



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Fisiología

Desarrollo de modelos experimentales de *LGMDD2* y rastreo de fármacos.

Tesis Doctoral

Presentada por:

Águeda Blázquez Bernal

Dirigida por:

Prof. Rubén D. Artero Allepuz

Dra. Ariadna Bargiela Schönbrunn

Tutor académico:

Prof. Federico V. Pallardó Calatayud

Abril 2023

D. **Rubén D. Artero Allepuz**, catedrático del Dpto. de Genética de la Universitat de València.

Dña. **Ariadna Bargiela Schönbrunn**, investigadora post-doctoral del grupo de Patología Neuromuscular y Ataxias del Instituto de Investigación La Fe de Valencia.

D. **Federico V. Pallardó Calatayud**, catedrático del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “**Desarrollo de modelos experimentales de LGMDD2 y rastreo de fármacos**”, corresponde al trabajo original realizado bajo su dirección por Dña. **Águeda Blázquez Bernal**, para su presentación y defensa como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 26 de abril de 2023.

Fdo. Dr. Rubén D. Artero Allepuz

Fdo. Dra. Ariadna Bargiela Schönbrunn

Fdo. Dr. Federico V. Pallardó Calatayud

BIOTECMED

Institut Universitari de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat de València
Dept. Genètica, Universitat de València. Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot. España.
Tel. +34 96 3544506 e-mail: isicbtm@uv.es web: <http://www.uv.es/biotecmed>

**“Poco a poco, paso a paso, conquistaremos
la cumbre de la montaña”**

Asociación Conquistando Escalones

**A mis padres,
por darme las alas para volar alto,
la libertad para decidir dónde
y los valores para saber cómo.**

ÍNDICE

RESUMEN	10
ABREVIACIONES.....	14
INTRODUCCIÓN	19
1. La Distrofia Muscular de Cinturas tipo D2.....	21
1.1. Aspectos clínicos e histopatológicos	21
1.2. Mecanismos de patogénesis	23
2. El músculo esquelético	25
3. Modelos experimentales de enfermedades neuromusculares.....	30
3.1. Modelo <i>in vivo</i> : <i>Drosophila melanogaster</i>	31
3.2. Modelos <i>in vitro</i> : mioblastos inmortalizados derivados de paciente	32
4. Estrategias terapéuticas en enfermedades neuromusculares.....	33
4.1. Terapia génica: sistema CRISPR-Cas9	33
4.2. Terapia farmacológica: reposicionamiento de fármacos	34
OBJETIVOS	37
MATERIAL Y METODOLOGÍA	41
1. Material biológico y manejo.....	43
1.1. Transgénesis en <i>Drosophila melanogaster</i>	43
1.2. Líneas y cruces de <i>Drosophila melanogaster</i>	44
1.3. Líneas y cultivo de mioblastos inmortalizados.....	45
1.4. Edición génica de mioblastos inmortalizados mediante CRISPR-Cas9.....	46
1.5. Administración de compuestos al modelo de mosca de <i>LGMDD2</i>	48
1.6. Administración de compuestos al modelo celular de <i>LGMDD2</i>	49
2. Metodología	49
2.1. Generación del anticuerpo anti-TNPO3mut.....	49
2.2. Métodos moleculares.....	50
2.3. Tinciones histoquímicas, cuantificación de reporteros e inmunofluorescencias	52
2.4. Estudios funcionales de las moscas.....	56
2.5. Estudios de viabilidad de las moscas.....	56
2.6. Ensayo de luminiscencia en moscas.....	57
2.7. Estudio del perfil STR.....	57
2.8. Estudio de la proliferación de mioblastos	57
2.9. Estudio de transcriptómica y proteómica de mioblastos.....	57
2.10. Análisis estadístico	59
RESULTADOS	61
Objetivo 1: Desarrollar y caracterizar un modelo experimental de <i>LGMDD2</i> en <i>Drosophila melanogaster</i>	63
1. Generación del modelo de <i>LGMDD2</i> en <i>Drosophila</i>	63

2. La expresión de <i>TNPO3mut</i> dirigida al músculo o a las motoneuronas de <i>Drosophila</i> provoca atrofia y degeneración muscular	68
3. Las moscas modelo <i>LGMDD2</i> muestran una actividad locomotora reducida	71
4. La expresión de <i>TNPO3mut</i> en <i>Drosophila</i> reduce la longevidad de las moscas	73
5. La autofagia está sobreactivada en las moscas modelo <i>LGMDD2</i> y el tratamiento con CQ rescata los fenotipos musculares	75
Objetivo 2: Identificar compuestos con potencial terapéutico en el modelo de <i>LGMDD2</i> en <i>Drosophila</i>	80
1. La expresión dirigida de <i>TNPO3mut</i> a las motoneuronas de <i>Drosophila</i> altera el splicing de <i>SMN2</i>	80
2. Cribado farmacológico en el modelo de <i>LGMDD2</i> en <i>Drosophila</i>	82
Objetivo 3: Caracterizar mioblastos inmortalizados derivados de paciente y evaluar el potencial terapéutico de la edición de la mutación <i>LGMDD2</i> mediada por CRISPR-Cas9	84
1. La expresión de <i>TNPO3</i> se restaura a niveles basales en mioblastos derivados de paciente corregidos con CRISPR-Cas9	84
2. La edición génica por CRISPR-Cas9 rescata las alteraciones de la proliferación y diferenciación de los mioblastos <i>LGMDD2</i>	88
3. La elevada actividad autofágica en mioblastos <i>LGMDD2</i> se restaura con la edición génica por CRISPR-Cas9	92
4. La edición génica por CRISPR-Cas9 restaura la expresión de genes y miRNAs relacionados con la <i>LGMDD2</i>	96
5. La mutación en <i>TNPO3</i> causante de <i>LGMDD2</i> induce cambios en el proteoma	99
Objetivo 4: Validar el efecto terapéutico de los compuestos candidatos en el modelo celular de <i>LGMDD2</i>	102
1. Seis fármacos candidatos mejoran la capacidad de fusión de los mioblastos <i>LGMDD2</i>	102
2. Los seis fármacos candidatos mejoran niveles de <i>TNPO3mut</i> , LC3 y MHC en mioblastos <i>LGMDD2</i>	104
DISCUSIÓN	108
1. Los modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>LGMDD2</i> generados sirven para profundizar sobre los mecanismos moleculares implicados en la distrofia	110
1.1. Las herramientas generadas de <i>LGMDD2</i> dan información sobre cómo afecta la mutación <i>c.2771delA</i> a <i>TNPO3</i> en el músculo	110
1.2. Los modelos de <i>LGMDD2</i> generados dan información sobre las posibles causas de la atrofia muscular	114
2. Los modelos experimentales de <i>LGMDD2</i> generados son válidos para probar diferentes estrategias terapéuticas	119
CONCLUSIONES	123
REFERENCIAS	128
ANEXO	140
Expresión diferencial del proteoma de los mioblastos inmortalizados derivados de paciente	142
Publicaciones	152

RESUMEN

La distrofia muscular de cinturas tipo D2 (*Limb-girdle muscular dystrophy type D2, LGMD2D*) es una enfermedad genética ultra rara para la cual no existe tratamiento. Las principales características clínicas de la *LGMD2D* son la debilidad y degeneración muscular progresiva que afecta a las cinturas pélvica y escapular de forma predominante. En 2013 se identificó la *LGMD2D* como una miopatía autosómica dominante causada por una mutación en el gen de la *transportina 3 (TNPO3)*, dando como resultado una proteína mutante con una extensión de 15 aminoácidos adicionales: TNPO3mut. TNPO3 es una β -importina responsable de la importación nuclear de proteínas ricas en serina/arginina (proteínas SR), involucradas principalmente en el *splicing* y metabolismo del RNA. Además, TNPO3 es una proteína esencial para la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. Al inicio de este trabajo apenas había información sobre la *LGMD2D* y se desconocía el papel de TNPO3mut en el músculo esquelético de los pacientes. Esto se debía, en gran parte, a la inexistencia de modelos experimentales que permitieran profundizar sobre la enfermedad y los mecanismos involucrados en la degeneración muscular. Por ello, nos planteamos desarrollar modelos de *LGMD2D* con los que identificar qué desencadena los síntomas de esta miopatía y sobre los que poder testar posibles terapias efectivas.

En este trabajo hemos desarrollado dos modelos experimentales de *LGMD2D*, en mosca y mioblastos inmortalizados, este último en colaboración con el grupo de Patología Neuromuscular y Ataxias del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, dirigido por el Dr. Vilchez. El estudio de ambos modelos ha demostrado que la mutación causante de *LGMD2D* provoca un aumento de los niveles de TNPO3, degeneración muscular y capacidad locomotora reducida en la mosca y afecta a la diferenciación de los mioblastos derivados de paciente. Además, este trabajo aporta evidencias de que hay un exceso de activación de las vías catabólicas que desregulan la homeostasis muscular y de que hay una alteración del *splicing* alternativo y constitutivo en *LGMD2D* que podría estar contribuyendo a la degeneración del músculo. Por otro lado, los modelos han sido utilizados para testar fármacos a gran escala y poder seleccionar 6 compuestos para su reposicionamiento contra la *LGMD2D*. Asimismo, se proporciona una prueba de concepto del potencial de la edición de *TNPO3* mediada por CRISPR-Cas9 como enfoque terapéutico contra la *LGMD2D*. A su vez, la edición génica de la mutación de *TNPO3* ha servido para identificar alteraciones claves a nivel del transcriptoma en *LGMD2D* que también podrían estar contribuyendo a la patología. Con todo, la presente tesis aporta información sobre los mecanismos moleculares involucrados en la *LGMD2D* que servirá para entender mejor cómo se desencadena la degeneración muscular en los pacientes y permite avanzar en la búsqueda de terapias validas contra esta distrofia.

ABREVIACIONES

ActD:	Actinomicina D
AME:	Atrofia muscular espinal
AMPK:	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ATG:	<i>Autophagy-related genes</i> , genes relacionados con autofagia
BSA:	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina de suero bovino
Cdk-4:	<i>Cyclin dependent kinase 4</i>
CK:	Creatine kinase, creatina quinasa
CNT:	Control
CPSF6:	<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor 6</i> , factor de especificidad de corte y poliadenilación 6
CQ:	Cloroquina
CRISPR:	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat</i>
DAPI:	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DM1:	Distrofia miotónica tipo 1
DMD:	Distrofia muscular de Duchenne
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DRG:	<i>Disease-Related Genes</i> , genes relacionados con la enfermedad
DSB:	<i>Double-stranded break</i> , corte de doble cadena
ELA:	Esclerosis lateral amiotrófica
FC:	<i>Fold Change</i>
FDR:	<i>False Discovery Rate</i>
FSHD:	<i>Facioscapulohumeral muscular dystrophy</i> , distrofia muscular facioescapulohumeral
GEO:	<i>Gene expression omnibus</i>
GO:	<i>Gene ontology</i>
HA:	Hemaglutinina
HDR:	<i>Homology-directed repair</i> , reparación dirigida por homología
hTERT:	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i>
IFM:	<i>Indirect flight muscles</i> , músculos indirectos del vuelo
IGF-1:	<i>Insulin-like growth factor 1</i> , factor de crecimiento similar a la insulina 1
LGMD:	<i>Limb-girdle muscular dystrophy</i> , distrofia muscular de cinturas
LGMD1F:	<i>Limb-girdle muscular dystrophy type 1F</i> , distrofia muscular de cinturas tipo 1F
LGMD2D:	<i>Limb-girdle muscular dystrophy type 2D</i> , distrofia muscular de cinturas tipo 2D
MHC:	<i>Myosin heavy chain</i> , miosinas de cadena pesada
MRI:	<i>Magnetic resonance imaging</i> , imagen por resonancia magnética
MSTN:	Miostatina

Abreviaciones

MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

MuRF1: Muscle RING-finger protein 1

NGS: Normal goat serum, suero normal de cabra

ON: Overnight, toda la noche

ORA: Over-representation analysis, análisis de sobrerrepresentación

PFA: Paraformaldehído

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PKM: Pyruvate kinase M

Proteínas SR: Proteínas ricas en serina/arginina

qRT-PCR: Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA-seq: RNA sequencing

RSF1: Repressor splicing factor 1

sgRNA: Single guide RNA, RNA guía monocatenario

SMN: Survival of motor neuron

SRSF: Serine and arginine rich splicing factor, factores de *splicing* ricos en serina y arginina

ssODN: Single-stranded donor oligonucleotide, oligonucleótido donante monocatenario

STR: Short tandem repeats

SWATH-MS: Sequential window acquisition of all theoretical fragment ion mass spectra

TALEN: Transcription activator-like effector nucleases

TGFβ: Transforming growth factor β

TNPO3: Transportina 3

TNPO3mut: TNPO3 mutante

TNPO3wt: TNPO3 wild type

TPM: Transcritos por millón

UAS: Upstream activation sequence

Ub: Ubiquitinación

UPS: Ubiquitin–proteasome system, sistema ubiquitina-proteasoma

VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

ZFN: Zinc-finger nucleases

INTRODUCCIÓN

1. La Distrofia Muscular de Cinturas tipo D2

1.1. Aspectos clínicos e histopatológicos

La distrofia muscular de cinturas (*Limb-girdle muscular dystrophy, LGMD*) es un grupo de trastornos genéticos de herencia autosómica, caracterizado por debilidad muscular progresiva y predominantemente proximal que afecta a las cinturas pélvica y escapular, con signos histológicos de degeneración y regeneración muscular ^{1,2}. Este grupo heterogéneo de enfermedades también presenta niveles de creatina quinasa (*creatine kinase, CK*) altos, signos distróficos en biopsias musculares, cambios degenerativos e infiltración fibro-grasa en imágenes por resonancia magnética (*magnetic resonance imaging, MRI*) y, además, puede afectar a miocardio y sistema respiratorio ³⁻⁵. Los avances en las técnicas de secuenciación del genoma han llevado a la identificación de 30 subtipos genéticos de *LGMD* que se clasifican en dos subgrupos principales, según sea el modo de herencia: autosómicas dominantes y autosómicas recesivas, abreviadas anteriormente como *LGMD1* y *LGMD2* y actualmente como *LGMD1* y *LGMD2*, de forma respectiva ⁶. Entre todas las formas la prevalencia estimada de las *LGMD* es de 1-9:100.000 ⁷.

