las cosas sean fáciles. GRACIAS por transmitirme PAZ.

-Júlia: el amor més real de la meua VIDA. No podía terminar con otra persona que no fueras tú. Llegaste a mitad doctorado (2018), y tú no eres consciente, pero desde que naciste revolucionaste mi vida, cambiaron las preferencias y me has enseñado tantas cosas que he aplicado todos los días. En el laboratorio eres un referente hay lemas con tus frases, como el sí...pero no, PROBLEMA...SOLUCIÓN. Pero con el que me quedo es SOMOS UN EQUIPO Y JUNTAS GANAREMOS, porque las cosas en equipo siempre tienen mejor resultado. Tú sí que eres la LUZ del faro. Gracias por volver a hacerme sentir la Maria niña disfrutona eso no lo quiero perder nunca. Me gustaría decirte algunas cosas que he aprendido en este camino.... se siempre fiel a ti misma, sigue tu instinto, ilusíonate, diviértete y sé persistente, encuentra tu mejor versión a diario, equívocate, márcate nuevos retos y sobre todo arriégate y no te arrepientas de intentar algo y no conseguirlo. Confía en la gente, juega en equipo. Elige bien a tus amigos, cuídales, escúchalos y conserva bien a los que te cuidan y te escuchan, la amistad mueve el mundo. Algo que he aprendido es que no quieras tener siempre la razón, no todo es blanco y negro. Descubre tu pasión y ve a por ella, sonríe, y nunca tires la toalla, aprende de los errores, pon amor en todo lo que hagas y no malgastes ni un día de tu vida en querer ser quién no eres. Trabaja duro por que nadie te regalará nada, valora lo que tienes, se agradecida y SUEÑA a lo grande por que a veces los sueños se cumplen. Sobre todo, vive el momento y disfruta del ahora y NUNCA dejes de jugar como ahora.

GRACIAS A TODOS, porque lo que le he dicho a Júlia me lo habéis enseñado cada uno de vosotros.

Abuelos y iaos GRACIAS estéis donde estéis por guiarme y cuidarme. En especial, iaia sempre serà la meua estrella que em guiarà vatja on vatja, el referent més gran. Gracias por nuestra conexión y sentir aún tus abrazos. Gracias por enseñarme a ser formigueta formigueta.

“El éxito es la suma de pequeños esfuerzos
repetidos días tras días”

-Robert Collier-

Als meus pares,
GRÀCIES per ser la llum del far

RESUMEN

La distrofia miotónica tipo 1 (DM1) es una enfermedad genética rara, neuromuscular crónica y debilitante, de herencia autosómica dominante, expresividad variable y penetrancia elevada. La causa genética radica en una mutación dinámica que consiste en una expansión anormal del triplete CTG en la región 3' no traducida (3'UTR) del gen *DM1 protein kinase (DMPK, Entrez 1760)*, localizado citogenéticamente en la región cromosómica 19q13.3. Mientras que en las personas no afectadas el número de tripletes oscila entre 5 y 37 copias, los pacientes con DM1 presentan un número de copias superior a 50, llegando incluso a miles. Es el tipo de distrofia muscular más común en adultos con una prevalencia a nivel mundial de 1 por cada 8000 nacimientos. El espectro clínico que presentan los pacientes con DM1 es muy amplio y, por lo tanto, es característicamente considerada como una enfermedad multisistémica que afecta en su mayor parte a la musculatura esquelética pero también a diferentes sistemas como el cardiovascular, nervioso, respiratorio, ocular, digestivo o endocrino. Principalmente, los síntomas son neuromusculares incluyen debilidad muscular (miopatía) y rigidez muscular, dificultad para relajar los músculos (miotonia) y pérdida muscular progresiva (atrofia). La pérdida de masa muscular es uno de los síntomas más debilitantes en DM1, ya que en último término conduce a inmovilidad, problemas respiratorios, disartria, disfagia y muerte súbita prematura en fases avanzadas de la enfermedad. Por lo tanto, la disfunción muscular es uno de los principales contribuyentes a la mortalidad y morbilidad en DM1, y supone una reducción significativa de la esperanza de vida de los pacientes. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que los transcritos *DMPK* mutantes desencadenan degeneración y atrofia muscular no se conocen en profundidad. Por consiguiente, no existe una terapia específica para el tratamiento de este aspecto de la enfermedad y por lo tanto el desarrollo de una terapia contra la disfunción muscular es un problema médico de primer orden.

Los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la DM1 son muy complejos, por lo que se han investigado diferentes propuestas para dilucidar la conexión entre las expansiones CUG y las manifestaciones clínicas. De entre todos los mecanismos propuestos, el efecto tóxico de "ganancia de función" de las expansiones parece ser

la hipótesis más consolidada. Los transcritos *DMPK* que expresan las expansiones de repeticiones CUG desempeña una función tóxica formando horquillas que se agregan en forma de foci ribonucleares insolubles. Estas horquillas son capaces de secuestrar a diferentes proteínas de unión a RNA dentro del núcleo de células musculares y neurales, generando con ello falta de función de las mismas. Además, la expresión de las expansiones CUG patogénicas repercute de forma directa o indirecta en la actividad de otras proteínas que se encuentran aguas abajo. Entre las proteínas de unión a RNA secuestradas por las expansiones CUG se encuentran factores reguladores del *splicing* alternativo, principalmente Muscleblind-like 1 (MBNL1; y su parólogo MBNL2). La falta de función de las proteínas MBNL contribuye en la aparición de uno de los rasgos moleculares distintivos de la DM1, la *esplíceopatía*. Distintas observaciones sugieren que la disponibilidad críticamente limitada de proteínas MBNL es un contribuyente determinante al fenotipo final de la DM1. Asimismo, la sobreexpresión de Mbnl1 o MBNL1 en ratones modelo HSA^{LR} es bien tolerada en músculo esquelético, y rescata miotonía y alteraciones en el *splicing* alternativo típicas de DM1. Por lo tanto, estos resultados demuestran que potenciar los niveles endógenos de proteínas MBNL son una buena estrategia terapéutica. De hecho, se han descrito diferentes pequeñas moléculas que aumentan los niveles de MBNL o se ha probado a potenciar los niveles de MBNL1/2 endógenos mediante la modulación de miRNAs que regulen la síntesis de estas proteínas utilizando para ello anti-miRs contra miR-23b y miR-218, obteniendo resultados sorprendentes en cuanto a mejoras tanto a nivel molecular *in vitro* en miotubos DM1 como a nivel funcional y fisiológico *in vivo* en ratones modelo HSA^{LR}. Junto con la alteración de las proteínas MBNL, otro regulador del *splicing* alternativo clave en el desarrollo muscular que se encuentra alterado en DM1 es CUG-BP Elav-like family member 1 (CELF1). Concretamente, los niveles de CELF1 se encuentran aumentados en las células DM1 como resultado de la hiperfosforilación de la proteína mediada por la proteína quinasa C (PKC). Estas fosforilaciones provocan la estabilización de la proteína en los núcleos celulares llevando a una ganancia de función. El desequilibrio del balance de niveles/actividad entre MBNL1/CELF1 en DM1 provoca el mantenimiento, en un gran número de transcritos, de un patrón de exones alternativos fetales en lugar de los propios de adulto. Estos efectos a nivel molecular comprometen la correcta diferenciación y función del músculo esquelético y se han

relacionado estrechamente con algunos de los síntomas musculares intrínsecos de la DM1. Además, otros factores reguladores del *splicing* alternativo se han descrito alterados en las células DM1, como por ejemplo la proteína Staufen-1 (STAU1) está aumentada en DM1 o la proteína de unión a RNA hnRNPA1, cuya expresión disminuye durante el desarrollo postnatal, pero en DM1 permanece aumentada y antagoniza la actividad de MBNL1. No obstante, también se han descrito alteraciones la regulación transcripcional, inhibición de la traducción, traducción no canónica asociada a repeticiones producida independientemente del codón de iniciación ATG (traducción RAN) que genera péptidos poli (Q) tóxicos, presencia de transcritos DM1 antisentido derivados de la región reguladora adyacente de *SIX5* que se convierten en siRNAs (DM1-AS), alteraciones en el uso de sitios alternativos de poliadenilación de diferentes mRNAs o desregulación en la biogénesis y estabilidad de miRNAs.

A pesar de que en los últimos años se ha avanzado en el estudio de la alteración de diferentes factores que contribuyen a la pérdida de masa muscular y debilidad en DM1, no se conocen con exactitud las causas últimas que conducen a la disfunción muscular de la enfermedad. Principalmente, la investigación de los mecanismos moleculares que conducen a la atrofia en DM1 se había centrado en relacionar la alteración en la inclusión de exones alternativos regulados por MBNL1 y CELF1 con los procesos de degradación muscular. Sin embargo, los defectos de *splicing* alternativo no explican de forma satisfactoria la pérdida de masa muscular, por lo que, en los últimos años han sugerido nuevas evidencias que apuntan a que otras cascadas de señalización alteradas juegan un papel importante en la patogénesis de la DM1, en parte al contribuir a la regulación deficiente de MBNL1 y CELF1, pero también al alterar múltiples procesos celulares que juegan su propio papel en la atrofia muscular.

Diferentes estudios a partir de biopsias de músculo esquelético de pacientes con DM1 han demostrado la alteración de estos miomiRs en DM1 y su relación con la patología muscular. Utilizando un modelo de DM1 en mosca que expresa 480 repeticiones CTG en músculo se demostró que 20 miRNAs estaban alterados, y en biopsias de músculo de pacientes con DM1 validaron los niveles reducidos de miR-1, miR-7 y miR-10. La repercusión de la desregulación de estos miRNAs se confirmó al

observar un aumento significativo de sus dianas. En el caso de miR-7 se ha descrito que miR-7 es un regulador negativo directo de *ATG4A* y *ATG7*, genes implicados en autofagia. Aunque hasta el momento no se conocía la repercusión en el fenotipo muscular y las causas de los bajos niveles de miR-7. Uno de los mecanismos implicados en la regulación de miR-7 y su biogénesis es *Musashi RNA binding protein 2* (MSI2). MSI2 junto con *Hu antigen R* (HuR) forman un heterodímero, de tal forma que HuR asiste en el reconocimiento y unión de MSI2 al bucle C-terminal conservado (CTL) de pri-miR-7-1. El complejo pri-miR-7-1-MSI2-HuR favorece la estabilización del miRNA inmaduro y, en consecuencia, se impide la biogénesis de miR-7 maduro.

Por otra parte, los principales mecanismos de degradación proteica, la autofagia y el UPS (sistema ubiquitina proteasoma), se han descrito sobreactivados en DM1. En el caso del UPS en ratones que expresan 45kb de la forma humana mutante DMPK o ratones DMSXL, se ha observado que presentan un aumento significativo de la actividad del UPS y de la expresión de genes como *Murf1* o *Fbxo32* (*Atrogin-1*), genes relacionados con la mayoría de los procesos atroficos. Con respecto a la autofagia, en cultivos primarios de músculo esquelético de DM1, se demostró una correlación positiva entre el tamaño de la expansión y los niveles de activación de apoptosis y autofagia. En células madre neurales de pacientes DM1 se observó proliferación reducida y aumento en autofagia asociada a la ruta mTOR. La hiperactivación de la autofagia debido a la inhibición de mTOR/S6K1 en respuesta al estrés metabólico se ha descrito en mioblastos fetales DM1. También se han descrito defectos en la regulación de la autofagia en los ratones HSA^{LR} modelo de DM1 en los cuales el tratamiento con fármacos cuya diana era la ruta AMPK/MTORC mejoró significativamente la función muscular. En un modelo de DM1 en *Drosophila*, se demostró que la autofagia se encuentra patológicamente activada en DM1 y que ésta podría ser una de las causas de la atrofia muscular. De la misma forma, se encontraron pruebas de la hiperactivación de la autofagia en DM1 tanto en biopsias musculares de pacientes como en una línea celular de fibroblastos de pacientes transdiferenciados a mioblastos que expresaba 1600 repeticiones CTG. Además, la inhibición genética de la autofagia, o la sobreexpresión de una de las isoformas de *Muscleblind* (*Mbl C*) fue suficiente para rescatar el fenotipo atrofico. Además, en biopsias de pacientes y mioblastos DM1 se observó un aumento de la expresión de genes y marcadores relacionados con el proceso. Congruente con estas

observaciones, en un modelo de ratón que expresa de forma inducible 960 repeticiones CUG en el músculo esquelético presenta miopatía, así como, defectos histopatológicos relacionados con degeneración muscular. Este modelo murino muestra una regulación positiva de las proteínas involucradas en la vía autofágica. Por consiguiente, la inhibición del proceso autofágico es una estrategia terapéutica potencialmente válida para evitar disfunción muscular de la enfermedad. No obstante, se desconocen de forma clara las causas del aumento patológico de este proceso. Algunos estudios sugieren que la falta de biodisponibilidad de MBNL1 contribuye, al menos en parte, a la autofagia excesiva. No obstante, se ha dedicado relativamente poca atención en la búsqueda de estrategias terapéuticas dirigidas a reestablecer unos niveles basales de esta vía catabólica.

La presente tesis doctoral incluye el resumen de los resultados más relevantes obtenidos en los tres artículos en los que soy co-primer autor en el primero de ellos y primer autor en el resto. La contribución por mi parte en los tres artículos ha sido máxima, tanto en la generación de hipótesis, a nivel experimental, análisis de resultados y también apoyo a la escritura. Observando en su totalidad los objetivos de los tres artículos, debido a que se ha dedicado relativamente poca atención en la búsqueda de estrategias terapéuticas dirigidas a reestablecer unos niveles basales de autofagia y a entender las causas moleculares que conducen a la hiperactivación de esta vía catabólica en DM1, en este trabajo se exploran dos aproximaciones alternativas. Por una parte, la inhibición de la autofagia mediante el uso de un anti-autofágico bien caracterizado, la cloroquina (CQ) y, por otra parte, el restablecimiento de los niveles de miR-7 como posible regulador clave de la actividad autofágica en DM1, dentro del concepto de modulación terapéutica de la expresión génica (TGM). Además, proponemos el estudio de la posible implicación de la disminución de miR-7 sobre la hiperactivación de la autofagia en DM1 en un modelo celular, a través de la modulación de sus niveles por medio de la utilización de un mimético o un anti-miR. Esta estrategia también ayudará a obtener una prueba de concepto basada en el aumento de los niveles de miR-7 como terapia anti-atrónica en DM1. Finalmente, indagamos en las causas moleculares por las que miR-7 podría estar disminuido en DM1 con el objetivo de definir nuevas dianas terapéuticas contra la pérdida de masa muscular característica de la enfermedad, centrando la atención en MSI2.

En el primer artículo (Ariadna Bargiela, **Maria Sabater-Arcis**, Jorge Espinosa-Espinosa, Miren Zulaica, Adolfo Lopez de Munain, Ruben Artero. 2019. "Increased Muscleblind levels by chloroquine treatment improve myotonic dystrophy type 1 phenotypes in in vitro and in vivo models". Proc Natl Acad Sci U S A. 116(50):25203-25213), en base a las observaciones previas que demostraban en un modelo de DM1 en *Drosophila* y modelos celulares que la hiperactivación de la autofagia es responsable, al menos en parte, del fenotipo de degeneración muscular y atrofia en DM1 y la inhibición genética de este proceso restaura la masa muscular y la función en *Drosophila* se hipotetizó que fármacos inhibidores de la autofagia podrían rescatar la atrofia muscular *in vivo*. La cloroquina (CQ) es un potente inhibidor de la autofagia que actúa bloqueando la fusión de los autofagosoma con los lisosomas. En el presente artículo se ratificó la implicación de la alteración de la autofagia en la disfunción muscular en DM1 mediante el bloqueo de este proceso con el anti-autofágico CQ. El tratamiento con CQ mejoró diferentes fenotipos relacionados con la DM1 a nivel molecular, celular y fisiológico *in vitro* en miotubos DM1 e *in vivo* en un modelo de DM1 en *Drosophila* y en ratones HSA^{LR}. Concretamente, a nivel molecular y celular, en miotubos DM1 la CQ mejoró significativamente el índice de fusión a todas las concentraciones probadas, pero no tuvo un efecto sobre el diámetro de los miotubos, sugiriendo que la inhibición de la autofagia mejora, en parte, la capacidad de fusión de las células DM1. Además, mediante RNA-seq se demostró que el tratamiento con CQ en miotubos DM1 rescataba de la expresión de genes relacionados con la enfermedad al tratar los miotubos DM1 con CQ a 0,1 y 10 μ M de forma dependiente de dosis, y los procesos biológicos rescatados estaban implicados en la homeostasis del músculo. En cuanto a los rescates funcionales y fisiológicos en los dos modelos *in vivo*, en moscas modelo, CQ mejoró de forma significativa el área de los músculos indirectos del vuelo (IFMs). Para comprobar si el rescate de la atrofia muscular con la CQ se correlacionaba con una mejora funcional en las moscas DM1, se realizaron ensayos de escalada y vuelo, obteniendo una mejora significativa en la actividad locomotora. Asimismo, el tratamiento con CQ fue suficiente para rescatar la supervivencia media de las moscas DM1 y en el caso de la concentración más baja de CQ probada, 10 μ M, las moscas extendieron la esperanza de vida máxima. En el caso de los ratones HSA^{LR} a las dos concentraciones probadas disminuyó el número de núcleos centrales y a nivel funcional, rescató de forma

notoria y significativa la debilidad muscular medida por una parte mediante la prueba de fuerza de agarre normalizada al peso y la miotonía. En conjunto, fenotipos que previamente se había demostrado que dependían de los niveles de Muscblind. Concomitante, se descubrió que el bloqueo de la autofagia aumenta la biodisponibilidad de MBNL1/2, y ese aumento es funcional puesto que rescatan la inclusión de diferentes exones alternativos alterados en la enfermedad y regulados por MBNL1/2 en los tres modelos estudiados. También se cuantificó la colocalización entre la señal de MBNL1 o 2 y los lisosomas (tinción con *Lysotracker*), observando una reducción drástica después del tratamiento con CQ, lo que demostró que la CQ promueve la liberación de MBNL de la vía autofágica, evitando así su degradación y consecuentemente, aumentando su biodisponibilidad. Adicionalmente, se indujo aún más la autofagia en miotubos DM1 con metformina (mtf) obteniendo una disminución dramática en los niveles de MBNL1/2 y consecuente potenciación patológica en el análisis de exones alternativos regulados por MBNL1/2, así como disminución de la capacidad de fusión. Estos resultados refuerzan la idea de que los efectos terapéuticos observados tras el tratamiento con CQ están mediados, en parte, por los niveles de MBNL a través de la modulación de la autofagia. En conjunto, estos resultados validan el potencial de la CQ como fármaco para suprimir la disfunción muscular en DM1.

En el segundo artículo (**Maria Sabater-Arcis**, Ariadna Bargiela, Denis Furling, Ruben Artero. 2020. “miR-7 Restores Phenotypes in Myotonic Dystrophy Muscle Cells by Repressing Hyperactivated Autophagy”. *Mol Ther Nucleic Acids*. 19:278-292), una vez validado en el primer artículo que la hiperactivación de la autofagia contribuye de forma relevante a la disfunción muscular en la DM1 y que su inhibición es suficiente para rescatar *in vivo* el fenotipo muscular, los esfuerzos se centraron en encontrar factores implicados en la desregulación de esta vía catabólica. Estudios previos demostraban que miR-7 estaba regulado negativamente en un modelo de DM1 en *Drosophila* y en biopsias musculares de pacientes. Asimismo, la expresión de *ATG4A*, una diana de este miRNA estaba aumentada significativamente en biopsias de pacientes con DM1 y, se había descrito que miR-7 reprime la autofagia mediante la regulación positiva de la señalización de mTOR y la inhibición directa de algunos genes de autofagia como *ATG4A* y *ATG7*. En este artículo, en primer lugar, para comprobar la relevancia de la disminución de miR-7 en los fenotipos musculares

de DM1, se utilizó la información existente de la base de datos DMseq y se correlacionó los niveles de expresión de 15 dianas confirmadas de miR-7 con datos de fuerza de dorsiflexión del tobillo de estos pacientes. Del total de 15 dianas, se correlacionaron con los datos de fuerza y los resultados mostraron que 11 de ellas presentaban una correlación negativa estadísticamente significativa, demostrando que los bajos niveles de miR-7 en DM1 podrían repercutir en la fuerza muscular, la cual está íntimamente relacionada con la debilidad y atrofia muscular. En segundo lugar, corroboramos que miR-7 está disminuido en miotubos DM1. A continuación, a través de la modulación de miR-7 con un mimético o un antagonista en miotubos DM1 o sanos, respectivamente, demostramos que el restablecimiento de los niveles de miR-7 fue suficiente para reprimir marcadores de autofagia y atrofia muscular, así como para rescatar defectos de fusión de los miotubos. Por el contrario, el bloqueo de miR-7 en miotubos control fue suficiente para provocar la aparición de fenotipos tipo DM1. Además, los efectos observados fueron independientes de MBNL1, ya que la modulación de miR-7 tanto en miotubos sanos o DM1 no tuvo ningún efecto sobre los niveles de MBNL1 ni en ninguno de los *splicings* alternativos alterados en DM1 y regulados por estas proteínas. Estos resultados sugieren que miR-7 actúa por debajo o en paralelo con MBNL1 en la vía de patogénesis de la enfermedad. En el caso concreto del índice de fusión, la restauración de los niveles del miR-7 con el agomiR-7 en miotubos DM1 fue suficiente para rescatar este fenotipo de forma dependiente de dosis. Además, la disminución de los niveles de miR-7 con el antagoniR-7 llevó a una drástica reducción en el índice de fusión de los miotubos sanos, de forma similar al fenotipo observado en DM1. En cuanto al diámetro, el aumento de miR-7 en miotubos DM1 no tuvo ningún efecto. Por el contrario, la reducción de miR-7 en células sanas disminuyó significativamente el diámetro de las células sanas, de forma dependiente de dosis. En conjunto, estos resultados sugieren que miR-7 es necesario para la fusión de los mioblastos y el aumento de su tamaño, pero el suplemento de miR-7 solo es suficiente para mejorar el fenotipo de fusión celular en DM1. También se moduló los niveles de miR-7 mediante la administración de un antagoniR o agomiR en mioblastos primarios aislados de los músculos esqueléticos de diafragma y gastrocnemio de ratones controles sanos (WT) y DM1 (HSA_{LR}) de 4,5 meses de edad, con el fin de probar la implicación de miR-7 en la capacidad de fusión de los mioblastos. No se observó una disminución del miRNA en los músculos analizados.

El tratamiento con antagomiR-7 en mioblastos WT fue suficiente para reducir significativamente el índice de fusión. De forma análoga, el rescate del fenotipo fue significativo al reponer miR-7 con el agomiR en mioblastos HSA_{LR} del diafragma y el gastrocnemio. Adicionalmente, se trataron mioblastos HSA_{LR} con antagomiR-7, cuantificando una clara reducción en el índice de fusión. Estos resultados refuerzan la idea de que la falta de miR-7 en DM1 es responsable en parte de los defectos en la capacidad de fusión de los mioblastos y, por ende, está relacionada con la disfunción muscular de la enfermedad.

Por último, en el tercer artículo (**Maria Sabater-Arcis**, Ariadna Bargiela, Nerea Moreno, Javier Poyatos-Garcia, Juan J Vilchez, Ruben Artero. 2021. "Musashi-2 contributes to myotonic dystrophy muscle dysfunction by promoting excessive autophagy through miR-7 biogenesis repression". *Mol Ther Nucleic Acids*. 25:652-667), describimos por primera la sobreexpresión de MSI2 en DM1. Se identificó que MSI2 está sobreexpresado a nivel de transcrito y proteína en diferentes líneas de mioblastos y biopsias de músculo esquelético derivadas de pacientes con DM1. Reforzando la hipótesis de que unos altos niveles de MSI2 en DM1 inhiben la biogénesis de miR-7 lo cual desemboca en una reducción en los niveles de miR-7 maduro, se confirmó en las biopsias de músculo de pacientes con DM1 una correlación de Pearson (*r*) negativa y significativa entre MSI2 y miR-7. Para confirmar la sobreexpresión de MSI2 en DM1 y la relevancia de dicha alteración en el fenotipo muscular de la enfermedad, se recurrió a la base de datos DMseq. MSI2 estaba sobreexpresado significativamente (más del 35%) en pacientes con DM1 y sus niveles, se correlacionaron negativa y significativamente con la fuerza de la dorsiflexión del tobillo, un fenotipo relacionado directamente con la debilidad y atrofia muscular al igual que lo obtenido para las dianas de miR-7. MSI2, junto con HuR, regulan negativamente la biogénesis de miR-7, por lo que mediante diferentes estrategias de silenciamiento de genes (siRNAs y gapmers) o la molécula pequeña Ro 08-2750 demostramos que la reducción de los niveles o actividad de MSI2 aumenta la expresión de miR-7, rescata la capacidad de fusión de los mioblastos, reprime la autofagia excesiva y regula negativamente los genes relacionados con la atrofia del sistema UPS. Asimismo, con las tres estrategias se analizó la expresión de dos dianas directas de MSI2. Por un lado, *P21*, cuya expresión está regulada negativamente por MSI2 y, por el otro lado *TGFBR1*, que por el contrario se ha demostrado que MSI2

potencia su expresión. La expresión de ambas dianas se observó alterada en miotubos DM1, y la reducción de *MSI2* moduló la expresión de ambos genes. Anteriormente, demostramos que la restauración de los niveles de miR-7 era suficiente para rescatar el índice de fusión, por lo que se estudió la contribución de *MSI2* a este fenotipo, así como el efecto sobre el tamaño de los miotubos, después de reducir los niveles de *MSI2* con las diferentes estrategias de silenciamiento de *MSI2*. La cuantificación de ambos parámetros mostró que la reducción de los niveles/actividad de *MSI2* en miotubos DM1 rescató significativamente el índice de fusión. A diferencia de los estudios anteriores con el agomiR-7, el diámetro de los miotubos también se rescató de forma significativa pero solo al reducir los niveles de *MSI2* con los dos ASOs, corroborando que la reducción de *MSI2*, vía aumento de miR-7, mejora fenotipos relacionados con disfunción muscular. Además, el silenciamiento de *MSI2* con los gapmers fue suficiente para potenciar los niveles de *MBNL1*. Todas estas observaciones sugieren de forma clara que *MSI2* regula a miR-7 y que el silenciamiento de *MSI2* mediante la utilización de siRNA o ASOs lleva a un aumento en los niveles de miR-7 que tiene un efecto positivo en los miotubos DM1, reestableciendo unos niveles basales del flujo autofágico y de diferentes marcadores implicados en el proceso atrofico en DM1. También se validaron los resultados, en una línea de mioblastos inmortalizados y dos líneas de mioblastos primarios DM1 (DM1-14 y DM1-16) procedentes de dos de las biopsias tratadas con con Ro a 10 μ M. En conjunto, los resultados en los diferentes modelos celulares de DM1 y las diferentes estrategias utilizadas para reducir los niveles de *MSI2* validan que *MSI2* representa una diana terapéutica potencial para tratar la disfunción muscular en DM1 y evidencian, de forma robusta, la implicación de la vía *MSI2*-miR-7-autofagia en la disfunción muscular en DM1.

En conclusión, los tres artículos publicados y recopilados en el presente trabajo demuestran en primer lugar que la hiperactivación de la autofagia contribuye al fenotipo de disfunción muscular en DM1, y su bloqueo con CQ supone un nuevo mecanismo mediante el cual aumentar la biodisponibilidad de las proteínas *MBNL 1* y *2*. En segundo lugar, miR-7 juega un papel crucial en la regulación negativa de la vía autofágica, y otras vías relacionadas con la atrofia, como el UPS, en DM1. Además, miR-7 es necesario tanto para la fusión como para el crecimiento de los miotubos DM1. Sin embargo, el aumento de miR-7 es suficiente para rescatar

significativamente solo el índice de fusión. Finalmente, la regulación al alza de MSI2 en DM1 podría ser una de las causas que contribuyen a la regulación negativa de miR-7 en DM1 y, por ende, a la sobreactivación de la autofagia y a la atrofia muscular característica de la enfermedad. Además, la reducción de los niveles o la actividad de MSI2 es suficiente para aumentar significativamente los niveles de miR-7, y consecuentemente o por otras vías independientes, reprimir la autofagia excesiva y la expresión de genes relacionados con la atrofia del sistema UPS, así como, aumentar los niveles de MBNL y regular otras vías de forma independiente de miR-7, como P21 y TGFBR1. En conjunto, los resultados obtenidos abren la puerta al estudio del eje MSI2-miR-7-autofagia como enfoque terapéutico válido para tratar la disfunción muscular en la DM1.

-Introducción general-	5
1. Distrofia Miotónica tipo 1	7
1.1 Aspectos clínicos e histopatológicos	7
1.2 Mecanismo de patogénesis.....	12
1.2.1 Alteración de factores de <i>splicing</i> alternativo y espliceopatía.....	13
1.2.2 Importancia de las proteínas Muscleblind en el mecanismo de patogénesis de la DM1.....	15
2. Implicación de los miRNAs en DM1.....	17
3. Procesos celulares y vías de señalización alteradas que contribuyen a la disfunción muscular en DM1.....	21
3.1 Autofagia y UPS en DM1	24
4. Modelos experimentales en DM1.....	29
4.1 Modelos <i>in vitro</i>	29
4.2 Modelos <i>in vivo</i>	33
4.2.1 <i>Drosophila melanogaster</i>	33
4.2.2 <i>Mus musculus</i>	33
5. Estrategias terapéuticas en DM1	36
5.1 Terapias basadas en pequeñas moléculas	36
5.2 Terapias basadas en el silenciamiento génico post-transcripcional utilizando oligonucleótidos con una secuencia dada.....	39
5.3 Terapias génicas	41
-Objetivos -	43
-Resultados principales -	47
1. Análisis de la relevancia de la autofagia en el fenotipo de disfunción muscular en modelos animales y celulares de DM1.....	49
1.1 El tratamiento con CQ en un modelo de DM1 en <i>Drosophila</i> , miotubos DM1 y en ratones HSA ^{LR} mejora fenotipos relacionados con la enfermedad a nivel molecular, funcional e histopatológico.....	50
1.2 La CQ potencia la expresión de las proteínas MBNL y rescata defectos en el <i>splicing</i> en tres modelos de DM1	52
1.3 El efecto terapéutico del tratamiento con CQ observado en <i>Drosophila</i> , células y ratones DM1 es dependiente del aumento de los niveles de MBNL como consecuencia de la inhibición de la autofagia.....	53

2. Implicación de la disminución de miR-7 en el fenotipo de disfunción muscular en un modelo celular de DM1	55
2.1 miR-7 está disminuido en miotubos DM1, y la sobreexpresión de genes diana de miR-7 se correlaciona con la debilidad muscular en pacientes.....	56
2.2 La modulación de los niveles de miR-7 afecta a la capacidad de fusión de miotubos DM1 y mioblastos primarios derivados de músculo de ratones HSA ^{LR} ..	57
2.3 miR-7 tiene una función central en la regulación de la autofagia y de otras vías relacionadas con el fenotipo de atrofia muscular, como el UPS en miotubos DM1.....	58
2.4 Los efectos de la modulación de miR-7 son independientes de MBNL1.....	60
3. Validación de la alteración patológica de Musashi-2 y su contribución, como represor de la biogénesis de miR-7, al fenotipo de disfunción muscular en biopsias musculares y diferentes líneas celulares de DM1	61
3.1 MSI2 está sobreexpresado en DM1 y se correlaciona negativamente con los niveles reducidos de miR-7 en biopsias musculares y diferentes líneas celulares.....	62
3.2 El silenciamiento de MSI2 con siRNAs y gapmers aumenta los niveles de miR-7 y rescata parámetros relacionados con la disfunción muscular en miotubos DM1.....	63
3.3 El restablecimiento de los niveles de MSI2 con los gapmers potencia los niveles de MBNL1 en miotubos DM1	66
3.4 El inhibidor de la actividad de MSI2, Ro 08-2750, mejora fenotipos moleculares relacionados con la diferenciación y atrofia en miotubos DM1, en mioblastos inmortalizados y en mioblastos primarios DM1	67
-Discusión general-	71
1. La hiperactivación de la autofagia contribuye de forma relevante a la disfunción muscular en la DM1 y su inhibición es suficiente para rescatar <i>in vivo</i> fenotipos relacionados con la disfunción muscular	73
2. La sobreexpresión de MSI2 contribuye a los bajos niveles de miR-7, y la desregulación de ambos está relacionada con la debilidad muscular en DM1	74
3. El eje MSI2-miR-7-autofagia regula la fusión y maduración de los mioblastos DM1.....	75
4. miR-7 y MSI2 regulan la autofagia y otras vías relacionadas con la atrofia muscular en DM1	79
5. El bloqueo de la autofagia o reducción de MSI2 aumentan MBNL1 de forma independiente a miR-7	81

6. El eje MSI2-miR-7-autofagia representa una nueva diana terapéutica contra la disfunción muscular en DM1.....	83
-Conclusiones -	87
-Bibliografía -	91
-Anexos-	119
-Artículo 1-.....	121
-Artículo 2-.....	167
-Artículo 3-.....	193

-Introducción general-

1. Distrofia Miotónica tipo 1

En 1909, el médico alemán Hans Steinert y su grupo describieron por primera vez la forma clásica de distrofia miotónica o también llamada enfermedad de Steinert (DM1; OMIM #160900) (Steinert, 1909). La DM1 es una enfermedad genética rara de herencia autosómica dominante, expresividad variable y penetrancia elevada. A pesar de ser una enfermedad rara, es el tipo de distrofia muscular más común en adultos, con una prevalencia de entre 1/2100 y 1/8000 (247.000-92.600 afectados en Europa; Ashizawa et al., 2018; Johnson et al., 2021). Sin embargo, dada la existencia de variantes subclínicas y dependiendo de la población de estudio, la prevalencia varía significativamente.

1.1 Aspectos clínicos e histopatológicos

La causa genética de la enfermedad radica en una mutación dinámica que consiste en una expansión anormal del triplete CTG en la región 3' no traducida (3'UTR) del gen *DM1 protein kinase (DMPK)* (Entrez 1760), localizado citogenéticamente en la región cromosómica 19q13.3 (Brook et al., 1992; M. Mahadevan et al., 1992). Mientras que en las personas no afectadas el número de tripletes oscila entre 5 y 35, los pacientes con DM1 presentan un número de repeticiones superior a 50, llegando incluso a miles (Ashizawa & Sarkar, 2011; Savić Pavićević et al., 2013) (Fig. I-1). En sangre de pacientes con DM1, se ha correlacionado el número de tripletes CTG con la gravedad de los síntomas, así como, con la edad de inicio. En base a estas observaciones, los pacientes con DM1 se han clasificado en tres categorías fenotípicas, presentando cada grupo unas características clínicas diferentes: asintomática o premutación, clásica y congénita (Tabla Fig. I-1). De esta forma, el rango de repeticiones comprendido entre 38 y 50 es considerado como alelos premutados y las personas portadoras son asintomáticas. En el extremo opuesto, están las personas que presentan un número de repeticiones superior a 1000 unidades donde la enfermedad se manifiesta desde el nacimiento presentando, por tanto, un fenotipo congénito. En este tipo de DM1, los síntomas son graves caracterizándose la hipotonía, un daño intelectual avanzado, y muy destacable, la gran frecuencia de insuficiencia y fallo cardíaco que lleva a la muerte de alrededor del 30% de los pacientes en el periodo neonatal (Echenne & Bassez, 2013).

Finalmente, existe la DM1 clásica que engloba aquellas personas que expresan entre 50 y 1000 CTG. Este grupo se puede subdividir según la edad de inicio, como se detalla en la tabla de la figura 2, en infantil, juvenil, adulta y tardía (de Antonio et al., 2016). El grupo de inicio tardío presenta entre 51 y 100 repeticiones las cuales son consideradas protomutaciones por lo que la aparición de los síntomas suele ser a partir de los 40 años y los síntomas no suelen ser graves. El subtipo mejor caracterizado y predominante es la forma de inicio adulto en la que la edad de aparición oscila entre los 20-40 años y presenta una prevalencia muy variable de entre 0.5 y 18.1 por cada 100.000 personas (Theadom et al., 2016).

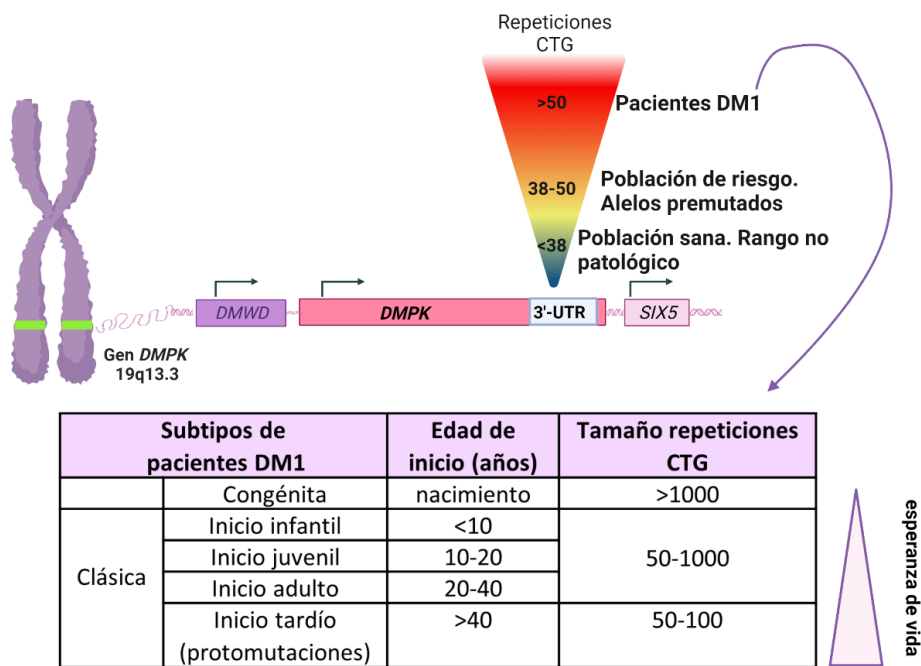


Figura I-1. Esquema representativo de la localización genómica de la mutación causante de la DM1 y de los diferentes subtipos de pacientes según número de repeticiones CTG. (Parte superior) Se representa el contexto genómico en el que se encuentra localizado cromosómicamente la mutación genética causante de la DM1. El gen *DMPK* (caja roja claro) contiene en el exón 15 (caja azul) un microsatélite inestable con la secuencia CTG en la región 3'UTR que en condiciones no patológicas presentan un número menor de 38 repeticiones CTG. En condiciones patológicas el número de repeticiones CTG es mayor de 50.

Según el número de repeticiones CTG que presenten los pacientes DM1, se clasifican en diferentes grupos (Parte inferior, Tabla). Se ha correlacionado de forma negativa el tamaño de las expansiones CTG con la esperanza de vida. Existe una parte de la población que son asintomáticos (Población de riesgo) y se les considera que son portadores de alelos premutados ya que presentan entre 38 y 50 repeticiones CTG. Flanqueando al gen *DMPK* se encuentran los genes *DMDW* y *SIX5* (caja morada y rosa, respectivamente). Imagen hecha en Biorender.com.

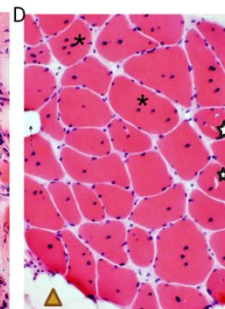
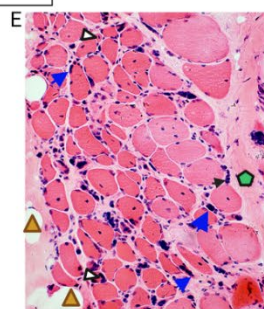
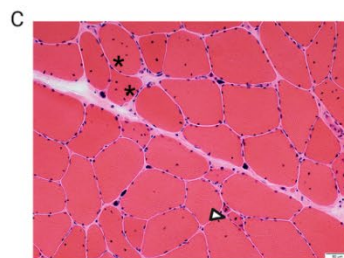
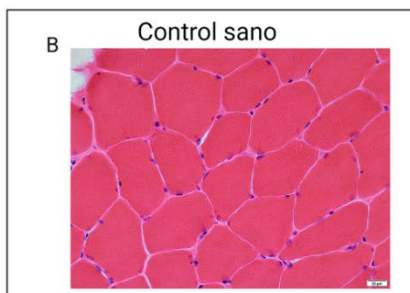
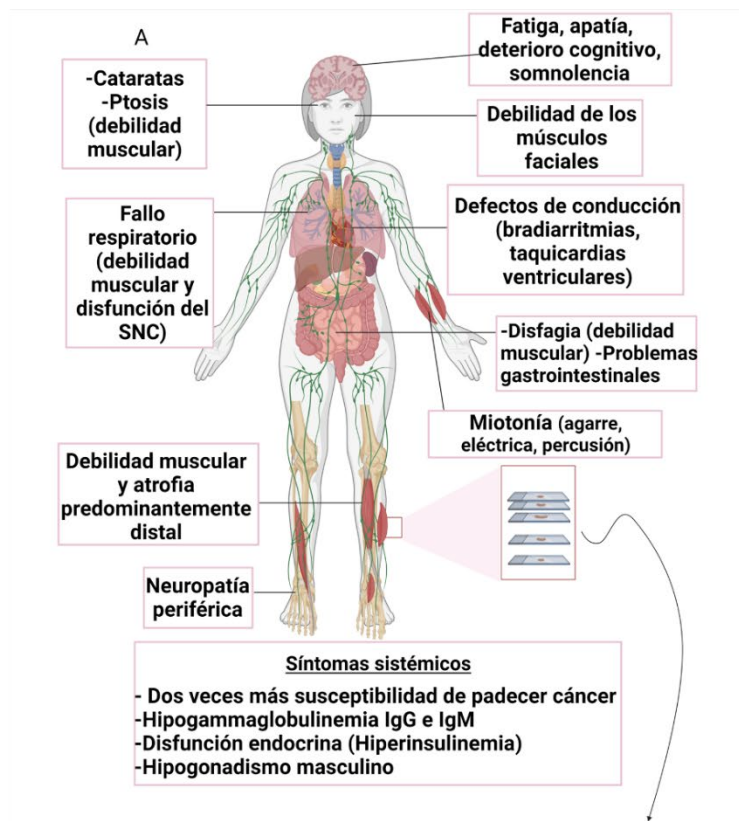
Los pacientes con DM1 que desarrollan la enfermedad en la edad adulta pueden quedar físicamente discapacitados y presentan una esperanza de vida reducida, principalmente por causas respiratorias o cardíacas, siendo más acusado el efecto, cuanto más temprana es la edad de manifestación de los síntomas. La mayoría de los síntomas son neuromusculares e incluyen debilidad muscular (miopatía) y rigidez muscular, dificultad para relajar los músculos (miotonía) y pérdida muscular progresiva (atrofia). La debilidad muscular y atrofia afectan principalmente a la musculatura distal lo que genera dificultad para realizar tareas que requieren una destreza fina de las manos y el pie caído, que incapacitan a los pacientes para llevar a cabo tareas cotidianas. También se manifiesta en la musculatura respiratoria causando insuficiencia respiratoria, disartria y disfagia. Sin embargo, la DM1 presenta un espectro clínico muy amplio y, por lo tanto, es característicamente considerada como una enfermedad multisistémica que afecta a otros sistemas como el cardiovascular, nervioso, respiratorio, ocular, digestivo o endocrino (Fig. I-2 A) (Smith & Gutmann, 2016). La disfunción respiratoria, es la causa más común de muerte en pacientes con DM1. Concretamente, la tasa de mortalidad por insuficiencia respiratoria oscila entre el 51 y el 76 %, especialmente en la forma congénita. La etiología de la disfunción respiratoria es compleja ya que combina disfunción respiratoria periférica (atrofia, debilidad muscular y miotonía) y del impulso respiratorio central, así como disfunción de los músculos de las vías respiratorias superiores (apnea obstructiva del sueño), junto con alto riesgo de infecciones pulmonares (Rossi et al., 2019).

A nivel histopatológico, la DM1 presenta unos rasgos característicos que son suficientes para distinguirla de otras distrofias musculares. En biopsias de músculo esquelético se ha observado desde las etapas más tempranas de la enfermedad un

marcado aumento de núcleos centrales, variabilidad en el diámetro de las fibras musculares (de menos de 10 μm a más de 100 μm) junto con un aumento y forma irregular de los mionúcleos. Con el avance de la enfermedad, se hacen más evidentes la presencia de grupos nucleares picnóticos, fibras anulares, rotura de fibras, presencia de vacuolas en las fibras, fibras con áreas basófilas periféricas regenerativas, y atrofia predominantemente de las fibras tipo 1. Aunque se han estudiado en menor medida, también son características en la DM1 la presencia de masas sarcoplásmicas, la fibrosis, la infiltración de tejido adiposo, un mayor número de fibras musculares intrafusales, deposición de colágeno, y la desorganización de las bandas Z y de las estructuras de los sarcómeros (Fig. I-2 C, D, E). Asimismo, a nivel de músculo cardíaco y sistema nervioso central también se ha observado en los pacientes agrandamiento de los ventrículos, degeneración vascular o pérdida de neuronas (Meola & Cardani, 2015; Thomas et al., 2018; Thornton, 2014).

A pesar de las correlaciones genotipo/fenotipo que se han establecido, el número de repeticiones puede ser variable incluso entre miembros de una familia. De hecho, la longitud de la repetición por sí sola no puede explicar la variabilidad de la enfermedad, ya que las expansiones de repeticiones CTG son inestables y su longitud está relacionada con dicha inestabilidad tanto en células germinales como somáticas. Por una parte, la inestabilidad de las células germinales da como resultado una variación intergeneracional del número de repeticiones y es el principal factor determinante del característico fenómeno de anticipación genética descrito en DM1, es decir, un aumento en la longitud de las expansiones CTG en la descendencia, en paralelo con una edad de aparición más temprana y síntomas de la enfermedad más graves en comparación con sus padres (Jansen et al., 1994; Redman et al., 1993; Temmerman et al., 2004). No obstante, es importante destacar que en aproximadamente un 6,4 % de las transmisiones de las repeticiones CTG de padres a hijos, se han observado fenómenos de contracción intergeneracional del número de repeticiones (Puymirat et al., 2009). También se ha descrito que la herencia materna da como resultado características clínicas más graves que la herencia paterna (Martorell et al., 2007). Por otra parte, a nivel de células somáticas, la inestabilidad de las repeticiones CTG se evidencia a través del mosaicismo genético durante la mitosis. Este mosaicismo provoca una variabilidad del número de repeticiones específica de tejido, o incluso dentro del mismo tejido, que irá aumentando a lo largo

de la vida del individuo y, por consiguiente, puede llevar a un empeoramiento de los síntomas (Ishii et al., 1996; Morales et al., 2012; Thornton et al., 1994).



- ▷ Fibras atroficas de tipo I y tipo II
- * Núcleos centrales
- ⚡ Núcleos picnóticos
- ☆ Vacuolas
- ⬢ Fibrosis: reemplazo de músculo por tejido fibrótico
- ▲ Tejido conectivo reemplazado por tejido adiposo

Figura I-2. Aspectos clínicos e histopatológicos de la DM1. (A) Principales afectaciones clínicas multisistémicas de la DM1. (B-D) Secciones de músculo esquelético teñidas con hematoxilina-eosina de un control sano (B) y de diferentes pacientes DM1. Concretamente, se muestran los primeros cambios (C) y en fases más avanzadas de la enfermedad (D-E). Las secciones están modificadas de la web <https://neuromuscular.wustl.edu>. Imagen hecha en Biorender.com y adaptada de (LoRusso et al., 2018).

1.2 Mecanismo de patogénesis

Los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la DM1 son muy complejos, por lo que se han investigado diferentes propuestas para dilucidar la conexión entre las expansiones CUG y las manifestaciones clínicas (S. Reddy et al., 1996; Sarkar et al., 2000). Sin embargo, a pesar de que los mecanismos de patogénesis propuestos no son excluyentes y pueden participar en la aparición de síntomas en pacientes, la toxicidad mediada por las repeticiones CUG *per se*, parece contribuir de manera más notable a la degeneración multisistémica observada en DM1. Las primeras evidencias que avalaron esta idea se describieron en *Drosophila* y células DM1 donde se demostró que la acumulación de transcritos *DMPK* mutantes en el núcleo llevaba al secuestro de proteínas y en consecuencia a efectos deletéreos en la diferenciación celular (Miller et al., 2000). Además, los ratones HSA^{LR} donde la expresión de las repeticiones se da en un contexto génico independiente de *DMPK*, manifiestan miopatía, miotonía, defectos de *splicing*, entre otros síntomas (Mankodi et al., 2000). En resumen, presentan un fenotipo multisistémico lo que demuestra que la expresión de las expansiones CUG en un rango patológico no son solo necesarias sino también suficientes para reproducir fenotipos de DM1. En conjunto, estas observaciones llegaron a proponer un mecanismo de patogénesis en el que las expansiones CUG una vez transcritas a RNA ejercen un efecto tóxico de "ganancia de función". Esta hipótesis se ha corroborado en modelos de la enfermedad en *C. elegans*, *Drosophila* y pez cebra (K.-Y. Chen et al., 2007; de Haro et al., 2006; Garcia-Lopez et al., 2008; Todd et al., 2013).

En músculo esquelético, corazón y cerebro de pacientes con DM1, los transcritos *DMPK* mutantes quedan retenidos en el núcleo celular en forma de agregados microscópicamente visibles conocidos como foci ribonucleares (Pettersson et al.,

2015). Las expansiones CUG se pliegan en forma de estructura en horquilla “imperfecta” (con desapareamientos “U-U”) cuya estabilidad es mayor cuando los RNAs presentan repeticiones en el rango patogénico. Estos agregados de RNA son capaces de unir y secuestrar a proteínas de unión a RNA de doble cadena. En consecuencia, estas proteínas dejan de estar presentes en sus localizaciones subcelulares y su función se ve alterada. Además del secuestro de proteínas, la expresión de las expansiones CUG patogénicas repercute de forma directa o indirecta en la actividad de otras proteínas que se encuentran aguas abajo. Todo ello, lleva a plantear un mecanismo de patogénesis muy complejo que se traduce a nivel fenotípico en las manifestaciones multisistémicas características de DM1. Entre las funciones alteradas como consecuencia de las expansiones CUG se incluyen: la regulación del *splicing* alternativo (Du et al., 2010; Ho et al., 2005), alteración de la regulación transcripcional (Kalsotra et al., 2014; Osborne et al., 2009), inhibición de la traducción como consecuencia de la activación de diferentes vías de estrés celular (Huichalaf et al., 2010), traducción no canónica asociada a repeticiones producida independientemente del codón de iniciación ATG (traducción RAN) que genera péptidos poli (Q) tóxicos (Zu et al., 2011), presencia de transcritos DM1 antisentido derivados de la región reguladora adyacente de *SIX5* que se convierten en siRNAs (DM1-AS) (Koehorst et al., 2021), alteraciones en el uso de sitios alternativos de poliadenilación de diferentes mRNAs (Batra et al., 2014) o desregulación en la biogénesis y estabilidad de miRNAs (Cappella et al., 2018; Cerro-Herreros et al., 2018; Fernandez-Costa et al., 2013; Kalsotra et al., 2014; Koehorst et al., 2020; Rau et al., 2011; Shen et al., 2020).

1.2.1 Alteración de factores de *splicing* alternativo y espliceopatía

La *espliceopatía* es uno de los rasgos moleculares distintivos de la DM1. Durante el desarrollo del tejido muscular sano, se produce un cambio del patrón de inclusión de exones alternativos mediado principalmente por las proteínas de unión a RNA Muscleblind-like 1-3 (MBNL 1-3) y CUG-BP Elav-like family member 1 (CELF1). Concretamente, los niveles de MBNL1 están reducidos durante las primeras etapas embrionarias y aumentan durante el desarrollo, favoreciendo la expresión de isoformas adultas. Por el contrario, la expresión de CELF1 sigue un patrón opuesto, por lo que su expresión es importante durante las primeras etapas del desarrollo

embrionario favoreciendo la inclusión de exones alternativos (Lin et al., 2006). Como ya se ha mencionado anteriormente, entre los reguladores de *splicing* secuestrados por las expansiones CUG están las proteínas MBNL. Su secuestro en el núcleo provoca una falta de función parcial de las mismas (Lin et al., 2006). Concomitantemente, los niveles de CELF1 se encuentran aumentados en las células DM1 como resultado de la hiperfosforilación de la proteína mediada por la proteína quinasa C (PKC). Estas fosforilaciones provocan la estabilización de la proteína en los núcleos celulares llevando a una ganancia de función (Kuyumcu-Martinez et al., 2007; Salisbury et al., 2008; L. Timchenko, 2013). El desequilibrio del balance de niveles/actividad entre MBNL1/CELF1 en DM1 impide la transición fetal a adulto de un gran número de transcritos, resultando en un mantenimiento de exones alternativos fetales en tejidos adultos (Du et al., 2010; Ho et al., 2004; Lin et al., 2006).

A pesar de que el desequilibrio entre MBNL1 y CELF1 explica la alteración de un amplio número de eventos de *splicing* en DM1 y, por lo tanto, ha suscitado interés científico durante mucho tiempo, es poco probable que la presentación fenotípica sea causada de forma exclusiva por esos dos factores, ya que la espliceopatía es considerada la base de la enfermedad. Se han identificado otros factores reguladores del *splicing* alternativo alterados en las células DM1. Por ejemplo, de la misma forma que CELF1, la proteína Staufen-1 (STAU1) está aumentada en músculo esquelético de pacientes con DM1 o la proteína de unión a RNA hnRNPA1, cuya expresión disminuye durante el desarrollo postnatal, pero en DM1 permanece aumentada y antagoniza la actividad de MBNL1 (Bondy-Chorney et al., 2016; Li et al., 2020).

En el contexto de alteraciones en el *splicing* alternativo que provocan la presencia de exones alternativos fetales de algunos transcritos en tejidos adultos y, son debidas al desequilibrio MBNL1/ CELF1/ hnRNPA1, entre otros reguladores del *splicing* alterados, el control postranscripcional de estos genes musculares compromete la correcta diferenciación y función del músculo esquelético. Estos efectos a nivel molecular se han relacionado estrechamente con algunos de los síntomas musculares intrínsecos de la DM1 (Lin et al., 2006; López-Martínez et al., 2020). Algunos ejemplos incluyen los defectos en la regulación del exón 78 de la *distrofina* (*DMD*) que se han relacionado con la arquitectura muscular y los defectos de organización típicos de los músculos esqueléticos distróficos de la DM1 (Rau et al., 2015). La isoforma

embrionaria M2 de piruvato quinasa (PKM2; que contribuye al efecto Warburg en cáncer) se favorece en tejido y modelos de ratón DM1 debido a un *splicing* alterado. La reexpresión de Pkm2 en el músculo esquelético altera la homeostasis metabólica y puede conducir a déficits de energía asociados con debilidad y degradación muscular (Z. Gao & Cooper, 2013). Otro ejemplo relacionado con la debilidad muscular es la exclusión del exón 11 en los transcritos maduros de *Anfifisina 1* (*BIN1*) que provoca defectos en la organización de la red de túbulos T (Fugier et al., 2011). La miotonía se ha relacionado con una inclusión anormal del exón 7a del gen del *canal de cloro tipo 1* (*CLCN1*) (Charlet-B et al., 2002). Dado que este exón presenta un codón de parada prematuro que desencadena NMD (*nonsense-mediated decay*), su inclusión anormal en DM1 se traduce finalmente en la degradación del transcrito, y como consecuencia en la falta de proteína. Consecuentemente, la falta del canal de cloruro causa una despolarización y desestabilización de los potenciales de membrana en las fibras musculares, contribuyendo a la miotonía en DM1. Similar a la alteración del *splicing* de *CLCN1*, se ha demostrado que la expresión de las isoformas de fetales del *receptor de rianodina 1* (*RYR1*) y de *ATP2A1* (*SERCA1*), en las cuales se favorece la exclusión del exón 70 y exón 22 respectivamente, alteran la señalización intracelular por Ca^{+2} afectando a la excitabilidad del sarcolema y, como resultado, potenciando las descargas miotónicas características de DM1 (Kimura et al., 2005; Santoro et al., 2014).

1.2.2 Importancia de las proteínas Muscleblind en el mecanismo de patogénesis de la DM1

Similar a los defectos en el *splicing* alternativo, MBNL1 promueve durante el desarrollo el uso de sitios poli (A) distales (patrón adulto), de forma que, en pacientes con DM1 la falta de MBNL1 promueve el uso de sitios proximales (fetales), asociados a una menor disponibilidad de sitios de unión para miRNAs y proteínas reguladoras (Batra et al., 2014). También participa en otros procesos de regulación del metabolismo de RNA como estabilidad y localización de transcritos y en la biogénesis de miRNAs (Masuda et al., 2012; Rau et al., 2011; E. T. Wang et al., 2012). Aunque se asume que son numerosas las alteraciones que las expansiones CUG provocan sobre la expresión génica, distintas observaciones sugieren que la disponibilidad críticamente limitada de proteínas MBNL es un contribuyente determinante al

fenotipo final. Así pues, el 80% de los eventos *splicing* alterados en ratones HSA^{LR} también están alterados en ratones *knock-out* (KO) para *Mbnl1* y lo mismo ocurre en el caso de, aproximadamente, un 70 % de defectos en la expresión. Estos resultados sugieren que la razón subyacente de esos cambios de expresión y la inclusión de exones alternativos es la pérdida de Mbnl1, ya sea directa o indirectamente a través de otros factores. Asimismo, los ratones KO para *Mbnl1* reproducen síntomas de la enfermedad como cataratas iridiscentes, miotonía y defectos histológicos (Du et al., 2010; Kanadia, 2003). Otro modelo de ratones mutantes para *Mbnl1*, reforzó la idea del papel crucial de las proteínas MBNL en el desarrollo de la enfermedad, ya que estos ratones con dos meses de edad presentan problemas cardíacos prominentes, fenotipos que se agravan tras seis meses de vida (Dixon et al., 2015). Sin embargo, los ratones KO para *Mbnl1* no reproducen el rango completo de síntomas de la DM1, de modo que se hipotetizaba que *Mbnl2* podría estar compensando la falta de función de *Mbnl1*. Por ello, se generaron ratones KO para *Mbnl1* en los que la función de *Mbnl2* estaba reducida (*Mbnl1*^{-/-} *Mbnl2*^{+/-}). Estos ratones reproducían aspectos cruciales de la enfermedad. Reforzando la hipótesis de la compensación, en ratones KO *Mbnl1*, *Mbnl2* presenta niveles de expresión aumentados y regula el *splicing* de exones normalmente regulados por Mbnl1 (K. Lee et al., 2013). Siguiendo una estrategia opuesta, la sobreexpresión de Mbnl1 o MBNL1 en ratones modelo HSA^{LR} es bien tolerada en músculo esquelético, y rescata miotonía y alteraciones en el *splicing* típicas de DM1 (Chamberlain & Ranum, 2012; Kanadia et al., 2006). En *Drosophila*, la pérdida de función de Mbl (el ortólogo de MBNL 1-3 en *Drosophila*) causa defectos en las uniones entre músculo y epidermis junto con desorganización de las bandas Z de los sarcómeros, y la sobreexpresión de la isoforma C de *Mbl* en un modelo de DM1 en mosca consigue rescatar parcialmente la atrofia muscular (Artero et al., 1998; Bargiela et al., 2015). Estos resultados demuestran que contrariamente a la mayoría de las enfermedades genéticas en las que los fenotipos se originan por mutaciones de pérdida o ganancia de función en un gen dado, la mayoría de las alteraciones moleculares de DM1 provienen de la falta de función de las proteínas MBNL1 y 2 que se puede suplir con más proteína ya que los genes que codifican para dichas proteínas permanecen funcionales.

2. Implicación de los miRNAs en DM1

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs monocatenarios no codificantes de pequeño tamaño (20-24 nucleótidos) cuya función es regular la expresión a nivel post-transcripcional promoviendo la degradación, desestabilización del mRNA o bloqueando la traducción mediante la unión al 3'UTR, 5'UTR de los mRNAs, incluso en algunos casos se ha detectado unión a la secuencia codificante para proteínas, así como, activación de la expresión génica. Actualmente, se estima que alrededor de 1900-2000 miRNAs identificados en humanos son capaces de modular hasta un 60 % de genes que codifican para proteínas en nuestro genoma (Kozomara et al., 2019).

La mayoría de miRNAs resultan de la transcripción de la RNA polimerasa II, que produce transcritos primarios (pri-miRNAs), los cuales son procesados por la RNasa tipo III, DROSHA, en el núcleo. El resultado es un precursor en forma de horquilla de aproximadamente 70 nucleótidos (pre-miRNA). Estos pre-miRNAs son exportados al citoplasma donde son procesados de nuevo por la RNasa de tipo III DICER dando lugar al miRNA de doble cadena. Finalmente, una de las hebras (miRNA maduro) se integra en el complejo miRISC que contiene la proteína Argonauta (AGO). Este miRNA maduro ya cargado en el complejo *RNA-induced silencing complex* (RISC), interacciona con los mRNAs diana por complementariedad de secuencia, y como resultado silencia la expresión de los transcritos diana (Gebert & MacRae, 2019; López Castel et al., 2019). Es importante destacar que existen otras vías no canónicas de biogénesis de miRNAs que se pueden dividir en la ruta de los miRtrones y las rutas independientes de DICER, aunque la mayoría de miRNAs siguen la vía canónica (Creugny et al., 2018).

A nivel muscular, se ha descrito un grupo de miRNAs específicos de músculo, sobre todo esquelético, llamados miomiRs. Los más conocidos son miR-206, miR-1 y miR-133a/b, aunque más tarde también se han añadido a esta lista miR-208a/b, miR-499 y miR-486, siendo estos miRNAs de músculo estriado y miR-208 solo de músculo cardíaco. Estos miomiRs son claves en la diferenciación muscular y adaptación al estrés (Koehorst et al., 2020).

Diferentes estudios a partir de biopsias de músculo esquelético de pacientes con DM1 han demostrado la alteración de estos miomiRs en DM1 y su relación con la

patología muscular. Gambardella et al. comprobaron que miR-206 estaba sobreexpresado en biopsias de pacientes con DM1, y se localizaba en núcleos centrales y agrupaciones de núcleos, ambos sellos distintivos de la histopatología de DM1 (Gambardella et al., 2010). A pesar de encontrar solo a miR-206 aumentado, estudios posteriores corroboraron los resultados de miR-206 y demostraron que miR-1 y miR-133 a/b estaban disminuidos en DM1 (Ambrose et al., 2017; Fritegotto et al., 2017). Perbellini et al. comprobaron que miR-1 y miR-335 estaban sobreexpresados, mientras que los niveles de miR-29b/c, y miR-33 estaban reducidos en biopsias de músculo esquelético DM1 comparado con los controles sanos (Perbellini et al., 2011). Más aún, observaron un cambio en la distribución celular de miR-1, miR-133b y miR-206 en las biopsias de DM1, de forma similar a Gambardella et al. La relevancia funcional de la desregulación de estos miRNAs y por lo tanto su contribución a la disfunción muscular de DM1, se corroboró al observar un aumento significativo en la expresión de genes diana implicados en el desarrollo muscular (*MEF2a*, *MET*, *GATA6* y *HAND2*), arritmia (*KCNE1*, *KCNJ2*, *CALM2*), y splicing (*SFRS9*) en el caso de miR-1, y atrofia (*DAG1*, *DIABLO*, *RET*, *TRIM63*, *TGFB3*) en el caso de miR-29b/c. Utilizando un modelo de DM1 en mosca que expresa 480 repeticiones CTG en músculo, Fernandez-Costa et al. demostraron que 20 miRNAs estaban alterados, y en biopsias de músculo de pacientes con DM1 validaron los niveles reducidos de aquellos tres que estaban conservados entre humanos y *Drosophila*: miR-1, miR-7 y miR-10. La repercusión de la desregulación de estos miRNAs se confirmó al observar un aumento significativo en la expresión de al menos siete genes diana de estos miRNAs (Fernandez-Costa et al., 2013). Es importante destacar que en el caso de miR-7 las dianas sobreexpresadas fueron *CTSB*, *ATG4A* y *VCL*. Estos genes están implicados en degradación proteica, autofagia, y anclaje de las integrinas al citoesqueleto de actina, es decir, procesos que se han visto alterados en DM1 y se han relacionado con la atrofia muscular característica de la enfermedad (Bargiela et al., 2015). También se ha visto una desregulación de miRNAs en tejido cardíaco de pacientes con DM1 y lo que es más interesante, se han relacionado esas alteraciones con algunos signos característicos de la enfermedad como las arritmias (revisado en Koehorst et al., 2020; López Castel et al., 2019).

El papel central de las proteínas MBNL en la enfermedad también se refleja con la estrecha relación que se ha visto con los miRNAs. Recientemente, Cerro-Herreros et

al. demostraron que miR-23b y miR-218 son reguladores de MBNL-1 y/o -2 después de un cribado en células HeLa. Específicamente, estos dos miRNAs son represores de la traducción de MBNL, y lo que es más interesante, observaron que miR-218 está aumentado en biopsias de músculo de pacientes con DM1 y en diferentes modelos de la enfermedad. Asimismo, la disminución de los niveles de estos miRNAs mediante anti-miRs en miotubos DM1 y ratones modelo HSA^{LR}, aumenta los niveles de MBNL-1 y/o -2 y rescata diferentes fenotipos relacionados con la enfermedad, demostrando de forma clara la importancia de estos miRNAs en el mecanismo de patogénesis de la enfermedad y su potencial terapéutico (Cerro-Herreros et al., 2018, 2020, 2021). Por otra parte, se ha visto que algunas alteraciones de los miRNAs están relacionadas con la falta de MBNL en DM1. Fernandez-Costa et al. estudió el posible papel regulador de Muscleblind (Mbl) para miR-1 y miR-7, ya que estos miRNA estaban regulados a la baja en moscas donde Mbl había sido silenciado, pero solo en el caso de miR-1 la disminución era significativa. En moscas modelo que expresaban 480 repeticiones CTG ambos miRNAs estaban disminuidos significativamente, y al sobreexpresar en estas moscas la isoforma de MbIC se observó un rescate significativo de los niveles de miR-1, lo cual corroboraba los resultados de Rau et al. en los que se describía una implicación directa de MBNL1 en la regulación de la biogénesis de miR-1. Según estas observaciones, en tejido cardíaco el secuestro de MBNL1 por repeticiones de CUG conduce a una reducción de los niveles de miR-1 maduro y un aumento de la expresión de sus genes diana (Fernandez-Costa et al., 2013). Concretamente, MBNL1 compite con LIN28B por unirse a un motivo conservado UGC que se encuentra dentro del bucle de pre-miR-1, de modo que el secuestro de MBNL1 en DM1 favorece la unión de LIN28B, desencadenando la uridilación del pre-miR-1 y su procesamiento ineficiente por DICER (Rau et al., 2011).

En el caso de miR-7, la sobreexpresión de MbIC en moscas modelo no rescató el efecto de las expansiones de CTG en los niveles de miR-7, sugiriendo que las alteraciones de miR-7 en DM1 ocurren a través de un mecanismo diferente (Fernandez-Costa et al., 2013). Como ya se ha mencionado anteriormente, miR-7 se encuentra disminuido en DM1. Una de las dianas que se encontró sobreexpresada en tejido muscular de DM1 fue *ATG4A* que está relacionado con el proceso de autofagia. Estudios independientes sitúan a miR-7 como un inhibidor crítico de la vía de la autofagia a través de la regulación positiva de la señalización de mTOR y la represión

traduccional directa de los genes críticos de la autofagia, *ATG7*, *ULK2* y *ATG4A* (Gu et al., 2017). Sin embargo, aún se desconoce el papel y la relevancia de la regulación a la baja de miR-7 en la patogénesis de la DM1, y por qué está disminuido. Existen muchos mecanismos implicados en la regulación de miR-7 y su biogénesis (revisado en Gajda et al., 2021). De entre todos ellos, debido a la relevancia en este trabajo es importante destacar la regulación de la biogénesis de este miRNA por *Musashi RNA binding protein 2* (*MSI2*) y *Hu antigen R* (HuR). HuR recluta a MSI2 formando un heterodímero de tal forma que HuR asiste en el reconocimiento y unión de MSI2 al bucle C-terminal conservado (CTL) de pri-miR-7-1. El complejo ternario pri-miR-7-1-MSI2-HuR favorece la estabilización del miRNA inmaduro y, en consecuencia, se reduce la forma madura de miR-7 (Choudhury et al., 2013) (Fig. I-3).

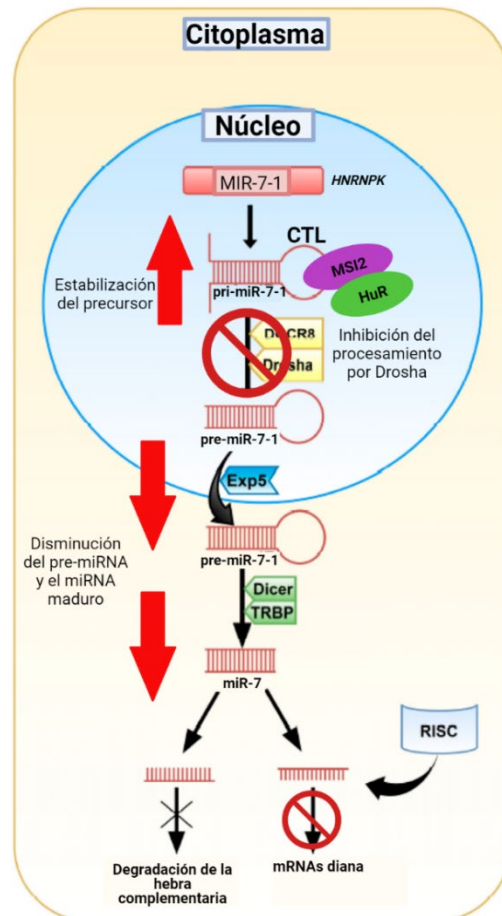


Figura I-3. Regulación de la biogénesis de miR-7 vía MSI2 y HuR. En el núcleo, dentro de un intrón del gen *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRNPK)* se encuentra la secuencia de MIR-7-1. El producto de MIR-7-1 da lugar al precursor pri-miR-7-1. Este precursor presenta en el extremo C-terminal un bucle conservado (CTL) el cual es reconocido por MSI2. El reconocimiento y unión de MSI2 al CTL del pri-miR-7-1 es asistido por HuR, formando un complejo HuR-MSI2-pri-miR-7, que estabiliza el precursor e impide el procesamiento del pri-miR-7-1 a pre-miR-7-1 por Drosha. Como resultado, hay una disminución de miR-7 maduro lo cual afecta a la función represora de miR-7 sobre sus genes diana. Imagen modificada con Biorender.com de (Gajda et al., 2021).

3. Procesos celulares y vías de señalización alteradas que contribuyen a la disfunción muscular en DM1

La homeostasis muscular es un mecanismo extremadamente complejo, pero que se puede simplificar como un equilibrio entre los procesos de generación de nuevo músculo y las vías catabólicas que lo destruyen. En condiciones patológicas, cuando se produce una alteración de la homeostasis del músculo hacia una disminución en los procesos implicados en la formación de nuevo músculo (vías anabólicas) y/o un aumento descontrolado de las vías de degradación proteica, se desencadena lo que se conoce como atrofia muscular (Bonaldo & Sandri, 2013). Como ya se ha comentado en el apartado 1.1, la atrofia muscular es un proceso crítico en los pacientes con DM1, puesto que es la primera causa de muerte. Sin embargo, las causas de esta pérdida progresiva y de la debilidad muscular, que afecta inicialmente a la musculatura distal y luego a la proximal en etapas avanzadas de la enfermedad, no se conocen con exactitud.

Tradicionalmente, la investigación de los mecanismos moleculares que conducen a la atrofia en DM1 se ha centrado en relacionar la alteración en la inclusión de exones alternativos regulados por MBNL1 y CELF1 con los procesos de degradación muscular. Aunque la espliceopatía característica de DM1 origina síntomas concretos de la enfermedad (descritos en el apartado 1.2), las causas últimas que conducen a la atrofia muscular no se han podido asociar a ninguna alteración concreta en la inclusión de exones alternativos. Principalmente, la atrofia se ha relacionado con una mayor actividad y estabilidad de la *Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3β)* por la sobreactivación de CELF1 (Jones et al., 2012). De hecho, los ratones que

experimentan una inhibición temprana de GSK3 β muestran atrofia muscular reducida (Wei et al., 2018). Por otra parte, también se ha visto que la acumulación nuclear de CELF1 puede contribuir al fenotipo atrófico por el deterioro en la traducción de mensajeros en el citoplasma (L. Timchenko, 2013). De hecho, P21, un inhibidor de las CDKs que promueve la salida del ciclo celular está infraexpresado en músculo DM1 debido al déficit de CELF1 en el citoplasma. Los bajos niveles de P21 probablemente contribuyen a una regeneración muscular ineficiente debido a que los mioblastos no pueden entrar en diferenciación miogénica si no salen previamente del ciclo celular (Amack & Mahadevan, 2004). Congruentemente, los ratones que sobreexpresan CELF1 tienen alterado P21 y muestran signos de retraso en la miogénesis probablemente por insuficiente proliferación de mioblastos durante el desarrollo (N. A. Timchenko et al., 2004). Otro modelo de sobreexpresión de CELF1 también desarrolló una enfermedad muscular que incluye atrofia y degeneración (Ward et al., 2010). Por lo tanto, aunque la diferenciación miogénica parece normal en DM1 (Loro et al., 2010), la generación de nuevo músculo está reprimida en DM1 por la incapacidad de los mioblastos de salir del ciclo celular.

Sin embargo, nuevas evidencias apuntan a que otras cascadas de señalización alteradas juegan un papel importante en la patogénesis de la DM1, en parte al contribuir a la regulación deficiente de MBNL1 y CELF1, pero también al alterar múltiples procesos celulares que juegan su propio papel en la atrofia muscular (Revisado en (Ozinski et al., 2021) (Fig. I-4).