En 2001 se identificó una familia española que padecía una distrofia muscular autosómica dominante y que, tras genotipar marcadores conocidos de otras *LGMD*, se determinó como un subtipo diferente llamado *LGMD* tipo 1F (*LGMD1F*) ⁸. Posteriormente, se profundizó en el estudio genético de la familia española identificada y se descubrió que el locus afectado se encontraba en la región cromosómica 7q32.1-32.2 ⁹. Actualmente, este subtipo de distrofia se ha renombrado como *LGMD* tipo D2 (*LGMD2D*, OMIM #608423), la cual afecta a menos de 100 personas en todo el mundo y para la que no existe tratamiento efectivo ^{10,11}. Clínicamente (Fig. 1), se caracteriza porque los pacientes presentan debilidad y atrofia muscular progresiva de los músculos de la cintura pélvica y escapular, afectando también a los músculos distales de forma frecuente. Otra característica de este trastorno es su amplio rango en la edad de inicio (congénito-adulto, 1-58 años), gravedad (leve-grave) y progresión (lenta-rápida). También se han visto en algunos casos síntomas como ptosis leve, episodios de vértigo, ataxias y disartias, y afectación de los músculos respiratorios. Las MRI de varios casos clínicos muestran deformidades esqueléticas como escoliosis, hiperlordosis, escápula alada y aracnodactilia, así como contracturas generalizadas en talones, rodillas y codos. Además, en algunos pacientes de *LGMD2D*, la electromiografía muestra cambios miopáticos y algunos casos mostraron características neurogénicas motoras claras, aunque en otros pacientes no se observaron anomalías en la transmisión neuromuscular. También se ha mostrado que un 40% de los casos tenía niveles elevados de *CK*, aunque no existe correlación entre los niveles de *CK* y la gravedad clínica de la *LGMD2D* ^{8,12}. Añadir que,

Introducción

recientemente, en la sangre periférica de algunos pacientes *LGMDD2* se ha identificado una activación de la respuesta inflamatoria a través de tres mecanismos interconectados: primero, una regulación alterada de la vía de señalización de la citoquina IL-17 en el centro de la respuesta proinflamatoria, que a su vez desencadena el segundo y tercer mecanismo, la vía de señalización de la citoquina TNF α y la actividad de metalopeptidasa ^{13,14}. Además, se ha visto una activación de la vía de señalización de los receptores TLR, que a su vez activan NF-k β , factores reguladores de IFN o MAP quinasas para regular la expresión de citoquinas, quimiocinas e IFN tipo I ^{13,15}. Todo esto sugiere un estado proinflamatorio que podría estar afectando a la función muscular de estos pacientes ¹³.

A nivel histopatológico (Fig. 1), las biopsias musculares de *LGMDD2* muestran una mayor variabilidad del tamaño y forma de las fibras, un aumento del tejido conectivo endomisial y perimisial, fibras degeneradas dispersas y prevalencia de fibras tipo 1, red intermiofibrilar anormal con bandas Z anormales, y fibras musculares con vacuolas bordeadas, núcleos agrandados con palidez central y núcleos centrales ocasionales ^{8,12}. Además, las biopsias muestran acumulación de proteínas citoesqueléticas (desmina) y miofibrilares (miotilina) en el citoplasma de las fibras musculares con desorden prominente ¹⁶. Destacar también el aumento de agregados de la proteína autofágica p62 observados en algunas fibras atróficas, así como vacuolas autofágicas y acumulaciones anormales de mitocondrias con inclusiones paracristalinas ^{8,12,17}. Por último, añadir que se ha visto una acumulación de TNPO3 en el área subsarcolemal y perinuclear, así como anomalías nucleares en las biopsias de pacientes *LGMDD2* ^{12,17,18}.

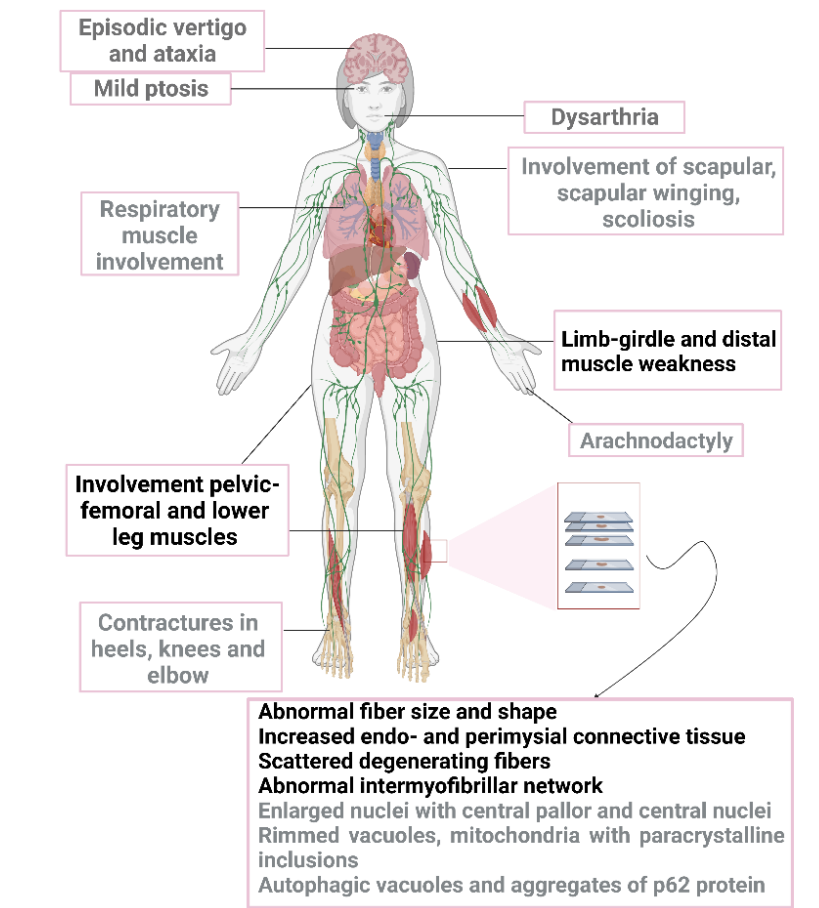


Figura 1. Aspectos clínicos e histopatológicos de la LGMDD2. Principales afectaciones clínicas de la LGMDD2. En negro se marcan las características comunes, vistas en todos los pacientes, y en gris las identificadas en algunos casos. Imagen hecha en Biorender.com.

1.2. Mecanismos de patogénesis

Gracias a la secuenciación del genoma completo de la familia española se sabe que la causa genética de la LGMDD2 es una mutación en heterocigosis en el gen *TNPO3* que codifica para la transportina 3 (TNPO3). La TNPO3 es una β -importina dependiente de Ran-GTP, principalmente responsable de la importación nuclear de proteínas ricas en serina/arginina (proteínas SR)¹⁹. De entre los diferentes transcritos del gen de la *TNPO3*, la mutación causante de la LGMDD2 es una delección en el transcrito ENST00000265388.10 que codifica para una proteína de 923 aminoácidos²⁰. Concretamente, se trata de una delección del nucleótido de adenina en el codón de parada, *c.2771delA*, situado en el exón 22, que provoca una extensión C-terminal de 15 aminoácidos: CSHSCTVPVTQECLF^{12,21}. Es importante destacar que recientemente se ha identificado dos familias con LGMDD2, húngara y sueca, y un caso esporádico que presentan diferentes mutaciones de cambio de marco de lectura en *TNPO3*: *c.2767delC*, *c.2757delC* y *c.2766delT*, respectivamente. No obstante, las consecuencias de estas nuevas mutaciones a nivel de secuencia proteica son casi las mismas que la mutación

Introducción

inicialmente descrita, ya que provocan una extensión similar en el dominio C-terminal de TNPO3 con 14 aminoácidos idénticos. Además, los pacientes presentan una sintomatología similar a la de la familia española, por lo que se ha propuesto que desempeñarán el mismo papel patogénico que *c.2771delA*^{10,18,21,22}. Adicionalmente, se ha identificado un caso esporádico de *LGMDD2* con una transición de G>A en el exón 20 de *TNPO3* en heterocigosis (*c.2453G>A*), que cambia la arginina 818 en una glutamina y cuyo efecto se desconoce todavía^{21,23} (Fig. 2).

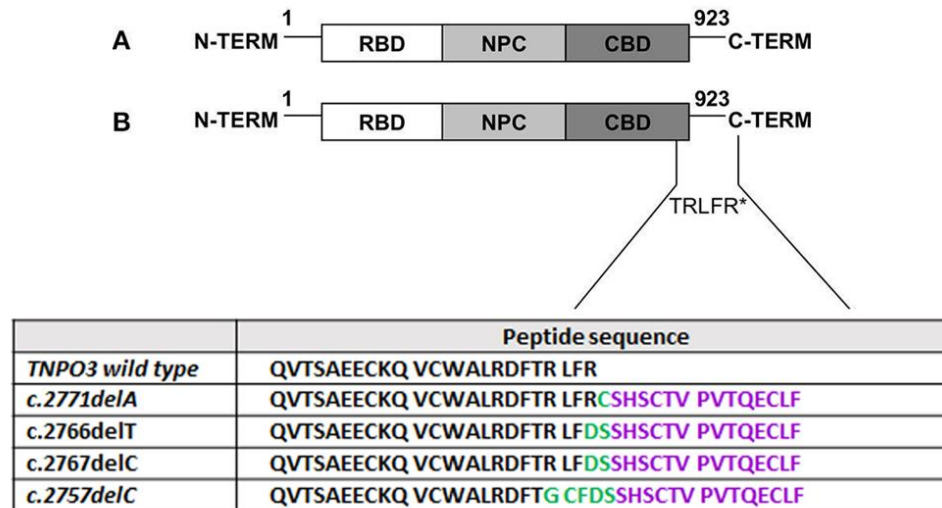


Figura 2. Mutaciones descritas en *TNPO3* que causan *LGMDD2*. Imagen adaptada de Costa et al 2022¹¹. (A) Representación gráfica de *TNPO3* de tipo normal que muestra el dominio de unión a Ran-GTP N-terminal (RBD), el dominio de unión al complejo de poro nuclear (NPC) y un dominio de unión a las proteínas cargo (CBD) C-terminal. Secuencia peptídica de *TNPO3* normal y de las diferentes *TNPO3*mut descritas en *LGMDD2*^{18,21,22}. La secuencia de tipo normal se indica en negro; la secuencia morada señala los 14 aminoácidos comunes en todas las mutaciones y el verde marca los nuevos aminoácidos como consecuencia de las mutaciones del marco de lectura.

La *TNPO3* se expresa en el músculo esquelético y en otros muchos tejidos como testículos, sistema respiratorio, aparato urinario o tracto gastrointestinal. A nivel subcelular, la *TNPO3* se localiza en la envoltura nuclear y en lamelas anulares, que consisten en membranas de retículo endoplásmico con una alta densidad de poros nucleares^{18,24}. A nivel estructural, el extremo N-terminal de *TNPO3* se une a Ran-GTP, la región central de la transportina tiene el sitio de unión al poro nuclear, mientras que el C-terminal es el dominio de unión a las proteínas cargo (Fig. 2). Se ha visto que *TNPO3* está altamente estructurada, existiendo en un equilibrio monómero-dímero y que, a altas concentraciones, se dimeriza para llevar a cabo sus funciones de importación nuclear²⁵. A nivel funcional, la *TNPO3* interviene principalmente en el transporte nuclear de las proteínas SR. Las proteínas SR son factores reguladores el corte y empalme (*splicing*) alternativo y el metabolismo del pre-mRNA. *TNPO3* reconoce a factores de *splicing* ricos en SR (*serine and arginine rich splicing factor*, *SRSF*) como *SRSF1* y *SRSF2*, mediante el reconocimiento de dominios SR fosforilados, aunque también reconoce al factor de especificidad de corte y poliadenilación 6 (*cleavage and polyadenylation specificity factor 6*, *CPSF6*)

independientemente de la fosforilación^{25–28}. También se ha visto que TNPO3 media la importación nuclear de la proteína de unión al RNA RBM4, de los factores de elongación de la RNA polimerasa II NELFE y PAF1 y de helicasas de RNA de la familia DDX y DHX, entre otros^{29,30}. Además, TNPO3 es un factor clave en el proceso de infección de células humanas por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), ya que participa en la importación nuclear del complejo de preintegración viral e interacciona con la integrasa viral^{31–33}. De hecho, la mutación *TNPO3 c.2771delA* interfiere significativamente con este proceso, protegiendo a los pacientes con *LGMDD2* contra la infección por VIH-1³⁴. Recientemente también se ha identificado que TNPO3 media la entrada al núcleo de la poliproteína retroviral Gag del virus del Sarcoma de Rous y es clave en la entrada al núcleo de la ribonucleoproteína del virus de Influenza A y en la replicación de dicho virus^{35,36}. Por otro lado, se ha visto que la TNPO3 se puede asociar al factor regulador del interferón 5, IRF5, crítico en la respuesta inmune frente a infección, y que variaciones en esta interacción pueden relacionarse con el lupus eritematoso sistémico³⁷.

Se desconoce cómo afecta la mutación de TNPO3 a su función en pacientes de *LGMDD2* y por qué causa la variabilidad descrita a nivel clínico e histopatológico. Es importante destacar que las familias con *LGMDD2* expresan la TNPO3 mutante (TNPO3mut) en heterocigosis, coexpresándose con la TNPO3 de tipo normal o *wild-type* (TNPO3wt)^{12,21,34}. La naturaleza dominante de la mutación en *TNPO3* podría deberse a uno de los siguientes fenómenos³⁸: pérdida de función de TNPO3mut y que la presencia de TNPO3wt sea insuficiente para compensarla (haploinsuficiencia); que TNPO3mut ejerza un efecto negativo sobre la TNPO3wt, provocando una pérdida de función de las dos formas de TNPO3 (dominancia negativa); y también podría ser que TNPO3mut tuviera una función nueva que produjera un efecto tóxico para las células (ganancia de función).