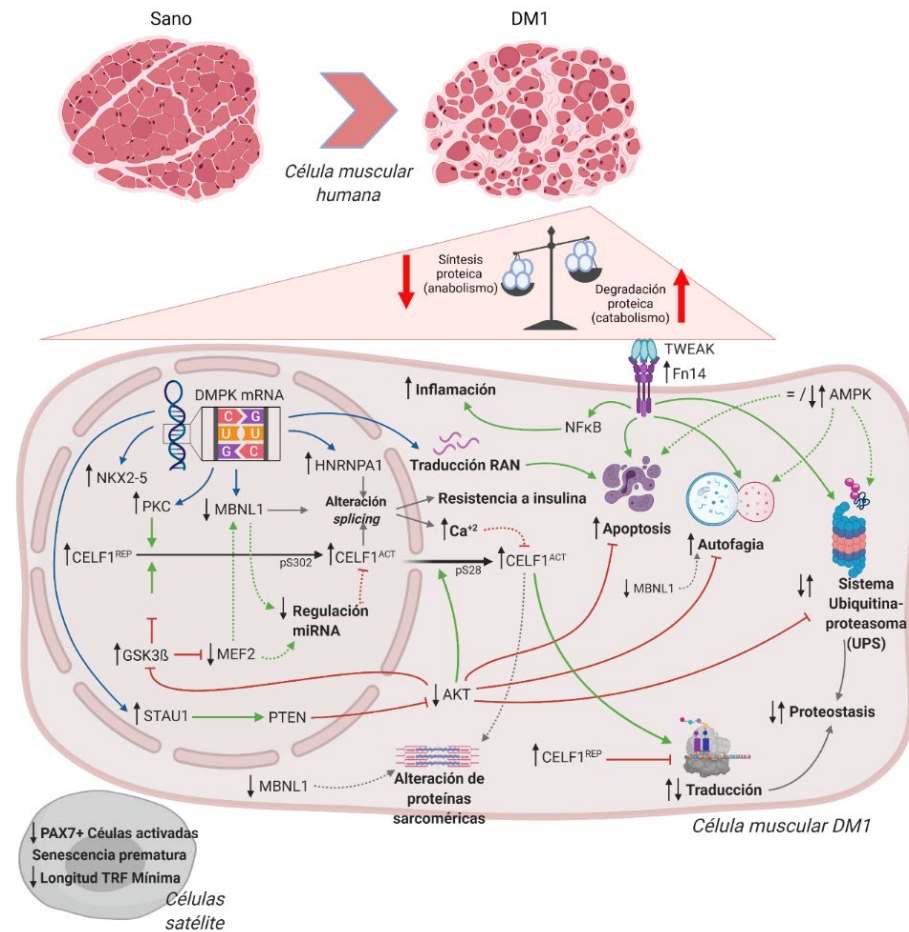


Figura I-4. Principales alteraciones moleculares que contribuyen a la disfunción muscular en DM1. Representación de los efectos tóxicos de las expansiones CUG (flechas azules) en células musculares humanas DM1 y células satélite. Se muestran todas las proteínas implicadas y sus contribuciones (flechas grises) a los procesos celulares relacionados con la disfunción muscular en DM1 (en negrita). También se indican las vías de señalización que unen estos componentes por activación (flechas verdes) o inhibición (líneas inhibidoras rojas). Brevemente, en las células musculares humanas DM1, las expansiones de CUG inducen la traducción no ATG (RAN) asociada a repetición, el secuestro de MBNL1 y la regulación positiva de PKC, HNRNPA1, NKX2-5 y STAU1. En el núcleo, la activación de PKC conduce a la hiperfosforilación y activación de CELF1 (CELF1^{ACT}) y, en consecuencia, contribuye a los defectos de *splicing*, junto con MBNL1 y HNRNPA1, que a su vez induce un aumento en los niveles de calcio. Además, STAU1 induce la expresión de PTEN, lo que conduce a la regulación a la baja de la señalización de PI3K/AKT, contribuyendo a alteraciones en múltiples procesos celulares

y provoca un aumento en la actividad de GSK3 β . GSK3 β estabiliza la forma represiva de CELF1 (CELF1^{REP}) a través de la fosforilación y degradación de ciclina D3 y también inactiva MEF2, lo que perjudica la diferenciación miogénica. Además, MEF2 podría desempeñar un papel en la expresión de MBNL1 y la regulación de miRNAs, lo que a su vez podría afectar a CELF1. En el citoplasma, tanto MBNL1 como CELF1 contribuyen a las alteraciones del sarcómero. La señalización de TWEAK / Fn14 también aumenta e induce inflamación, entre otras contribuciones, mientras que el papel de la AMPK no está claro. En conjunto, todas las alteraciones en diferentes vías de señalización desencadenan una ruptura en el equilibrio de la homeostasis del músculo en cuanto a que se produce una hiperactivación de procesos catabólicos como el UPS, la autofagia o la apoptosis y una disminución en procesos anabólicos (disminución de la síntesis proteica, regeneración muscular deficiente) que finalmente contribuyen al fenotipo atrófico de DM1. Imagen adaptada de (Ozimski et al., 2021) utilizando Biorender.com.

3.1 Autofagia y UPS en DM1

Debido a la repercusión en este trabajo es importante destacar dos procesos que median la degradación de los componentes celulares para mantener la homeostasis muscular como son el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y la autofagia. En condiciones de homeostasis del músculo, se reciben señales de supervivencia y de crecimiento que activan la vía IGF1/AKT/mTOR promoviendo la síntesis proteica y, por lo tanto, la formación de nuevo músculo. Además, la activación de AKT permite mantener fosforilado a los factores de transcripción FOXO (FOXO1/3), de modo que se impide su traslocación al núcleo. Por otro lado, los procesos de degradación como la autofagia y el UPS presentan una actividad basal que permite eliminar proteínas y orgánulos defectuosos para mantener así un balance entre la síntesis y degradación proteica, pero siempre inhibidos en parte, gracias a la represión de otros factores como por ejemplo mTOR. En condiciones patológicas, entre las múltiples vías que se encuentran alteradas, se produce una falta de señalización de IGF1, que conduce a una disminución de la activación de AKT y por lo tanto de mTOR. Por consiguiente, la falta de fosforilación de FOXO por parte de AKT, permite su translocación al núcleo y la consecuente activación de la transcripción de diferentes atrogenes, como *tripartite motif containing 63 (TRIM63) /muscle RING-finger protein 1 (MuRF1)* y *F box protein 32 (FBXO32) / ATROGINA-1*, que favorecen la actividad del UPS, y de diferentes ATGs

que participan en alguno de los puntos de la autofagia. Además, la falta de energía (aumento de AMP/ATP) lleva a una activación de *AMP-activated protein kinase* (AMPK) que favorece también la activación de los procesos catabólicos mediante la activación de la autofagia, promoción de FOXO al núcleo y también inhibición de mTOR, que contribuye al déficit de síntesis proteica. Por otro lado, las señales de estrés llevan a un aumento de *MYOSTATIN* (MSTN) y/o de *Transforming growth factor beta* (TGF β) los cuales activan la señalización vía SMAD1/2 por dimerización de receptores como TGFBR1/2 y ACTR1B/2B. Esta señalización activa una cascada de SMADs que finalmente se translocan al núcleo actuando de co-factores de FOXO, lo cual contribuye a activar las vías catabólicas, junto con la represión que ejercen las SMADs sobre la vía AKT/mTOR. En conjunto, se produce una ruptura de la homeostasis del músculo, debido a que el aumento excesivo de la degradación proteica vía hiperactivación de la actividad del UPS y la autofagia, junto con otras vías alteradas, impiden que la síntesis proteica (disminuida también) pueda cubrir esa degradación excesiva, lo que finalmente conduce a degeneración muscular (Fig. I-5) (Revisado en Bonaldo & Sandri, 2013).

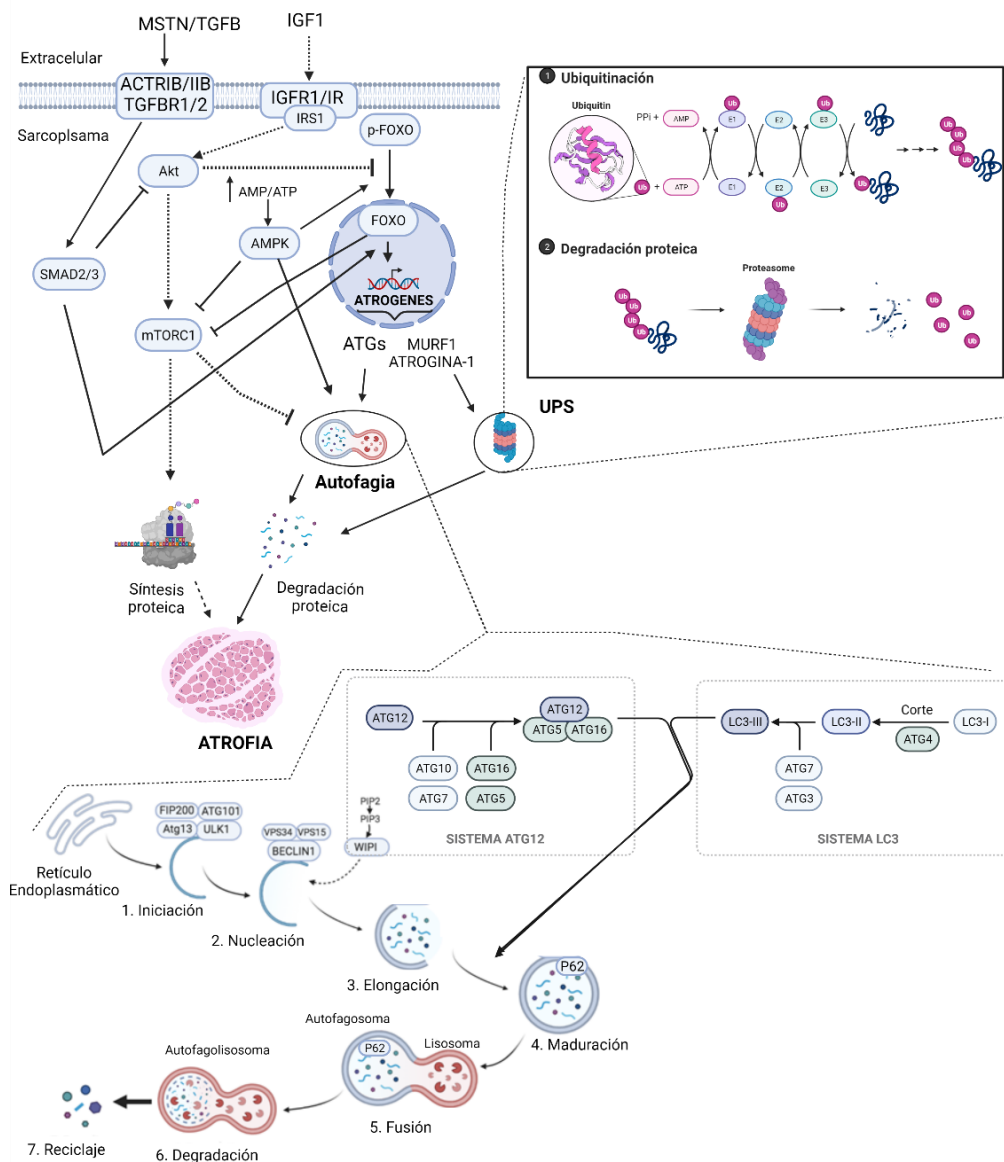


Figura I-5. Representación esquemática de los principales procesos catabólicos que contribuyen a la atrofia muscular; la autofagia y el sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS), y de las vías de señalización que los regulan. Se representan todas las etapas que componen la ruta de la autofagia y del UPS. En el caso del UPS, se producen ubiquitinaciones (Ub) sucesivas del cargo a degradar mediante las Ubiquitin-ligasas (E1-E3), finalmente la proteína queda marcada con una cadena de ub que es reconocida y degradada por el proteasoma 26S, formado por dos subunidades 19S y una 20S.

En el caso de la autofagia, se producen varias etapas (iniciación, nucleación, elongación y maduración) para la formación, a partir de membrana del retículo endoplasmático, de vesículas conocidas como autofagosomas. En la formación de este tipo de vesículas están implicadas una gran cantidad de proteínas de la familia de los *Autophagy-related genes* (ATG). Los autofagosomas se fusionan con los lisosomas para dar lugar a los autofagolisosomas donde se lleva a cabo la degradación del cargo por parte de los enzimas lisosomales. También se representan las diferentes vías de señalización que regulan los procesos de autofagia y UPS en condiciones de atrofia. Imagen hecha en Biorender.com.

La desregulación de estos procesos catabólicos constituye un sello distintivo de atrofia y debilidad muscular. En los últimos años, diferentes estudios han demostrado un papel central de la autofagia y la desregulación del UPS en el proceso de atrofia muscular en DM1 (Ozinski et al., 2021).

El aumento patológico en la actividad del UPS se describió en músculo esquelético y cardíaco de ratones transgénicos DM300, los cuales expresan una región genómica humana con repeticiones expandidas de aproximadamente 550 CTG (Vignaud et al., 2010). Estos ratones mostraron desgaste muscular progresivo y debilidad entre los 3 y 10 meses de edad debido a la sobreexpresión de *Atrogin-1* y/o *Murf1*, sugiriendo que la activación aberrante de esta vía proteolítica podría estar mediando, al menos en parte, el proceso atrofico. También se ha visto activación patológica de UPS en ratones DMSXL a los 4 meses de edad (Huguet et al., 2012). La activación patológica de la señalización de AMPK o TWEAK/Fn14 también se ha descrito en músculos y tejidos esqueléticos de un modelo de DM1 murino y tejidos de pacientes con DM1 (Brockhoff et al., 2017; Yadava et al., 2015). Debido a que la activación de TWEAK en miotubos causa atrofia a través de la activación del UPS y otras vías como NF- κ B (Sato et al., 2014), otro potencial contribuyente a la hiperactivación de UPS en DM1 podría ser la activación patológica de la señalización TWEAK / Fn14.

La autofagia se considera un proceso que promueve la supervivencia celular ya que elimina proteínas y orgánulos dañados en la célula, promoviendo el reciclaje de los componentes moleculares y la producción de energía y, en consecuencia, el mantenimiento de la homeostasis muscular. No obstante, en determinados estados fisiopatológicos, su sobreactivación lleva a alteraciones en la homeostasis proteica, atrofia muscular y muerte celular (Klionsky et al., 2021).

En este sentido el tamaño de las expansiones CTG en los mioblastos primarios humanos y el nivel de activación de la apoptosis y la autofagia han mostrado una correlación positiva (Loro et al., 2010), mientras que en células madre neurales DM1 se han descrito déficits en proliferación y sobreactivación de la autofagia (Denis et al., 2013). La autofagia hiperactivada debida a la inhibición de mTOR/S6K1 en respuesta al estrés metabólico también se ha observado en mioblastos fetales DM1 (Beffy et al., 2010). Estudios posteriores realizados en biopsias de músculo esquelético de pacientes apoyan también la alteración de esta vía al detectar un aumento en la expresión de casi dos veces del gen regulador de la autofagia *ATG4A* (Fernandez-Costa et al., 2013). Un apoyo crítico a estas observaciones procede de la experimentación con animales. En un modelo en mosca que expresa expansiones CUG tóxicas bajo el control de un promotor inducible por choque térmico, la expresión de RNAs no codificantes con 480 repeticiones CUG en adultos redujo significativa el área media de los músculos indirectos de vuelo (IFM), concomitante con una activación de la apoptosis y la autofagia. Consecuentemente, la inhibición genética de ambos procesos fue suficiente para mejorar el fenotipo atrofico. Además, en biopsias de pacientes y mioblastos DM1 se observó un aumento de la expresión de genes y marcadores relacionados con el proceso (Bargiela et al., 2015). Congruente con estas observaciones, el modelo de ratón que expresa de forma inducible 960 repeticiones CUG en el músculo esquelético presenta miopatía, así como, defectos histopatológicos relacionados con degeneración muscular. Este modelo murino muestra una regulación positiva de las proteínas involucradas en la vía autofágica (Morriss et al., 2018). Una correlación directa entre la desregulación de la autofagia y la patología muscular de DM1 también se estudió en ratones HSA^{LR}, miotubos DM1 y biopsias musculares (Brockhoff et al., 2017).

Con todo, queda demostrado que la hiperactivación de la autofagia es responsable del fenotipo atrofico en DM1 de forma significativa, no obstante, se desconocen, en parte, las causas del aumento patológico de este proceso. Algunos estudios sugieren que la falta de biodisponibilidad de MBNL1 contribuye, al menos en parte, al aumento patológico de la actividad autofágica. Denis et al. demostraron que el aumento de la autofagia estaba relacionado con las alteraciones de la vía de señalización de mTOR, y que esta vía estaba regulada por MBNL1, ya que la pérdida de función de MBNL1, resultó en la alteración de la señalización de mTOR, mientras que los experimentos

de ganancia de función rescataron el fenotipo (Denis et al., 2013). De forma similar, se ha demostrado en un modelo inducible de DM1 que la sobreexpresión de MbIC, una isoforma de la proteína Muscblind de *Drosophila*, era suficiente para reducir la expresión normal de genes relacionados con la autofagia y mejorar el fenotipo atrófico. Además, la sobreexpresión de mTOR inhibió la autofagia y mejoró la atrofia (Bargiela et al., 2015). Recientemente, se ha demostrado en células satélite (SSC) de DM1 que MBNL1 puede promover la capacidad proliferativa de SSCs DM1 al inhibir la autofagia a través de la vía mTOR (Song et al., 2020).

En conjunto todas las observaciones apuntan a que la atrofia típica de DM1 se debe a un problema en el balance entre el mantenimiento de la masa muscular y la regeneración, debido a la activación de los procesos de apoptosis/autofagia/UPS y la falta de regeneración, más que a miogénesis deficiente. De manera que, las estrategias terapéuticas dirigidas a reestablecer el balance en algunas de estas vías presentan un gran potencial terapéutico contra la atrofia muscular en DM1.

4. Modelos experimentales en DM1

4.1 Modelos *in vitro*

Una de las estrategias ampliamente utilizadas para confirmar la contribución directa de las repeticiones en el mecanismo de patogénesis de la DM1 y rastrear/validar diferentes moléculas con potencial terapéutico, ha sido la expresión de repeticiones CTG en diferentes modelos celulares (Ho et al., 2004; Konieczny et al., 2017; J. E. Lee et al., 2012; Warf & Berglund, 2007). No obstante, estos modelos presentan limitaciones asociadas a que el nivel de sobreexpresión de las repeticiones CTG no está bajo el control del promotor endógeno de *DMPK*.

Otros modelos de gran interés, y que se han empleado en este trabajo, son las líneas celulares derivadas de pacientes (Fig. I-6). En la actualidad, en el campo de la DM1, los cultivos celulares primarios incluyen principalmente fibroblastos dérmicos y células del músculo esquelético, también llamados mioblastos, y aislados directamente del tejido del paciente. Los fibroblastos primarios se utilizan a menudo debido a su relativa accesibilidad y su facilidad de manipulación en cultivo, al contrario de lo que ocurre con los mioblastos. Sin embargo, los mioblastos tienen la ventaja de iniciar una diferenciación miogénica que da como resultado su fusión en

miotubos (Beaulieu et al., 2012; Bigot et al., 2009; Loro et al., 2010). Por lo tanto, teniendo en cuenta la ventaja que presentan los fibroblastos frente a los mioblastos, y para solucionar la desventaja de los fibroblastos primarios de no poder diferenciarse a miotubos, se han desarrollado modelos en los que se ha transducido de forma estable una construcción viral que expresa el factor miogénico *MYOD1*, lo cual permite forzar la entrada en el proceso miogénico y conseguir transdiferenciar los fibroblastos en miotubos (Kuyumcu-Martinez & Cooper, 2006; Ravel-Chapuis et al., 2012).

Otra limitación de trabajar con células primarias es que a medida que van aumentando los pases del cultivo primario, las células entran en un estado de senescencia replicativa, reduciendo su capacidad proliferativa, y haciendo que sean cultivos de corta duración. Esto junto con la limitación de la disponibilidad de las biopsias y la variabilidad intrínseca de cada paciente del que se aíslan las células, planteó la necesidad de inmortalizar fibroblastos y mioblastos primarios y fibroblastos transdiferenciados. Para ello se requiere la expresión estable de la telomerasa humana (hTERT) y la inhibición adicional de la vía de señalización P16 mediante sobreexpresión de CDK4. Las líneas celulares DM1 resultantes 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 (André et al., 2019; Arandel et al., 2017; Larsen et al., 2011; O'Leary et al., 2010; Pantic et al., 2016; Provenzano et al., 2017).

En este sentido, en este trabajo, aunque se han utilizado puntualmente líneas de mioblastos primarios, así como líneas de fibroblastos primarios transdiferenciados a mioblastos, principalmente se han empleado dos líneas celulares cedidas por el doctor Denis Furling (Instituto de Miología, París, Francia). Se trata de fibroblastos obtenidos de una biopsia de piel de una donante femenina de 11 años que expresaba 1300 repeticiones de CTG, y de un donante no afectado de DM1 de 25 años (control). Estos fibroblastos están inmortalizados con el sistema descrito anteriormente. Además, se pueden transdiferenciar a miotubos ya que han sido transducidos de forma estable para que expresen el gen *MYOD1* de forma inducible por doxiciclina. Este modelo de DM1 presenta características moleculares asociadas con el

mecanismo de ganancia de función de RNA tóxico, como los agregados de RNA nuclear y los defectos de *splicing* o defectos en la capacidad de fusión de las células. 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; Cerro-Herreros et al., 2018).

En los últimos años, ha adquirido gran relevancia el desarrollo de modelos que permitan resolver las limitaciones que supone el trabajo con cultivos primarios, es decir, la disponibilidad limitada de biopsias y la dificultad para obtener material que refleje las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad. Entre estos modelos, por un lado, están las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). La ventaja de esta estrategia es que se puede obtener de forma sencilla células somáticas de pacientes con DM1, por ejemplo, fibroblastos de la epidermis, y reprogramarlos a un estado embrionario y diferenciarlos en el tipo celular que se desee (Y. Gao et al., 2016; Ueki et al., 2017; Yu et al., 2007). Ahora bien, teniendo en cuenta el estado de pluripotencia de estas células, las repeticiones CTG son altamente inestables durante el proceso de reprogramación y los subsiguientes pases, con una expansión más rápida cuando las repeticiones CTG son más largas. Además, el estado maduro de las células iPS derivadas podría no ser equivalente al estado maduro de las células a las que se deriva *in vivo*. Por otro lado, se ha desarrollado por bioingeniería un método para fabricar un modelo 3D de tejido de músculo esquelético DM1 utilizando mioblastos transdiferenciados de fibroblastos derivados de pacientes. Este modelo presenta grandes ventajas frente al uso de animales y cultivos celulares tradicionales (en 2D). Por ejemplo, este modelo celular en 3D representa la arquitectura compleja del músculo esquelético frente al modelo celular 2D. Por otro lado, el uso de animales para experimentación farmacológica plantea varios dilemas éticos. Además, estos modelos *in vivo* no son lo suficientemente efectivos en predecir la eficacia clínica de fármacos por la dificultad de extrapolar los resultados obtenidos con animales a seres humanos. En conjunto, esta nueva tecnología podría servir para acelerar la investigación preclínica ya que los ensayos tradicionales podrían complementarse con modelos de tejidos 3D generados a partir de células de pacientes y que mimeticen la arquitectura del músculo esquelético (Fernández-Garibay et al., 2021).

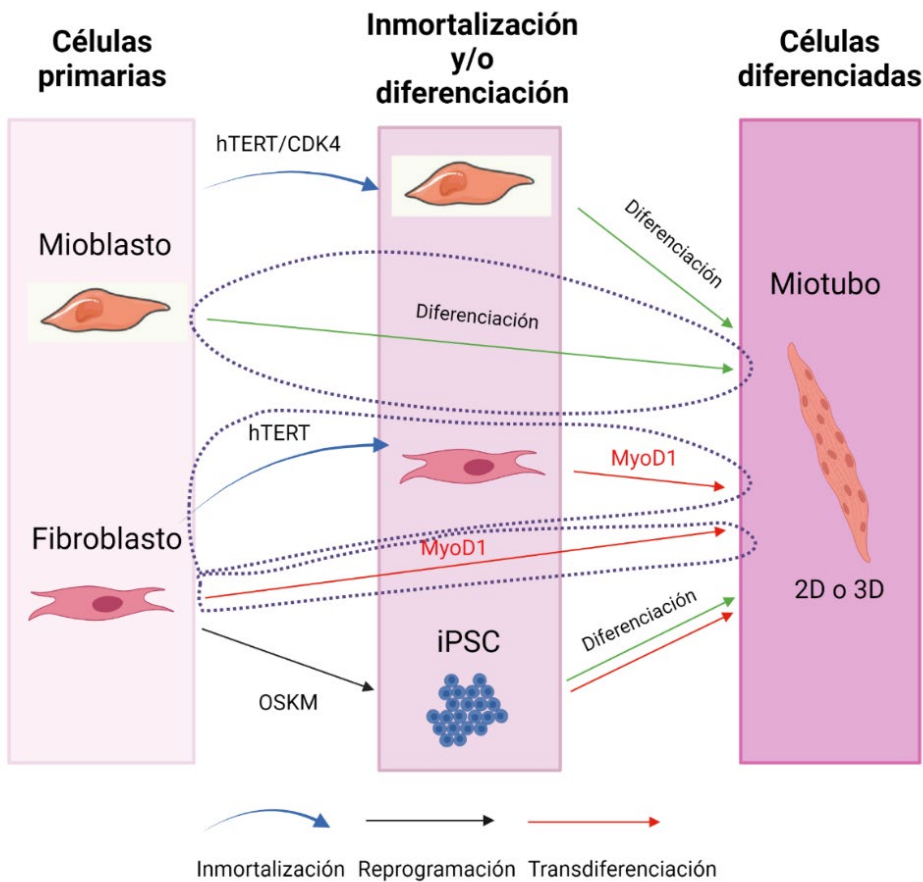


Figura I-6. Modelos *in vitro* de la parte muscular de DM1 derivados de células de pacientes. Rodeado con puntos morados se muestran los dos modelos que se han utilizado en este trabajo. Por una parte, mioblastos primarios derivados de pacientes DM1 cedidos por el Dr. Juan Vílchez (Unidad de Investigación Neuromuscular, Departamento de Neurología, Instituto de Investigación Sanitaria la Fe, Hospital Universitario i Politécnico La Fe, 46026 Valencia, España), fibroblastos primarios transdiferenciados a miotubos mediante la transducción de MYOD1 cedidos por el Dr. Adolfo López de Munain (Área de Neurociencias, Instituto Biodonostia, 20014 San Sebastián, España) y, finalmente fibroblastos inmortalizados y transdiferenciados a miotubos cedidos por el Dr. Denis Furling. OSKM (se refiere a los factores de reprogramación de Yamanaka Oct3/4 (denominado también Pou5fl), Sox2, Klf4 y c-Myc. Imagen hecha en Biorender y adaptada de (Matloka et al., 2018).

4.2 Modelos *in vivo*

Durante los últimos 20 años, se han generado una gran variedad de modelos animales para investigar los mecanismos fisiopatológicos de la DM1, incluyendo *Caenorhabditis elegans* (K.-Y. Chen et al., 2007), *Drosophila melanogaster* (de Haro et al., 2006; Garcia-Lopez et al., 2008; Picchio et al., 2013), *Mus musculus* (M. S. Mahadevan et al., 2006; Mankodi et al., 2000; Seznec et al., 2000) y *Danio rerio* (Todd et al., 2013).

4.2.1 *Drosophila melanogaster*

A pesar de que existen diferentes modelos en *Drosophila* de DM1 como se ha mencionado, merece especial atención debido a la relevancia que presenta en este trabajo un modelo de DM1 en *Drosophila* que se generó en nuestro laboratorio. Estas moscas expresan 480 repeticiones CTG en el contexto de un RNA no traducible, cuyo transgén está formado por repeticiones sintéticas interrumpidas cada 20 tripletes por el pentanucleótido CTCGA (de Haro et al., 2006; Garcia-Lopez et al., 2008). La expresión de repeticiones CTG en músculo de *Drosophila* reproduce varios aspectos de la enfermedad en humanos como el secuestro de las proteínas Muscleblind en los foci ribonucleares, la degeneración progresiva de los IFMs, activación de las rutas de apoptosis y autofagia, alteraciones en el *splicing*, reducción de la vida media y alteración en la biogénesis de miRNAs (Bargiela et al., 2015; Fernandez-Costa et al., 2013; Garcia-Lopez et al., 2008; Loro et al., 2010). Por lo tanto, este modelo reproduce aspectos moleculares, genéticos e histológicos de la enfermedad y ha sido utilizado como herramienta para descubrir nuevos componentes en la ruta de patogénesis de la enfermedad, así como fármacos potenciales para el tratamiento de la DM1 (Cerro-Herreros et al., 2016; Fernandez-Costa et al., 2013; García-Alcover et al., 2014; Garcia-Lopez et al., 2008, 2011; Llamusi et al., 2013).

4.2.2 *Mus musculus*

Se han creado diferentes modelos murinos para estudiar los mecanismos patogénicos de la DM1. Los más utilizados para estudiar el mecanismo de patogénesis, así como testar diferentes aproximaciones terapéuticas, han sido

aquellos en los que se han introducido repeticiones CTG tóxicas, como se resume en la tabla I-1.

Debido a la importancia en este trabajo, merece especial atención el modelo murino HSA^{LR}. Utilizando como fondo genético la cepa de ratones FVB/NJ se insertaron aproximadamente 250 repeticiones CTG en el 3'UTR de un gen no relacionado con la enfermedad: *la actina alfa 1 humana (ACTA1)*. La expresión de *ACTA1* es específica de músculo esquelético, de modo que la expresión de transcritos de *ACTA1* que contienen en su 3'UTR expansiones CUG con un tamaño considerado como patogénico, lleva a reproducir características fisiológicas y moleculares típicas de la enfermedad. En concreto, estos ratones desarrollan un fenotipo grave, incluyendo disminución de la fuerza de agarre, teniendo en cuenta el peso, y descargas miotónicas a partir de los 4 meses. A nivel histológico, entre los signos de miopatía son característicos la presencia de núcleos centrales en las fibras musculares. A nivel molecular presentan foci ribonucleares, secuestro de Mbnl1 y alteraciones en el *splicing* de transcritos musculares. Sin embargo, este modelo tiene la limitación de la expresión exclusiva en musculatura esquelética, restringiendo su aplicación a la investigación de la patología esquelética muscular de la DM1. Además, no reproduce algunas de las características típicas de la enfermedad como la inestabilidad somática e intergeneracional de las expansiones, el desgaste muscular y los niveles de Celf1 aumentados (Mankodi et al., 2000).

		HSA ^{LR}	DMSXL	GFP- DMPK-3'UTR (CTG) _{200/5} (DM200/DM 5)	EpA960	TREDT960I
Diseño y expresión del transgén	(CTG)n	~250	>1000	5/200	960	960
	Secuencias flanqueantes	3'UTR actina esquelética humana	45kb del locus DM1 humano	DMPK humano	3'UTR DMPK humano	3'UTR DMPK humano
	Promotor	ACTA1 humano	DMPK humano	DMPK humano, tet-sensible	B-Actina, potenciador CMV, sistema Cre/loxP	DMPK humano tet-sensible
	Expresión del transgén	Músculo esquelético y uniones neuromusculares	Ubicuo	Inducible (Ubicuo o específico de tejido)	Inducible (Ubicuo o específico de tejido)	Inducible con (Músculo esquelético)
Aspectos moleculares y fenotípicas típicas de DM1	Foci de RNA	✓	✓	ausente	✓	✓
	Colocalización de MBNL	Mbnl1	Mbnl1 y Mbnl2	no detectada	Mbnl1 y Mbnl2	Mbnl1
	Aumento de CEFL1	no claro	Cerebro (y CELF2) tendencia en corazón	Músculo esquelético, normal en corazón	Músculo esquelético, corazón, cerebro	Músculo esquelético
	Alteración del <i>splicing</i>	Severa	Leve, dependiente de la edad	Leve en músculo esquelético, ausente en corazón	Severa en músculo esquelético y corazón. Leve en cerebro	Leve
	Miotonía	✓	✓	✓	✓	✓
	Atrofia	Leve > 14 meses	✓	Leve	✓	✓
	Debilidad (Fuerza de agarre)	✓	✓ no significativa al normalizar al peso	✓	✓	✓
	Histopatología	✓	✓	✓	✓	✓
Referencias	Mankodi et al. 2000, Jones et al. 2012, Lin et al. 2006	Seznec et al. 2000, Huguet et al. 2012	Mahadevan et al. 2006	Wang et al. 2007, Wang et al. 2017, Orengo et al. 2008	Morris et al. 2018	

Tabla I-1. Principales modelos murinos en DM1. En la tabla se muestran las principales características genéticas y fenotípicas de los modelos murinos en DM1 más estudiados. Al igual que los ratones TREDT960I que expresan de forma inducible en músculo esquelético las 960 repeticiones CTG, también se han generado otros ratones que expresan dichas repeticiones de forma inducible y específica en corazón como se describe en (Rao et al., 2021). Tabla Adaptada de (Braz et al., 2018; Gomes-Pereira et al., 2011).

5. Estrategias terapéuticas en DM1

La disponibilidad de modelos de DM1 en *Drosophila*, ratones y células, ha hecho posible el diseño de numerosos enfoques terapéuticos que se pueden agrupar en tres categorías amplias de moléculas pequeñas, silenciamiento génico post-transcripcional utilizando oligonucleótidos con secuencia dada (ASO y RNAi) y terapias génicas (revisado (Braz et al., 2018; Konieczny et al., 2017; Overby et al., 2018; Pascual-Gilabert et al., 2021).

5.1 Terapias basadas en pequeñas moléculas

Un enfoque actual en el tratamiento de la DM1 es la utilización de pequeñas moléculas ya sean nuevos fármacos y reutilizados (reposicionamiento). La reutilización de fármacos tiene expectativas prometedoras en cuanto a eficacia, seguridad, coste y traslación al entorno clínico. Esto se debe a que los fármacos reutilizados ya se han estudiado en modelos preclínicos y en humanos para evaluaciones de seguridad. Además, en muchos casos los aspectos de formulación ya están desarrollados a diferencia de los fármacos completamente nuevos, lo que explica por qué están más cerca de alcanzar la autorización de comercialización.

Debido al carácter multisistémico de la enfermedad en cuanto a la alteración de muchas vías de señalización, la realización de rastreos de alto rendimiento ha permitido identificar un amplio abanico de pequeñas moléculas con un elevado potencial terapéutico contra la DM1 (Revisado en Konieczny et al., 2017; K. Reddy et al., 2019). De entre todas ellas, es interesante destacar tres fármacos de reposicionamiento; tideglusib, mexiletina y metformina, ya que han conseguido completar la fase II de ensayos clínicos en la que se ha probado la administración oral y está programado su paso a fase III (Bassez et al., 2018; Heatwole et al., 2021;

Horrigan et al., 2020). Tideglusib es un inhibidor de la GSK3 β diseñado inicialmente para tratar la enfermedad de Alzheimer. En mioblastos de DM1 congénita (CMD) el tratamiento con Tideglusib corrige los niveles de GSK3 β y CELF1, y reduce la expresión de *DMPK* tóxico. *In vivo*, en ratones HSA^{LR} y DMSXL, mejora parámetros funcionales como miotonía o debilidad muscular, en músculo y cerebro en el caso de los ratones DMSXL (M. Wang et al., 2019). Mexiletina, es un antiarrítmico utilizado para reducir o prevenir la miotonía mediante el bloqueo de canales de sodio implicados en la contracción y relajación muscular (Takahashi & Cannon, 2001). Se ha visto que reduce los niveles de transcritos *DMPK* normales y mutantes (Witherspoon et al., 2015). Finalmente, metformina es un agente para tratar la diabetes tipo 2. Se ha sugerido que podría utilizarse para tratar la resistencia a insulina característica de DM1. También corrige defectos en el *splicing* de forma dependiente a la vía AMPK y por otros mecanismos independientes, y mejora la disfunción mitocondrial y la alteración en el metabolismo en fibroblastos DM1 (García-Puga et al., 2020; Laustriat et al., 2015).

Estos tres compuestos afectan a las vías de señalización celular alteradas de forma indirecta por la toxicidad de las expansiones CUG y por lo tanto tienen un efecto indirecto y beneficioso sobre la DM1. Sin embargo, la mayoría de rastreos han ido dirigidos, por una parte, a encontrar moléculas que inhiban la interacción CUGexp:MBNL o que actúen sobre la conformación del RNA tóxico y desplieguen la estructura de la horquilla alterando su afinidad por las proteínas con las que interacciona y así liberar la proteína secuestrada. Entre ellas, cuatro son las que han generado mayor expectación; (1) la pentamidina, pertenece a la familia de los antimicrobianos diamidinas. En DM1 esta molécula compite con MBNL1 por la unión a horquillas CUG, observando rescates *in vitro* e *in vivo* en la inclusión de exones alternativos regulados por las proteínas MBNL. Por otro lado, en nuestro laboratorio se identificó el (2) hexapéptido abp1, el cual estabiliza las expansiones CUG en su conformación de cadena sencilla evitando el secuestro de MBNL1 y demostrando que la formación de esta estructura secundaria es en sí misma una diana terapéutica válida en moscas modelo DM1 y ratones HSA^{LR} (García-Lopez et al., 2011). Otro tipo de moléculas que impiden la unión de MBNL a las repeticiones son (3) la eritromicina, un antibiótico natural que mejora la miotonía y las alteraciones en la inclusión de exones alternativos en un modelo murino de la enfermedad (Nakamori et al., 2016)

y (4) la fenilbutazona (PBZ) un antiinflamatorio no esteroideo. Uno de los efectos terapéuticos observados de la PBZ es a través de inhibir la unión de MBNL a CUGexp. En ratones modelo HSA^{LR} el tratamiento con PBZ aumentó la fuerza de agarre, rescató el porcentaje de inclusión de diferentes exones alternativos y redujo el número de núcleos centrales en las fibras musculares (G. Chen et al., 2016). Ahora bien, se ha sugerido que las estrategias que meramente bloquean el secuestro de MBNLs por las expansiones CUGs podrían secundariamente generar otros problemas, si por ejemplo los transcritos tóxicos previamente acumulados en foci ribonucleares, pudieran ahora salir al citoplasma donde podrían generar otro tipo de toxicidad. Por otra parte, teniendo en cuenta esto, el otro tipo de estrategias se ha centrado en identificar moléculas pequeñas que regulan positivamente los niveles de proteína MBNL1 (F. Zhang et al., 2017). Si bien la sobreexpresión de MBNL1 por sí sola puede no ser suficiente para rescatar toda la patogénesis asociada en la DM1 (Yadava et al., 2015), la restauración de los niveles funcionales de proteínas MBNL, cuya actividad es limitante en la enfermedad, puede ser un enfoque terapéutico viable para revertir muchos fenotipos que provocan síntomas específicos en DM1 (Chamberlain & Ranum, 2012; Kanadia et al., 2006). Hasta ahora, tres enfoques epigenéticos diferentes han demostrado la capacidad de regular al alza la expresión de MBNL1 endógena en modelos de mamíferos. El primer rastreo de este tipo de moléculas identificó ISOX y vorinostat, ambos inhibidores de las histonas desacetilasas (HDAC). El tratamiento en fibroblastos derivados de pacientes con DM1 aumentó los niveles de MBNL1 aproximadamente dos veces y fue suficiente para rescatar la inclusión de diferentes exones alternativos dependientes de MBNL1 como el exón 22 de *ATP2A1* y el exón 11 de *INSR* (F. Zhang et al., 2017). Por otro lado, como se ha descrito anteriormente, la PBZ permite que haya más disponibilidad de MBNL debido a que impide su unión con las repeticiones CUG, pero además presenta una actividad dual, puesto que actúa a nivel epigenético, suprimiendo la metilación de una región potenciadora en el intrón 1 de *Mbnl1*, lo que resulta en un aumento de la transcripción de *Mbnl1* y contribuye a los rescates que se observan tras el tratamiento (G. Chen et al., 2016). Un tercer enfoque está basado en la utilización de oligonucleótidos sintéticos y modificados químicamente para bloquear los miRNAs que inhiben la expresión de MBNL1 y 2 en el tejido del músculo esquelético (Cerro-Herreros et al., 2016, 2018), lo cual se tratará en el siguiente apartado.

5.2 Terapias basadas en el silenciamiento génico post-transcripcional utilizando oligonucleótidos con una secuencia dada

La estrategia terapéutica basada en oligonucleótidos está en auge, con al menos diez estudios ya aprobados para uso clínico en distrofias musculares (Iftikhar et al., 2021). En DM1, los principales enfoques han sido el diseño de oligonucleótidos antisentido (ASOs) o técnicas basadas en la interferencia de RNA (RNAi) en la que se incluyen siRNAs o modulación de miRNAs.

Para su uso como terapia, los RNAi y los ASOs deben superar una serie de problemas relacionados con la estabilidad, biodistribución y selectividad por mRNA. Estos problemas pueden resolverse, al menos en parte, mediante el uso de modificaciones químicas (Geary et al., 2015; Hammond et al., 2021). Entre las modificaciones químicas más destacables están la introducción en el esqueleto químico del oligonucleótido de enlaces fosforotioato (PS) o la modificación de la ribosa con un puente extra que conecta el oxígeno en 2' y el carbono 4' (LNA (*locked nucleic acids*) y BNAs (*bridged nucleic acid*)) para evitar degradación por nucleasas, y las modificaciones en la ribosa por adición de grupos 2'-metoxi (2'-O-metil: 2'-OMe) o 2'-O-metoxietil (2'-MOE) para mejorar la afinidad de la unión y la estabilidad del oligonucleótido por su diana.

En el caso de los ASOs son ácidos nucleicos monocatenarios, cortos y sintéticos, complementarios a determinadas secuencias específicas de un mRNA diana. Estos ASOs entran a la célula mediante endocitosis y se unen al mRNA diana ejerciendo su actividad al (i) bloquear la maduración de las proteínas, la inclusión de exones alternativos o la desestabilización del pre-mRNA o (ii) degradar el mRNA diana por inducción de la actividad de la enzima RNasa-H (Liang et al., 2017). Uno de los tipos de ASOs más relevantes para este trabajo son los gapmers, que hibridan por complementariedad de secuencia con el RNA diana formando un heterodúplex DNA-RNA. En su estructura presentan una región central del oligonucleótido que carece de las modificaciones descritas anteriormente (2'-OMe, 2'-MOE, LNA o BNA) dejando así un fragmento suficiente para que la enzima RNasa-H reconozca y ejerza su acción endonucleasa sobre el heterodúplex DNA-RNA, lo que favorece la degradación del RNA diana. En DM1, este tipo de estrategias se han dirigido a la raíz del problema, es decir, a degradar los transcritos *DMPK*. A pesar de que se han testado diferentes

químicas de ASOs dirigidos a degradar los transcritos *DMPK* (Wheeler et al., 2012), solo los ASOs de tipo *gapmer* (*gapmer*-ASO) con química cET, 2'-MOE que desencadenan la degradación específica de los transcritos *DMPK* han llegado a fase clínica (IONIS-DMPK-2.5Rx; ClinicalTrials.gov identifier NCT02312011 (Madsen, 2017)) tras haber funcionado de forma muy efectiva en mioblastos DM1, ratones DMSXL y monos (Jauvin et al., 2017; Pandey et al., 2015). A pesar de los resultados tan alentadores, el ensayo clínico para este fármaco se suspendió debido a un beneficio terapéutico inadecuado en los pacientes con DM1, pues se observó que llegaba de forma insuficiente al músculo esquelético.

Los siRNA y miRNAs regulan la expresión génica endógena mediante RNAi. Atendiendo a una finalidad terapéutica, por una parte, los siRNAs pueden ser sintetizados químicamente y ser utilizados para silenciar genes específicos. Por otra parte, los miRNAs pueden ser modulados mediante el diseño de oligonucleótidos sintéticos dirigidos tanto a reducir su actividad (anti-miRs) como a aumentarla (Ago-miRs o miRNAs miméticos), de modo que la modulación de los miRNAs afecta directamente a la expresión de sus genes diana. En DM1, se han realizado diferentes abordajes utilizando siRNAs dirigidos a los transcritos *DMPK* o las expansiones CUG, como el ssiDM10 o el rAAV6-HSA10, obteniendo rescates en la inclusión de diferentes exones alternativos, así como, rescates funcionales en la miotonía (Bisset et al., 2015; Langlois et al., 2005; Sobczak et al., 2013).

Como ya se ha descrito para las pequeñas moléculas, potenciar los niveles endógenos de las proteínas MBNL es una posible estrategia terapéutica. Otro enfoque terapéutico dirigido a potenciar los niveles de MBNL1/2 endógenos es mediante la modulación de miRNAs que regulen la síntesis de estas proteínas utilizando para ello anti-miRs. Se identificaron miR-23b y miR-218 como represores naturales de la traducción de MBNL1/2. El tratamiento con anti-miRs frente a estos miRNAs, aumentó significativamente los niveles de MBNL1/2 y rescató diferentes defectos moleculares y funcionales característicos de DM1 en miotubos derivados de pacientes y en ratones modelo HSA^{LR} (Cerro-Herreros et al., 2018). Además, *in vivo* estos anti-miRs no mostraron signos de toxicidad (Cerro-Herreros et al., 2020, 2021). Estos resultados refuerzan la idea de que las estrategias dirigidas a aumentar los niveles de MBNL son válidas para tratar aspectos de la patología muscular en DM1.

5.3 Terapias génicas

La terapia génica tiene como objetivo corregir las mutaciones génicas. La capacidad de CRISPR/Cas9 para dirigirse a secuencias repetidas de DNA como son las expansiones CTG en DM1, ha planteado la posibilidad de utilizar este sistema como posible estrategia terapéutica. Dastidar et al. evaluaron la actividad de CRISPR/Cas9, administrando el sistema a través de un vector viral para escindir las repeticiones de CTG, hasta 1200 repeticiones, en células derivadas de pacientes con DM1, lo que condujo a la normalización de la expresión del gen *DMPK* y la degradación de los RNAs tóxicos (Dastidar et al., 2018). En los últimos años, esta estrategia se ha probado en más modelos de DM1 y también se han realizado modificaciones para mejorar su efectividad (Revisado en (Raaijmakers et al., 2019)). Sin embargo, aún queda por esclarecer si la escisión de las repeticiones CTG mediada por CRISPR/Cas9 también es posible en células diferenciadas terminalmente como son los miotubos. Las eficiencias de escisión pueden variar entre los diferentes tipos de células y estudios, probablemente dependiendo de la elección de los sgRNA. *In vivo*, tanto en los ratones modelo de DM1 DMSXL como HSA^{LR}, se ha testado el uso del sistema CRISPR/Cas9 con diferentes modificaciones y administrándolo junto con virus adeno-asociados (AAV), obteniendo rescates a nivel molecular y funcional. Además, lo más interesante, sin presentar signos significativos de toxicidad, lo cual demuestra el potencial clínico. De hecho, uno de ellos, el AAV-PIN-dCas9, se encuentra en fase preclínica (revisado en Pascual-Gilbert et al., 2021).

-Objetivos -

La atrofia muscular es uno de los síntomas más críticos y debilitantes en pacientes con DM1 dado que desemboca, en los estadios más avanzados, en problemas de inmovilidad, insuficiencia respiratoria, disartria y disfagia, y es una de las principales causas de muerte en pacientes. Pese a su relevancia y al número creciente de estudios dirigidos a descifrar los mecanismos moleculares que conducen a la degeneración muscular en DM1, no se ha trasladado a la clínica una terapia efectiva contra este fenotipo tan crucial en la enfermedad.

Uno de los procesos que más contribuye a la atrofia muscular en DM1 es la autofagia. Bargiela et al. demostraron que la atrofia muscular que provocan las expansiones CUG en la musculatura de *Drosophila* se origina, al menos en parte, por la hiperactivación de la autofagia. La inhibición genética de la autofagia, y la sobreexpresión de Muscleblind, fue suficiente para revertir, en parte, el fenotipo atrófico, sugiriendo que un tratamiento dirigido a reprimir el proceso autofágico podría ser efectivo (Bargiela et al., 2015). No obstante, se ha dedicado relativamente poca atención en la búsqueda de estrategias terapéuticas dirigidas a reestablecer unos niveles basales de esta vía catabólica. En este trabajo se exploran dos aproximaciones alternativas. Por una parte, la inhibición de la autofagia mediante el uso de un anti-autofágico bien caracterizado, la cloroquina (CQ) y, por otra parte, el restablecimiento de los niveles de miR-7 como posible regulador clave de la actividad autofágica en DM1, dentro del concepto de modulación terapéutica de la expresión génica (TGM).

La TGM consiste en la manipulación artificial de la expresión endógena de un gen para aliviar un estado patológico. Una de las estrategias utilizadas para modular niveles endógenos de expresión de genes es la basada en miRNAs, la cual ha despertado un gran interés gracias a su eficacia en modelos animales de distintas patologías humanas. En este sentido, Fernandez-Costa et al. demostraron que la expresión de miR-7 está reducida en biopsias de pacientes y en mioblastos DM1. Congruente con estas observaciones, entre los genes predichos como dianas de miR-7, encontraron que la expresión de *ATG4A*, un gen regulador del proceso autofágico, estaba aumentada en biopsias de músculo esquelético de pacientes con DM1 (Fernandez-Costa et al., 2013). En conjunto, todas las observaciones apuntan a hipotetizar que el déficit en los niveles de miR-7 es la causa (al menos parcial) de la

hiperactivación de la autofagia la cual desencadena atrofia muscular en DM1. Este concepto se ve respaldado por que miR-7 es un regulador negativo directo de los genes *ATG4A* y *ATG7* (Gu et al., 2017). Sin embargo, hasta el momento, se desconocen las consecuencias de la disminución de los niveles de miR-7 en los mecanismos patogénicos de DM1. Por ello, en este trabajo proponemos el estudio de la posible implicación de la disminución de miR-7 sobre la hiperactivación de la autofagia en DM1 en un modelo celular, a través de la modulación de sus niveles por medio de la utilización de un mimético o un anti-miR. Esta estrategia también ayudará a obtener una prueba de concepto basada en el aumento de los niveles de miR-7 como terapia anti-atrónica en DM1.

Finalmente, se busca profundizar en el conocimiento de las causas moleculares por las que miR-7 podría estar disminuido en DM1 con el objetivo de definir nuevas dianas terapéuticas contra la pérdida de masa muscular característica de la enfermedad. En este sentido un candidato fundamental es la proteína MSI2 puesto que previamente se ha descrito que participa en la biogénesis de miR-7 (Choudhury et al., 2013).

Con todo, los objetivos específicos que se persiguieron a lo largo del desarrollo de la presente tesis doctoral son los siguientes:

- **Objetivo 1:** Investigar la relevancia de la autofagia en el fenotipo de disfunción muscular en modelos animales y celulares de DM1.
- **Objetivo 2:** Estudiar *in vitro* la implicación de miR-7 en el fenotipo de disfunción muscular en DM1.
- **Objetivo 3:** Validar la alteración patológica de Musashi-2 en DM1 y su contribución, como represor de la biogénesis de miR-7, al fenotipo de disfunción muscular.

-Resultados principales -

La presente tesis incluye el resumen de los resultados más relevantes de los que soy co-primera autora en el primero de ellos y primera autora en los otros dos. Es importante destacar que cada uno de los artículos corresponde a un objetivo propuesto.

- Artículo 1- Ariadna Bargiela, **Maria Sabater-Arcis**, Jorge Espinosa-Espinosa, Miren Zulaica, Adolfo Lopez de Munain, Ruben Artero. 2019. "Increased Muscleblind levels by chloroquine treatment improve myotonic dystrophy type 1 phenotypes in in vitro and in vivo models". Proc Natl Acad Sci U S A. 116(50):25203-25213.
- Artículo 2- **Maria Sabater-Arcis**, Ariadna Bargiela, Denis Furling, Ruben Artero. 2020. "miR-7 Restores Phenotypes in Myotonic Dystrophy Muscle Cells by Repressing Hyperactivated Autophagy". Mol Ther Nucleic Acids. 19:278-292.
- Artículo 3- **Maria Sabater-Arcis**, Ariadna Bargiela, Nerea Moreno, Javier Poyatos-Garcia, Juan J Vilchez, Ruben Artero. 2021. "Musashi-2 contributes to myotonic dystrophy muscle dysfunction by promoting excessive autophagy through miR-7 biogenesis repression". Mol Ther Nucleic Acids. 25:652-667.

1. Análisis de la relevancia de la autofagia en el fenotipo de disfunción muscular en modelos animales y celulares de DM1

Anteriormente se demostró en *Drosophila* y modelos celulares que la hiperactivación de la autofagia es responsable, al menos en parte, del fenotipo de degeneración muscular y atrofia en DM1. Además, la inhibición genética de este proceso restaura la masa muscular y la función en *Drosophila* (Bargiela et al., 2015; Beffy et al., 2010; Denis et al., 2013; Loro et al., 2010). Esto llevó a la hipótesis de que los fármacos inhibidores de la autofagia podrían rescatar la atrofia muscular *in vivo*. La cloroquina (CQ) es un potente inhibidor de la autofagia que actúa bloqueando la fusión de los autofagosoma con los lisosomas. En este trabajo, se demuestra que el tratamiento con CQ mejora diferentes fenotipos relacionados con la DM1 a nivel molecular, celular y fisiológico *in vitro* en fibroblastos inmortalizados y transdiferenciados a miotubos derivados de pacientes con DM1 e *in vivo* en un modelo de DM1 en *Drosophila* y en ratones modelo HSA^{LR}. Concomitante con la mejora molecular y funcional, se descubrió que el tratamiento con CQ evita la

degradación de MBNL1/2 por autofagia. Asimismo, la mayor biodisponibilidad de estas proteínas es funcional puesto que se rescata la inclusión de diferentes exones alternativos regulados por MBNL1/2 en los tres modelos estudiados.

1.1 El tratamiento con CQ en un modelo de DM1 en *Drosophila*, miotubos DM1 y en ratones HSA^{LR} mejora fenotipos relacionados con la enfermedad a nivel molecular, funcional e histopatológico

Dado que previamente se había descrito la hiperactivación de la autofagia y su relación causal con el fenotipo de atrofia en el modelo de DM1 en *Drosophila* que expresa 480 repeticiones CTG no codificantes en la musculatura somática (*Mhc-Gal4>UAS-i(CTG)480*), inicialmente se decidió probar el efecto de la CQ *in vivo* en estas moscas. Se alimentaron moscas adultas de un día durante 7 días con CQ diluida en la comida a 10 μ M y 100 μ M. En primer lugar, se corroboró que la autofagia estaba aumentada en las moscas DM1 mediante tinción con *LysoTracker*, y se comprobó midiendo la actividad de caspasa-3/-7 que la inhibición de la autofagia con CQ no tenía un efecto sobre la apoptosis. En segundo lugar, se estudió el efecto del tratamiento con CQ sobre el fenotipo de atrofia que presentan estas moscas en cuanto a reducción del área de los IFMs. Los resultados mostraron un aumento significativo en el área de los IFMs a ambas concentraciones validando así los resultados previos (Bargiela et al., 2015). Para comprobar si el rescate de la atrofia muscular con la CQ se correlacionaba con una mejora funcional en las moscas DM1, se realizaron ensayos de escalada y vuelo, obteniendo una mejora significativa en la actividad locomotora. Adicionalmente, el tratamiento de CQ fue suficiente para rescatar la supervivencia media de las moscas DM1 a ambas concentraciones. Asimismo, a la concentración más baja de CQ testada, las moscas extendieron la esperanza de vida máxima, lo que demuestra que el tratamiento crónico es bien tolerado.

A continuación, partiendo de las observaciones previas que demostraban una actividad autofágica excesiva en mioblastos DM1, se evaluó el efecto de la CQ en fibroblastos inmortalizados procedentes de pacientes con DM1 que se transdiferencian a miotubos por la expresión inducible de MYOD1 (miotubos) (Arandel et al., 2017; Bargiela et al., 2015; Loro et al., 2010). Miotubos DM1

diferenciados durante 4 días se incubaron con CQ durante las últimas 48 horas a 0,1 , 1 y 10 μM (concentraciones por debajo del TC10 según un ensayo de toxicidad). Mediante inmunofluorescencia, en miotubos DM1 se detectó una señal muy marcada en la formación de puntos correspondientes a LC3 como consecuencia del aumento de actividad autofágica en comparación con el patrón difuso observado en miotubos sanos. Dado que la CQ impide la fusión de los autofagosomas-lisosomas, en los miotubos DM1 tratados con CQ se obtuvo un aumento sorprendentemente marcado en la señal de LC3, indicativo de una acumulación de los autofagosomas, sobre todo a la concentración más alta. Estos resultados confirman un bloqueo efectivo del proceso autofágico por parte de la CQ en los miotubos DM1.

Un fenotipo que se encuentra notablemente alterado en miotubos DM1 es la capacidad de fusión que podría estar relacionado indirectamente con la disfunción muscular (Arandel et al., 2017). Mediante tinción inmunofluorescente contra DESMINA, un marcador de diferenciación miogénica, demostramos que la CQ mejoraba drásticamente el índice de fusión a todas las concentraciones probadas, pero no tuvo un efecto sobre el diámetro de los miotubos, sugiriendo que la inhibición de la autofagia mejora, en parte, la capacidad de fusión de las células DM1. De forma análoga, se realizó un análisis de expresión mediante RNA-seq de los miotubos CNT y DM1 sin tratar y tratados con CQ a 0.1 y 10 μM . Los resultados del RNA-seq indicaron un rescate de un 25 % y 59 % en la expresión de genes relacionados con la enfermedad al tratar los miotubos DM1 con CQ a 0,1 y 10 μM respectivamente, lo cual apuntaba a un efecto dependiente de dosis. Además, la mayoría de los procesos biológicos rescatados estaban implicados en la homeostasis del músculo reforzando la idea del potencial de la CQ como tratamiento para los pacientes con DM1.

Finalmente, para evaluar en un modelo mamífero de DM1 si la administración sistémica de CQ mejora los fenotipos moleculares, funcionales e histopatológicos al igual que los observados en *Drosophila* y los miotubos DM1 y demostrar el potencial de la CQ como tratamiento para la DM1, se trataron durante 7 días por vía intraperitoneal ratones modelo HSA^{LR} de 4,5 meses de edad con dos concentraciones de CQ diferentes, 25 y 50 mg/kg, comparando los resultados con ratones HSA^{LR} tratados con el vehículo PBS y ratones sanos FVB. Una de las principales

características histopatológicas en DM1 es una ubicación central de los núcleos en las fibras musculares, indicativo del intento del músculo miopático por regenerarse (L. Timchenko, 2013). El tratamiento con CQ a las dos concentraciones probadas disminuyó el número de núcleos centrales tanto en gastrocnemio como en cuádriceps. A nivel funcional, el tratamiento con CQ rescató de forma notoria y significativa la debilidad muscular medida por una parte mediante la prueba de fuerza de agarre normalizada al peso, que mejoró alrededor de un 50% y, por otra parte, mediante un electromiograma para cuantificar el fenotipo de miotonía típico de DM1.

Tomados en conjunto, estos resultados validan el potencial de la CQ como fármaco para suprimir la disfunción muscular en DM1.

1.2 La CQ potencia la expresión de las proteínas MBNL y rescata defectos en el *splicing* en tres modelos de DM1

Las proteínas MBNL juegan un papel crítico en la patogénesis de la enfermedad. Estudios previos describieron una estrecha relación entre MBNL y la autofagia (Bargiela et al., 2015; Denis et al., 2013; Song et al., 2020). Estas observaciones se ven reforzadas por la similitud en cuanto a la mejora de los fenotipos relacionados con DM1 obtenidos *in vitro* e *in vivo* tras el tratamiento con CQ y los obtenidos cuando se potenció la expresión de MBNL mediante el silenciamiento de miRNAs que lo regulan (Cerro-Herreros et al., 2016, 2018). Por ello, se planteó la hipótesis de que la hiperactivación de la autofagia en DM1 podría promover directamente la degradación de proteínas MBNL y contribuir, junto con el secuestro de estas, a los bajos niveles que se observan en DM1. Sorprendentemente, en los tres modelos de DM1 que se probó la CQ, se obtuvo un aumento significativo y dependiente de dosis en los niveles de MBNL (Mbl en *Drosophila* y MBNL1/2 en miotubos y ratón), y solo en el caso de *Drosophila*, se observó un ligero aumento, pero significativo, a nivel de transcrito. Además, en moscas y en miotubos se analizó por inmunofluorescencia la distribución de MBNL. Es interesante que en secciones longitudinales de IFMs el tratamiento con CQ aumentó significativamente la intensidad de la señal de Mbl hasta hacerla similar a los controles sanos, al igual que la distribución en las bandas sarcoméricas Z y H. En consonancia con ello, se observó un aumento muy marcado de la señal de MBNL1/2 en miotubos DM1 tratados con CQ, y muy similar a la señal

observada en miotubos sanos. Adicionalmente, se confirmó por inmunofluorescencia el aumento de MBNL1/2 tras el tratamiento con CQ en dos líneas control y dos líneas DM1 de fibroblastos primarios transdiferenciados a miotubos.

Para confirmar que el aumento de MBNL por la CQ era funcional y dado que una de las principales funciones de MBNL es la de regulador del *splicing* alternativo, se analizaron una gran variedad de exones alternativos alterados en DM1 y dependientes de MBNL en los tres modelos estudiados. En todos los casos, se obtuvieron rescates significativos en la inclusión de los exones alternativos analizados y en algunos de ellos se observó un efecto dependiente de dosis.

Los niveles de CELF1 no se vieron afectados tras el tratamiento con CQ en miotubos DM1 y en ratones. Este dato fue congruente con lo descrito para la inclusión del exón 8 de *CAPZB* en células y ratón o el exón 3 de *Mfn2* y el exón 12 *Ank2* en ratón, los cuales están regulados por CELF1 y permanecieron inalterados tras el tratamiento.

En conjunto, estos resultados demuestran que la CQ aumenta los niveles de las proteínas MBNL, y lo que es más interesante, ese MBNL extra es funcional puesto que se rescata la inclusión de diferentes exones alternativos regulados por estas proteínas y, por lo tanto, podría explicar, al menos parcialmente, la mejoría tan relevante tras el tratamiento con CQ en los diferentes fenotipos funcionales, histológicos y moleculares caracterizados en los tres modelos de DM1.

1.3 El efecto terapéutico del tratamiento con CQ observado en *Drosophila*, células y ratones DM1 es dependiente del aumento de los niveles de MBNL como consecuencia de la inhibición de la autofagia

Para arrojar luz sobre la razón por la cual los niveles de las proteínas MBNL aumentaron tras el tratamiento con CQ, en primer lugar, se descartó la posibilidad de que la CQ interaccionara directamente con las expansiones CUG y afectara a su estabilidad favoreciendo así la liberación de Mbl. Mediante ensayos de fluorimetría diferencial de barrido (DSF) se demostró que la presencia de CQ no llevó a cambios en la fluorescencia ni en la temperatura de melting de las sondas CUG, es decir la temperatura a la que se despliega el 50% del RNA. Estos datos indican que el mecanismo por el cual Mbl se acumula en los músculos tratados con CQ no se debe a la unión directa de CQ a las repeticiones CUG. De forma similar, el tratamiento con

CQ no tuvo ningún efecto significativo en el área y número de foci ribonucleares ni en los transcritos de *DMPK* en miotubos DM1. Sin embargo, la CQ redujo de forma significativa y dependiente de dosis la colocalización de MBNL1 con los foci, sugiriendo un mecanismo independiente de la interacción directa con las repeticiones para la liberación de MBNL.

En segundo lugar, se realizó doble tinción con *LysoTracker* y anticuerpos contra MBNL1 o 2 y se cuantificó la colocalización de ambas señales calculando el coeficiente de colocalización de Manders y la eficiencia de colocalización. Es importante destacar que se observó cinco veces más colocalización de MBNL1 o 2 con *LysoTracker* en miotubos DM1 en comparación con los niveles detectados en miotubos sanos. Estos valores se redujeron drásticamente después del tratamiento con CQ, lo que demostró que la CQ promueve la liberación de MBNL de la vía autofágica, evitando así su degradación y consecuentemente, aumentando su biodisponibilidad.

Para confirmar que los efectos terapéuticos observados en el tratamiento con CQ estaban mediados por los niveles de MBNL a través de la modulación de la autofagia, se evaluó el efecto de inducir más aún la autofagia en los miotubos DM1. Con este fin, las células se trataron con metformina (mtf) a 30 mM, que activa la vía AMPK y, en consecuencia, conduce a la activación de la autofagia a través de la inhibición de mTOR y la activación de ULK1 (Y. Wang et al., 2018). Tras la adición de mtf, se detectó una disminución dramática en los niveles de MBNL1/2. En consonancia, el análisis de los exones alternativos regulados por MBNL1 y/o MBNL2 demostró que el tratamiento con mtf, en general, potenciaba los fenotipos patológicos. Como control, se analizó el *splicing* de *CAPZB* dependiente de CELF1 y no se obtuvo ningún efecto después del tratamiento con mtf al igual que ocurría al tratar las células con CQ.

En resumen, estos resultados confirman que la CQ, bloqueando la autofagia, aumenta los niveles de MBNL disponibles y, ese aumento mejora diferentes fenotipos clave en la enfermedad.

2. Implicación de la disminución de miR-7 en el fenotipo de disfunción muscular en un modelo celular de DM1

En un estudio realizado en nuestro laboratorio se describió que miR-7 estaba regulado negativamente en un modelo de DM1 en *Drosophila* y en biopsias musculares de pacientes. Asimismo, la expresión de *ATG4A*, una diana de este miRNA, estaba aumentada significativamente en biopsias de pacientes con DM1 (Fernandez-Costa et al., 2013). Se ha descrito que miR-7 reprime la autofagia mediante la regulación positiva de la señalización de mTOR y la inhibición directa de algunos genes de autofagia (*ATG7*, *ULK2* y *ATG4A*) (Gu et al., 2017). Sin embargo, aún se desconocía el papel y la relevancia de la regulación a la baja de miR-7 en los mecanismos patogénicos de DM1. Por otra parte, las causas por las que la autofagia está alterada en DM1 y contribuye al fenotipo de atrofia no están del todo claras. Aunque varias observaciones sugieren que las proteínas MBNL regulan la autofagia, la falta de estas proteínas en DM1 no parece ser el único contribuyente para explicar la desregulación de la autofagia en la enfermedad puesto que, por ejemplo, la sobreexpresión de la isoforma C de Muscleblind rescata solo parcialmente la atrofia muscular en el modelo de DM1 en mosca (Bargiela et al., 2015).

Teniendo en cuenta estas observaciones previas, esta segunda sección incorpora el trabajo publicado en Sabater-Arcis et al 2020. Este artículo demuestra que los niveles reducidos de miR-7, a través de un mecanismo independiente de MBNL1, están implicados de forma crucial en la regulación del proceso autofágico y otras vías relacionadas con la atrofia, como el UPS, en DM1. Concretamente, a través de la modulación de miR-7 con un mimético o un antagonista en miotubos DM1 o sanos, respectivamente, demostramos que el restablecimiento de los niveles de miR-7 fue suficiente para reprimir marcadores de autofagia y atrofia muscular, así como para rescatar defectos de fusión y crecimiento de los miotubos. Por el contrario, el bloqueo de miR-7 en miotubos control fue suficiente para provocar la aparición de fenotipos tipo DM1.

2.1 miR-7 está disminuido en miotubos DM1, y la sobreexpresión de genes diana de miR-7 se correlaciona con la debilidad muscular en pacientes

Para comprobar la relevancia de la disminución de miR-7 en los fenotipos musculares de DM1, se utilizó la información existente de la base de datos DMseq (E. T. Wang et al., 2019). Esta base de datos recoge información del análisis de expresión mediante RNA-seq de 40 biopsias de pacientes con DM1 y 10 controles sanos y también los datos de fuerza de dorsiflexión del tobillo de estos pacientes. De modo que, se seleccionaron 12 dianas confirmadas de miR-7, junto con tres de las estudiadas por Fernandez-Costa et al. El total de 15 dianas, se correlacionaron con los datos de fuerza y los resultados mostraron que 11 de ellas presentaban una correlación negativa estadísticamente significativa, demostrando que los bajos niveles de miR-7 en DM1 podrían repercutir en la fuerza muscular, la cual está íntimamente relacionada con la debilidad y atrofia muscular.

En el mismo modelo celular utilizado en el primer objetivo de esta tesis, se confirmó que la expresión de miR-7 se encontraba disminuida de forma significativa tanto en fibroblastos como en miotubos DM1 diferenciados durante 7 días respecto de los fibroblastos y miotubos sanos.

En base a estos resultados, se decidió restaurar los niveles de miR-7 en miotubos DM1 con un mimético del miRNA modificado químicamente (agomiR-7). Por otro lado, los niveles de miR-7 se disminuyeron en miotubos sanos con un anti-miR (antagomiR-7) para comprobar si la falta de miR-7 era suficiente para que los miotubos sanos reprodujeran un fenotipo DM1 y, de este modo, demostrar la relevancia del miRNA en la patogénesis de la enfermedad. Como control se utilizaron agomiRs o antagomiRs con secuencia al azar (*Scramble*).

Inicialmente, se caracterizó el perfil de toxicidad de los oligonucleótidos, estableciendo una ligera toxicidad a partir de 100 nM para ambos. Por ello, se seleccionaron las concentraciones de 1, 10 y 100 nM para el trabajo experimental. En segundo lugar, se observó un aumento de los niveles del miRNA con el agomiR-7 en miotubos DM1 y una disminución de los niveles del miRNA en miotubos sanos con el antagomiR-7. También se confirmó la captación de los oligonucleótidos mediante el uso de agomiR-7 y antagomiR-7 marcados con CY3.

2.2 La modulación de los niveles de miR-7 afecta a la capacidad de fusión de miotubos DM1 y mioblastos primarios derivados de músculo de ratones HSA^{LR}

Previamente, se había descrito que miotubos DM1 presentan una capacidad de fusión reducida, de modo que podría ser un fenotipo indirecto de la disfunción muscular *in vitro* (Arandel et al., 2017). La contribución de miR-7 a este fenotipo se comprobó tras el aumento o reducción del miRNA en miotubos DM1 o controles, respectivamente, y posterior inmunofluorescencia contra DESMINA. Respecto al índice de fusión, las células DM1 presentaban una reducción de casi el 50 % respecto a las células sanas. La restauración de los niveles del miR-7 con el agomiR-7 en miotubos DM1 fue suficiente para rescatar este fenotipo de forma dependiente de dosis, observando el máximo aumento alrededor del 40 %. Además, la disminución de los niveles de miR-7 con el antagomiR-7 llevó a una drástica reducción en el índice de fusión (alrededor de un 30%) de los miotubos sanos, de forma similar al fenotipo observado en DM1. En cuanto al diámetro, el aumento de miR-7 en miotubos DM1 no tuvo ningún efecto. Por el contrario, la reducción de miR-7 en células sanas disminuyó entre 3-4 veces el diámetro de las células sanas, de forma dependiente de dosis. En conjunto, estos resultados sugieren que miR-7 es necesario para la fusión de los mioblastos y el aumento de su tamaño, pero el suplemento de miR-7 solo es suficiente para mejorar el fenotipo de fusión celular en DM1.

Con el fin de probar la implicación de miR-7 en la capacidad de fusión de los mioblastos, se decidió modular los niveles de miR-7 mediante la administración de un antagomiR o agomiR en mioblastos primarios aislados de los músculos esqueléticos de diafragma y gastrocnemio de ratones controles sanos (WT) y DM1 (HSA^{LR}) de 4,5 meses de edad. Los ratones modelo reproducen varios fenotipos de la enfermedad, como miotonía y defectos de *splicing*, pero no muestran una atrofia clara (Mankodi et al., 2000). Congruente con la hipótesis de la implicación de miR-7 en el fenotipo de atrofia, no se observó una disminución del miRNA en los músculos analizados. El tratamiento con antagomiR-7 en mioblastos WT fue suficiente para reducir significativamente el índice de fusión. De forma análoga, la recuperación del fenotipo fue robusta al reponer miR-7 con el agomiR en mioblastos HSA^{LR} del diafragma y el gastrocnemio. Adicionalmente, se trataron mioblastos HSA^{LR} con

antagomiR-7, cuantificando una clara reducción en el índice de fusión. Estos resultados son de especial relevancia puesto que apuntan a que la expresión normal de miR-7 en mioblastos y músculo de ratones HSA^{LR} podría estar contribuyendo a la ausencia de fenotipos pronunciados relacionados con atrofia en estos ratones.

Indagando acerca del posible mecanismo mediante el cual el aumento en los niveles de miR-7 lleva a un rescate en el índice de fusión de los miotubos DM1, se analizó el grado de activación de AKT y AMPK. El restablecimiento de miR-7 en miotubos DM1, aumentó de forma espectacular la ratio p(Ser473)-AKT/AKT, mientras que el efecto contrario se obtuvo al bloquear miR-7 en los miotubos sanos. Sin embargo, no se detectaron diferencias en la activación de AMPK.

Estos resultados refuerzan la idea de que la falta de miR-7 en DM1 es responsable en parte de los defectos en la capacidad de fusión de los mioblastos y, por ende, está relacionada con la disfunción muscular de la enfermedad.

2.3 miR-7 tiene una función central en la regulación de la autofagia y de otras vías relacionadas con el fenotipo de atrofia muscular, como el UPS en miotubos DM1

En base a las observaciones previas que demuestran que miR-7 regula diferentes genes implicados en autofagia (Fernandez-Costa et al., 2013; Gu et al., 2017), nuestra hipótesis fue que el déficit en los niveles de miR-7 era la causa (al menos parcial) de la hiperactivación de la autofagia, la cual desencadena atrofia muscular.

Teniendo en cuenta las informaciones previas que apuntan a que el restablecimiento de unos niveles basales de autofagia mediante inhibición genética o química, con la CQ, es suficiente para mejorar de forma notoria fenotipos relacionados con la atrofia muscular, se decidió confirmar que el efecto de miR-7 sobre las alteraciones de la fusión celular estaba mediado por la regulación de la autofagia. Para ello, se inhibió o potenció esta vía mediante el tratamiento con CQ o metformina, respectivamente. Los resultados mostraron que el índice de fusión mejoró significativamente cuando se bloqueó la autofagia y, por el contrario, se agravó al inducir la vía por el tratamiento con metformina de forma similar a los resultados obtenidos tras disminuir los niveles de miR-7 en miotubos sanos. Estos resultados indican que miR-7, a través de la posible regulación de la autofagia en

DM1, podría tener un efecto sobre los fenotipos relacionados con la capacidad de fusión de los mioblastos.

Para demostrar de forma clara que miR-7 regula la autofagia en DM1, se evaluó el efecto de modular los niveles de miR-7 sobre diferentes marcadores de autofagia que se encuentran alterados en DM1. El aumento de miR-7 con agomiR en miotubos DM1 redujo de forma significativa tanto la formación de autofagolisosomas, medida mediante tinción con *LysoTracker*, así como la expresión a nivel de transcrito (*ATG4A*, *ATG7*, *ATG2B*, *ATG3*, *ATG5*, *VPS34*) y de proteína (*ATG4A*, *ATG7*, *P62*, *LC-3II/LC-3I*) de diferentes genes relacionados con autofagia. Por el contrario, la modulación negativa de los niveles de miR-7 con el antagomiR en miotubos sanos llevó a una activación de la autofagia sorprendente. Para probar la relevancia de la modulación de miR-7 en el flujo autofágico, se utilizaron los vectores de expresión LC3 y P62 marcados ambos con mCherry-GFP en tándem. Brevemente, la señal de GFP de estas construcciones se reduce en un entorno ácido, mientras que la de mCherry es más estable. De modo que la colocalización de la fluorescencia de GFP y la de mCherry indica un compartimento celular que no se ha fusionado con un orgánulo ácido (autofagosoma), mientras que la señal de mCherry en ausencia de la de GFP corresponde a una vesícula de autofagosoma que se ha fusionado con un lisosoma (autofagolisosoma). De acuerdo con los resultados anteriores, cuando se transfectaron simultáneamente en las células DM1 el vector que expresa mCherry-GFP-LC3 y el oligonucleótido *scramble*, la señal correspondiente a mCherry fue mucho más intensa que la de GFP en comparación con los miotubos sanos, indicativo de una hiperactivación del flujo autofágico en DM1. La reducción de los niveles de miR-7 con el antagomiR-7 reveló un flujo de autofagia dramáticamente aumentado en los miotubos sanos, generando un patrón de tinción comparable al de los miotubos DM1. Por contra, la transfección de agomiR-7 en miotubos DM1 aumentó la señal de GFP sobre la de mCherry, indicativo de un alivio del flujo autofágico excesivo. Como control, se bloqueó la fusión de los autofagosomas y lisosomas con CQ en las células DM1. En este caso, el patrón de expresión de los reporteros fue muy similar al observado después de la adición de agomiR-7, apoyando la hipótesis de que la restauración de los niveles de miR-7 es suficiente para normalizar la actividad autofágica en DM1. Se obtuvieron resultados similares con la construcción mCherry-GFP-p62.