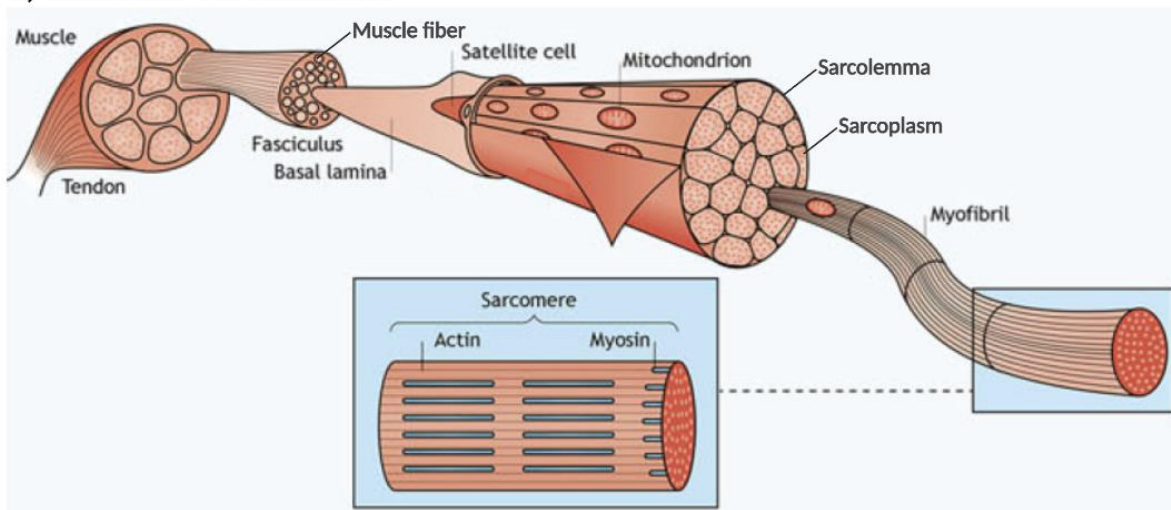
2. El músculo esquelético

El músculo esquelético es un tipo de músculo estriado, constituido por fascículos musculares formados, a su vez, por un conjunto de fibras musculares. Las fibras musculares son células alargadas multinucleadas, que sitúan sus núcleos en la periferia. Cada fibra muscular está rodeada por una lámina basal que alberga una membrana plasmática llamada sarcolema. Dentro de cada fibra se encuentra el citoplasma o sarcoplasma, compuesto por un citoesqueleto altamente organizado que contiene miofibrillas. Las miofibrillas están formadas por filamentos de actina y miosina responsables de la contracción (Fig. 3A)^{39,40}.

Introducción

El músculo esquelético adulto tiene una destacable capacidad de crecimiento y regeneración gracias a las células satélite musculares. Durante la miogénesis del músculo esquelético adulto estas células madre se activan y proliferan, dando lugar a una población amplificadora transitoria de células conocida como mioblastos. Estos precursores miogénicos expresan Pax7, Myf5 y MyoD y desmina para diferenciarse en miocitos que, una vez salen del ciclo celular, se fusionarán expresando MyoG para formar miotubos. Finalmente, los miotubos expresan diferentes miosinas de cadena pesada (Myosin heavy chain, MHC) para terminar la diferenciación y madurar a nuevas miofibras (Fig. 3B) ^{40,41}. Es importante destacar que seis tipos de *LGMDR* (*R1-R6*) tienen una alteración en su capacidad de regeneración del músculo, bien por presentar poca cantidad de células satélite o porque estas células tienen afectada su función de proliferación y/o diferenciación ⁴⁰. No obstante, debido a la poca información disponible sobre la *LGMD2*, se desconoce si hay una alteración a este nivel que pudiera estar afectando al músculo de los pacientes.

A) Structure of skeletal muscle



B) Adult myogenesis

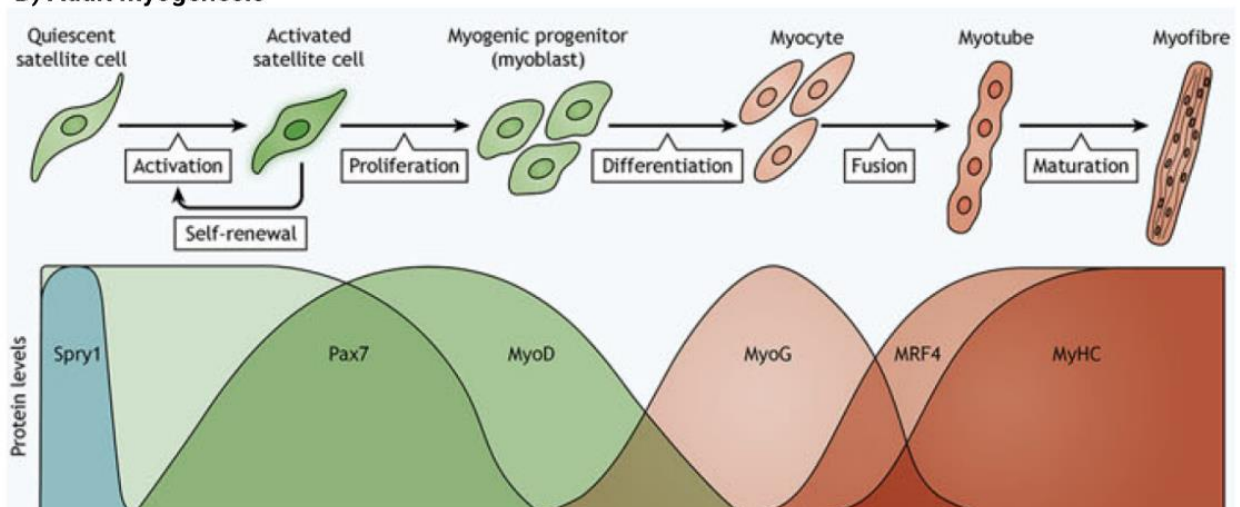


Figura 3. Estructura y miogénesis del músculo esquelético adulto. Imágenes adaptadas de Morgan and Partridge 2020 de la estructura del músculo esquelético adulto (A) y su miogénesis (B) ⁴⁰. El músculo esquelético está formado por fibras musculares que son células polinucleadas especializadas en la contracción del músculo, gracias a los filamentos de actina y miosina que contienen. El crecimiento y regeneración de estas fibras ocurre cuando se expresan reguladores miogénicos clave, que activan a las células satélite para fusionarse y formar miotubos y fibras musculares.

El músculo esquelético es un tejido altamente plástico y complejo, con una gran capacidad de adaptación para mantener su propia homeostasis. El término homeostasis hace referencia al proceso dinámico por el cual un organismo, órgano, tejido y/o célula se autorregula para mantener en equilibrio su medio interno. La homeostasis se consigue mientras haya un equilibrio entre las vías anabólicas, encargadas de sintetizar proteínas, y las vías catabólicas, encargadas de degradar proteínas ⁴².

Dentro de las vías catabólicas, el sistema ubiquitina-proteasoma (*ubiquitin-proteasome system, UPS*) y la autofagia son los principales procesos que media la degradación de los componentes celulares, y la producción de energía para mantener la homeostasis intracelular. Brevemente, en el proceso de degradación por el sistema *UPS*, las ubiquitin-ligasas (E1-E3) producen ubiquitinaciones (Ub) sucesivas de las proteínas cargo a degradar. Primero, la enzima E1 se une a la ubiquitina después de la escisión de ATP. Luego, la ubiquitina se transfiere de E1 a E2, y E3 se une a E2 y al sustrato proteico, induciendo la transferencia de ubiquitina desde E2 a la proteína a degradar. Una vez que la proteína cargo quedan marcadas con una cadena de Ub, es reconocida y degradada por el proteasoma 26S, formado por las subunidades 19S y 20S (Fig. 4).

La autofagia está compuesta por varias etapas: iniciación, nucleación, elongación, maduración, fusión y degradación. Este proceso comienza con la formación de vesículas conocidas como autofagosomas, formadas a partir del retículo endoplasmático. La autofagia se desencadena por la activación de un complejo regulador que contiene las proteínas Vps34, Beclin 1, Vps15, entre otras, el cual induce el reclutamiento de LC3 en el autofagosoma naciente. A su vez, en la formación de este tipo de vesículas están implicadas gran cantidad de proteínas de la familia de los *ATG* (*Autophagy-related genes*). Los autofagosomas maduros, que expresan a su vez las proteínas autofágicas LC3II y P62, 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 (Fig. 4) ^{42,43}.

Introducción

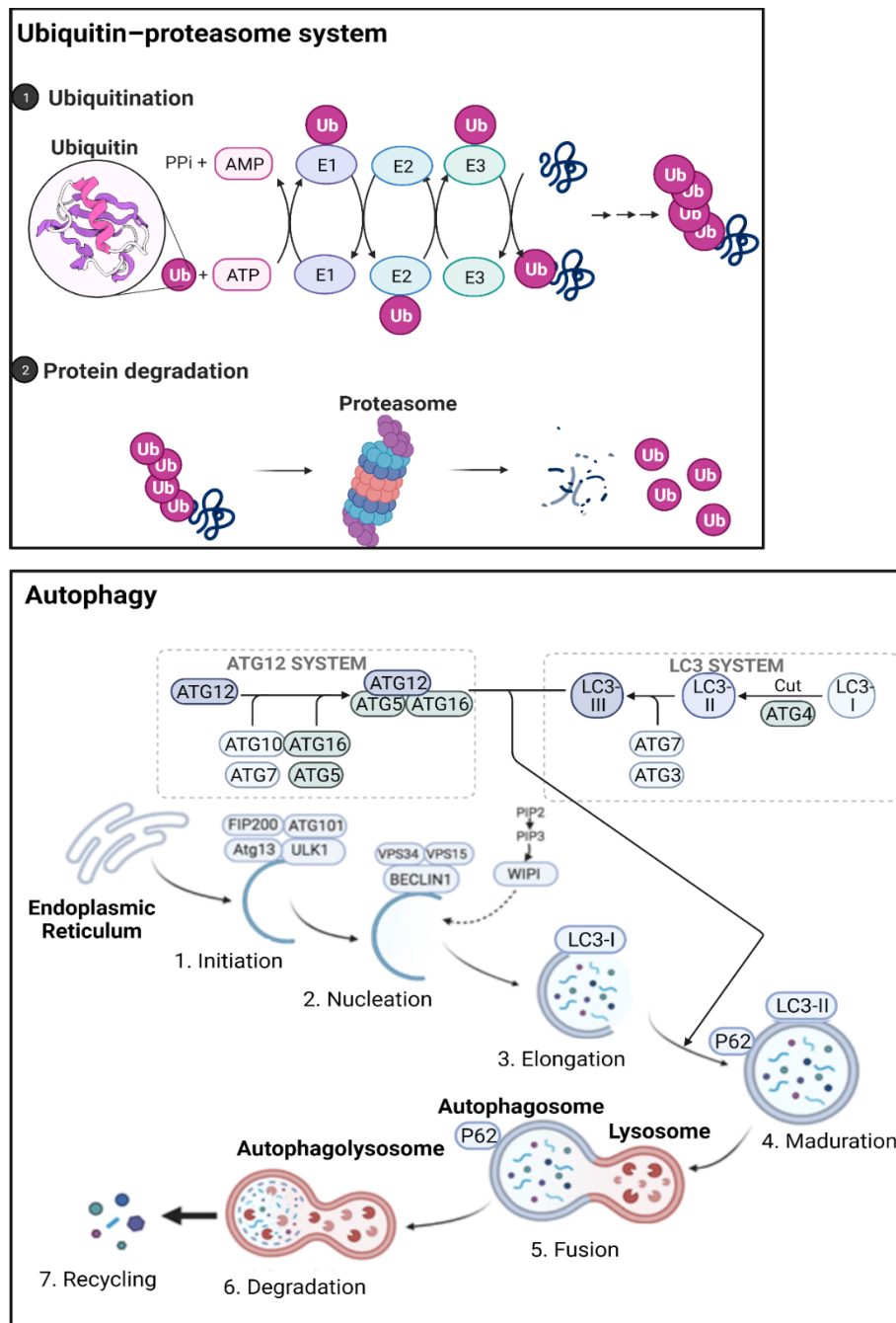


Figura 4. Principales procesos catabólicos que contribuyen a la homeostasis muscular. Imagen adaptada de Tesis de María Sabater Arcis, 2022 ⁴⁴, hecha en Biorender.com. Representación esquemática de la degradación proteica mediante los principales procesos de degradación proteica descritos: el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia.

En cuanto a las vías anabólicas, la señalización de la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (*insulin-like growth factor 1, IGF-1*) promueven la síntesis proteica y formación de músculo nuevo. De forma resumida, la activación del receptor *IGF-1, IGF-1R*, conduce a la fosfoactivación de la *PI3K (phosphoinositide 3-kinase)* y la subsiguiente activación de la quinasa Akt. Cuando Akt está activa actúa directamente sobre múltiples dianas, activando los procesos

dependientes de la quinasa mTOR para promover la supervivencia celular, el metabolismo de la glucosa y los procesos de crecimiento anabólico. Simultáneamente, la activación de Akt mantiene al factor de transcripción FoxO fosforilado, de modo que se impide su traslocación al núcleo inhibiendo tanto la autofagia como los procesos catabólicos (Fig. 5) ⁴⁵.

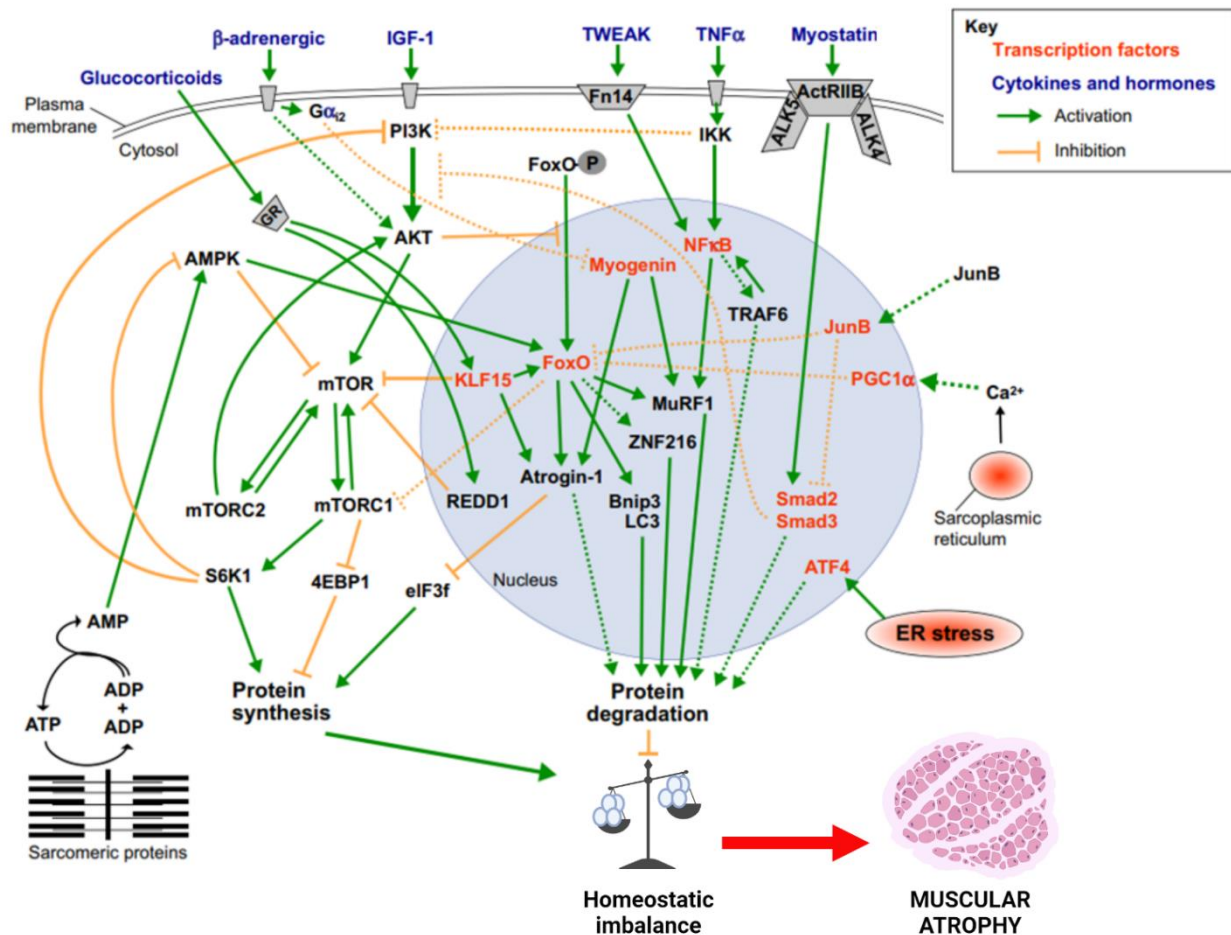


Figura 5. Representación esquemática de las principales vías que controlan la homeostasis muscular. Imagen adaptada de Bonaldo & Sandri, 2013 ⁴⁴. Se representan las principales vías de señalización implicadas en la síntesis y degradación de proteínas, las cuales están reguladas por varios estímulos diferentes y activan múltiples vías de señalización que pueden interactuar entre sí. Las líneas punteadas representan vías cuyos mecanismos moleculares y su función en el músculo esquelético adulto aún no se han definido por completo.