Considerando la alteración de la vía AKT en miotubos DM1, el efecto de miR-7 sobre esta vía y, teniendo en cuenta que AKT regula los factores de transcripción de la familia FoxO que posteriormente regulan la expresión de genes implicados en la degradación de proteínas, se analizaron los niveles de expresión de varios genes relacionados con atrofia (*MuRF1*, *FBXO32*, *FoxO1*, *FoxO3*, *AKT1* y *IL-1 β*). El aumento de los niveles de miR-7 con el agomiR-7 a la concentración más alta (100 nM) fue suficiente para cambiar significativamente los niveles de expresión de los genes en miotubos DM1 hacia un patrón sano. Asimismo, un fenotipo de expresión similar al de los miotubos DM1 se obtuvo al reducir los niveles de miR-7 con el antagomiR-7 en miotubos sanos. Estos resultados fueron concomitantes con los observados al analizar marcadores del proceso de autofagia, demostrando que miR-7 juega un papel crucial en la regulación negativa de la vía autofágica. Todo ello sugiere que la disminución en los niveles de miR-7 podría ser la causa, al menos en parte, de la activación patológica de la autofagia descrita en DM1 y de forma indirecta, de otras vías catabólicas relacionadas con el proceso atrofico, como la vía UPS.

2.4 Los efectos de la modulación de miR-7 son independientes de MBNL1

Para investigar más a fondo el papel de miR-7 en DM1, se analizaron las consecuencias de su modulación en dos proteínas críticas de la enfermedad: CELF1 y MBNL1. Los resultados mostraron que los transcritos de *CELF1* respondían a la modulación de miR-7. La regulación de los niveles de *CELF1* por miR-7 probablemente será indirecta ya que no se encontraron predicciones significativas de unión en su 3'UTR utilizando los algoritmos miRtarget y miRanda. Por el contrario, la modulación de miR-7 no tuvo ningún efecto sobre los niveles de MBNL1 en las células expuestas a los oligonucleótidos. En consonancia con estos resultados, tampoco se detectaron cambios significativos en el porcentaje de inclusión de exones alternativos de seis genes dependientes de MBNL1 tras la modulación de miR-7. Teniendo en cuenta la posibilidad de que miR-7 podría tener un efecto sobre la acumulación de transcritos *DMPK* mutantes, se cuantificaron los foci ribonucleares por hibridación *in situ*, pero no se detectaron cambios.

Estos resultados sugieren que miR-7 actúa por debajo o en paralelo con MBNL1 en la vía de patogénesis de la enfermedad.

3. Validación de la alteración patológica de Musashi-2 y su contribución, como represor de la biogénesis de miR-7, al fenotipo de disfunción muscular en biopsias musculares y diferentes líneas celulares de DM1

La producción de miRNAs maduros está estrictamente regulada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. Evidencias crecientes sugieren que las proteínas de unión a RNA (RBP), que incluyen factores reguladores de *splicing*, actúan como reguladores postranscripcionales de miRNAs. Por lo tanto, la unión de una RBP al bucle terminal o un tallo del precursor de un miRNA puede afectar positiva o negativamente el procesamiento del pri-miRNAs mediado por el microprocesador en el núcleo, y/o el procesamiento mediado por DICER de un pre-miRNA en el citoplasma. En DM1 una de las alteraciones más importantes que favorecen la desregulación del *splicing* alternativo y procesamiento de transcritos reside en las proteínas de unión a RNA, como por ejemplo MBNL, CELF1, hnRNPA1 o STAU1. Muchos de estos factores, como MBNL1 o hnRNPA1, regulan la biogénesis de miRNAs (Michlewski & Cáceres, 2019). En el objetivo 2 demostramos la importancia de la desregulación de miR-7 en la patogénesis de la enfermedad. A pesar de la relevancia que supone el déficit de miR-7 en DM1, se desconocía su origen. Tomando en conjunto todas las observaciones, de entre los factores que se han propuesto para explicar la regulación de la biogénesis de miR-7, resultó de especial interés la regulación negativa del procesamiento del pri-miR-7 por parte de MSI2 junto con HuR (Choudhury et al., 2013). Por lo tanto, hipotetizamos que la RBP MSI2 podría estar regulada al alza en DM1 y contribuir a la disfunción muscular a través de la represión del procesamiento de miR-7.

Este tercer apartado incorpora el artículo publicado en Sabater-Arcis et al. 2021 en el que se describe por primera vez en detalle la sobreexpresión de la proteína de unión a RNA Musashi-2 (MSI2) en DM1. Concretamente se identificó que MSI2 está sobreexpresado a nivel de transcrito y proteína en diferentes líneas de mioblastos y biopsias de músculo esquelético derivadas de pacientes con DM1. Utilizando estrategias de silenciamiento de genes (siRNAs y gapmers) o la molécula pequeña Ro 08-2750 demostramos que la reducción de los niveles o actividad de MSI2 aumenta

la expresión de miR-7, reprime la autofagia excesiva y regula negativamente los genes relacionados con la atrofia. También se detectó una regulación positiva significativa de MBNL1 tras el silenciamiento de MSI2.

3.1 MSI2 está sobreexpresado en DM1 y se correlaciona negativamente con los niveles reducidos de miR-7 en biopsias musculares y diferentes líneas celulares

Para evaluar la posible desregulación de MSI2 y su implicación en la reducción de los niveles de miR-7 en DM1, se analizó la expresión de MSI2 a nivel de transcrito y proteína y de miR-7 en biopsias de músculo deltoides de 17 controles sanos y 16 donantes con DM1, en cinco líneas de mioblastos primarios obtenidas de las biopsias (2 de control y 3 de DM1) y en el modelo celular utilizado en los objetivos 1 y 2 de la presente tesis. En todos los casos, se detectaron niveles significativamente reducidos de miR-7 en las muestras de DM1. De forma análoga, se confirmó un aumento significativo de MSI2 a nivel de transcrito y proteína en todas las muestras analizadas (a excepción de los transcritos *MSI2* en los mioblastos primarios por la gran variabilidad). Particularmente destacable fue el aumento de proteína MSI2 detectado en miotubos DM1 (cerca de 60 veces respecto de miotubos sanos). Reforzando la hipótesis de que unos altos niveles de MSI2 en DM1 inhiben la biogénesis de miR-7 lo cual desemboca en una reducción en los niveles de miR-7 maduro, se confirmó en las biopsias de músculo de pacientes con DM1 una correlación de Pearson (r) negativa y significativa entre MSI2 y miR-7. Esta correlación no se observó en mioblastos primarios. Para confirmar la sobreexpresión de MSI2 en DM1 y la relevancia de dicha alteración en el fenotipo muscular de la enfermedad, se recurrió a la base de datos DMseq (descrita en el apartado 2.1 de resultados del objetivo 2 de la tesis). Una vez más, se corroboraron los resultados obtenidos, MSI2 estaba sobreexpresado significativamente (más del 35%) en pacientes con DM1 y sus niveles, se correlacionaron negativa y significativamente con la fuerza de la dorsiflexión del tobillo, un fenotipo relacionado directamente con la debilidad y atrofia muscular.

3.2 El silenciamiento de *MSI2* con siRNAs y gapmers aumenta los niveles de miR-7 y rescata parámetros relacionados con la disfunción muscular en miotubos DM1

Considerando la sobreexpresión de *MSI2* observada en DM1 y la estrecha relación de dicho aumento con la disminución de miR-7 y el fenotipo de atrofia muscular, se propuso reestablecer los niveles de *MSI2* para dilucidar de forma clara, por una parte, que la reducción de *MSI2* tiene un efecto positivo sobre los niveles de miR-7 y, por otra parte, que ese aumento en los niveles del miRNA tiene un potencial terapéutico contra los mecanismos moleculares que contribuyen a la atrofia en DM1.

Para reducir los niveles de *MSI2*, se transfectaron miotubos DM1 con siRNAs o gapmers (ASOs), favoreciendo así la degradación de los transcritos *MSI2* por medio de la vía de RNAi o de la actividad RNasa-H, respectivamente. Concretamente, ambas estrategias se dirigieron a diferentes zonas de la isoforma 1 de *MSI2* ya que es la que más se expresa en músculo esquelético (GTEx Consortium, 2020). Como control se utilizaron siRNA o ASOs con secuencia al azar (*scramble*).

En el caso de los siRNAs, se transfectaron dos siRNAs a una concentración final de 100 nM. Los resultados mostraron una clara y significativa disminución, de alrededor del 70%, en la expresión de *MSI2* en miotubos DM1, siendo esta disminución relevante ya que se obtuvo un aumento significativo (3 veces) en los niveles de miR-7. Estos resultados son congruentes con la idea de que niveles altos de *MSI2* reprimen la biogénesis de miR-7. Asimismo, se analizó la expresión de dos dianas directas de *MSI2*. Por un lado, *P21*, cuya expresión está regulada negativamente por *MSI2* (Zhou et al., 2020) y, por el otro lado *TGFBR1*, que por el contrario se ha demostrado que *MSI2* potencia su expresión (Jiang et al., 2019). La expresión de ambas dianas se observó alterada en miotubos DM1, y la reducción de *MSI2* moduló la expresión de ambos genes. Finalmente, se midió la capacidad de fusión de las células como un fenotipo en el que miR-7 está implicado. Los resultados mostraron una mejora significativa en el índice de fusión de las células al reducir los niveles de *MSI2*, mientras que para el diámetro el rescate no fue significativo.

En el caso de los ASOs, inicialmente se diseñaron tres y se seleccionaron dos concentraciones, 30 nM y 150 nM, en base a que presentaban una toxicidad baja. La

eficiencia de los ASOs se comprobó midiendo la expresión de *MSI2*. Los resultados mostraron una reducción significativa con el ASO 1 y 3 en ambas concentraciones probadas. Sin embargo, en el caso del ASO 2 se cuantificó una ligera disminución, pero no significativa. A nivel de proteína los resultados fueron similares. En conjunto, el nivel de silenciamiento de *MSI2* conseguido con los ASOs fue mayor que con los siRNAs, traduciéndose en cambios más notables en la expresión de sus dianas directas. La expresión de miR-7 aumentó significativamente al reducir los niveles de *MSI2* con los ASO 1 y 3, siendo el efecto dependiente de dosis. Como era de esperar los niveles de miR-7 no aumentaron de forma significativa con el ASO 2, concomitante con la falta de reducción de *MSI2*. Estos resultados son una comprobación adicional de que el aumento de *MSI2* en DM1 está implicado en la reducción de los niveles de miR-7 ya que, si no hay reducción eficiente de *MSI2*, no hay aumento de miR-7. En este punto, debido a la falta de actividad del ASO 2 solo se continuó con los ASO 1 y 3. También se estudió el efecto de los ASOs en la expresión de *P21* y *TGFBR1* en miotubos DM1. Los resultados demostraron que el tratamiento con el ASO 3 a 30 nM llevaba a un aumento significativo en la expresión de *P21*. También es destacable la disminución significativa observada en la expresión de *TGFBR1* al tratar con el ASO 1 a 30 nM así como la tendencia a la disminución en el caso de los ASO 1 y 3 a 150 nM.

Anteriormente, demostramos que la restauración de los niveles de miR-7 era suficiente para rescatar el índice de fusión, por lo que se estudió la contribución de *MSI2* a este fenotipo, así como el efecto sobre el tamaño de los miotubos, después de reducir los niveles de *MSI2* con los ASOs. Después de 7 días de diferenciación, la cuantificación de ambos parámetros mostró que la reducción de los niveles de *MSI2* en miotubos DM1 restauró drásticamente el índice de fusión. A diferencia de los estudios anteriores con el agomiR-7 y los siRNA, el diámetro de los miotubos también se rescató de forma significativa con los dos ASOs corroborando que la reducción de *MSI2*, vía aumento de miR-7, mejora fenotipos relacionados con disfunción muscular.

Después de describir la disminución de miR-7 como una de las causas por las que la autofagia está hiperactivada en DM1 y tras obtener un aumento en los niveles de miR-7 al silenciar *MSI2* con los ASOs, se cuantificó la expresión de diferentes genes y proteínas implicadas en el proceso catabólico de la autofagia, observando un rescate significativo en la mayoría de los parámetros analizados tras silenciar *MSI2* con los

ASO 1 y 3. En concreto, los niveles de expresión de *ATG3*, *ATG4A*, *ATG7*, *ATG5* y *mTOR* se rescataron. A nivel de proteína se observó una disminución significativa en los niveles de las dos dianas directas de miR-7, *ATG4A* y *ATG7*, a la concentración de 150 nM de los dos ASOs y en el caso de *ATG7* también a la concentración más baja. Apoyando la idea de que los rescates en los niveles de autofagia tras la reducción de MSI2 son debidos, en parte, al aumento de los niveles de miR-7. Asimismo, se obtuvo un aumento robusto en la activación de AKT (fosfo (Ser473)-AKT/AKT) a la concentración más alta, de forma similar a lo observado con la restauración de los niveles de miR-7 con el agomiR-7.

Aunque no se obtuvo un rescate en los niveles de P62, la reducción de MSI2 demostró una clara reducción de la ratio LC3-II/LC3-I a la concentración de 150 nM. De forma complementaria, se realizaron dos tinciones para comprobar el flujo autofágico a punto medio, cuando se están formando los autofagosomas, con una inmunofluorescencia contra LC3 y a punto final mediante tinción con *LysoTracker*, que marca vesículas ácidas correspondientes a los autofagolisosomas. En el caso de la detección de LC3, se observan puntos fluorescentes correspondientes a LC3-II, indicativo de un aumento del flujo autofágico, mientras que al disminuir la actividad autofágica la señal fluorescente punteada se vuelve más difusa. En base a esto, se cuantificaron los puntos LC3 por unidad de área. Los resultados corroboraron lo observado al cuantificar los niveles de proteína LC3-II/LC3-I, puesto que la reducción de MSI2 con los dos ASOs, redujo de forma cuantitativa la formación de puntos LC3 sobre todo a la concentración más alta, indicativo de una disminución del flujo autofágico. Es importante resaltar que se cuantificó un aumento en los puntos LC3 de alrededor de 4 veces en miotubos DM1 comparado con los miotubos sanos. También se observó una clara reducción de la señal de *LysoTracker* con los dos ASOs, siendo destacable la concentración más alta.

Asimismo, se analizó a nivel de transcrito la expresión de *FBXO32*, *MURF1*, *FOXO1*, *FOXO3*, *AKT1*, *IGF1*, *IL-1 β* y *MSTN*. Genes implicados en diferentes vías catabólicas, como el UPS, que durante procesos de atrofia están alterados y que en el objetivo 2 se demostró, para la gran mayoría, que el aumento de miR-7 reestablecía su expresión. El tratamiento con los ASOs rescató significativamente la expresión de todos los genes analizados, al menos en alguna de las concentraciones probadas.

En conjunto, todas estas observaciones sugieren de forma clara que MSI2 regula a miR-7 y que el silenciamiento de MSI2 mediante la utilización de siRNA o ASOs lleva a un aumento en los niveles de miR-7 que tiene un efecto positivo en los miotubos DM1, reestableciendo unos niveles basales del flujo autofágico y de diferentes marcadores implicados en el proceso atrofico en DM1.

3.3 El restablecimiento de los niveles de MSI2 con los gampers potencia los niveles de MBNL1 en miotubos DM1

Considerando la novedad de describir la alteración de MSI2, y su posible repercusión en la patogénesis de la enfermedad, se decidió cuantificar los niveles de MBNL1, MBNL2 y CELF1 después del tratamiento con el ASO 1 y 3 para comprobar la implicación de MSI2 sobre estas proteínas clave en la enfermedad de forma independiente a miR-7.

Los resultados mostraron que los niveles de MBNL2 y CELF1 no se modificaron tras la reducción de MSI2. Por el contrario, los niveles de MBNL1 aumentaron de forma notoria con los dos ASOs a la concentración más elevada de 150 nM, siendo significativo el aumento para el ASO 1. Curiosamente a nivel de transcrito, aunque sí había una tendencia al aumento, no se detectaron cambios significativos en la expresión de *MBNL1*. Congruente con las observaciones a nivel de proteína, la inmunofluorescencia contra MBNL1 y MBNL2 demostró que el tratamiento con los dos ASOs tuvo un ligero efecto sobre MBNL1 a 30 nM. Ahora bien, a la concentración de 150 nM la señal fluorescente se incrementó de forma sorprendente a nivel de núcleo y citoplasma. En cambio, en el caso de MBNL2 solo se observó leve aumento con el ASO1 a 150 nM.

La funcionalidad del aumento de MBNL1 tras la reducción de los niveles de MSI2 se confirmó al cuantificar un rescate significativo en el porcentaje de inclusión del exón 10 de *PKM*, exón 22 de *SERCA1* y exón 7 de *NFIX*, en alguna de las concentraciones probadas del ASO 1 y 3.

3.4 El inhibidor de la actividad de MSI2, Ro 08-2750, mejora fenotipos moleculares relacionados con la diferenciación y atrofia en miotubos DM1, en mioblastos inmortalizados y en mioblastos primarios DM1

Para apoyar los resultados obtenidos al silenciar MSI2 con los siRNA y gapmers y reforzar nuestra hipótesis de que el aumento de MSI2 es una de las causas por las que miR-7 está disminuido, se probó otro tipo de estrategia dirigida a reducir la actividad de MSI2 en los miotubos DM1. Específicamente, la molécula pequeña Ro-08-2750 (Ro) se ha demostrado que se une directa y selectivamente al dominio de unión a RNA de MSI2, bloqueando la interacción de MSI2 a sus dianas y, consecuentemente, la regulación que ejerce sobre ellas (Minuesa et al., 2019).

Considerando esto, los miotubos DM1 se trataron con la molécula Ro a 10 y 15 μM (seleccionadas en base a un ensayo de toxicidad). De acuerdo con el mecanismo de acción de Ro, se observó un ligero efecto sobre los niveles de MSI2, de modo que, se analizó la expresión de las dianas directas de MSI2 (miR-7, *TGFBR1* y *P21*) para confirmar que a esas concentraciones Ro estaba ejerciendo un efecto sobre la actividad de MSI2. Los miotubos DM1 tratados con Ro a 10 μM aumentaron la expresión de miR-7 significativamente (2,5 veces) y mostraron una disminución significativa de *TGFBR1*, pero no de *P21*. Asimismo, la concentración de Ro a 15 μM no tuvo efecto sobre los miotubos DM1, motivo por el cual se probaron las concentraciones de 1 y 3 μM , para comprobar si a 10 μM se alcanzaba el máximo efecto. En este sentido, solo se observó un aumento significativo de miR-7 a la concentración de 3 μM .

Para confirmar, al igual que lo observado con los siRNAs y gapmers, que la inhibición de la actividad de MSI2 tiene un impacto sobre la capacidad de fusión de las células y el proceso de autofagia, en parte por al aumento de miR-7, se cuantificó el índice de fusión de los miotubos DM1 tratados con el rango de concentraciones de 1 a 15 μM . El tratamiento con Ro en los miotubos DM1, confirmó una recuperación dependiente de dosis y significativa para todas las concentraciones probadas, alcanzando el máximo porcentaje de recuperación a 10 μM (98%), de acuerdo con las observaciones previas. Además, el diámetro también se rescató de forma espectacular a 10 μM , confirmando que esa concentración era la óptima. Por otra

parte, los miotubos DM1 solo mostraron un rescate significativo de marcadores de autofagia (ATG4A, ATG7, P62 y *LysoTracker*) a la concentración de 10 μ M de Ro.

Para validar los resultados y obtener una evidencia más robusta de la implicación de la vía MSI2-miR-7-autofagia en la disfunción muscular en DM1 y corroborar también el potencial terapéutico de reducir los niveles de MSI2, se trataron con Ro a 10 μ M una línea de mioblastos inmortalizados diferenciados durante 7 días y procedentes del mismo donante que los miotubos DM1 utilizados hasta ahora (Arandel et al., 2017), y dos líneas de mioblastos primarios DM1 (DM1-14 y DM1-16) utilizadas en la sección de resultados 3.1 y procedentes de dos de las biopsias en las que se analizó también la alteración de MSI2 y miR-7. En los mioblastos inmortalizados se confirmó que MSI2 estaba sobreexpresado significativamente en comparación con los mioblastos sanos, mientras que miR-7 se comportó de manera inversa. Este resultado es de gran relevancia, puesto que valida en otro modelo celular la sobreexpresión de MSI2 y la disminución de miR-7 en DM1. El tratamiento con Ro a 10 μ M rescató la expresión de las dianas directas de MSI2. Concretamente, se reestableció la expresión de miR-7 y *P21* en todas las líneas celulares y de *TGFBR1* en la DM1-14, aunque en todas las líneas había tendencia a la disminución en la expresión de *TGFBR1*.

También se estudió la capacidad de fusión de estas líneas DM1 y el efecto de inhibir la actividad de MSI2 con el compuesto. En concreto, se analizó el índice de fusión, obteniendo una disminución significativa en todas las líneas DM1 respecto de sus controles sanos, reafirmando así la incapacidad de las células DM1 de fusionarse y diferenciarse terminalmente de forma correcta. Este fenotipo mejoró drásticamente tras el tratamiento con Ro a 10 μ M en todas las líneas DM1 estudiadas a 7 días de diferenciación. Adicionalmente, se evaluó el índice de fusión a 10 y 14 días de diferenciación y el efecto de Ro en los mioblastos inmortalizados, observando una disminución significativa en la capacidad de fusión de las células DM1 con respecto las células sanas y un espectacular rescate al tratar con Ro, similar al observado a 7 días de diferenciación.

En cuanto a la repercusión de la disminución de MSI2 sobre la autofagia, las células DM1 mostraron un aumento en la formación de puntos de LC3 comparado con los controles sanos, lo que confirma de nuevo la hiperactivación de la vía autofágica en

DM1. El tratamiento con la molécula pequeña fue suficiente para revertir este fenotipo en todas las líneas de mioblastos DM1 de forma espectacular. Además, en miotubos DM1 inmortalizados, se cuantificaron los niveles de ATG4A y ATG7, los cuales estaban aumentados en las células DM1 sin tratar y sus niveles disminuyeron con el compuesto. De manera similar, la expresión de genes relacionados con el sistema UPS y degradación muscular estaba aumentada en todas las líneas y se rescató con el tratamiento, confirmando la alteración de estas vías catabólicas en DM1.

Tomados en conjunto, todos los resultados en los diferentes modelos celulares de DM1 y las diferentes estrategias utilizadas para reducir los niveles de MSI2 validan que MSI2 representa una diana terapéutica potencial para tratar la disfunción muscular en DM1.

-Discusión general-

En la mayoría de las miopatías hereditarias o distrofias musculares los pacientes experimentan debilidad y atrofia muscular progresiva (es decir, pérdida de masa muscular). Como resultado, se pierde la fuerza física y la independencia, lo que provoca una morbilidad sustancial durante décadas. En el caso concreto de la DM1, la principal causa de mortalidad es la muerte súbita debido a problemas de conducción cardíaca y arritmias, y la insuficiencia respiratoria como resultado de la atrofia muscular. Por lo tanto, la disfunción muscular es un aspecto crítico en la patogénesis de la enfermedad, puesto que reduce la esperanza y calidad de vida de los pacientes con DM1. Si bien es ampliamente conocido que la causa de la pérdida de fibras musculares en DM1 reside en la expresión de las repeticiones CTG expandidas, los mecanismos mediante los cuales las mismas desencadenan la atrofia muscular siguen siendo en gran parte desconocidos. Se ha demostrado en diferentes modelos que la autofagia y el UPS están hiperactivados (Bargiela et al., 2015; Beffy et al., 2010; Loro et al., 2010; Morriss et al., 2018; Vignaud et al., 2010).

1. La hiperactivación de la autofagia contribuye de forma relevante a la disfunción muscular en la DM1 y su inhibición es suficiente para rescatar *in vivo* fenotipos relacionados con la disfunción muscular

Nuestros resultados con el inhibidor de la autofagia CQ demostraron que el tratamiento con CQ bloqueó la autofagia de forma efectiva y fue suficiente para mejorar significativamente varios fenotipos moleculares y funcionales asociados con la enfermedad en dos modelos animales, *Drosophila* y ratón, y también en miotubos DM1. Trabajos previos avalan estas observaciones ya que la inhibición genética de la vía en moscas modelo DM1 mediante sobreexpresión de mTOR revirtió casi a nivel de controles sanos el tamaño de los IFMs mientras que la interferencia de algunos genes *Atgs* rescató parcialmente la atrofia en las moscas DM1 (Bargiela et al., 2015). Estos datos sugieren que la alteración de la autofagia es un mecanismo que contribuye, en parte, a la atrofia muscular observada en DM1. Asimismo, en diferentes modelos de DM1 en *Drosophila* o ratón se ha demostrado que el fenotipo de atrofia muscular se puede revertir al reducir la expresión de las repeticiones CTG (Bargiela et al., 2015; Morriss et al., 2018). Estas observaciones junto con la

reversibilidad del fenotipo de autofagia proporcionan una prueba de concepto de la necesidad de entender las causas moleculares por las que la expresión de las expansiones CUG conducen a la hiperactivación de la autofagia, con el fin de encontrar nuevas dianas terapéuticas y, consecuentemente, desarrollar estrategias terapéuticas destinadas a limitar la autofagia contra la disfunción muscular en DM1.

2. La sobreexpresión de MSI2 contribuye a los bajos niveles de miR-7, y la desregulación de ambos está relacionada con la debilidad muscular en DM1

En base a los estudios previos (Fernandez-Costa et al., 2013) nuestros resultados corroboraron que miR-7 está disminuido en DM1. Teniendo en cuenta estos datos, a través de estrategias complementarias de modulación de miR-7, demostramos que la regulación a la baja de miR-7 (antagomiR-7) en los miotubos sanos origina fenotipos similares a DM1, mientras que la restauración de los niveles normales del miRNA (AgomiR-7) en las células DM1 regula a la baja la autofagia excesiva y el UPS. Por lo tanto, esto sugiere que miR-7 constituye un nodo regulatorio del proceso de autofagia y otras vías relacionadas con la atrofia, como el UPS, en DM1. En consecuencia, proponemos que la desregulación de miR-7 es la causa, al menos parcial, de la sobreactivación de la autofagia y contribuye a la alteración de otras vías implicadas en la disfunción muscular, como el UPS. Es importante destacar que varios autores han descrito que los ratones HSA^{LR} jóvenes (6 meses) no reproducen el desgaste y la degeneración muscular (Fugier et al., 2011; Kimura et al., 2005; Rhodes et al., 2012). Nuestros resultados sugieren que la falta de regulación a la baja de miR-7 en ratones modelo DM1 previene los fenotipos de desgaste muscular observados en biopsias y mioblastos humanos, en los que miR-7 está claramente infraexpresado.

El origen de los bajos niveles de este miR-7 se desconocía hasta el momento. Estudios previos describían que MSI2, junto con HuR, reprime la biogénesis de miR-7 (Choudhury et al., 2013). Demostramos por primera vez, en diferentes modelos celulares y biopsias de pacientes, que la expresión de MSI2 está fuertemente regulada al alza a nivel de transcrito y proteína en DM1. Además, observamos una correlación negativa significativa entre los niveles de MSI2 y miR-7 en biopsias de pacientes con DM1, lo que refuerza la idea de que la sobreexpresión de MSI2

participa en la infraexpresión de miR-7. Además, demostramos que la reducción de los niveles de MSI2 mediante tres estrategias diferentes fue suficiente para aumentar significativamente los niveles de miR-7 y rescatar diferentes parámetros relacionados con la disfunción muscular, de forma similar a lo observado al reponer miR-7. A pesar de que falta por dilucidar las causas que provocan la sobreexpresión de MSI2 en DM1, este estudio da a conocer una nueva diana terapéutica dentro del eje miR-7-autofagia-disfunción muscular.

Análogamente, demostramos una correlación negativa y significativa entre los niveles de transcritos que son dianas de miR-7 o la expresión de MSI2 y la debilidad de la dorsiflexión del tobillo de pacientes con DM1. Por lo tanto, estos resultados brindan un apoyo fundamental a la hipótesis de que los niveles de MSI2-miR-7 pueden afectar la fuerza muscular, que está íntimamente relacionada con la atrofia y debilidad muscular (Hiba et al., 2012). Además, estos datos destacan la relevancia de la desregulación de miR-7-MSI2 como contribuyentes al fenotipo muscular.

La reducción de MSI2 lleva a un aumento en los niveles de miR-7 que se traduce en una regulación a la baja de la autofagia. Sin embargo, el restablecimiento del flujo autofágico no es tan marcado como cuando se reponen los niveles de miR-7 con un mimético. Por lo tanto, no se descarta que existan otras alteraciones en la enfermedad que estén contribuyendo, además de MSI2, a la desregulación de miR-7. En el contexto de DM1, resulta de interés la regulación de miR-7 por el complejo NF90-NF45 (también conocido como ILF2 e ILF3, respectivamente), que se une a pri-miR-7-1, inhibiendo la síntesis del miRNA maduro (Higuchi et al., 2016). Curiosamente, de entre las dianas de miR-7 sobreexpresadas que se seleccionaron para correlacionarlas con la fuerza, estaban ILF2 e ILF3, sugiriendo así, una posible contribución a la regulación de miR-7 en DM1.

3. El eje MSI2-miR-7-autofagia regula la fusión y maduración de los mioblastos DM1

La fusión de mioblastos es fundamental para el crecimiento y la regeneración muscular adecuados y, por lo tanto, un defecto en este proceso probablemente contribuye a la atrofia muscular. Previamente se había descrito que los miotubos

DM1 presentan defectos en la capacidad de fusión y el crecimiento de las células (Arandel et al., 2017). Analizamos el índice de fusión y el diámetro de los miotubos DM1 después de actuar a los tres niveles del eje MSI2-miR-7-autofagia. En el caso del índice de fusión, obtuvimos un rescate sorprendente al tratar los miotubos DM1 con todas las estrategias probadas. De acuerdo con estas observaciones, los niveles normales de miR-7 en los mioblastos HSA^{LR} podrían explicar tanto los leves defectos de fusión detectados, así como el modesto rescate del índice de fusión con el agomiR-7. De hecho, el tratamiento de estas células con el antagomiR-7 empeoró fuertemente los defectos de fusión. Evidencias previas respaldan que una regulación estricta de la autofagia es fundamental para la diferenciación muscular normal. Fortini et al. observaron que durante la miogénesis, se requieren una actividad basal de la autofagia, como parte de la reprogramación metabólica, para lograr una fusión correcta de los miotubos. Por el contrario, demostraron que la autofagia hiperactivada, por inducción con rapamicina, inhibía fuertemente este proceso (Fortini et al., 2016). Estas observaciones apoyan que el efecto de la alteración de miR-7 sobre el deterioro de la fusión celular esté mediado directamente por la hiperactivación de la autofagia. Adicionalmente, el bloqueo o potenciación de la autofagia con CQ o mtf, que resultaron en un aumento o disminución de la capacidad de fusión, respectivamente, confirman que la activación anormal de la autofagia puede contribuir directamente al defecto de fusión de mioblastos DM1. En consecuencia, la disminución del flujo autofágico mediante el tratamiento con CQ, agomiR-7 o la reducción de MSI2 podría explicar, al menos en parte, la recuperación de la capacidad de fusión de los miotubos DM1.

Junto con la inhibición de la autofagia, la CQ podría favorecer la mejora en el índice de fusión a través del aumento de MBNL. Estudios previos avalan la implicación de MBNL en el proceso de diferenciación. En concreto, en células C2C12 los niveles de Mbnl1-3 varían significativamente en el núcleo durante la diferenciación miogénica (Bland et al., 2010). Asimismo, la desrepresión de la expresión de MBNL mediante el bloqueo de miRNAs que lo regulan fue suficiente para rescatar el índice de fusión, al igual que lo observado mediante la inhibición de la autofagia con CQ (Cerro-Herreros et al., 2021). Estas observaciones sugieren que la falta de MBNL contribuye a los defectos en la fusión de los mioblastos DM1 vía hiperactivación de la autofagia, y que el restablecimiento de los niveles de MBNL es suficiente para rescatar dicho fenotipo.

Una comparación cuantitativa entre las diferentes estrategias para silenciar MSI2 indica que cuanto menores son los niveles de MSI2 y mayores los de miR-7, mejores parámetros de recuperación se obtienen. Esta asociación fue evidente entre la inhibición de MSI2 y el rescate del crecimiento de los miotubos, mostrando el mayor aumento del diámetro cuando los niveles de MSI2 eran los más bajos. Sin embargo, el tratamiento con el agomiR-7 o CQ logró solo un leve aumento del diámetro de las células. Por contra, la reducción de miR-7 en miotubos sanos sí que redujo de forma significativa este fenotipo. Nuestros datos sugieren que miR-7 es necesario y suficiente para mantener la fusión de los mioblastos ya sea mediante la inhibición de la autofagia o por otras vías independientes. Aunque tampoco se descarta la posibilidad de que ejerza un control directo sobre la capacidad de fusión. En cambio, si bien miR-7 es necesario para el crecimiento de miotubos, pueden permanecer defectos moleculares adicionales en los miotubos DM1 que la reposición de los niveles de miR-7 o el bloqueo de la autofagia por sí solos no son capaces de mejorar. Más aún, a pesar de que la recuperación en la capacidad de fusión de las células es más notable al restablecer unos niveles normales de MSI2 que al incrementar miR-7 con un mimético, se consigue un aumento de miR-7 y una recuperación del flujo autofágico significativamente mayor con el agomiR-7. Estas observaciones sugieren que el eje miR-7-autofagia contribuye hasta cierto nivel a la diferenciación de los mioblastos, puesto que aumentar los niveles de miR-7 por encima de esa contribución no tiene efecto sobre el crecimiento de los miotubos. Por consiguiente, junto con el eje MSI2-miR-7-autofagia-atrofia, la sobreexpresión de MSI2 puede tener consecuencias adicionales sobre el crecimiento de los miotubos independientes de la represión de la biogénesis de miR-7 y la autofagia (Fig. D-1).

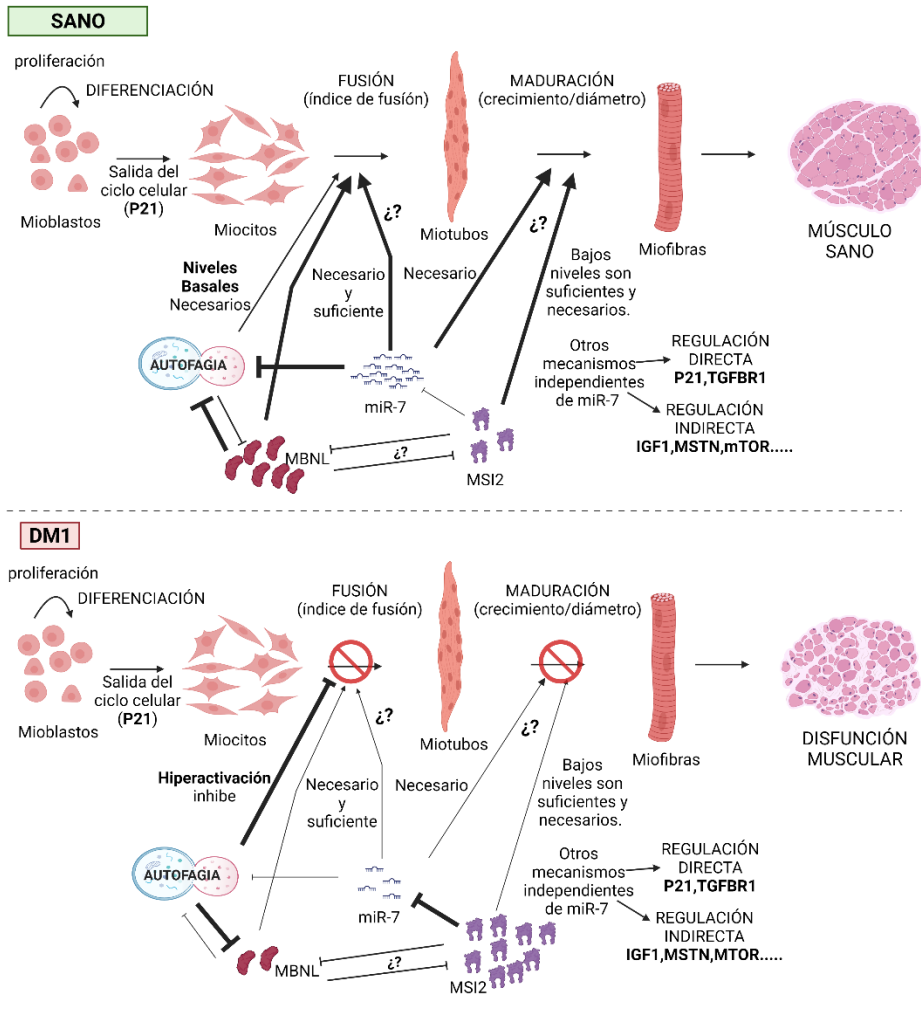


Figura D-1. Implicación de la autofagia, miR-7 y MSI2 en la diferenciación miogénica en DM1. Representación esquemática de la influencia de la autofagia, miR-7 y MSI2 en diferentes puntos del proceso de diferenciación de los mioblastos en un estado sano y un estado patológico de DM1. (Parte de arriba) En condiciones no patológicas, los mioblastos proliferativos salen del ciclo celular con ayuda, de entre otros factores, del aumento de P21 y empiezan a fusionarse. Además, miR-7 es suficiente y necesario para una correcta fusión de los miocitos mediante la regulación negativa de la autofagia, entre otros factores. Aunque tampoco se descarta una regulación directa de miR-7 sobre la fusión de los miotubos (interrogantes). MBNL favorece una correcta diferenciación y controla de forma negativa la autofagia (Bargiela et al., 2015; Cerro-Herreros et al., 2021; Song et al., 2020).

En cuanto a la maduración de los miotubos, miR-7 es necesario, pero no suficiente para favorecer este proceso. (Parte de abajo) En DM1, la hiperactivación de la autofagia debida, en parte, a la disminución de miR-7 y a la falta de biodisponibilidad de MBNL, impide una correcta fusión de los miocitos y, consecuentemente, no se produce una fusión y crecimiento correcto de los miotubos. Asimismo, la sobreexpresión de MSI2 favorece, por una parte, la inhibición de la biogénesis de miR-7, contribuyendo al aumento excesivo del flujo autofágico y finalmente al deterioro de la diferenciación de los miotubos. Por otra parte, de forma independiente a miR-7, el exceso de MSI2 podría contribuir a empeorar el crecimiento de los miotubos vía regulación directa de sus dianas P21 o TGFBR1 o indirecta por otras vías como IGF-1, MSTN, AKT, mTOR. En conjunto, todas las alteraciones contribuirían al fenotipo de disfunción muscular característico de DM1. Imagen hecha en Biorender.com.

4. miR-7 y MSI2 regulan la autofagia y otras vías relacionadas con la atrofia muscular en DM1

En este sentido, las células del músculo esquelético regulan su tamaño mediante un equilibrio de las vías de síntesis y degradación de proteínas (Cohen et al., 2015). Cabe destacar que la reducción de los niveles de MSI2 mostró efectos en ambos lados de este equilibrio complejo, porque, además de disminuir el catabolismo a través de la represión de la autofagia, también actuó sobre el anabolismo muscular. MSTN, un miembro de la superfamilia de TGF- β , regula negativamente la masa muscular al inhibir la fosforilación de Akt, lo que resulta en una disminución de la síntesis de proteínas y una reducción del tamaño de las células (Morissette et al., 2009). Es importante destacar que la reducción de MSI2, disminuyó significativamente los niveles de expresión de *MSTN* y aumentó *AKT1* y su forma activa (p-AKT), desreprimiendo así el anabolismo. De forma complementaria, la expresión de IGF-1 se incrementó significativamente. IGF-1 promueve la síntesis de proteínas musculares mediante la activación de la vía Akt / mTOR (Yoshida & Delafontaine, 2020) y, de manera consistente, en las células silenciadas con MSI2, también detectamos un aumento de la expresión de mTOR junto con la activación de AKT. Estos resultados y el hecho de que MSTN e IGF-1 tienen funciones opuestas en la regulación del crecimiento y tamaño del músculo esquelético (Morissette et al., 2009) indican que el rescate de *MSTN* e *IGF-1* tras la reducción de MSI2 podrían contribuir

a través de las vías Akt / mTOR a la mejora observada en el diámetro de los miotubos DM1. Además, dos dianas directas de MSI2 son, por una parte, P21, el cual MSI2 regula negativamente, sus niveles están disminuidos en DM1 y está implicado en la salida del ciclo celular para que los mioblastos se diferencien terminalmente (Zhou et al., 2020). Por otra parte, TGFBR1 está regulado positivamente por MSI2 y en DM1 está sobreexpresado. Esta diana pertenece a la vía TGF- β , por lo tanto, junto con MSTN están implicados en la regulación del anabolismo/catabolismo (Park et al., 2014). La reducción de los niveles de MSI2, lleva a un efecto moderado sobre estas dianas, lo que también podría contribuir a la mejora en el diámetro e índice de fusión. El efecto modesto observado para estas dos dianas sugiere la posibilidad de que otras alteraciones moleculares en DM1, además de la sobreexpresión de MSI2, puedan contribuir a la mala regulación de TGFBR1 y P21 y, en consecuencia, contrarrestar el efecto del silenciamiento de MSI2. En particular, CELF1 regula la expresión de P21 en DM1 (Denis et al., 2013). De acuerdo con estas observaciones, CELF1 permaneció sin cambios después del bloqueo de MSI2, por lo que podría estar contribuyendo al efecto leve sobre los niveles de P21 después de la reducción de MSI2 (Fig. D-2).

El otro gran sistema de degradación proteica que se ha demostrado que está sobreactivado en DM1 es el UPS (Huguet et al., 2012; Vignaud et al., 2010). De manera consistente, nuestros datos sugieren que la activación patológica del UPS juega un papel importante en el desgaste muscular, ya que observamos una mayor expresión de *MuRF1* y *FBXO32* (ATROGINA-1) en miotubos DM1. Además, se sabe que el factor de transcripción FoxO3, que se induce en el músculo esquelético atrofico cuando se reducen los niveles de AKT-P, controla la transcripción de *FBXO32*, *MuRF1* y otros genes relacionados con la autofagia (Bonaldo & Sandri, 2013). En consecuencia, la expresión regulada al alza de *FoxO1* y *FoxO3* en miotubos DM1, y la reducción de AKT-P, podrían explicar la sobreexpresión de los genes relacionados con la atrofia / autofagia en DM1. Es importante destacar que el aumento de los niveles de miR-7 con el agomiR-7 o la reducción de MSI2 fueron suficientes para rescatar la expresión de *MuRF1*, *FBXO32*, *FoxO1* y *FoxO3*, así como la fosforilación de AKT. Además, los análisis del estado de fosforilación de AMPK, tras la modulación de miR-7 no mostraron ningún efecto. AMPK participa en la regulación de varias vías metabólicas que regulan el tamaño de los músculos, como la autofagia y la activación del UPS o la inhibición de la síntesis de proteínas mediante el bloqueo de mTOR

(Thomson, 2018). Sin embargo, nuestros datos sugieren que esta vía permanece inalterada en este modelo celular de DM1 y que, en consecuencia, la activación de la autofagia y el sistema UPS son dependientes de AKT. Aunque no podemos descartar la posibilidad de una inhibición directa de miR-7 en genes relacionados con la atrofia, como se describe en el caso de la autofagia, las predicciones de ser posibles dianas de miR-7 son débiles. Teniendo en cuenta la interrelación entre autofagia y UPS (Bonaldo & Sandri, 2013), es posible que MSI2-miR-7 inhiba directamente el flujo autofágico y, por lo tanto, la restauración de la autofagia evite la activación de UPS (MuRF1 y FBXO32). Otra posibilidad es que el efecto de miR-7 y/o MSI2 esté por encima de MuRF1 y FBXO32, ya que estos genes están aguas abajo de varias vías relacionadas con la atrofia (Bonaldo & Sandri, 2013) (Fig. D-2).

5. El bloqueo de la autofagia o reducción de MSI2 aumentan MBNL1 de forma independiente a miR-7

El bloqueo de la autofagia con la CQ aumentó los niveles de Muscleblind en los tres modelos estudiados, y ese MBNL extra era funcional puesto que se rescataba la inclusión de diferentes exones alternativos dependientes de estas proteínas. Asimismo, en cuanto a los rescates funcionales y fisiológicos, en moscas modelo, la CQ mejoró fenotipos que previamente se había demostrado que dependían de los niveles de Muscleblind (Bargiela et al., 2015; Cerro-Herreros et al., 2016). De manera análoga, los resultados obtenidos en los ratones son consistentes con enfoques previos en los que el aumento de MBNL1 ya sea mediante sobreexpresión transgénica en ratones HSA^{LR} (Chamberlain & Ranum, 2012) o mediante la administración de diferentes compuestos era suficiente para corregir la miopatía (Cerro-Herreros et al., 2018; G. Chen et al., 2016; Herrendorff et al., 2016; B.-W. Zhang et al., 2016). Estas observaciones previas apoyan que los rescates observados tras el tratamiento con CQ están mediados, en parte, gracias al aumento de la biodisponibilidad de MBNL, junto con otras vías como consecuencia del bloqueo de la autofagia.

Estudios preliminares han demostrado la implicación de las proteínas MBNL en la regulación de la autofagia (Bargiela et al., 2015; Denis et al., 2013; Song et al., 2020). Teniendo en cuenta esto, el aumento de las proteínas MBNL por la CQ podría

explicarse, en parte, debido a que la CQ evita la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, de modo que las proteínas MBNL no se degradan. En consecuencia, dichas proteínas se acumulan, como hemos demostrado con los estudios de colocalización de las proteínas MBNL1/2 y *LysoTracker*. Ese MBNL extra podría contribuir, a su vez, a reprimir aún más la autofagia excesiva en un bucle de retroalimentación positiva, como lo demuestra el tratamiento de los miotubos con mtf.

Sin embargo, MBNL no puede explicar toda la regulación de la hiperactivación de la autofagia observada en DM1. En este sentido, descartamos la posibilidad de que miR-7 actuara vía regulación de MBNL1 ya que no observamos ningún cambio en los niveles de proteína MBNL1, ni en la inclusión de varios exones alternativos regulados por MBNL1 tras la modulación de los niveles de miR-7. Sin embargo, estos resultados no excluyen un papel de MBNL1 en el proceso atrófico, ya que en moscas modelo DM1, la sobreexpresión de mbLC logró rescatar el área muscular transversal (Bargiela et al., 2015). Por lo que planteamos la hipótesis de que miR-7 actúa aguas abajo de MBNL1, o en paralelo, en el mecanismo de patogénesis de la enfermedad, y ambos son reguladores de la autofagia en DM1 y contribuyen al fenotipo atrófico.

Estos resultados parecen contradictorios puesto que al inhibir la autofagia con el agomiR-7 se esperaría un aumento de la biodisponibilidad de MBNL1 al igual que ocurre cuando se inhibe esta vía catabólica con CQ. No obstante, el hecho de que en miotubos sanos, la inducción de la autofagia al reducir los niveles de miR-7 con el antagomiR-7, no tenga tampoco efecto sobre los niveles de MBNL a pesar de activar la autofagia, sugiere que otros mecanismos asociados a la expresión de las repeticiones CTG expandidas estarían contribuyendo al aumento de MBNL observado tras el tratamiento con CQ. Es importante señalar que la CQ no solo aumentó los niveles de proteína MBNL a través de la inhibición de la autofagia, sino que también redujo de manera significativa y dependiente de la dosis la colocalización con los foci ribonucleares, de manera similar a los ratones HSA^{LR} tratados con fenilbutazona, que también aumentan los niveles endógenos de Mbnl1 (G. Chen et al., 2016). Si bien la base molecular de tal efecto sobre el grado de colocalización permanece sin explorar, sugiere que este podría ser un mecanismo que contribuyera, junto con la inhibición de la autofagia, a ese aumento de las proteínas MBNL. Por ende, podría ser una explicación de por qué la inhibición de la autofagia, por medio del restablecimiento

de miR-7, no es capaz de aumentar los niveles de MBNL. Otra observación que apoya la idea de que otros mecanismos están implicados en el aumento de MBNL es que el tratamiento con CQ en ratones HSA^{LR} fue el más refractario de los modelos DM1 en el aumento de MBNL 1 o 2. Esto está en línea con la falta de hiperactivación de la autofagia en este modelo en comparación con las moscas y los miotubos DM1 (Brockhoff et al., 2017). Asimismo, el silenciamiento de MSI2 llevó a un aumento de MBNL1 funcional, puesto que se rescataron algunos eventos de *splicing* regulados por MBNL1. Una posible explicación a ese aumento es que MSI2 actúe independientemente del eje miR-7-autofagia ya que MSI2 regula muchas dianas, tanto a nivel de estabilidad del mRNA como postranscripcionalmente (Bennett et al., 2016; Duggimpudi et al., 2018).

6. El eje MSI2-miR-7-autofagia representa una nueva diana terapéutica contra la disfunción muscular en DM1

Los resultados tan alentadores obtenidos en nuestros experimentos de rescate representan una prueba de concepto de que estrategias dirigidas a disminuir la autofagia en DM1 pueden ser terapéuticas. Además, la inhibición de la actividad de MSI2 con Ro 08-2750 en tres modelos adicionales de DM1, el bloqueo de la autofagia con CQ en dos modelos más de DM1 o el tratamiento del agomiR-7 en mioblastos primarios de diferentes músculos de ratones HSA^{LR}, validan completamente los datos obtenidos en los miotubos DM1. De manera que proporcionamos evidencia en múltiples sistemas y demostramos la solidez de modular la vía MSI2-miR-7-autofagia como una posible estrategia terapéutica contra la disfunción muscular en DM1.

No es la primera vez que se propone la regulación de la autofagia como terapia para las distrofias musculares caracterizadas por atrofia muscular. Enfermedades musculares como la enfermedad de Pompe, distrofia muscular de cinturas D2 (LGMDD2) o distrofia muscular congénita causada por deficiencia de la cadena $\alpha 2$ de la laminina presentan la autofagia aumentada y su supresión muestra efectos beneficiosos en modelos animales de la enfermedad (Blázquez-Bernal et al., 2021; Carmignac et al., 2011; Lim et al., 2018). En conjunto, nuestros estudios constituyen una prueba de concepto para proponer al eje MSI2-miR-7-autofagia como una nueva diana terapéutica contra la disfunción muscular en la DM1. Asimismo, los rescates

resultantes de actuar directamente en alguno de los tres puntos del eje, ya sea mediante la CQ (autofagia), agomiR-7 (aumento de miR-7) o siRNAs, ASOs, Ro 08-2750 (silenciamiento de MSI2), apuntan a estas moléculas como fuertes candidatos para el desarrollo de una terapia contra la degeneración muscular en DM1. La efectividad observada en todos los casos sugiere un tratamiento de estas moléculas solas o en combinación como por ejemplo el caso de la CQ o Ro 08-2750, las cuales podrían utilizarse como un complemento sistémico a la biodistribución limitada de las terapias basadas en oligonucleótidos. Además, la posibilidad de combinar diferentes moléculas dirigidas a cada una de las dianas del eje permitiría abarcar y atacar de una forma más amplia y complementaria la patología muscular (Fig.D-2).

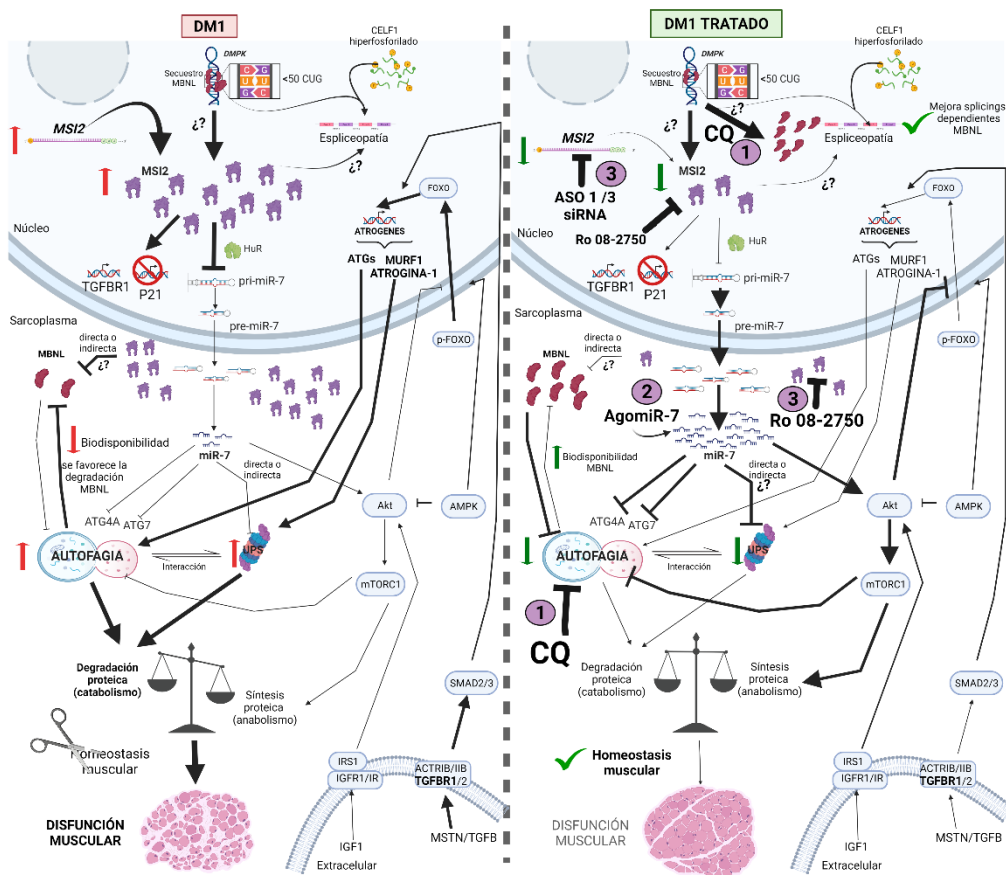


Figura D-2. Posible modelo de todas las alteraciones demostradas o corroboradas en este trabajo que contribuyen al fenotipo de disfunción muscular en DM1, así como, las diferentes estrategias empleadas para revertir/frenar este fenotipo. (Izquierda) Las expansiones CUG patogénicas secuestran a MBNL, entre otros factores. Esto junto con la hiperactivación de CEFL1 contribuyen a la espiiceopatía. Por otra parte, mediante un mecanismo desconocido, las expansiones CUG llevan a una sobreexpresión de MSI2 que, junto con HuR, inhiben el procesamiento del pri-miR-7-1 y, consecuentemente, se traduce en unos bajos niveles de miR-7. La infraexpresión de miR-7 potencia la hiperactivación excesiva de vías catabólicas como la autofagia, o del UPS, ya sea de forma directa o indirecta por falta de modulación positiva de la vía AKT/mTOR/FOXO, llevando a un aumento de la expresión de ATROGENES implicados en el UPS (ATROGINA-1 y MuRF1) y en la autofagia (ATGs). La falta de proteínas MBNL favorece la activación descontrolada de la autofagia que, a su vez, favorece la degradación de las proteínas MBNL. Esto podría generar un bucle de retroalimentación positivo entre ambos (interrogante). MSI2 regula de forma positiva a TGFBR1, el cual podría contribuir a una activación de la vía TGF- β /SMAD, junto con el aumento de MSTN, potenciando la expresión de atrogenes y otras vías que contribuyen a la atrofia muscular. A su vez, MSI2 inhibe la expresión de P21, contribuyendo a los defectos de diferenciación. Aunque se desconoce el mecanismo, MSI2 podría ejercer una regulación sobre las proteínas MBNL, y no se descarta un posible papel de MSI2 como regulador del *splicing* alternativo en DM1 (interrogante). (Derecha) Estrategias terapéuticas que hemos demostrado como válidas contra la disfunción muscular en DM1. (1) La Cloroquina (CQ) bloquea la autofagia, liberando a MBNL de los autofagosomas lo que aumenta la biodisponibilidad de MBNL funcional (rescate de *splicings*). Además, la CQ podría liberar a MBNL1/2 de los foci lo que contribuiría al aumento de los niveles de MBNL1/2 (interrogante). (2) AgomiR-7, mimético de miR-7, aumenta los niveles de miR-7 resultando en un restablecimiento de unos niveles basales de autofagia. Además, seguramente de forma indirecta, activa la vía AKT, disminuyendo la expresión de FOXO1/3, ATROGINA-1 y MuRF1, lo que favorece una inhibición del UPS y en conjunto, se favorece una menor tasa de degradación proteica, de forma independiente de MBNL1. (3) siRNAs/ASOS 1/3, y el compuesto Ro 08-2750 van dirigidos a degradar o inhibir la actividad de MSI2, respectivamente. La reducción de MSI2, aumenta miR-7 y consecuentemente tiene un efecto similar al tratamiento con agomiR-7. También, aumenta los niveles de MBNL1 y regula otras vías de forma independiente a miR-7 como P21 o TGFBR1. Imagen hecha en Biorender.com.

-Conclusiones -

Considerados en conjunto todos los resultados, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. La hiperactivación de la autofagia contribuye de forma significativa al fenotipo de disfunción muscular en DM1 ya que su inducción o reducción mediante diferentes estrategias es suficiente para empeorar o mejorar, respectivamente, fenotipos relacionados con la atrofia muscular.
2. La autofagia es una diana terapéutica contra la disfunción muscular en DM1. El tratamiento con el compuesto antiautofágico CQ, bloquea de forma efectiva la autofagia excesiva en DM1 y es suficiente para mejorar fenotipos moleculares en moscas modelo, ratones HSA^{LR} y miotubos DM1, así como, características funcionales y fisiológicas tan importantes como la supervivencia, locomoción y atrofia en moscas modelo, o la histopatología, fuerza y miotonía en ratones.
3. El bloqueo de la autofagia supone un nuevo mecanismo mediante el cual aumentar la biodisponibilidad de las proteínas MBNL 1 y 2. Además, la potenciación de los niveles de MBNL es funcional, puesto que se rescata la inclusión de exones alternativos regulados por estas proteínas.
4. miR-7 juega un papel crucial en la regulación negativa de la vía autofágica, y otras vías relacionadas con la atrofia, como el UPS, en DM1 ya que su modulación es suficiente para restablecer (agomiR-7 en miotubos DM1) o activar (antagomiR-7 en miotubos sanos) dichos procesos, de forma independiente de MBNL1. En consecuencia, la regulación a la baja de miR-7 origina, al menos en parte, la sobreactivación de la autofagia, que contribuye a la atrofia muscular en DM1.
5. miR-7 es necesario tanto para la fusión como para el crecimiento de los miotubos DM1. Sin embargo, el aumento de miR-7 es suficiente para rescatar significativamente solo el índice de fusión. Estos efectos podrían estar mediados, en parte, por la inhibición de la autofagia, puesto que la modulación de la vía con CQ o mtf mejora o empeora, respectivamente, el fenotipo.
6. MSI2 y miR-7 son dos nuevas dianas terapéuticas contra la disfunción muscular en DM1. MSI2 está fuertemente sobreexpresado en DM1 e inhibe la biogénesis de miR-7, lo que explica, en parte, los niveles reducidos de miR-7 en DM1. En

consecuencia, MSI2 es un nuevo factor que contribuye al eje miR-7/autofagia para explicar la atrofia muscular de la enfermedad. De hecho, existe una correlación negativa significativa entre los niveles de MSI2 o dianas de miR-7 y la fuerza de pacientes con DM1. Además, la reducción de los niveles o la actividad de MSI2 es suficiente para aumentar significativamente los niveles de miR-7, y consecuentemente o por otras vías independientes, reprimir la autofagia excesiva y la expresión de genes relacionados con la atrofia del sistema UPS, así como, aumentar los niveles de MBNL y regular otras vías de forma independiente de miR-7, como P21 y TGFBR1.

7. En conjunto, describimos la existencia del eje MSI2-miR-7-autofagia como contribuyente al fenotipo muscular en DM1 y proponemos este eje como enfoque terapéutico válido para tratar la disfunción muscular en la DM1.

-Bibliografía -

- Amack, J. D., & Mahadevan, M. S. (2004). Myogenic defects in myotonic dystrophy. *Developmental Biology*, 265(2). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.07.021>
- Ambrose, K. K., Ishak, T., Lian, L.-H., Goh, K.-J., Wong, K.-T., Ahmad-Annur, A., & Thong, M.-K. (2017). Deregulation of microRNAs in blood and skeletal muscles of myotonic dystrophy type 1 patients. *Neurology India*, 65(3). https://doi.org/10.4103/neuroindia.NI_237_16
- André, L. M., van Cruchten, R. T. P., Willemse, M., & Wansink, D. G. (2019). (CTG)_n repeat-mediated dysregulation of MBNL1 and MBNL2 expression during myogenesis in DM1 occurs already at the myoblast stage. *PLOS ONE*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217317>
- Arandel, L., Polay Espinoza, M., Matloka, M., Bazinet, A., de Dea Diniz, D., Naouar, N., Rau, F., Jollet, A., Edom-Vovard, F., Mamchaoui, K., Tarnopolsky, M., Puymirat, J., Battail, C., Boland, A., Deleuze, J.-F., Mouly, V., Klein, A. F., & Furling, D. (2017). Immortalized human myotonic dystrophy muscle cell lines to assess therapeutic compounds. *Disease Models & Mechanisms*, 10(4). <https://doi.org/10.1242/dmm.027367>
- Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., Perez-Alonso, M., & Baylies, M. K. (1998). The muscleblind Gene Participates in the Organization of Z-Bands and Epidermal Attachments of *Drosophila* Muscles and Is Regulated by Dmef2. *Developmental Biology*, 195(2). <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8833>
- Ashizawa, T., Gagnon, C., Groh, W. J., Gutmann, L., Johnson, N. E., Meola, G., Moxley, R., Pandya, S., Rogers, M. T., Simpson, E., Angeard, N., Bassez, G., Berggren, K. N., Bhakta, D., Bozzali, M., Broderick, A., Byrne, J. L. B., Campbell, C., Cup, E., ... Winblad, S. (2018). Consensus-based care recommendations for adults with myotonic dystrophy type 1. *Neurology: Clinical Practice*, 8(6). <https://doi.org/10.1212/CPJ.0000000000000531>
- Ashizawa, T., & Sarkar, P. S. (2011). Myotonic dystrophy types 1 and 2. *Handbook of Clinical Neurology*, 101. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045031-5.00015-3>

- Bargiela, A., Cerro-Herreros, E., Fernandez-Costa, J. M., Vilchez, J. J., 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*(7). <https://doi.org/10.1242/dmm.018127>
- Bassez, G., Audureau, E., Hogrel, J.-Y., Arrouasse, R., Baghdoyan, S., Bhugaloo, H., Gourlay-Chu, M.-L., le Corvoisier, P., & Peschanski, M. (2018). Improved mobility with metformin in patients with myotonic dystrophy type 1: a randomized controlled trial. *Brain*, *141*(10). <https://doi.org/10.1093/brain/awy231>
- Batra, R., Charizanis, K., Manchanda, M., Mohan, A., Li, M., Finn, D. J., Goodwin, M., Zhang, C., Sobczak, K., Thornton, C. A., & Swanson, M. S. (2014). Loss of MBNL Leads to Disruption of Developmentally Regulated Alternative Polyadenylation in RNA-Mediated Disease. *Molecular Cell*, *56*(2). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.027>
- Beaulieu, D., Thebault, P., Pelletier, R., Chapdelaine, P., Tarnopolsky, M., Furling, D., & Puymirat, J. (2012). Abnormal prostaglandin E2 production blocks myogenic differentiation in myotonic dystrophy. *Neurobiology of Disease*, *45*(1). <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.06.014>
- 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. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *42*(12), 1973–1983. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.08.010>
- Bennett, C. G., Riemondy, K., Chapnick, D. A., Bunker, E., Liu, X., Kuersten, S., & Yi, R. (2016). Genome-wide analysis of Musashi-2 targets reveals novel functions in governing epithelial cell migration. *Nucleic Acids Research*, *44*(8). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw207>
- Bigot, A., Klein, A. F., 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*(4). <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080560>

- Bisset, D. R., Stepniak-Konieczna, E. A., Zavaljevski, M., Wei, J., Carter, G. T., Weiss, M. D., & Chamberlain, J. R. (2015). Therapeutic impact of systemic AAV-mediated RNA interference in a mouse model of myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 24(17). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv219>
- Bland, C. S., Wang, E. T., Vu, A., David, M. P., Castle, J. C., Johnson, J. M., Burge, C. B., & Cooper, T. A. (2010). Global regulation of alternative splicing during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Research*, 38(21). <https://doi.org/10.1093/nar/gkq614>
- Blázquez-Bernal, Á., Fernandez-Costa, J. M., Bargiela, A., & Artero, R. (2021). Inhibition of autophagy rescues muscle atrophy in a LGMD2 *Drosophila* model. *The FASEB Journal*, 35(10). <https://doi.org/10.1096/fj.202100539RR>
- Bonaldo, P., & Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models & Mechanisms*, 6(1). <https://doi.org/10.1242/dmm.010389>
- Bondy-Chorney, E., Crawford Parks, T. E., Ravel-Chapuis, A., Klinck, R., Rocheleau, L., Pelchat, M., Chabot, B., Jasmin, B. J., & Côté, J. (2016). Stauf1 Regulates Multiple Alternative Splicing Events either Positively or Negatively in DM1 Indicating Its Role as a Disease Modifier. *PLOS Genetics*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005827>
- Braz, S. O., Acquaire, J., Gourdon, G., & Gomes-Pereira, M. (2018). Of Mice and Men: Advances in the Understanding of Neuromuscular Aspects of Myotonic Dystrophy. *Frontiers in Neurology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00519>
- Brockhoff, M., Rion, N., Chojnowska, K., Wiktorowicz, T., Eickhorst, C., Erne, B., Frank, S., Angelini, C., Furling, D., Rüegg, M. A., Sinnreich, M., & Castets, P. (2017). Targeting deregulated AMPK/mTORC1 pathways improves muscle function in myotonic dystrophy type I. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(2). <https://doi.org/10.1172/JCI89616>
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J.-P., Hudson, T., Sohn, R., Zeman, B.,

- Snell, R. G., Rundle, S. A., Crow, S., Davies, J., Shelbourne, P., Buxton, J., Jones, C., ... Housman, D. E. (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*(4). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90154-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90154-5)
- Cappella, M., Perfetti, A., Cardinali, B., Garcia-Manteiga, J. M., Carrara, M., Provenzano, C., Fuschi, P., Cardani, R., Renna, L. V., Meola, G., Falcone, G., & Martelli, F. (2018). High-throughput analysis of the RNA-induced silencing complex in myotonic dystrophy type 1 patients identifies the dysregulation of miR-29c and its target ASB2. *Cell Death & Disease*, *9*(7). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0769-5>
- Carmignac, V., Svensson, M., Körner, Z., Elowsson, L., Matsumura, C., Gawlik, K. I., Allamand, V., & Durbeej, M. (2011). Autophagy is increased in laminin $\alpha 2$ chain-deficient muscle and its inhibition improves muscle morphology in a mouse model of MDC1A. *Human Molecular Genetics*, *20*(24), 4891–4902. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr427>
- Cerro-Herreros, E., Fernandez-Costa, J. M., Sabater-Arcis, M., Llamusi, B., & Artero, R. (2016). Derepressing muscleblind expression by miRNA sponges ameliorates myotonic dystrophy-like phenotypes in *Drosophila*. *Scientific Reports*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/srep36230>
- Cerro-Herreros, E., González-Martínez, I., Moreno, N., Espinosa-Espinosa, J., Fernández-Costa, J. M., Colom-Rodrigo, A., Overby, S. J., Seoane-Miraz, D., Poyatos-García, J., Vilchez, J. J., López de Munain, A., Varela, M. A., Wood, M. J., Pérez-Alonso, M., Llamusi, B., & Artero, R. (2021). Preclinical characterization of antagomiR-218 as a potential treatment for myotonic dystrophy. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *26*. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.07.017>
- Cerro-Herreros, E., González-Martínez, I., Moreno-Cervera, N., Overby, S., Pérez-Alonso, M., Llamusi, B., & Artero, R. (2020). Therapeutic Potential of AntagomiR-23b for Treating Myotonic Dystrophy. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, *21*. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.07.021>

- Cerro-Herreros, E., Sabater-Arcis, M., Fernandez-Costa, J. M., 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*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04892-4>
- Chamberlain, C. M., & Ranum, L. P. W. (2012). Mouse model of muscleblind-like 1 overexpression: skeletal muscle effects and therapeutic promise. *Human Molecular Genetics*, *21*(21). <https://doi.org/10.1093/hmg/dds306>
- Charlet-B, N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. v, Grice, E. A., & Cooper, T. A. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Molecular Cell*, *10*(1). [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00572-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00572-5)
- 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*(1). <https://doi.org/10.1038/srep25317>
- Chen, K.-Y., Pan, H., Lin, M.-J., Li, Y.-Y., Wang, L.-C., Wu, Y.-C., & Hsiao, K.-M. (2007). Length-dependent toxicity of untranslated CUG repeats on *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *352*(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.102>
- Choudhury, N. R., de Lima Alves, F., de Andres-Aguayo, L., Graf, T., Caceres, J. F., Rappsilber, J., & Michlewski, G. (2013). Tissue-specific control of brain-enriched miR-7 biogenesis. *Genes & Development*, *27*(1). <https://doi.org/10.1101/gad.199190.112>
- Cohen, S., Nathan, J. A., & Goldberg, A. L. (2015). Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *14*(1). <https://doi.org/10.1038/nrd4467>
- Creugny, A., Fender, A., & Pfeffer, S. (2018). Regulation of primary microRNA processing. *FEBS Letters*, *592*(12). <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13067>

- Dastidar, S., Ardui, S., Singh, K., Majumdar, D., Nair, N., Fu, Y., Reyon, D., Samara, E., Gerli, M. F. M., Klein, A. F., De Schrijver, W., Tipanee, J., Seneca, S., Tulalamba, W., Wang, H., Chai, Y. C., In't Veld, P., Furling, D., Tedesco, F. S., ... VandenDriessche, T. (2018). Efficient CRISPR/Cas9-mediated editing of trinucleotide repeat expansion in myotonic dystrophy patient-derived iPSC and myogenic cells. *Nucleic Acids Research*, 46(16). <https://doi.org/10.1093/nar/gky548>
- de Antonio, M., Dogan, C., Hamroun, D., Mati, M., Zerrouki, S., Eymard, B., Katsahian, S., & Bassez, G. (2016). Unravelling the myotonic dystrophy type 1 clinical spectrum: A systematic registry-based study with implications for disease classification. *Revue Neurologique*, 172(10). <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2016.08.003>
- de Haro, M., Al-Ramahi, I., de Gouyon, B., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N. A., Ashizawa, T., Cooper, T. A., & Botas, J. (2006). MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, 15(13). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl137>
- Denis, J. A., Gauthier, M., Rachdi, L., Aubert, S., Giraud-Triboulet, K., Poydenot, P., Benchoua, A., Champon, B., Maury, Y., Baldeschi, C., Scharfmann, R., Piétu, G., Peschanski, M., & Martinat, C. (2013). mTOR-dependent proliferation defect in human ES-derived neural stem cells affected by myotonic dystrophy type 1. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 8). <https://doi.org/10.1242/jcs.116285>
- Dixon, D. M., Choi, J., El-Ghazali, A., Park, S. Y., Roos, K. P., Jordan, M. C., Fishbein, M. C., Comai, L., & Reddy, S. (2015). Loss of muscleblind-like 1 results in cardiac pathology and persistence of embryonic splice isoforms. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep09042>
- Du, H., Cline, M. S., Osborne, R. J., Tuttle, D. L., Clark, T. A., Donohue, J. P., Hall, M. P., Shiue, L., Swanson, M. S., Thornton, C. A., & Ares, M. (2010). Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(2). <https://doi.org/10.1038/nsmb.1720>

- Duggimpudi, S., Kloetgen, A., Maney, S. K., Münch, P. C., Hezaveh, K., Shaykhalishahi, H., Hoyer, W., McHardy, A. C., Lang, P. A., Borkhardt, A., & Hoell, J. I. (2018). Transcriptome-wide analysis uncovers the targets of the RNA-binding protein MSI2 and effects of MSI2's RNA-binding activity on IL-6 signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(40). <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002243>
- Echenne, B., & Bassez, G. (2013). Congenital and infantile myotonic dystrophy. *Handbook of Clinical Neurology*, 113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00009-5>
- Fernandez-Costa, J. M., Garcia-Lopez, A., Zuñiga, S., Fernandez-Pedrosa, V., Felipe-Benavent, A., Mata, M., Jaka, O., Aiastui, A., Hernandez-Torres, F., Aguado, B., Perez-Alonso, M., Vilchez, J. J., Lopez de Munain, A., & Artero, R. D. (2013). Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in Drosophila that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Human Molecular Genetics*, 22(4). <https://doi.org/10.1093/hmg/dd5478>
- Fernández-Garibay, X., Ortega, M. A., Cerro-Herreros, E., Comelles, J., Martínez, E., Artero, R., Fernández-Costa, J. M., & Ramón-Azcón, J. (2021). Bioengineered in vitro 3D model of myotonic dystrophy type 1 human skeletal muscle. *Biofabrication*, 13(3). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/abf6ae>
- Fortini, P., Ferretti, C., Iorio, E., Cagnin, M., Garribba, L., Pietraforte, D., Falchi, M., Pascucci, B., Baccharini, S., Morani, F., Phadngam, S., de Luca, G., Isidoro, C., & Dogliotti, E. (2016). The fine tuning of metabolism, autophagy and differentiation during in vitro myogenesis. *Cell Death & Disease*, 7(3). <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.50>
- Fritegotto, C., Ferrati, C., Pegoraro, V., & Angelini, C. (2017). Micro-RNA expression in muscle and fiber morphometry in myotonic dystrophy type 1. *Neurological Sciences : Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 38(4). <https://doi.org/10.1007/s10072-017-2811-2>
- Fugier, C., Klein, A. F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A., Tosch, V., Vignaud, A., Ferry, A., Messaddeq, N., Kokunai, Y., Tsuburaya, R., de la Grange, P., Dembele, D., Francois, V., Precigout, G., Boulade-Ladame, C.,

- Hummel, M.-C., Lopez de Munain, A., ... Charlet-Berguerand, N. (2011). Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nature Medicine*, 17(6). <https://doi.org/10.1038/nm.2374>
- Gajda, E., Grzanka, M., Godlewska, M., & Gawel, D. (2021). The Role of miRNA-7 in the Biology of Cancer and Modulation of Drug Resistance. *Pharmaceuticals*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/ph14020149>
- Gambardella, S., Rinaldi, F., Lepore, S. M., Viola, A., Loro, E., Angelini, C., Vergani, L., Novelli, G., & Botta, A. (2010). Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *Journal of Translational Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-48>
- 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*, 24(8). <https://doi.org/10.1038/mt.2016.97>
- Gao, Z., & Cooper, T. A. (2013). Reexpression of pyruvate kinase M2 in type 1 myofibers correlates with altered glucose metabolism in myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(33). <https://doi.org/10.1073/pnas.1308806110>
- García-Alcover, I., Colonques-Bellmunt, J., Garijo, R., Tormo, J. R., Artero, R., Álvarez-Abril, M. C., López Castel, A., & Pérez-Alonso, M. (2014). Development of a *Drosophila melanogaster* spliceosensor system for in vivo high-throughput screening in myotonic dystrophy type 1. *Disease Models & Mechanisms*. <https://doi.org/10.1242/dmm.016592>
- García-Lopez, A., Llamusi, B., Orzaez, M., Perez-Paya, E., & Artero, R. D. (2011). In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(29). <https://doi.org/10.1073/pnas.1018213108>
- García-Lopez, A., Monferrer, L., García-Alcover, I., Vicente-Crespo, M., Álvarez-Abril, M. C., & Artero, R. D. (2008). Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity

- model in *Drosophila*. *PloS One*, 3(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001595>
- García-Puga, M., Saenz-Antoñanzas, A., Fernández-Torrón, R., Munain, A. L. de, & Matheu, A. (2020). Myotonic Dystrophy type 1 cells display impaired metabolism and mitochondrial dysfunction that are reversed by metformin. *Aging*, 12(7). <https://doi.org/10.18632/aging.103022>
- Geary, R. S., Norris, D., Yu, R., & Bennett, C. F. (2015). Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.008>
- Gebert, L. F. R., & MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>
- Gomes-Pereira, M., Cooper, T. A., & Gourdon, G. (2011). Myotonic dystrophy mouse models: towards rational therapy development. *Trends in Molecular Medicine*, 17(9). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.05.004>
- GTEx Consortium. (2020). The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6509). <https://doi.org/10.1126/science.aaz1776>
- Gu, D. na, Jiang, M. jie, Mei, Z., Dai, J. juan, Dai, C. yun, Fang, C., Huang, Q., & Tian, L. (2017). microRNA-7 impairs autophagy-derived pools of glucose to suppress pancreatic cancer progression. *Cancer Letters*, 400, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.04.020>
- Hammond, S. M., Aartsma-Rus, A., Alves, S., Borgos, S. E., Buijsen, R. A. M., Collin, R. W. J., Covello, G., Denti, M. A., Desviat, L. R., Echevarría, L., Foged, C., Gaina, G., Garanto, A., Goyenvalle, A. T., Guzowska, M., Holodnuka, I., Jones, D. R., Krause, S., Lehto, T., ... Arechavala-Gomez, V. (2021). Delivery of oligonucleotide-based therapeutics: challenges and opportunities. *EMBO Molecular Medicine*, 13(4). <https://doi.org/10.15252/emmm.202013243>
- Heatwole, C., Luebbe, E., Rosero, S., Eichinger, K., Martens, W., Hilbert, J., Dekdebrun, J., Dilek, N., Zizzi, C., Johnson, N., Puwanant, A., Tawil, R., Schifitto, G., Beck, C.