En condiciones patológicas, hay una ruptura de la homeostasis bien por una disminución de la capacidad de síntesis proteica y/o por un exceso de degradación proteica en el músculo, que acaba desencadenando la atrofia muscular. Entre las múltiples vías alteradas en estas condiciones, se produce una falta de señalización de IGF1, que conduce a una disminución de la activación de AKT y, por consiguiente, de mTOR. A su vez, la falta de fosforilación de FoxO permite su translocación al núcleo y la consecuente activación de la transcripción de diferentes atrogenes, como: *ATGs*, que participan en la autofagia, y las ubiquitin-ligasas E3 *MuRF1 (muscle RING-finger protein 1)* y Atrogin-

Introducción

1, que favorecen la actividad del UPS. También puede haber una falta de energía (aumento de AMP/ATP) que active a la AMPK (*AMP-activated protein kinase*), favoreciendo así a la activación de la autofagia y a la inhibición de mTOR. Por otro lado, un estado pro-inflamatorio, en respuesta a la citoquina TNF α se activa el complejo I κ B quinasa (IKK), que fosforila al inhibidor de NF κ B. Esto conduce a la translocación nuclear de NF κ B y la activación de la transcripción de genes implicados en la degradación proteica. Por último, añadir que las señales de estrés también conllevan un aumento de miostatina (MSTN), un miembro de la familia *TGF β* (*Transforming growth factor β*) que regula negativamente el crecimiento muscular. Este aumento de MSTN provoca la activación de la vía de señalización de Smad2/3. 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 ⁴² (Fig. 5).

En biopsias de pacientes de *LGMDD2* se ha visto una acumulación de proteínas autofágicas, que apunta a una sobreactivación de esta ruta ^{8,17}. La autofagia puede hiperactivarse en respuesta al estrés metabólico y/o en respuesta a una lesión del tejido que puede estar asociada, a su vez, con la inflamación ⁴⁶. De hecho, en varios estudios han demostrado que la sobreactivación de la autofagia altera la homeostasis de proteínas en el músculo, y el catabolismo excesivo termina degradando el músculo y generando atrofia ^{42,43,47}. Sin embargo, se necesitan más estudios que avalen esta hiperactivación de la autofagia en *LGMDD2* y que demuestren si dicha desregulación es la causa o consecuencia de la atrofia muscular en los pacientes.

3. Modelos experimentales de enfermedades neuromusculares

Los modelos de experimentación sirven para estudiar las causas y consecuencias de las patologías humanas, y son claves para testar nuevas estrategias terapéuticas. En *LGMDD2*, la falta de modelos con los que trabajar ha sido un freno para el avance en la investigación de esta enfermedad. A continuación, debido a la repercusión que han tenido en la presente tesis, se destacan dos tipos de modelos de experimentación concretos: el modelo en *Drosophila melanogaster* y el modelo de mioblastos inmortalizados. El modelo *in vivo* de *Drosophila* permite estudiar la distrofia en condiciones fisiológicas, mientras que el modelo *in vitro* de mioblastos permite profundizar sobre los efectos de la mutación en el contexto de célula humana ya que proceden de un paciente. El estudio de estos dos modelos ha sido fundamental para la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos que, en última instancia, conducen a la degeneración muscular en *LGMDD2*. Además, ambos modelos han servido para probar diferentes estrategias terapéuticas que, por un lado, podrían aportar información

relevante sobre la patología y que, por otro lado, podrían llegar a ser propuestas de tratamiento contra esta distrofia.

3.1. Modelo *in vivo*: *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster es uno de los organismos más utilizados como modelo biomédico de enfermedades musculares humanas. Esto se debe a que *Drosophila*, a pesar de ser un insecto, conserva propiedades biológicas, fisiológicas y neurológicas básicas de los mamíferos y, especialmente, conserva el sistema músculo esquelético y los procesos de desarrollo muscular básicos⁴⁸. Los músculos indirectos del vuelo (*indirect flight muscles, IFM*) son músculos fibrilares en *Drosophila*⁴⁹ comparables en estructura a los músculos esqueléticos de vertebrados, ya que contienen cientos de núcleos y tienen una organización similar^{50,51}. A su vez, la investigación sobre los *IFM* de *Drosophila* ha identificado roles para muchos genes, que tienen equivalentes en el desarrollo y la función de los músculos de los vertebrados, con alteraciones fenotípicas comparables entre especies⁵². Por ejemplo, cuando se sobreexpresa el inhibidor del ciclo celular humano p21 en mioblastos de *Drosophila*, estas células no proliferan ni se fusionan para formar los *IFM*, sugiriendo un papel común para los genes del ciclo celular durante el desarrollo muscular⁵³. También se ha visto que la expresión persistente de factores de diferenciación como Twist y Notch conduce a la degeneración apoptótica de los *IFM* de la mosca⁵¹.

Otra ventaja que presenta *D. melanogaster* es que se estima que casi un 75% de los genes causantes de patologías humanas tienen homólogos funcionales en mosca, convirtiendo a la mosca en un buen modelo de enfermedades genéticas humanas⁴⁸. Concretamente, el gen *TNPO3* que codifica para la transportina humana tiene su ortólogo en *Drosophila* llamado *Tnpo-SR*, el cual también codifica una β -importina encargada del transporte de proteínas SR al núcleo celular de la mosca⁵⁴. De hecho, se ha visto que *Tnpo-SR* también interacciona de forma específica con un antagonista de las proteínas SR: el *RSF1* (*repressor splicing factor 1*). El dominio RS de las proteínas SR y el dominio GRS de *RSF1* son necesarios para la interacción directa con *Tnpo-SR*, que puede ser modulada por fosforilación. Además, *Tnpo-SR* se localiza en el citosol y núcleo celular, al igual que ocurre en humanos. Con todo, *Tnpo-SR* es considerada homóloga funcional de la *TNPO3* humana⁵⁵. Es importante mencionar que *Drosophila* también podría ser un buen modelo experimental de *LGMDD2* debido a que únicamente expresa dos genes de transportina, en comparación con los tres genes presentes en humanos. Esto permite que se detecten fenotipos con mayor facilidad ya que, al alterar la función génica de una de las isoformas, hay menos probabilidad de que otras suplan su función por redundancia genética.

Actualmente existe un gran número de herramientas genéticas desarrolladas en *Drosophila*, como es el sistema Gal4/UAS. Brevemente, este sistema permite dirigir la expresión de un transgén de

Introducción

interés a un tejido o tiempo determinado ⁵⁶. En conjunto, *Drosophila* se considera como un buen modelo experimental para la investigación biomédica de enfermedades musculares y genéticas y, en particular, podría ser un modelo *in vivo* válido para investigar la *LGMDD2*. De hecho, a día de hoy existen varios modelos de la distrofia miotónica tipo 1 (DM1) generados en *Drosophila* ⁵⁷⁻⁵⁹, así como modelos de diferentes *LGMD* ^{60,61}, entre otros, que han permitido avanzar en el conocimiento de estas patologías humanas.

3.2. Modelos *in vitro*: mioblastos inmortalizados derivados de paciente

Las líneas celulares inmortalizadas derivadas de pacientes son otro de los principales modelos experimentales en investigación biomédica. A diferencia de los cultivos primarios, los cultivos inmortalizados muestran un número potencialmente ilimitado de divisiones, mientras mantienen la mayoría de las características específicas de tejido y de la enfermedad ⁶². El ejemplo de células inmortalizadas más comúnmente utilizado en investigación son las células HeLa, provenientes de una muestra de cáncer cérvico-uterino ⁶³. De hecho, la resistencia a la infección por VIH-1 de los pacientes *LGMDD2* se demostró gracias a la transducción de células HeLa con un lentivirus que contenía el cDNA de TNPO3mut ³⁴. Sin embargo, dicho modelo no sirve para entender qué consecuencias tiene la expresión de TNPO3mut específicamente en el músculo de los pacientes, siendo éste el principal tejido afectado en esta patología.

En este sentido, los mioblastos inmortalizados derivados de paciente *LGMDD2* podrían constituir un modelo *in vitro* sobre el que investigar los mecanismos que conducen a la degeneración muscular en esta distrofia. Estos mioblastos tienen la principal ventaja de iniciar una diferenciación miogénica que da como resultado su fusión en miotubos provenientes del propio paciente sobre los que realizar estudios moleculares ⁶⁴⁻⁶⁶. De hecho, para el estudio de enfermedades musculares, como la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular facioescapulohumeral (*facioscapulohumeral muscular dystrophy, FSHD*) ya se utilizan líneas de mioblastos inmortalizados procedentes de paciente como modelo *in vitro* ^{67,68}. Además, las líneas de mioblastos inmortalizados de paciente permiten probar diferentes estrategias terapéuticas. Como ejemplos, en mioblastos inmortalizados de las distrofias *FSHD*, *DM1* y *DM2* ya se han probado distintas terapias génicas basadas en RNA ^{62,69,70}. Con todo, los mioblastos inmortalizados *LGMDD2* ofrecen nuevos paradigmas celulares para estudios fisiopatológicos y estrategias terapéuticas.

4. Estrategias terapéuticas en enfermedades neuromusculares

Todavía no existe ningún tratamiento eficaz contra las *LGMD* y las estrategias actuales se basan en mantener la función de los músculos afectados y en mejorar la calidad de vida. De hecho, los enfoques farmacológicos para mejorar las *LGMD*, incluidos los corticosteroides y hormona de crecimiento, han sido escasos e inefectivos hasta el momento ⁷¹. Sin embargo, actualmente los enfoques terapéuticos moleculares basados en terapia génica han demostrado ser prometedores, ya que pueden apuntar a mecanismos celulares o moleculares específicos de *LGMD* y podrían servir para descubrir mecanismos involucrados en las patologías ^{72,73}.

Puesto que la causa de la *LGMD2D* es la *TNPO3*mut, el principal enfoque farmacológico se centraría en la reducción de los niveles de *TNPO3*mut, bien con fármacos que inhiban su síntesis, o bien con fármacos que activen su degradación. De forma indirecta, también se podrían estudiar fármacos que ayudaran a frenar la degeneración muscular y/o a regenerar el tejido muscular afectado. Por otro lado, las estrategias terapéuticas basadas en edición génica se centrarían en corregir, de forma específica, la mutación *c.2771delA* de *TNPO3* que causa la distrofia. Dada la relevancia que tienen en la presente tesis, a continuación, se destacan dos tipos de estrategias terapéuticas concretas: el reposicionamiento de fármacos, y el editado mediante CRISPR-Cas9, como terapia génica.

4.1. Terapia génica: sistema CRISPR-Cas9

La terapia génica representa una de las principales estrategias terapéuticas en los trastornos neuromusculares heredados genéticamente, ya que tiene como objetivo corregir mutaciones génicas ⁷⁴. En los últimos años se han desarrollado diferentes tecnologías de edición génica, basadas en el uso de nucleasas diseñadas contra *loci* específicos. Las *ZFN* (*zinc-fingers nucleases*) y *TALEN* (*transcription activator-like effectors nucleases*) son las principales técnicas de edición génica utilizadas ^{75,76}. Sin embargo, debido a la complejidad de diseño de los dominios de unión al DNA y a problemas de validación y de síntesis, la utilización de estas nucleasas resulta muy compleja y su eficiencia es baja. Actualmente, *CRISPR* (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) y su proteína asociada Cas-9, son el método más efectivo, eficiente y preciso de herramienta de edición del genoma utilizado en investigación ⁷⁷. Aunque el sistema CRISPR-Cas9 se describió inicialmente como un sistema natural de inmunidad bacteriana adaptativa ^{78,79}, este sistema se ha adaptado para dirigirse a secuencias concretas de DNA y editar genes en células humanas con gran éxito. Brevemente, el sistema CRISPR-Cas9 consiste en introducir en la célula a editar un RNA guía monocatenario (*single guide RNA*, *sgRNA*), diseñado para reconocer de forma específica la secuencia diana del gen de interés, y una endonucleasa Cas9, encargada de cortar dicha secuencia. El sistema CRISPR-Cas9 ofrece nuevas

Introducción

oportunidades para la corrección de mutaciones en modelos de enfermedades monogénicas, constituyendo un enfoque terapéutico prometedor para el tratamiento tanto “*in vivo*” como “*ex vivo*”^{77,80}.