- A., Richeson, J. F., Zareba, W., Thornton, C., McDermott, M. P., & Moxley, R. (2021). Mexiletine in Myotonic Dystrophy Type 1: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Neurology*, 96(2). <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000011002>
- Herrendorff, R., Faleschini, M. T., Stiefvater, A., Erne, B., Wiktorowicz, T., Kern, F., Hamburger, M., Potterat, O., Kinter, J., & Sinnreich, M. (2016). Identification of Plant-derived Alkaloids with Therapeutic Potential for Myotonic Dystrophy Type I. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(33). <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.710616>
- Hiba, B., Richard, N., Hébert, L. J., Coté, C., Nejjari, M., Vial, C., Bouhour, F., Puymirat, J., & Janier, M. (2012). Quantitative assessment of skeletal muscle degeneration in patients with myotonic dystrophy type 1 using MRI. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 35(3), 678–685. <https://doi.org/10.1002/jmri.22849>
- Higuchi, T., Todaka, H., Sugiyama, Y., Ono, M., Tamaki, N., Hatano, E., Takezaki, Y., Hanazaki, K., Miwa, T., Lai, S., Morisawa, K., Tsuda, M., Taniguchi, T., & Sakamoto, S. (2016). Suppression of MicroRNA-7 (miR-7) Biogenesis by Nuclear Factor 90-Nuclear Factor 45 Complex (NF90-NF45) Controls Cell Proliferation in Hepatocellular Carcinoma. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(40). <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.748210>
- Ho, T. H., Bundman, D., Armstrong, D. L., & Cooper, T. A. (2005). Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 14(11). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi162>
- Ho, T. H., Charlet-B, N., Poulos, M. G., Singh, G., Swanson, M. S., & Cooper, T. A. (2004). Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *The EMBO Journal*, 23(15). <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600300>
- Horrigan, J., Gomes, T. B., Snape, M., Nikolenko, N., McMorn, A., Evans, S., Yaroshinsky, A., della Pasqua, O., Oosterholt, S., & Lochmüller, H. (2020). A Phase 2 Study of AMO-02 (Tideglusib) in Congenital and Childhood-Onset Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1). *Pediatric Neurology*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.08.001>

- Huguet, A., Medja, F., Nicole, A., Vignaud, A., Guiraud-Dogan, C., Ferry, A., Decostre, V., Hogrel, J.-Y., Metzger, F., Hoeflich, A., Baraibar, M., Gomes-Pereira, M., Puymirat, J., Bassez, G., Furling, D., Munnich, A., & Gourdon, G. (2012). Molecular, physiological, and motor performance defects in DMSXL mice carrying >1,000 CTG repeats from the human DM1 locus. *PLoS Genetics*, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003043>
- Huichalaf, C., Sakai, K., Jin, B., Jones, K., Wang, G., Schoser, B., Schneider-Gold, C., Sarkar, P., Pereira-Smith, O. M., Timchenko, N., & Timchenko, L. (2010). Expansion of CUG RNA repeats causes stress and inhibition of translation in myotonic dystrophy 1 (DM1) cells. *The FASEB Journal*, *24*(10). <https://doi.org/10.1096/fj.09-151159>
- Iftikhar, M., Frey, J., Shohan, Md. J., Malek, S., & Mousa, S. A. (2021). Current and emerging therapies for Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Pharmacology & Therapeutics*, *220*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107719>
- Ishii, S., Nishio, T., Sunohara, N., Yoshihara, T., Takemura, K., Hikiji, K., Tsujino, S., & Sakuragawa, N. (1996). Small increase in triplet repeat length of cerebellum from patients with myotonic dystrophy. *Human Genetics*, *98*(2). <https://doi.org/10.1007/s004390050176>
- Jansen, G., Willems, P., Coerwinkel, M., Nillesen, W., Smeets, H., Vits, L., Höweler, C., Brunner, H., & Wieringa, B. (1994). Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)_n repeat variation and selection against extreme expansion in sperm. *American Journal of Human Genetics*, *54*(4).
- Jauvin, D., Chrétien, J., Pandey, S. K., Martineau, L., Revillod, L., Bassez, G., Lachon, A., MacLeod, A. R., Gourdon, G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A., Bennett, C. F., & Puymirat, J. (2017). Targeting DMPK with Antisense Oligonucleotide Improves Muscle Strength in Myotonic Dystrophy Type 1 Mice. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, *7*, 465–474. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.05.007>
- Jiang, X., Tan, J., Wen, Y., Liu, W., Wu, S., Wang, L., Wangou, S., Liu, D., Du, C., Zhu, B., Xie, D., & Ren, C. (2019). MSI2-TGF-β/TGF-β R1/SMAD3 positive feedback

- regulation in glioblastoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 84(2).
<https://doi.org/10.1007/s00280-019-03892-5>
- Johnson, N. E., Butterfield, R. J., Mayne, K., Newcomb, T., Imburgia, C., Dunn, D., Duval, B., Feldkamp, M. L., & Weiss, R. B. (2021). Population Based Prevalence of Myotonic Dystrophy Type 1 Using Genetic Analysis of State-wide Blood Screening Program. *Neurology*.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000011425>
- Jones, K., Wei, C., Iakova, P., Bugiardini, E., Schneider-Gold, C., Meola, G., Woodgett, J., Killian, J., Timchenko, N. A., & Timchenko, L. T. (2012). GSK3 β mediates muscle pathology in myotonic dystrophy. *Journal of Clinical Investigation*, 122(12). <https://doi.org/10.1172/JCI64081>
- Kalsotra, A., Singh, R. K., Gurha, P., Ward, A. J., Creighton, C. J., & Cooper, T. A. (2014). The Mef2 Transcription Network Is Disrupted in Myotonic Dystrophy Heart Tissue, Dramatically Altering miRNA and mRNA Expression. *Cell Reports*, 6(2). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.025>
- Kanadia, R. N. (2003). A Muscleblind Knockout Model for Myotonic Dystrophy. *Science*, 302(5652). <https://doi.org/10.1126/science.1088583>
- Kanadia, R. N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S. G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A., & Swanson, M. S. (2006). Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(31). <https://doi.org/10.1073/pnas.0604970103>
- Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J. D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., Dirksen, R. T., Takahashi, M. P., Dulhunty, A. F., & Sakoda, S. (2005). Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, 14(15). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi223>
- Klionsky, D. J., Petroni, G., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cadwell, K., Cecconi, F., Choi, A. M. K., Choi, M. E., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Deretic, V., Dikic, I., Elazar, Z.,

- Eskelinen, E., ... Pietrocola, F. (2021). Autophagy in major human diseases. *The EMBO Journal*, 40(19). <https://doi.org/10.15252/embj.2021108863>
- Koehorst, E., Ballester-Lopez, A., Arechavala-Gomez, V., Martínez-Piñeiro, A., & Nogales-Gadea, G. (2020). The Biomarker Potential of miRNAs in Myotonic Dystrophy Type I. *Journal of Clinical Medicine*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/jcm9123939>
- Koehorst, E., Núñez-Manchón, J., Ballester-López, A., Almendrote, M., Lucente, G., Arbex, A., Chojnacki, J., Vázquez-Manrique, R. P., Gómez-Escribano, A. P., Pintos-Morell, G., Coll-Cantí, J., Ramos-Fransi, A., Martínez-Piñeiro, A., Suelves, M., & Nogales-Gadea, G. (2021). Characterization of RAN Translation and Antisense Transcription in Primary Cell Cultures of Patients with Myotonic Dystrophy Type 1. *Journal of Clinical Medicine*, 10(23). <https://doi.org/10.3390/jcm10235520>
- Konieczny, P., Selma-Soriano, E., Rapisarda, A. S., Fernandez-Costa, J. M., Perez-Alonso, M., & Artero, R. (2017). Myotonic dystrophy: candidate small molecule therapeutics. *Drug Discovery Today*, 22(11). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.07.011>
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Kuyumcu-Martinez, N. M., & Cooper, T. A. (2006). Misregulation of alternative splicing causes pathogenesis in myotonic dystrophy. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 44. https://doi.org/10.1007/978-3-540-34449-0_7
- Kuyumcu-Martinez, N. M., Wang, G.-S., & Cooper, T. A. (2007). Increased Steady-State Levels of CUGBP1 in Myotonic Dystrophy 1 Are Due to PKC-Mediated Hyperphosphorylation. *Molecular Cell*, 28(1). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.027>
- Langlois, M.-A., Boniface, C., Wang, G., Alluin, J., Salvaterra, P. M., Puymirat, J., Rossi, J. J., & Lee, N. S. (2005). Cytoplasmic and Nuclear Retained DMPK mRNAs Are

Targets for RNA Interference in Myotonic Dystrophy Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17). <https://doi.org/10.1074/jbc.M501591200>

Larsen, J., Pettersson, O. J., Jakobsen, M., Thomsen, R., Pedersen, C. B., Hertz, J. M., Gregersen, N., Corydon, T. J., & Jensen, T. G. (2011). Myoblasts generated by lentiviral mediated MyoD transduction of myotonic dystrophy type 1 (DM1) fibroblasts can be used for assays of therapeutic molecules. *BMC Research Notes*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-490>

Laustriat, D., Gide, J., Barrault, L., Chautard, E., Benoit, C., Auboeuf, D., Boland, A., Battail, C., Artiguenave, F., Deleuze, J.-F., Bénit, P., Rustin, P., Franc, S., Charpentier, G., Furling, D., Bassez, G., Nissan, X., Martinat, C., Peschanski, M., & Baghdoyan, S. (2015). In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.35>

Lee, J. E., Bennett, C. F., & Cooper, T. A. (2012). RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(11). <https://doi.org/10.1073/pnas.1117019109>

Lee, K., Li, M., Manchanda, M., Batra, R., Charizanis, K., Mohan, A., Warren, S. A., Chamberlain, C. M., Finn, D., Hong, H., Ashraf, H., Kasahara, H., Ranum, L. P. W., & Swanson, M. S. (2013). Compound loss of muscleblind-like function in myotonic dystrophy. *EMBO Molecular Medicine*, 5(12). <https://doi.org/10.1002/emmm.201303275>

Li, M., Zhuang, Y., Batra, R., Thomas, J. D., Li, M., Nutter, C. A., Scotti, M. M., Carter, H. A., Wang, Z. J., Huang, X.-S., Pu, C. Q., Swanson, M. S., & Xie, W. (2020). HNRNPA1-induced spliceopathy in a transgenic mouse model of myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.1907297117>

Liang, X.-H., Sun, H., Nichols, J. G., & Crooke, S. T. (2017). RNase H1-Dependent Antisense Oligonucleotides Are Robustly Active in Directing RNA Cleavage in Both the Cytoplasm and the Nucleus. *Molecular Therapy*, 25(9). <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.06.002>

- Lim, J.-A., Sun, B., Puertollano, R., & Raben, N. (2018). Therapeutic Benefit of Autophagy Modulation in Pompe Disease. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(7), 1783–1796. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.04.025>
- Lin, X., Miller, J. W., Mankodi, A., Kanadia, R. N., Yuan, Y., Moxley, R. T., Swanson, M. S., & Thornton, C. A. (2006). Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 15(13). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl132>
- Llamusi, B., Bargiela, A., Fernandez-Costa, J. M., Garcia-Lopez, A., Klima, R., Feiguin, F., & Artero, R. (2013). Muscleblind, BSF and TBPH are mislocalized in the muscle sarcomere of a Drosophila myotonic dystrophy model. *Disease Models & Mechanisms*, 6(1). <https://doi.org/10.1242/dmm.009563>
- López Castel, A., Overby, S. J., & Artero, R. (2019). MicroRNA-Based Therapeutic Perspectives in Myotonic Dystrophy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22). <https://doi.org/10.3390/ijms20225600>
- López-Martínez, A., Soblechero-Martín, P., de-la-Puente-Ovejero, L., Nogales-Gadea, G., & Arechavala-Gomeza, V. (2020). An Overview of Alternative Splicing Defects Implicated in Myotonic Dystrophy Type I. *Genes*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/genes11091109>
- Loro, E., Rinaldi, F., Malena, A., Masiero, E., Novelli, G., Angelini, C., Romeo, V., Sandri, M., Botta, A., & Vergani, L. (2010). Normal myogenesis and increased apoptosis in myotonic dystrophy type-1 muscle cells. *Cell Death and Differentiation*, 17(8). <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.33>
- LoRusso, S., Weiner, B., & Arnold, W. D. (2018). Myotonic Dystrophies: Targeting Therapies for Multisystem Disease. In *Neurotherapeutics* (Vol. 15, Issue 4, pp. 872–884). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00679-z>
- Madsen, A. (2017, October 1). *Ionis reports set back on DMPKRx program for myotonic dystrophy*. MDA.

- Mahadevan, M. S., Yadava, R. S., Yu, Q., Balijepalli, S., Frenzel-McCardell, C. D., Bourne, T. D., & Phillips, L. H. (2006). Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nature Genetics*, 38(9). <https://doi.org/10.1038/ng1857>
- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., & et. al. (1992). Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science*, 255(5049). <https://doi.org/10.1126/science.1546325>
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., & Thornton, C. A. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5485). <https://doi.org/10.1126/science.289.5485.1769>
- Martorell, L., Cobo, A. M., Baiget, M., Naudó, M., Poza, J. J., & Parra, J. (2007). Prenatal diagnosis in myotonic dystrophy type 1. Thirteen years of experience: implications for reproductive counselling in DM1 families. *Prenatal Diagnosis*, 27(1). <https://doi.org/10.1002/pd.1627>
- Masuda, A., Andersen, H. S., Doktor, T. K., Okamoto, T., Ito, M., Andresen, B. S., & Ohno, K. (2012). CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Scientific Reports*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/srep00209>
- Matloka, M., Klein, A. F., Rau, F., & Furling, D. (2018). Cells of Matter—In Vitro Models for Myotonic Dystrophy. *Frontiers in Neurology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00361>
- Meola, G., & Cardani, R. (2015). Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(4). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.019>
- Michlewski, G., & Cáceres, J. F. (2019). Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA (New York, N.Y.)*, 25(1). <https://doi.org/10.1261/rna.068692.118>

- Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umuay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., & Swanson, M. S. (2000). Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *The EMBO Journal*, *19*(17), 4439–4448. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.17.4439>
- Minuesa, G., Albanese, S. K., Xie, W., Kazansky, Y., Worroll, D., Chow, A., Schurer, A., Park, S.-M., Rotsides, C. Z., Taggart, J., Rizzi, A., Naden, L. N., Chou, T., Gourkanti, S., Cappel, D., Passarelli, M. C., Fairchild, L., Adura, C., Glickman, J. F., ... Kharas, M. G. (2019). Small-molecule targeting of MUSASHI RNA-binding activity in acute myeloid leukemia. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10523-3>
- Morales, F., Couto, J. M., Higham, C. F., Hogg, G., Cuenca, P., Braida, C., Wilson, R. H., Adam, B., del Valle, G., Brian, R., Sittenfeld, M., Ashizawa, T., Wilcox, A., Wilcox, D. E., & Monckton, D. G. (2012). Somatic instability of the expanded CTG triplet repeat in myotonic dystrophy type 1 is a heritable quantitative trait and modifier of disease severity. *Human Molecular Genetics*, *21*(16). <https://doi.org/10.1093/hmg/dds185>
- Morissette, M. R., Cook, S. A., Buranasombati, C., Rosenberg, M. A., & Rosenzweig, A. (2009). Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *297*(5). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00043.2009>
- Morriss, G. R., Rajapakshe, K., Huang, S., Coarfa, C., & Cooper, T. A. (2018). Mechanisms of skeletal muscle wasting in a mouse model for myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, *27*(16). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy192>
- Nakamori, M., Taylor, K., Mochizuki, H., Sobczak, K., & Takahashi, M. P. (2016). Oral administration of erythromycin decreases RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *3*(1). <https://doi.org/10.1002/acn3.271>
- O'Leary, D. A., Vargas, L., Sharif, O., Garcia, M. E., Sigal, Y. J., Chow, S.-K., Schmedt, C., Caldwell, J. S., Brinker, A., & Engels, I. H. (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.
<https://doi.org/10.2174/1875397301004010009>
- Osborne, R. J., Lin, X., Welle, S., Sobczak, K., O'Rourke, J. R., Swanson, M. S., & Thornton, C. A. (2009). Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 18(8).
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp058>
- Overby, S. J., Cerro-Herreros, E., Llamusi, B., & Artero, R. (2018). RNA-mediated therapies in myotonic dystrophy. *Drug Discovery Today*, 23(12).
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.08.004>
- Ozimski, L. L., Sabater-Arcis, M., Bargiela, A., & Artero, R. (2021). The hallmarks of myotonic dystrophy type 1 muscle dysfunction. *Biological Reviews*, 96(2).
<https://doi.org/10.1111/brv.12674>
- Pandey, S. K., Wheeler, T. M., Justice, S. L., Kim, A., Younis, H. S., Gattis, D., Jauvin, D., Puymirat, J., Swayze, E. E., Freier, S. M., Bennett, C. F., Thornton, C. A., & MacLeod, A. R. (2015). Identification and Characterization of Modified Antisense Oligonucleotides Targeting *DMPK* in Mice and Nonhuman Primates for the Treatment of Myotonic Dystrophy Type 1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 355(2). <https://doi.org/10.1124/jpet.115.226969>
- Pantic, B., Borgia, D., Giunco, S., Malena, A., Kiyono, T., Salvatori, S., de Rossi, A., Giardina, E., Sangiuolo, F., Pegoraro, E., Vergani, L., & Botta, A. (2016). Reliable and versatile immortal muscle cell models from healthy and myotonic dystrophy type 1 primary human myoblasts. *Experimental Cell Research*, 342(1).
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.02.013>
- Park, S.-M., Deering, R. P., Lu, Y., Tivnan, P., Lianoglou, S., Al-Shahrour, F., Ebert, B. L., Hacohen, N., Leslie, C., Daley, G. Q., Lengner, C. J., & Kharas, M. G. (2014). Musashi-2 controls cell fate, lineage bias, and TGF- β signaling in HSCs. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(1).
<https://doi.org/10.1084/jem.20130736>

- Pascual-Gilabert, M., López-Castel, A., & Artero, R. (2021). Myotonic dystrophy type 1 drug development: A pipeline toward the market. *Drug Discovery Today*, 26(7). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.03.024>
- Perbellini, R., Greco, S., Sarra-Ferraris, G., Cardani, R., Capogrossi, M. C., Meola, G., & Martelli, F. (2011). Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 21(2). <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.11.012>
- Pettersson, O. J., Aagaard, L., Jensen, T. G., & Damgaard, C. K. (2015). Molecular mechanisms in DM1 — a focus on foci. *Nucleic Acids Research*, 43(4). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv029>
- 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(14). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt127>
- Provenzano, C., Cappella, M., Valaperta, R., Cardani, R., Meola, G., Martelli, F., Cardinali, B., & Falcone, G. (2017). CRISPR/Cas9-Mediated Deletion of CTG Expansions Recovers Normal Phenotype in Myogenic Cells Derived from Myotonic Dystrophy 1 Patients. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.10.006>
- Puymirat, J., Giguere, Y., Mathieu, J., & Bouchard, J.-P. (2009). INTERGENERATIONAL CONTRACTION OF THE CTG REPEATS IN 2 FAMILIES WITH MYOTONIC DYSTROPHY TYPE 1. *Neurology*, 73(24). <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c677e1>
- Raaijmakers, R. H. L., Ripken, L., Ausems, C. R. M., & Wansink, D. G. (2019). CRISPR/Cas Applications in Myotonic Dystrophy: Expanding Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15). <https://doi.org/10.3390/ijms20153689>
- Rao, A. N., Campbell, H. M., Guan, X., Word, T. A., Wehrens, X. H. T., Xia, Z., & Cooper, T. A. (2021). Reversible cardiac disease features in an inducible CUG repeat

- RNA-expressing mouse model of myotonic dystrophy. *JCI Insight*, 6(5).
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.143465>
- Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemin, J.-P., Fischer, M.-C., Jost, B., Dembele, D., Gourdon, G., Nicole, A., Duboc, D., Wahbi, K., Day, J. W., Fujimura, H., Takahashi, M. P., Auboeuf, D., Dreumont, N., Furling, D., & Charlet-Berguerand, N. (2011). Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(7).
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2067>
- Rau, F., Lainé, J., Ramanoudjame, L., Ferry, A., Arandel, L., Delalande, O., Jollet, A., Dingli, F., Lee, K.-Y., Peccate, C., Lorain, S., Kabashi, E., Athanasopoulos, T., Koo, T., Loew, D., Swanson, M. S., le Rumeur, E., Dickson, G., Allamand, V., ... Furling, D. (2015). Abnormal splicing switch of DMD's penultimate exon compromises muscle fibre maintenance in myotonic dystrophy. *Nature Communications*, 6.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8205>
- Ravel-Chapuis, A., Bélanger, G., Yadava, R. S., Mahadevan, M. S., DesGroseillers, L., Côté, J., & Jasmin, B. J. (2012). The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *Journal of Cell Biology*, 196(6). <https://doi.org/10.1083/jcb.201108113>
- Reddy, K., Jenquin, J. R., Cleary, J. D., & Berglund, J. A. (2019). Mitigating RNA Toxicity in Myotonic Dystrophy using Small Molecules. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16). <https://doi.org/10.3390/ijms20164017>
- Reddy, S., Smith, D. B. J., Rich, M. M., Leferovich, J. M., Reilly, P., Davis, B. M., Tran, K., Rayburn, H., Bronson, R., Cros, D., Balice-Gordon, R. J., & Housman, D. (1996). Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nature Genetics*, 13(3).
<https://doi.org/10.1038/ng0796-325>
- Redman, J. B., Fenwick, R. G., Fu, Y. H., Pizzuti, A., & Caskey, C. T. (1993). Relationship between parental trinucleotide GCT repeat length and severity of myotonic dystrophy in offspring. *JAMA*, 269(15).

- Rhodes, J. D., Lott, M. C., Russell, S. L., Moulton, V., Sanderson, J., Wormstone, I. M., & Broadway, D. C. (2012). Activation of the innate immune response and interferon signalling in myotonic dystrophy type 1 and type 2 cataracts. *Human Molecular Genetics*, 21(4), 852–862. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr515>
- Rossi, S., della Marca, G., Ricci, M., Perna, A., Nicoletti, T. F., Brunetti, V., Meleo, E., Calvello, M., Petrucci, A., Antonini, G., Bucci, E., Licchelli, L., Sancricca, C., Massa, R., Rastelli, E., Botta, A., di Muzio, A., Romano, S., Garibaldi, M., & Silvestri, G. (2019). Prevalence and predictor factors of respiratory impairment in a large cohort of patients with Myotonic Dystrophy type 1 (DM1): A retrospective, cross sectional study. *Journal of the Neurological Sciences*, 399. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.02.012>
- Salisbury, E., Sakai, K., Schoser, B., Huichalaf, C., Schneider-Gold, C., Nguyen, H., Wang, G.-L., Albrecht, J. H., & Timchenko, L. T. (2008). Ectopic expression of cyclin D3 corrects differentiation of DM1 myoblasts through activation of RNA CUG-binding protein, CUGBP1. *Experimental Cell Research*, 314(11–12). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.04.018>
- Santoro, M., Piacentini, R., Masciullo, M., Bianchi, M. L. E., Modoni, A., Podda, M. V., Ricci, E., Silvestri, G., & Grassi, C. (2014). Alternative splicing alterations of Ca²⁺ handling genes are associated with Ca²⁺ signal dysregulation in myotonic dystrophy type 1 (DM1) and type 2 (DM2) myotubes. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(4). <https://doi.org/10.1111/nan.12076>
- Sarkar, P. S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., Chai, Y., Stout, J. T., & Reddy, S. (2000). Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nature Genetics*, 25(1). <https://doi.org/10.1038/75500>
- Sato, S., Ogura, Y., & Kumar, A. (2014). TWEAK/Fn14 Signaling Axis Mediates Skeletal Muscle Atrophy and Metabolic Dysfunction. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00018>
- Savić Pavićević, D., Miladinović, J., Brkušanić, M., Šviković, S., Djurica, S., Brajušković, G., & Romac, S. (2013). Molecular genetics and genetic testing in myotonic dystrophy type 1. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/391821>

- Seznec, H., Lia-Baldini, A.-S., Duros, C., Fouquet, C., Lacroix, C., Hofmann-Radvanyi, H., Junien, C., & Gourdon, G. (2000). Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 9, Issue 8).
- Shen, X., Xu, F., Li, M., Wu, S., Zhang, J., Wang, A., Xu, L., Liu, Y., & Zhu, G. (2020). miR-322/-503 rescues myoblast defects in myotonic dystrophy type 1 cell model by targeting CUG repeats. *Cell Death & Disease*, 11(10). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03112-6>
- Smith, C. A., & Gutmann, L. (2016). Myotonic Dystrophy Type 1 Management and Therapeutics. *Current Treatment Options in Neurology*, 18(12). <https://doi.org/10.1007/s11940-016-0434-1>
- Sobczak, K., Wheeler, T. M., Wang, W., & Thornton, C. A. (2013). RNA Interference Targeting CUG Repeats in a Mouse Model of Myotonic Dystrophy. *Molecular Therapy*, 21(2). <https://doi.org/10.1038/mt.2012.222>
- Song, K.-Y., Guo, X.-M., Wang, H.-Q., Zhang, L., Huang, S.-Y., Huo, Y.-C., Zhang, G., Feng, J.-Z., Zhang, R.-R., Ma, Y., Hu, Q.-Z., & Qin, X.-Y. (2020). MBNL1 reverses the proliferation defect of skeletal muscle satellite cells in myotonic dystrophy type 1 by inhibiting autophagy via the mTOR pathway. *Cell Death & Disease*, 11(7). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02756-8>
- Steinert, H. (1909). Über das klinische und anatomische bild des muscelschwundes der myotoniker. *Deutsche Zeitschrift Für Neurologie*, 37.
- Takahashi, M. P., & Cannon, S. C. (2001). Mexiletine block of disease-associated mutations in S6 segments of the human skeletal muscle Na(+) channel. *The Journal of Physiology*, 537(Pt 3). <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00701.x>
- Temmerman, N. de, Sermon, K., Seneca, S., de Rycke, M., Hilven, P., Lissens, W., van Steirteghem, A., & Liebaers, I. (2004). Intergenerational Instability of the Expanded CTG Repeat in the DMPK Gene: Studies in Human Gametes and

- Preimplantation Embryos. *The American Journal of Human Genetics*, 75(2).
<https://doi.org/10.1086/422762>
- Theadom, A., Rodrigues, M., & Roxburgh, R. (2016). Knowledge of Sub-Types Important to Understanding of the Prevalence of Myotonic Dystrophy. *Neuroepidemiology*, 46(3). <https://doi.org/10.1159/000444469>
- Thomas, J. D., Oliveira, R., Sznajder, Ł. J., & Swanson, M. S. (2018). Myotonic Dystrophy and Developmental Regulation of RNA Processing. In *Comprehensive Physiology*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170002>
- Thomson, D. M. (2018). The Role of AMPK in the Regulation of Skeletal Muscle Size, Hypertrophy, and Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19103125>
- Thornton, C. A. (2014). Myotonic Dystrophy. *Neurologic Clinics*, 32(3). <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2014.04.011>
- Thornton, C. A., Johnson, K., & Moxley, R. T. (1994). Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes. *Annals of Neurology*, 35(1). <https://doi.org/10.1002/ana.410350116>
- Timchenko, L. (2013). Molecular mechanisms of muscle atrophy in myotonic dystrophies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(10). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.010>
- Timchenko, N. A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z.-J., Quan, L., & Timchenko, L. T. (2004). Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(13). <https://doi.org/10.1074/jbc.M312923200>
- Todd, P. K., Ackall, F. Y., Hur, J., Sharma, K., Paulson, H. L., & Dowling, J. J. (2013). Transcriptional changes and developmental abnormalities in a zebrafish model of myotonic dystrophy type 1. *Disease Models & Mechanisms*. <https://doi.org/10.1242/dmm.012427>
- Ueki, J., Nakamori, M., Nakamura, M., Nishikawa, M., Yoshida, Y., Tanaka, A., Morizane, A., Kamon, M., Araki, T., Takahashi, M. P., Watanabe, A., Inagaki, N.,

- & Sakurai, H. (2017). Myotonic dystrophy type 1 patient-derived iPSCs for the investigation of CTG repeat instability. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep42522>
- Vignaud, A., Ferry, A., Huguet, A., Baraibar, M., Trollet, C., Hyzewicz, J., Butler-Browne, G., Puymirat, J., Gourdon, G., & Furling, D. (2010). Progressive skeletal muscle weakness in transgenic mice expressing CTG expansions is associated with the activation of the ubiquitin-proteasome pathway. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 20(5). <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.03.006>
- Wang, E. T., Cody, N. A. L., Jog, S., Biancolella, M., Wang, T. T., Treacy, D. J., Luo, S., Schroth, G. P., Housman, D. E., Reddy, S., Lécuyer, E., & Burge, C. B. (2012). Transcriptome-wide Regulation of Pre-mRNA Splicing and mRNA Localization by Muscleblind Proteins. *Cell*, 150(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.041>
- Wang, E. T., Treacy, D., Eichinger, K., Struck, A., Estabrook, J., Olafson, H., Wang, T. T., Bhatt, K., Westbrook, T., Sedehizadeh, S., Ward, A., Day, J., Brook, D., Berglund, J. A., Cooper, T., Housman, D., Thornton, C., & Burge, C. (2019). Transcriptome alterations in myotonic dystrophy skeletal muscle and heart. *Human Molecular Genetics*, 28(8). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy432>
- Wang, M., Weng, W.-C., Stock, L., Lindquist, D., Martinez, A., Gourdon, G., Timchenko, N., Snape, M., & Timchenko, L. (2019). Correction of Glycogen Synthase Kinase 3 β in Myotonic Dystrophy 1 Reduces the Mutant RNA and Improves Postnatal Survival of DMSXL Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 39(21). <https://doi.org/10.1128/MCB.00155-19>
- Wang, Y., Xu, W., Yan, Z., Zhao, W., Mi, J., Li, J., & Yan, H. (2018). Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 37(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0731-5>
- Ward, A. J., Rimer, M., Killian, J. M., Dowling, J. J., & Cooper, T. A. (2010). CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, 19(18). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq277>

- Warf, M. B., & Berglund, J. A. (2007). MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T. *RNA*, *13*(12). <https://doi.org/10.1261/rna.610607>
- Wei, C., Stock, L., Valanejad, L., Zalewski, Z. A., Karns, R., Puymirat, J., Nelson, D., Witte, D., Woodgett, J., Timchenko, N. A., & Timchenko, L. (2018). Correction of GSK3 β at young age prevents muscle pathology in mice with myotonic dystrophy type 1. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *32*(4). <https://doi.org/10.1096/fj.201700700R>
- Wheeler, T. M., Leger, A. J., Pandey, S. K., MacLeod, A. R., Nakamori, M., Cheng, S. H., Wentworth, B. M., Bennett, C. F., & Thornton, C. A. (2012). Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature*, *488*(7409). <https://doi.org/10.1038/nature11362>
- 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*(4). <https://doi.org/10.1111/cts.12275>
- Yadava, R. S., Foff, E. P., Yu, Q., Gladman, J. T., Kim, Y. K., Bhatt, K. S., Thornton, C. A., Zheng, T. S., & Mahadevan, M. S. (2015). TWEAK/Fn14, a pathway and novel therapeutic target in myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, *24*(7). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu617>
- Yoshida, T., & Delafontaine, P. (2020). Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Cells*, *9*(9). <https://doi.org/10.3390/cells9091970>
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*, *318*(5858). <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
- Zhang, B.-W., Cai, H.-F., Wei, X.-F., Sun, J.-J., Lan, X.-Y., Lei, C.-Z., Lin, F.-P., Qi, X.-L., Plath, M., & Chen, H. (2016). miR-30-5p Regulates Muscle Differentiation and

Alternative Splicing of Muscle-Related Genes by Targeting MBNL. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2). <https://doi.org/10.3390/ijms17020182>

Zhang, F., Bodycombe, N. E., Haskell, K. M., Sun, Y. L., Wang, E. T., Morris, C. A., Jones, L. H., Wood, L. D., & Pletcher, M. T. (2017). A flow cytometry-based screen identifies MBNL1 modulators that rescue splicing defects in myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, 26(16). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx190>

Zhou, L., Sheng, W., Jia, C., Shi, X., Cao, R., Wang, G., Lin, Y., Zhu, F., Dong, Q., & Dong, M. (2020). Musashi2 promotes the progression of pancreatic cancer through a novel ISYNA1-p21/ZEB-1 pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(18). <https://doi.org/10.1111/jcmm.15676>

Zu, T., Gibbens, B., Doty, N. S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M. D., Margolis, J., Peterson, M., Markowski, T. W., Ingram, M. A. C., Nan, Z., Forster, C., Low, W. C., Schoser, B., Somia, N. v., Clark, H. B., Schmechel, S., Bitterman, P. B., Gourdon, G., ... Ranum, L. P. W. (2011). Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1). <https://doi.org/10.1073/pnas.1013343108>

-Anexos-

-Anexos-

-Artículo 1-



Increased Muscleblind levels by chloroquine treatment improve myotonic dystrophy type 1 phenotypes in in vitro and in vivo models

Ariadna Bargiela^{a,b,c,1}, Maria Sabater-Arcis^{a,b,c,1}, Jorge Espinosa-Espinosa^{a,b,c}, Miren Zulaica^{d,e}, Adolfo Lopez de Munain^{d,e,f,g}, and Ruben Artero^{a,b,c,2}

^aTranslational Genomics Group, Incliva Health Research Institute, 46010 Valencia, Spain; ^bInterdisciplinary Research Structure for Biotechnology and Biomedicine, University of Valencia, 46100 Valencia, Spain; ^cPríncipe Felipe Research Center–Incliva Health Research Institute, 46010 Valencia, Spain; ^dNeuroscience Area, Instituto Biodonostia, 20014 San Sebastian, Spain; ^eCenter of Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Ministry of Science, Innovation and University, 28031 Madrid, Spain; ^fDepartment of Neurology, Hospital Universitario Donostia, 20014 San Sebastian, Spain; and ^gDepartment of Neurosciences, School of Medicine and Nursing, University of the Basque Country, 20014 San Sebastian, Spain

Edited by David E. Housman, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, and approved October 24, 2019 (received for review November 29, 2018)

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a life-threatening and chronically debilitating neuromuscular disease caused by the expansion of a CTG trinucleotide repeat in the 3' UTR of the *DMPK* gene. The mutant RNA forms insoluble structures capable of sequestering RNA binding proteins of the Muscleblind-like (MBNL) family, which ultimately leads to phenotypes. In this work, we demonstrate that treatment with the antiautophagic drug chloroquine was sufficient to up-regulate MBNL1 and 2 proteins in *Drosophila* and mouse (HSA^{LR}) models and patient-derived myoblasts. Extra Muscleblind was functional at the molecular level and improved splicing events regulated by MBNLs in all disease models. In vivo, chloroquine restored locomotion, rescued average cross-sectional muscle area, and extended median survival in DM1 flies. In HSA^{LR} mice, the drug restored muscular strength and histopathology signs and reduced the grade of myotonia. Taken together, these results offer a means to replenish critically low MBNL levels in DM1.

chloroquine | myotonic dystrophy | muscleblind | therapy

The autosomal dominant disorder myotonic dystrophy type 1 (DM1) is the most prevalent adult-onset muscular dystrophy. DM1 is characterized by severe neuromuscular defects, including myotonia and progressive muscle weakness and wasting (atrophy), leading to disability as the disease progresses, and respiratory distress either from primary muscle failure or from cardiopulmonary complications. DM1 is also characteristically multisystemic and degenerative, affecting body systems such as the heart and the brain (1). Several candidate therapies have been tested in DM1 models but none has reached clinical practice (2) revealing a need to find new drugs against DM1.

The molecular basis of the disease is the pathogenic expansion of an unstable CTG microsatellite in the 3' UTR of the *DM1 protein kinase (DMPK)* gene. Transcripts containing expanded repeats form double-stranded structures that accumulate in cell nuclei as ribonuclear foci (3). Mutant *DMPK* interferes with 2 Muscleblind-like families of proteins that regulate alternative splicing (MBNL1 and MBNL2), with overlapping patterns of expression in skeletal muscle, heart, and central nervous system (CNS), and the CUGBP Elav-like family member 1 (CELF1), a MBNL antagonistic regulator of alternative splicing (AS) that also regulates transcription and translation (4). In affected tissues the MBNL1 and 2 functions are reduced by aberrant binding to CUG expansions, while CELF1 is activated due to increased stabilization because of hyperphosphorylation (5). MBNL proteins are developmental sensors, so MBNL depletion maintains fetal AS patterns in adults that become unfit proteins, giving rise to specific symptoms such as myotonia, muscle weakness, insulin resistance, or cardiac conduction defects (6–8). MBNL proteins control RNA metabolism in additional ways, including fetal-to-

adult polyadenylation patterns, stability, differential localization of mRNAs, and miRNA biogenesis (9–12).

Limited availability of MBNL1 and MBNL2 is a primary contributor to DM1 phenotypes. Loss of *MBNL1* function accounts for more than 80% of missplicing events and nearly 70% of expression defects in a murine model that expresses 250 CTG repeats in the context of human skeletal actin (HSA^{LR}; refs. 13 and 14). Furthermore, overexpression of MBNL1 rescues aberrant AS of muscle transcripts and myotonia in HSA^{LR} mice (15). *Mbnl1*^{-/-} *Mbnl2*^{+/-} animals consistently reproduce cardinal aspects of DM1, while *Mbnl2* knockout (KO) mice or ones that express CUG repeats reproduce CNS phenotypes typical of the disease (16, 17). MBNL1 overexpression is well tolerated in skeletal muscle in mice, and early and long-term overexpression prevents myotonia, myopathy, and AS alterations in DM1 mice (18). Thus, contrary to most genetic diseases in which the phenotypes originate from loss- or gain-of-function mutations in a given gene, most molecular DM1 alterations stem from the depletion of

Significance

In this work, we report the use of chloroquine as a treatment against myotonic dystrophy type 1 (DM1), a neuromuscular disease caused by expanded CUG repeats with no available effective treatment. We tested the effect of the drug in 2 different animal models of the disease, *Drosophila* and mouse, and also in human-derived myoblasts. We demonstrate that chloroquine treatment was able to upregulate Muscleblind levels. These proteins are a key component in the pathogenic mechanism of the disease, as they are sequestered by mutant RNA expressing expanded CUG repeats, and are thus deprived of their normal function. Moreover, we observed that Muscleblind boosting was functional, detecting amelioration of disease-related phenotypes in all 3 models at molecular, cellular, and physiological levels.

Author contributions: A.B. and R.A. designed research; A.B. and M.S.-A. performed research; M.Z. and A.L.d.M. contributed new reagents/analytic tools; A.B., M.S.-A., and J.E.-E. analyzed data; and A.B., M.S.-A., and R.A. wrote the paper.

Competing interest statement: The method described in this paper is the subject of a patent application (inventors: A.B., R.A.), M.S.-A., J.E.-E., M.Z., and A.L.d.M. declare no competing interests.

This article is a PNAS Direct Submission.

Published under the PNAS license.

Data deposition: RNA-sequencing data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> (accession no. GSE128844).

¹A.B. and M.S.-A. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. Email: ruben.artero@uv.es.

This article contains supporting information online at <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1820297116/-/DCSupplemental>.

First published November 21, 2019.

MBNL1 and 2 proteins, which remain encoded in perfectly functional genes. From the therapeutic perspective, this is a particularly favorable situation because protein depletion can be compensated with extra endogenous expression, which will also antagonize excessive CELF1 activity. We have pioneered this approach by identifying *miR-23b* and *miR-218* as translational repressors of all transcript isoforms originated from MBNL1 and 2 genes. *miR-23b* and *miR-218* antagonists raise MBNL1 and 2 protein expression in skeletal muscles and improve DM1-like phenotypes (19). We previously reported abnormal hyperactivation of autophagy in *Drosophila* and cell models of disease and that inhibiting autophagy restored muscle mass and function in *Drosophila* (20). This led to the hypothesis that autophagy inhibitory drugs could rescue muscle atrophy in vivo. Chloroquine (CQ) is a well-characterized autophagy blocker so we tested its ability to improve muscle function in *Drosophila* and mouse models. Subsequent studies led to the discovery that CQ increases Muscleblind levels in a *Drosophila* model, in patient-derived myoblasts, and in a DM1 murine model, to a sufficient extent to significantly improve various molecular and functional phenotypes associated with the disease.

Results

Autophagy Blocker CQ Rescues CUG RNA Toxicity in Model Fly Muscle.

We used a *Drosophila* model that expresses 480 noncoding CTG repeats throughout the somatic musculature (*Mhc-Gal4 UAS-(CTG)480/+*) (21). One-day-old adult flies were transferred to tubes containing standard medium supplemented with 10 or 100 μM CQ for 7 d and were compared to DM1 flies taking no drugs and normal controls. Autophagy was detected in somatic muscles of DM model flies using LysoTracker (SI Appendix, Fig. S1 A and B). A strong signal was observed in flies that expressed expanded CTG repeats during myogenesis compared to the controls. These data indicate an abnormal increase of autophagy in muscles expressing toxic RNA, as similarly reported following heat-shock induction of expanded CTG repeats in adult flies (20). We studied caspase-3 and caspase-7 activity and observed no effect on apoptosis levels after CQ treatment. Thus, autophagy block was not compensated by extra activation of apoptosis (SI Appendix, Fig. S1 C).

Muscle mass loss is a characteristic phenotype of DM1 patients that model flies clearly reproduce (20). Thus, we studied the effect of CQ treatment on muscle atrophy. We first measured muscle area of indirect flight muscles (IFMs) of untreated DM1 flies and model flies fed with food supplemented with 10 or 100 μM CQ (Fig. 1 A–D). Whereas no effect over the IFM cross-sectional muscle area was detected in control flies at any concentration of the drug (SI Appendix, Fig. S1 D–F), sections of model flies showed a significantly reduced IFM area that reached $\sim 50\%$ of normal controls. Interestingly, 7-d oral administration of 10 or 100 μM CQ to adult DM1 flies showed a 1.2 and 1.13-fold increase of muscle area, respectively. Therefore, CQ administration to adult flies that already had a 50% reduction in IFM muscles managed to rescue around 25% of the muscle area, clearly indicating a muscle homeostasis contribution to the atrophic phenotype. To test whether increased muscle area correlated to improved functional locomotion, we studied the climbing and flying ability (Fig. 1 E and F). DM1 flies have reductions of 22 and 58% in climbing and flight capacity, respectively. Both phenotypes were significantly rescued upon CQ administration. Furthermore, DM1 patients have reduced life expectancy due to, among other symptoms, muscle wasting and cardiac conduction defects (22). Model flies reproduce this phenotype with a median survival of 6 d compared to normal controls that have a 6.5-fold higher survival (Fig. 1 G). Chronic CQ administration was sufficient to significantly increase mean life and also extend maximal lifespan of DM1 flies at the lowest dose of CQ. Taken together these observations confirm that

autophagy blocker CQ rescues muscle degeneration and muscle function and manages to extend the lifespan of DM1 model flies.

CQ Enhances Muscleblind Expression in DM1 Fly Muscles. Considering the critical role of the MBNL proteins in the pathogenesis of DM1, and the possibility that autophagy directly contributes to low MBNL levels by promoting its degradation, we decided to quantify *Drosophila* Muscleblind (Mbl) in CQ-treated flies. We initially measured *mbl* transcript levels and normalized expression relative to *Rp49* (Fig. 1 H). Results revealed a 3-fold decrease of *mbl* in DM1 flies, and these levels were partially restored, in a dose-dependent manner, upon CQ administration. To confirm that the increase was in somatic muscle, we normalized *mbl* expression relative to *mhc*, which encodes a sarcomeric component highly specific of somatic muscle (23) (SI Appendix, Fig. S1 G). This normalization further supported the finding that CQ intake enhanced *mbl* levels in somatic muscle. Mbl protein was around 7 times lower in DM1 flies than in controls, and these levels were partially restored after a 7-d CQ treatment (Fig. 1 I). Moreover, we confirmed that Mbl overexpression was CTG repeat dependent. No effect on Mbl levels was observed after CQ treatment of control flies, thus suggesting that up-regulation of Mbl by CQ in DM1 model flies required activation of autophagy by CUG RNA (SI Appendix, Fig. S1 H). To investigate whether CQ directly bound CUG repeats, we tested whether the drug had any effect on CUG thermal stability using differential scanning fluorimetry (DSF; ref. 24). The DSF method reports not only RNA structure stability but also its modulation by RNA-binding ligands. We found that in the presence of CQ there was no significant change in fluorescence or the melting temperature of the CUG probe, which indicates the temperature at which 50% of the RNA is unfolded (SI Appendix, Fig. S2). These data indicate that the mechanism by which Mbl accumulates in CQ-treated muscles is not due to the direct binding of CQ to expanded CUG repeats.

We sought independent validation of Mbl expression data in DM1 *Drosophila* muscles by immunofluorescence of adult thoraces (Fig. 1 J–M). In control flies, we observed a neat signal with a regular transversal banding pattern spanning throughout the IFM fiber width, in agreement with previous reports that localized Mbl in sarcomeric H and Z bands (25). In DM1 fly muscles the signal was greatly reduced, and the banding pattern was obviously disrupted while the protein accumulated in the cell nuclei. In contrast, muscles from treated flies resembled controls in terms of Mbl immunofluorescence intensity and distribution to sarcomeric bands.

It is well known that Mbl regulates AS and transcription of hundreds of mRNAs (12, 14). The boost in Mbl conferred by CQ treatment was enough to reestablish *Serca* exon 13 inclusion in a dose-dependent manner, which achieved values similar to those in control flies at the highest concentration (Fig. 1 N). We also demonstrated that a reduction of around 50% in the expression of *Cyp6w1* and *Amy-d*, both Mbl dependent, was completely rescued upon 100 μM CQ treatment (Fig. 1 O and P).

CQ Improves DM1-Like Phenotypes in Immortalized Patient-Derived Myoblasts.

It was previously demonstrated that autophagy was abnormally up-regulated in DM1 myoblasts that express expanded CUG repeats (20, 26). We treated immortalized patient-derived myoblasts (iPDMs) (27) differentiated for 4 d with CQ at concentrations ranging from 0.1 to 10 μM (well below toxic concentration 10, meaning the dose produces a toxic effect in 10% of the population [TC10], to rule out any nonspecific effects related to toxicity; SI Appendix, Fig. S3 A). CQ blocks late-stage autophagy by decreasing autophagosome–lysosome fusion, resulting in the accumulation of proteins involved in previous steps in this pathway, such as LC3 (28). We detected LC3 signal and observed a diffuse pattern in immortalized control-derived myoblasts (iCDMs) while strong puncta formation was detected in iPDMs as a consequence of increased autophagic activity (20).

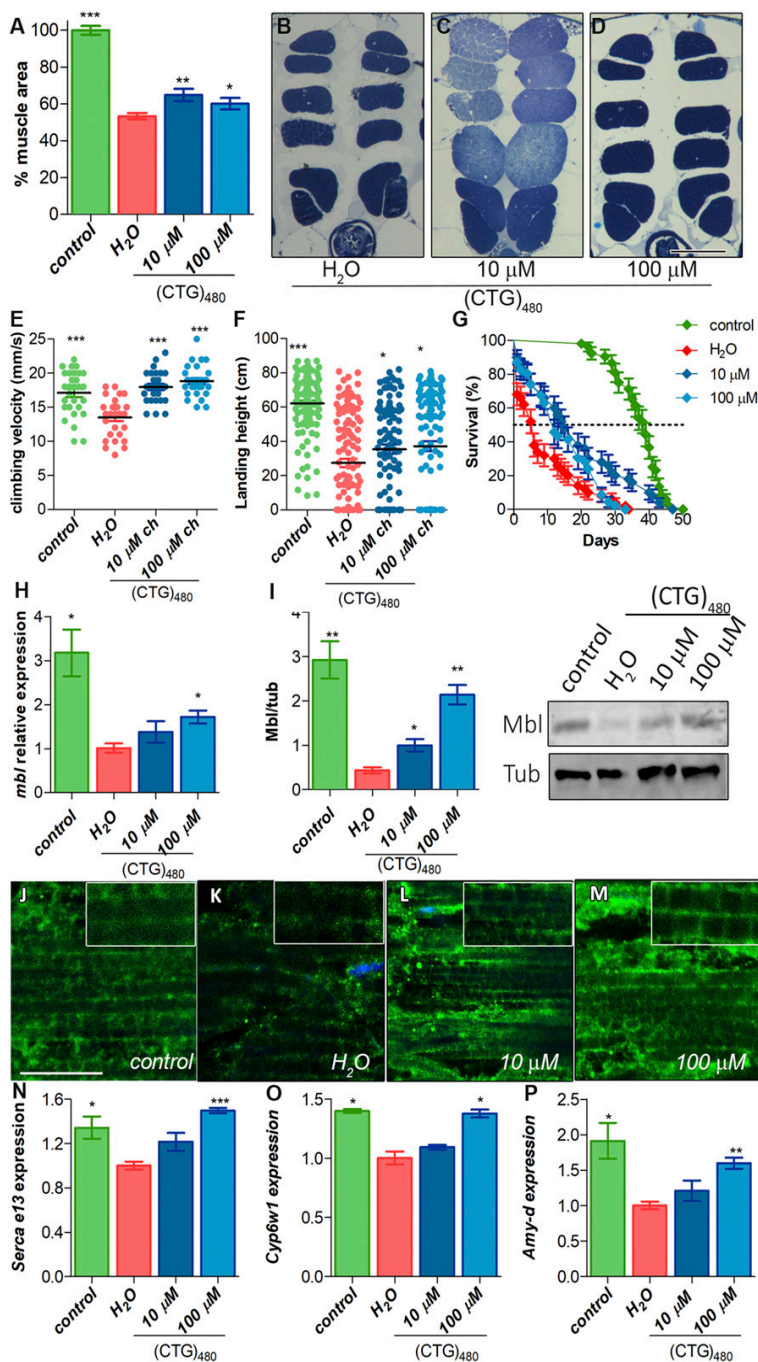


Fig. 1. CQ treatment rescues DM1-like phenotypes in model flies by *Muscblind* up-regulation. (A) Relative quantification of the mean percentage of muscle area per condition ($n = 6$). (B–D) Representative dorsoventral sections of resin-embedded thoraces of DM1 [*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)₄₈₀*] flies treated with the indicated concentrations of CQ or vehicle. (Scale bar, 100 μm.) (E) Quantification of climbing velocity as mean of speed \pm SEM ($n = 30$) comparing control ability (*Mhc-Gal4/+*; green), DM1 (red), and DM1-treated flies (blue). (F) Graphs of flight assays represent the average landing distance reached by the different experimental groups ($n = 100$). (G) Survival curves expressed as percentages ($50 < n < 80$). (H) RT-qPCR amplification of *muscblind* from control (green) and DM1 flies (red) treated with CQ (blue bars) after normalization to *rp49*. (I) Graphs and representative blot image of *Muscblind* immunodetection. α -Tubulin protein expression was used as an endogenous control. (J–M) Representative confocal images of longitudinal sections of IFMs showing anti-Mbl staining (green) in control (J), untreated DM1 flies (K), and DM1-treated flies (L and M). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). All stainings were performed in parallel and images were acquired using the same settings. (Scale bar, 10 μm.) RT-qPCR analysis to quantify expression of *Serca* exon 13 (N), *Cyp6w1* (O), and *Amy-d* (P) relative to *Rp49* in the indicated conditions ($n = 3$). All comparisons refer to untreated DM1 flies (H₂O in the graphs). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ according to Student's *t* test.

A similar signal was observed after 0.1 and 1 μM CQ treatment. However, in cells treated with the highest concentration of CQ, a dramatic increase in the signal was detected, thus confirming an effective blockade of autophagic flux (Fig. 2 A–E). We also analyzed foci number and area in immortalized patient-derived fibroblasts (iPDFs) treated with CQ. (SI Appendix, Fig. S4). In our laboratory conditions, neither of the CQ concentrations (1 and 10 μM) had any effect on ribonuclear foci number or area. MBNL1 sequestration by expanded CUG RNA, however, was significantly rescued according to double immunofluorescence and in situ hybridization data. While we detected dense aggregates of MBNL1 in RNA foci in iPDMs under control conditions, sequestration of MBNL1 was markedly attenuated by CQ as observed in colocalization studies (Fig. 2 F and G and SI Appendix, Fig. S4). Quantitatively, CQ reduced the average percentage of colocalization of MBNL1 and CUG by 35 and 42% at increasing concentrations of CQ. Importantly, we confirmed that *DMPK* transcript levels remained unchanged after the treatment (Fig. 2H), which was also confirmed by RNA sequencing (RNA-Seq) data (7.35 ± 0.06 , 7.36 ± 0.06 , 7.39 ± 0.02 , counts per million for untreated iPDMs, or treated with 0.1 or 10 μM CQ, respectively). iPDMs were reported to have impaired fusion capacity in vitro (27). This parameter was specifically quantified in iPDMs differentiated for 7 d and stained for Desmin, which is a marker of

terminally differentiated myoblasts (Fig. 2 I–O). iPDM fusion index was about 50%, and myotube diameter about 15%, of normal values (Fig. 2 I and J). Exposure of cells to a range of CQ concentrations did not affect the diameter of the myotubes but strongly rescued fusion index. These data suggest improved differentiation capacity in DM1 cells after CQ treatment.

Given our results in the fly model where CQ enhanced Mbl expression, we hypothesized that improvements observed in iPDM could originate from increased MBNL protein levels. MBNL1 and 2 were detected by immunofluorescence in myoblasts differentiated for 4 d (Fig. 3 A–H). In iPDM cells, we found that MBNL1 and 2 expression was substantially lower than in iCDMs, and that the proteins were mainly detected in ribonuclear foci. CQ treatment had a profound and dose-dependent effect on the expression of both proteins and their distribution, which at the highest concentration approached a normal pattern. Importantly, although MBNL proteins were still detected in nuclear foci, they were also broadly dispersed in both cell compartments. Note that MBNL2 increased to similar levels in both the cell nucleus and cytoplasm of treated iPDMs, whereas in iCDMs its expression was mainly cytoplasmic. To confirm these results, we immunodetected MBNL1 and MBNL2 in 2 additional CDM and 2 PDM lines. From these, 1 contained 1,000 and the other 333 CTG repeats (SI Appendix, Fig. S5). Consistently, we observed increased signal in the nucleus

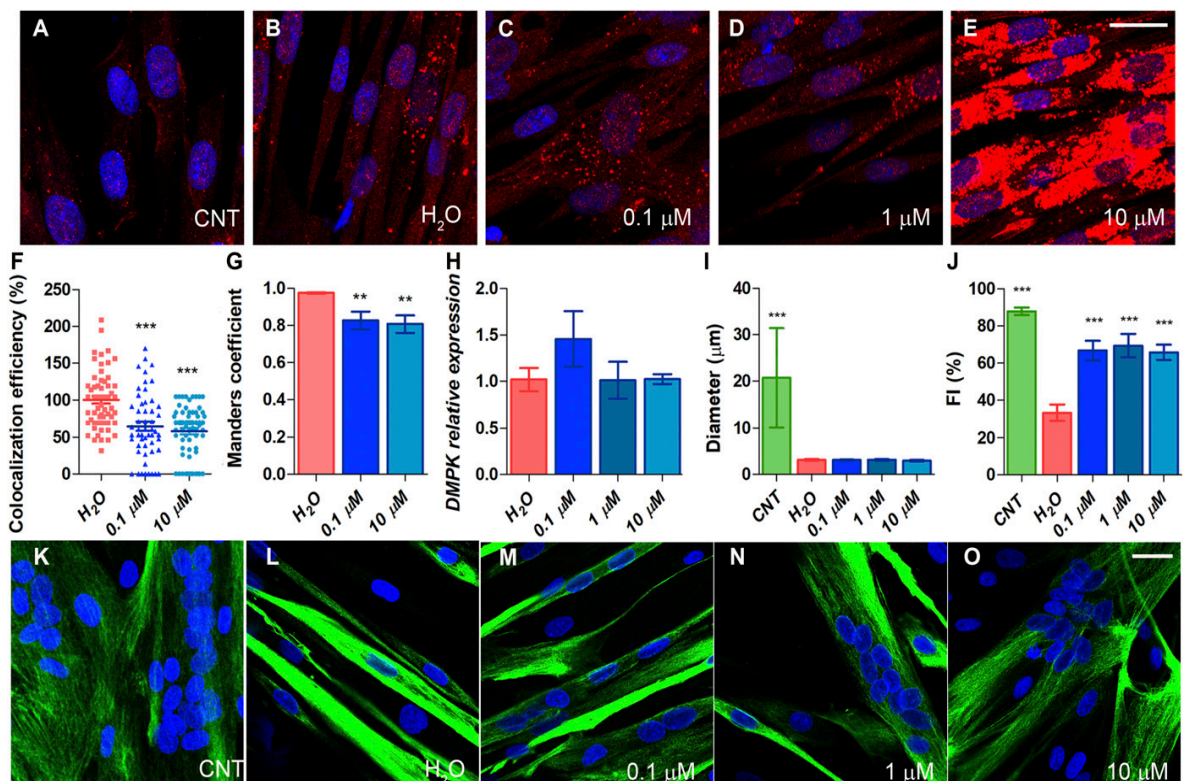


Fig. 2. CQ treatment of DM1 iPDMs improves phenotypes. (A–E) Fluorescence images of LC3 immunostaining (red) of iCDMs (control [CNT]) (A) and iPDMs (B) differentiated for 96 h and treated with vehicle or CQ (C–E) for 48 h (Scale bar, 20 μm). (F–G) Analysis of colocalization efficiency (F) and Manders' coefficient (G) between MBNL1 and CAG, in iPDMs treated with CQ 0.1 and 10 μM . Colocalization efficiencies were normalized to untreated iPDMs (H_2O) and data were expressed as percentage (%) in the case of colocalization efficiency. Between 50 and 60 nuclei were analyzed. (H) RT-qPCR analysis to quantify expression of *DMPK* relative to *GAPDH* in iPDMs after CQ treatment ($n = 3$). (I–J) Quantification of myotube diameter and myogenic fusion index of iCDMs (green) and untreated iPDMs (red) and iPDMs treated with CQ (blue) ($n = 7$ to 10 images per condition). (K–O) Representative confocal images of Desmin-immunostained (green) human myoblasts transdifferentiated for 7 d used for quantifications in I and J. Staining was performed in iCDMs (K), and iPDMs untreated (L) or treated with CQ (M–O) for 48 h. (Scale bar, 1,000 μm .) Nuclei were counterstained with DAPI (blue). $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ according to Student's *t* test. All comparisons refer to untreated iPDMs (H_2O in the graphs).

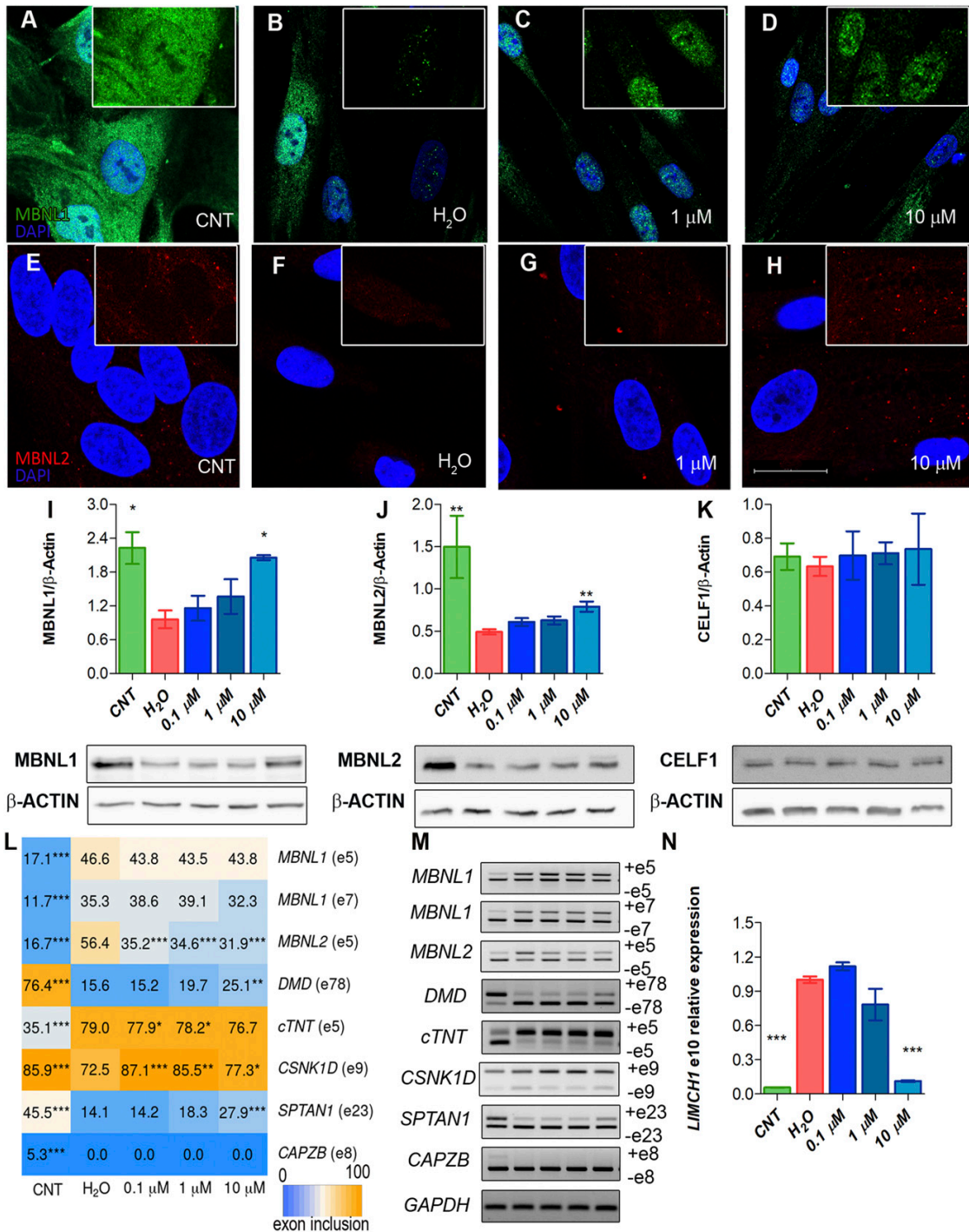


Fig. 3. MBNL1 and MBNL2 are overexpressed upon CQ treatment of iPDMs. (A–H) Representative confocal images of MBNL1 (green) and MBNL2 (red) immunostaining in iCDMs (control [CNT]) (A and E), untreated iPDMs (B and F), and iPDMs treated with CQ (C, D, G, and H). Nuclei were counterstained with DAPI. (Scale bar, 20 μ m.) (I–K) Western blot quantification and representative blot images of MBNL1 (I), MBNL2 (J), and CELF1 (K) in iCDMs (green bar) and untreated (red bar) or CQ-treated iPDMs (blue bars). β -ACTIN expression was used as an endogenous control. (L) Heatmap representing the quantification of splicing decisions altered in iPDMs. Numbers within the boxes indicate the percentage of inclusion of the indicated exons obtained by semiquantitative RT-PCR. (M) Representative gels used to quantify in L. Percentage of CELF1-regulated CAPZB exon 8 inclusion was determined as a control. (N) RT-qPCR to measure exon 10 inclusion of LIMCH1. GAPDH was used as an internal control. In all analyses, sample size was $n = 3$, with the exception of MBNL2 Western blot with $n = 6$. Cells were differentiated for 96 h. All comparisons refer to untreated iPDMs (H₂O in the graphs). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ according to Student's t test.

for MBNL1 and in the cytoplasm for MBNL2 in a dose-dependent manner after CQ treatment of iPDMs.

Quantification of MBNL1 and 2 levels demonstrated an increase of up to 100% and 65%, respectively, after the addition of CQ at the indicated concentrations (Fig. 3 I and J). To test whether CQ might have a nonspecific targeted ability to up-regulate protein levels, CELF1 was quantified in parallel experiments and no significant changes were found (Fig. 3K). At the functional level, the CQ-induced MBNL1 increase was sufficient to rescue the inclusion of *MBNL2* exon 5, *DMD* exon 78, and *cTNT* exon 5, which are altered in DM1 (Fig. 3 L and M and *SI Appendix*, Fig. S6). However, no effect was detected in the MBNL1 inclusion pattern of exons 5 and 7 that are dependent on MBNL1 levels (29). In the case of the inclusion of *SPTAN1* exon

23 and *LIMCH1* exon 10, regulated by MBNL2 (16), both were significantly rescued at the highest dose. Exon regulation of *CSNK1D*, a target of MBNL2, was restored at the 3 tested CQ concentrations (Fig. 3 L–N). The splicing of *CAPZB*, regulated by CELF1, was also analyzed, and no changes were detected in its exon inclusion (Fig. 3 L and M). CQ therefore not only enhanced MBNL1 and 2 expression levels in iPDMs but rescued its sub-cellular distribution and molecular function as an AS regulator, thus supporting its potential as a therapy against DM1.

To shed light into the reason why MBNL protein levels went up upon CQ treatment, we performed double staining with LysoTracker and antibodies against MBNL1 or 2 and quantified colocalization of both signals by calculating Manders' colocalization coefficient and colocalization efficiency, to determine how

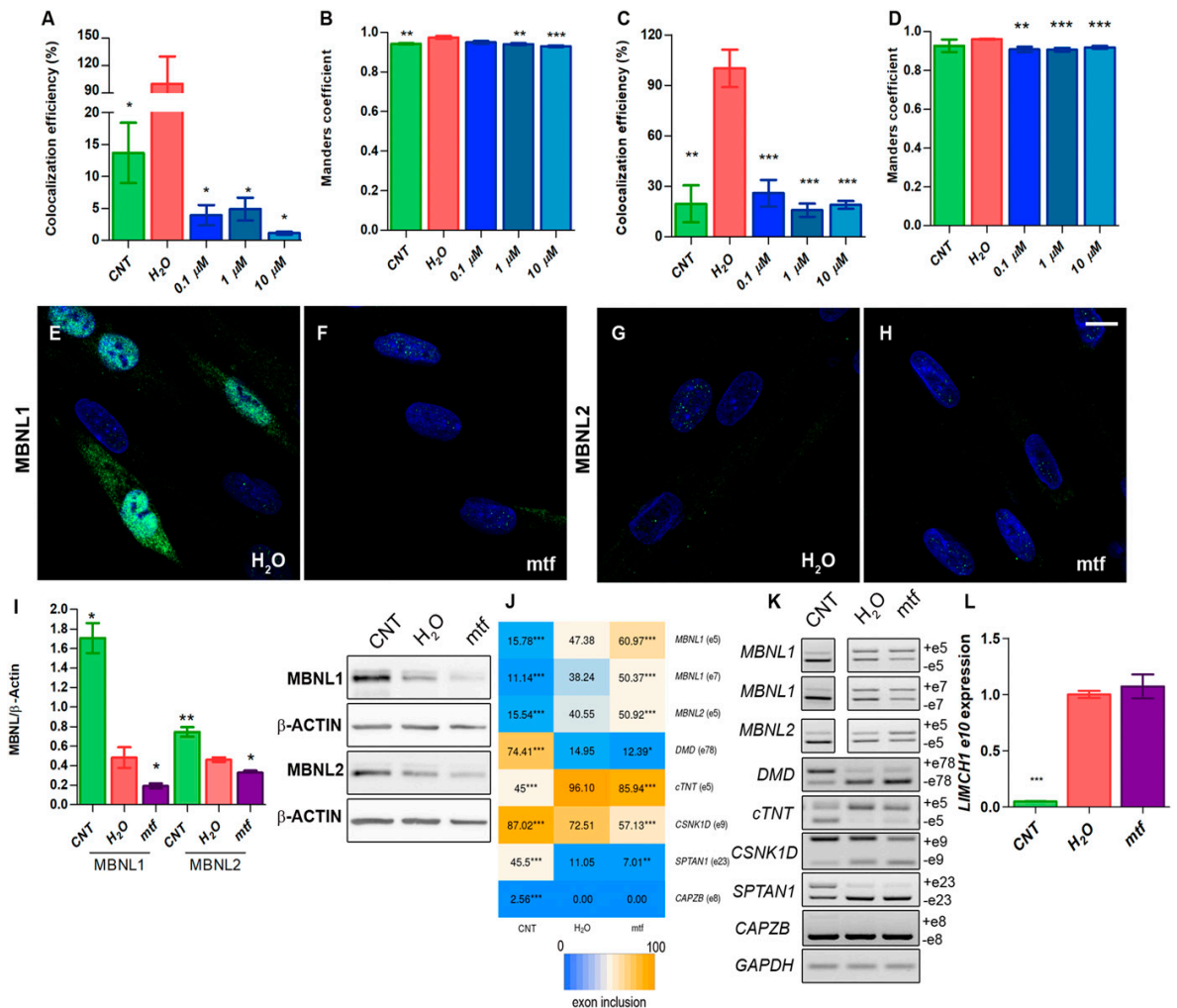


Fig. 4. Overexpression of MBNLs by CQ is mediated by autophagy blockade in iPDMs. (A–D) Colocalization efficiency and Manders' coefficient between MBNL1/LysoTracker (A and B) and MBNL2/LysoTracker (C and D). Colocalization efficiencies were normalized to untreated iPDMs (H₂O) and data were expressed as percentage (%). No less than 70 nuclei were analyzed. (E–H) Representative confocal images of MBNL1 and MBNL2 (green) immunostaining in untreated iPDMs (E and G) or treated with mtf (F and H). Nuclei were counterstained with DAPI. (Scale bar, 10 μ m.) (I) Western blot quantification and representative blot images of MBNL1, MBNL2, and β -ACTIN in iCDMs (control [CNT]; green bar), and untreated (H₂O; red bar) or mtf-treated iPDMs (mtf; purple bar). β -ACTIN expression was used as an endogenous control. (J) Heatmap representing the analysis of splicing decisions altered in iPDMs and worsened after mtf treatment. Numbers within boxes indicate the percentage of inclusion of the indicated exons obtained by semiquantitative RT-PCR. (K) Representative gels used to quantify in J. Percentage of CELF1-regulated *CAPZB* exon 8 inclusion was determined as a control. (L) RT-qPCR to analyze exon 10 inclusion of *LIMCH1*. *GAPDH* was used as an internal control. In all analyses sample size was $n = 3$ and cells were differentiated for 96 h. All comparisons refer to untreated iPDMs (H₂O in the graphs). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ according to Student's t test.

much and how well the fluorescent signals overlapped (Fig. 4A–D and *SI Appendix*, Fig. S7). Importantly, we observed 5 times more colocalization of MBNL1 or 2 with LysoTracker in iPDMs compared to levels detected in iCDMs. These values were dramatically reduced after CQ treatment of iPDMs, which demonstrated that CQ promotes MBNL release from the autophagic pathway preventing degradation and increasing protein levels.

Chemical Induction of Autophagy Worsens DM1-Linked Phenotypes in Human Muscle Cells. To confirm that therapeutic effects observed upon CQ treatment were mediated by MBNL levels through modulation of autophagy, we evaluated the effects of further enhancing autophagy in iPDMs. To this end, we treated cells with 30 mM metformin (mtf), which activates AMPK and consequently leads to autophagy activation via both mTOR inhibition and ULK1 activation (30). After adding mtf, we detected a dramatic decrease in the MBNL1 signal compared to untreated iPDMs. Quantification of the protein by Western blot showed a reduction of 60% after autophagy induction (Fig. 4E, F, and I). Down-regulation of MBNL2 was not obvious by immunostaining, but Western blot demonstrated a reduction of 35% (Fig. 4G–I). Analysis of defective-DM1 AS events regulated by MBNL1 and MBNL2 demonstrated that upon mtf treatment missplicing of most alternative exons was higher than in iPDMs treated with water (Fig. 4J–L and *SI Appendix*, Fig. S8), except for MBNL2-dependent *LIMCH1* exon 10 and *cTNT* exon 5 inclusion. Overall, we observed a tight correlation between MBNL levels and AS regulation. As a control, we analyzed CELF1-dependent splicing of *CAPZB*, and we did not observe any effect after mtf treatment.

CQ Treatment Recovers Expression of 59% of Disease-Related Transcripts in iPDMs. In order to have a comprehensive description of the consequences of CQ treatment on DM1-related gene regulation, we conducted paired-end RNA-Seq from iCDMs and untreated and treated (0.1 and 10 μ M CQ) iPDMs differentiated for 96 h (31). Bioinformatics analyses with edgeR software comparing iCDMs and untreated iPDMs identified 3,594 differentially regulated disease-related genes (DRGs). As observed in Fig. 5A there is a strong differential expression in transcripts between iCDMs and iPDMs. Importantly, after 10 μ M CQ treatment, the transcript expression profile of the samples is more similar to iCDMs than to iPDMs as indicated by dendrograms. From DRGs, almost 25% were recovered after low-dose treatment and this percentage reaches 59% after exposure to 10 μ M CQ (Fig. 5B and C). Altogether, we observed a strong correlation between CQ dose and effect on DRG recovery. A gene ontology (GO) enrichment test was also performed, considering all recovered genes in each treatment (% of recovery ranging from 10 to 110%). This test highlighted genes involved in several pathways related to muscle homeostasis and function (Fig. 5D and E). Considering RNA-Seq data, it is confirmed that the effects of the drug depend on its dose. Globally, our results demonstrate that restoration of muscle functions correlates to MBNL levels and also that CQ can be considered as a potential drug to treat DM1 patients.