Durante los últimos diez años se han publicado numerosos estudios de terapia génica basada en CRISPR-Cas9 en enfermedades neuromusculares. El sistema CRISPR-Cas9 se ha utilizado para corregir mutaciones asociadas a la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en modelos animales y células madre pluripotentes inducidas derivadas de pacientes. Esto ha servido para verificar la implicación de las mutaciones en la ELA y estudiar los efectos de su corrección. Además, CRISPR también se ha utilizado para crear mutaciones para investigar la fisiopatología de la ELA⁸¹. Por otro lado, mediante el editado con CRISPR-Cas9 de las mutaciones de DMD, la expresión de distrofina se restaura de manera eficiente en células humanas y modelos de ratón de DMD⁸². En células madre pluripotentes inducidas derivadas de pacientes con *LGMD* tipo R2 y R3, la edición mediada por CRISPR-Cas9 restaura notablemente la expresión de la proteína disferlina y alfa-sarcoglicano, respectivamente, así como su localización subcelular⁸³. Por último, destacar que actualmente existen 79 ensayos clínicos en humanos donde se utiliza en CRISPR-Cas9 para tratar distintos tipos de cánceres, infecciones víricas y enfermedades genéticas como la β -talasemia y anemia falciforme⁸⁴. De hecho, la FDA ya ha aprobado diferentes terapias basadas en CRISPR-Cas9 para tratar la enfermedad de células falciformes y de neoplasias malignas^{85,86}. Por último añadir que en la Tercera Cumbre Internacional sobre Edición del Genoma Humano, celebrada recientemente, se ha hecho público el primer caso de un paciente con anemia falciforme que se ha curado gracias al editado genético de sus células con CRISPR-Cas9⁸⁷. Con todo, la edición génica mediante CRISPR-Cas9 de la mutación *c.2771delA* del gen *TNPO3* podría ser una estrategia terapéutica válida contra la *LGMD2D*.

4.2. Terapia farmacológica: reposicionamiento de fármacos

La terapia farmacológica tiene como objetivo prevenir y/o tratar enfermedades con fármacos generados *de novo* o reposicionados. El descubrimiento y desarrollo de fármacos nuevos destinados a enfermedades raras, conocidos como medicamentos huérfanos, es un proceso costoso, lento (entre 10 – 15 años) y arriesgado. De hecho, sólo llegar a la fase I de los ensayos clínicos, supone unos 5 – 6 años en los que hay que desarrollar un compuesto que tenga resultados prometedores en modelos *in vitro* e *in vivo*, y entonces hacerle las primeras pruebas en humanos para comprobar su seguridad. Menos de un 10% de esos compuestos que logran alcanzar la fase II de ensayos clínicos llega a convertirse en fármacos disponibles para médicos y pacientes^{88–90}. Un enfoque diferente en el tratamiento de enfermedades raras es identificar nuevos usos de fármacos ya comercializados para otras patologías. El reposicionamiento de fármacos tiene expectativas prometedoras en cuanto a

eficacia, seguridad, coste y traslación al entorno clínico. De hecho, los fármacos reposicionados generalmente se aprueban antes (3 – 12 años), a un coste de hasta 8 veces más reducido aproximadamente, con menor riesgo y con tasas de aprobación entorno al 30 – 75%. Esto se debe a que los fármacos reposicionados ya se han estudiado en modelos preclínicos y en humanos, y se conocen bien su perfil de seguridad y sus propiedades farmacocinéticas, al menos para la indicación para la que están autorizados ^{90,91}. Además, a diferencia de los fármacos generados *de novo*, los aspectos de formulación ya están desarrollados, lo que explica por qué están más cerca de alcanzar la autorización de comercialización ⁹². Existen varios ejemplos de fármacos reposicionados para enfermedades raras, como es el caso del Canakinumab, un fármaco concebido para tratar la artritis reumatoide y que posteriormente fue aprobado también como terapia para el síndrome de Muckle-Wells ⁹³. Otro ejemplo es el Sirolimus (Rapamicina), un fármaco usado para prevenir el rechazo de un trasplante, que también puede emplearse para el tratamiento del síndrome linfoproliferativo autoinmune y actualmente se encuentra en ensayos clínicos para tratar la β -talasemia ^{94,95}.

Una de las principales estrategias para reposicionar fármacos contra enfermedades raras se basa en realizar rastreos de compuestos sobre modelos experimentales existentes. Esta estrategia aprovecha los avances recientes y rápidos en las tecnologías de detección, que permiten evaluar el potencial terapéutico de quimiotecas de fármacos, ya existentes y con mecanismo de acción conocido, frente a objetivos moleculares o fenotipos asociados a la enfermedad de interés ⁹⁰. Los rastreos para el descubrimiento de fármacos realizados en modelos celulares no tienen en cuenta los factores fisiológicos y anatómicos de un ser vivo que afectan la capacidad de un fármaco para interactuar con su diana y son incapaces de anticipar la dosis efectiva para tratar la nueva indicación en estudio. Los resultados obtenidos utilizando modelos preclínicos *in vivo* proporcionan una indicación de los posibles efectos farmacológicos en humanos ⁹⁶. *Drosophila* permite realizar un rastreo de fármacos contra enfermedades neurodegenerativas, debido a que posee un sistema nervioso central complejo y una barrera hematoencefálica conservada ^{97,98}. Como ejemplo, gracias a un rastreo realizado en modelos de *Drosophila* se ha identificado a Zaprinst, utilizado para la disfunción eréctil, y al antibiótico Moxifloxacina como fármacos candidatos para tratar el Parkinson y la Atrofia muscular espinal (AME), respectivamente ^{99,100}. De hecho, este último ya se ha probado en células derivadas de pacientes y en un modelo murino, siendo los ensayos clínicos el siguiente paso ¹⁰¹.

OBJETIVOS

La distrofia muscular de cinturas tipo D2 es una enfermedad genética ultra rara, con un patrón de herencia autosómico dominante, para la cual no existe tratamiento. Se trata de una distrofia muscular degenerativa, de la que apenas hay información. Esto se debe, en gran parte, a que su causa molecular se describió hace relativamente poco y a la inexistencia de algún modelo experimental que permita investigar la enfermedad. Por tanto, nos planteamos la necesidad de desarrollar modelos de *LGMD2* con los que realizar ensayos experimentales, para descubrir qué desencadena los síntomas de esta enfermedad, así como identificar posibles terapias efectivas.

Esta situación ha sido el punto de partida de la presente tesis doctoral, cuyos principales objetivos son los siguientes:

Objetivo 1: Desarrollar y caracterizar un modelo experimental de *LGMD2* en *Drosophila melanogaster*.

Objetivo 2: Identificar compuestos con potencial terapéutico en el modelo de *LGMD2* en *Drosophila*.

Objetivo 3: Caracterizar mioblastos inmortalizados derivados de paciente y evaluar el potencial terapéutico de la edición genética de la mutación *LGMD2* mediada por CRISPR-Cas9.

Objetivo 4: Validar el efecto terapéutico de los compuestos candidatos en el modelo celular de *LGMD2*.

MATERIAL Y METODOLOGÍA

1. Material biológico y manejo

1.1. Transgénesis en *Drosophila melanogaster*

El sistema Gal4/UAS permite dirigir la expresión de uno o varios transgenes en tejidos, tipos celulares o momentos del desarrollo concretos en *Drosophila*. Por un lado, se genera una línea de mosca que contiene el transgén que se quiere expresar clonado aguas abajo de la secuencia *UAS* (*upstream activation sequence*), diana del factor de transcripción Gal4. Por otro lado, se genera otra línea de mosca que expresa el factor de transcripción Gal4 bajo el potenciador de un gen, de un tejido u órgano específico. Las líneas Gal4 son conocidas como *drivers*. Al cruzar ambas líneas, Gal4, que sólo se expresa en el tejido de interés, se une a la secuencia *UAS* activando la expresión de la construcción (Fig. 6) ^{56,102}.

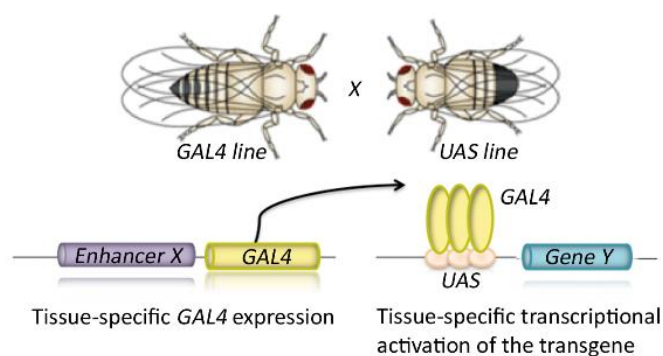


Figura 6. Representación esquemática del sistema Gal4/UAS de *Drosophila melanogaster*. Imagen adaptada de Muqit 2002 ¹⁰³.

Para generar las líneas de moscas transgénicas *UAS-TNPO3*, primeramente, se obtuvieron los cDNAs de TNPO3wt y TNPO3mut cedidos por el Dr. Nigro (Universidad de Vanvitelli) ²¹. Los cDNAs están fusionados en N-terminal con la etiqueta hemaglutinina del virus de la influenza humana (HA). Ambos constructos se liberaron del plásmido pCS2+ mediante digestión con *Bam*HI/*Xba*I y se subclonaron en sitios *Bgl*II/*Xba*I en el plásmido pUAST ⁵⁶. A continuación, *UAS-TNPO3wt* y *UAS-TNPO3mut* se subclonaron en el plásmido pCa4B usando el sitio de restricción *Bam*HI. El plásmido pCa4B contiene los sitios *attP*B, mediante los cuales las construcciones clonadas pueden integrarse en el genoma de *Drosophila* utilizando la integrasa PhiC31 ¹⁰⁴. Los plásmidos pCa4B-UAS-TNPO3 se enviaron a la empresa de transgénesis BestGene Inc. para su microinyección en embriones de moscas *y¹w^{67c23}*; *P-CaryP-attP40* ¹⁰⁵. Ambas construcciones se integraron en el cromosoma 2L en la región citogenética 25C7 para garantizar el mismo nivel de alta expresión de cDNA en todas las líneas. Se obtuvieron 5 líneas transgénicas para cada construcción. Un anterior miembro del grupo de Genómica Traslacional, el Dr. Juan Manuel Fernández Costa, comprobó la secuencia de *TNPO3* mediante PCR y

Material y metodología

eligió una línea de *UAS-TNPO3wt* y *UAS-TNPO3mut* para realizar pruebas previas. A partir de entonces comienza el estudio de la presente tesis.

1.2. Líneas y cruces de *Drosophila melanogaster*

De Bloomington Drosophila Stock Center (Universidad de Indiana Bloomington) se obtuvieron las líneas: *y^{1w¹¹¹⁸}*, *D42-Gal4* (#8816), *Act5C-Gal4* (#4414), *UAS-GFP* (#4776) y *UAS-GFP:Atg8* (#51656), y las líneas de RNA interferente (RNAi), *UAS-IR-bcd* (#54477), *UAS-IR-Tnpo-SR* (#25988). La línea *MHC-Gal4* se obtuvo de G. Davis Marek 2000 ¹⁰⁶, y la línea recombinante *D42>SMN2:luc*, *UAS-SMN2:luciferase* (abreviada como *D42>SMN2:luc*) del trabajo de Konieczny 2020 ¹⁰⁰. Para la presente tesis generamos mediante cruces genéticos una línea de *Drosophila* que expresaba la construcción *UAS-TNPO3mut* y, a su vez, silenciaba la expresión del gen ortólogo mediante RNAi con la construcción *UAS-IR-Tnpo-SR*: línea *UAS-TNPO3mut; UAS-IR-Tnpo-SR* (nombrada como *sTNPO3mut*). En paralelo se generó la línea control que expresaba la *TNPO3wt*, en un fondo silenciado para el endógeno: *UAS-TNPO3wt; UAS-IR-Tnpo-SR* (*sTNPO3wt*) (Fig. 7A). Además, se generó la línea *MHC-Gal4; UAS-GFP:Atg8a* (abreviada como *MHC>GFP:Atg8a*) para la expresión específica de *GFP:Atg8a* en músculo de mosca (Fig. 7B).

Los cruces de moscas para la caracterización del modelo de *LGMDD2* se llevaron a cabo a 25 °C, cruzando hembras vírgenes (líneas Gal4) con machos (líneas UAS), en una relación 3/1, en tubos con medio nutritivo estándar. El medio nutritivo estándar se prepara disolviendo, en 1 l de agua: 10.5 g de agar, 60 g de levadura, 10 g de harina de soja, 60 g de harina de maíz, 50 g de azúcar, 80 g de extracto de malta, 5 ml de ácido propiónico, 10 ml de etanol y 3 g de nipagín. La descendencia se mantuvo a 29 °C para aumentar la expresión del sistema Gal4/UAS. A los 8-9 días, se recogieron los adultos nacidos y con ellos se realizaron los diferentes estudios a 29 °C.

Los cruces de moscas para el rastreo de fármacos se realizaron cruzando hembras vírgenes de la línea recombinante *D42>SMN2:luc* con machos de las líneas generadas *sTNPO3wt* y *sTNPO3mut* a 25 °C en sistemas de puesta con placas de agar que contenían levadura fresca. Las placas de agar, que contenían los embriones, se cambiaron cada 2 días, añadiendo periódicamente nuevos parentales al sistema de puesta, y se mantuvieron a 25 °C 24 h aproximadamente para que se desarrollaran a larvas L1.