CQ Raises Mbnl Expression and Ameliorates Molecular Phenotypes in a DM1 Murine Model. HSA^{LR} mice express 250 CTG repeats in the 3' UTR of the human skeletal actin and reproduce symptoms observed in patients, such as myotonia, splicing defects, and muscle atrophy (13, 32). We treated these mice with 2 different concentrations of i.p. CQ, 25 and 50 mg/kg for 7 d, and compared results with untreated HSA^{LR} controls and normal mice with the same genetic background (friend virus B [FVB]). First, we quantified HSA^{LR} transgene expression in the gastrocnemius and quadriceps muscles having previously discovered that fluctuations in transgene expression strongly influence phenotypic manifestations in these mice (19). In quadriceps, expres-

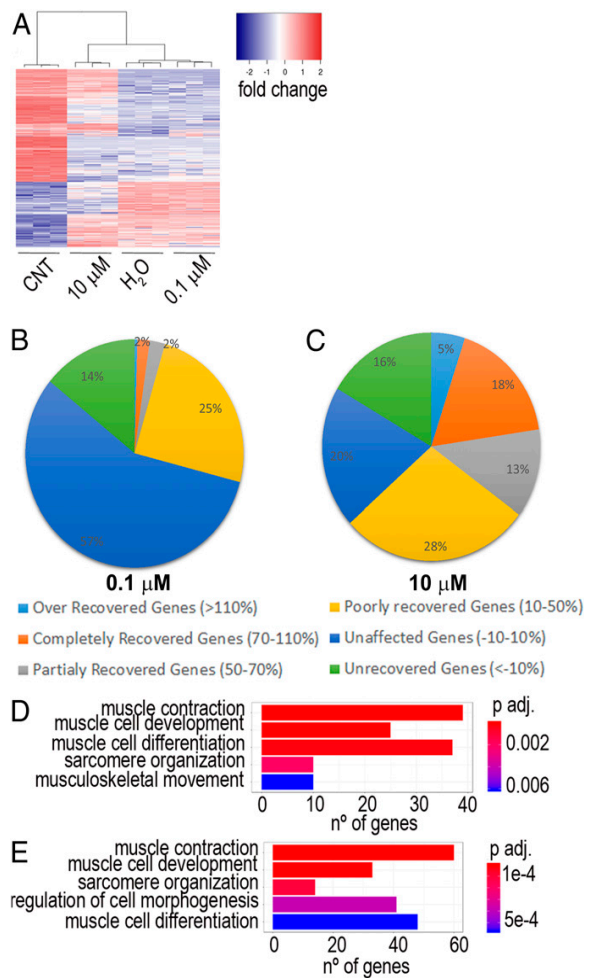


Fig. 5. Global effect of CQ on RNA expression. (A) Heatmap representing transcript expression at the indicated conditions. (B and C) Pie charts showing the percentage of recovery of DRGs after CQ treatment. (D and E) Bar plots based on GO analysis showing the principal biological processes affected by 0.1 μ M (D) and 10 μ M (E) CQ in DM1. CNT, control.

sion was fairly stable between control and experimental groups, with maximum variations around 2-fold above average. Gastrocnemius, in contrast, revealed bigger changes but toward greater expression of the transgene, which did not impede detection of the typical DM1 phenotypes in the model (*SI Appendix*, Fig. S9A).

Based on the significant increase of MBNLs in the DM1 fly model and in myoblasts, Mbnl1 and 2 levels were quantified in quadriceps and gastrocnemius. In the case of Mbnl1, despite a trend toward rising levels in drug-treated mice compared to vehicle-only controls (phosphate-buffered saline [PBS]), the differences did not reach statistical significance in either muscle (Fig. 6A and B). Mbnl2 expression in gastrocnemius, in contrast, did show a significant increase at the 2 tested doses while quadriceps levels remained stable at the low CQ dose and reached borderline significance ($P < 0.08$) at the highest (Fig. 6C and D). Additional Mbnl protein levels did not originate from extra transcription or enhanced stability since no changes were found at the mRNA level (*SI Appendix*, Fig. S9B and C). Importantly, Celf1 levels remained unchanged after the administration of the drug as similarly observed in the cell model of disease (Fig. 6E and F).

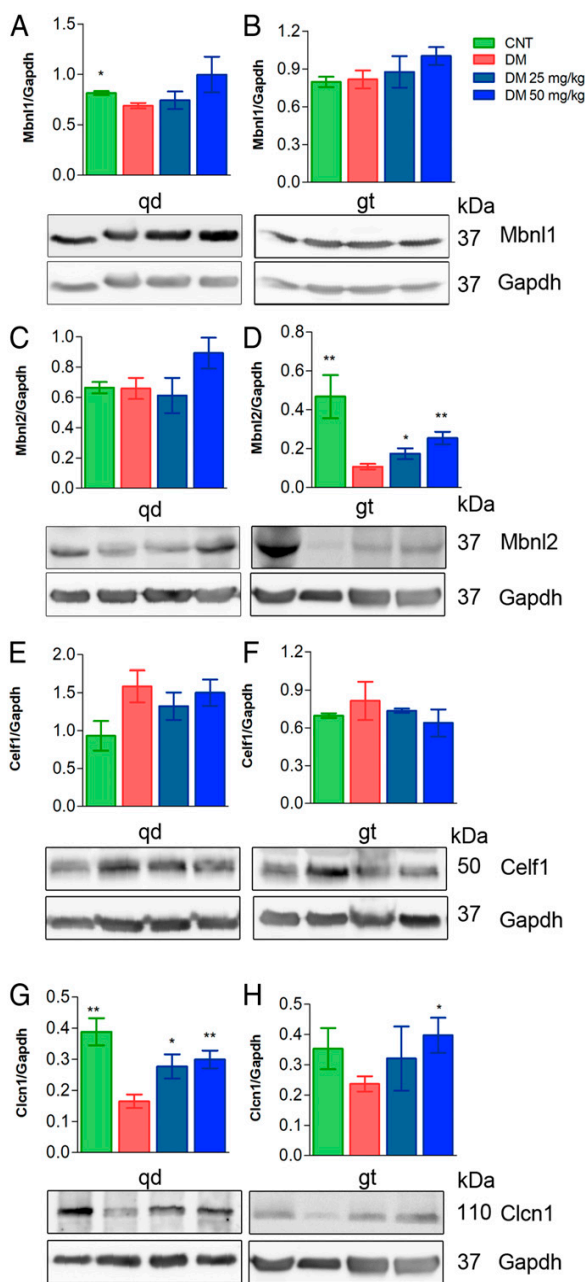


Fig. 6. Treatment of HSA^{LR} mice increases Mbnl1 and Mbnl2 levels. (A–H) Western blotting analyses of protein extracts from quadriceps (qd) (A, C, E, and G) or gastrocnemius (gt) (B, D, F, and H) of FVB control mice ($n = 4$, green bars), untreated HSA^{LR} model mice ($n = 6$, red bars), or model mice injected for 7 d with CQ at 25 mg/kg ($n = 3$, dark blue bars) or 50 mg/kg CQ ($n = 5$, pale blue bars). Protein levels are relative to Gapdh, which was used as an internal control. Representative blots used for quantification are shown below bar graphs. Because Cln1 and Mbnl2 proteins were detected in the same blots, the internal control Gapdh was the same (duplicated blot in D and H). All comparisons are relative to HSA^{LR} mice treated with the vehicle PBS (DM). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ according to Student's t test. CNT, control.

As we detected up-regulation of Mbnl proteins in vivo, we sought to analyze Mbnl-dependent splicing events relevant for HSA^{LR} phenotypes. Thus, we studied splicing pattern of *Nfix*,

Atp2a1, and *Cln1*, regulated by Mbnl1, and observed that CQ administered at 50 mg/kg significantly ameliorated aberrant exon choices for *Nfix* (exon 7). Of the splicing events regulated by Mbnl2, we analyzed *Add1*, *Clasp2*, *Spna2*, and *Limch1* (Fig. 7 A–C and *SI Appendix*, Fig. S10). All of the splicing events improved in the 2 muscles studied from treated HSA^{LR} mice, except for *Clasp2* and *Spna2* that did so only in gastrocnemius. To confirm the specificity of CQ toward Mbnl activity, we quantified the inclusion of *Capzb* exon 8, *Mfn2* exon 3, and *Ank2* exon 21, which depend on Celf1 (33, 34), and, consistent with previous results, remained unchanged upon CQ treatment (*SI Appendix*, Fig. S11). Considering the relevance of the myotonic phenotype in the disease and the fact that we could not detect significant changes in exon 7a inclusion in *Cln1* transcripts in our experimental conditions, we quantified Cln1 protein by Western blot. This confirmed down-regulation of Cln1 by 60% and 32% in quadriceps and gastrocnemius, respectively, in control HSA^{LR} compared to FVB. Importantly, these amounts were reestablished to normal levels upon CQ administration (Fig. 6 G and H). Thus, CQ seems to promote Cln1 protein levels through processes other than alternative splicing, being transcriptional control of Cln1 by SP1 (35) one potential mechanism.

Functional and Histopathological Improvements in CQ-Treated HSA^{LR} Mice. It has been proposed that muscular phenotypes in DM1 are partially caused by defects in AS, leading to developmentally inappropriate protein expression in adults (36, 37). Muscle weakness is widespread among patients, and HSA^{LR} (38) mice reproduce this phenotype in a variable, age- and sex-dependent manner. We measured the grip strength of the forelegs and observed that the HSA^{LR} mice had ~25% less force than the reference mice. This phenotype was reevaluated 7 d after the end of treatment, observing an improvement of ~50% in both groups of treated mice compared to controls (Fig. 7D). Another defining symptom of the disease is myotonia that was quantified by electromyography (EMG) using a 0 to 4 myotonic grade scale. EMG testing of the hindlegs showed that before treatment, HSA^{LR} mice had myotonic discharges in more than 80% of the electrode insertions. Four days after finishing the 7-d treatment with the drug, myotonia decreased from almost grade 3 to grade 2 or 1, indicating that myotonic discharges occurred in less than 50% of the insertions of the electrode (Fig. 7E). Interestingly, we found strong positive correlations between *Cln1* exon 7 inclusion and Cln1 levels and also with myotonia grade (*SI Appendix*, Fig. S12). Finally, centrally located nuclei is one of the most characteristic histopathological changes in DM1 muscle (39) and is an indication of myopathic muscle attempting to regenerate. We observed that untreated HSA^{LR} muscle fibers had 35% and 33% of central nuclei in quadriceps and gastrocnemius, respectively. After CQ injections this phenotype improved significantly in both muscles in a dose-dependent manner (Fig. 7F–J). Overall, these results confirm that molecular rescues brought about by CQ translate into an improvement of histological and functional phenotypes in HSA^{LR} animals.

Discussion

Several lines of evidence indicate that up-regulation of Muscleblind-like proteins is a valid therapeutic strategy against DM1 because MBNLs are reduced in DM1 models and patients, and transgenic overexpression did not have deleterious effects in murine models (15, 18, 40, 41). Three different epigenetic approaches have so far demonstrated the ability to up-regulate endogenous MBNL expression in mammalian models. Small molecule HDAC inhibitors ISOX and vorinostat increased MBNL1 expression in DM1 patient-derived fibroblasts (42) while phenylbutazone suppressed methylation of an enhancer region in Mbnl1 intron 1 (43). A third approach used antagonomiRs to block miRNAs that inhibit MBNL1 and 2 expression in skeletal muscle tissue (19). This study provides

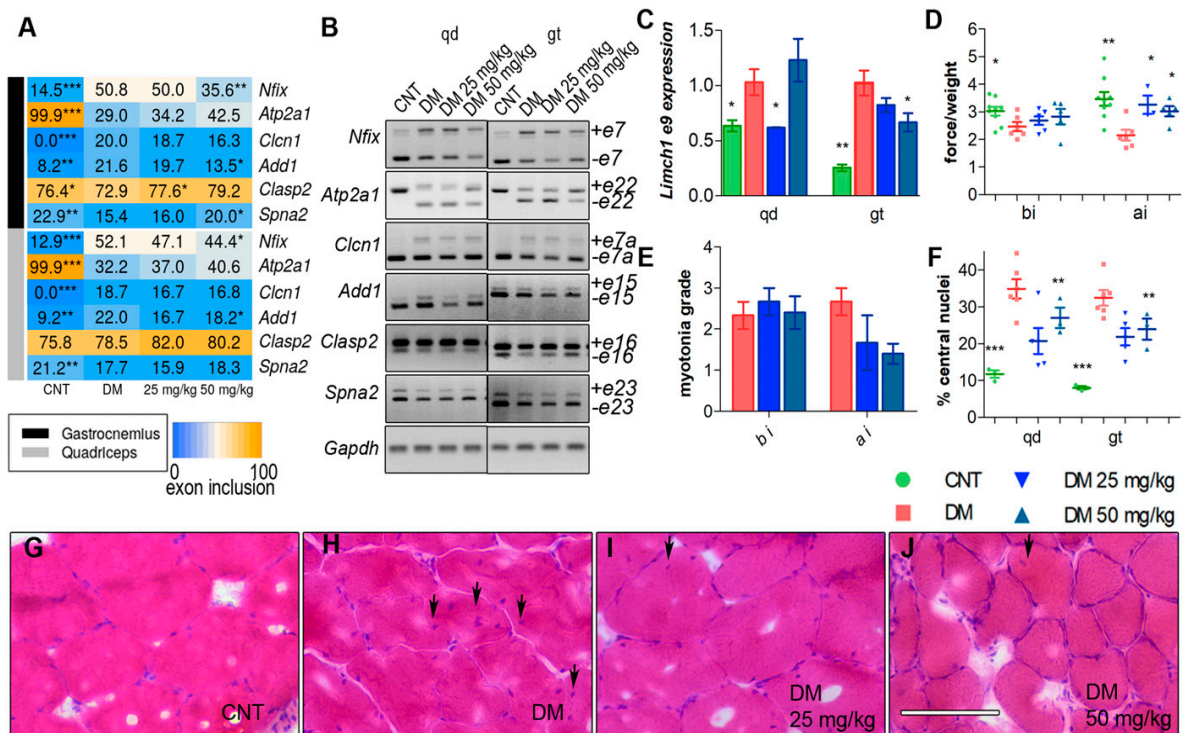


Fig. 7. Injection (i.p.) of CQ improves Mbnl-regulated splicing and muscle function and histopathology of HSA^{LR} mice. (A) Heatmap representing the analysis of splicing decisions altered in HSA^{LR} mice. The number in the boxes indicates the percentage of inclusion of the indicated exons obtained by semiquantitative RT-PCR. (B) Representative gels used to perform quantifications in A from quadriceps (qd) (Left) and gastrocnemius (gt) (Right) muscles. (C) RT-qPCR to analyze exon 9 inclusion of *Limch1*. *Gadph* values were used for normalization in the quantification of the percentage of exon inclusion. (D) Forelimb grip strength and (E) myotonia grade measured before injection (bi) and 7 d after the last dose (ai). All comparisons are relative to HSA^{LR} mice treated with the vehicle PBS (DM). (F) Quantification of the percentage of central nuclei in muscle fibers from qd and gt muscles. (G–J) Representative micrographs of muscle fibers stained with H&E and quantified in F. (Scale bar, 100 μ m). Experimental groups were control (CNT) (FVB; $n = 8$), DM (HSA^{LR}; $n = 6$), DM 25 mg/kg (HSA^{LR}; $n = 3$), and DM 50 mg/kg (HSA^{LR}; $n = 5$). All comparisons are relative to HSA^{LR} mice treated with the vehicle PBS (DM). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ according to Student's t test.

evidence that CQ can increase Muscleblind levels in 3 models of disease and that this increase translates into molecular and functional improvements in fly and mouse models.

CQ is a potent inhibitor of autophagy that works by blocking autophagosome fusion with lysosomes (28). Autophagy is a prosurvival mechanism that performs a housekeeping function in removing exhausted, redundant, or unwanted cellular components, but that when abnormally activated, results in cell death (44). It has been demonstrated that autophagy is hyperactivated in different DM1 models (20, 26, 45) and could also contribute to muscular atrophy, one of the most serious symptoms of the disease (46). It has been shown in an inducible model of DM1 that overexpression of *MblC*, an isoform of the *Drosophila* Muscleblind protein, was sufficient to reduce autophagy (20). Low levels of Muscleblind proteins may, therefore, play a contributory role in hyperactivation of autophagy. Conversely, CQ prevents autophagosomes with cargo from fusing with lysosomes, so that the cargo is not degraded. Consequently, by blocking autophagy disposal of MBNLs with CQ treatment, Muscleblind levels build up, as we have demonstrated with colocalization studies of LysoTracker and MBNL proteins. Extra MBNL, in turn, may further contribute toward repressing excessive autophagy in a virtuous positive feedback loop, as demonstrated by iPDM treatment with *mtf*. We observed that overactivation of autophagy resulted in dramatic MBNL1 and 2 down-regulation that worsened splicing defects. This may also explain the observation that HSA^{LR} was the most refractory of the DM1 models in MBNL1 or 2 increase, which is in line with the lack of autophagy

hyperactivation in this model compared to flies and iPDMs. In *Drosophila* Mbl activation also included small but significant up-regulation at the transcript level, which suggests that at least 2 pathways contribute to extra Mbl upon CQ treatment. It is important to note that CQ not only increased MBNL protein levels but also significantly, and dose-dependently, reduced colocalization with CUG RNA foci, as similarly reported for HSA^{LR} mice treated with phenylbutazone, which also increased endogenous levels of Mbnl1 (43). While the molecular basis for such an effect on the degree of colocalization remains unexplored, it indeed suggests an improved bioavailability of MBNL1 in the cell.

Mtf has been recently proposed as a potential anti-DM1 therapy (47, 48) and Bassez et al. (48) report that patients treated with *mtf* improved in the 6-min walk test. Because we detect down-regulation in MBNL levels upon treatment of iPDMs with *mtf*, we propose that this drug may work through alternative molecular pathways. In support of this notion, Laustriat et al. (47) studied splicing events dysregulated in human DM1 myoblasts and found a negligible effect by *mtf* (only inclusion of 4 out of 22 alternative exons were rescued). Remarkably, 1 of these splicing events was *cTNT* exon 5 inclusion, consistent with our own data. Furthermore, Laustriat et al. (47) did not study the effect of *mtf* on MBNL2 levels and regulated splicing events, in contrast with our data that found strong reduction of MBNL2 and worsening of MBNL2-dependent splicing. Therefore, the positive effects reported for *mtf* seem to stem from molecular rescues at levels other than MBNL protein amounts or activity. Taken together, the use of *mtf*, that reduces MBNL levels, CQ, that enhances

them, and DM1 and healthy controls, establishes 4 data points that nicely correlate with the inclusion of a number of alternative exons (*SI Appendix, Fig. S13*). Muscleblind levels increased 4-fold in *Drosophila* muscles and 3-fold in gastrocnemius in HSA^{LR} mice. The increase was more limited in human cells and in other mouse tissues, but nevertheless sufficient to improve missplicing and expression of genes regulated by Muscleblind in the 3 models used (14, 16, 49). It was reported by in vitro studies that MBNL1 targets exhibit dose dependency and require different amounts of MBNL1 for the half-maximal response (29). Splicing analyses of CQ-treated HSA^{LR} muscles revealed no changes in the pattern of *Atp2a1*, that in vitro requires lower levels of Mbnl1 than *Nfix*, which was significantly restored with CQ. Similar results were obtained when HSA^{LR} mice were treated with an antagoniR that up-regulated Mbnl1 (19). These data, therefore, revealed differing in vivo and in vitro susceptibility of splicing regulation by MBNL1 levels.

In model flies, CQ improved locomotor parameters and survival, phenotypes that had previously been shown to depend on Muscleblind levels (20, 41). The rescue was similar to previous results with an inducible *Drosophila* DM1 model where *MblC* overexpression was sufficient to increase the area of indirect flight muscles of model flies by 35% (24% by CQ) (20). In vitro, we observed that exposure of the cells to CQ improved the fusion index of iPDMs, which is characteristically reduced in patient cells. Myoblast fusion is critical for proper muscle growth and regeneration, and a defect in this process will therefore probably contribute to muscle atrophy. It has been reported in C2C12 cells that Mbnl1-3 levels vary significantly in the nucleus during myogenic differentiation and that MBNL family members are likely contributors to developmentally regulated myogenic AS (50). Analogously, HSA^{LR} mice showed partial recovery of muscle strength, decrease in the number of myotonic discharges in the skeletal muscles, and reduction in the number of central

nuclei in the muscle fibers. These results are consistent with previous approaches in which MBNL1 was transgenically overexpressed in HSA^{LR} mice to correct myopathy (18) or where administration of different compounds generated similar results (19, 42, 43, 51). Importantly, these resulting improvements at the functional level make CQ a strong candidate for drug repurposing in DM1 either alone or as a systemic complement to the limited biodistribution of oligonucleotide-based therapies (19, 52, 53).

Materials and Methods

iCDFs and iPDFs (1,300 CTG) differentiable to myoblasts by MyoD expression were provided by D. Furling, Centre de Recherche en Myologie, Paris, France (27). Nonimmortalized CDFs and PDFs (333 and 1,000 CTG) differentiable to myoblasts by MyoD expression were generated in A.L.D.M.'s laboratory. Mouse handling and experimental procedures conformed to the European law regarding laboratory animal care and experimentation (2003/65/CE) and were approved by Conselleria de Agricultura, Generalitat Valenciana (reference number 2018/VSC/PEA/0182). Homozygous transgenic HSA^{LR} (line 20 b) mice were provided by C. Thornton (13) (University of Rochester Medical Center, Rochester, NY) and mice with the same genetic background (FVB) were used as controls. In all figures, graphs show mean \pm SEM **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 according to Student's *t* test. In all graphs error bars correspond to biological replicates. For additional details, see *SI Appendix, Materials and Methods*.

Data Availability. All data discussed in the paper are available to readers.

ACKNOWLEDGMENTS. This work was funded by a grant from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2015-64500-R, including funds from the European Regional Development Fund) (awarded to R.A.). A.B. was supported by a postdoctoral fellowship (APOSTD2017/077), and M.S.-A. and J.E.-E. were supported by predoctoral fellowships (ACIF/2018/071 and GRISOLIAP/2018/098, respectively), all from the Conselleria d'Educació, Investigació, Cultura i Esport (Generalitat Valenciana). This work was cofinanced by the European Union through Programa Operativo del Fondo Europeo de Desarrollo Regional of Comunitat Valenciana 2014-2020.

- C. A. Thornton, Myotonic dystrophy. *Neurol. Clin.* **32**, 705–719, viii (2014).
- S. J. Overby, E. Cerro-Herreros, B. Llamusi, R. Artero, RNA-mediated therapies in myotonic dystrophy. *Drug Discov. Today* **23**, 2013–2022 (2018).
- L. T. Timchenko *et al.*, Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4407–4414 (1996).
- C. Barreau, L. Paillard, A. Méreau, H. B. Osborne, Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: Molecular characteristics and biological functions. *Biochimie* **88**, 515–525 (2006).
- R. Cardani *et al.*, Overexpression of CUGBP1 in skeletal muscle from adult classic myotonic dystrophy type 1 but not from myotonic dystrophy type 2. *PLoS One* **8**, e83777 (2013).
- R. S. Savkur, A. V. Phillips, T. A. Cooper, Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* **29**, 40–47 (2001).
- N. Charlet-B *et al.*, Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol. Cell* **10**, 45–53 (2002).
- C. Fugier *et al.*, Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat. Med.* **17**, 720–725 (2011).
- R. Batra *et al.*, Loss of MBNL leads to disruption of developmentally regulated alternative polyadenylation in RNA-mediated disease. *Mol. Cell* **56**, 311–322 (2014).
- A. Masuda *et al.*, CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci. Rep.* **2**, 209 (2012).
- F. Rau *et al.*, Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 840–845 (2011).
- E. T. Wang *et al.*, Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell* **150**, 710–724 (2012).
- A. Mankodi *et al.*, Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* **289**, 1769–1773 (2000).
- H. Du *et al.*, Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 187–193 (2010).
- R. N. Kanadia *et al.*, Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 11748–11753 (2006).
- K. Charizanis *et al.*, Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* **75**, 437–450 (2012).
- P. Y. Wang *et al.*, Reduced cytoplasmic MBNL1 is an early event in a brain-specific mouse model of myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 2247–2257 (2017).
- C. M. Chamberlain, L. P. Ranum, Mouse model of muscleblind-like 1 overexpression: Skeletal muscle effects and therapeutic promise. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 4645–4654 (2012).
- E. Cerro-Herreros *et al.*, miR-23b and miR-218 silencing increase Muscleblind-like expression and alleviate myotonic dystrophy phenotypes in mammalian models. *Nat. Commun.* **9**, 2482 (2018).
- A. Bargiela *et al.*, Increased autophagy and apoptosis contribute to muscle atrophy in a myotonic dystrophy type 1 *Drosophila* model. *Dis. Model. Mech.* **8**, 679–690 (2015).
- B. Llamusi *et al.*, Muscleblind, BSF and TBPH are mislocalized in the muscle sarcomere of a *Drosophila* myotonic dystrophy model. *Dis. Model. Mech.* **6**, 184–196 (2013).
- K. Yum, E. T. Wang, A. Kalsotra, Myotonic dystrophy: Disease repeat range, penetrance, age of onset, and relationship between repeat size and phenotypes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **44**, 30–37 (2017).
- D. M. Swank *et al.*, Alternative exon-encoded regions of *Drosophila* myosin heavy chain modulate ATPase rates and actin sliding velocity. *J. Biol. Chem.* **276**, 15117–15124 (2001).
- R. Silvers, H. Keller, H. Schwalbe, M. Hengesbach, Differential scanning fluorimetry for monitoring RNA stability. *ChemBioChem* **16**, 1109–1114 (2015).
- A. Bargiela, B. Llamusi, E. Cerro-Herreros, R. Artero, Two enhancers control transcription of *Drosophila* muscleblind in the embryonic somatic musculature and in the central nervous system. *PLoS One* **9**, e93125 (2014).
- E. Loro *et al.*, Normal myogenesis and increased apoptosis in myotonic dystrophy type-1 muscle cells. *Cell Death Differ.* **17**, 1315–1324 (2010).
- L. Arandel *et al.*, Immortalized human myotonic dystrophy muscle cell lines to assess therapeutic compounds. *Dis. Model. Mech.* **10**, 487–497 (2017).
- M. Mauthe *et al.*, Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **14**, 1435–1455 (2018).
- S. D. Wagner *et al.*, Dose-dependent regulation of alternative splicing by MBNL proteins reveals biomarkers for myotonic dystrophy. *PLoS Genet.* **12**, e1006316 (2016).
- Y. Wang *et al.*, Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 63 (2018).
- A. Bargiela Sabater-Arcis *et al.*, Increased Muscleblind levels by chloroquine treatment improves myotonic dystrophy type 1 phenotypes in vitro and in vivo models. *Gene Expression Omnibus*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=gse128844>. Deposited 26 March 2019.
- C. Wei *et al.*, Correction of GSK3 β at young age prevents muscle pathology in mice with myotonic dystrophy type 1. *FASEB J.* **32**, 2073–2085 (2018).

33. M. Koshelev, S. Sarma, R. E. Price, X. H. Wehrens, T. A. Cooper, Heart-specific over-expression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1066–1075 (2010).
34. A. Kalsotra *et al.*, A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 20333–20338 (2008).
35. A. Ebralidze, Y. Wang, V. Petkova, K. Ebralidse, R. P. Junghans, RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* **303**, 383–387 (2004).
36. X. Lin *et al.*, Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2087–2097 (2006).
37. M. Nakamori *et al.*, Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy. *Ann. Neurol.* **74**, 862–872 (2013).
38. K. Jones *et al.*, GSK3 β mediates muscle pathology in myotonic dystrophy. *J. Clin. Invest.* **122**, 4461–4472 (2012).
39. A. Vihola *et al.*, Histopathological differences of myotonic dystrophy type 1 (DM1) and PROMM/DM2. *Neurology* **60**, 1854–1857 (2003).
40. H. J. Kim *et al.*, Therapeutic modulation of eIF2 α phosphorylation rescues TDP-43 toxicity in amyotrophic lateral sclerosis disease models. *Nat. Genet.* **46**, 152–160 (2014).
41. E. Cerro-Herreros, J. M. Fernandez-Costa, M. Sabater-Arcis, B. Llamusi, R. Artero, Derpressing muscleblind expression by miRNA sponges ameliorates myotonic dystrophy-like phenotypes in *Drosophila*. *Sci. Rep.* **6**, 36230 (2016).
42. F. Zhang *et al.*, A flow cytometry-based screen identifies MBNL1 modulators that rescue splicing defects in myotonic dystrophy type I. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 3056–3068 (2017).
43. G. Chen *et al.*, Phenylbutazone induces expression of MBNL1 and suppresses formation of MBNL1-CUG RNA foci in a mouse model of myotonic dystrophy. *Sci. Rep.* **6**, 25317 (2016).
44. F. Madeo, A. Zimmermann, M. C. Maiuri, G. Kroemer, Essential role for autophagy in life span extension. *J. Clin. Invest.* **125**, 85–93 (2015).
45. M. Brockhoff *et al.*, Targeting deregulated AMPK/mTORC1 pathways improves muscle function in myotonic dystrophy type I. *J. Clin. Invest.* **127**, 549–563 (2017).
46. E. P. Foff, M. S. Mahadevan, Therapeutics development in myotonic dystrophy type 1. *Muscle Nerve* **44**, 160–169 (2011).
47. D. Laustriat *et al.*, In vitro and in vivo modulation of alternative splicing by the biguanide metformin. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **4**, e262 (2015).
48. G. Bassez *et al.*, Improved mobility with metformin in patients with myotonic dystrophy type 1: A randomized controlled trial. *Brain* **141**, 2855–2865 (2018).
49. L. Picchio, E. Plantie, Y. Renaud, P. Poovthumkadavil, K. Jagla, Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: Phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2795–2810 (2013).
50. C. S. Bland *et al.*, Global regulation of alternative splicing during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res.* **38**, 7651–7664 (2010).
51. R. Herrendorff *et al.*, Identification of plant-derived alkaloids with therapeutic potential for myotonic dystrophy type I. *J. Biol. Chem.* **291**, 17165–17177 (2016).
52. K. Sobczak, T. M. Wheeler, W. Wang, C. A. Thornton, RNA interference targeting CUG repeats in a mouse model of myotonic dystrophy. *Mol. Ther.* **21**, 380–387 (2013).
53. J. L. Horsham *et al.*, Clinical potential of microRNA-7 in cancer. *J. Clin. Med.* **4**, 1668–1687 (2015).

Supplementary Information for

Increased Muscleblind levels by chloroquine treatment improve myotonic dystrophy type 1 phenotypes in *in vitro* and *in vivo* models.

Ariadna Bargiela, Maria Sabater-Arcis, Jorge Espinosa-Espinosa, Miren Zulaica, Adolfo Lopez de Munain and Ruben Artero.

Corresponding author: Ruben Artero
Email: ruben.artero@uv.es

This PDF file includes:

Supplementary text
Figs. S1 to S13
Tables S1
References for SI reference citations

Supplementary Information Text

Materials and methods.

Fly strains and crosses

w¹¹¹⁸ line was obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center (Indiana University, Bloomington, IN, USA). *Mhc-Gal4* flies were described in (1). *Mhc-Gal4 UAS-(CTG)480* flies were generated in (2). All crosses were carried out at 25 °C with standard fly food. For oral administration of chloroquine (Chloroquine diphosphate salt solid, ≥98%, C6628 Sigma Aldrich), a maximum of 25 one-day adult flies were collected in tubes containing standard food supplemented with chloroquine (10 or 100 μM). Flies were transferred to tubes containing fresh food every 2-3 days for a total administration time of 7 days.

Determination of caspase-3 and caspase-7 activity

Ten adult female flies of the indicated genotypes were homogenized in 100 μl of cold PBS buffer using TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany). After a 10 min centrifugation, the supernatant was transferred into a white 96-well plate. Caspase-3 and caspase-7 activity was measured using the Caspase-Glo 3/7 Assay Systems (Promega, Fitchburg, WI, USA). Briefly, 100 μl of Caspase-Glo 3/7 reagent was added per well and the plate was incubated at room temperature for 30 min. Then luminescence was measured using an Infinite 200 PRO plate reader (Tecan Life Sciences; Männedorf, Switzerland). Luminescence readings were normalized to total protein using the BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, USA). All graphs show the mean of three biological samples with three technical replicates of each. P-values were obtained using a two-tailed, non-paired Student's *t*-test ($\alpha=0.05$).

LysoTracker staining

Drosophila somatic muscles were processed to stain lysosomes as previously described (3). *Drosophila* muscles were incubated for 30 min at 37°C with 100 nM of LysoTracker RED-DND99 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) and 5 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO USA) in PBS 1X. After three rinses with PBS 1X, *Drosophila* muscles were mounted using fluorescence mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark)

Differential scanning fluorimetry (DSF)

DSF experiments were performed as described in (4). Six CQ concentrations ranging from 0.01 to 100 µM were used.

RNA extraction, semiquantitative PCR and real time PCR.

For RNA extraction from fly and murine samples, tissues were homogenized using TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany) in TriReagent (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA). Total RNA from human myoblasts was isolated using TriReagent following manufacturer's recommendations. One microgram of RNA was digested with DNaseI (Invitrogen) and reverse-transcribed with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) using random hexanucleotides (Roche Life Sciences; Indianapolis, IN, USA). Alternative splicing was analyzed using 20 ng of cDNA in a standard PCR reaction with GoTaq polymerase (Promega, Inc.; Madison, WI, USA) and specific primers (*SI Appendix*, Table. S1). *Rp49*, *GAPDH*, and *Gapdh* were used as endogenous controls in fly, human and mouse samples, respectively. PCR products were separated in a 2.5% agarose gel and quantified using ImageJ software (NIH). *Serca* exon 13, *LIMCH1* exon 10 and *Limch1* exon 9 expression were analyzed by RT-qPCR as follows. RT-qPCR was performed using 0.2 ng of cDNA as template with 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) using a Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems; Foster City CA, USA). As endogenous control we used *Rp49*, *GAPDH*, and *Gapdh* that were detected using 0.2 ng of cDNA in both, quantitative and semi-quantitative PCR. We used 1 ng of cDNA from human

myoblast or mouse tissue as a template for multiplex RT-qPCR using the QuantiFast Probe PCR Kit reagent. Commercial TaqMan probes (Qiagen) were used to detect human (MBNL1 and MBNL2) or mouse (Mbnl1 and Mbnl2; FAM-labeled probes) and reference (GAPDH; MAXlabeled probe) genes. Results from myoblasts were normalized to *GAPDH* (TAMRA-labeled probe; Integrated DNA Technologies) whereas the mouse results were normalized to *Gapdh*. HSA transgene expression levels were determined by RT-qPCR as described previously (5). Three biological replicates and three technical replicates per biological sample were performed. Relative expression to endogenous gene and the control group were obtained by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Pairs of samples were compared using two-tailed Student's *t*-test ($\alpha < 0.05$), applying Welch's correction when necessary.

RNAseq and data analysis

Libraries were prepared using TruSeq Stranded mRNA Library prep kit (Illumina) following manufacturers indications. Libraries were sequenced using paired-end, 75 base pair sequencing with the Illumina NextSeq 550 sequencer in the SCSIE-UCIM from the University of Valencia. For gene expression analysis, raw reads were checked for quality and aligned to GRCh38.p12 genome using STAR software (version 2.6.1a_08-27)(6). Uniquely aligning paired sequences were used as input to the program featureCounts part of the package SubRead (v1.6.3) (7) using GRCh38.95.gtf as annotation file to generate the gene counts. Differential Gene Expression (DGE) were computed using the R Bioconductor package edgeR (version 3.24.3)(8). To consider a gene to be DGE we used a fold change (FC) ≥ 2 and adjusted p-value < 0.05 . Percentage of recovery of each gene was used using the following formula:

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{Mean}_{\text{treated_genecount}} - \text{Mean}_{\text{disease_gene_count}}}{\text{Mean}_{\text{control_gene_count}} - \text{Mean}_{\text{disease_gene_count}}} \times 100$$

To analyze transcripts expression raw reads were checked for quality and aligned to GRCh38.p12 using STAR. Uniquely aligning paired sequences were used as input to the program Rsem (v1.3.1)(9) using GRCh38.95.gtf as annotation file to generate the transcripts counts. DGE were computed using the R Bioconductor package edgeR. To

consider a transcript to be DGE we used a fold change (FC) ≥ 2 and adjusted p-value < 0.05 . We used the same formula as before to calculate the percentage of recovery. Gene Ontology analyses were performed using clusterProfiler (10) considering all recovered genes in each treatment with a percentage of correction ranging between 10 and 110. The raw data and the raw count tables are available in GEO repository under the id GSE128844

Western blotting

For total protein extraction from *Drosophila*, 20 female thoraces were homogenized in 50 mM Tris-Cl, pH 8 plus protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche Applied Science). For total protein extraction from human myoblasts, cells were sonicated in RIPA buffer while mouse muscles were homogenized in RIPA buffer using TissueLyser LT (Qiagen). Total protein was quantified with BCA protein assay kit (Pierce) using bovine serum albumin as standard. 20 μ g of samples were denatured for 5 min at 100°C, resolved in 12% SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose 0.45 μ m (GE Healthcare) membranes. The membranes were blocked with 5% non-fat dried milk in PBS-T (PBS 1X containing 0.05% Tween 20) and immunodetected following standard procedures. For Mbl protein detection on fly samples, anti-Mbl antibody (11) was pre-absorbed against 0–6 h after egg laying embryos to eliminate non-specific binding of antibody. Membranes were incubated with pre-absorbed primary (overnight, 1:1000). Loading control was mouse anti- α -Tubulin (overnight, 1:5000, Sigma-Aldrich). For human myoblasts and mouse muscle samples, membranes were incubated overnight at 4°C with primary mouse anti-MBNL1 antibody (1:1000, ab77017, Abcam in the case of mouse muscle samples and 1:200, clone MB1a, The Wolfson Centre for Inherited Neuromuscular Disease in the case of cell samples), mouse anti-CUG-BP1 (1:200, clone 3B1, Santa Cruz) antibodies or mouse anti-MBNL2 (1:200, clone MB2a, The Wolfson Centre for Inherited Neuromuscular Disease). Loading controls were the anti- β -ACTIN antibody (1 h, 1:5000, clone AC-15, Sigma-Aldrich) for human myoblast samples and mouse anti-Gapdh (1 h, 1:5000, clone G-9, Santa Cruz) for mouse samples. In all cases,

primary antibodies were detected by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated sheep anti-mouse-IgG secondary antibody (1 h, 1:5000, Sigma-Aldrich) except in the case of α -Tubulin, that it was used at 1:3000. Immunoreactive bands were detected using enhanced chemiluminescence. Western Blotting Substrate (Pierce) and images were acquired with an ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Quantification was performed using ImageJ software (NIH), and statistical differences were estimated using Student's *t*-test ($p < 0.05$) on normalized data.

Non-fluorescent histological analysis

Analysis of the indirect flight muscle area in *Drosophila* thoraces was performed as previously described (2). Briefly, six thoraces of three-day-old females were embedded in Epon following standard procedures. After drying the resin, semi-thin sections of 1.5 μm were obtained using an ultramicrotome (Ultracut E, Reichert-Jung and Leica). Images were taken at 100x magnification with a Leica DM2500 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). P-values were obtained using a two-tailed, non-paired t-test ($\alpha = 0.05$), applying Welch's correction when necessary.

For central nuclei quantification of mouse muscles, gastrocnemius and quadriceps were frozen in isopentane and 15 μm -sections were obtained with a Leica CM 1510S cryostat. Sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and mounted with DPX (Sigma-Aldrich) according to standard procedures. Images were taken at a 100x magnification with a Leica DM2500 microscope. The percentage of central nuclei was quantified in a total of 500 fibers in each mouse.

***Drosophila* functional assays.**

Flight assays were performed at day 5 according to Babcock. et al. 2014 using 100 male flies per group (12). Landing distance was compared between groups using two-tailed t-test ($\alpha = 0.05$). To assess climbing velocity groups of ten five-day-old males were transferred into disposable pipettes (1.5 cm in diameter and 25 cm height) after a period of 24 h without anesthesia. The height reached from the bottom of the vial by each fly in a period of 10 s was recorded with a camera. For each genotype, two

groups of 30 flies were tested. Two-tailed Student t-test ($\alpha=0.05$) was used for comparisons of pairs of samples applying Welch's correction whenever necessary.

***Drosophila* lifespan analyses**

50-80 newly emerged flies were collected in freshly prepared tubes containing standard nutritive medium with or without chloroquine. Males and females were kept in different tubes at 25°C. The number of dead flies was scored daily. Flies were transferred to new tubes twice a week. Survival curves were obtained using the Kaplan–Meier method and were statistically compared according to the Gehan-Breslow-Wilcoxon test ($\alpha=0.05$).

Cell culture conditions

A cell model of the disease (kindly provided by Dr. Denis Furling, Institute of Myologie, Paris (13)) consisted of normal (iCDF) and DM1 (iPDF; 1300 CTG repeats) immortalized (hTERT) skin fibroblasts conditionally expressing MyoD. Fibroblast Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies, Mulgrave, Victoria, Australia) supplemented with 4.5 g/L of glucose, 1 % of penicillin and streptomycin (P/S) and 10% foetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Fibroblasts were transdifferentiated into myoblasts by inducing expression of MyoD. Cells were plated in muscle differentiation medium (MDM) made of DMEM 4.5 g/L glucose with 1% P/S, 2% horse serum, 1% apo-transferrin (10 mg/ml), 0.1 % insulin (10 mg/ml) and 0.02 % doxycycline (10 mg/ml). In all cases, the cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Fibroblasts were in MDM for 96 h. Chloroquine was added to MDM to final concentrations of 0.1 μ M, 1 μ M and 10 μ M for 48 h. Similarly, 30 mM mtf was added for 48 h. It was demonstrated in human cell lines that autophagic flux was not blocked by CQ at acidic pH (14). Then, we measured the pH of the cell culture medium before adding CQ, 24 and 48 h after addition, and observed values ranging from 7.8 to 8, confirming that CQ was indeed inhibiting autophagy.

Human fibroblasts isolation and culture

Four different lines from primary human fibroblast were isolated from donors skin and transduced to express MyoD as previously described (15). Fibroblasts from DM1 patients expressing 1000 and 333 CUG repeats were from male donors (33 and 46 years, respectively). Control fibroblasts were obtained from healthy female controls (48 years and unknown). All control and patient materials were obtained with the written informed consent of the donor. Ethical approval for this study was obtained from the ethical review committee at the Hospital Universitario Donostia.

Double MBNL staining and FISH

Immortalized fibroblasts were seeded into 24-well plates (4.0×10^4 cells per well). Fibroblasts were differentiated for 96 h. CQ was added to MDM to final concentrations of 0.1 μM and 10 μM for 48 h. Then, cells were fixed in 4% PFA for 15 min at room temperature followed by washes in 1x PBS. Double MBNL and foci detection were performed as previously described (16). Analysis of MBNL and (CAG)₇ colocalization in ribonuclear foci was calculated using ZEN 2.6 software analyzing 50-60 nuclei.

Foci detection

Immortalized fibroblasts were seeded into 96-well plates (1.0×10^4 cells per well). After chloroquine treatment, cells were fixed in 4% PFA for 15 min at room temperature followed by washes in 1x PBS. Fixed cells were washed with 2x SSC, 30% deionized formamide for 10 min at room temperature and were hybridized with Cy3-(CAG)₇-Cy3 labelled probe diluted 1:500 in hybridization buffer (40% formamide, 2x SSC, 0.2% BSA, 10% dextran sulfate, 2 mM ribonucleoside-vanadyl complex, 10% tRNA [10 mg/ml], and 10% herring sperm) for 2 h at 37°C. After hybridization, cells were washed twice with 2x SSC, 30% deionized formamide for 15 min at 45°C, rinsed with 1x PBS, incubated with Hoechst 33342 (5 mg/ml) diluted 1:20.000 in 1x PBS for 20 min at room temperature, and mounted with 20% Mowiol. Images were taken and analyzed using an IN Cell Analyzer 2200 Imaging System.

Immunofluorescent methods

Immunofluorescence detection of Muscleblind in fly thorax muscles was performed as previously described (2). Briefly, fly thoraces from 5-day-old females were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight at 4 °C, followed by cryoprotection with 30% sucrose for 48 h at 4°C. Thoraces were then embedded in OCT, and transversal sections (10 µm) were obtained with a Leica CM 1510S cryostat. Cryosections were washed in PBS containing Triton 0.3% (PBS-T), blocked (PBT containing 5% donkey serum and 0.5% BSA) for 30 min at room temperature and incubated with the corresponding antibody (sheep anti-Mbl 1:500) overnight at 4°C. After washes with PBS-T, the tissue was incubated 45 min with biotin-conjugated secondary antibodies (Sigma) at 1:200 dilution. Cryosections were then incubated with Elite ABC kit standard (Vectastain) for 30 min at RT, followed by washes and incubation with streptavidin-FITC (1:1000) (Vector, London, UK) for 45 min. Finally, samples were mounted in Vectashield (Vector, London, UK) with 2 µg/ml DAPI. Anti-Mbl antibody was preincubated with 0 to 6 h-old embryos, which do not express the protein.

MBNL1 and MBNL2 were detected in cells differentiated in MDM for 96 h (3×10^5 cells/well in 24 well plates). After 48 h CQ treatment, cells were fixed with 4% PFA in PBS for 15 min at RT. In the case of double staining to detect LysoTracker and MBNL1 or 2, previously to fixation, cells were incubated 30 min at 37°C with 100 nM LysoTracker RED-DND99 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). In all cases, fixed cells were permeabilized with PBS-T and blocked with Blocking Buffer (PBS-T, 0.5% BSA, 1% Goat Serum) 1 h at RT. Cells were incubated overnight at 4°C with primary mouse anti-MBNL1 (1:200 clone MB1a, The Wolfson Centre for Inherited Neuromuscular Disease), rabbit anti-MBNL2 (1:200, ab105331, Abcam) for single immunofluorescence or mouse anti-MBNL2 (1:200, clone MB2a, The Wolfson Centre for Inherited Neuromuscular Disease) for double staining (LysoTracker plus MBNL1 or -2). Then, cells were incubated for 1 h at RT with a secondary biotin-conjugated anti-mouse-IgG to detect MBNL1 or MBNL2 (1:200, Sigma-Aldrich) in the case of double

immunofluorescence and MBNL1 single staining, or anti-rabbit-IgG (1:200, Sigma-Aldrich) for single MBNL2 staining. Fluorescence signal was amplified using ABC solution for 30 min at RT, followed by a FITC-Streptavidin (1:200, Vector, London, UK) to detect anti-MBNL1 and anti-MBNL2 (double staining with LysoTracker) or streptavidin-Texas Red (1:200, Vector) to detect anti-MBNL2 (single immunofluorescence) for 2 h at RT. Excess antibody was washed off with PBS-T. Finally, cells were washed three times with PBS and mounted in Vectashield (Vector Laboratories, London, UK) with 2 µg/ml DAPI. Images were taken on an LSM800 confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany). LysoTracker and MBNL1 or MBNL2 colocalization were calculated using ZEN 2.6 software.

To carry out immunodetection of DESMIN, fibroblasts were seeded in 24-well plates with 2.5×10^4 cells/well and were transdifferentiated for 7 days. After 48 h of chloroquine treatment, cells were fixed with 4% PFA for 15 min at RT and were processed using anti-DESMIN (1:50, Abcam; Cambridge, MA), biotin-conjugated anti-mouse-IgG (1:200, Sigma-Aldrich) and streptavidin-FITC (1:200, Vector) as primary and secondary antibodies, and fluorophore, respectively.

Images were taken with an LSM800 confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany) at 200x magnification. The fusion index was defined as the percentage of nuclei within myotubes (>2 myonuclei) out of the total number of nuclei in each condition. The average number of nuclei per myotube was determined by counting over 250 nuclei from randomly chosen DESMIN-positive cells (5-7 micrographs). Myotube diameters were measured at 5 points along the entire tube. A total of 50 myotubes were examined for each experimental condition. Quantification was performed using ImageJ software (NIH).

For LC3B immunodetection cells were differentiated in MDM for 96 h (3×10^5 cells/well in 24 well plates). After 48 h CQ treatment, cells were fixed with 4% PFA in PBS for 15 min at RT. After fixation, cells were permeabilized with methanol 100% for 15 min at -20°C and blocked with Blocking Buffer (PBS 1X, 0.5% BSA, 1% Goat Serum) for 1 h at RT. Cells were incubated O/N with rabbit anti-LC3B (1:200, ab51520,

Abcam) diluted in blocking buffer. Then, samples were incubated with Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 594 (1:200, Invitrogen) for 2 h. Between antibodies, cells were washed three times with PBS1X. Finally, cells were washed three times with PBS and mounted in Vectashield (Vector Laboratories, London, UK) with 2 µg/ml DAPI. Images were taken on an LSM800 confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany) at 400x magnification.

Toxicity assay

Healthy iCDM were aliquoted in 96-well plate with 1.0×10^5 cells per well. After 24 h, chloroquine or mtf were added to the MDM at concentrations ranging from 0.05 to 200 µM and from 0.05 µM to 200 mM, respectively. Cells were transdifferentiated into myoblasts for 4 days. To measure cell viability, 20 µl MTS/PMS tetrazolium salt was added to each well and cells were incubated for 2 h at 37°C in a humidified chamber with 5% CO₂. The conversion of MTS into soluble formazan (accomplished by dehydrogenase enzymes from metabolically active cells) was measured by absorbance at 490 nm (CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, Inc.; Madison, WI). Absorbance was measured using an Infinite 200 PRO plate reader (Tecan Life Sciences; Männedorf, Switzerland). Data were transformed to percentage of survival relative to cells not exposed to the drug, which was considered 100% viability.

Transgenic mice and chloroquine administration.

Mouse handling and experimental procedures conformed to the European law regarding laboratory animal care and experimentation (2003/65/CE) and were approved by *Conselleria de Agricultura, Generalitat Valenciana* (reference number 2018/VSC/PEA/0182). Homozygous transgenic HSA^{LR} (line 20 b) mice were provided by Prof. C. Thornton (17) (University of Rochester Medical Center, Rochester, New York, USA) and mice with the same genetic background (FVB) were used as controls. Experiments were performed in 4.5-month-old males. Animals received one intraperitoneal shot of 100 µl of compound every 24 h for seven

consecutive days. Experimental groups were treated with PBS (n=8 FVB, n=6 HSA^{LR}), 25 mg/kg/dose (n=3 HSA^{LR}) and 50 mg/kg/dose (n=5 HSA^{LR}). 7 days after the last injection animals were sacrificed and quadriceps and gastrocnemius were harvested. Each muscle was divided into three parts, two were snap frozen in liquid nitrogen for protein and RNA isolation and the third was frozen in isopentane for histological analyses.

Electromyography studies.

EMG was performed before starting the treatment and before sacrifice. Analysis was done under general anesthesia, as previously described (18). Briefly, five needle insertions were performed in each quadriceps muscle of both hind limbs, and myotonic discharges were graded on a five-point scale: 0, no myotonia; 1, occasional myotonic discharge in $\leq 50\%$ of the needle insertions; 2, myotonic discharge in $>50\%$ of the insertions; 3, myotonic discharge in nearly all of the insertions; and 4, myotonic discharge in all insertions.

Forelimb grip strength test.

The forelimb grip strength was measured with a Grip Strength Meter (BIO-GS3; Bioseb, USA). The peak pull force (measured in grams) was recorded on a digital force transducer when the mouse grasped the bar. The gauge of force transducer was reset to 0 g after each measurement. Tension was recorded by the gauge at the time the mouse released its forepaws from the bar. We performed five consecutive measurements at 30 s intervals. Grip force values were normalized to the body weight of each mouse.

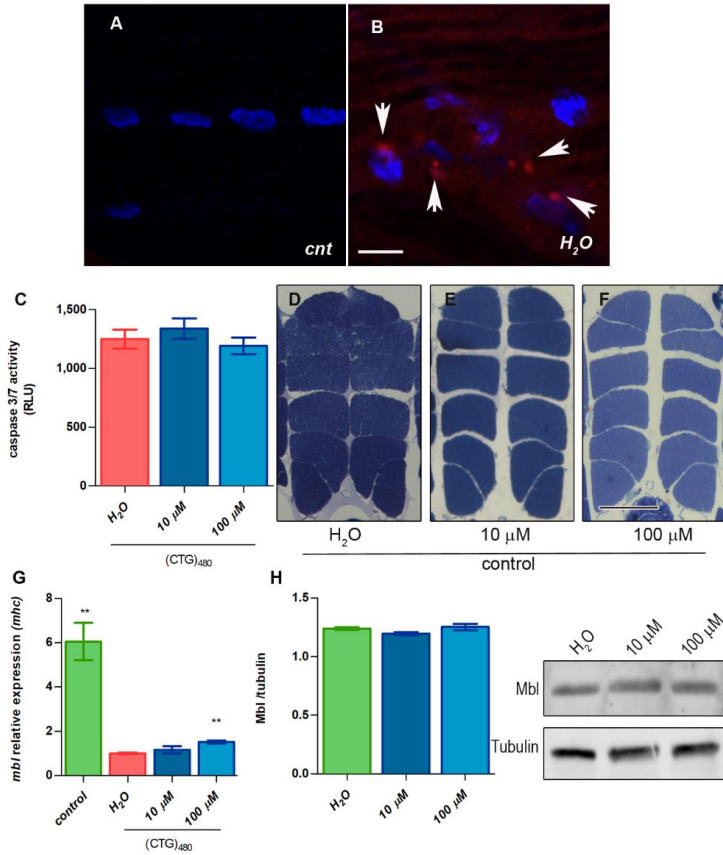


Fig. S1. Effect of chloroquine treatment on DM1 and control flies. (A,B) LysoTracker staining (red) of IFMs from control (cnt, *Mhc-Gal4/+*) (A); DM1 (H₂O; *Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480*) (B). Arrows indicate LysoTracker signal. Scale bar=10 μm. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue). (C) Quantification of caspase 3 and caspase 7 activity in DM1 model flies taking water (red bars) or chloroquine at the indicated concentrations (blue bars). (D-F) Representative dorsoventral sections of resin-embedded thoraces of control flies treated with the indicated concentrations of chloroquine. Scale bar=100 μm. (G) RT-qPCR amplification of *muscleblind* from control (*Mhc-Gal4/+*; green) and DM1 flies (*Mhc-Gal4 UAS-i(CTG)480*; red) treated with 10 or 100 μM (blue bars) of chloroquine after normalization to *mhc*. (H) Bar graph and representative images of Muscleblind protein

detection by western blot in healthy controls fed with 10 or 100 μ M chloroquine. α -Tubulin protein expression was used as an endogenous control. Graphs show mean \pm S.E.M **P<0.01 according to Student's *t*-test. All comparisons are referred to untreated DM1 flies (H₂O in the graphs).

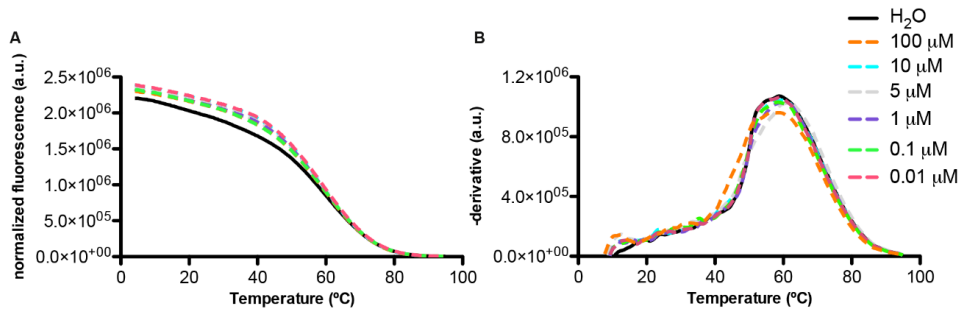


Fig. S2. Chloroquine does not interact with CUG RNA. Melting curve representation of Differential Scanning Fluorimetry assay showing fluorescence intensity (A) and first derivative (B) versus temperature (°C) of a wide range of chloroquine concentrations (0.01-100 μM). A constant concentration of RNA (600 nM) was used for each condition (n=3) (a.u arbitrary units).

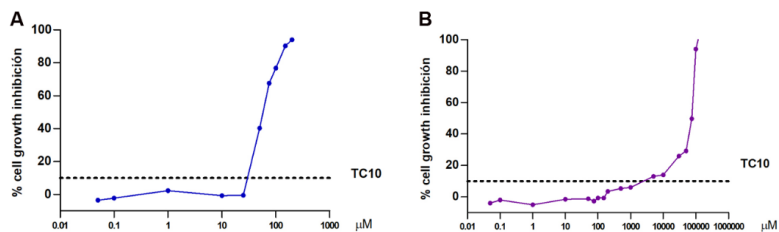


Fig. S3. Cell growth inhibition assay by MTS method. Human normal fibroblasts transdifferentiated for 96 h into myoblasts were treated with increasing concentrations of chloroquine (A) or mtf (B) ranging from 0.05 to 200 μM and 0.05 μM to 200 mM, respectively (n=4). TC10 (27.6 μM for chloroquine and 32 mM for mtf) was obtained using the least squares non-linear regression model.

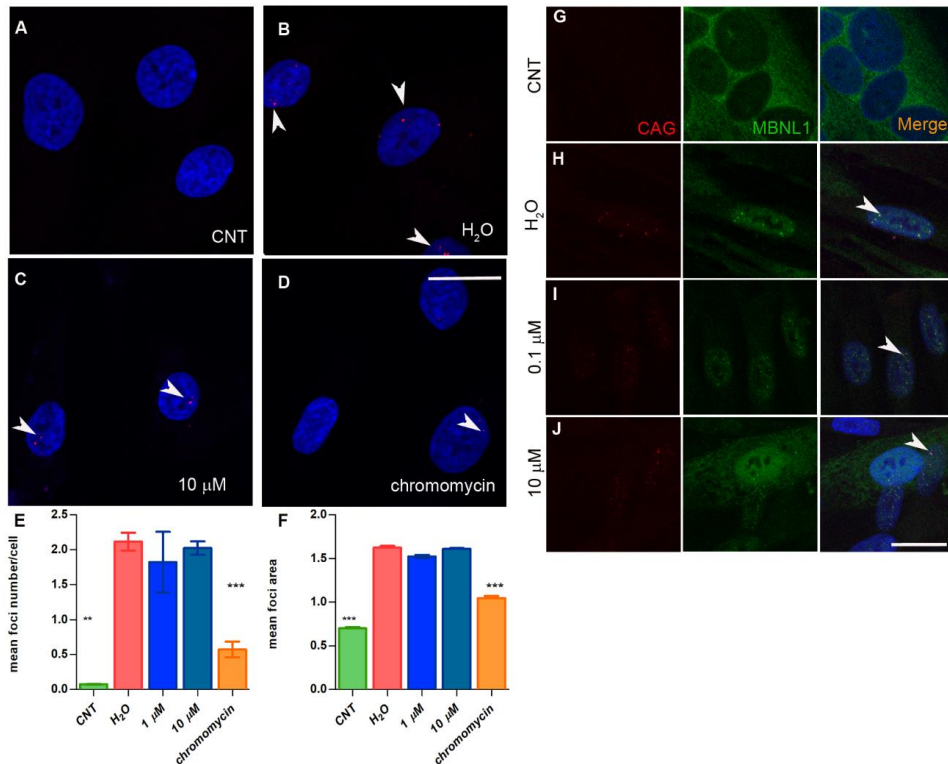


Fig. S4. Analysis of CQ effect on foci formation. (A-D) Representative images of fluorescence *in situ* hybridization to detect ribonuclear foci in iCDF (A), iPDF (B) and iPDF treated with CQ (C) or chromomycin (D) for 48 h. Nuclei were counterstained with DAPI (blue) and rCUG^{exp} RNA foci were detected with a Cy3-labelled probe (red). Quantification of mean foci number per cell (E) and the mean foci area (F) from the analysis of a minimum of 1000 fibroblast nuclei. Chromomycin was used as a positive control (19). Three biological replicates were used for each condition. (E and F). (G-J) Representative confocal images of MBNL1 immunostaining (green) and *in situ* hybridization to detect ribonuclear foci (red) in iPDM. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Arrows indicate MBNL1 and foci co-localization that is markedly green in untreated cells and acquires a redish colour with CQ, indicating lower MBNL1 levels in ribonuclear foci. Scale bars=20 μm.

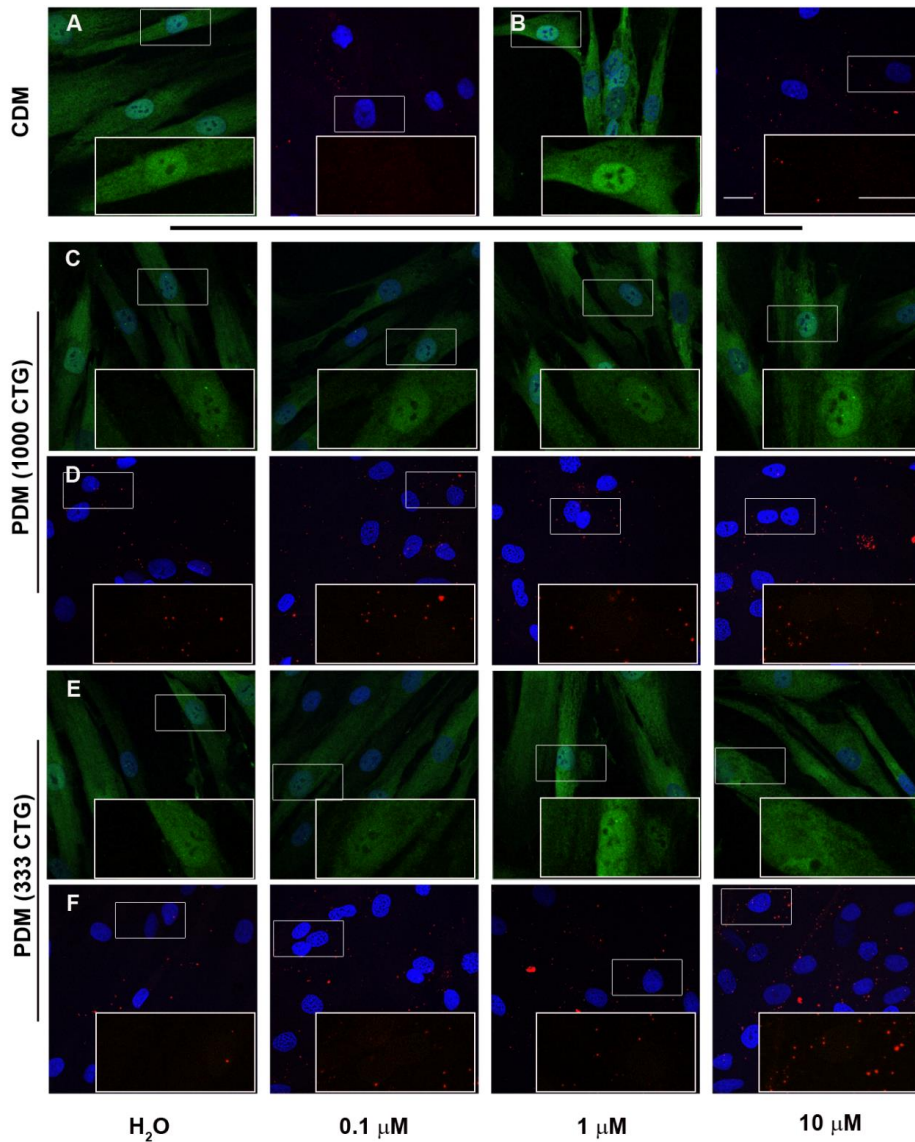


Fig. S5. MBNL1 and MBNL2 are overexpressed upon chloroquine treatment of PDM. Representative confocal images of MBNL1 (green) and MBNL2 (red) immunostaining in two different lines of healthy CDM (*A,B*), and two different lines of patient-derived myoblasts expressing 1000 (*C,D*) and 333 (*E,F*) CUG repeats,

respectively, treated with water as control, or with the indicated concentrations of chloroquine as indicated. Cells were differentiated for 96 h. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bars=20 μm .

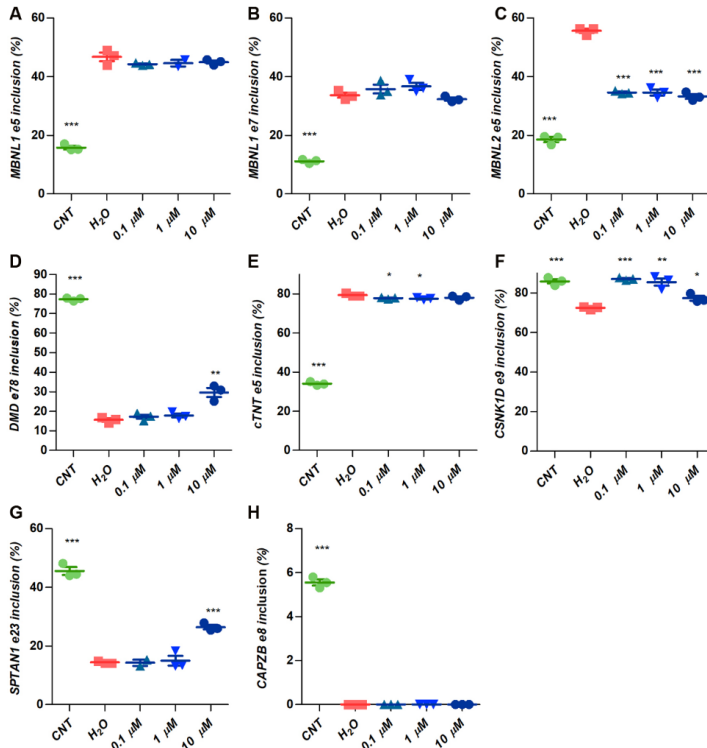


Fig. S6. Effect of chloroquine on splicing regulation on muscle cells. (A-H) Graphs show the percentage of inclusion of the indicated exons obtained by semiquantitative RT-PCR of *MBNL1* (exons 5 and 7), *MBNL2* (exon 5), *DMD* (exon 79), and *cTNT* (exon 5), which are MBNL1-dependent (A-F), and *CSNK* (exon 9) and *SPTAN1* (exon 23), which are MBNL2-dependent (G and H). Percentage of CELF1-regulated *CAPZB* exon 8 inclusion was determined as a control (I). *GAPDH* was used as an internal control. In all analyses sample size was n=3. Data are mean ± S.E.M. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 according to Student's *t*-test. Cells were differentiated 96 h and treated with the indicated concentrations of chloroquine. All comparisons are referred to untreated DM1 cells (H₂O in the graphs).

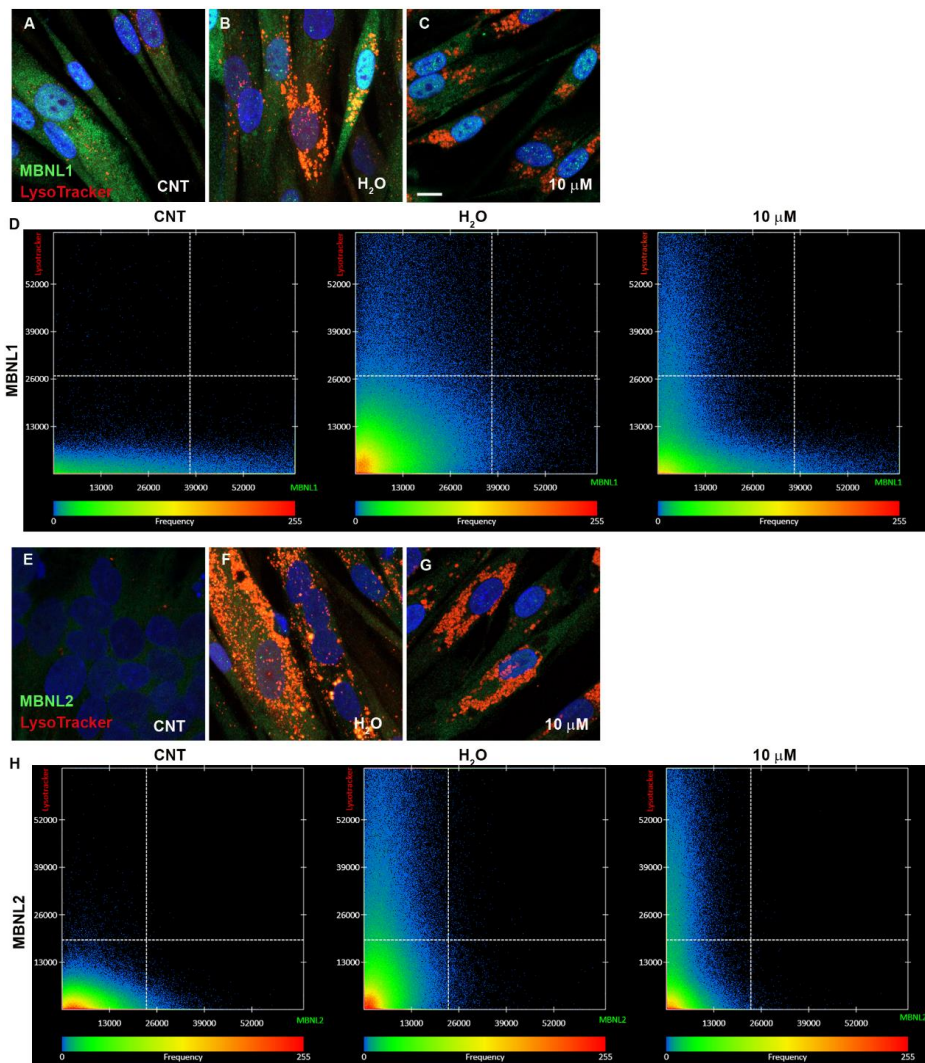


Fig. S7. The blockade of autophagosome and lysosome fusion by CQ reduces MBNL1 and MBNL2 colocalization with LysoTracker. Representative confocal images of immunodetection of MBNL1 (green) and LysoTracker (red) (A-C) or MBNL2 (green) and LysoTracker (red) (E-G) in iCDM (A, E, CNT), iPDM treated with vehicle (B, F, H₂O) and iPDM treated with 10 μM CQ (C, G, 10 μM). Scale bar=10 μm. Representative Scatter Plots of fluorescence intensity distribution of pixels for MBNL1/LysoTracker (D) and MBNL2/LysoTracker (H) from controls (CNT), iPDM

(H₂O) or iPDM cells treated with 10 μ M CQ (10 μ M). X-axis corresponds to the green channel (MBNL1 (*D*) or MBNL2 (*H*)) and Y-axis is the red channel (LysoTracker). Dashed lines indicate thresholds used to define colocalized signals (upper right quadrant).

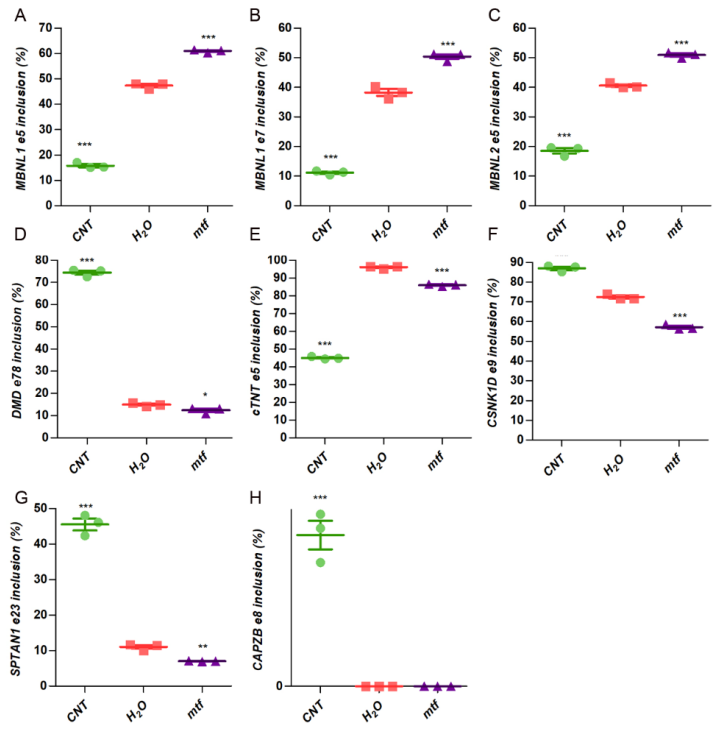


Fig. S8. Mtf treatment of DM1 muscle cells worsens splicing defects. (A-H) Graphs show the percentage of inclusion of the indicated exons obtained by semiquantitative RT-PCR of *MBNL1* (exons 5 and 7), *MBNL2* (exon 5), *DMD* (exon 78), and *cTNT* (exon 5), which are MBNL1-dependent (A-F), and *CSNK* (exon 9) and *SPTAN1* (exon 23), which are MBNL2-dependent (G and H). Percentage of CELF1-regulated *CAPZB* exon 8 inclusion was determined as a control (I). *GAPDH* was used as an internal control. In all analyses sample size was n=3. Data are mean \pm S.E.M. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 according to Student's *t*-test. Cells were differentiated 96 h and treated with 30 mM mtf. All comparisons are referred to untreated DM1 cells (H₂O in the graphs).

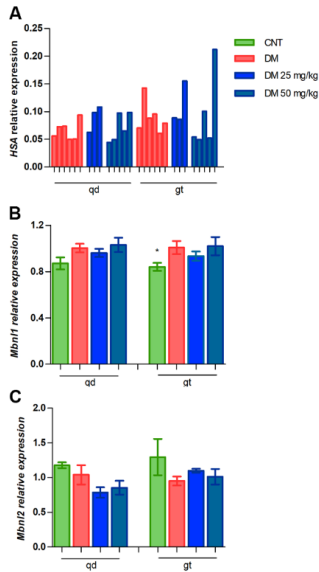


Fig. S9. *HSA* transgene and *Mbnl* expression quantification. (A) Quantification of the *HSA* transgene by RT-qPCR. Bars show relative expression in each animal. (B and C) Analyses of the relative expression of *Mbnl1* (B) or *Mbnl2* (C) by RT-qPCR. Quantifications were performed in control (green), and HSA^{LR} mice treated with PBS (red) or with 25 and 50 mg/kg chloroquine (blue) in quadriceps (qd) and gastrocnemius (gt). *Gapdh* was used as an internal control. Data are mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ according to Student's *t*-test. Experimental groups were CNT (FVB; $n=8$), DM (HSA^{LR} ; $n=6$), DM 25 mg/kg (HSA^{LR} ; $n=3$), DM 50 mg/kg (HSA^{LR} ; $n=5$).