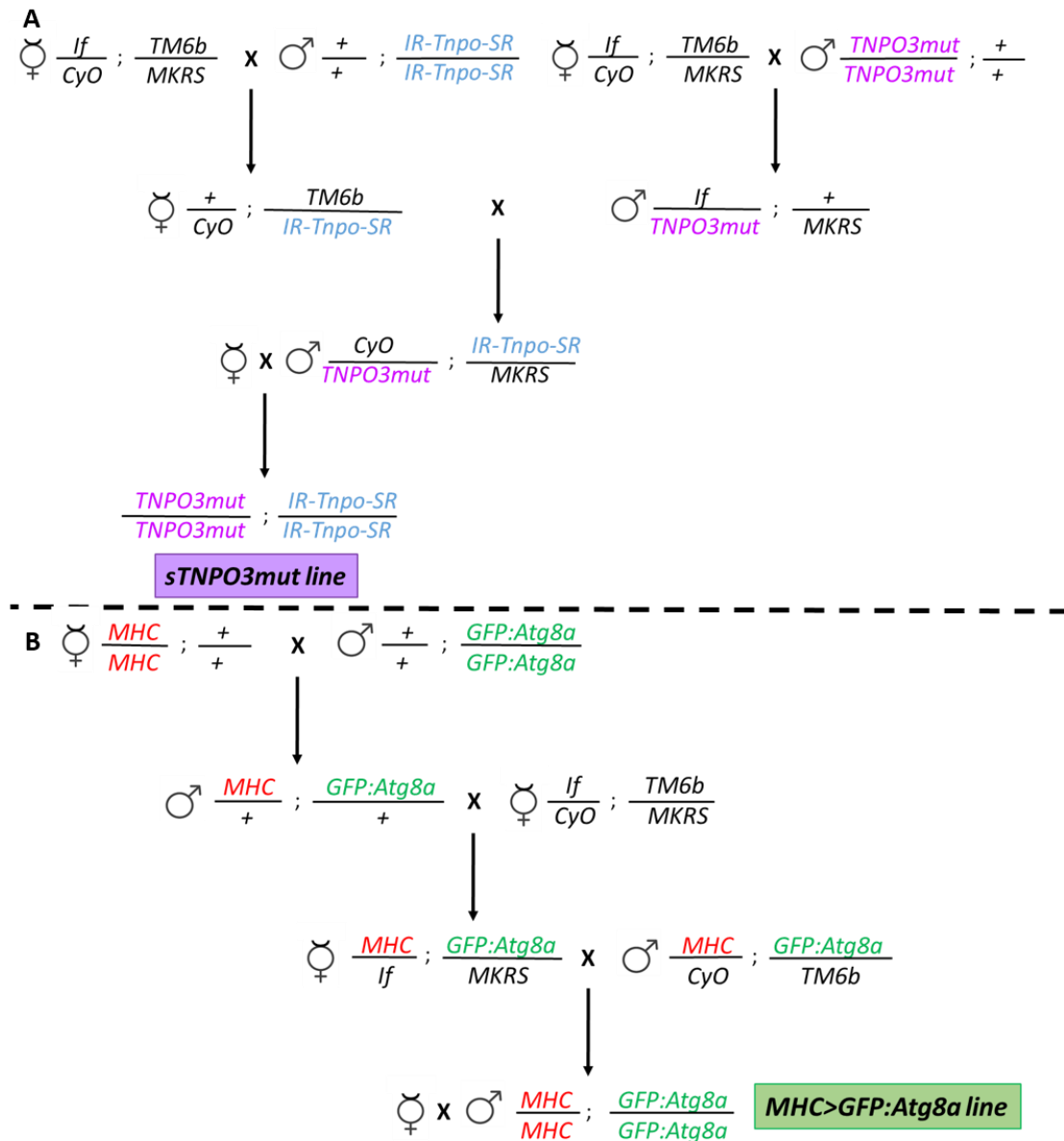


Figura 7. Esquema de generación de las líneas de *Drosophila* indicadas. Generación de las moscas *sTNPO3mut* (A) *MHC>GFP:Atg8a* (B) mediante cruces genéticos estándar. La generación de las moscas *sTNPO3wt* se hizo igual, usando la línea *UAS-TNPO3wt* (A). En cada cruce se indica el genotipo de interés abreviado de los progenitores y descendencia. ♀ representa hembras vírgenes y + representa un cromosoma normal. *If* (*Irregular facets*) es un marcador fenotípico de ojos pequeños y *CyO* (*Curly of Oster*) un balanceador con fenotipo de alas curvas, ambos del cromosoma 2. Para el cromosoma 3 se utilizaron los balanceadores *TM6b* (*Third Multiple 6b*), con fenotipo de pupas pequeñas y quetas humerales extra, y *MKRS* con fenotipo de quetas cortas y gruesas.

1.3. Líneas y cultivo de mioblastos inmortalizados

Las dos líneas de mioblastos inmortalizadas fueron proporcionadas por el biobanco del Instituto de Miología de París. Los mioblastos control (CNT; ID AB1079) proceden del cuádriceps de un donante masculino sano de 38 años, y los mioblastos de *LGMD2* (LGMD2; ID LGMD1F-B2) se

Material y metodología

obtuvieron del tibial anterior de un donante masculino LGMDD2 de 33 años. Para su immortalización en el Instituto de Miología de París, se transdujeron los mioblastos primarios humanos con vectores lentivirales que contienen *hTERT* (*human telomerase reverse transcriptase*) y *Cdk-4* de ratón (*cyclin dependent kinase 4*). Por un lado, la expresión estable de *hTERT* evita el acortamiento excesivo de los telómeros que desencadena la entrada en la senescencia replicativa celular. Por otro lado, la sobreexpresión de *Cdk-4* inhibe la vía de señalización de p16, un inhibidor del ciclo celular ¹⁰⁷.

La línea de mioblastos immortalizados de LGMDD2 editada genéticamente (LGMDD2 GE) la proporcionó el grupo de Patología Neuromuscular y Ataxias del Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) La Fe. La edición génica de la línea proveniente de paciente se realizó mediante la herramienta CRISPR-Cas9, tal y como se explica en el siguiente subapartado.

Todas las líneas descritas se cultivaron con medio de crecimiento de células de músculo esquelético suplementado con la mezcla de la casa comercial PeloBiotech, que contiene: factores de crecimiento de fibroblastos y epidérmico, dexametasona, insulina, fetuina, 2% de suero bovino fetal y 50.00 µg/ml gentamicina (PB-MH-272-0000; PELOBiotech). Este medio de crecimiento se suplementó con 10% de suero de caballo y 2% de penicilina/estreptomicina. El medio de diferenciación, cuando fue necesario, se preparó con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) de alto contenido en glucosa, 2% de suero de caballo y 1% de penicilina y estreptomicina (ThermoFisher Scientific). Cada 2-3 días se refrescó el medio de diferenciación. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂.

1.4. Edición génica de mioblastos immortalizados mediante CRISPR-Cas9

La generación de la línea de mioblastos immortalizados mediante CRISPR-Cas9 la llevó a cabo el grupo de Patología Neuromuscular y Ataxias dirigido por el Dr. Vélchez (IIS La Fe de Valencia). El mecanismo de edición del genoma por CRISPR-Cas9 consta de tres pasos: reconocimiento, escisión y reparación. Para editar genéticamente la línea de mioblastos immortalizados LGMDD2, primeramente, se diseñó un *sgRNA* y un oligonucleótido donante monocatenario (*single-stranded donor oligonucleotide*, *ssODN*). El *sgRNA* se diseñó con la herramienta bioinformática Breaking-Cas ¹⁰⁸ para reconocer al alelo mutado de *TNPO3* y para que su sitio de escisión esperado estuviera cerca del *c.2771delA*, confiriendo más especificidad sobre este alelo que el tipo normal. El *ssODN* se diseñó para que tuviera la secuencia correcta del codón *stop* del alelo de *TNPO3*^{wt} flanqueada por dos brazos de homología idénticos a la cadena no dirigida. Una vez diseñados, se introdujeron por electroporación el complejo *sgRNA*-endonucleasa Cas9 y el *ssODN* en los mioblastos LGMDD2. Destacar que el complejo *sgRNA*-Cas9 se introdujo como ribonucleoproteína debido a su mejor eficiencia de corte en

células difíciles de transfectar, como los mioblastos, y por presentar menos limitaciones que los plásmidos CRISPR ¹⁰⁹. Una vez en la célula, el *sgRNA* reconoce la secuencia diana del gen de interés y dirige a Cas9 para que realice un corte de doble cadena (*double-stranded break, DSB*). Tras el *DSB*, sistemas propios de reparación del daño del DNA de la célula pueden reparar el corte. Concretamente, el sistema de reparación dirigida por homología (*homology-directed repair, HDR*) presenta una mayor fidelidad y es útil para la corrección de mutaciones puntuales ¹¹⁰. Esta *HDR* se produce gracias a la introducción en la célula del *ssODN*, que actúa como molde ¹¹¹. La eficiencia de corte de la nucleasa Cas9 se evaluó mediante el ensayo de la endonucleasa T7 ¹¹² y la inclusión del nucleótido de adenina en los mioblastos editados se confirmó mediante ensayo de *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Las células correctamente editadas se secuenciaron por el método de Sanger y se amplificaron para formar colonias homogéneas, según se describe en Soblechero-Martín 2021 ¹¹³. A partir de aquí, se seleccionaron siete de los clones editados correctamente, generados en paralelo, para continuar con su caracterización como parte del trabajo de la presente tesis (Fig. 7). Viendo que los resultados eran reproducibles entre los diferentes clones, se eligió uno para completar la caracterización.

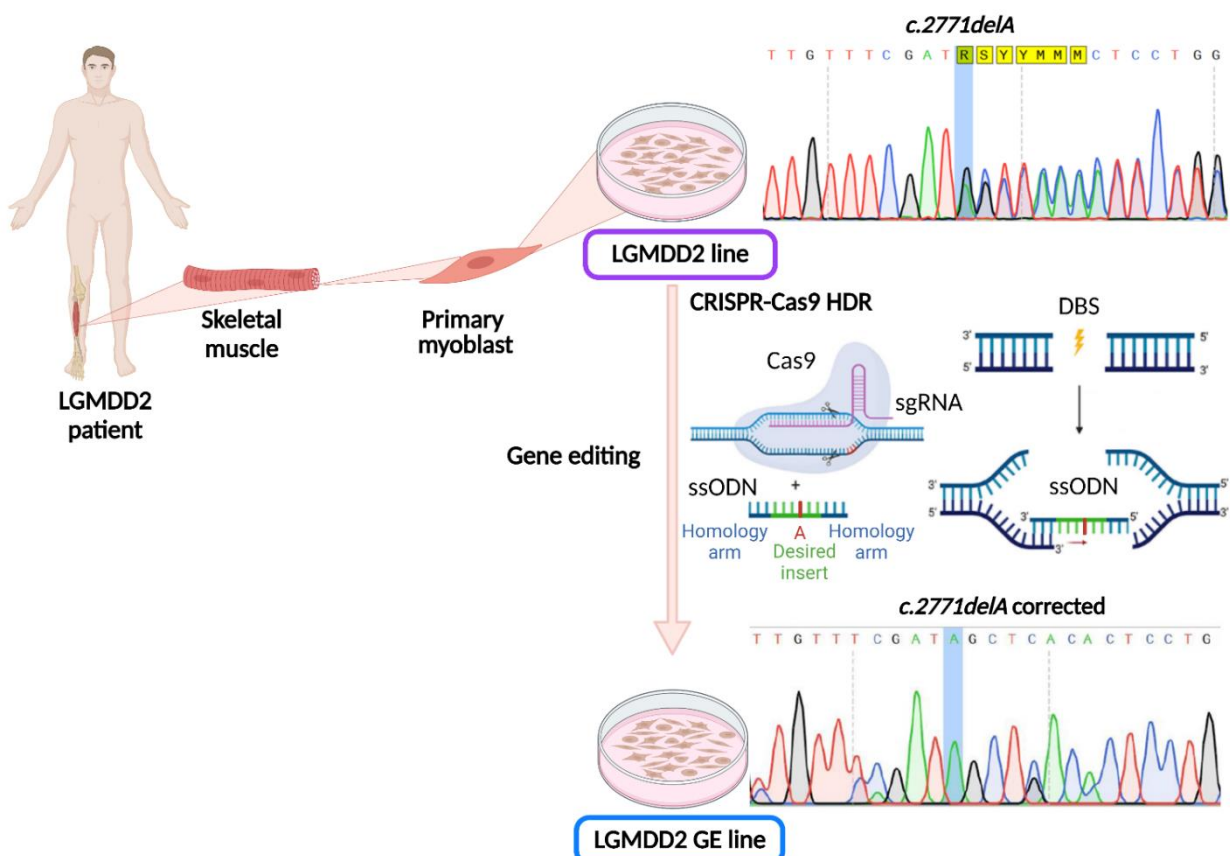


Figura 8. Representación del proceso de editado de mioblastos inmortalizados de LGMDD2. Los mioblastos inmortalizados de *LGMDD2* (LGMDD2 line) provienen de mioblastos primarios aislados a partir de una biopsia muscular de un paciente *LGMDD2*, que expresa la mutación *c.2771delA* en *TNPO3*. Esta línea fue corregida genéticamente mediante el sistema CRISPR-Cas9, utilizando un *ssODN* que incluye el nucleótido de A (LGMDD2 GE line). Imagen hecha con Biorender.com.

medio nutritivo estándar (columnas 2-11). Cada pocillo contenía un compuesto diferente: C1, C2, C3, C4, etc. En la columna 1 se sembraron moscas *sTNPO3wt* sin tratar (verde; *D42-Gal4>UAS-TNPO3wt, UAS-SMN2:luc; UAS-IR-Tnpo-SR*), en las columnas 2-11 moscas *sTNPO3mut* tratadas (amarillo; *D42-Gal4>UAS-TNPO3mut, UAS-SMN2:luc; UAS-IR-Tnpo-SR*) y en la columna 12 larvas *sTNPO3mut* sin tratar (azul).

1.6. Administración de compuestos al modelo celular de *LGMDD2*

Para realizar una validación de los fármacos *in vitro*, se trataron los mioblastos *LGMDD2* durante los 7 días de diferenciación con 5 dosis distintas de cada compuesto propuesto disuelto en el medio de diferenciación. Cada 2-3 días se refrescó el medio de diferenciación con cada dosis y compuesto. Los fármacos y dosis testadas se recogen en la Tabla 1, y todos fueron proporcionados por MedChemExpress.

Tabla 1. Compuestos y dosis administradas al modelo celular de *LGMDD2*

Compuestos	Dosis
C1	2.5 μ M; 500 nM; 100 nM; 20 nM; 4 nM
C2	3 μ M; 2 μ M; 1 μ M
C3	25 μ M; 2.5 μ M; 500 nM; 100 nM; 20 nM; 4 nM
C4	25 μ M; 2.5 μ M; 500 nM; 100 nM; 20 nM; 4 nM
C5	25 μ M; 2.5 μ M; 500 nM; 100 nM; 20 nM; 4 nM
C6	25 μ M; 2.5 μ M; 500 nM; 100 nM; 20 nM; 4 nM
C7	25 μ M; 12.5 μ M; 6.25 μ M; 2.5 μ M
C8	25 μ M; 2.5 μ M; 500 nM; 100 nM; 20 nM; 4 nM
C9	5 μ M; 3 μ M; 1 μ M; 200 nM; 40 nM; 8 nM

2. Metodología

2.1. Generación del anticuerpo anti-TNPO3mut

El anticuerpo anti-TNPO3mut se generó en la Unidad de Síntesis de Péptidos U3 del ICTS-NANBIOSIS, como parte del Servicio de Anticuerpos Personalizados CABS del IQAC-CSIC. Primero la unidad U3 de Nanbiosis sintetizó el bioconjugado TRAN-KLH(CUCCA) B4, a partir del péptido de los 15 aminoácidos extra CSHSCSVPVTQECLF. Tras su purificación por diálisis y caracterización mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, el servicio CABS utilizó el bioconjugado para inmunizar a tres conejos de la raza NEW ZEELAND (100 μ g/animal).