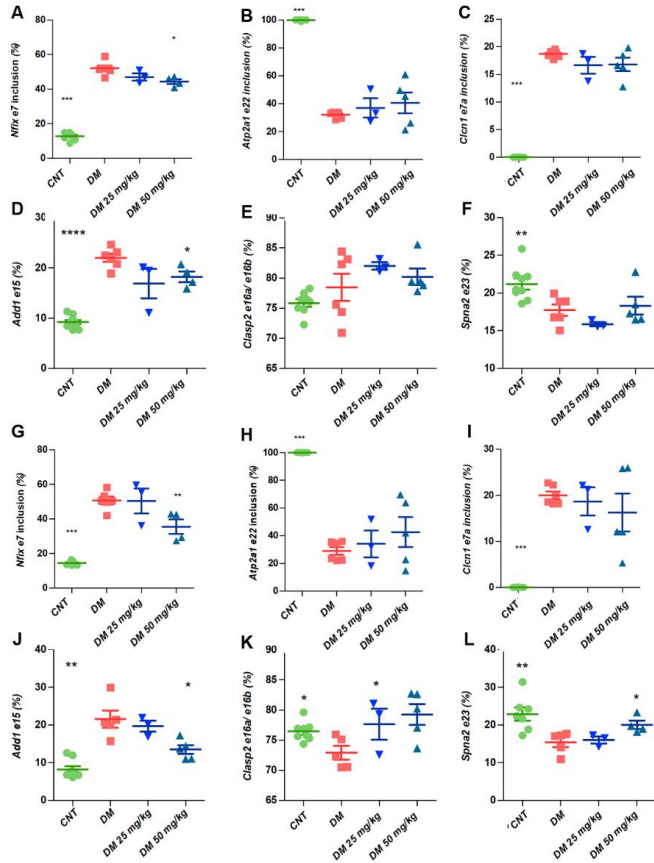


Fig. S10. Percentage of inclusion of the indicated exons in control and HSA^{LR} mice with or without chloroquine. *Nfix* (exon 7), *Atp2a* (exon 22), and *Cln1* (exon 7a) inclusion is regulated by Mbn11 (A-C and G-I), while *Add1* (exon 15), *Clasp2* (exon 16), and *Spna2* (exon 23) are regulated by Mbn12 (D-F and J-L). Determinations were performed in quadriceps (A-F) and gastrocnemius (G-L) and *Gadph* values were used as an internal control. Quantifications were performed in control (green), model HSA^{LR} mice treated with PBS (red) or with 25 and 50 mg/kg chloroquine (blue). Data are mean \pm S.E.M. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 according to Student's *t*-test. Experimental groups were CNT (FVB; n=8), DM (HSA^{LR}; n=6), DM 25 mg/kg (HSA^{LR}; n=3), DM 50 mg/kg (HSA^{LR}; n=5). All comparisons are referred to untreated HSA^{LR} mice (DM in the graphs).

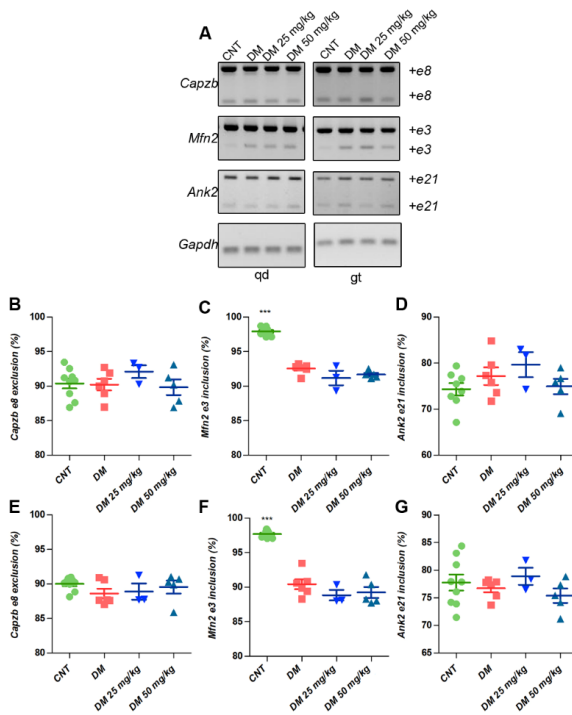


Fig. S11. CELF1-dependent splicing remains unchanged in chloroquine-treated HSA^{LR} mice. (A) Representative gels used for quantification in *B-G* from quadriceps (qd, left) and gastrocnemius (gt, right) muscles. (B-G) RT-PCR analysis of Celf1-dependent splicing impaired in HSA^{LR} mice; *Capzb* (exon 8), *Mfn2* (exon 3), and *Ank2* (exon 21), from quadriceps (B-D) and gastrocnemius (E-G). *Gapdh* values were used for normalization in the quantification of the exon inclusion. Quantifications were performed in control FVB mice (green), model HSA^{LR} mice treated with PBS (red) or with 25 and 50 mg/kg chloroquine (blue). Data are mean \pm S.E.M. *** $P < 0.001$ according to Student's *t*-test. Experimental groups were CNT (FVB; $n=8$), DM (HSA^{LR}; $n=6$), DM 25 mg/kg (HSA^{LR}; $n=3$), DM 50 mg/kg (HSA^{LR}; $n=5$). All comparisons are referred to untreated HSA^{LR} mice (DM in the graphs)

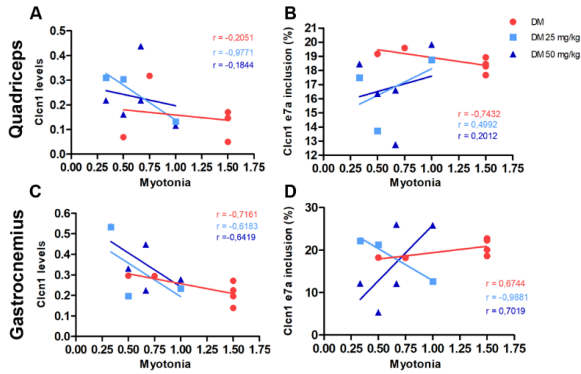


Fig. S12. Clcn1 protein levels, *Clcn1* splicing, and myotonia are correlated.

Pearson's correlations between Clcn1 protein levels (A and C) or Clcn1 exon 7a (B and D) and myotonia grade. Experimental groups were DM (HSA^{LR}; n=6), DM 25 mg/kg (HSA^{LR}; n=3), DM 50 mg/kg (HSA^{LR}; n=5). Data from myotonia assay (x-axis) were expressed as the ratio between myotonia measurement after (ai) and before (bi) chloroquine injection (ai/bi). Clcn1 protein levels were normalized to Gapdh.

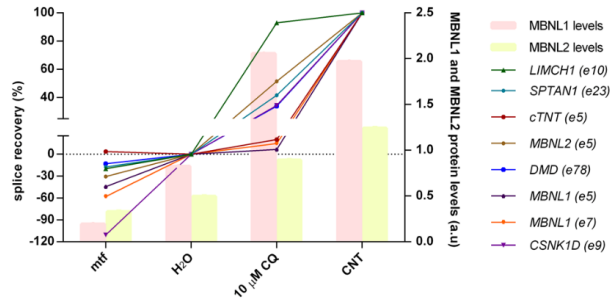


Fig. S13 Effect of the treatments on DM1-related phenotypes. MBNL levels (right Y-axis) are downregulated in iPDM (H₂O) compared to iCDM (CNT). MBNL1 (red bars) and MBNL2 (yellow bars) levels quantified in iPDM were reduced or increased after mtf or CQ treatment, respectively. Dots represent the percentage of recovery of exon inclusion (left Y-axis) after mtf or CQ treatment considering 0% values in iPDM (H₂O) and 100% those obtained for iCDM (CNT)

Table S1 Sequences of oligonucleotides used for qRT-PCR and semiquantitative RT-PCR

Primers sequence	Sequence (5' → 3')	RT-qPCR/RTPCR	Species
<i>amy-d fwd</i>	GGACCATCTGATTGATCTCG	RT-qPCR	<i>Drosophila</i>
<i>amy-d rev</i>	GGTGTTCCAGGTTCTTGAGG	RT-qPCR	<i>Drosophila</i>
<i>cyp6w1 fwd</i>	TTGCGCACAAAAATCTCTCC	RT-qPCR	<i>Drosophila</i>
<i>cyp6w1 rev</i>	GTCCTGCAAGTTCTTTCCAA	RT-qPCR	<i>Drosophila</i>
<i>mbl fwd</i>	TTGAATCAAAATTATAGCCCAAGCT	RT-qPCR	<i>Drosophila</i>
<i>mbl rev</i>	CGATTTTGCTCGTTAGCGTTT	RT-qPCR	<i>Drosophila</i>
<i>mhc fwd</i>	CCAGGAGCGCAACGCCAAGT	RT-qPCR	<i>Drosophila</i>
<i>mhc rev</i>	GCGGGCATCCTCCTCCTGAGT	RT-qPCR	<i>Drosophila</i>
<i>rp49 fwd</i>	GGATCGATATGCTAAGCTGTGCGACA	RT-qPCR/RTPCR	<i>Drosophila</i>
<i>rp49 rev</i>	GGTGCCTTGTTCGATCCGTAACC	RT-qPCR/RTPCR	<i>Drosophila</i>
<i>serca fwd</i>	GCAGATGTTCTCGATGTGCG	RT-qPCR	<i>Drosophila</i>
<i>serca rev</i>	CGTCCTCCTCACATTAC	RT-qPCR	<i>Drosophila</i>
<i>CAPZB fwd</i>	GGAGAAGGATGAAACTGTGAGTG	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>CAPZB rev</i>	CAGAGGTTTAGCATTGCTGCT	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>CSNK1D fwd</i>	GATACCTCTCGCATGTCCACCTCACA	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>CSNK1D rev</i>	GCATTGTCTGCCCTTCACAGCAAT	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>DMD fwd</i>	GTGAGGAAGATCTTCTCAGTCC	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>DMD rev</i>	CTCCATCGCTCTGCCCAAATC	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>GAPDH fwd</i>	CATCTTCCAGGAGCGAGATC	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>GAPDH rev</i>	GTTACACCCATGACGAACAT	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>LIMCH1 fwd</i>	CGGAAGCTGCCAGATGTGAAGAAG	RT-qPCR	<i>homo sapiens</i>
<i>LIMCH1 rev</i>	CCTCCTCACACCGCATGTCAAA	RT-qPCR	<i>homo sapiens</i>
<i>MBNL1 (e5) fwd</i>	AGGGAGATGCTCTCGGGAAAAGTG	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>MBNL1 (e5) rev</i>	GTTGGCTAGAGCCTGTTGGTATTGAAAATAC	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>MBNL1 (e7) fwd</i>	GCTGCCCAATACCAGGTCAAC	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>MBNL1 (e7) rev</i>	TGGTGGGAGAAATGCTGTATGC	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>MBNL2 (e5) fwd</i>	ACAAGTGACAACACCGTAACCG	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>MBNL2(e5) rev</i>	TTTGGTAAAGGATGAAGAGCACC	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>SPTAN1 fwd</i>	GATTGGTGGAAAGTGAAGTGAACGAT	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>SPTAN1 rev</i>	TGATCCATTGCTGTAGTTCATTCCG	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>cTNT fwd</i>	ATAGAAGAGGTGGTGAAGAGTAC	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>
<i>cTNT rev</i>	GTCTCAGCCTCTGCTTCAGCATCC	RT-PCR	<i>homo sapiens</i>

Primers sequence	Sequence (5' → 3')	RT-qPCR/RTPCR	Species
<i>Add1 fwd</i>	GGATGAGACAAGAGAGCAGAAAGAGAAGA	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Add1 rev</i>	CTGGGAAGGCAAGTGCTTCTGAA	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Ank2 fwd</i>	GAACGTGGTTCTCCGATTGT	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Ank2 rev</i>	CGTCTCCTGGGGTATGTCAG	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Atp2a1 fwd</i>	GCTCATGGTCCTCAAGATCTCAC	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Atp2a1 rev</i>	GGGTCAGTGCCTCAGCTTTG	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Capzb fwd</i>	GCACGCTGAATGAGATCTACTTTG	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Capzb rev</i>	CCGGTTAGCGTGAAGCAGAG	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Clasp2 fwd</i>	GTTGCTGTGGGAAATGCCAAGAC	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Clasp2 rev</i>	GCTCCTTGGGATCTTGCTTCTCTTC	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Cln1 fwd</i>	GTCCTCAGCAAGTTTATGTCC	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Cln1 rev</i>	GAATCCTCGCCAGTAATTCC	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>HSA fwd</i>	ACGGGTGCGTGGTGTCTC	RT-qPCR	<i>mus musculus</i>
<i>HSA rev</i>	GGTCAGGATACCTCTCTTGCT	RT-qPCR	<i>mus musculus</i>
<i>Gapdh fwd</i>	ATCAACGGGAAGCCCATCAC	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Gapdh rev</i>	CTTCCACAATGCCAAAGTTGT	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Limch1 fwd</i>	CGGAAGTTGCCAGATGTGAAGAAA	RT-qPCR	<i>mus musculus</i>
<i>Limch1 rev</i>	CCTCCTCACACCGCATGTCAAA	RT-qPCR	<i>mus musculus</i>
<i>Mfn2 fwd</i>	AGCCATGTCCACGATGCCCA	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Mfn2 rev</i>	ATGTAGGCCCCAGCTGCTCAA	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Nfix fwd</i>	TCGACGACAGTGAGATGGAG	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Nfix rev</i>	CAAACCTCTCAGCGAGTCC	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Spna2 fwd</i>	GATTGGTGGAAAGTGGAAGTGAATGAC	RT-PCR	<i>mus musculus</i>
<i>Spna2 rev</i>	TGATCCACTGCTGTAACCTCGTTTGCT	RT-PCR	<i>mus musculus</i>

References

1. Marek KW, *et al.* (2000) A genetic analysis of synaptic development: pre- and postsynaptic dCBP control transmitter release at the *Drosophila* NMJ. *Neuron* 25(3):537-547.
2. Llamusi B, *et al.* (2013) Muscleblind, BSF and TBPH are mislocalized in the muscle sarcomere of a *Drosophila* myotonic dystrophy model. *Dis Model Mech* 6(1):184-196.
3. Hunt LC & Demontis F (2013) Whole-mount immunostaining of *Drosophila* skeletal muscle. *Nat Protoc* 8(12):2496-2501.
4. Chakraborty M, *et al.* (2018) Daunorubicin reduces MBNL1 sequestration caused by CUG-repeat expansion and rescues cardiac dysfunctions in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy. *Dis Model Mech* 11(4).
5. Wheeler TM, *et al.* (2009) Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science* 325(5938):336-339.
6. Dobin A, *et al.* (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29(1):15-21.
7. Liao Y, Smyth GK, & Shi W (2013) The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res* 41(10):e108.
8. Robinson MD, McCarthy DJ, & Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26(1):139-140.
9. Li B & Dewey CN (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics* 12:323.
10. Yu G, Wang LG, Han Y, & He QY (2012) clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OmicS : a journal of integrative biology* 16(5):284-287.
11. Houseley JM, *et al.* (2005) Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 14(6):873-883.
12. Babcock DT & Ganetzky B (2014) An improved method for accurate and rapid measurement of flight performance in *Drosophila*. *J Vis Exp* (84):e51223.
13. Arandel L, *et al.* (2017) Immortalized human myotonic dystrophy muscle cell lines to assess therapeutic compounds. *Dis Model Mech* 10(4):487-497.
14. Pellegrini P, *et al.* (2014) Acidic extracellular pH neutralizes the autophagy-inhibiting activity of chloroquine: implications for cancer therapies. *Autophagy* 10(4):562-571.
15. Fernandez-Costa JM, *et al.* (2013) Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in *Drosophila* that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum Mol Genet* 22(4):704-716.
16. Gonzalez AL, *et al.* (2017) In silico discovery of substituted pyrido[2,3-d]pyrimidines and pentamidine-like compounds with biological activity in myotonic dystrophy models. *PLoS One* 12(6):e0178931.
17. Mankodi A, *et al.* (2000) Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289(5485):1769-1773.

18. Kanadia RN, *et al.* (2006) Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(31):11748-11753.
19. Ketley A, *et al.* (2014) High-content screening identifies small molecules that remove nuclear foci, affect MBNL distribution and CELF1 protein levels via a PKC-independent pathway in myotonic dystrophy cell lines. *Hum Mol Genet* 23(6):1551-1562.

-Artículo 2-

miR-7 Restores Phenotypes in Myotonic Dystrophy Muscle Cells by Repressing Hyperactivated Autophagy

Maria Sabater-Arcis,^{1,2,3} Ariadna Bargiela,^{1,2,3} Denis Furling,⁴ and Ruben Artero^{1,2,3}

¹Translational Genomics Group, Incliva Health Research Institute, Valencia 46100, Spain; ²Interdisciplinary Research Structure for Biotechnology and Biomedicine (ERI BIOTECMED), University of Valencia, Valencia 46100, Spain; ³CIPF-INCLIVA Joint Unit, Valencia 46012, Spain; ⁴Sorbonne Université, Inserm, Association Institut de Myologie, Centre de Recherche en Myologie, Paris 75013, France

Unstable CTG expansions in the 3' UTR of the *DMPK* gene are responsible for myotonic dystrophy type 1 (DM1) condition. Muscle dysfunction is one of the main contributors to DM1 mortality and morbidity. Pathways by which mutant *DMPK* trigger muscle defects, however, are not fully understood. We previously reported that *miR-7* was downregulated in a DM1 *Drosophila* model and in biopsies from patients. Here, using DM1 and normal muscle cells, we investigated whether *miR-7* contributes to the muscle phenotype by studying the consequences of replenishing or blocking *miR-7*, respectively. Restoration of *miR-7* with agomiR-7 was sufficient to rescue DM1 myoblast fusion defects and myotube growth. Conversely, oligonucleotide-mediated blocking of *miR-7* in normal myoblasts led to fusion and myotube growth defects. *miR-7* was found to regulate autophagy and the ubiquitin-proteasome system in human muscle cells. Thus, low levels of *miR-7* promoted both processes, and high levels of *miR-7* repressed them. Furthermore, we uncovered that the mechanism by which *miR-7* improves atrophy-related phenotypes is independent of MBNL1, thus suggesting that *miR-7* acts downstream or in parallel to MBNL1. Collectively, these results highlight an unknown function for *miR-7* in muscle dysfunction through autophagy- and atrophy-related pathways and support that restoration of *miR-7* levels is a candidate therapeutic target for counteracting muscle dysfunction in DM1.

INTRODUCTION

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is an autosomal-dominant neuromuscular disease with multisystemic and variable symptoms. In the course of the disease, dysfunction is observed in many organs and tissues, specifically skeletal, cardiac, and smooth muscles and the CNS.¹ These dysfunctions lead to characteristic symptoms such as cardiac conduction defects, muscle myotonia with distress, neuropsychological abnormalities, muscle weakness, and atrophy.² The leading cause of mortality is sudden death due to cardiac conduction problems, arrhythmias, and respiratory failure as a result of muscle wasting.

The genetic cause of the disorder is an unstable expansion of non-coding CTG repeats located within the 3' UTR of the *DM1 protein ki-*

nase (DMPK) gene. Mutant *DMPK* transcripts are retained in the nucleus and form ribonuclear foci that are a histopathological hallmark of the disease. Chief among sequestered CUG-binding proteins are the Muscleblind-like proteins (MBNL1, 2, and 3). While MBNL1 controls fetal-to-adult splicing and polyadenylation transitions in muscle and MBNL2 seems to serve a similar role in the brain,³ MBNL3 deficit results in progressive impairment of muscle regeneration⁴ and age-associated pathologies observed in DM1.⁵ CUGBP Elav-like family member 1 (CELF1) regulates alternative splicing antagonistically to MBNL1. In contrast to MBNL1, CELF1 is not sequestered into ribonuclear foci but is hyper-activated and stabilized in the cell nucleus.⁶

The mechanisms underlying muscle atrophy remain largely unknown. Atrophy has been linked to increased activity and stability of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) by CELF1 overactivation.⁷ Indeed, mice that underwent early inhibition of GSK3 β exhibited reduced muscle atrophy.⁸ Moreover, defects in alternative exon regulation of *dystrophin (DMD)* were linked to defects in muscle architecture and organization, which are characteristic features of dystrophic DM1 skeletal muscles.⁹ Additionally, it was demonstrated that embryonic M2 isoform of pyruvate kinase (*PKM2*), a key enzyme contributing to the Warburg effect in cancer, is significantly induced in DM1 tissue and mouse models owing to aberrant splicing. Authors suggest that Pkm2 re-expression in skeletal muscle disrupts the metabolic homeostasis and may lead to energy deficits associated with muscle weakness and wasting.¹⁰

However, evidence suggests that other processes might be contributing to muscle wasting in DM1. Specifically, autophagy and the ubiquitin-proteasome system are two main processes that mediate the degradation of cellular components in order to recycle them and obtain energy, thus maintaining muscle homeostasis. Autophagy

Received 21 July 2019; accepted 8 November 2019;
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.11.012>

Correspondence: Ariadna Bargiela, Translational Genomics Group, Interdisciplinary Research Structure for Biotechnology and Biomedicine (ERI BIOTECMED), Incliva Health Research Institute, Valencia 46100, Spain, and CIPF-INCLIVA Joint Unit, Valencia 46012, Spain
E-mail: ariadna.bargiela@uv.es



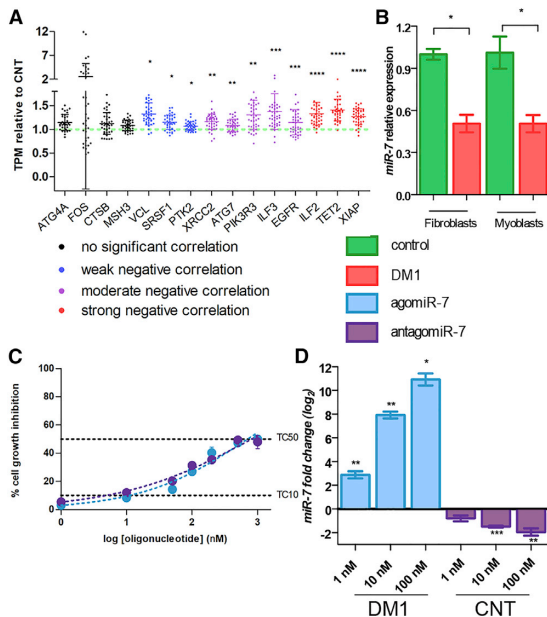


Figure 1. Involvement of *miR-7* in DM1
 (A) The graph represents *miR-7* target genes that are significantly overexpressed in DM1 biopsies (according to Wang et al.²³). Asterisks show the significance of the Pearson's correlation coefficient between ankle dorsiflexion strength and expression level of each gene. (B) Relative expression levels of *miR-7* measured by qRT-PCR (calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method) in human CNT (green) and DM1 (red) fibroblast and myoblast cells. (C) Cell growth inhibition assay by MTS method. Human CNT myoblasts were transfected with increasing concentrations of agomiR-7 (blue) and antagomiR-7 (purple) ($n = 4$). TC10 (11.15 nM for agomiR-7 and 4.92 nM for antagomiR-7) and TC50 (708.3 nM for agomiR-7 and 816.9 nM for antagomiR-7) were obtained using the least-squares non-linear regression model. (D) Logarithmic representation on base 2 (\log_2) of the qRT-PCR quantification of *miR-7* levels in human CNT (blue) and DM1 (purple) myoblasts after transfection with 1, 10, and 100 nM of agomiR-7 or antagomiR-7, respectively. Transfection of myoblasts with antagomiR-7 or agomiR-7 led to a reduction or increase of *miR-7* levels in a dose-dependent manner compared to CNT and DM1 myoblasts transfected with scramble versions of antagomiR and agomiR at the same concentration, respectively ($n = 3$). In (A) and (B), *U1* and *U6* snRNAs were used as reference genes ($n = 3$). Error bars indicate \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ according to Student's *t* test.

was demonstrated to be overactivated in DM1-derived primary myoblasts concomitantly with apoptosis, leading to loss of myotubes.¹¹ Consistently, autophagic markers were upregulated in mice expressing 960 CUG repeats that also exhibited marked muscle atrophy.¹² In a heat-shock-induced adult-onset DM1 *Drosophila* model, hyperactivation of autophagy and apoptosis are partly responsible for muscle atrophy, since inhibition of either pathway was sufficient to rescue muscle atrophy.¹³ The defective activity of the ubiquitin-proteasome system was described in muscles of transgenic DM1 mice that displayed progressive muscle wasting and weakness due to Fbx032 and/or Murf1 overexpression.¹⁴ Pathological activation of AMPK or

TWEAK/Fn14 signaling was also reported in skeletal muscles and heart of a murine DM1 model and in tissues from DM1 patients.^{15,16}

Additional studies found that the expression of several microRNAs (miRNAs) is altered in DM1 human skeletal and heart muscle and also in DM1 muscle cells.^{17–19} Furthermore, misexpression was reported for 20 miRNAs in DM1 model flies. Among them, *miR-7* was under-expressed, and target transcripts had higher expression in DM1 muscle tissue, such as the autophagy-related gene *ATG4A*.²⁰ Interestingly, recent studies reported that *miR-7* represses autophagy through the upregulation of *mTOR* signaling and direct inhibition of some autophagy genes (*ATG7*, *ULK2*, and *ATG4A*).²¹ However, the role and relevance of *miR-7* downregulation in DM1 pathogenic mechanisms still remain unknown.

Considering these previous data, here we shed light on this problem by demonstrating that depleted levels of *miR-7* trigger DM-related phenotypes through an MBNL1-independent mechanism such as increased autophagy and the ubiquitin-proteasome system, which are pathways known to contribute to muscle atrophy.²² Importantly, replenishing of *miR-7* levels through the use of chemically modified agomiRs was sufficient to repress autophagy and muscle atrophy markers and to rescue differentiation parameters such as fusion index and myotube diameter. These results provide proof of concept that the modulation of *miR-7* levels could be a valid therapeutic approach to muscle atrophy in DM1.

RESULTS

miR-7 Targets Are Overexpressed in DM1 Muscle Biopsies and Correlate with Muscle Weakness

The first test to our hypothesis that *miR-7* levels were relevant to muscle phenotypes in DM1 was to extract expression data of direct *miR-7* target transcripts from existing datasets and to correlate their levels with functional data. To this end, we resorted to the DMseq database that includes information on ankle dorsiflexion strength from 40 DM1 patients and 10 controls.²³ From these data, the authors calculated the correlation between force and gene expression results from RNA-sequencing (RNA-seq) experiments. Based on the miRtarbase²⁴ and DMseq databases, we first selected all confirmed *miR-7* targets according to at least two of the following methods: 3' UTR luciferase reporter assays, western blot, or qRT-PCR. From these genes, we selected those that were significantly overexpressed in DM1 patients, which further supported that they were under direct *miR-7* repression, and obtained a total of 11. We also included three predicted targets of *miR-7* that were studied by Fernandez-Costa et al.²⁰ and *ATG7*, since the binding of *miR-7* to its 3' UTR has been demonstrated.²¹ Of the 15 *miR-7* targets analyzed, 11 showed a statistically significant negative correlation (4 weak, 5 moderate, and 3 strong, according to the classification by Evans²⁵) between gene expression and dorsiflexion force, that is, the higher the overexpression, the lower the force of the tibialis anterior muscle (Figure 1A; Table S1). Therefore, these results from DM1 tibialis muscle biopsies provide critical support to the hypothesis that *miR-7* levels may impinge on muscle strength, which is intimately related to muscle atrophy and weakness.

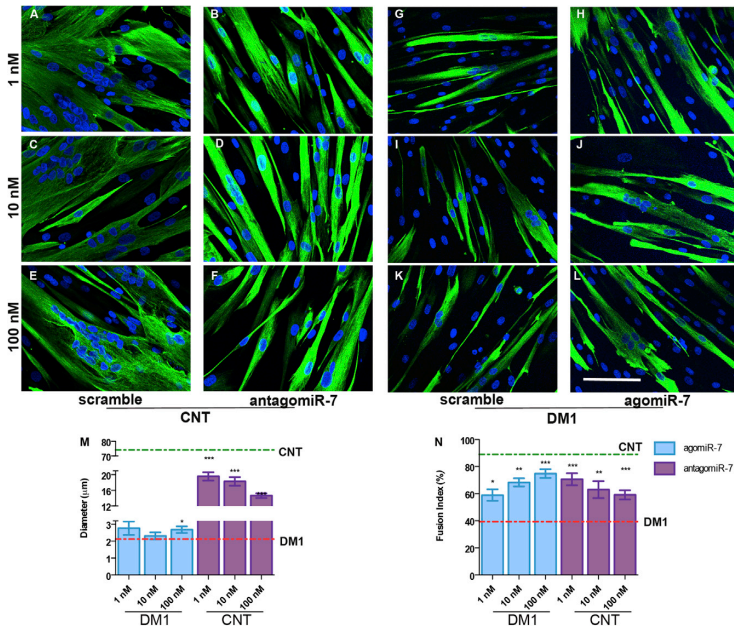


Figure 2. Raising *miR-7* Levels with agomiR Oligonucleotides Improves DM1 Myotube Defects in Fusion Capacity and Diameter

(A–L) Representative confocal images of Desmin-immunostained (green) human myoblasts transfected for 7 days after antagomiR-7 transfection into CNT cells (B, D, and F) or agomiR-7 transfection into DM1 cells (H, J, and L) and their respective scramble controls (A, C, and E for antagomiR; G, I, and K for agomiR) at 1, 10, and 100 nM. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 100 µm. (M) Quantification of myotube diameter of CNT (purple) and DM1 (blue) myoblasts treated with the indicated concentrations of antagomiR-7 and agomiR-7, respectively. Dashed lines represent the mean of the three concentrations (1, 10, 100 nM) from CNT (73.54 ± 3.77 ; green) or DM1 (2.24 ± 0.09 ; red) myoblasts transfected with scramble versions (N). Analysis of the myogenic fusion index of transdifferentiated CNT (purple) and DM1 (blue) human myoblasts transfected with antagomiR-7 or agomiR-7, respectively ($n = 5-7$ images in each condition; mean CNT scrambles, 89.00 ± 1.58 ; green dashed line, 39.37 ± 2.68 ; mean DM1 scrambles, red dashed line). The statistical analysis was performed comparing each concentration of agomiR-7 or antagomiR-7 to its respective scramble. Data were expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ according to Student's t test.

miR-7 Is Downregulated in 7-Day Transdifferentiated DM1 Myoblasts

Given the strong correlation between *miR-7* target dysregulation and muscle weakness in human-derived samples, we set out to establish a cell model in which we investigate the molecular basis of such a relationship. We analyzed *miR-7* levels in DM1 fibroblasts expressing 1300 CTG repeats²⁶ and in fibroblasts transdifferentiated into multinucleated myotubes for 7 days (Transdifferentiated myoblasts; TDM; Figure 1B). In both cases, only about half the normal levels of *miR-7* were detected in DM1 cells. We designed two chemically modified oligonucleotides as tools to investigate the potential roles of *miR-7* in DM1 muscle dysfunction: a mimic of *miR-7* (agomiR-7) and a *miR-7* blocker (antagomiR-7; Figure 1C) and assayed their toxicity profile in cells. The half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) were 708.3 nM for agomiR-7 and 816.9 nM for antagomiR-7, indicating that the modified oligonucleotides were slightly toxic and they were only safe for cells at concentrations below 100 nM, at which more than 80% of cells were viable. To replenish the *miR-7* deficit, we transfected DM1 TDMs with agomiR-7 and with control (scramble) oligonucleotides at 1, 10, and 100 nM (Figure 1D, blue bars). We observed a dose-dependent increase in *miR-7* levels when compared to cells treated with the scramble at the same concentration, achieving a fold increase of over 2.100 at the highest concentration. Conversely, we decided to block *miR-7* in CNT (healthy control cells) TDMs to assess whether a lack of *miR-7* contributed to characteristic DM1 muscle phenotypes. CNT TDMs were transfected with *miR-7* antagonists and scramble controls at 1, 10, and 100 nM. After that, we quantified by qRT-PCR *miR-7* levels and

observed a dose-dependent reduction of the miRNA that reached 75% of normal at 100 nM of antagomiR-7 (Figure 1D, purple bars). Note that antagomiR blocks miRNA function but not necessarily destroys it. To confirm that both the mimic and the inhibitor were effectively entering into the cells, we transfected CNT TDMs with Cy3-labeled agomiR-7 and antagomiR-7 (Figure S1). A very faint red signal was observed when cells were treated with the oligonucleotides at the lowest concentration. As expected, stronger red fluorescence was detected at 10- and 100-nM modified oligonucleotides with the number of cells being very similar in all conditions.

miR-7 Supplementation Rescues Differentiation Defects in DM1 Muscle Cells

It was previously described that DM1 myoblasts form smaller myotubes and have reduced fusion capacity under differentiation conditions.²⁶ We studied the contribution of *miR-7* to these phenotypes by restoring *miR-7* levels, or reducing them, in DM1 or CNT TDMs, respectively (Figure 2). After 7 days of differentiation, TDMs were stained with an antibody against Desmin, a class-III intermediate filament protein found in muscle cells that integrate the sarcolemma, Z-disk, and nuclear membrane, thus regulating sarcomere architecture and widely used as a marker of myogenic cells. DM1 TDMs had reduced diameter and fusion index compared to CNT transfected with their corresponding scramble (Figures 2G, 2I, and 2K and 2A, 2C, and 2E). Quantification of both parameters showed that DM1 TDMs had a smaller diameter than CNT, with mean values of 2.12 and 74 µm, respectively, whereas fusion index was also significantly lower (around 49.6% of normal; reference values denoted as

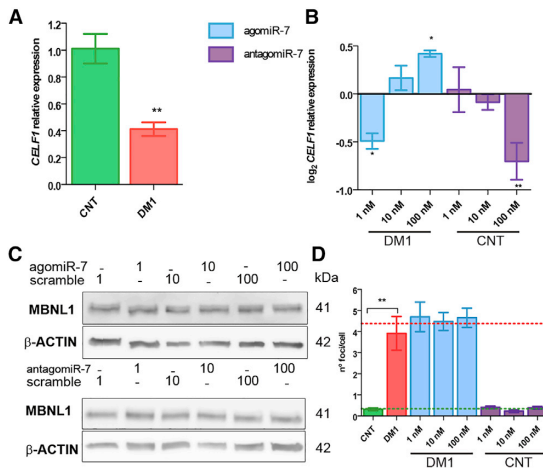


Figure 3. Modulation of *miR-7* Levels in DM1 Myoblasts Produces Changes in *CELF1* Expression, but Not in *MBNL1*

(A) Relative expression levels of *CELF1* measured by qRT-PCR in CNT (green) and DM1 (red) TDMs. Logarithmic representation on base 2 (log₂) of the qRT-PCR quantification of *CELF1* (B) relative expression levels in CNT (purple) and DM1 (blue) TDMs transfected with 1, 10, 100 nM of antiagomiR-7 or agomiR-7. Results for each concentration of agomiR-7 or antiagomiR-7 (in control TDMs) were normalized to their corresponding scramble concentration. *GAPDH* expression levels were used as reference gene in (A) and (B) (n = 3). Data were obtained according to the 2^{-ΔΔCt} method. (C) Western blot of MBNL1 protein in DM1 myoblasts transfected with agomiR-7 and CNT transfected with antiagomiR-7. β-ACTIN was used as endogenous control (n = 3). (D) Quantification of foci number per cell obtained from *in situ* hybridization of DM1 TDMs transfected with the indicated concentrations of *miR-7* mimic (blue bars) or CNT TDMs treated with anti*miR-7* (purple bars). Dashed lines represent the mean of the three concentrations (1, 10, 100 nM) from CNT (4.398 ± 0.457; green) or DM1 (0.347 ± 0.087; red) myoblasts transfected with scramble versions. The bar graphs show mean ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 according to Student's t test.

red and green dotted lines in Figures 2M, 2N and S2). We observed that increasing the levels of *miR-7* in DM1 cells had a mild effect on the size of the myotubes, since the rescue was only statistically significant at 100 nM of agomiR. However, restoring the levels of the miRNA dramatically raised the fusion index at all three concentrations, reaching an increase of 90% when compared to the fusion index of scramble controls (Figures 2M and 2N, blue bars), which indicates an improved fusion capacity. On the contrary, a dose-dependent worsening of both parameters was observed when *miR-7* was inhibited in CNT TDMs (Figures 2M and 2N, purple bars). Taken together, these results support that while *miR-7* was necessary for both myoblast growth and fusion, only extra *miR-7* was sufficient to strongly rescue the fusion index in DM1 myoblasts. To confirm that the effect on cell fusion alterations was mediated by autophagy regulation, we inhibited or boosted this pathway by chloroquine or metformin treatment, respectively, and analyzed the fusion index (Figure S3). Results showed that this parameter was significantly improved when autophagy was blocked, and the opposite effect

was observed when the pathway was induced by metformin treatment.

Restoration of *miR-7* Levels Ameliorates DM1 Phenotypes in an MBNL1-Independent Manner

To further investigate the role of *miR-7* in DM1, we analyzed the consequences of its modulation on two critical players of the disease: the *CELF1* and *MBNL1* genes. *CELF1* transcripts were found to respond to *miR-7* modulation so that in *miR-7*-deprived DM1 TDMs or normal TDMs transfected with antiagomiR-7, *CELF1* was downregulated, whereas treatment with a *miR-7* mimic showed a dose-dependent rescue of the said defect (Figures 3A and 3B). Regulation of *CELF1* levels by *miR-7* was most likely indirect, since no significant predictions of binding were found in its 3' UTR using the miRtarget and miRanda algorithms. In contrast, *miR-7* had no effect on *MBNL1* protein levels in cells exposed to the scramble, mimic, or inhibitor oligonucleotides (Figure 3C; Figure S4A). Considering the possibility that *miR-7* could have an effect on the accumulation of mutant *DMPK* transcripts, we quantified ribonuclear foci by *in situ* hybridization. No significant differences in foci number were detected between DM1 TDMs treated with scramble and agomiR-7 (Figure 3D). We also analyzed the splicing pattern of five genes that were previously described to be regulated by *MBNL1*, *ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ transporting 1 (ATP2A1)*,²⁷ *bridging integrator 1 (BIN1)*,²⁸ *cardiac troponin T (cTNT)*,²⁹ *DMD*,³⁰ and insulin receptor (*INSR*),³¹ or by *MBNL2*, *spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 (SPTAN-1)*.³² No effect was detected in any of the experimental conditions (Figure S4B). These data are consistent with unchanged *MBNL1* protein levels and foci number and suggest that *miR-7* acts downstream or in parallel to *MBNL1* in the DM1 pathogenesis pathway (Figure S5).

miR-7 Is a Regulatory Node for Hyperactivated Autophagy in DM1 TDMs

Deregulated autophagy was previously reported in different DM1 models, and its restoration was sufficient to recover some DM1-impaired phenotypes such as muscle mass or lifespan.^{11,13,16,33} Considering this previous information and the demonstration that *miR-7* regulates *ATG4A*,²¹ an autophagy regulatory gene that promotes autophagosome biogenesis,³⁴ we decided to measure autophagy levels in DM1 TDMs and the consequences of the modulation of *miR-7* levels on that phenotype. Autophagy was detected using LysoTracker, which is a stain with high selectivity for acidic organelles, such as digesting autophagolysosomes. CNT and DM1 TDMs were transfected with antiagomiR-7 and agomiR-7, respectively, using a scramble oligonucleotide as a negative control (Figure 4). Strong green fluorescence was detected in DM1 TDMs treated with the scramble, whereas only a few green puncta were observed in CNT TDMs (compare Figures 4A, 4C, and 4E and Figures 4G, 4I, and 4K), indicating increased autophagy in DM1 cells. When *miR-7* was inhibited in CNT TDMs, a pronounced increase of the green fluorescence was detected, even at 1 nM (Figures 4A–4F). On the contrary, the transfection of DM1 TDMs with the *miR-7* mimic generated a

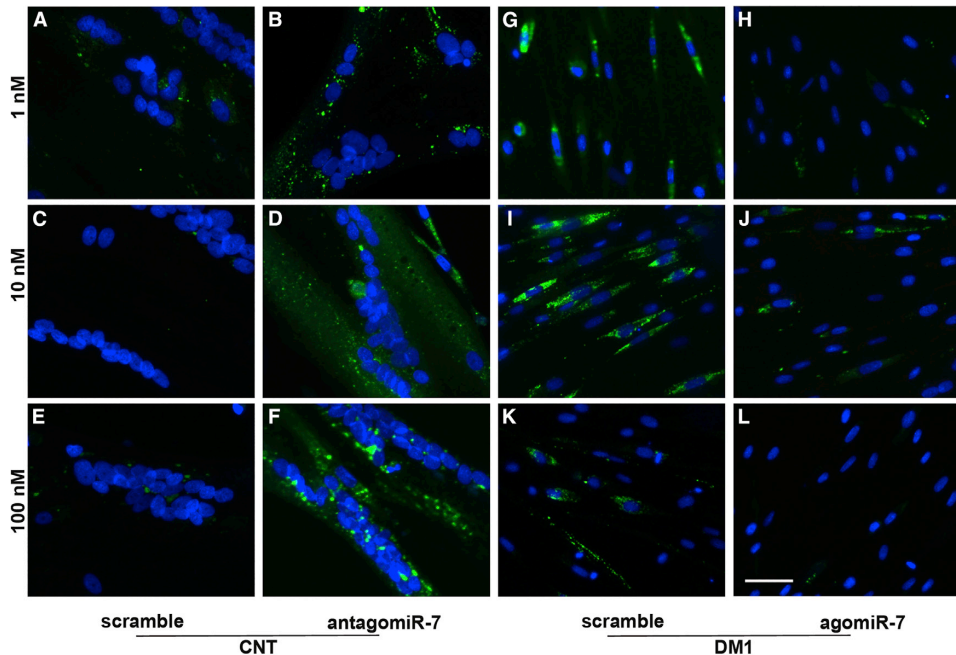


Figure 4. Restoring *miR-7* Levels Rescues Hyperactivated Autophagy in DM1 Myoblasts

(A–L) Fluorescent images of LysoTracker staining (green) in human CNT (A–F) and DM1 TDMs (G–L) treated with antagonomiR-7 at 1 (B), 10 (D) and 100 nM (F) or agomiR-7 at 1 (H), 10 (J) and 100 nM (L), respectively, and their corresponding scramble controls for the antagonomiR-7 1 (A), 10 (C) and 100 nM (E) or for the agomiR-7 1 (G), 10 (I) and 100 nM (K). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar, 50 μ m.

dramatic reduction of autophagy levels at all three tested concentrations (Figures 4G–4L).

To reinforce these observations, we analyzed by qRT-PCR the expression of six autophagy-related genes: *ATG2B*, *ATG3*, *ATG4A*, *ATG5*, *ATG7*, and *VPS34*. Importantly, we observed that all these genes were overexpressed in DM1 TDMs (Figure 5A). In contrast, in DM1 TDMs, a significant rescue of the expression levels of all the studied genes was achieved upon agomiR-7 transfection (Figures 5B–5G, blue bars). On the contrary, blocking of *miR-7* in CNT TDMs consistently enhanced expression of all five genes, yet each responded differently to varying concentrations of anti-*miR-7* (Figures 5B–5G, purple bars).

Autophagy activation in DM1 TDMs and response to *miR-7* was also assessed at the protein level. Amounts of ATG4A proteins were dramatically lower after the transfection of DM1 TDMs with a *miR-7* mimic, achieving values similar to those obtained in CNT cells (green dotted line, Figure 6A). Consistent results were obtained when *miR-7* was blocked in CNT TDMs, as ATG4A levels showed a potent increase of around 80%–100% compared to the same cells treated with the scramble at the same concentration. Similar results, although milder, were obtained after ATG7 quantification (Figure 6B). P62 is

a scaffold protein that delivers proteins committed for lysosomal degradation to the autophagosome. Low levels of autophagic activity lead to the accumulation of P62, as the protein is degraded by autophagy itself.^{35,36} Our data indicate that the transfection of DM1 TDMs with agomiR-7 at 10 and 100 nM was sufficient to totally restore P62 levels. Even at 1 nM, there was a mild but significant rescue (Figure 6C, blue bars). On the contrary, the reduction of the *miR-7* in CNT TDMs showed a trend to reduce P62 at the highest concentration of the *miR-7* inhibitor, thus confirming the activation of the autophagy pathway. We next evaluated levels of soluble and autophagosome-associated LC3 (LC3I and II, respectively), since the conversion of LC3I into LC3II marks the accumulation of autophagosomes in the cells³⁷ (Figure 6D). We observed that increasing *miR-7* levels by transfection of 100 nM agomiR achieved a reduction of autophagy in DM1 TDMs. On the contrary, by blocking the *miR-7* in CNT TDMs, we observed an accumulation of LC3II at all three concentrations of the inhibitor compared to the same cells treated with scramble oligonucleotide. Finally, we tested the activation of AKT and AMPK by calculating the ratio of phospho(Ser473)-AKT to AKT and phospho(Thr)172 AMPK to AMPK. This is a relevant measure, as AKT and AMPK control both protein synthesis via mTOR and protein degradation (including autophagy) via the transcription factors of the FoxO family.^{38,39} We observed a

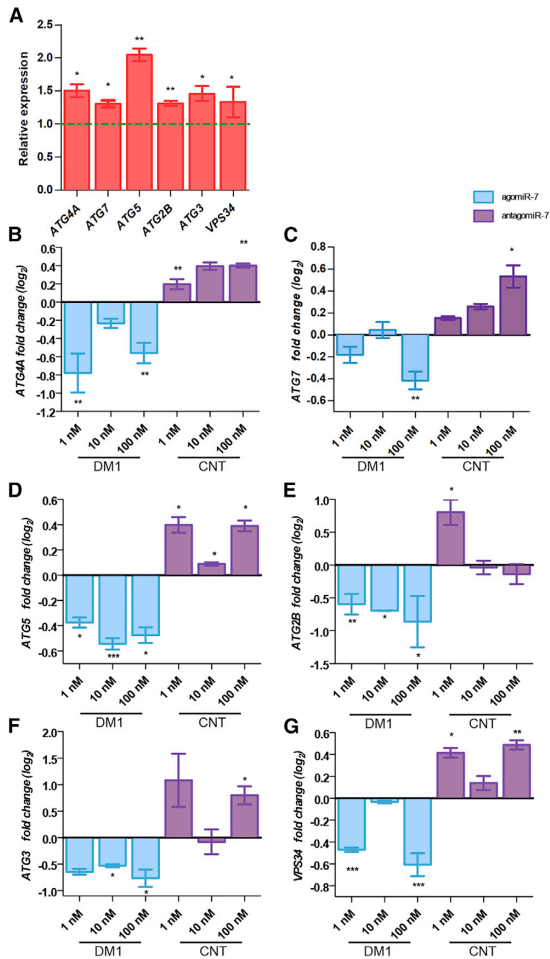


Figure 5. Impaired Expression of Autophagy-Related Genes Is Restored by Increasing *miR-7* Levels in DM1 Myoblasts

(A) Quantification of relative expression of autophagy-related genes (*ATG4A*, *ATG7*, *ATG5*, *ATG2B*, *ATG3*, and *VPS34*) in DM1 myoblasts by qRT-PCR using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Green dashed line indicates the relative expression levels of the genes in CNT myoblasts. Logarithmic representation on base 2 (\log_2) of the qRT-PCR quantification of (B) *ATG4A*, (C) *ATG7*, (D) *ATG5*, (E) *ATG2B*, (F) *ATG3*, and (G) *VPS34* in CNT (purple) and DM1 (blue) myoblasts transdifferentiated for 7 days after transfection with the indicated concentration of antiagomiR-7 (in control TDMs) or agomiR-7 (in DM1 TDMs), respectively. Gene expression levels were normalized to cells transfected with antiagomiR or agomiR scramble at each concentration. In all cases, *GAPDH* expression was used as reference gene ($n = 3$). Data were obtained using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The bar graphs show mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ according to Student's *t* test.

spectacular increase in the levels of p-AKT/AKT at 100 nM agomiR-7 in DM1 TDM achieving levels slightly higher than those obtained for CNT cells transfected with scramble oligonucleotide. Conversely,

CNT TDMs transfected with antiagomiR-7 lowered the ratio at all three tested concentrations, except for the 10 nM condition (Figure 6E). However, no differences in AMPK ratios were observed between CNT and DM1 TDM, nor even after *miR-7* modulation (Figure S6).

To further demonstrate the relevance of *miR-7* modulation on autophagy flux, we used tandem mCherry-GFP-tagged LC3 and mCherry-GFP-tagged P62 expression vectors. The rationale behind these constructs is that GFP signal is reduced in an acidic environment, whereas mCherry is more stable. In this way, the colocalization of GFP and mCherry fluorescence indicates a cellular compartment that has not fused with an acidic organelle (autophagosome), whereas mCherry signal in the absence of GFP fluorescence corresponds to an autophagosome vesicle that has fused with a lysosome, thus becoming an autolysosome.³⁷ Consistent with our previous results, when we simultaneously transfected DM1 TDM cells with the vector expressing mCherry-GFP-LC3 and the scramble oligonucleotide, the signal corresponding to mCherry was much stronger than that of GFP compared to CNT TDMs, thus supporting an enhanced autophagic flux in DM1 TDM (Figures 6F and 6H). Experimental manipulation of *miR-7* levels revealed a dramatically increased autophagy flux in the CNT TDMs upon *miR-7* blocking, generating a staining pattern comparable to that of the DM1 TDMs (Figure 6G). In contrast, experimental supply of *miR-7* mimic to DM1 model cells increased GFP signal over that of mCherry, indicating alleviation of the excessive autophagic flux of DM1 cells (Figure 6I). As a control, the cells were treated with chloroquine, a compound that blocks autophagy by preventing the formation of autolysosomes (Figure 6J). In this case, the expression pattern of the reporters was very similar to that observed after the addition of agomiR-7, supporting the hypothesis that the restoration of *miR-7* levels is sufficient to normalize autophagic activity in DM1 TDMs. Similar results were obtained when cells were transfected with the construct expressing mCherry-GFP-P62 (Figure S7).

Taken together, these data demonstrate that *miR-7* plays a crucial role in the negative regulation of the autophagic pathway, as its modulation was sufficient to significantly halt (agomiR-7 in DM1 TDMs) or activate (antiagomiR-7 in CNT TDMs) the process.

***miR-7* Restores Expression of Genes Involved in Muscle Atrophy**

Considering the impaired activation of AKT in DM1 TDMs (Figure 6E) and that AKT regulates transcription factors of the FoxO family, which subsequently regulate expression of genes involved in protein degradation, we decided to further analyze expression levels of several genes involved in these pathways. AKT1, AKT2, and AKT3 form the AKT family. In DM1 TDMs, we found that *AKT1* was down-regulated and its levels could be set back to normal by transfection with 100 nM agomiR-7 (Figures 7A and 7B). Consistent with these data, silencing of AKT1 increased autophagy marker LC3II in glioma cells.⁴⁰ *AKT1* transcript levels, however, remained unchanged upon blocking of *miR-7* activity in CNT TDMs. The FoxO family in skeletal muscle is comprised of three paralogs: FoxO1, FoxO3, and FoxO4.

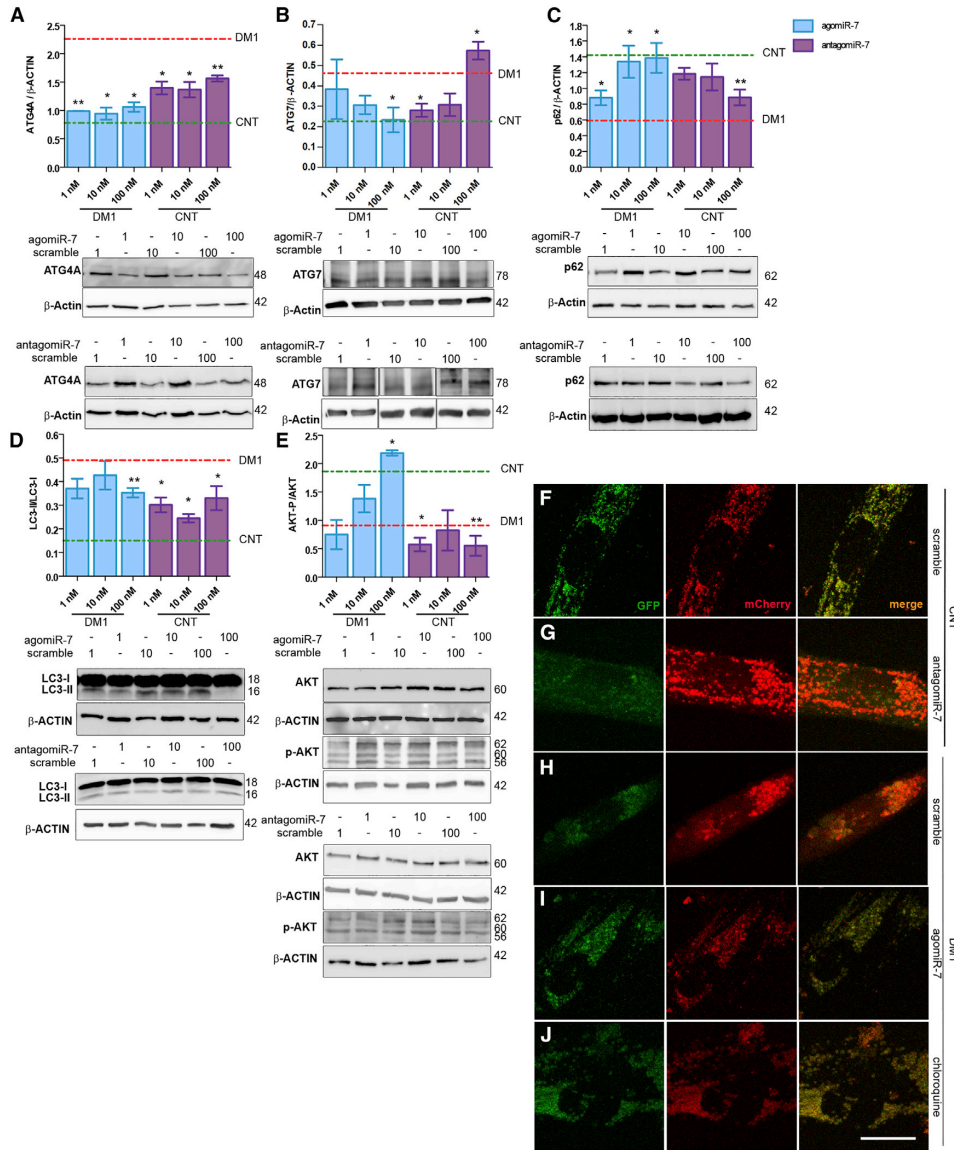


Figure 6. Positive *miR-7* Modulation Is Sufficient to Restore Autophagy-Related Protein Levels Altered in DM1 Myoblasts

Western blot analysis and representative blots of (A) ATG4A, (B) ATG7, (C) P62, (D) LC3-II/LC3-I ratio, and (E) AKT-P/AKT total protein levels in DM1 TDM (blue) treated with agomiR-7 and CNT TDM (purple) transfected with antagomiR-7 at the indicated concentrations. β-ACTIN was used as an endogenous control to normalize protein levels ($n = 3$). Dashed lines represent the mean of the three concentrations (1, 10, 100 nM) from CNT (0.787 ± 0.065 ; 0.226 ± 0.041 ; 1.421 ± 0.043 ; 0.148 ± 0.013 ; 1.861 ± 0.140 ; in A–E, respectively, green) or DM1 (2.265 ± 0.183 ; 0.462 ± 0.067 ; 0.596 ± 0.044 ; 0.499 ± 0.019 ; 0.910 ± 0.127 ; in A–E, respectively, red) TDMs transfected with scramble versions of the modified oligonucleotides. Representative confocal images of fluorescent LC3 puncta. CNT TDMs were cotransfected with mCherry-GFP-LC3 plasmid and 100 nM scramble oligonucleotide or antagomiR-7 (F and G). DM1 cells were cotransfected with the reporter plasmid and 100 nM scramble or agomiR-7 oligonucleotides (H and I). DM1 cells were also treated with 10 μM chloroquine for 16 h as a positive control of autophagy blockade (J). The merged images (yellow) show overlap of GFP-LC3 (green) and mCherry-LC3 (red). Scale bar represents 20 μm. Statistical analysis was performed comparing each concentration of agomiR-7 or antagomiR-7 with their respective scramble at a given concentration. The bar graphs show mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ according to Student's *t* test.

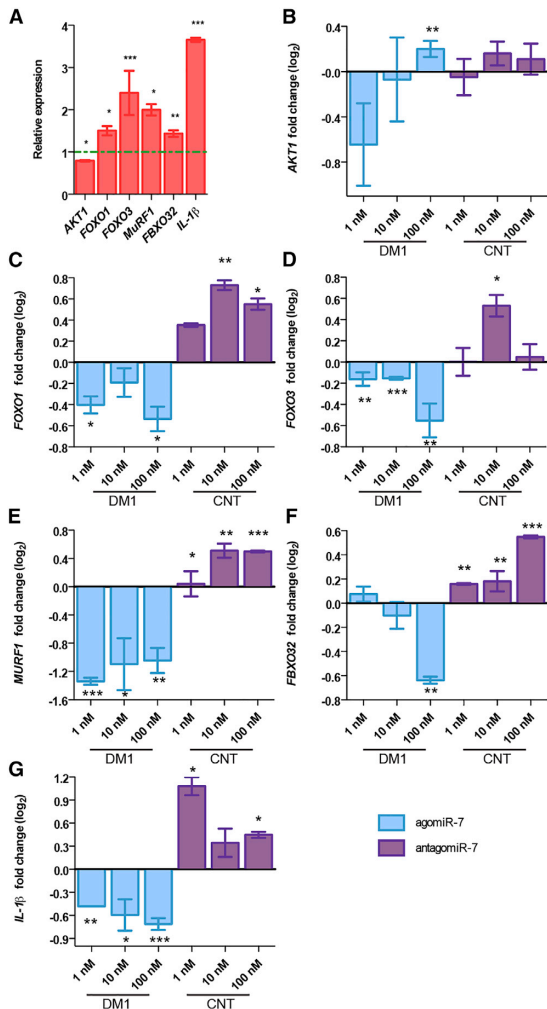


Figure 7. AgomiR-7 Rescues Expression Levels of Genes Involved in Muscle Atrophy
 (A) qRT-PCR analyses in 7-days DM1 TDMs of genes involved in signaling pathways of muscle degradation (*FOXO1*, *FOXO3*, *MuRF1*, *FBXO32*, *IL-1β*, and *AKT1*). Gene expression in DM1 TDMs was compared to the expression level of the corresponding gene in CNT TDMs (green dashed line). Logarithmic representation on base 2 (\log_2) of the qRT-PCR quantification of (B) *AKT1*, (C) *FOXO1*, (D) *FOXO3*, (E) *MuRF1*, (F) *FBXO32*, and (G) *IL-1β* in CNT (purple) and DM1 (blue) TDMs treated with three concentrations (1, 10, and 100 nM) of antagonomiR-7 and agomiR-7, respectively. Gene expression was normalized to cells transfected with antagonomiR or agomiR scrambles at the corresponding concentration. In all cases, *GAPDH* expression was used as reference gene ($n = 3$). Data were obtained using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The bar graphs show mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ according to Student's t test.

We quantified transcript levels of *FoxO1* and *FoxO3* and observed that they were abnormally overexpressed in DM1 TDMs, and these levels could be lowered upon transfection with a *miR-7* mimic (Figures 7A, 7C, and 7D, blue bars). We also tested the possibility of generating a DM1-like expression profile of *FoxO1* and *FoxO3* in CNT cells upon inhibition of *miR-7*, and we confirmed our hypothesis with different concentrations of antagonomiR-7. *AKT*, through negative regulation of the FoxO transcription factors, downregulates the expression of *FBXO32*, *MuRF1* (involved in protein degradation), and other autophagy-related genes such as *LC3* or *BNIP3*.⁴¹ Levels of *MuRF1* and *FBXO32* were quantified in DM1 TDMs and were found higher compared to CNT myoblasts. Both genes responded to *miR-7* manipulations as expected, and while agomiR-7 promoted lower expression, antagonomiR-7 reduced it (Figures 7A, 7E, and 7F).

Skeletal muscle inflammation is one of the most common symptoms in muscle atrophy.⁴² Specifically, activation of the innate immune response, as well as increased production of pro-inflammatory cytokine interleukin-1β (*IL-1β*) in plasma of DM1 patients were previously described.^{43,44} We decided to quantify the expression levels of *IL-1β* in our cell model as an additional atrophy marker. *IL-1β* expression in DM1 TDMs was upregulated compared to CNT, supporting the notion of an immune response alteration in DM1. Surprisingly, restoration of *miR-7* levels in DM1 TDMs yielded a significant downregulation of *IL-1β* in a dose-dependent manner. In contrast, antagonomiR-7 transfection in CNT increased the *IL-1β* expression at two of the three tested concentrations, thus mimicking a DM1-like phenotype (Figure 7G). Taken together, these results support the ability of *miR-7* to modulate several pathways that contribute to muscle atrophy, including ubiquitin-proteasome system.

***miR-7* Modulation Affects Primary HSA^{LR} Myoblast Fusion**

DM1 model mice that express 250 CTG repeat units in the context of a human skeletal actin gene (*HSA^{LR}*)^{45,46} reproduce several symptoms of the disease, such as myotonia and splicing defects, but fail to show overt muscle atrophy, according to several reports.^{27,28,45} To test the hypothesis that it is lack of *miR-7* under-expression in the model that prevents atrophy, we decided to modulate levels of *miR-7* by agomiR and antagonomiR administration in primary myoblasts isolated from diaphragm and gastrocnemius muscles of control (wild-type [WT]) and DM1 (*HSA^{LR}*) mice. First, we quantified *miR-7* levels and detected no significant differences in expression between WT and *HSA^{LR}* myoblasts derived from either of the analyzed muscles (Figure 8A). Of note, however, was the strong variability of *miR-7* levels among samples. Thus, we confirmed these data in diaphragm and gastrocnemius muscle samples from WT and *HSA^{LR}* mice, and we concluded that *miR-7* levels were normal in *HSA^{LR}* mice (Figure 8B). Then we treated WT myoblasts with antagonomiR-7 and *HSA^{LR}* cells with agomiR-7, both at 50 nM. Cells were also treated with their corresponding scramble versions. *miR-7* levels dramatically increased when *HSA^{LR}* myoblasts were treated with agomiR-7 (Figure 8C), while blocking of *miR-7* with the antagonomiR showed no effect on expression levels of the miRNA, as could be expected considering

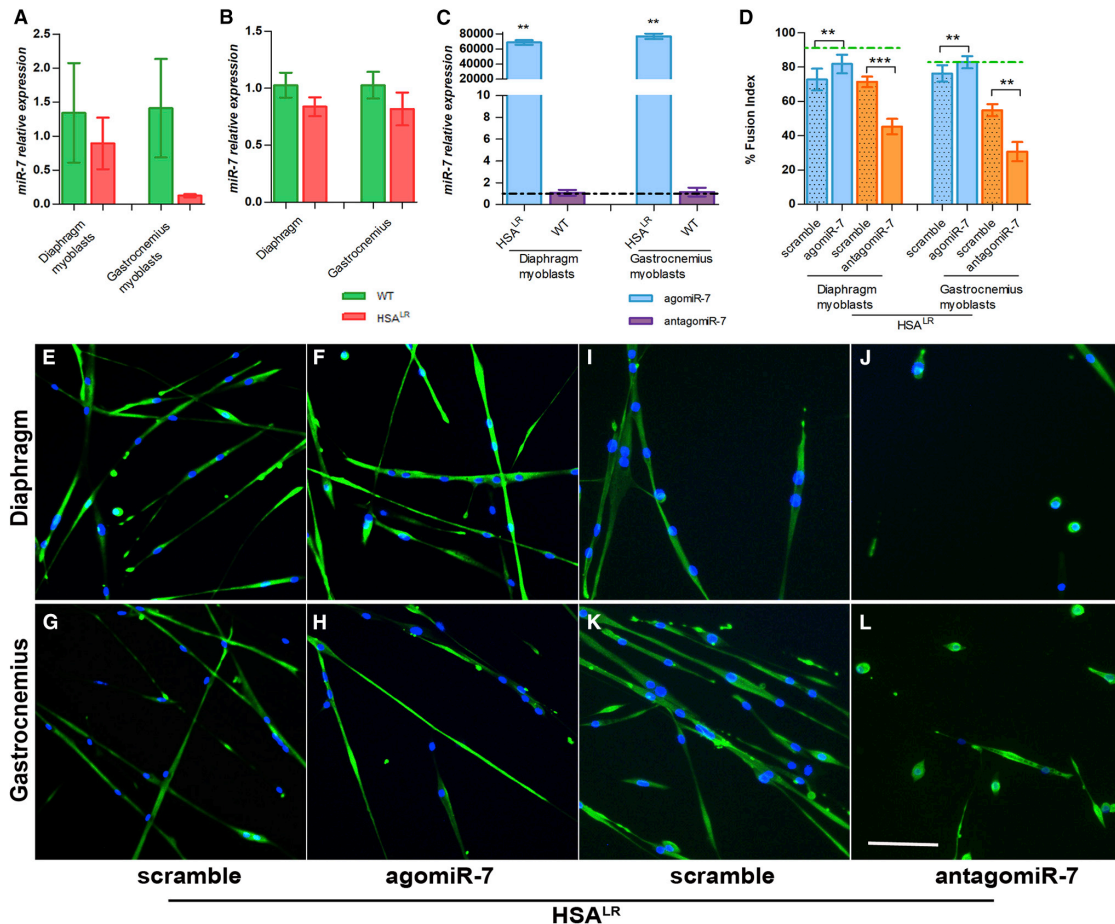


Figure 8. miR-7 Levels Affect the Fusion Capacity of Primary Myoblasts

Quantification by qRT-PCR of relative expression of *miR-7* in (A) WT and HSA^{LR} myoblasts from the indicated tissues and in (B) gastrocnemius and diaphragm from WT and HSA^{LR} model mice. *U1* and *U6* were used as endogenous controls. Data were obtained using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method ($n = 3$). (C) Quantification by qRT-PCR of relative expression of *miR-7* in WT and HSA^{LR} myoblasts isolated from the indicated tissues after treatment with antagomiR-7 (purple bars) or agomiR-7 (blue bars), respectively. *U1* and *U6* were used as endogenous controls. Comparisons are relative to cells treated with their corresponding scramble, indicated with the black dotted line (1.194 ± 0.663 and 1.014 ± 0.112 for HSA and WT diaphragm, respectively, and 1.053 ± 0.222 and 1.124 ± 0.366 for HSA and WT gastrocnemius, respectively). Data were obtained using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method ($n = 3$). (D) Analysis of the myogenic fusion index of HSA^{LR} mouse myoblasts from the indicated tissues transfected with agomiR-7, antagomiR-7, or their respective scrambles ($n = 7-10$ images in each condition). Green dashed lines represent the mean fusion index from WT myoblasts treated with scramble versions (see Figure S8). The statistical analysis was performed comparing values from treated cells with their respective scramble. The bar graphs show mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ according to Student's *t* test. (E-L) Representative confocal images of Desmin-immunostained (green) in HSA^{LR} myoblasts from Diaphragm and Gastrocnemius treated with agomiR-7 and their scramble (F and E for Diaphragm and H and G for Gastrocnemius) or antagomiR-7 and their scramble (J and I for Diaphragm and L and K for Gastrocnemius). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 100 μ m.

the fact that the antagomiR binds to the natural miRNA blocking its activity but not necessarily promoting its degradation. The fusion index of the myoblasts was analyzed by Desmin immunostaining. We observed that this parameter was significantly reduced in gastrocnemius and diaphragm ($p = 0.0030$ and $p < 0.0001$) HSA^{LR} myoblasts compared to WT myoblasts (Figure S8). We also found that

treatment with antagomiR-7 in WT myoblasts was sufficient to significantly reduce the fusion index in both myoblast lines (Figure S8). In contrast, recovery of the phenotype was detected upon replenishing *miR-7* with the agomiR in HSA^{LR} cells from diaphragm and gastrocnemius (Figures 8D–8H). To test the possibility that it is high levels of *miR-7* in HSA^{LR} myoblasts that prevent them from stronger fusion

index phenotypes, we measured this parameter after treating HSA^{LR} cells with antagomiR-7. These experiments revealed a robust reduction in the fusion index when *miR-7* activity was inhibited by the antisense oligonucleotide (Figures 8D and 8I–8L). In this case, we detected around 60% reduction in the fusion index of HSA^{LR} myoblasts treated with antagomiR-7 when compared to WT cells, similarly to values obtained in CNT and DM1 human myoblasts. Thus, like human myoblasts, primary mouse myoblasts respond to *miR-7* levels so that downregulation enhances differentiation defects and replenishment in CUG-expressing cells rescues them.

DISCUSSION

Muscle atrophy is the most debilitating symptom in DM1,² but the triggering molecular mechanisms are poorly understood. In the present study, we first correlated levels of *miR-7* target mRNAs with ankle dorsiflexion weakness in DM1 patients. We then used a DM1 myoblast cell model to demonstrate that *miR-7* was downregulated and the autophagic flux was impaired in these cells, which was consistent with previous reports.^{11,13,16,20,33} Importantly, we restored the levels of *miR-7* in human DM1 myoblasts by transfection of a *miR-7* mimic and found that it was sufficient to drastically ameliorate myoblast fusion capacity in a dose-dependent manner, to restore normal autophagic flux, and to prevent overexpression of muscle-atrophy-related genes. Conversely, transfection of CNT cells with a miRNA inhibitor (antagomiR-7) generated DM1-like molecular phenotypes, including lower fusion potential of myoblasts, activation of the autophagy process, and increased expression of atrophy-related genes. These effects were MBNL1 independent, suggesting that *miR-7* acts downstream or in parallel of MBNL1 in this pathogenic pathway.

We analyzed the fusion index and diameter of DM1 myotubes after agomiR-7 transfection and, while we detected a mild improvement in the diameter, the rescue of DM1 myoblast fusion index was dramatic. Conversely, CNT treated with the *miR-7* inhibitor showed a significant deterioration in both parameters, which further supports a role for *miR-7* in the atrophic process. In line with these observations, normal levels of *miR-7* in HSA^{LR} cells might explain both the mild fusion defects detected and weak rescue of fusion index by agomiR-7. Indeed, a *miR-7* blocker strongly enhanced cell fusion defects. Our data suggest that *miR-7* is necessary and sufficient to sustain myoblast fusion, but, while it is required for myotube growth, additional molecular defects may remain in DM1 myotubes because replenishing of *miR-7* levels was only capable of a mild improvement of this phenotype. Importantly, independent evidence supports that fine-tuning of autophagy is critical to normal muscle differentiation. Fortini et al.⁴⁷ observed that during myogenesis, a given amount of basal autophagy is required, as a part of the metabolic reprogramming, to achieve appropriate myotube fusion. By contrast, they demonstrated that hyperactivated autophagy, by rapamycin induction, markedly inhibited myoblasts fusion. Hence, in our case, we propose that the abnormal activation of autophagy may directly contribute to the myoblast fusion defect, and thus, dampening

the autophagy flux by agomiR-7 treatment explains the recovery in myoblast fusion capacity.

Notably, we disfavor the possibility that *miR-7* acts through MBNL1 regulation, as we did not observe any changes in MBNL1 protein levels, nor in several MBNL1-dependent splicing events, in DM1 and CNT muscle cells after transfection with agomiR-7 and antagomiR-7, respectively. Specifically, changes in *DMD* exon 78 regulation were monitored. The study of this splicing event was of particular interest, as it was demonstrated to be involved in muscle atrophy and muscle weakness in DM1.⁹ However, these results do not exclude a role of MBNL1 in the atrophic process, since in DM1 model flies, overexpression of *mbfC* managed to rescue cross-sectional muscle area.¹³ Instead, we hypothesize that *miR-7* acts downstream of MBNL1, or in parallel, in the CTG-mediated muscle disease pathways (Figure S5).

In the skeletal muscle, the ubiquitin-proteasomal system and autophagy constitute the major catabolic processes for protein breakdown. Interestingly, previous reports found a significant increase in trypsin-like proteasome activity and *Fbxo32* (*Atrogin-1*) expression in the muscles of mice expressing 45 kb of mutant human *DMPK*, thus indicating that the UPS may contribute to progressive muscle wasting and weakness.¹⁴ Overactivation of the UPS was also confirmed in the DMSXL DM1 mouse model.⁴⁸ Consistently, our data suggest that the pathological activation of the UPS and autophagy play an important role in muscle wasting since we report increased expression of *MurF1* and *FBXO32* in DM1 TDMs. Moreover, transcription factor FoxO3, which is induced in atrophic skeletal muscle when AKT-P levels are reduced, is known to control the transcription of *FBXO32*, *MurF1*, and other autophagy-related genes.³⁸ Consequently, the upregulated expression of *FoxO1* and *FoxO3* in DM1 TDMs, and reduced AKT-P, could explain the abnormal overexpression of the atrophy-/autophagy-related genes. Importantly, transfection with the *miR-7* mimic in DM1 TDMs was enough to rescue the expression of *MurF1*, *FBXO32*, *FoxO1*, and *FoxO3* to levels close to CNT TDMs. Moreover, analyses of AMPK phosphorylation status demonstrated no alteration in DM1 TDMs, and *miR-7* modulation did not show any effect on AMPK levels. AMPK is involved in the regulation of several metabolic pathways that regulate muscle size, such as autophagy and UPS activation or inhibition of protein synthesis via mTOR blockade.⁴⁹ However, our data suggest that this pathway remains unaltered in DM1 and that, in consequence, the activation of autophagy and UPS system are AKT dependent and that *miR-7* exerts a specific effect on the AKT signaling pathway. We also report the recovery of *IL-1β* expression by agomiR-7, showing a significant downregulation of the cytokine expression. These results provide more evidence for the beneficial effect of *miR-7* upregulation in DM1 atrophy and suggest a dual negative modulation of *miR-7* on both catabolic processes (UPS and autophagy; Figure S5). Although we cannot rule out the possibility of a direct inhibition of *miR-7* on atrophy-related genes, as described in the case of autophagy,²¹ only marginal predictions were found between *miR-7* and these genes (data not shown). Considering the

crossstalk between autophagy and UPS,³⁸ it is possible that *miR-7* directly inhibits autophagic flux and, thus, autophagy restoration prevents UPS activation (*MURF1* and *FBXO32*). Another possibility is that the *miR-7* effect is upstream of *MuRF1* and *FBXO32*, since these genes are downstream of several atrophy-related pathways.³⁸

In conclusion, although the mechanisms by which mutant *DMPK* transcripts trigger *miR-7* downregulation remain unclear, by modulating *miR-7* levels we discovered that this miRNA plays a crucial role in tuning the autophagy process and other atrophy-related pathways, such as the UPS, in DM1. Consequently, we propose that *miR-7* dysregulation is the cause, at least in part, of the autophagy overactivation, which is regarded as one of the most important contributors to muscle atrophy in DM1.^{11,13} Furthermore, we report the implication of *miR-7* in myoblast fusion capacity both in human-derived myoblasts and primary myoblasts from DM1 model mice. Importantly, several authors have reported that young HSA^{LR} mice (6 months) do not reproduce muscle wasting and degeneration.^{27,28,45} Our results suggest that lack of *miR-7* downregulation in DM1 model mice prevents muscle-wasting phenotypes observed in human myoblasts and biopsies, in which *miR-7* is clearly under-expressed.

In this work, we demonstrate that *miR-7* is strongly downregulated in DM1 cells. Our results suggest that modulation of *miR-7* levels *in vivo* in murine models of the disease improves on muscle homeostasis and serve as proof of concept in the development of a therapeutic strategy against DM1 based on *agomiR-7*-mediated restoration of *miR-7* levels as therapeutic approach for DM1 atrophy treatment. When considering *miR-7* modulation as a therapeutic option, our proposal is to re-establish *miR-7* to control levels, not to induce over-expression of the miRNA. This is relevant because *miR-7* is involved in normal brain development.⁵⁰ Additionally, several studies highlight the importance of *miR-7* expression in the developing pancreas for normal pancreatic development and function, which may be distinct from that in the mature pancreas.^{51,52} Considering the adult nature of the disease, in a treatment based in *miR-7* modulation we do not expect to interfere with the development-related functions of the miRNA.

MATERIALS AND METHODS

Chemically Modified Oligonucleotides

Cy3-labeled and non-labeled hsa-miR-7 *agomiR* (*agomiR-7*), *antagomiR* (*antagomiR-7*), and their respective scramble controls were synthesized by Creative Biogene (NY, USA) according to the following sequences:

5'-UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU-3' (*agomiR-7* sense strand),

5'-mA*mC*mGmUmGmAmCmAmCmGmUmUmCmGmGmA mGmA*mA*mT*mT*-3'-chol (*agomiR-7* antisense strand),

5'-UUCUCGGAACGUGUCACGUTT-3' (scramble *agomiR-7* control, sense strand),

5'-mA*mC*mGmUmGmAmCmAmCmGmUmUmCmGmGmA mGmA*mA*mT*mT*-3'-chol (scramble *agomiR-7* control, antisense strand),

5'-mU*mG*mGmAmAmGmAmCmUmAmGmUmGmAmUmUm mUmUmGmU*mU*mG*mU*-3' (*antagomiR-7*), and

5'-mC*mA*mGmUmAmCmUmUmUmGmUmGmUm mA*mC*mA*mA*-3'-chol (scramble *antagomiR-7* control),

where m denotes 2'-O-methyl-modified phosphoramidites, * denotes phosphorothioate linkages, and "chol" denotes cholesterol groups. Cy3-labeled oligonucleotides were used to visualize the distribution of the compounds in cells.

Transgenic Mice

Homozygous transgenic HSA^{LR} (line 20 b) mice were provided by Prof. C. Thornton⁴⁵ (University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, USA) and mice with the same genetic background (Friend Virus B; FVB) were used as controls and obtained from The Jackson Laboratory. Gastrocnemius and diaphragm muscles were isolated from control mice (FVB) and DM1 model mice (HSA^{LR}) expressing 250 CUG repeats. Tissues were divided in two parts. One part was snap-frozen for RNA extraction, and the other part was used to isolate mouse primary myoblasts, as described previously.⁴⁵

Cell Culture and Transfection Conditions

A cell model of the disease²⁶ consisted of normal (CNT) and DM1 (1300 CTG repeats) immortalized (hTERT) skin fibroblasts conditionally expressing MyoD. Fibroblasts were grown in DMEM with 4.5 g/L of glucose, 1% of penicillin and streptomycin (P/S), and 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA). Fibroblasts were transdifferentiated into myoblasts by inducing the expression of MyoD.²⁰ Cells were plated in muscle differentiation medium (MDM) made of DMEM 4.5 g/L glucose with 1% P/S, 2% horse serum, 1% apo-transferrin (10 mg/mL), 0.1% insulin (10 mg/mL), and 0.02% doxycycline (10 mg/mL). In all cases, the cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Fibroblasts were transfected with *agomiR-7* and *antagomiR-7* using X-tremeGENE HP (Roche Life Sciences; Indianapolis, IN, USA) to final concentrations ranging from 1 to 100 nM. After 4 h, transfection reagent was replaced by MDM. Fibroblasts were in MDM for 7 days, and the medium was replaced thrice.

Myoblasts from gastrocnemius, quadriceps, and diaphragm of FVB control mice and DM1 model mice, HSA^{LR}, expressing 250 CUG repeats, were isolated as previously described.⁵³ Myoblasts were grown F-10/DMEM medium containing 50% Ham's F-10 medium (Gibco) and 50% DMEM (4.5% glucose and L-glutamine, Gibco), 1% P/S (Gibco), and 20% FBS (Gibco). Just before use, basic fibroblast growth factor was added to the medium (10 ng/μL, Peprotech). Myoblast differentiation to myotubes was induced by replacing F-10/DMEM

medium by other containing DMEM, 5% horse serum (Gibco), and 1% P/S. Myoblasts were transfected with modified oligonucleotides using Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. Oligonucleotides were at a final concentration of 50 nM. Myoblasts were differentiated for 5 days.

Immunofluorescence Staining and Fusion Index Determination

Fibroblasts were seeded in 24-well plates with 2.5×10^4 cells/well. After transfection of agomiR-7 or antagomiR-7, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min at room temperature followed by three washes in PBS 1×. Cells were then permeabilized with PBS-T (0.3% X-Triton in PBS), blocked (PBS-T, 0.5% BSA, 1% donkey serum) for 30 min at RT, and incubated with mouse anti-Desmin (1:50, Abcam; Cambridge, MA, USA) overnight at 4°C. After three washes with PBS-T, cells were incubated for 1 h with biotin-conjugated anti-mouse-immunoglobulin G (IgG) (1:200, Sigma-Aldrich). Signal was amplified with an Elite ABC kit (VECTASTAIN Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) for 30 min at RT, followed by PBS-T washes and incubation with streptavidin-fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:200, Vector) for 45 min. Samples were counterstain mounted with VECTASHIELD mounting medium containing DAPI (Vector Laboratories) to detect the nuclei. Images were taken in a confocal microscope (FV1000, Olympus Life Science Europe; Hamburg, Germany) using a 200× magnification. In the case of chloroquine and metformin, fibroblasts were transdifferentiated for 7 days. The last 48 h, cells were treated with 10 μM chloroquine or 30 mM Metformin (Sigma-Aldrich).

The fusion index was defined as the percentage of nuclei within myotubes (>2 myonuclei) regarding the total number of nuclei in each condition. The average number of total nuclei per myotube was determined by counting over 250 nuclei from randomly chosen Desmin-positive cells (5–7 micrographs). Myotube diameters were measured at five points along the entire tube. A total of 50 myotubes were examined for each experimental condition. Three independent transfection experiments were carried out. Quantification was performed using ImageJ software (NIH).

Foci Detection

Fibroblasts were seeded into 96-well plates (1.0×10^4 cells per well). After agomiR-7 or antagomiR-7 treatment, cells were fixed in 4% PFA for 10 min at room temperature followed by washes in 1× PBS. Fixed cells were incubated in pre-hybridization buffer (2× saline sodium citrate [SSC], 30% deionized formamide) for 10 min at room temperature and hybridized with Cy3-(CAG)7-Cy3-labeled probe diluted 1:500 in hybridization buffer (40% formamide, 2× SSC, 0.2% BSA, 10% dextran sulfate, 2 mM ribonucleoside-vanadyl complex, 10% tRNA [10 mg/mL], and 10% herring sperm) for 2 h at 37°C. After hybridization, cells were washed twice with pre-hybridization buffer for 15 min at 45°C, twice with 0.5× SSC for 5 min at 37°C, and once with 1× PBS for 15 min at room temperature. Cells were then incubated with Hoechst 33342 (5 mg/mL) diluted 1:2,000 in 1× PBS for 20 min at room temperature and mounted with 20% Mowiol. Images

were taken and analyzed using an IN cell analyzer 2200 imaging system.

LysoTracker Staining

2.5×10^4 cells were seeded in a 24-well plate. After treatment with oligonucleotides, cells were incubated for 30 min at 37°C with 100 nM LysoTracker Green DND-26 (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY) and 5 μg/mL Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). Then, cells were washed twice with warmed 1× PBS and mounted using fluorescence-mounting medium (Dako; Glostrup, Denmark). Images were immediately taken on a DM4000 Leica fluorescence microscope (Leica; Wetzlar, Germany) at 400× magnification.

Toxicity Assay

CNT cells were aliquoted in 96-well plates with 1.0×10^5 cells per well. After 24 h, cells were transfected with different agomiR-7 and antagomiR-7 concentrations (from 1 nM to 1 μM) and were transdifferentiated into myoblasts for 7 days. To measure cell viability, 20 μl of MTS/PMS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt and phenazine methosulfate respectively) was added to each well, that contains 100 μl of medium, and was incubated for 2 h at 37°C in a humidified chamber with 5% CO₂. The conversion of MTS into soluble formazan (accomplished by dehydrogenase enzymes from metabolically active cells) was measured by absorbance at 490 nm (CellTiter 96 aqueous non-radioactive cell proliferation assay, Promega; Madison, WI, USA). Absorbance was measured using an Infinite 200 PRO plate reader (Tecan Life Sciences; Männedorf, Switzerland). Data were transformed to percentage of survival relative to cells not exposed to oligonucleotides, which was considered 100% viability.

RNA Extraction, Semiquantitative PCR, and Real-Time PCR

For each biological replicate, total RNA from 1×10^6 cells was extracted using the miRNeasy mini kit (QIAGEN; Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. One microgram of RNA was digested with DNase I (Invitrogen) and reverse-transcribed with SuperScript II (Invitrogen) using random hexanucleotides. To analyze alternative splicing events, 20 ng of cDNA was used in a standard PCR reaction with GoTaq polymerase (Promega). Specific primers were used to analyze the alternative splicing of *SPTAN1*, *BINI*, *ATP2A1*, *INSR*, *DMD*, *cTNT*, and *DLG1* in CNT and DM1 muscle cells (Table S2). qRT-PCR was performed using 2 ng of cDNA template with 5× HOT FIREPol EvaGreen qPCR mix plus (ROX) (Solis BioDyne) and QuantiFast probe PCR kit reagent (QIAGEN; Vedbaek, Denmark) and specific primers and probes (Table S3). In all cases, *GAPDH* was detected as endogenous control using 0.2 ng of cDNA. miRNA expression in cells was quantified using specific miRCURY locked nucleic acid miRNA PCR primers (Exiqon) according to the manufacturer's instructions. Relative gene expression was normalized to *U1* or *U6* small nuclear RNA (snRNA). qRT-PCRs were carried out in a Step One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems; Foster City CA, USA). Three biological replicates and three technical replicates per biological sample were performed. Relative expression to endogenous gene and the

control group were obtained by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Pairs of samples were compared using a two-tailed Student's *t* test ($\alpha < 0.05$), applying Welch's correction when necessary.

Western Blotting

For total protein extraction, 1×10^6 cells were sonicated in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 1.0% IGE-PAL (octylphenoxypolyethoxyethanol), 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0]) plus protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche Applied Science). Total protein concentration was measured at 562 nm using a BCA protein assay kit (Thermo Scientific Pierce, Grand Island, NY, USA) and BSA as protein standard. 20 μ g of protein were denatured for 5 min at 100°C, electrophoresed on 12% SDS-PAGE gels, and transferred onto 0.45 μ m nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Membranes were blocked with 5% non-fat dried milk in PBS-T (0.05% Tween 20 [pH 7.4]) for 1 h, then incubated overnight at 4°C in 5% blocking solution with primary antibodies at the appropriate dilution. Primary antibodies used for blotting were rabbit anti-ATG4A (1:1,000, Cell Signaling Technology), mouse anti-SQSTM1 (1:1,000, Abcam), rabbit anti-LC3B (1:3,000, Abcam), rabbit anti-AKT (1:1,000, Cell Signaling Technology; Danvers, MA, USA), mouse anti-MBNL1 (1:200, clone MB1a, The Wolfson Centre for Inherited Neuromuscular Disease, UK), rabbit anti-AMPK α (1:1,000, Cell Signaling Technology), rabbit anti-phospho-Akt (Ser473) (1:1,000, Cell Signaling Technology), rabbit anti-ATG7 (1:1,000, Cell Signaling Technology), and rabbit anti-phospho-AMPK α (Thr172) (1:1,000, Cell Signaling Technology) membranes were blocked and incubated with the primary and secondary antibodies with BSA 5% in PBS-T. Goat horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse-IgG (1:5,000, Sigma-Aldrich) and goat HRP-conjugated anti-rabbit-IgG (1:5,000, Sigma-Aldrich) were used as secondary antibodies and were incubated for 1 h RT. Loading control was detected with a primary mouse anti- β -Actin antibody (1 h, 1:5,000, Sigma-Aldrich) followed by HRP-conjugated anti-mouse-IgG antibody (1 h, 1:5,000, Sigma-Aldrich). Immunoreactive bands were detected using enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting substrate (Pierce), and images were taken in an ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA). Quantification was performed using ImageJ software (NIH).

Tandem mCherry-EGFP Reporter Fluorescence Assay

3.5×10^4 immortalized fibroblasts per well were seeded in 24-well plates. The next day, cells were transfected with 100 nM of the agomiR-7 (DMI) or antagomiR-7 (CNT) and their respective scramble using Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. After 24 h, modified oligonucleotides in MDM were removed and replaced with fresh MDM. At day 2 of differentiation, myoblasts were transiently transfected with 1 μ g of pDest-mCherry-eGFP-LC3B or pDest-mCherry-eGFP-P62 (kindly provided by Prof. Fuentes, University of Extremadura, Spain) using X-tremeGENE HP DNA transfection reagent (Roche Life Science) following the manufacturer's recommendations in Opti-MEM (Gibco) for 6 h. Then, medium was re-

placed with MDM. 72 h post-transfections, 5-day-differentiated myoblasts were visualized *in vivo* using LSM800 confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany) at 400 \times magnification. In the case of chloroquine control, myoblasts were incubated with chloroquine 10 μ M (chloroquine diphosphate salt solid, $\geq 98\%$, C6628 Sigma Aldrich) 16 h before visualizing the cells.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.11.012>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.A. provided the conceptual framework for the study. D.F. generated TDM. R.A., A.B., M.S.-A., and D.F. conceived and designed the experiments and helped in the interpretation of results. M.S.-A. and A.B. performed the experiments and analyzed data. A.B. and M.S.-A. prepared the manuscript with input from R.A.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2015-64500-R) and the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-094599-B-100), including funds from the European Regional Development Fund, to R.A. Part of the equipment employed in this work has been funded by Generalitat Valenciana and co-financed with ERDF funds (OP ERDF of Comunitat Valenciana 2014-2020). A.B. was supported by a postdoctoral fellowship (APOSTD2017/077), and M.S.-A. was supported by a predoctoral fellowship (ACIF/2018/071), both from the Conselleria d'Educació, Investigació, Cultura i Esport (Generalitat Valenciana). The authors also thank Sarah Overby for her insightful comments on the manuscript.

REFERENCES

- André, L.M., Ausems, C.R.M., Wansink, D.G., and Wieringa, B. (2018). Abnormalities in Skeletal Muscle Myogenesis, Growth, and Regeneration in Myotonic Dystrophy. *Front. Neurol.* 9, 368.
- Foff, E.P., and Mahadevan, M.S. (2011). Therapeutics development in myotonic dystrophy type 1. *Muscle Nerve* 44, 160–169.
- Charizanis, K., Lee, K.Y., Batra, R., Goodwin, M., Zhang, C., Yuan, Y., Shiue, L., Cline, M., Scotti, M.M., Xia, G., et al. (2012). Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* 75, 437–450.
- Poulos, M.G., Batra, R., Li, M., Yuan, Y., Zhang, C., Darnell, R.B., and Swanson, M.S. (2013). Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Hum. Mol. Genet.* 22, 3547–3558.
- Choi, J., Dixon, D.M., Dansithong, W., Abdallah, W.F., Roos, K.P., Jordan, M.C., Trac, B., Lee, H.S., Comai, L., and Reddy, S. (2016). Muscleblind-like 3 deficit results in a spectrum of age-associated pathologies observed in myotonic dystrophy. *Sci. Rep.* 6, 30999.
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.S., and Cooper, T.A. (2007). Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol. Cell* 28, 68–78.

7. Jones, K., Wei, C., Iakova, P., Bugiardini, E., Schneider-Gold, C., Meola, G., Woodgett, J., Killian, J., Timchenko, N.A., and Timchenko, L.T. (2012). GSK3 β mediates muscle pathology in myotonic dystrophy. *J. Clin. Invest.* *122*, 4461–4472.
8. Wei, C., Stock, L., Valanejad, L., Zalewski, Z.A., Karns, R., Puymirat, J., Nelson, D., Witte, D., Woodgett, J., Timchenko, N.A., and Timchenko, L. (2018). Correction of GSK3 β at young age prevents muscle pathology in mice with myotonic dystrophy type 1. *FASEB J.* *32*, 2073–2085.
9. Rau, F., Lainé, J., Ramanoudjame, L., Ferry, A., Arandel, L., Delalande, O., Jollet, A., Dingli, F., Lee, K.Y., Peccate, C., et al. (2015). Abnormal splicing switch of DMD's penultimate exon compromises muscle fibre maintenance in myotonic dystrophy. *Nat. Commun.* *6*, 7205.
10. Gao, Z., and Cooper, T.A. (2013). Reexpression of pyruvate kinase M2 in type 1 myofibers correlates with altered glucose metabolism in myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *110*, 13570–13575.
11. Loro, E., Rinaldi, F., Malena, A., Masiero, E., Novelli, G., Angelini, C., Romeo, V., Sandri, M., Botta, A., and Vergani, L. (2010). Normal myogenesis and increased apoptosis in myotonic dystrophy type-1 muscle cells. *Cell Death Differ.* *17*, 1315–1324.
12. Morriss, G.R., Rajapakse, K., Huang, S., Coarfa, C., and Cooper, T.A. (2018). Mechanisms of skeletal muscle wasting in a mouse model for myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* *27*, 2789–2804.
13. Bargiela, A., Cerro-Herreros, E., Fernandez-Costa, J.M., Vilchez, J.J., Llamusi, B., and Artero, R. (2015). Increased autophagy and apoptosis contribute to muscle atrophy in a myotonic dystrophy type 1 *Drosophila* model. *Dis. Model. Mech.* *8*, 679–690.
14. Vignaud, A., Ferry, A., Huguet, A., Baraibar, M., Trollet, C., Hyzewicz, J., Butler-Brown, G., Puymirat, J., Gourdon, G., and Furling, D. (2010). Progressive skeletal muscle weakness in transgenic mice expressing CTG expansions is associated with the activation of the ubiquitin-proteasome pathway. *Neuromuscul. Disord.* *20*, 319–325.
15. Yadava, R.S., Foff, E.P., Yu, Q., Gladman, J.T., Kim, Y.K., Bhatt, K.S., Thornton, C.A., Zheng, T.S., and Mahadevan, M.S. (2015). TWEAK/Fn14, a pathway and novel therapeutic target in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 2035–2048.
16. Brockhoff, M., Rion, N., Chojnowska, K., Wiktorowicz, T., Eickhorst, C., Erne, B., Frank, S., Angelini, C., Furling, D., Rüegg, M.A., et al. (2017). Targeting deregulated AMPK/mTORC1 pathways improves muscle function in myotonic dystrophy type I. *J. Clin. Invest.* *127*, 549–563.
17. Perbellini, R., Greco, S., Sarra-Ferraris, G., Cardani, R., Capogrossi, M.C., Meola, G., and Martelli, F. (2011). Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul. Disord.* *21*, 81–88.
18. Gambardella, S., Rinaldi, F., Lepore, S.M., Viola, A., Loro, E., Angelini, C., Vergani, L., Novelli, G., and Botta, A. (2010). Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *J. Transl. Med.* *8*, 48.
19. Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemin, J.P., Fischer, M.C., Jost, B., Dembele, D., Gourdon, G., Nicole, A., Duboc, D., et al. (2011). Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 840–845.
20. Fernandez-Costa, J.M., Garcia-Lopez, A., Zuñiga, S., Fernandez-Pedrosa, V., Felipe-Benavent, A., Mata, M., Jaka, O., Aiausti, A., Hernandez-Torres, F., Aguado, B., et al. (2013). Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in *Drosophila* that are conserved in myotonic dystrophy type I patients. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 704–716.
21. Gu, D.N., Jiang, M.J., Mei, Z., Dai, J.J., Dai, C.Y., Fang, C., Huang, Q., and Tian, L. (2017). microRNA-7 impairs autophagy-derived pools of glucose to suppress pancreatic cancer progression. *Cancer Lett.* *400*, 69–78.
22. Sandri, M. (2010). Autophagy in health and disease. 3. Involvement of autophagy in muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *298*, C1291–C1297.
23. Wang, E.T., Treacy, D., Eichinger, K., Struck, A., Estabrook, J., Olafson, H., Wang, T.T., Bhatt, K., Westbrook, T., Sedehzadeh, S., et al. (2019). Transcriptome alterations in myotonic dystrophy skeletal muscle and heart. *Hum. Mol. Genet.* *28*, 1312–1321.
24. Hsu, S.D., Lin, F.M., Wu, W.Y., Liang, C., Huang, W.C., Chan, W.L., Tsai, W.T., Chen, G.Z., Lee, C.J., Chiu, C.M., et al. (2011). miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* *39*, D163–D169.
25. Evans, J. (1996). *Straightforward Statistics for the Behavioral Sciences* (Brooks/Cole Publishing).
26. 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. *Dis. Model. Mech.* *10*, 487–497.
27. Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J.D., Pouliquin, P., Aoiike, F., Fujimura, H., Dirksen, R.T., Takahashi, M.P., Dulhunty, A.F., and Sakoda, S. (2005). Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 2189–2200.
28. Fugier, C., Klein, A.F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A., Tosch, V., Vignaud, A., Ferry, A., Messadeg, N., et al. (2011). Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat. Med.* *17*, 720–725.
29. Philips, A.V., Timchenko, L.T., and Cooper, T.A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* *280*, 737–741.
30. Nakamori, M., Sobczak, K., Puwanant, A., Welle, S., Eichinger, K., Pandya, S., Dekdebrun, J., Heatwole, C.R., McDermott, M.P., Chen, T., et al. (2013). Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy. *Ann. Neurol.* *74*, 862–872.
31. Savkur, R.S., Philips, A.V., and Cooper, T.A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* *29*, 40–47.
32. Childs-Disney, J.L., Stepniak-Konieczna, E., Tran, T., Yildirim, I., Park, H., Chen, C.Z., Hoskins, J., Southall, N., Maragan, J.J., Patnaik, S., et al. (2013). Induction and reversal of myotonic dystrophy type 1 pre-mRNA splicing defects by small molecules. *Nat. Commun.* *4*, 2044.
33. Befly, P., Del Carratore, R., Masini, M., Furling, D., Puymirat, J., Masiello, P., and Simili, M. (2010). Altered signal transduction pathways and induction of autophagy in human myotonic dystrophy type I myoblasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 1973–1983.
34. Abreu, S., Kriegenburg, F., Gómez-Sánchez, R., Mari, M., Sánchez-Wandelmer, J., Skytte Rasmussen, M., Soares Guimaraes, R., Zens, B., Schuschnig, M., Hardenberg, R., et al. (2017). Conserved Atg8 recognition sites mediate Atg4 association with autophagosomal membranes and Atg8 deconjugation. *EMBO Rep.* *18*, 765–780.
35. Björkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Övervatn, A., Brech, A., and Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.* *452*, 181–197.
36. Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2010). p62, an autophagy hero or culprit? *Nat. Cell Biol.* *12*, 207–209.
37. Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* *8*, 445–544.
38. Bonaldo, P., and Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* *6*, 25–39.
39. Heras-Sandoval, D., Pérez-Rojas, J.M., Hernández-Damián, J., and Pedraza-Chaverri, J. (2014). The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cell. Signal.* *26*, 2694–2701.
40. Cheng, Y., Ren, X., Zhang, Y., Patel, R., Sharma, A., Wu, H., Robertson, G.P., Yan, L., Rubin, E., and Yang, J.M. (2011). eEF-2 kinase dictates cross-talk between autophagy and apoptosis induced by Akt inhibition, thereby modulating cytotoxicity of novel Akt inhibitor MK-2206. *Cancer Res.* *71*, 2654–2663.
41. Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., et al. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* *6*, 458–471.
42. Mammarella, A., Ferroni, P., Paradiso, M., Martini, F., Paoletti, V., Morino, S., Antonini, G., Gazzaniga, P.P., Musca, A., and Basili, S. (2002). Tumor necrosis factor-alpha and myocardial function in patients with myotonic dystrophy type 1. *J. Neurol. Sci.* *201*, 59–64.

43. Rhodes, J.D., Lott, M.C., Russell, S.L., Moulton, V., Sanderson, J., Wormstone, I.M., and Broadway, D.C. (2012). Activation of the innate immune response and interferon signalling in myotonic dystrophy type 1 and type 2 cataracts. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 852–862.
44. Zhou, J., Liu, B., Liang, C., Li, Y., and Song, Y.H. (2016). Cytokine Signaling in Skeletal Muscle Wasting. *Trends Endocrinol. Metab.* *27*, 335–347.
45. Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., and Thornton, C.A. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* *289*, 1769–1773.
46. Kanadia, R.N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S.G., Wheeler, T.M., Thornton, C.A., and Swanson, M.S. (2006). Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 11748–11753.
47. Fortini, P., Iorio, E., Dogliotti, E., and Isidoro, C. (2016). Coordinated Metabolic Changes and Modulation of Autophagy during Myogenesis. *Front. Physiol.* *7*, 237.
48. Huguet, A., Medja, F., Nicole, A., Vignaud, A., Guiraud-Dogan, C., Ferry, A., Decostre, V., Hogrel, J.Y., Metzger, F., Hoeflich, A., et al. (2012). Molecular, physiological, and motor performance defects in DMSXL mice carrying >1,000 CTG repeats from the human DMI1 locus. *PLoS Genet.* *8*, e1003043.
49. Thomson, D.M. (2018). The Role of AMPK in the Regulation of Skeletal Muscle Size, Hypertrophy, and Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, E3125.
50. Chen, H., Shalom-Feuerstein, R., Riley, J., Zhang, S.D., Tucci, P., Agostini, M., Aberdam, D., Knight, R.A., Genchi, G., Nicotera, P., et al. (2010). miR-7 and miR-214 are specifically expressed during neuroblastoma differentiation, cortical development and embryonic stem cells differentiation, and control neurite outgrowth in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *394*, 921–927.
51. Joglekar, M.V., Joglekar, V.M., and Hardikar, A.A. (2009). Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. *Gene Expr. Patterns* *9*, 109–113.
52. Nieto, M., Hevia, P., Garcia, E., Klein, D., Alvarez-Cubela, S., Bravo-Egana, V., Rosero, S., Damaris Molano, R., Vargas, N., Ricordi, C., et al. (2012). Antisense miR-7 impairs insulin expression in developing pancreas and in cultured pancreatic buds. *Cell Transplant.* *21*, 1761–1774.
53. Hindi, L., McMillan, J.D., Afroze, D., Hindi, S.M., and Kumar, A. (2017). Isolation, Culturing, and Differentiation of Primary Myoblasts from Skeletal Muscle of Adult Mice. *Biol. Protoc.* *7*, e2248.

OMTN, Volume 19

Supplemental Information

***miR-7* Restores Phenotypes in Myotonic Dystrophy Muscle Cells by Repressing Hyperactivated Autophagy**

Maria Sabater-Arcis, Ariadna Bargiela, Denis Furling, and Ruben Artero

Supplemental Figures

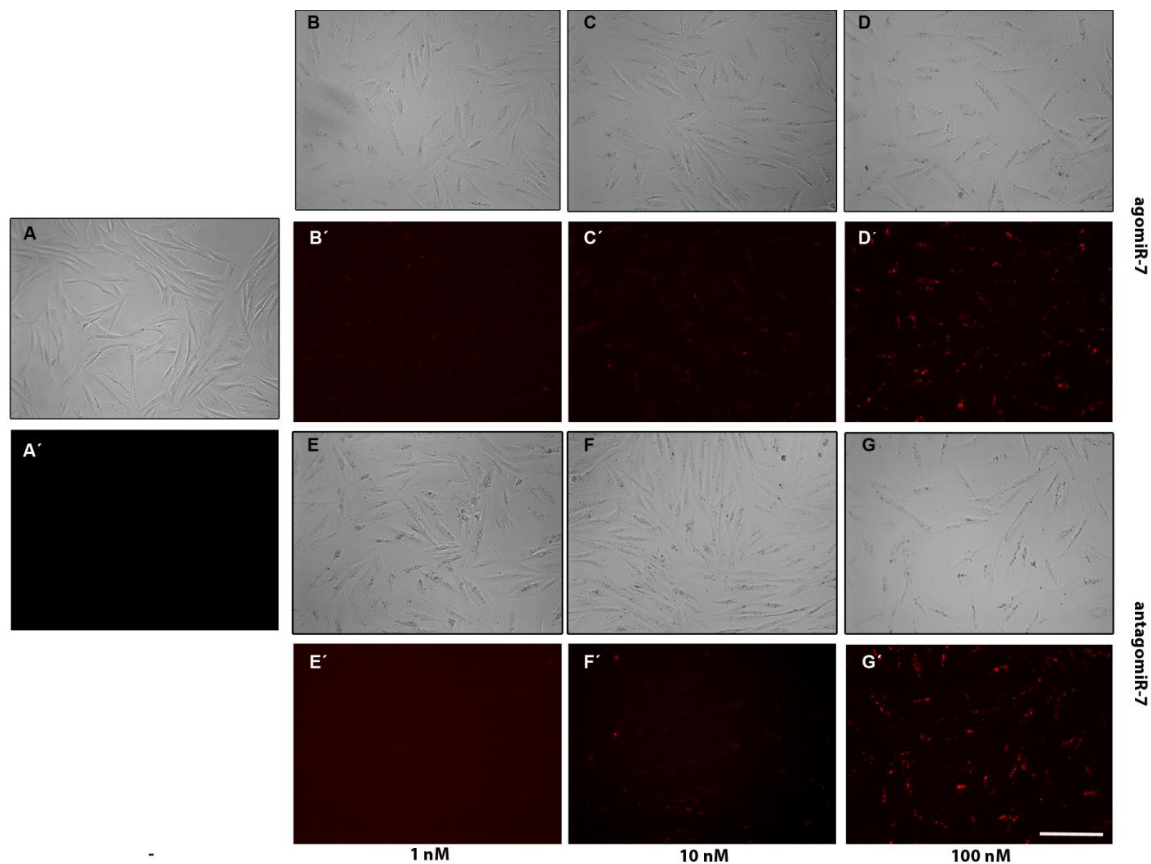


Fig. S1 Uptake of modified oligonucleotides by myoblasts Fluorescence images of CNT myoblasts transfected with Cy3-labelled agomiR-7 (*B'-D'*) and antagomiR-7 (*E'-G'*) versions (red) at the indicated concentrations. Untransfected cells (mock) (*A*) were used as controls. Bright-field images (*A*, *B-D* and *E-G*) were taken to confirm that the red fluorescent came from cells. Scale bar=200 μ m. In all cases myoblasts were transdifferentiated for 7 days.

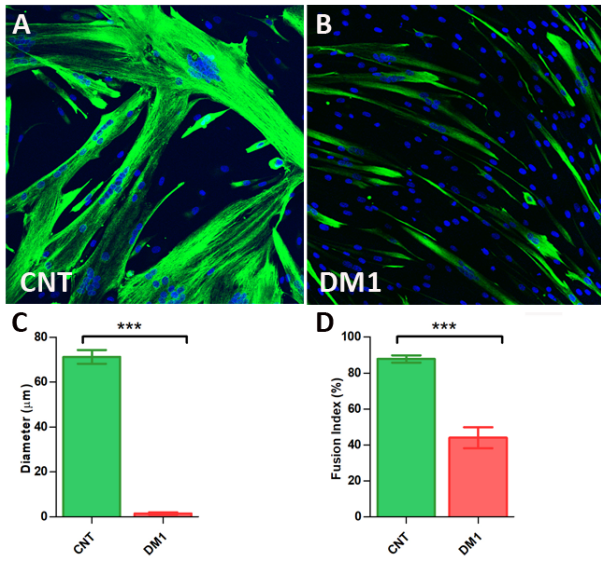


Fig. S2 DM1 cells show impaired diameter and fusion capacity. (A,B) Representative confocal images of control (CNT) and disease model (DM1) TDM stained with anti-Desmin antibody (green) (upper panels) in the absence of any oligonucleotide treatment used to quantify the diameter and the fusion index (C,D; n=5-7 images in each condition). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 50 μm . The bar graphs show mean \pm S.E.M. *** $p < 0.001$ according to Student's t-test.

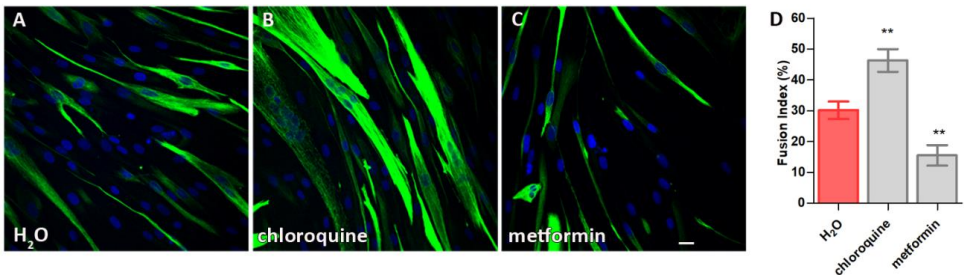


Fig. S3 Autophagy levels affect fusion capacity of DM1 cells. (A-C) Representative confocal images of DM1 TDM untreated (A) or treated with chloroquine (B) or metformin (C). Cells were stained with anti-Desmin antibody and images were used to quantify the fusion index (D; n=5-7 images in each condition). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 20 μm . The bar graphs show mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$ according to Student's t-test.

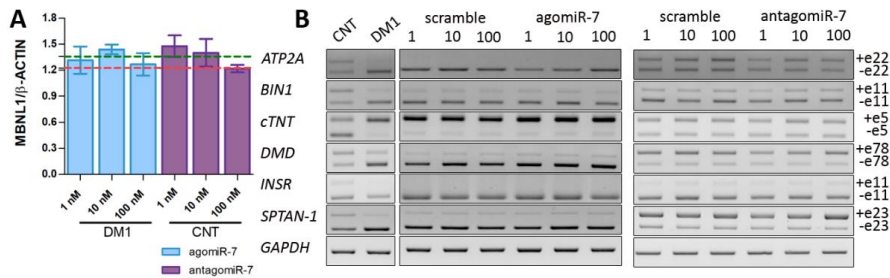


Fig. S4 MBNL levels are independent of *miR-7* modulation (A) Western blot analysis of MBNL1 total protein levels in DM1 TDM (blue) treated with agomiR-7 and CNT TDM (purple) transfected with antagomiR-7 at the indicated concentrations. β -ACTIN was used as an endogenous control to normalize protein levels (n=3). Dashed lines represent the mean of the three concentrations (1, 10, 100 nM) from CNT (1.359 ± 0.040 ; green) or DM1 (1.225 ± 0.0646 ; red) TDMs transfected with scramble versions of the modified oligonucleotides (B) Semiquantitative RT-PCR analyses of splicing events dependent on MBNL proteins and altered in DM1 cells (*ATP2A1* (exon 22), *BIN1* (exon 11), *cTNT* (exon 5), *DMD* (exon 78), *INSR* (exon 11) and *SPTAN-1* (exon 23)). *GAPDH* was used as internal control (n=3).

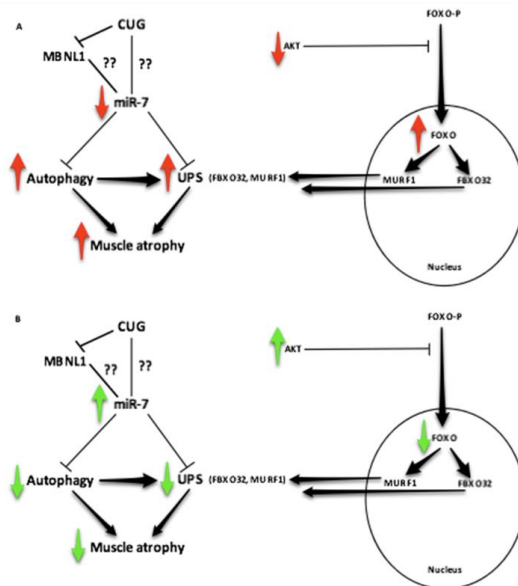


Fig. S5. Hypothetical model for *miR-7* contribution to skeletal muscle atrophy in DM1. *miR-7* might be involved in muscle atrophy through a series of simultaneous and complementary missregulation of autophagy genes and other atrophy-related pathways. (A) In DM1, mutant *DMPK* transcripts (CUG) sequester MBNL1 and trigger *miR-7* down-regulation through an unknown mechanism. *miR-7* regulates autophagy, so its down-regulation enhance autophagy-related gene expression and therefore autophagy flux. In addition, *miR-7* could

regulate other genes implicated in different muscle atrophy-related pathways that finally activate the expression of Ubiquitin-proteasome system (UPS) genes like *MuRF1* and *FBXO32*. Collectively, these *miR-7*-regulated processes result in increased protein degradation ultimately leading to muscle atrophy. (B) The administration of agomiR-7 replenishes *miR-7* levels which restores basal autophagy flux and UPS activity resulting in decreased abnormal protein degradation that could subsequently rescue, at least in part, muscle atrophy.

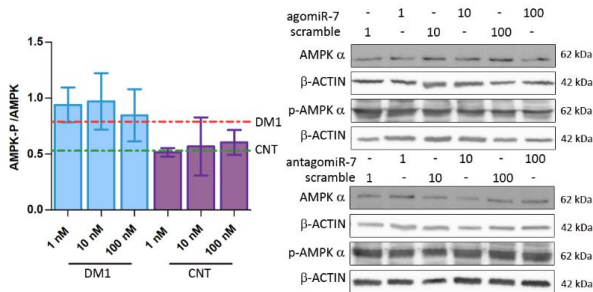


Fig. S6. AMPK ratio remains unchanged upon *miR-7* modulation. Western blot analysis and representative gels of AMPK-P/AMPK total protein levels in DM1 TDM (blue) treated with agomiR-7 and CNT TDM (purple) transfected with antagonomiR-7 at the indicated concentrations. β -ACTIN was used as an endogenous control to normalize protein levels (n=3). Dashed lines represent the mean of the three concentrations (1, 10, 100 nM) from CNT (0.5272 ± 0.1316 , green) or DM1 (0.7906 ± 0.1316 , red) TDMs transfected with scramble versions of the modified oligonucleotides. Statistical analysis was performed comparing AMPK-P/AMPK ratio from each concentration of agomiR-7 or antagonomiR-7 with their respective scramble at a given concentration. None of the differences was statistically significant according to Student's t-test. The bar graphs show mean \pm S.E.M.

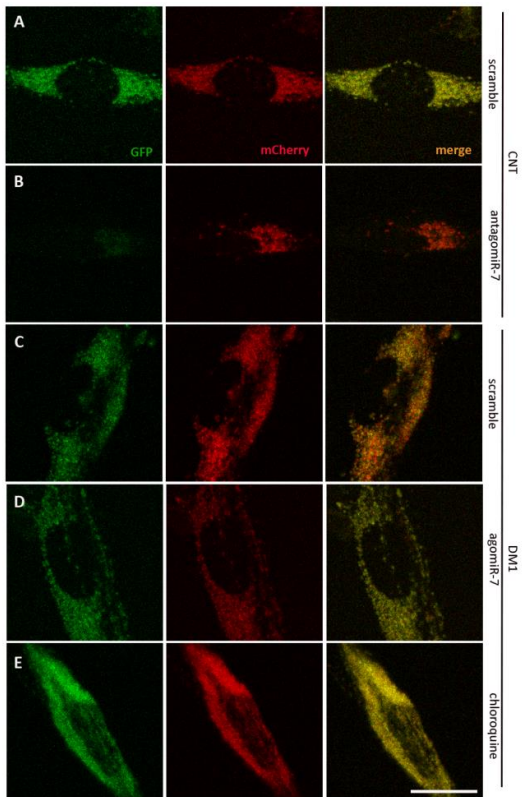


Fig. S7 Representative confocal images of fluorescent p62 puncta. CNT TDM were cotransfected with mCherry-GFP-p62 plasmid and 100 nM scramble oligonucleotide or antagoniR-7 (A-B). DM1 cells were cotransfected with the reporter plasmid and 100 nM scramble or agomiR-7 oligonucleotides (C-D). DM1 cells were also treated with 10 nM chloroquine for 16 h as a positive control of autophagy blockade. (I). The merged images (yellow) show overlap of GFP-p62 (green) and mCherry-p62 (red). Scale bar represents 20 μ m.

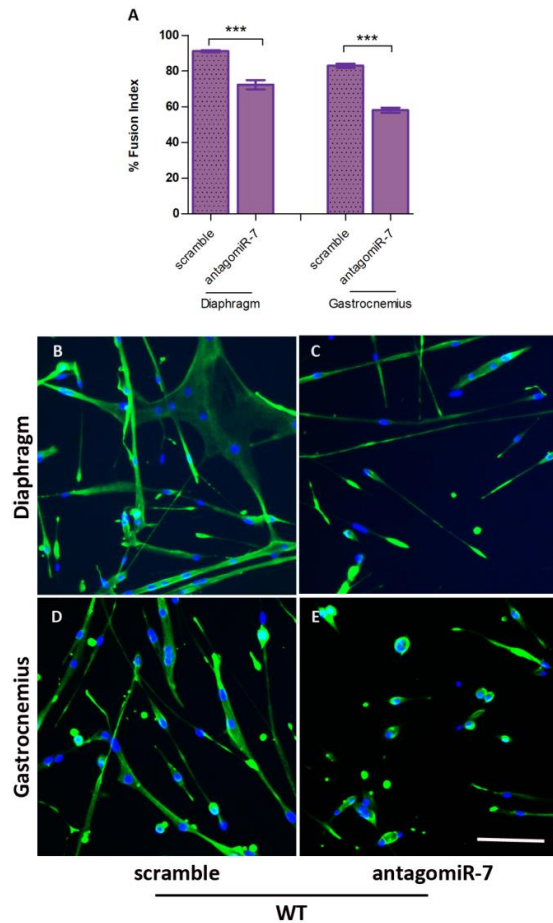


Fig. S8 Reduction of *miR-7* levels impairs fusion index in WT myoblasts. (A) Analysis of the myogenic fusion index of WT mice myoblasts from the indicated tissues transfected with scramble oligonucleotide or antagomiR-7 (n=7-10 images in each condition). The statistical analysis was performed comparing values from treated cells with their respective scramble. The bar graphs show mean±S.E.M. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 according to Student's t-test. (B-E) Representative confocal images of Desmin-immunostained (green) WT myoblasts from the indicated tissues. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 100 μ m.

Supplemental Tables

Table S1 Predicted targets of *miR-7* and their expression in DM1 patient biopsies according to DM-seq database

Gene	P-value	Strength correl.
ATG4A	0.16275	0.225
FOS	0.64114	0.076
CTSB	0.67674	0.068
MSH3	0.10518	-0.260
VCL	0.04139	-0.324
SRSF1	0.03077	-0.342
PTK2	0.02250	-0.36
XRCC2	0.00934	-0.406
ATG7	0.00896	-0.408
PIK3R3	0.00759	-0.416
ILF3	0.00089	-0.505
EGFR	0.00030	-0.542
ILF2	.00003	-0.612
TET2	<0.00001	-0.648
XIAP	< 0.00001	-0.703

Table S2. RT-PCR primers for MBNL1 and MBNL2 RNA targets

Gene	Exon	Forward primer sequence (5→3')	Reverse primer sequence (5→3')
<i>ATP2A</i>	22	GATGATCTTCAAGCTCCGGGC	CAGCTCTGCCTGAAGATGTG
<i>BIN1</i>	11	CTCAACCAGAACCTCAATGATGTG	CTGAGATGGGACTTGGGGAG
<i>cTNT</i>	5	ATAGAAGAGGTGGTGAAGAGTAC	GTCTCAGCCTCTGCTTCAGCATC
<i>DLG1</i>	19	AGCCCGATTAAAAACAGTGA	CGTATTCTTCTTCGACCACGGT
<i>GAPDH</i>	-	CATCTTCCAGGAGCGGATC	GTTACACCCATGACGAACAT
<i>INSR</i>	11	TGCTGCTCCTGTCCAAAGAC	GAAGTGTGGGGAAAGCTG
<i>SPTAN1</i>	23	GATTGGTGGAAAGTGAAGTGAA	TGATCCATTGCTGTAGTTCATTC

<i>DMD</i>	78	GTGAGGAAGATCTTCTCAGTCC	CTCCATCGCTCTGCCCAAATC
------------	----	------------------------	-----------------------

Table S3 Sequence of the primers used to quantify the relative expression of the indicated genes by RT-qPCR

Gene	Forward primer sequence (5→3')	Reverse primer sequence (5→3')
<i>AKT1</i>	TGGACTACCTGCACTCGGAGAA	GTGCCGCAAAGGTCTTCATG
<i>ATG2B</i>	CTTCAGATGGAGTTGGAGGAGAC	AGTGGCTCCTTTCAGTCTACG
<i>ATG3</i>	ACTGATGCTGGCGGTGAAGATG	GTGCTCAACTGTTAAAGGCTGCC
<i>ATG4A</i>	CAAGCCAGAAGTGACAACCA	TTATGGTGCCAGATGGAAGA
<i>ATG5</i>	GCAGATGGACAGTTGCACACAC	GAGGTGTTTCCAACATTGGCTCA
<i>ATG7</i>	CGTTGCCACAGCATCATCTTC	CACTGAGGTTACCATCCTTGG
<i>DMPK</i>	AGCCTGAGCCGGGAGATG	GCGTAGTTGACTGGCGAAGTT
<i>FBX032</i>	CACTGGTCCAAAGAGTCGGCAA	GCACAAAGGCAGGTCAGTGAAG
<i>FOXO1</i>	CTACGAGTGGATGGTCAAGAGC	CCAGTTCCTTCATTCTGCACACG
<i>FOXO3</i>	TCTACGAGTGGATGGTGCCTTG	CTCTTGCCAGTTCCTCATTCTG
<i>GAPDH</i>	CAACGGATTTGGTCGTATTGG	TGATGGCAACAATATCCACTTTACC
<i>Il-1B</i>	CCACAGACCTTCCAGGAGAATG	GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG
<i>MuRF1</i>	AAGCCAGTGGTCATCTTGCCGT	CTCCAGACATGGACACTGAGCT
<i>VPS34</i>	GCGTTCTTTGCTGGCTGCACAA	CTCCAAGCAATGCCTGTAGTCTC

-Anexos-

-Artículo 3-

Musashi-2 contributes to myotonic dystrophy muscle dysfunction by promoting excessive autophagy through *miR-7* biogenesis repression

Maria Sabater-Arcis,^{1,2} Ariadna Bargiela,^{1,2} Nerea Moreno,^{1,2} Javier Poyatos-Garcia,^{3,4} Juan J. Vilchez,^{3,4} and Ruben Artero^{1,2}

¹Translational Genomics Group, University Institute for Biotechnology and Biomedicine (BIOTECMED), University of Valencia, 46100 Burjassot, Valencia, Spain; ²INCLIVA Biomedical Research Institute, 46100 Burjassot, Valencia, Spain; ³Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, Spain; ⁴Neuromuscular Research Unit, Neurology Department, Instituto de Investigación Sanitaria la Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, 46026 Valencia, Spain

Skeletal muscle symptoms strongly contribute to mortality of myotonic dystrophy type 1 (DM1) patients. DM1 is a neuro-muscular genetic disease caused by CTG repeat expansions that, upon transcription, sequester the Muscleblind-like family of proteins and dysregulate alternative splicing of hundreds of genes. However, mis-splicing does not satisfactorily explain muscle atrophy and wasting, and several other contributing factors have been suggested, including hyperactivated autophagy leading to excessive catabolism. MicroRNA (*miR*)-7 has been demonstrated to be necessary and sufficient to repress the autophagy pathway in cell models of the disease, but the origin of its low levels in DM1 was unknown. We have found that the RNA-binding protein Musashi-2 (*MSI2*) is upregulated in patient-derived myoblasts and biopsy samples. Because it has been previously reported that *MSI2* controls *miR*-7 biogenesis, we tested the hypothesis that excessive *MSI2* was repressing *miR*-7 maturation. Using gene-silencing strategies (small interfering RNAs [siRNAs] and gapmers) and the small molecule *MSI2*-inhibitor Ro 08-2750, we demonstrate that reducing *MSI2* levels or activity boosts *miR*-7 expression, represses excessive autophagy, and downregulates atrophy-related genes of the UPS system. We also detect a significant upregulation of *MBNL1* upon *MSI2* silencing. Taken together, we propose *MSI2* as a new therapeutic target to treat muscle dysfunction in DM1.

INTRODUCTION

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a severe and chronically debilitating disease caused by an expansion of the CTG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region (3' UTR) of the *DM1 protein kinase* (*DMPK*) gene. DM1 is autosomal dominant and can affect newborns to elderly people. Adult-onset patients may become physically disabled and may have a shortened lifespan. Most symptoms are neuromuscular, including muscle weakness (myopathy), muscle stiffness and trouble relaxing muscles (myotonia), and progressive muscle wasting (atrophy), but DM1 is characteristically multisystemic and also affects the heart, the brain, and the smooth musculature. Pneu-

monia and respiratory distress due to muscle weakness and atrophy and heart failure are the most frequent causes of death.¹

Mutant *DMPK* transcripts in skeletal muscle, heart, and brain tissue get retained in the cell nucleus into microscopically visible ribonuclear foci.² CUG trinucleotide expansions fold into stable, double-stranded stem-loops that sequester the splicing factors Muscleblind-like (*MBNL*).³ CUGBP Elav-like family member 1 (*CELF1*) regulates alternative splicing antagonistically to *MBNL1*. In contrast to *MBNL1*, *CELF1* is not sequestered into ribonuclear foci but is hyper-activated and stabilized in the cell nucleus.⁴ Like *CELF1*, the RNA-binding protein heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (*HNRNPA1*) is up-regulated in DM1 and antagonizes *MBNL* activity inducing fetal splicing shifts.⁵ In the context of splicing alterations due to *MBNL1/CELF1/hnRNP1* imbalance, the post-transcriptional control of muscle genes compromises the correct skeletal muscle differentiation and function. One example is the mis-splicing of *dystrophin* (*DMD*), induced by *MBNL1*, that affects muscle architecture and fiber maintenance contributing to the dystrophic process characteristic of DM1 skeletal muscles.⁶ Additionally, the re-expression of the embryonic M2 isoform of pyruvate kinase (*PKM2*) in DM1 alters glucose metabolism homeostasis leading to defects in energy metabolism associated with muscle dysfunction.⁷

Muscle wasting is a critical symptom in DM1 patients, and multiple contributing factors have been proposed to explain muscle loss.⁸ Several studies support a relevant role for hyperactivated autophagy. In a *Drosophila* DM1 model and DM1 myotubes, the autophagic flux is overactivated, and genetic or chemical blockade of this pathway, by mechanistic target of rapamycin kinase (mTOR) upregulation or chloroquine treatment, an autophagy blocker, improves muscle

Received 4 February 2021; accepted 10 August 2021;
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.08.010>.

Correspondence: Ariadna Bargiela, University Institute for Biotechnology and Biomedicine (BIOTECMED), University of Valencia, Dr. Moliner, 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain.
E-mail: ariadna.bargiela@uv.es

function and molecular markers of muscle atrophy.^{9,10} In the same *Drosophila* model, overexpression of Muscleblind is sufficient to recover muscle area and expression of autophagy-related genes.⁹ Muscle wasting and histological defects are also found in an inducible mouse model that expresses 960 CUG repeats, in which proteins involved in the autophagic pathway are upregulated, thus suggesting an imbalance between anabolic and catabolic pathways that normally regulate muscle mass.¹¹ In the widely used human skeletal actin long repeats (HSA^{LR}) mouse model, expressing 250 CUG repeats in the skeletal musculature, treatment with chloroquine also rescues muscle dysfunction defects, possibly through increased levels of MBNL1 and MBNL2.¹⁰ Importantly, primary myoblasts derived from DM1 patients show normal myogenesis but impaired apoptosis and autophagy.¹²

Other studies have shown that some microRNAs (miRNAs) are mis-expressed in skeletal muscle, heart, and blood samples from DM1 patients and DM1 muscle cells and mouse models.^{13–17} Specifically, miRNA (*miR*)-7 levels are reduced in human skeletal muscle biopsies and DM1 muscle cells. Through complementary *miR*-7 modulation strategies, it was demonstrated that downregulation of *miR*-7 in control myotubes originates DM1-like phenotypes, whereas restoration of normal miRNA levels in DM1 cells downregulates excessive autophagy and ubiquitin proteasome system (UPS). Thus, *miR*-7 is necessary and sufficient to inhibit major catabolic processes contributing to muscle wasting, placing *miR*-7 as a new target to treat DM1.^{13,17} Furthermore, independent studies place *miR*-7 as a critical inhibitor of the autophagy pathway through upregulation of the mTOR signaling and direct translational repression of critical autophagy genes, namely *ATG7*, *ULK2*, and *ATG4A*.¹⁸ *miR*-7 biogenesis is regulated by Musashi homolog 2 (*MSI2*) and Hu antigen R (*HuR*). *MSI2* binds through *HuR* to the conserved terminal loop of *pri-mir-7-1*, resulting in the stabilization of the immature miRNA reducing the levels of the mature form.¹⁹ In mammals, the two family members *MSI1* and *MSI2* are highly expressed in stem cells but almost absent from differentiated tissues.²⁰ Moreover, it was suggested in mouse models that *Msi* proteins are splicing regulators, as numerous alternative exons were altered after *Msi1* or -2 knockout or overexpression.²¹ However, as *Msi* was mainly located in the cytoplasm, effects in pre-mRNA splicing might be indirect. Here, we report that *MSI2* is upregulated in DM1, which explains the reduced levels of *miR*-7 in disease samples, and propose *MSI2* as a new contributing factor to explain the muscle atrophy of the disease.

RESULTS

MSI2 overexpression correlates with decreased levels of miR-7 in DM1

We previously reported that *miR*-7 is reduced in DM1 and that its normalization rescues muscle wasting phenotypes.¹⁷ However, the reasons leading to its reduction remained unknown. To shed light on this problem, we first measured *miR*-7 levels in deltoid muscle biopsies from 17 healthy controls (37 years \pm 3; median \pm SEM) and 16 DM1 donors (45 years \pm 3), in six primary myoblast lines obtained from the above biopsies (3 control and 3 DM1), and DM1 fibroblasts ex-

pressing 1,300 CTG repeats²² transdifferentiated into multinucleated myotubes (TDMs) for 7 days (Figure 1A). In all cases, we confirmed significantly lower levels of *miR*-7 in DM1 samples. Considering previous work demonstrating that the RNA-binding protein *MSI2* blocks *miR*-7 biogenesis,¹⁹ we hypothesized that *MSI2* could be upregulated in DM1 cells (Figures 1B–1E). Indeed, we found an excess of *MSI2* in muscle biopsies and TDMs (near 60 times at the protein level compared to control TDMs) but not in primary myoblasts. Furthermore, we immunodetected *MSI2* in healthy control and DM1 TDMs, where we confirmed the increased expression in DM1 muscle cells and found that *MSI2* localization was predominantly cytoplasmic (Figures 1C and 1D). Consistent with our hypothesis that increased *MSI2* in DM1 might contribute to low levels of mature *miR*-7, the relative expressions of *miR*-7 and *MSI2* protein correlated negatively and significantly in biopsies ($r = -0.54$, $p = 0.045$) (Figure 1F). To further validate *MSI2* overexpression in DM1 and that this alteration was relevant in the disease, we resorted to publicly available RNA sequencing (RNA-seq) and ankle dorsiflexion strength data from 40 patients and ten controls.²³ Importantly, *MSI2* was significantly overexpressed (over 35%) in DM1 compared to controls, in full agreement with results obtained in our muscle sample cohort (Figure 1G). The analysis also supported that *MSI2* levels negatively correlated with ankle dorsiflexion strength (Figure 1H; $r = -0.48$, $p = 0.0017$).

Silencing of MSI2 rescues cell parameters related to muscle disease in TDMs

To confirm that excessive *MSI2* was involved in muscle-wasting mechanisms, we targeted *MSI2* transcripts by small interfering RNAs (siRNAs) and gapmers, triggering RNAi and RNase-H degradation, respectively. We tested a combination of two siRNAs and a control with a random sequence for 48 h in DM1 TDMs. *MSI2* levels were quantified finding a reduction of transcripts of almost 70% compared to the same cells treated with the control (Figure 2A). Importantly, this reduction had functional consequences in the cell since the direct target *miR*-7 increased (more than three times). Additionally, we quantified *TGFBR1* levels, as it was demonstrated to be directly regulated by *MSI2*²⁴ and also *P21*, which, in contrast to *TGFBR1*, is inhibited by *MSI2*.²⁵ *TGFBR1* levels dropped (near 40%), and *P21* levels, however, did not significantly change (Figure 2B). *MSI2* silencing was also assessed at the level of the strong myotubes fusion phenotype described for TDMs, which we previously showed that *miR*-7 overexpression was sufficient to improve.¹⁷ After 7 days of differentiation, TDMs treated with siRNAs were immunodetected for Desmin, a class-III intermediate filament protein widely used as a marker of myogenic cells (Figures 2C and 2D). The reduction in *MSI2* levels was sufficient to improve the fusion capacity of the cells to more than 70% compared to a mere 40% in the same cells treated with the scrambled siRNA (Figure 2E). Myotube diameter trended higher than controls upon *MSI2* silencing but did not reach statistical significance (Figure 2F).

As alternatives to siRNAs, we designed three antisense oligonucleotides (ASOs) with RNase-H triggering activity (also known as gapmers) against different exons within the *MSI2* transcript isoform 1 and a scrambled control oligonucleotide with the same chemistry.

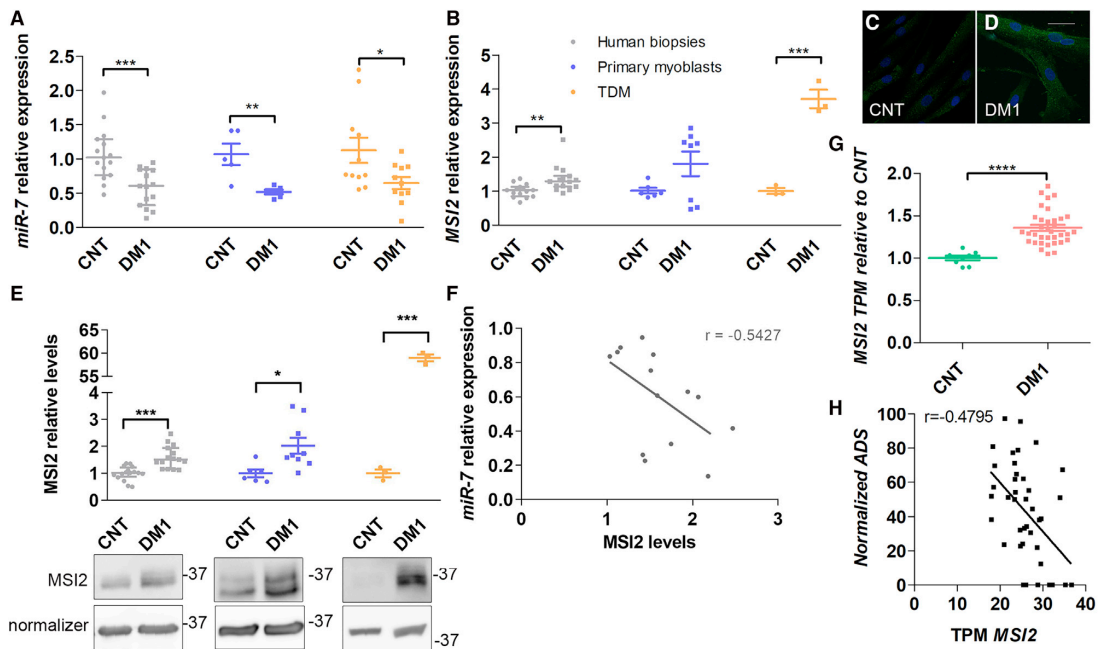


Figure 1. MSI2 is upregulated in DM1 samples

Quantification by qRT-PCR of the relative expression of (A) *miR-7* and (B) *MSI2* in human biopsies (gray; n = 17 controls; n = 16 DM1), cultured primary myoblasts (blue; n = 3), and transdifferentiated myoblasts (TDMs; orange; n = 1). *miR-7* quantification is relative to endogenous *U1* and *U6* levels, and *MSI2* is referenced to *GADPH* and *GPI* expression. Sample sizes indicate biological replicates. At least three independent experiments were carried out for primary myoblasts and TDMs, and three technical replicates were performed from each biological sample in all cases. Representative confocal images of *MSI2* immunostained (green; C) healthy controls and (D) DM1 TDMs. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 20 μ m. (E) Analysis of relative protein levels of *MSI2* by western blot and representative blots of protein extracts obtained from human biopsies, cultured primary myoblasts, and TDMs. β -actin and *GAPDH* were used as endogenous controls to normalize protein levels of TDMs or human biopsies and primary myoblasts, respectively. Samples sizes as in (A) except n = 3 for primary myoblasts and TDMs. The scatterplots show the median with interquartile range for human biopsies and mean \pm SEM for cultured cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ according to Student's t test. (F) Pearson's correlations between the relative *miR-7* and *MSI2* protein expression levels in human biopsies (gray). (G) The scatterplot represents *MSI2* transcripts per million (TPM) in biopsies from 40 DM1 patients and 10 controls (according to Wang et al.²³) with the median and interquartile range. **** $p < 0.0001$ according to Student's t test. (H) Pearson's correlation between *MSI2* TPM in DM1 biopsies and ankle dorsiflexion strength (ADS) measured in biopsy donors according to Wang et al.²³

Initially, we assayed their toxicity profile in control TDMs and observed low toxicity, as at near 1,000 nM, the cell viability was still higher than 50%. Two different concentrations were used in subsequent experiments: 30 nM, at which around 90% of cells were viable, and 150 nM, at which between 70% and 80% of the cells were viable when transfected with any of the three ASOs (Figure 3A). To confirm the activity of the ASOs, we measured *MSI2* relative expression upon transfection in DM1 TDMs. We observed a significant reduction with ASO1 and -3, but ASO1 was better at both tested concentrations. Similar results were observed quantifying *MSI2* protein levels (Figures 3B and 3C). The scrambled sequence ASO did not significantly reduce *MSI2* transcripts at 150 nM in transfected control TDMs (Figure S1). Overall, the level of silencing achieved with ASOs was higher than that obtained with siRNAs and, as expected, led to significant changes in direct *MSI2* targets. *miR-7* was derepressed in ASO-treated DM1 cells, except for ASO2, which did not significantly alter *miR-7* levels

compared to scrambled ASO (Figure 3D). Given the lack of activity on *MSI2* transcripts and the *miR-7* target, ASO2 was discarded as a potential molecule to silence the gene. The effect of reduced *MSI2* levels on *P21* and *TGFBR1* targets was also studied (Figure 3E). *P21* was strongly derepressed in muscle cells treated with ASO3 at the lowest concentration, whereas *TGFBR1* behaved the opposite at 150 nM of ASO1. After 7 days of differentiation, TDMs were stained with an antibody against Desmin. Quantification of fusion capacity and myotube diameter showed that reducing *MSI2* levels in DM1 TDMs restored the fusion index dramatically, in a dose-dependent manner in the case of ASO3, and the size of the myotubes (Figures 3F–3J).

Reduction of *MSI2* inhibits hyperactivated autophagy and muscle atrophy-related genes in DM1 TDMs

Given the involvement of *MSI2* in *miR-7* biogenesis,¹⁹ we investigated the expression of critical autophagy pathway genes in DM1 and

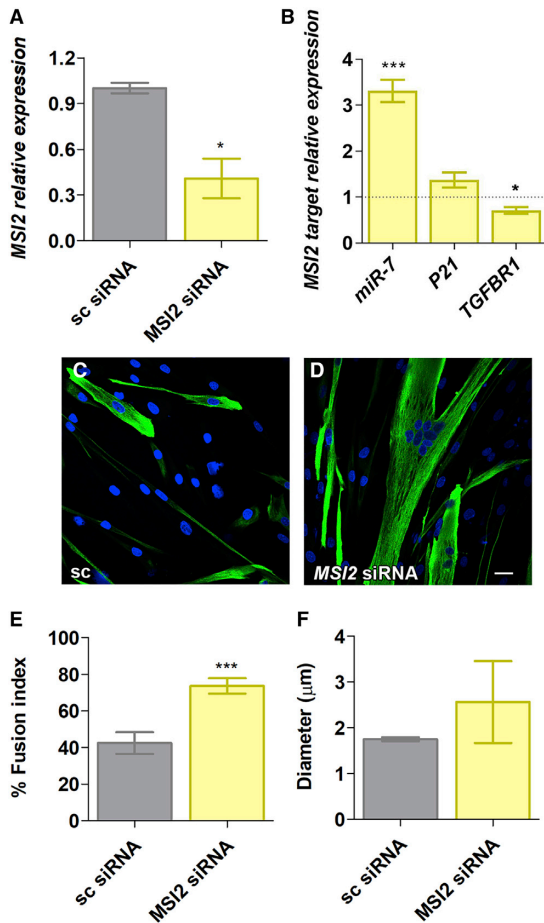


Figure 2. MSI2 is reduced after siRNA treatment in DM1 TDMs

Quantification by qRT-PCR of (A) *MSI2* and (B) *miR-7*, *P21*, and *TGFBR1* in DM1 TDMs treated with 100 nM scrambled (sc) siRNA or a combination of two siRNAs targeting *MSI2* at a final concentration of 100 nM. Levels of *MSI2*, *P21*, and *TGFBR1* are relative to the mean of *GAPDH* and *GPI*, whereas *miR-7* was normalized to *U1* and *U6*. Data come from three biological replicates. (C and D) Representative confocal images of Desmin-immunostained (green) human TDMs for 7 days after 100 nM siRNA transfection into DM1 cells. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 200 μ m. Quantification of (E) myogenic fusion index and (F) myotube diameter of DM1 myoblasts transfected with the indicated siRNA (between 10 and 15 images analyzed, totaling some 400–500 nuclei). The statistical analysis was performed comparing values from treated cells with their corresponding scramble (black dashed line in B). The bar graphs show mean \pm SEM. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ according to Student's *t* test.

control TDMs, namely *ATG3*, *ATG4A*, *ATG5*, *ATG7*, and *mTOR* (Figure 4A). Their expression was rescued significantly, approaching normal levels in all cases, after treatment with ASOs at one or both concentrations tested, except *ATG5*, which only significantly reduced

its expression at the highest concentration of ASO1 (Figure 4B). Autophagy status in DM1 TDMs in response to *MSI2* levels was also assessed at the protein level. We evaluated the expression of *ATG4A* and *ATG7*, direct *miR-7* targets, and observed that *ATG4A* was dramatically reduced (around 50% compared to scrambled ASO) at the highest concentration of ASOs, whereas *ATG7* was also repressed in response to low *MSI2* upon ASO transfection (Figures 4C and 4D). Additionally, we tested the activation of the AKT pathway by calculating the phospho(Ser473)-AKT (AKT-P)-to-total-AKT ratio. This is a relevant parameter, as AKT controls both protein synthesis via mTOR and protein degradation (including autophagy) via the FoxO family of transcription factors.^{26,27} Our data show a robust increase in AKT-P/AKT ratio in cells treated with 150 nM ASO1 or ASO3 (Figure 4E). The soluble-to-autophagosome-associated-LC3 (LC3-I and LC3-II, respectively) ratio was also quantified since the transformation of LC3-I into LC3-II is an indicator of increased autophagic flux in cells.²⁸ Notably, autophagic flux dropped to about one-half when *MSI2* was silenced with the highest concentration of ASOs (Figure 4F). Finally, we quantified P62 scaffold protein levels that deliver proteins committed for lysosomal degradation to the autophagosome. Low levels of autophagic activity lead to the accumulation of P62, as autophagy itself degrades the protein.^{29,30} We did not detect any significant increase in P62 levels upon ASO treatment (Figure S2).

To further evaluate the autophagy status in DM1 TDMs treated with ASOs, we performed immunofluorescence staining to detect LC3. In cells transfected with the scrambled ASO, a heavily punctated pattern was observed. These spots correspond to LC3 conjugated to membrane-bound phosphatidylethanolamine (LC3-II) in autophagosomes.³¹ However, upon reduction in *MSI2* levels, these spots disappear, and the signal becomes mainly cytoplasmic and diffuse, indicating an increase in soluble LC3-I and, therefore, lower autophagic flux (Figures 5A–5F). We analyzed LC3 immunofluorescence results by quantifying LC3 dots per unit of area (Figure 5G). Analyzed dots correspond to the LC3-II isoform involved in the autophagosome formation, an essential step in the mechanism underlying autophagy. Our results confirmed increased puncta formation in DM1 TDMs (around four times) and also that this parameter can be modulated upon *MSI2* targeting with ASOs. Both ASO1 and -3 caused a significant decrease in LC3 dots when added to DM1 TDMs compared to cells treated with the scrambled ASO at the same concentration. The acidotropic dye LysoTracker marks the acidic cellular compartments, including lysosomes and autophagolysosomes, which are excellent markers of autophagy flux levels. When the muscle cells were treated with the ASOs at the lowest concentration, no noticeable change was observed in the signal; however, treatment with high ASO concentration strongly lowered the signal, thus confirming the reduction in autophagic activity when *MSI2* gets silenced (Figures 5H–5M).

Since we have previously reported that increased *miR-7* levels rescued expression of muscle atrophy-related genes,¹⁷ we quantified the transcripts of a set of genes involved in protein degradation belonging to the UPS system, namely *FBXO32*, *MURF1*, *FOXO1*, *FOXO3*, *AKT1*,

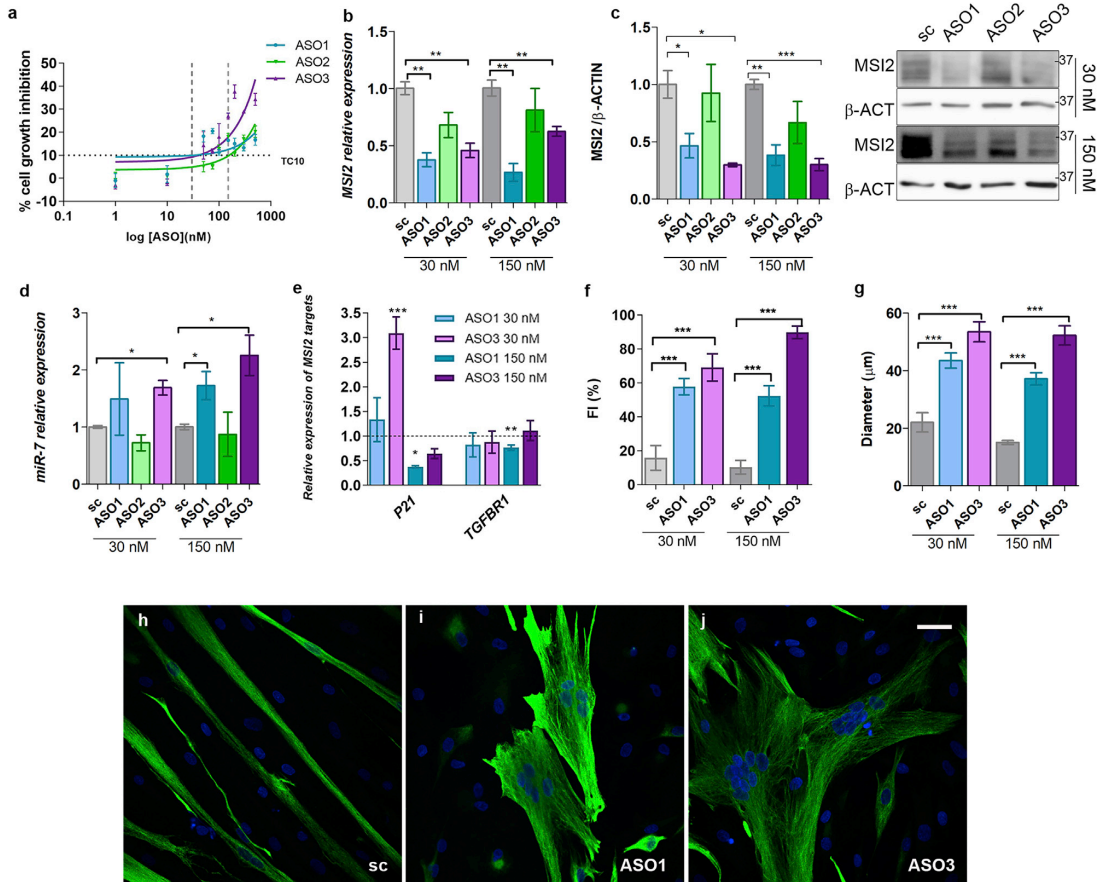


Figure 3. Atrophic muscle markers ameliorate in DM1 TDMs upon MSI2 reduction

(A) Cell growth inhibition assay by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) method. Human control (CNT) myoblasts were transfected with a range of concentrations of ASO1, -2, and -3 ($n = 4$). TC10 (33.1 nM, 158.3 nM, and 40.6 nM for ASO1, -2 and -3, respectively) was obtained using the least-squares non-linear regression model. Vertical dashed lines indicate 30 and 150 nM concentrations used in the subsequent experiments. MSI2 quantification by (B) qRT-PCR relative to *GAPDH* and *GPI* and (C) by western blot relative to β -actin expression. (D) Quantification of *miR-7* relative to *U1* and *U6* in DM1 TDMs transfected with the indicated ASOs. (E) Quantification by qRT-PCR of *P21* and *TGFBR1* expression relative to the mean of *GAPDH* and *GPI* levels after treatment of the muscle cells with the indicated concentrations of ASOs. Relative expression of control myotubes 1.412 ± 0.068 and 0.643 ± 0.042 for *P21* and *TGFBR1*, respectively. (D and E) The sample size was three biological replicates. (F) Analysis of myogenic fusion index and (G) myotube diameter of DM1 myoblasts transfected with the indicated concentrations of ASOs or scramble ($n = 10-15$ images analyzed). (H-J) Representative confocal images of Desmin-immunostained (green) human TDMs for 7 days after ASO or scrambled control transfection at 150 nM. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 40 μ m. The bar graphs show mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, according to Student's *t* test. In all cases, the statistical analysis compares the values of ASO and scrambled-treated cells (black dashed line or gray bar).

IGF1, *IL-1 β* , and *MSTN*. We observed that all of them were misregulated in DM1 myotubes demonstrating pathological upregulation of this pathway (Figure 5N). Consistent with the observations upon *miR-7* modulation, MSI2 silencing rescued the expression of most of the genes studied, at least at one of the two concentrations tested (Figure 5O). *IGF1*, *FBXO32*, and *MSTN* levels were significantly rescued by at least one ASO concentration. Taken together, these results indicate that ASO-mediated reduction in MSI2 transcript level

mimic gene expression rescues in autophagy and UPS systems brought about by *miR-7* agomiRs in DM1 TDMs.