CABS dispone de un protocolo de inmunización bien establecido que incluye inoculaciones con adyuvante de Freud (primera inmunización con adyuvante completo y posteriores inmunizaciones con

Material y metodología

adyuvante incompleto). Para determinar el progreso de la respuesta inmune, se realizó un sangrado transcurridos 10 días desde la segunda inoculación para obtener el suero y determinar el título del anticuerpo mediante ELISA indirecto. Entre los controles se incluye la obtención de suero pre-inmune de los animales de experimentación obtenido de una sangría previa a la primera inyección. Durante 4 meses se realizaron 6 inmunizaciones y al final del proceso se procedió a la exanguinación completa del animal mediante un proceso quirúrgico bajo anestesia.

2.2. Métodos moleculares

2.2.1. *qRT-PCR* y *RT-PCR* semicuantitativa de músculo de mosca y mioblastos

Para la extracción de RNA total de las moscas modelo de *LGMDD2*, se homogenizaron 30 machos adultos de 15 días de edad, por triplicado, con TriReagent (Sigma-Aldrich). Para los mioblastos, se extrajo el RNA total de 1×10^6 células, por triplicado, utilizando el kit mini miRNeasy (QIAGEN). La pureza y la concentración del RNA se determinaron con un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

Para la retrotranscripción, primero se digirió 1 µg del RNA total de cada muestra con DNasa I (Roche) durante 20 min a 37 °C y después se inactivó con calor la DNasa durante 10 min a 75 °C. Seguidamente, se añadieron una mezcla de dNTPs y hexámeros (ThermoFisher Scientific) a las muestras digeridas y se incubaron durante 5 min a 65 °C para desnaturalizar el RNA. Por último, se utilizó Superscript II Reverse Transcriptase, DTT e inhibidor de RNasa (ThermoFisher Scientific) para la retrotranscripción. La *qRT-PCR* (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) se realizó con 2 ng de cDNA y EvaGreen qPCR mix plus (Solis BioDyne) y utilizando un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5 (Applied Biosystems). Se utilizaron como referencias endógenas en la mosca la expresión de los genes *Rp49* y *Tub48B*. Para los estudios en mioblastos humanos se usaron *GAPDH*, *GPI* y *HPRT1* como genes endógenos.

Para el análisis de *splicing* alternativo de *PKM*, se usaron 20 ng de cDNA en una reacción de *RT-PCR* semicuantitativa de 30 ciclos, realizada con polimerasa GoTaq (Promega) y una mezcla de dNTPs (ThermoFisher Scientific). Para este análisis se usó *GAPDH* como gen endógeno.

Las secuencias de los *primers* se recogen en la Tabla 2. Todos los experimentos se realizaron siguiendo las instrucciones de los fabricantes, e incluyeron tres réplicas biológicas y tres técnicas de cada muestra. Los niveles de expresión se normalizaron al gen de referencia utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ¹¹⁴.

Tabla 2. *Primers* usados en *qRT-PCR* y *RT-PCR* semicuantitativa

	<i>Primer</i>	<i>Secuencia (5' → 3')</i>
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Rp49 fwd</i>	GGATCGATATGCTAAGCTGTCGCACA
	<i>Rp49 rev</i>	GGTGCGCTTGTTTCGATCCGTAACC
	<i>Tub48B fwd</i>	CACTACACCATCGGCAAGGA
	<i>Tub48B rev</i>	GCAGACCGGGTGCACTGATC
	<i>TNPO3 fwd</i>	GAAAGGCCTGTGTGAAAAGC
	<i>TNPO3 rev</i>	CTCTGTCTGCCGAGATCACA
	<i>Tnpo-SR fwd</i>	TCCTGCAAGCTCCAGAAACT
	<i>Tnpo-SR rev</i>	TCAATCCAGTCGCACAGTTC
	<i>Atg4 fwd</i>	GCGCTCTTCGAGATCAGTCA
	<i>Atg4 rev</i>	CCTGCCGCTCTCTTCAACTA
	<i>Atg7 fwd</i>	CATAGCCTGTTACGCGCCGT
	<i>Atg7 rev</i>	CCGCTTGAATTCCGAGATTCCCGTC
	<i>Atg8a fwd</i>	ATCCAGACCGTGTGCCCGTCAT
	<i>Atg8a rev</i>	ACCGACGGTCAGGTCGGAAGG
	<i>Atg9 fwd</i>	CCACATCGAGGACCTTGACTC
	<i>Atg9 rev</i>	CCACTACAATCACTGTGAATCCG
	<i>Atg12 fwd</i>	TCGATGCCAGCGAGCAAATTTTCCT
	<i>Atg12 rev</i>	GCCCCACGCCTGATTCTTGCA
<i>Homo sapiens</i>	<i>GAPDH fwd</i>	CATCTTCAGGAGCGAGATC
	<i>GAPDH rev</i>	GTTACACCCATGACGAACAT
	<i>GPI fwd</i>	CAGGGCATCATCTGGGACAT
	<i>GPI rev</i>	TCTTAGCCAGCTGCTTTCCC
	<i>HPRT1 fwd</i>	TGACACTGGCAAAACAATGCA
	<i>HPRT1 rev</i>	GGTCCTTTTACCAGCAAGCT
	<i>TNPO3 fwd</i>	GAAAGGCCTGTGTGAAAAGC
	<i>TNPO3 rev</i>	CTCTGTCTGCCGAGATCACA
	<i>PKM fwd</i>	CTGAAGGCAGTGATGTCGCC
	<i>PKM rev</i>	ACCCGAGGTCCACGTCTC

2.2.2. *Western blot* de músculo de mosca y mioblastos

Para la extracción de proteína total en mosca, se homogeneizaron tres réplicas por genotipo de 30 tórax de machos adultos de 15 días de edad en tampón RIPA (Pierce, Thermo Scientific). En cuanto a los mioblastos, se homogenizaron 1×10^6 células por triplicado. Los homogenizados de mosca y células se mezclaron con un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Complete y PhosStop, Roche Applied Science) y se sonicaron sometiéndolos a 6 pulsos de 0.5 s y 60 Hz de frecuencia. La concentración de proteína total se midió a 562 nm utilizando el kit para cuantificar proteínas con BCA (Pierce, Thermo Scientific) y albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*, BSA) como proteína estándar.

Material y metodología

se desnaturalizaron 40 µg de proteína de mosca y 30 µg de proteína de mioblastos de cada muestra durante 5 min a 100 °C. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE al 12% por electroforesis y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm (Amersham Protran, GE Healthcare Life Sciences). Las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% en PBS-T (Na₂HPO₄ 8 mM, NaCl 150 mM, KH₂PO₄ 2 mM, KCl 3 mM, Tween 20 al 0.1%, pH 7.4) durante 1 h a temperatura ambiente (TA) y luego se incubaron durante toda la noche (*overnight*, ON) a 4 °C con los anticuerpos primarios en una solución de bloqueo al 5%. Todas las diluciones de anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas en mosca y en mioblastos se recogen en la Tabla 3. Tras tres lavados con PBS-T, las membranas se incubaron 1 h a TA con las diluciones adecuadas de anticuerpos secundarios. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron el anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo ambos conjugados con peroxidasa de rábano picante hechos en cabra (1:3500 y 1:5000, respectivamente, Sigma-Aldrich). Después de tres lavados, las bandas inmunorreactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia utilizando ECL Western blotting Substrate o SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Pierce, Thermo Scientific). Las imágenes se adquirieron en un Amersham ImageQuant 800 (GE Healthcare Life Sciences). La cuantificación de las proteínas de interés se realizó mediante el software ImageJ (NIH).

Tabla 3. Anticuerpos primarios usados en *western blot*

Anticuerpo	Dilución	Referencia, proveedor
Anti-TNPO3	1:50	Ab54353, Abcam
Anti-HA	1:100	H3663, Sigma-Aldrich
Anti-GFP	1:1000	11814460001, Roche
Anti-α-tubulin	1:500	12G10, Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-TNPO3mut	1:1000	Generado en la presente tesis
Anti-ATG7	1:1000	2631S, Cell Signaling Technology
Anti-LC3B	1:2000	Ab51520, Abcam
Anti-P62	1:1000	Ab56416, Abcam

2.3. Tinciones histoquímicas, cuantificación de reporteros e inmunofluorescencias

2.3.1. Tinciones de los músculos de mosca

Para cuantificar el área de los *IFM* se diseccionaron las moscas y se siguió el protocolo descrito en Selma-Soriano 2018 ¹¹⁵. Brevemente, se fijaron seis tórax de hembras adultas de cada genotipo, de 7 y 15 días de edad, con OsO₄. Tras deshidratar las muestras fijadas, se embebieron en resina epoxi y, una vez seca la resina, se realizaron secciones transversales semifinas de 1.5 µm de cada mosca utilizando el ultramicrotomo Reichert Jung Ultracut (Leica Microsystems). Las secciones se tiñeron con

azul de toluidina para mejorar el contraste y se montaron con DPX (PanReac AppliChem). Las imágenes se tomaron con un aumento de 100x utilizando un microscopio Leica DM2500 (Leica Microsystems). Se tomaron seis imágenes de *IFM* por mosca y se convirtieron en imágenes binarias para cuantificar el área muscular. Se utilizó el software ImageJ (NIH) para cuantificar el porcentaje de píxeles correspondientes al tejido muscular (*IFM*, píxeles negros) del total.

Para la tinción de los músculos abdominales, se realizó un corte en cada mosca que permite exponer el corazón y los músculos abdominales desde la parte dorsal (descrito anteriormente en Selma-Soriano 2018 ¹¹⁶). Se diseccionaron 6 moscas hembra de 15 días de edad por genotipo, se fijaron con PFA al 4% 20 min en agitación, se lavaron tres veces con PBS-T (PBS con 0.3% Triton X-100) y se tiñeron durante 1 h en oscuridad con isotiocianato de faloidina-tetrametilrodamina B (1:1000, Sigma-Aldrich) preparado en PBS-T. Tras tres lavados con PBS, se montaron en portaobjetos con medio de montaje de fluorescencia (Dako). Las imágenes se tomaron con un aumento de 100x utilizando un microscopio confocal LSM800 (Zeiss). Utilizando el software ImageJ (NIH), se realizaron tres mediciones del ancho de cada fibra A4: una en cada extremo de la fibra y otra entre esos dos puntos. Se cuantificaron las cinco fibras A4 más cercanas al corazón de cada mosca.

2.3.2. Detección del reportero *GFP:Atg8a* en músculo de mosca

La detección de *GFP:Atg8a* se realizó como se describe en Bargiela 2019 ¹¹⁷. Concretamente, en este trabajo se diseccionaron los tórax de entre cuatro y ocho moscas hembra de 15 días de edad y se fijaron en PFA al 4% a 4 °C ON. Posteriormente, el tejido se incubó en sacarosa al 30% durante dos días a 4 °C. A continuación, los tórax se embebieron en el reactivo Optimal Cutting Temperature (OCT, Tissue-Tek, Sakura Europe) y se obtuvieron criosecciones longitudinales de 10 µm utilizando un criostato Leica CM 1510S (Leica Microsystems). Las imágenes se adquirieron con un aumento de 400x usando un microscopio confocal LSM800 (Zeiss). La cuantificación de la señal correspondiente a GFP en las imágenes se realizó mediante el software ImageJ (NIH). Brevemente, se delimitó el área de una región completa del músculo en cada micrografía adquirida, se obtuvo la densidad integrada del canal verde y se normalizó frente al área muscular. De cada mosca se analizaron tres imágenes, correspondientes a tres campos diferentes del tórax de la mosca.

2.3.3. Tinción de lisosomas en músculo de mosca y mioblastos

La tinción de lisosomas de músculo de mosca se realizó preparando el tejido como se describe en Hunt 2013 ¹¹⁸. Para la tinción en células, se sembraron 2.5×10^4 mioblastos por pocillo en placas de 24 pocillos y se diferenciaron durante 7 días. Tanto los tórax de mosca como los mioblastos, ambos sin fijar, se incubaron durante 30 min a 37 °C con 100 nM de *LysoTracker* RED-DND99 (Invitrogen).

Material y metodología

Después de tres lavados con PBS, las muestras se incubaron con PFA al 4% durante 20 min a TA, se lavaron tres veces con PBS y se montaron con medio de montaje de fluorescencia que contenía *DAPI* (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vectashield, Vector Laboratories). Se tomaron imágenes representativas de los tejidos marcados y de los mioblastos con un aumento de 400x utilizando un microscopio confocal LSM800 (Zeiss).

2.3.4. Tinciones inmunofluorescentes en mioblastos

Para todas las inmunodetecciones en mioblastos, se sembraron 2.5×10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos. Las células se fijaron con PFA al 4% durante 15 min en los días 0 y/o 7 de diferenciación. Todas las diluciones de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para las tinciones se recogen en la Tabla 4.

Para la detección de TNPO3, los mioblastos fijados se permeabilizaron durante 5 min con PBS-T (0.2% Triton X-100 en PBS). Después de tres lavados con PBS, las células se bloquearon [PBS, BSA al 1%, suero normal de cabra al 1% (*normal goat serum*, NGS)] durante 1 h a TA y se incubaron con el anticuerpo primario ON a 4 °C. Después de tres lavados con PBS, las células se incubaron durante 1 h a 37 °C con el anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor Plus 594 disuelto en tampón de bloqueo. Finalmente, las células se lavaron tres veces de nuevo con PBS y se montaron.

Para la inmunodetección de Desmina y MHC, los mioblastos fijados se lavaron tres veces con PBS-T (0.1% Triton X-100 en PBS), se bloquearon (PBS-T, 1% BSA, 1% NGS) durante 1 h a TA y luego se incubaron ON a 4 °C con los anticuerpos primarios disueltos en tampón de bloqueo. Después de tres lavados con PBS-T, las células se incubaron durante 2 h a TA con los anticuerpos secundarios de conejo y de ratón, respectivamente, ambos diluidos en tampón de bloqueo. Después de un triple lavado con PBS, se montaron las células.

La inmunodetección de LC3B se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito en Sabater-Arcis 2021 ¹¹⁹. Tras fijar los mioblastos de 7 días de diferenciación, se permeabilizaron con metanol al 100% durante 15 min a -20 °C y se bloquearon (PBS, 0.5% BSA, 1% NGS) durante 1 h a TA. Después las células se incubaron ON a 4 °C con el anticuerpo primario disuelto en tampón de bloqueo. Tras tres lavados con PBS, las células se incubaron 2 h a TA con el anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 594. Finalmente, las células se volvieron a lavar tres veces con PBS y se montaron.