Reducing MSI2 boosts MBNL1 levels in DM1 TDMs

Considering the key role of MBNL and CELF1 proteins in the pathogenesis of DM1 and previous results where inhibition of autophagy in DM1 promoted MBNL1 activity,¹⁷ we quantified MBNL1 and MBNL2 and CELF1 levels after ASO treatments. Our data show that

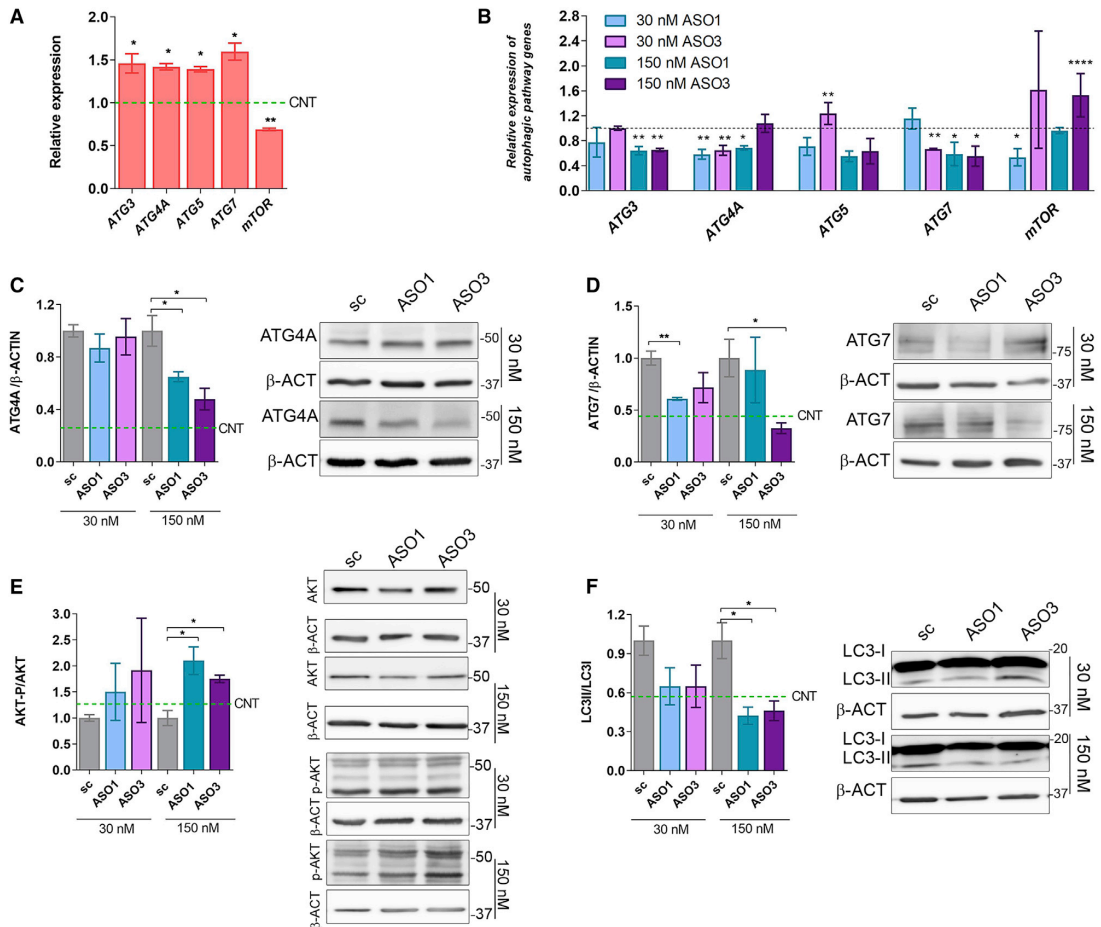


Figure 4. Inhibition of MS12 expression in DM1 TDMs restores impaired autophagic markers

(A) qRT-PCR quantification of the relative expression of the indicated genes involved in different autophagy pathway steps in DM1 and control (green dashed lines) myotubes. Statistical analyses were performed comparing DM1 versus controls. (B) Analyses of the expression of genes quantified in (A) in DM1 myotubes treated with ASOs targeting *MS12* transcripts. All comparisons for the statistical analyses were performed using their corresponding scrambled control (dashed lines). The mean of *GAPDH* and *GPI* expression was used as reference (n = 3). Quantification and representative western blots of (C) ATG4A, (D) ATG7, (E) AKT-P/AKT total protein levels, and (F) LC3-II/LC3-I ratio in DM1 TDMs treated with *MS12* targeting or scrambled ASOs at the indicated concentrations. Green dashed lines indicate protein expression levels in control myotubes. β -actin was used as an endogenous control to normalize protein levels (n = 3). The bar graphs show mean \pm SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001 according to Student's t test.

when DM1 muscle cells were treated with ASOs at 150 nM, MBNL1 protein was enhanced, achieving levels 50% higher than those obtained in cells treated with scrambled ASO (Figure 6A). No effect was observed on MBNL1 transcript levels upon ASO treatment (Figure S3). In contrast, MBNL2 and CELF1 levels remained unchanged after ASO treatment (Figures 6B and 6C; Figure S3). These results were confirmed by immunofluorescence staining to detect MBNL1 and MBNL2 in ASO-treated DM1 TDMs. For MBNL1, a low concentration of ASOs did not change the intensity or the pattern of the signal

compared to scrambled-treated controls, but at the high ASO concentration, a boost in the green signal became evident both in the cytoplasm and in the cell nucleus (Figures 6D–6I). An antibody against MBNL2 gave results consistent with the western blot quantification, except for a slight increase with 150 nM ASO1, although the signal was very weak given the low expression of MBNL2 (Figures 6J–6O). To confirm that the additional protein detected was functional, we studied splicing defects regulated by MBNL proteins (Figures 6P–6R). ASO-induced MBNL1 increase was sufficient to reduce

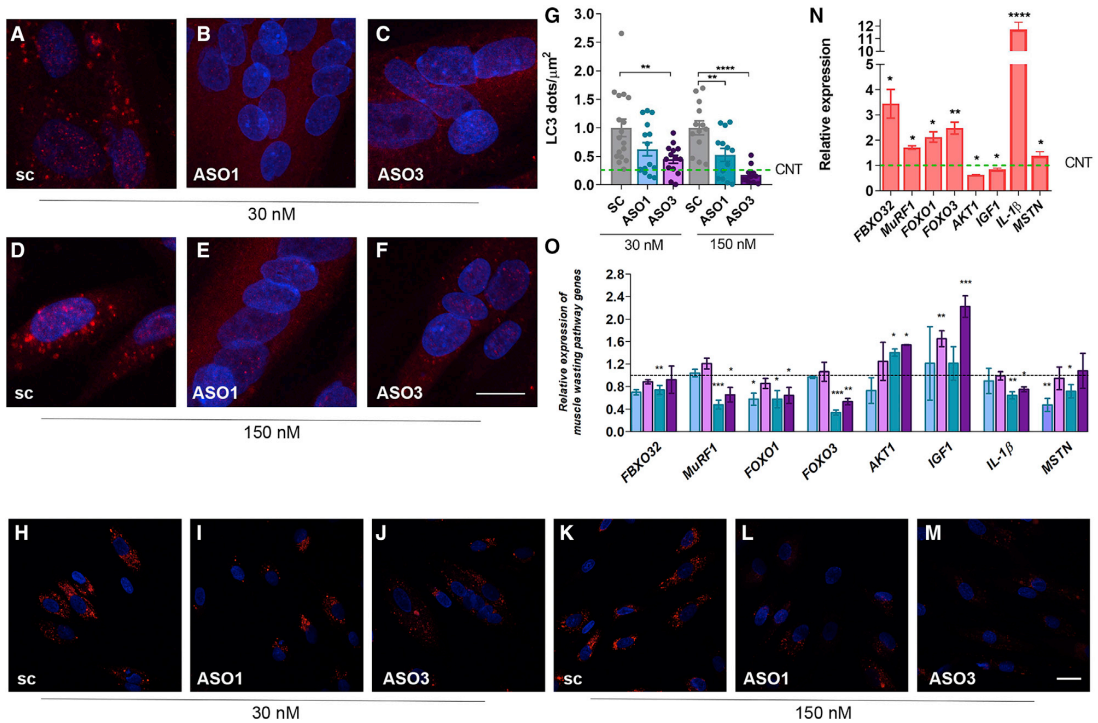


Figure 5. Blocking MSI2 expression improves muscle wasting markers in DM1 TDMs

(A–F) Fluorescence confocal images of LC3 immunostaining (red) or (H–M) LysoTracker staining (red) in 7-day TDMs treated for 48 h with (A, D, H, and K) scramble, (B, E, I, and L) ASO1, or (C, F, J, and M) ASO3 at the indicated concentrations. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar, 20 μ m. (G) Quantification of LC3 puncta per square micrometer. Each condition was compared to cells treated with its corresponding scrambled oligonucleotides. The green dashed line shows the mean value obtained for control muscle cells. Quantification by qRT-PCR of the relative expression of genes involved in catabolic pathways leading to muscle degradation in DM1 and control myotubes (N) or DM1 cells treated with the indicated concentration of ASOs (O). Statistical analyses were carried out comparing DM1 with the control condition (N) or comparing ASOs with their corresponding scramble (O). GAPDH and GPI were used as endogenous controls ($n = 3$). The bar graphs show mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ according to Student's *t* test.

the inclusion of pyruvate kinase (PK) exon 10 (fetal PKM2 isoform)⁷ in all of the experimental conditions evaluated. The inclusion of *SERCA1* exon 22 (ASO3) or *NFIX* exon 7 (both tested ASOs) further confirms the relevance of the extra MBNL1 detected.

MSI2 activity inhibitor Ro 08-2750 improves phenotypes in DM1 muscle cells

MSI2 contains two highly conserved RNA-binding domains. The first is crucial for the binding specificity, whereas the second adds affinity for its target sequences.³² It was recently demonstrated that Ro 08-2750 binds to the first RNA-binding site, thus blocking MSI2 ability to bind to its target RNAs and consequently, the regulation that MSI2 exerts over them.³³ Considering this, we treated DM1 TDMs differentiated for 7 days with 10 and 15 μ M Ro 08-2750, which were concentrations below TC10 (11.44 μ M) and below TC50 (20.06 μ M; Figure S4A), respectively. MSI2 levels were analyzed in cells treated with the small molecule, and according to the described mechanism

of action of Ro 08-2750,³³ a mild effect on MSI2 levels was observed upon the treatment (Figures 7A and 7B; Figure S4). Consistent with its role in *miR-7* biogenesis, DM1 cells treated with the compound at 10 μ M showed a significant 2.5-fold increase in *miR-7* levels compared to control DM1 TDMs (DMSO; Figure 7C; Figure S4). *TGFBR1* expression, a direct target of MSI2, was also significantly reduced by 10 μ M of Ro 08-2750, whereas for *P21*, no change was detected (Figure 7D; Figure S4). Since the strongest effect of the molecule was detected at 10 μ M, we decided to test the dose response on evaluated phenotypes of lower concentrations. For this purpose, we treated DM1 TDMs with 1 and 3 μ M of Ro 08-2750. No effect was detected on MSI2 levels or its targets *P21* and *TGFBR1* at 1 μ M. However, 3 μ M was sufficient to significantly de-repress *miR-7* biogenesis leading to levels similar to those obtained with the 10 μ M treatment (Figure S4)

The fusion index and myotube diameter were obtained in Desmin-immunostained cells to check whether the observed reduction in

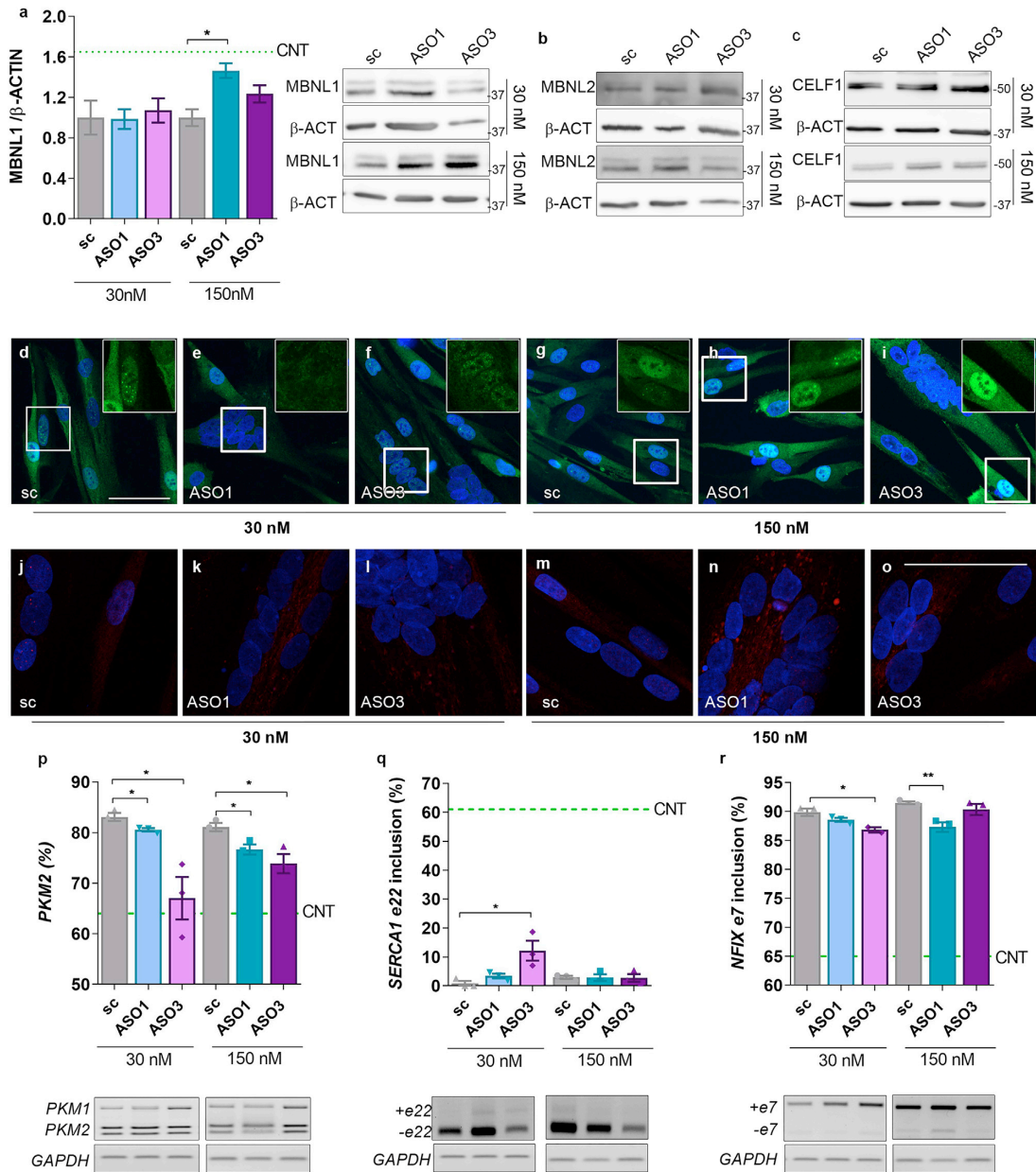


Figure 6. Degradation of *MSI2* transcripts enhances MBNL1 levels in 7-day differentiated TDMs

(A) Quantification and representative blots of MBNL1 levels in protein extracts obtained from DM1 TDMs treated with the indicated concentrations of *MSI2*-targeting or scrambled ASOs. (B and C) The western blots shown are representative of the amounts of MBNL2 and CELF1. β -actin was used as an endogenous control ($n = 3$). Representative confocal images of (D–I) MBNL1 (green) or (J–O) MBNL2 (red) immunodetection in DM1 TDMs treated for 48 h with scramble (D, J, G, and M), ASO1 (E, K, H, and N), or ASO3 (F, L, I, and O) at the indicated concentrations. Nuclei were counterstained with DAPI (scale bar, 50 μ m). (P–R) Semiquantitative RT-PCR analyses and

(legend continued on next page)

MSI2 levels and activity inhibition had any impact on the DM1 cell model (Figures 7E–7G). The fusion index and diameter of the cells improved significantly at both concentrations of Ro 08-2750, but the rescue was more robust at 10 μ M (Figures 7H and 7I). Additionally, we evaluated the fusion index after treating the cells with 1 or 3 μ M of Ro 08-2750, and we confirmed that the recovery was in a dose-dependent manner reaching a peak at 10 μ M (Figure S4). Specifically, the recovery percentage was 48%, 77%, 98%, and 63% when cells were treated at 1, 3, 10, and 15 μ M of Ro 08-2750. Considering the results obtained at the different concentrations of Ro 08-2750 tested, we found that 10 μ M was the optimum concentration to work with the compound, since when treating DM1 TDMs with concentrations below or above, the rescues disappeared or worsened, respectively. Given the regulation of the autophagy pathway by MSI2 and *miR-7*, three proteins involved in the process (ATG4A, ATG7, P62) were quantified by western blot (Figures 7J–7L). The results confirmed the contribution of MSI2 to the hyperactivation of the autophagy pathway, since DM1 TDMs treated with 10 μ M of the MSI2 inhibitor significantly rescued the levels of the autophagy-related proteins and qualitatively decreased the formation of autophagolysosomes according to LysoTracker stainings (Figures 7M–7O). Overall, these results demonstrate that similar molecular and cell rescues can be obtained by MSI2 silencing and protein activity inhibition.

To validate results, we treated independent DM1 cell lines with the MSI2 inhibitor Ro 08-2750. Specifically, we treated immortalized myoblasts differentiated for 7 days from the same donor as for TDMs (Figure 8) and two primary myoblast lines obtained from additional patient biopsies (Table S1; Figure 9). We confirmed that MSI2 levels were significantly increased compared to controls, whereas *miR-7* behaved inversely (Figures 8A and 8B; Figure 9A). Notably, Ro 08-2750 at 10 μ M rescued the expression of the direct MSI2 targets *miR-7* and *P21* in all cell lines and *TGFBR1* in the DM1–14 (Figure 8B; Figure 9A). Similarly, UPS system and muscle degradation genes showing impaired expression in DM1 muscle cells were significantly rescued upon treatment (Figure 8C; Figure 9B). Additionally, we evaluated by anti-Desmin immunofluorescence the fusion capacity of immortalized myoblasts at 7, 10, and 14 days of differentiation (Figures 8D–8G; Figure S5). In all cases, the capacity of DM1 muscle cells was much lower when compared to control counterparts. Notably, the fusion index was significantly improved after treatment with the compound, namely 160%, 77%, and 95% at days 7, 10, and 14, respectively, compared to DM1 cells treated with vehicle only. In the case of primary myoblasts cultured for 7 days, it was also confirmed that the fusion capacities of both DM1–14 and DM1–16 lines were significantly impaired compared to healthy controls (Figures 9C–9H) and that this phenotype was dramatically reversed after the addition of 10 μ M Ro 08-2750. Finally, DM1 cells

showed increased LC3 puncta formation (Figures 8H–8K; Figures 9I–9N), confirming the hyperactivation of the autophagic pathway. In immortalized myotubes, this was reinforced by the detection of increased ATG4A and ATG7 protein levels (Figures 8L and 8M). Treatment with the small molecule was sufficient to reverse autophagic markers to a non-DM1 state dramatically.

Taken together, all results support that MSI2 represents a valid new therapeutic target to treat muscle dysfunction in DM1.

DISCUSSION

A key aspect of DM1 pathogenesis is progressive muscle wasting. DM1 muscle atrophy research has focused on the RNA toxicity concept and the increased activity and stability of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3b).³⁴ However, this paradigm has changed in the last years, as strong evidence supports alterations in various signaling pathways contributing to DM1 muscle dysfunction.⁸ *miR-7* downregulation originates, at least in part, autophagy overactivation, which is one of the most critical contributors to muscle atrophy in DM1 together with other atrophy-related pathways such as the UPS.^{9,12,17,35} However, the mechanisms promoting *miR-7* dysregulation remain unclear. Here, we report that MSI2 is pathologically overexpressed in DM1 samples, and its depletion by different gene-silencing strategies (siRNA, ASOs) or small-molecule inhibition increases *miR-7* levels and ameliorates disease-related muscle markers. The rescues detected were qualitatively similar to those observed in previous work, where *miR-7* was replenished with a miRNA mimic in DM1 TDMs.¹⁷ Nevertheless, a quantitative comparison between the different strategies to silence MSI2 indicates that the lower the MSI2 levels and the higher *miR-7*, the better recovery parameters in DM1 TDMs. This association was apparent between inhibition of MSI2 and muscle growth rescue, showing the highest increase in diameter when the levels of MSI2 were the lowest. The previously reported treatment with a *miR-7* mimic or chloroquine in DM1 muscle cells achieved a milder recovery of the cells' diameter than the one observed in the present work.^{10,17} This suggests that together with the MSI2-*miR-7*-atrophy axis, MSI2 overexpression may have additional consequences independent of repression of *miR-7* biogenesis. However, based on the obtained results, it cannot be ruled out that there are other alterations in the disease that are contributing, additionally to MSI2, to the deregulation of *miR-7*. Specifically, it has been described that *miR-7* biogenesis is also regulated by the quaking protein, which, similarly to MSI2, binds to immature *miR-7*.³⁷ Moreover, it was reported that Cyran, a long non-coding RNA (lncRNA), binds to *miR-7* and effectively promotes its degradation via target-directed miRNA degradation.³⁸ In the context of DM1, of particular interest is the regulation of *miR-7* by the NF90-NF45 complex (also known as ILF2 and ILF3, respectively), which binds to pri-miR-7-1, inhibiting the synthesis of mature miRNA.⁴¹ Interestingly,

representative agarose gels of splicing events altered in DM1 cells: (P) *PKM* isoforms represented as the percent of *PKM2* and (Q) *SERCA1* (exon 22) and (R) *NFIX* (exon 7) represented as the percent of exon inclusion. *GAPDH* was used as an internal control (n = 3). In all cases, the statistical analyses were performed comparing values from treated cells with those obtained for cells treated with the scrambled ASO at the same concentration. Green dashed lines indicate values obtained for healthy control TDMs. The bar graphs show mean \pm SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001, according to Student's t test.

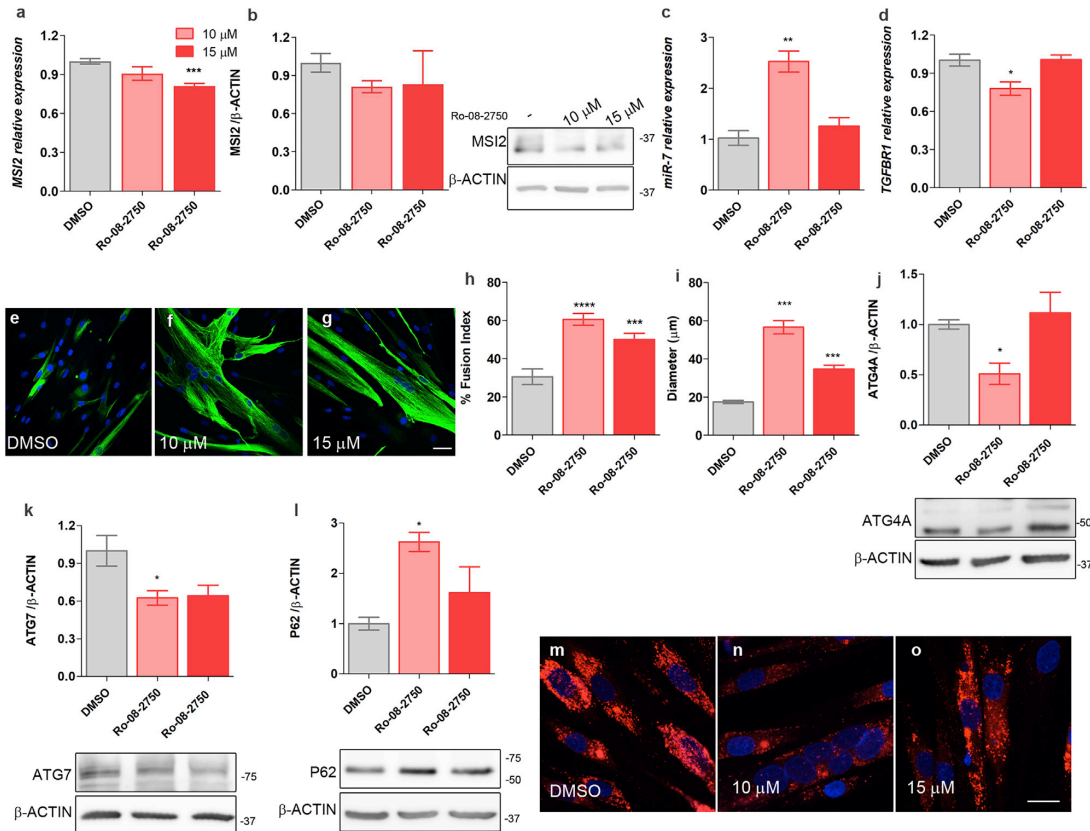


Figure 7. Downregulation of MSI2 activity by treatment with the small molecule Ro 08-2750 improves DM1-related phenotypes

MSI2 quantification by (A) qRT-PCR, relative to the mean of *GAPDH*, *GPI*, and *HPRT1* levels, and (B) western blot in 7-day differentiated DM1 TDMs treated for 48 h with 10 or 15 μM Ro 08-2750 or with 0.8% DMSO as control. Bar graph and representative blot images of MSI2 immunodetection are shown. β -actin expression was used as an endogenous control. (A and B) $n = 6$ for myotubes treated with DMSO and 10 μM Ro 08-2750. (C) Relative expression levels of *miR-7* were measured by qRT-PCR. Data were normalized to the mean of *U1* and *U6* levels. (D) Quantification by qRT-PCR of *TGFBRI* after small-molecule treatment relative to the mean of *GAPDH*, *GPI*, and *HPRT1* expression levels used as an endogenous reference. In all qRT-PCR and western blots, the sample size was $n = 3$, unless otherwise specifically indicated. Representative confocal images of Desmin-immunostained (green) human DM1 TDMs for 7 days after treatment with (E) DMSO as control or with Ro 08-2750 compound at (F) 10 μM or (G) 15 μM . Quantification of the percentage of myogenic fusion index (H) and myotube diameter (I) of DM1 TDMs with the indicated concentrations of the compound ($n = 10$ –15 images). Quantification by western blot of (J) ATG4A, (K) ATG7, and (L) P62. Representative blots used for quantification are shown below the bar graphs. β -actin was used as an endogenous control to normalize protein levels ($n = 3$). Representative confocal images of LysoTracker staining (red) of 7-day DM1 TDMs treated with (M) DMSO as control or with the Ro 08-2750 compound at (N) 10 μM or (O) 15 μM . (E–G and M–O). Scale bars correspond to 20 μm , and the nuclei were counterstained with DAPI. The bar graphs show mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ according to Student's *t* test.

upregulation of *ILF2* and *ILF3* was demonstrated in biopsies from DM1 skeletal muscles.¹⁷ Globally, it is possible that other new targets exist in a DM1 context to modulate *miR-7* levels.

Besides using strategies to inhibit MSI2, we treated four different DM1 cell models with the small molecule Ro 08-2750 that binds directly and selectively to MSI2 and competes for its RNA binding, thus leading to inhibition of MSI2 RNA-binding activity and the regulation of downstream targets.³³ Globally, we fully validated

data obtained in the TDMs, provide evidence in multiple systems, and build more confidence in the robustness of modulating this pathway as a potential therapeutic strategy against DM1. Finally, our data are consistent with previous observations demonstrating that the axis *miR-7*-autophagy is involved in myotubes differentiation.³⁹

Skeletal muscle cells regulate their size by a balance of protein synthesis and degradation pathways.⁴⁰ Noteworthy, the reduction of MSI2

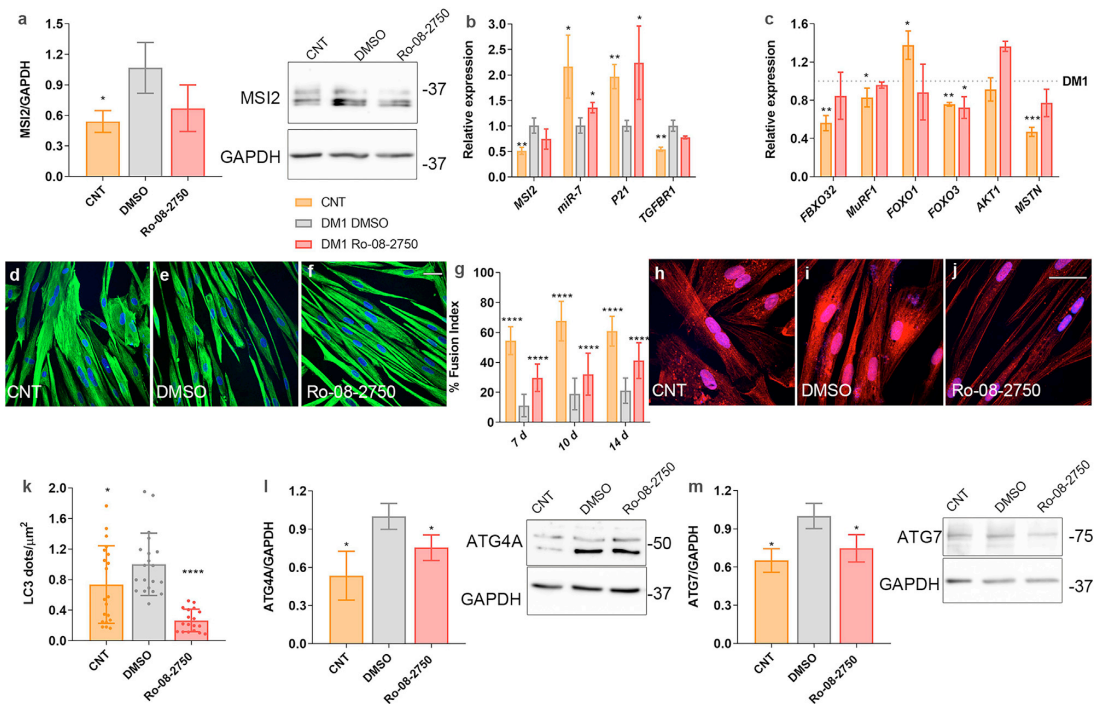


Figure 8. MSI2 inhibition in DM1 myoblasts improves pathological phenotypes

(A) MSI2 quantification by western blot and representative blots in control (orange) and DM1 myoblasts treated with vehicle 0.8% DMSO (gray) or 10 μ M Ro-08-2750 (red) during the last 48 h of 7-day differentiated myotubes; GAPDH expression was used as an endogenous control. (B) Quantification by qRT-PCR of *MSI2* and its direct targets *miR-7*, *P21*, and *TGFBR1* in the same conditions as those described in (A). (C) Quantification by qRT-PCR of the relative expression of genes involved in catabolic pathways leading to muscle degradation in DM1 treated with vehicle (gray dashed line) and control myoblasts (orange) or DM1 cells treated with compound (red). Statistical analyses were carried out comparing control and DM1 treated with Ro-08-2750 with DM1 myoblasts treated with vehicle. mRNA levels shown in (A) and (B) are relative to the mean of *GAPDH*, *GPI*, and *HPRT1*; *miR-7* was normalized to the mean of *U1* and *U6* ($n = 3$). Representative confocal images of Desmin immunostaining (green; D–F) and LC3 staining (red; H–J) of 7-day control and DM1 myoblasts treated with DMSO (D, H, and E–I) as control or with 10 μ M Ro-08-2750. (F and J) Scale bars correspond to 40 μ m, and the nuclei were counterstained with DAPI. (G) Quantification of myogenic fusion index of the conditions represented in (D)–(F) at 7, 10, and 14 days of differentiation ($n = 10$ –15 images). (K) Quantification of the number of LC3 puncta per square micrometer. (G and K) Each condition was compared to DM1 cells treated with DMSO. Quantification by western blot of (L) ATG4A and (M) ATG7. Representative blots used for quantification are shown on the side of the bar graphs. GAPDH was used as an endogenous control to normalize protein levels ($n = 3$). The bar graphs show mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ according to Student's *t* test.

levels showed effects on both sides of this complex balance, because in addition to dampening down catabolism via autophagy repression, it also acted on muscle anabolism. MSTN, a member of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, negatively regulates muscle mass by inhibiting Akt phosphorylation, resulting in decreased protein synthesis and reduced cell size.⁴² Importantly, we observed that treatment of DM1 TDMs with *MSI2*-targeting ASOs significantly reduced *MSTN* expression levels and increased AKT1 and its active form (p-AKT), thus derepressing muscle mass anabolism. Complementary, upon ASO treatment, *IGF-1* was significantly upregulated. IGF-1 promotes muscle protein synthesis via activating the Akt/mTOR pathway,⁴³ and consistently, in *MSI2* silenced cells, we also detected increased *mTOR* expression together with AKT activation. These results and the fact that *MSTN* and IGF-1 have opposing roles

in regulating the growth and size of skeletal muscle⁴² indicate that *MSTN* and IGF-1 rescue may ameliorate ASO-treated DM1 TDMs via the Akt/mTOR pathways. Remarkably, reduction of *MSI2* expression in DM1 TDMs with ASOs was sufficient to rescue the expression of *MuRF1*, *FBXO32*, *FoxO1*, and *FoxO3* genes involved in protein degradation via the AKT/mTOR pathway, thus contributing to improved fusion index and diameter of treated TDMs. Finally, it has been reported that increased expression of PKM2 in type 1 myofibers leads to type 1 myofiber atrophy.⁷ In our experiments, the percentage of the PKM2 isoform was significantly reduced after *MSI2* silencing with the ASOs. This suggests that re-establishing normal *MSI2* levels promotes a PKM2-to-PKM1 switch characteristic from differentiated myotubes, contributing to the improved fusion index and myotube diameter observed in treated DM1 TDMs.

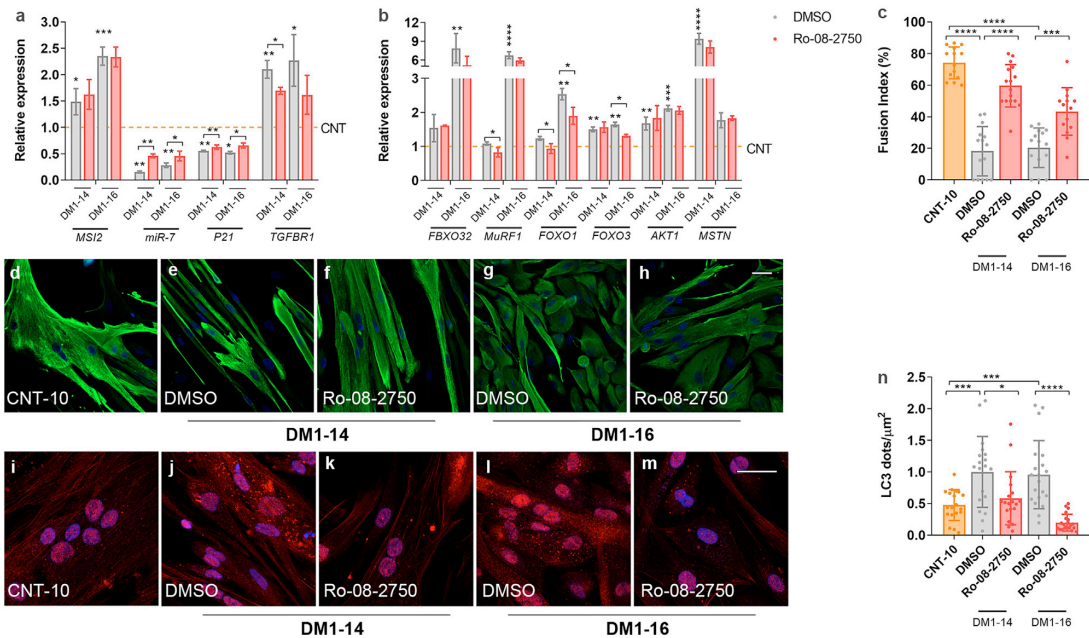


Figure 9. Ro-08-2750 treatment of immortalized DM1 myoblasts differentiated for 7 days validates MSI2 as a new therapeutic target

(A and B) Quantification by qRT-PCR of the indicated genes in control primary myoblasts (line CNT-10, orange dashed line) and two DM1 lines, DM1-14 and DM1-16, treated with vehicle (0.8% DMSO; gray) or 10 μ M Ro-08-2750 (red) for 48 h in 7-day differentiation cultures. Asterisks above gray bars indicate statistical differences between CNT-10 and the DM1 lines. Asterisks over the black lines indicate the significant differences between both treatments (DMSO or Ro-08-2750). Gene expression is relative to the mean of *GAPDH* and *GPI*, and *miR-7* was normalized to the mean of *U1* and *U6* ($n = 3$). (C) Quantification of the myogenic fusion index and (D–H) representative confocal images of Desmin immunostaining (green) of control primary myoblasts (D) and DM1-14 and DM1-16 lines treated with vehicle (E and G) or with 10 μ M Ro-08-2750 (F and H). (I–M) Representative confocal micrographs of LC3 immunostaining (red) and (N) quantification of the number of LC3 puncta per square micrometer in cell cultures identical to (D)–(H). Scale bar corresponds to 40 μ m, and the nuclei were counterstained with DAPI (blue). The bar graphs show mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ according to Student's *t* test.

The study of MBNL1 protein levels upon MSI2 silencing demonstrated increased MBNL1 after treatment with the highest concentration of ASO1. Moreover, extra MBNL1 protein was functional as splicing events regulated by MBNL1 were significantly improved. Previous results have shown that *miR-7* levels were MBNL1 independent.¹⁷ MBNL1 levels may increase because of autophagy repression via MSI2/miR-7, resulting in reduced MBNL1 disposal as similarly observed when autophagy was blocked with chloroquine in DM1 muscle cells.¹⁰ Another possibility would be for MSI2 to act independently of the *miR-7*/autophagy axis since MSI2 regulates many targets involved in varied processes, both at the level of mRNA stability or post-transcriptionally.^{44,45}

Maintenance of fetal-splicing patterns of certain transcripts is a key phenotype in DM1.⁴⁶ A potential direct role for MSI2 on alternative splicing misregulation in DM1, combined with MBNL1, CELF1, and HNRNPA1 dysregulations, cannot be discarded, but so far, the involvement of this protein in splicing has been suggested to be indirect, through the control of other regulators. Indeed, when we quantified *PKM2* levels after ASO treatments, we observed a significant

reduction at all tested conditions. However, MBNL1 levels were only increased when cells were treated at the highest concentration of ASO1. These results suggest that MSI2 could indirectly contribute to *PKM* regulation, as it was reported that *c-MYC*,³³ a direct target of MSI2, upregulates transcription of *PTB*, *hnrNPA1*, and *hnrNPA2*, which, in turn, promotes *PKM2* levels.⁴⁷

Upon MSI2 modulation, we observed a surprisingly modest effect on the MSI2 mRNA-binding targets' levels *TGFBR1* and *P21*.^{24,48} However, these results do not exclude the possibility that other molecular alterations in DM1, in addition to MSI2 overexpression, may also contribute to *TGFBR1* and *P21* misregulation and, consequently, counteract the effect of MSI2 silencing. Specifically, CELF1 was reported to regulate *P21* expression in DM1.^{49,50} Consistent with these observations, CELF1 remained unchanged after MSI2 blocking, so this fact could also be contributing to the mild effect over *P21* levels after MSI2 reduction.

In summary, this study sheds new light on the molecular mechanisms leading to muscle atrophy in DM1 and, more specifically, on *miR-7*

downregulation and subsequent autophagy regulation. We demonstrate that the RNA-binding protein MSI2 is strongly upregulated in DM1 and, for the first time, propose that this protein is a new therapeutic target to treat DM1 muscle dysfunction. Remarkably, we observed a significant negative correlation between MSI2 levels and ankle dorsiflexion force in biopsies from 40 DM1 patients, highlighting the relevance of MSI2 dysregulation as a contributor to the muscle phenotype. Moreover, we demonstrate that the reduction of MSI2 levels by three different strategies was enough to significantly reduce *miR-7* levels, constituting essential proof-of-concept studies to develop new therapeutic strategies.

MATERIALS AND METHODS

Chemically modified oligonucleotides

siRNAs targeting *MSI2* transcripts (ID S42755 and S42757; catalog number 4392421) and negative control (catalog number 4390843) were from the Invitrogen (Madrid, Spain) *Silencer* Select siRNA collection. ASO and scrambled control were synthesized by biomers.net. The ASO sequences were as follows: ASO1, 5' +T+G+A*C*T*T*C*T*T*T*C*G*G+C+T+G 3'; ASO2, 5' +C+A+C*G*A*A*G*T*T*G*G*G*A+T+A+T 3'; ASO3, 5' +T+T+G*G*A*T*T*A*A*G*G*T*G+C+C 3'; and scrambled ASO, 5' +T+T+C*C*C*T*G*A*A*G*G*T*G+C+C+T 3', which are complementary to sequences from exon 9 (ASO1), exon 10 (ASO2), and exon 14 (ASO3). A + sign denotes locked nucleic acid nucleotides, and * indicates phosphorothioate linkages.

Cell culture and treatment with oligonucleotides and small molecule

Unaffected (control) and patient-derived (DM1) cells were kindly provided by Dr. Furling (Institute of Myology, Paris, France).²² Briefly, DM1 cells were obtained from skin or skeletal muscle biopsy of an 11-year-old female donor expressing 1,300 CTG repeats, and counterpart control cells were obtained from a 25-year-old non-DM1 donor. Both fibroblasts and myoblasts have been immortalized. Additionally, fibroblasts were transduced to express MyoD (doxycycline) inducibly. Forced expression of MyoD transdifferentiates fibroblasts into myotubes.²² TDMs were cultured as previously described.¹⁷ After 4 days in differentiation medium (MDM), cells were transfected with a combination of the two siRNAs targeting *MSI2* transcripts (final concentration 100 nM) using Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen, Madrid, Spain) following the manufacturer's recommendations. After 48 h, the medium containing the siRNAs was replaced by fresh MDM. 24 h later, cells were collected. As a control, the same protocol was performed using 100 nM of a siRNA with a scrambled sequence. Gapmers were transfected following the same protocol at 30 and 150 nM. To treat cells with the small molecule Ro 08-2750 (Tocris catalog number 2272; Bristol, UK), cells were cultured as before. Briefly, after 5 days in MDM, the medium was supplemented with Ro 08-2750 to a final concentration of 1, 3, 10, or 15 μ M (0.8% DMSO) or with 0.8% DMSO (vehicle) for 48 h. Immortalized myoblasts were cultured as previously described.²² Immortalized myoblasts cultured for 5 days in MDM were treated

with Ro 08-2750 to a final concentration of 10 μ M for 48 h. In the case of fusion index determinations at 7, 10, and 14 days, the compound was added for the last 48 h.

Primary human skeletal muscle cultures

Primary human myoblasts from muscle biopsies from 3 DM1 patients and three controls were obtained as previously described.⁵¹ A positive selection for the CD56 surface marker was performed to enrich for myoblasts, using CD56-coated microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) following the manufacturer's instructions. Purified myoblasts were seeded in six-well plates (2.5×10^5 cells/well), and the following day, the medium was replaced with MDM (DMEM + 2% horse serum + 1% penicillin-streptomycin). The medium was changed every 2 days. To treat primary myoblasts, CNT-10, DM1-14, and DM1-16 with the small molecule Ro 08-2750 cells were cultured as before. After 5 days in differentiation conditions, the medium was supplemented with Ro 08-2750 to a final concentration of 10 μ M (0.8% DMSO) or with 0.8% DMSO (vehicle) for 48 h. Information about biopsy donors is compiled in [Table S1](#).

DM1 patients and skeletal muscle biopsies

All muscle biopsies were taken after informed consent by patients and approval by the Experimentation Ethics Committee of the University Hospital La Fe (Valencia, Spain; authorization 2014/0799). Methods for the determination of the size of the CTG repeat expansion were as reported in Fernandez-Costa et al.¹³ A detailed description of muscle type, sex, age, and repeats length is provided in [Table S1](#).

Immunofluorescence methods

Desmin immunostaining and fusion index and diameter determination were performed as previously described.¹⁰ For *MSI2* immunodetection, 3.5×10^4 fibroblasts/well were seeded in 24-well plates. After 7 days of differentiation into myotubes, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min. After three washes with 0.1% Triton X-100 in PBS 1 \times (PBS-T), cells were blocked (PBS-T, 1% BSA, 5% normal goat serum) for 1 h and incubated with rabbit anti-*MSI2* (1:100, EP1305Y; Abcam) in blocking buffer for 48 h at 4°C. After three washes with PBS-T, cells were incubated for 1 h with goat anti-rabbit fluorescein isothiocyanate (FITC) immunoglobulin G (IgG; 1:200; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in blocking buffer. Finally, cells were washed thrice with PBS 1 \times and were counterstained and mounted with VECTASHIELD mounting medium containing 40,6-dia-midino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, London, UK) to detect the nuclei.

For LC3B immunodetection, cells were differentiated in MDM for 7 days (3×10^5 cells/well in 24-well plates). After 48 h of gapmer treatment, cells were fixed with 4% PFA in PBS for 15 min at room temperature. After fixation, cells were permeabilized with methanol 100% for 15 min at -20°C and blocked with blocking buffer (PBS 1 \times , 0.5% BSA, 1% goat serum) for 1 h at room temperature. Cells were incubated overnight (O/N) with rabbit anti-LC3B (1:200, ab51520; Abcam, Cambridge, UK) diluted in blocking buffer. Then, samples were

incubated with goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 594 (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 2 h. Between antibodies, cells were washed three times with PBS 1×. Finally, cells were washed three times with PBS and mounted in Vectashield (Vector Laboratories, London, UK) with 2 µg/mL DAPI. MBNL1 and MBNL2 were detected in cells differentiated in MDM for 7 days as previously described.¹⁰

For LysoTracker staining, 2.5×10^4 cells were seeded in a 24-well plate. After treatment with ASOs for 48 h, samples were incubated for 30 min at 37°C with 100 nM LysoTracker RED-DND99 (Invitrogen, Madrid, Spain). After two washes with warmed PBS, cells were fixed with 4% PFA for 15 min, followed by washes in 1× PBS. Then, cells were mounted using Vectashield (Vector Laboratories, London, UK) with 2 µg/mL DAPI. Images were acquired in an LSM800 confocal microscope (Zeiss) at 400× magnification.

LC3 puncta quantification

Image analyses of LC3-stained myotubes were performed using the Iffdotmeter software⁵² following the authors' recommendations. Briefly, the quantification of the number of LC3 dots or LC3 puncta was performed with 15–20 images per condition. Total LC3 dots per image were normalized relative to the total area corresponding to all of the myotubes observed in each image. Myotube area was measured by using ImageJ software. Data were expressed as the number of LC3 dots/µm².

Toxicity assay

Control cells were aliquoted in a 96-well plate with 1.0×10^5 cells per well. After 24 h, cells were transfected with different ASOs as described¹⁷ (concentrations ranging from 1 nM to 1 µM) or treated with Ro 08-2750 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) at concentrations ranging from 0.0195 to 80 µM (in 1:2 serial dilutions). Cell viability was measured as previously described.¹⁰

RNA extraction, semiquantitative PCR, and real-time PCR

All of the procedures were performed as previously described.¹⁷ Primers not previously reported are listed in Table S2. qRT-PCR data were obtained using the delta-delta CT method. Commercial TaqMan probes (QIAGEN) were used to detect *MBNL1* (6-carboxy-fluorescein (FAM)-labeled probe) and reference *GAPDH* (NHS ester-fluoro-phore (MAX)-labeled probe) genes (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium). Relative quantification of the relevant genes in healthy control TDMs was previously reported.¹⁷

Western blotting

Protein extraction, quantification, and immunodetection were performed as previously described.^{10,17} Specifically, MS12 detections were performed by incubating membranes O/N with a rabbit anti-MS12 antibody (1:1,000, EP1305Y; Abcam, Cambridge, UK). Goat horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit-IgG (1:3,500; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as the secondary antibody. Images were acquired with an ImageQuant LAS 4000 or Amersham ImageQuant 800 (GE Healthcare). Quantification was

performed using ImageJ software (NIH). Relative quantification of the relevant proteins in healthy control TDMs was previously reported.¹⁷

Statistical analyses

In all molecular studies, for comparison on mean data, we assumed that all parameters follow a normal distribution, and the samples were compared using two-tailed t tests ($\alpha = 0.05$), applying Welch's correction when necessary. The statistical differences were estimated by Student's t tests ($p < 0.05$) on normalized data. Sample sizes (n) are included in the figure legends.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.08.010>.

ACKNOWLEDGMENTS

The Wolfson Centre for Inherited Neuromuscular Disease provided antibody MB1a (4A8). This work was possible by research grants RTI2018-094599-B-100 from the Ministerio de Ciencia e Innovación-Agencia Estatal de Investigación, which included funds from the European Regional Development Fund (ERDF), and PROMETEO/2020/081 from the Generalitat Valenciana to R.A. Additional funding was from the "Fundación para la Innovación y la Prospectiva en Salud en España, FIPSE" to R.A. A.B. and M.S.-A. thank the support of the Conselleria d'Educació, Investigació and Cultura i Esport (Generalitat Valenciana) as postdoctoral (APOSTD2017/077) and predoctoral (ACIF/2018/071) grantees, respectively. N.M. was supported by a predoctoral fellowship (PRE2019-090622) from the Ministerio de Ciencia e Innovación-Agencia Estatal de Investigación. Part of the equipment employed in this work has been funded by Generalitat Valenciana and co-financed with ERDF funds (OP ERDF of Comunitat Valenciana 2014-2020).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.A. provided the conceptual framework for the study. R.A., A.B., and M.S.-A. conceived and designed the experiments, helped in the interpretation of results, and prepared the manuscript. J.P.-G. and J.J.V. provided the muscle biopsies and protein extracts and RNA from primary myoblasts. M.S.-A., A.B., and N.M., performed the experiments and analyzed data.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Smith, C.A., and Gutmann, L. (2016). Myotonic Dystrophy Type 1 Management and Therapeutics. *Curr. Treat. Options Neurol.* 18, 52.
- Pettersson, O.J., Aagaard, L., Andrejeva, D., Thomsen, R., Jensen, T.G., and Damgaard, C.K. (2014). DDX6 regulates sequestered nuclear CUG-expanded DMPK-mRNA in dystrophin myotonia type 1. *Nucleic Acids Res.* 42, 7186–7200.
- Todd, P.K., and Paulson, H.L. (2010). RNA-mediated neurodegeneration in repeat expansion disorders. *Ann. Neurol.* 67, 291–300.

4. Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.S., and Cooper, T.A. (2007). Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol. Cell* 28, 68–78.
5. Li, M., Zhuang, Y., Batra, R., Thomas, J.D., Li, M., Nutter, C.A., Scotti, M.M., Carter, H.A., Wang, Z.J., Huang, X.-S., et al. (2020). HNRNPA1-induced spliceopathy in a transgenic mouse model of myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117, 5472–5477.
6. Rau, F., Lainé, J., Ramanoudjame, L., Ferry, A., Arandel, L., Delalande, O., Jollet, A., Dingli, F., Lee, K.-Y., Peccate, C., et al. (2015). Abnormal splicing switch of DMD's penultimate exon compromises muscle fibre maintenance in myotonic dystrophy. *Nat. Commun.* 6, 7205.
7. Gao, Z., and Cooper, T.A. (2013). Reexpression of pyruvate kinase M2 in type 1 myofibers correlates with altered glucose metabolism in myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 13570–13575.
8. Ozimski, L.L., Sabater-Arcis, M., Bargiela, A., and Artero, R. (2021). The hallmarks of myotonic dystrophy type 1 muscle dysfunction. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 96, 716–730.
9. Bargiela, A., Cerro-Herreros, E., Fernandez-Costa, J.M., Vilchez, J.J., Llamusi, B., and Artero, R. (2015). Increased autophagy and apoptosis contribute to muscle atrophy in a myotonic dystrophy type 1 Drosophila model. *Dis. Model. Mech.* 8, 679–690.
10. Bargiela, A., Sabater-Arcis, M., Espinosa-Espinosa, J., Zulaica, M., Lopez de Munain, A., and Artero, R. (2019). Increased Muscleblind levels by chloroquine treatment improve myotonic dystrophy type 1 phenotypes in vitro and in vivo models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 25203–25213.
11. Morriss, G.R., Rajapakse, K., Huang, S., Coarfa, C., and Cooper, T.A. (2018). Mechanisms of skeletal muscle wasting in a mouse model for myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 27, 2789–2804.
12. Loro, E., Rinaldi, F., Malena, A., Masiero, E., Novelli, G., Angelini, C., Romeo, V., Sandri, M., Botta, A., and Vergani, L. (2010). Normal myogenesis and increased apoptosis in myotonic dystrophy type-1 muscle cells. *Cell Death Differ.* 17, 1315–1324.
13. Fernandez-Costa, J.M., Garcia-Lopez, A., Zuñiga, 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. *Hum. Mol. Genet.* 22, 704–716.
14. Perfetti, A., Greco, S., Cardani, R., Fossati, B., Cuomo, G., Valaperta, R., Ambrogio, F., Cortese, A., Botta, A., Mignarri, A., et al. (2016). Validation of plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1. *Sci. Rep.* 6, 38174.
15. Koutsoulidou, A., Kyriakides, T.C., Papadimas, G.K., Christou, Y., Kararizou, E., Papanicolaou, E.Z., and Phylactou, L.A. (2015). Elevated Muscle-Specific miRNAs in Serum of Myotonic Dystrophy Patients Relate to Muscle Disease Progress. *PLoS ONE* 10, e0125341.
16. Cerro-Herreros, E., Sabater-Arcis, M., Fernandez-Costa, J.M., Moreno, N., Perez-Alonso, M., Llamusi, B., and Artero, R. (2018). miR-23b and miR-218 silencing increase Muscleblind-like expression and alleviate myotonic dystrophy phenotypes in mammalian models. *Nat. Commun.* 9, 2482.
17. Sabater-Arcis, M., Bargiela, A., Furling, D., and Artero, R. (2020). miR-7 Restores Phenotypes in Myotonic Dystrophy Muscle Cells by Repressing Hyperactivated Autophagy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 19, 278–292.
18. Gu, D.N., Jiang, M.J., Mei, Z., Dai, J.J., Dai, C.Y., Fang, C., Huang, Q., and Tian, L. (2017). microRNA-7 impairs autophagy-derived pools of glucose to suppress pancreatic cancer progression. *Cancer Lett.* 400, 69–78.
19. Choudhury, N.R., de Lima Alves, F., de Andrés-Aguayo, L., Graf, T., Cáceres, J.F., Rappilber, J., and Michlewski, G. (2013). Tissue-specific control of brain-enriched miR-7 biogenesis. *Genes Dev.* 27, 24–38.
20. Siddall, N.A., McLaughlin, E.A., Marriner, N.L., and Hime, G.R. (2006). The RNA-binding protein Musashi is required intrinsically to maintain stem cell identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 8402–8407.
21. Katz, Y., Li, F., Lambert, N.J., Sokol, E.S., Tam, W.-L., Cheng, A.W., Airoldi, E.M., Lengner, C.J., Gupta, P.B., Yu, Z., et al. (2014). Musashi proteins are post-transcriptional regulators of the epithelial-luminal cell state. *eLife* 3, e03915.
22. 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. *Dis. Model. Mech.* 10, 487–497.
23. Wang, E.T., Treacy, D., Eichinger, K., Struck, A., Estabrook, J., Olafson, H., Wang, T.T., Bhatt, K., Westbrook, T., Sedehizadeh, S., et al. (2019). Transcriptome alterations in myotonic dystrophy skeletal muscle and heart. *Hum. Mol. Genet.* 28, 1312–1321.
24. Park, S.M., Deering, R.P., Lu, Y., Tivnan, P., Lianoglou, S., Al-Shahrour, F., Ebert, B.L., Hacohen, N., Leslie, C., Daley, G.Q., et al. (2014). Musashi-2 controls cell fate, lineage bias, and TGF- β signaling in HSCs. *J. Exp. Med.* 211, 71–87.
25. Zhou, L., Sheng, W., Jia, C., Shi, X., Cao, R., Wang, G., Lin, Y., Zhu, F., Dong, Q., and Dong, M. (2020). Musashi2 promotes the progression of pancreatic cancer through a novel ISYNA1-p21/ZEB-1 pathway. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 10560–10572.
26. Bonaldo, P., and Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* 6, 25–39.
27. Heras-Sandoval, D., Pérez-Rojas, J.M., Hernández-Damián, J., and Pedraza-Chaverri, J. (2014). The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cell. Signal.* 26, 2694–2701.
28. Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445–544.
29. Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., and Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.* 452, 181–197.
30. Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2010). p62, an autophagy hero or culprit? *Nat. Cell Biol.* 12, 207–209.
31. Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods Mol. Biol.* 445, 77–88.
32. Zearfoss, N.R., Deveau, L.M., Clingman, C.C., Schmidt, E., Johnson, E.S., Massi, F., and Ryder, S.P. (2014). A conserved three-nucleotide core motif defines Musashi RNA binding specificity. *J. Biol. Chem.* 289, 35530–35541.
33. Minuesa, G., Albanese, S.K., Xie, W., Kazansky, Y., Worroll, D., Chow, A., Schurer, A., Park, S.-M., Rotsides, C.Z., Taggart, J., et al. (2019). Small-molecule targeting of MUSASHI RNA-binding activity in acute myeloid leukemia. *Nat. Commun.* 10, 2691.
34. Jones, K., Wei, C., Iakova, P., Bugiardini, E., Schneider-Gold, C., Meola, G., Woodgett, J., Killian, J., Timchenko, N.A., and Timchenko, L.T. (2012). GSK3 β mediates muscle pathology in myotonic dystrophy. *J. Clin. Invest.* 122, 4461–4472.
35. Huguet, A., Medja, F., Nicole, A., Vignaud, A., Guiraud-Dogan, C., Ferry, A., Decostre, V., Hogrel, J.-Y., Metzger, F., Hoeflich, A., et al. (2012). Molecular, physiological, and motor performance defects in DMSXL mice carrying >1,000 CTG repeats from the human DM1 locus. *PLoS Genet.* 8, e1003043.
37. Wang, Y., Vogel, G., Yu, Z., and Richard, S. (2013). The QKI-5 and QKI-6 RNA binding proteins regulate the expression of microRNA 7 in glial cells. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1233–1243.
38. Yang, A., Shao, T.-J., Boffill-De Ros, X., Lian, C., Villanueva, P., Dai, L., and Gu, S. (2020). AGO-bound mature miRNAs are oligouridylated by TUTs and subsequently degraded by DIS3L2. *Nat. Commun.* 11, 2765.
39. Li, L., Chen, Y., Nie, L., Ding, X., Zhang, X., Zhao, W., Xu, X., Kyei, B., Dai, D., Zhan, S., et al. (2019). MyoD-induced circular RNA CDRIas promotes myogenic differentiation of skeletal muscle satellite cells. *Biochim. Biophys. Acta. Gene Regul. Mech.* 1862, 807–821.
40. Cohen, S., Nathan, J.A., and Goldberg, A.L. (2015). Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 58–74.
41. Higuchi, T., Todaka, H., Sugiyama, Y., Ono, M., Tamaki, N., Hatano, E., Takezaki, Y., Hanazaki, K., Miwa, T., Lai, S., et al. (2016). Suppression of MicroRNA-7 (miR-7) Biogenesis by Nuclear Factor 90-Nuclear Factor 45 Complex (NF90-NF45) Controls Cell Proliferation in Hepatocellular Carcinoma. *J. Biol. Chem.* 291, 21074–21084.

42. Morissette, M.R., Cook, S.A., Buranasombati, C., Rosenberg, M.A., and Rosenzweig, A. (2009). Myostatin inhibits IGF-1-induced myotube hypertrophy through Akt. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *297*, C1124–C1132.
43. Yoshida, T., and Delafontaine, P. (2020). Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Cells* *9*, 1970.
44. Bennett, C.G., Riemondy, K., Chapnick, D.A., Bunker, E., Liu, X., Kuersten, S., and Yi, R. (2016). Genome-wide analysis of Musashi-2 targets reveals novel functions in governing epithelial cell migration. *Nucleic Acids Res.* *44*, 3788–3800.
45. Duggimpudi, S., Kloetgen, A., Maney, S.K., Münch, P.C., Hezaveh, K., Shaykhalishahi, H., Hoyer, W., McHardy, A.C., Lang, P.A., Borkhardt, A., and Hoell, J.I. (2018). Transcriptome-wide analysis uncovers the targets of the RNA-binding protein MSI2 and effects of MSI2's RNA-binding activity on IL-6 signaling. *J. Biol. Chem.* *293*, 15359–15369.
46. López-Martínez, A., Soblechero-Martín, P., de-la-Puente-Ovejero, L., Nogales-Gadea, G., and Arechavala-Gomez, V. (2020). An Overview of Alternative Splicing Defects Implicated in Myotonic Dystrophy Type 1. *Genes (Basel)* *11*, 1109.
47. David, C.J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., and Manley, J.L. (2010). HnRNP proteins controlled by *c-Myc* deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* *463*, 364–368.
48. Zhang, H., Tan, S., Wang, J., Chen, S., Quan, J., Xian, J., Zhang, S., He, J., and Zhang, L. (2014). Musashi2 modulates K562 leukemic cell proliferation and apoptosis involving the MAPK pathway. *Exp. Cell Res.* *320*, 119–127.
49. Denis, J.A., Gauthier, M., Rachdi, L., Aubert, S., Giraud-Triboulet, 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. *J. Cell Sci.* *126*, 1763–1772.
50. Picchio, L., Legagneux, V., Deschamps, S., Renaud, Y., Chauveau, S., Paillard, L., and Jagla, K. (2018). Bruno-3 regulates sarcomere component expression and contributes to muscle phenotypes of myotonic dystrophy type 1. *Dis. Model. Mech.* *11*, dmm031849.
51. de Luna, N., Gallardo, E., Soriano, M., Dominguez-Perles, R., de la Torre, C., Rojas-García, R., García-Verdugo, J.M., and Illa, I. (2006). Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation “in vitro”. *J. Biol. Chem.* *281*, 17092–17098.
52. Rodríguez-Arribas, M., Pizarro-Estrella, E., Gómez-Sánchez, R., Yakhine-Diop, S.M.S., Gragera-Hidalgo, A., Cristo, A., Bravo-San Pedro, J.M., González-Polo, R.A., and Fuentes, J.M. (2016). IFDOTMETER: A New Software Application for Automated Immunofluorescence Analysis. *J. Lab. Autom.* *21*, 246–259.

OMTN, Volume 25

Supplemental information

**Musashi-2 contributes to myotonic dystrophy
muscle dysfunction by promoting excessive
autophagy through *miR-7* biogenesis repression**

Maria Sabater-Arcis, Ariadna Bargiela, Nerea Moreno, Javier Poyatos-Garcia, Juan J. Vilchez, and Ruben Artero

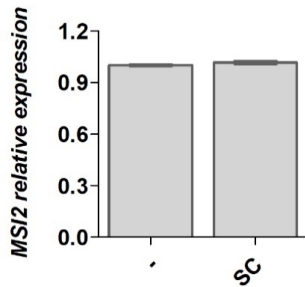


Figure S1. The scrambled (SC) control ASO does not affect *MSI2* levels. Quantification by qRT-PCR of the *MSI2* relative expression levels in healthy TDMs differentiated for 7 days treated with 150 nM of SC. The bar graph shows the mean \pm s.e.m. The mean of *GAPDH* and *GPI* expression was used as a reference for normalization (n = 3).

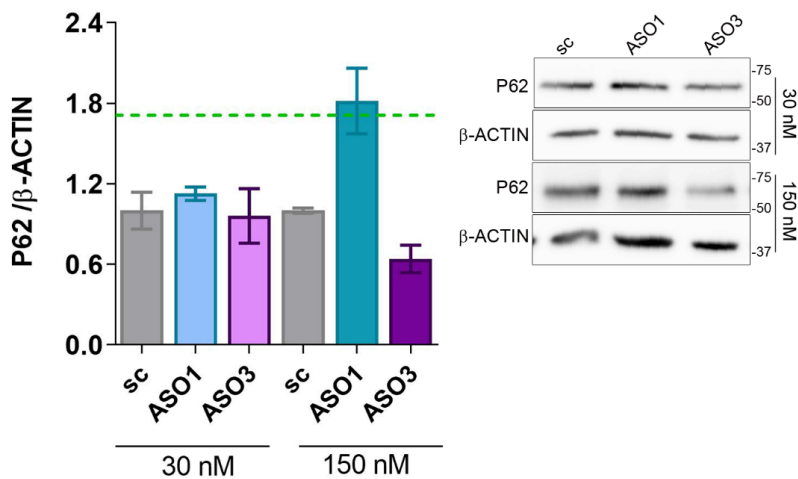


Figure S2. P62 levels of DM1 TDMs remain unchanged upon treatment with *MSI2*-targeting ASOs. Quantification and representative western blots of the P62 levels in protein extracts from TDMs treated with the indicated ASOs against the *MSI2* transcripts. β -ACTIN expression was used as an endogenous control (n=3). Green dashed line indicates relative levels of P62 detected in control myotubes. Statistical analyses compared experimentally treated-TDMs with the scrambled gapmer at the same concentration and found no significant differences by Student's t-tests. The bar graphs show the mean \pm s.e.m.

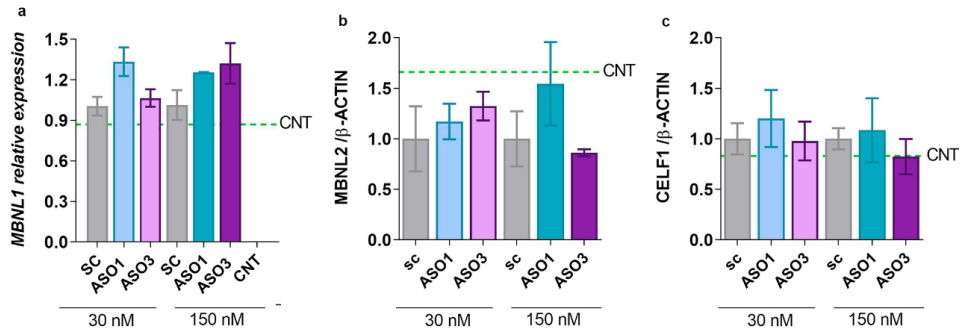


Figure S3. MBNL1 transcripts, MBNL2 and CELF1 protein levels do not significantly change upon treatment with *MS12* targeting ASOs. (a) MBNL1 transcripts quantification by RT-qPCR in DM1 myotubes transdifferentiated for 7 days and treated with the indicated molecules targeting *MS12* mRNA. *GAPDH* expression levels were used as endogenous controls (n=3). Western blot quantification of MBNL2 (b) and CELF1 (c) protein expression levels in 7-days transdifferentiated DM1 TDMs after treatment with the indicated ASOs. β -ACTIN expression was used as an endogenous control (n = 3). None of the statistical comparisons of experimental to scrambled-treated TDMs reached the significance threshold. Green dashed lines indicate values detected in control myotubes. The bar graphs show the mean \pm s.e.m.

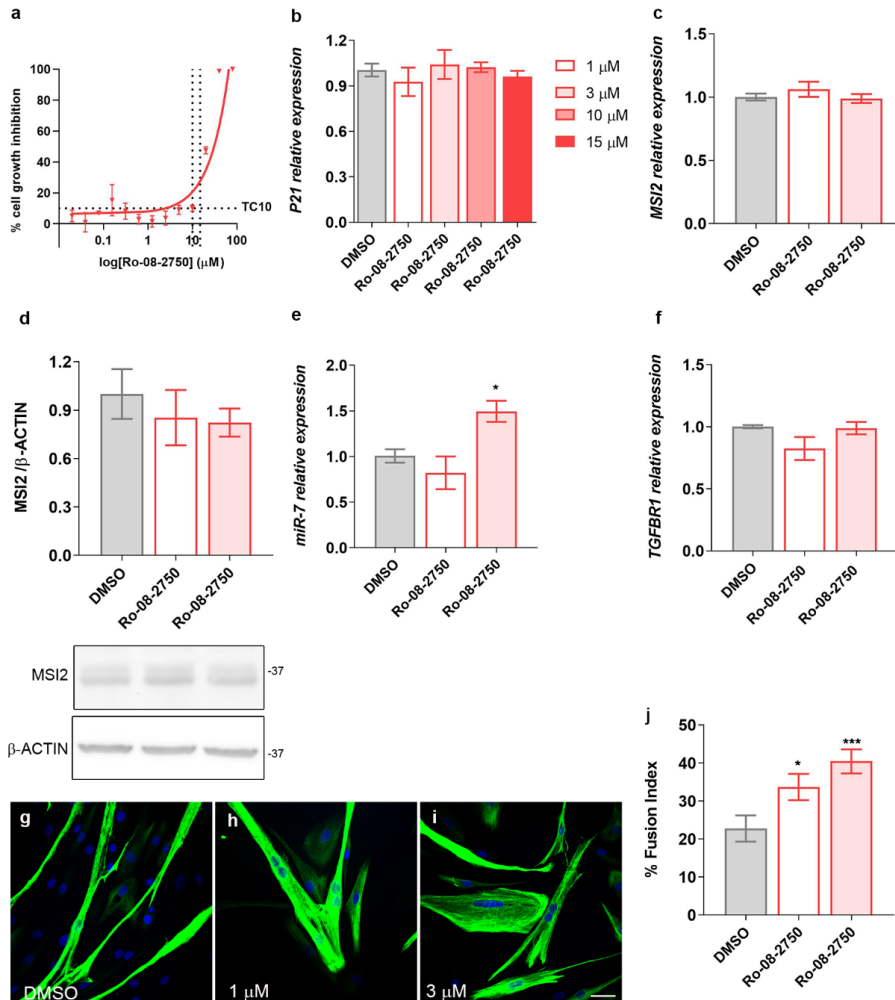


Figure S4. Effect of Ro-08-2750 treatment in DM1 myotubes. (a) Cell growth inhibition assay by the MTS method. Human normal TDMs were transfected with a range of Ro 08-2750 concentrations ($n=4$). TC10 was obtained using the least-squares non-linear regression model. Quantification of mRNA relative expression by qRT-PCR of (b) *P21*, (c) *MSI2*, (e) *miR-7*, and (f) *TGFBF1* in DM1 TDMs treated with the vehicle (DMSO), or the indicated concentration of Ro-08-2750. *GAPDH*, *GPI*, and *HPRT1* or *U1* and *U6* expression levels were used as endogenous controls in b,c,f and e, respectively ($n=3$). (d) *MSI2* relative protein level was quantified by western blot relative to β -ACTIN in myotubes treated with vehicle or with the indicated concentrations of the compound ($n=3$). Representative blots from each condition are also shown. (j) Quantification of the percentage of myogenic fusion index of DM1 TDMs with the indicated concentrations of the

compound (n=10-15 images). Representative confocal images of Desmin-immunostained (green) human DM1 myotubes transdifferentiated for 7 days after treatment with (g) DMSO as control or with 1 or 3 μ M Ro 08-2750 (h,i). Scale bar 40 μ m. Nuclei were counterstained with DAPI. The bar graphs show mean \pm s.e.m. * P <0.05, according to Student's t-test.

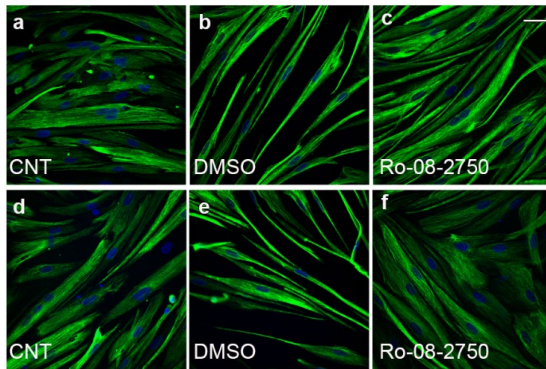


Figure S5 MSI2 inhibition by Ro 08-2750 improves fusion capacity of 10 and 14 days-differentiated DM1 myoblasts. Representative confocal images of Desmin-immunostained (green) immortalized myoblasts from control (a,d), DM1 treated with 0.8% DMSO (b,e) or DM1 treated with 10 μ M Ro 08-2750 (c,f) differentiated for 10 (a-c) or 14 (d-f) days. Scale bar 40 μ m. Nuclei were counterstained with DAPI.

Table S1 Information of biopsies from skeletal muscle

	Sample	Sex	Age	Muscle	Repeats length
Controls	CNT-1	Female	61	Deltoid	nd
	CNT-2	Male	34	Deltoid	nd
	CNT-3	Female	35	Deltoid	nd
	CNT-4	Male	37	Biceps	nd
	CNT-5	Male	24	Deltoid	nd
	CNT-6	Male	25	Deltoid	nd
	CNT-7	Female	29	Deltoid	nd
	CNT-8	Female	46	Deltoid	nd
	CNT-9	Male	29	Deltoid	nd
	CNT-10(*)	Male	18	Medial gastrocnemius	nd
	CNT-11	Male	50	Deltoid	nd
	CNT-12	Male	63	Deltoid	nd
	CNT-13	Male	59	Deltoid	nd
	CNT-14	Male	47	Deltoid	nd
	CNT-15	Female	34	Deltoid	nd
	CNT-16	Male	55	Deltoid	nd

	CNT-17	Female	37	Deltoid	nd
Patients	DM1-1	Male	30	Deltoid	nd
	DM1-2	Male	61	Deltoid	0.3 kb
	DM1-3	Male	45	Deltoid	3.6 kb
	DM1-4	Female	69	Deltoid	1.1 kb
	DM1-5	Male	28	Deltoid	nd
	DM1-6	Female	65	Deltoid	nd
	DM1-7	Female	33	Deltoid	0.9 kb
	DM1-8	Male	32	Deltoid	0.4 kb
	DM1-9	Female	68	Deltoid	0.2 kb
	DM1-10	Male	27	Deltoid	0.75 kb
	DM1-11	Female	44	Deltoid	nd
	DM1-12	Male	52	Deltoid	nd
	DM1-13	Male	36	Deltoid	3 kb
	DM1-14(*)	Female	50	Deltoid	150
	DM1-15	Female	47	Deltoid	nd
	DM1-16(*)	Male	54	Deltoid	0.8 kb

nd: not determined (*) biopsies used to isolate primary cells

Table S2 Sequences of oligonucleotides used for qRT-PCR and semiquantitative RT-PCR

Primers sequence	Sequence (5' → 3')	qRT-PCR/RT-PCR	Species
<i>GAPDH fwd</i>	CATCTTCCAGGAGCGAGATC	qRT-PCR/ RT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>GAPDH rev</i>	GTTCACACCCATGACGAACAT	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>GPI fwd</i>	CAGGGcATCATCTGGGACAT	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>GPI rev</i>	TCTTAGCCAGCTGCTTTCCC	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>HPRT1 fwd</i>	TGACACTGGCAAACAATGCA	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>HPRT1 rev</i>	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>IGF1 fwd</i>	CTCTTCAGTTCGTGTGGAGAC	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>IGF1 rev</i>	CAGCCTCCTTAGATCACAGCTC	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>MSI2 fwd</i>	GCAGACCTCACCAGATAGCCTT	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>MSI2 rev</i>	AAGCCTCTGGAGCGTTTCGTAG	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>MSTN fwd</i>	TGAGAATGGTCATGATCTTGCTGT	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>MSTN rev</i>	TCATCACAGTCAAGACAAAATCC	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>mTOR fwd</i>	AGCATCGGATGCTTAGGAGTGG	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>mTOR rev</i>	CAGCCAGTCATCTTTGGAGACC	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>

<i>NFIX fwd</i>	GAGCCCTGTTGATGACGTGTTCTA	RT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>NFIX rev</i>	CTGCACAAACTCCTTCAGTGAGTC	RT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>P21 fwd</i>	AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>P21 rev</i>	TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>PKM fwd</i>	CTGAAGGCAGTGATGTCGCC	RT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>PKM rev</i>	ACCCGGAGGTCCACGTCTC	RT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>SERCA1 fwd</i>	GATGATCTTCAAGCTCCGGGC	RT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>SERCA1 rev</i>	CAGCTCTGCCTGAAGATGTG	RT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>TGFBR1 fwd</i>	GACAACGTCAGGTTCTGGCTCA	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>
<i>TGFBR1 rev</i>	CCGCCACTTTCCTCTCCAAACT	qRT-PCR	<i>Homo sapiens</i>