Todas las muestras se montaron con medio de montaje *DAPI* (Vector Laboratories) para detectar los núcleos de las células. Las imágenes se tomaron con un aumento de 200x, para la

inmunodetección de Desmina y MHC, y con un aumento de 400x para la tinción de TNPO3 y LC3B utilizando un microscopio confocal LSM800 (Zeiss).

Tabla 4. Anticuerpos usados en inmunofluorescencia

Anticuerpo	Dilución	Referencia, proveedor
Anti-TNPO3	1:200	Ab71388, Abcam
Anti-Desmin	1:200	Ab15200, Abcam
Anti-MHC	1:50	MF20, Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-LC3B	1:200	Ab51520, Abcam
Anti-IgG rabbit Alexa Fluor Plus 594 (H+L)	1:200	A32740, ThermoFisher Scientific
Anti-IgG mouse Alexa Fluor Plus 488 (H+L)	1:200	A32723, ThermoFisher Scientific

El índice de fusión, el diámetro de los miotubos y los puntos de LC3B se cuantificaron según el método descrito en Sabater-Arcis 2020 y 2021^{119,120}. Brevemente, el índice de fusión se definió como el porcentaje de núcleos dentro de los miotubos (> 2 micronúcleos) respecto al número total de núcleos en cada condición. El diámetro de los miotubos se midió en 5 puntos a lo largo de todo el tubo y se calculó el diámetro medio por micrografía. La cuantificación de puntos LC3 se realizó utilizando el software Iqdotmeter¹²¹, siguiendo las recomendaciones de los autores. Los puntos LC3 totales por imagen se normalizaron en relación con el área total medida de todos los miotubos observados en cada imagen. El porcentaje de núcleos dentro de los miotubos teñidos con MHC (núcleos MHC positivos o núcleos MHC⁺) se midió en relación con el número total de núcleos en cada condición. Se analizaron un total de 15-20 imágenes por condición. Todas estas cuantificaciones se realizaron utilizando el software ImageJ (NIH).

2.3.5. Detección de los reporteros *mCherry-eGFP* en mioblastos

Para el ensayo de los dos reporteros *mCherry-eGFP* se sembraron, en paralelo, 2.5×10^4 mioblastos inmortalizados por pocillo en placas de 24 pocillos. A las 48 h de la diferenciación, los mioblastos se transfectaron transitoriamente con 1 μ g de *pDest-mCherry-eGFP-LC3B* o *pDest-mCherry-eGFP-P62* (plásmidos proporcionados por el Prof. Fuentes, Universidad de Extremadura) usando el reactivo de transfección de DNA HP X-tremeGENE (Roche Life Science) diluido en Opti-MEM (Gibco). La transfección de los mioblastos se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante durante 24 h. Luego se reemplazó el medio de diferenciación y, tras 48 h, los mioblastos se visualizaron *in vivo* en placas utilizando un microscopio confocal LSM800 (Zeiss) con un aumento de 400x. En el caso del control con cloroquina (CQ), los mioblastos se incubaron con CQ a 10 μ M durante 16 h antes de su visualización.

Material y metodología

2.4. Estudios funcionales de las moscas

2.4.1. Análisis de la capacidad del vuelo

Los análisis de vuelo de mosca se llevaron a cabo siguiendo el protocolo detallado en Babcock 2014 ¹²². Se utilizaron entre 80–100 moscas macho de 15 días de edad por genotipo, separados en 4 tubos. Los tubos se dejaron caer sobre un embudo colocado en la parte superior de un cilindro (25 cm de diámetro y 90 cm de altura), cuyo interior estaba forrado con una lámina de plástico untada con pegamento para insectos (Tangle-Trap insect trap coating) de manera uniforme. Terminado el ensayo por genotipo, la lámina se retiró del cilindro y se tomó una fotografía con una cámara convencional. Mediante el software ImageJ (NIH) se analizó la altura de vuelo de cada mosca por genotipo.

2.4.2. Análisis de la capacidad de escalada

Para evaluar la velocidad de escalada se realizó una prueba de geotaxis negativa, siguiendo el protocolo descrito en Bargiela 2019 ¹¹⁷. Concretamente, se utilizaron entre 25-30 moscas macho de 15 días de edad por cada genotipo. Después de 24 h sin anestesia (CO₂), las moscas se transfirieron a pipetas desechables (1.5 cm de diámetro y 25 cm de altura) en tres grupos. Tras esperar unos minutos de habituación al nuevo espacio, se empezó la grabación con una cámara convencional y se dieron ligeros y repetidos golpes para que todas las moscas cayesen al fondo del tubo. La altura de escalada se analizó para cada mosca durante un período de 10 s, utilizando el software Aegisub.

2.5. Estudios de viabilidad de las moscas

2.5.1. Análisis de la longevidad de las moscas

Se recolectaron 100 moscas macho recién nacidas por genotipo y se distribuyeron en 4 tubos que contenían medio nutritivo estándar. Se mantuvieron a 29 °C y se transfirieron a tubos con medio nutritivo fresco cada dos-tres días. El número de individuos muertos se cuantificó diariamente. Las curvas de supervivencia se obtuvieron utilizando el método de *Kaplan-Meier*, y las comparaciones estadísticas de las curvas se llevaron a cabo de acuerdo con el análisis de *log-rank (Mantel-Cox)* ($\alpha = 0.05$).

2.5.2. Cuantificación de moscas eclosionadas

Se sembraron entre 25-30 larvas de primer/segundo estadio en tubos que contenían medio estándar. Las larvas se mantuvieron a 29 °C hasta que se completó su desarrollo larvario. A los 6 días se contabilizó el número de pupas y a los 10 días el número de adultos nacidos en cada tubo.

2.6. Ensayo de luminiscencia en moscas

El ensayo de luminiscencia se realizó para el rastreo de compuestos en *Drosophila*, con las moscas nacidas en las placas preparadas que contenían un fármaco diferente por pocillo (Fig. 8). A los 3 días de edad, las placas que contenían las moscas se congelaron a -20 °C. Después se recogieron las moscas de cada pocillo, por separado, y se homogenizaron con 100 µl de tampón de lisis (Steady-Glo Luciferase Assay System; Promega). Se transfirieron 50 µl de cada homogenizado en una placa blanca de 96 pocillos y se añadieron 20 µl de luciferina Steady-Glo® Reagent (Steady-Glo Luciferase Assay System; Promega). Las placas se incubaron en oscuridad 30 min a TA en agitación y se midió la señal de luminiscencia a 570 nm con un lector de microplacas (Infinite M200 Pro, TECAN).

2.7. Estudio del perfil STR

Para el estudio del perfil de *STR* (*short tandem repeats*), se extrajo el DNA genómico de 1×10^6 mioblastos *LGMDD2* primarios e inmortalizados, utilizando el mini kit QIAamp DNA (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El experimento fue realizado por la empresa STABVIDA. Brevemente, se secuenciaron 100 ng/µl de DNA mediante PCR multiplex utilizando el kit Powerplex 16 loci (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Los 16 *loci* analizados están en la Fig. 20 y los resultados fueron analizados por GeneMarker HID v1.75.

2.8. Estudio de la proliferación de mioblastos

Para el ensayo de proliferación celular se sembraron 5×10^3 mioblastos inmortalizados por pocillo en placas de 96 pocillos. Las células se incubaron a 37 °C en una cámara humidificada con 5% CO₂ durante 24, 48, 72 y 96 h en medio de cultivo estándar. Se añadieron 20 µl de una mezcla de solución de compuesto de tetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, *MTS*) y un reactivo de acoplamiento de electrones (metosulfato de fenazina) a cada pocillo, que contenía 100 µl de medio, y se incubó durante 4 h. La conversión de *MTS* en formazán soluble tiene una absorbancia a 490 nm que se puede medir y es directamente proporcional al número de células vivas en cada pocillo (ensayo de proliferación celular no radiactivo acuoso CellTiter 96, Promega). La absorbancia se midió utilizando un lector de placas Infinite 200 PRO (Tecan Life Sciences).

2.9. Estudio de transcriptómica y proteómica de mioblastos

Para el *RNA-seq* (*RNA sequencing*), se extrajo y cuantificó el RNA de los mioblastos inmortalizados diferenciados durante 7 días, por triplicado, tal y como se explica en el apartado 2.2.1.

Material y metodología

La secuenciación de 7 µg de RNA la realizó la empresa Novogene, utilizando la plataforma Illumina NovaSeq 6000. Esta tecnología está basada en secuenciación por síntesis con nucleótidos marcados con fluorocromos y terminadores reversibles, permitiendo así una secuenciación masiva y paralela en millones de fragmentos de DNA. Por un lado, se secuenciaron los longRNAs, que engloban mRNAs, *long non-coding RNAs* y *circular RNAs*, realizando 30G de lecturas de extremos emparejados por muestra. Además, se secuenciaron los miRNAs, generando 20M de lecturas por muestra desde un único extremo.

El análisis de los datos transcriptómicos obtenidos fue realizado por el bioinformático Jorge Espinosa Espinosa, doctorando del grupo de Genómica Traslacional. Para el análisis de longRNAs, las secuencias FastQ se mapearon con Genome Reference Consortium Human Build 38 (GRCh38.p13). La identificación y cuantificación de los miRNAs se realizó mediante el conjunto de análisis de RNAs sRNAtoolbox¹²³. Se utilizaron sRNAbench con la base de datos de miRNAs humanos miRBase 22.1 y el ensamblaje humano GRCh38_p13. La expresión diferencial de los RNAs y miRNAs se calculó utilizando el software R (versión 3.6.3) con edgeR¹²⁴. Todos los datos analizados están disponibles públicamente en el repositorio *Gene expression omnibus* (GEO) con número de acceso GEO: GSE198551.

El análisis proteómico de los mioblastos inmortalizados fue llevado a cabo por el servicio de Proteómica del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental de la Universitat de València (SCSIE). Se extrajo y cuantificó la proteína total de mioblastos de 7 días de diferenciación, siguiendo la explicación del apartado 2.2.2. Se analizaron 5 réplicas de 60 µg de proteína de cada condición. El análisis se realizó mediante la técnica *SWATH-MS* (*sequential window acquisition of all theoretical fragment ion mass spectra*). *SWATH-MS* es un método de adquisición independiente de datos que genera mapas de proteínas globales y cuantitativos. Brevemente, se fragmentan de manera sistemática y sin sesgos todos los péptidos ionizados de cada muestra dentro de un intervalo de masa (*m/z*) y esta adquisición de datos independientes es analizada en combinación con la librería de datos específicos generada previamente¹²⁵. Los datos del análisis de la expresión diferencial de la proteómica están recogidos en el Anexo de la presente tesis.

El análisis de expresión diferencial del *RNA-seq* y de la proteómica se explica en el siguiente subapartado de estadística. Identificados los RNA y proteínas con expresión significativamente diferente, se realizaron los análisis de la anotación funcional. Concretamente, para los datos transcriptómicos se realizó un análisis de sobrerrepresentación (*over-representation analysis, ORA*), agrupando las rutas según la clasificación de *Gene ontology* (GO). La anotación funcional de los datos proteómicos se realizó con la base de datos STRING¹²⁶, agrupando las rutas según la clasificación de Kegg.

2.10. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 9. Los diagramas de dispersión con barras representan los resultados de cada experimento, normalizados a los datos del grupo control respectivo. Los puntos de datos corresponden a los valores individuales en cada condición. Los tamaños de muestra (n) se incluyen en las leyendas de las figuras. En todos los estudios moleculares, para la comparación de medias de datos normalizados, asumimos que todos los parámetros seguían una distribución normal. Para las comparaciones de dos condiciones, se aplicó la prueba t de *Student* de dos colas ($\alpha = 0.05$) y la corrección de *Welch* cuando fue necesario. Para las comparaciones múltiples, los datos normalizados se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher de la prueba ANOVA unidireccional ($\alpha = 0.05$). La significación estadística se fijó en un *P*-valor < 0.05 .

Los gráficos tipo volcán representan los resultados del rastreo de fármacos en mosca, el RNA-seq y la proteómica de los mioblastos. Cada punto representa la media de medidas de luminiscencia de las moscas modelo tratadas con cada compuesto, o de la expresión de un RNA, miRNA o una proteína en los mioblastos derivados de paciente. Todas las medias fueron previamente normalizadas respecto a las medias del grupo control respectivo, obteniéndose así el *fold change* (FC) de cada media. Para el análisis estadístico del rastreo y de la proteómica, se realizó una prueba t multiple con las medias de cada condición, para obtener los *P*-valor ajustados con la corrección del *False Discovery Rate* (FDR) fijada al 5%, según el método de Benjamini-Hochberg. A partir de un $|\log_2 FC| > 0$ y un $FDR < 0.05$ se consideró que los compuestos mejoraban o empeoraban el fenotipo de luminiscencia, o las proteínas estaban expresadas al alza o baja de forma significativa.

Para el análisis estadístico del RNA-seq, realizado por Jorge Espinosa, se utilizó la prueba empírica F de cuasi verosimilitud de Bayes. Luego, los recuentos normalizados se transformaron a su FC con sus estadísticas asociadas (*P*-valor y FDR). Los genes con un $|\log_2 FC| > 1$ y un $FDR < 0.05$ se consideraron expresados, mínimo, dos veces más o dos veces menos que el control de forma significativa.

RESULTADOS

Objetivo 1: Desarrollar y caracterizar un modelo experimental de LGMDD2 en *Drosophila melanogaster*

1. Generación del modelo de LGMDD2 en *Drosophila*

Debido a la naturaleza dominante de la *LGMDD2*, en un primer momento planteamos la hipótesis de que la sobreexpresión de la versión humana de la proteína TNPO3mut podría ser suficiente para desencadenar en la mosca defectos musculares propios de la patología. Para ello, se generaron dos líneas de *Drosophila* transgénicas: una expresaba un transgén con la versión mutante *c.2771delA* del *TNPO3* humano (*UAS-TNPO3mut*), y otra expresaba la versión humana de tipo normal (*UAS-TNPO3wt*) como control. Cada transgén se insertó en el mismo sitio attP, attp40, en el cromosoma 2 para estandarizar los efectos de posición. Esta posición genómica fue seleccionada porque promueve altos niveles de expresión¹⁰⁵. Dado que *LGMDD2* es una miopatía, primero dirigimos la expresión de ambos transgenes a los músculos de *Drosophila*, mediante el sistema Gal4/UAS, usando el *driver* específico de músculo *MHC-Gal4*.

Para comprobar que los transgenes *TNPO3* estaban correctamente integrados, detectamos la expresión de ambas proteínas en el tórax de mosca mediante *western blot* con anti-TNPO3 y anti-HA, aprovechando la etiqueta fusionada al cDNA humano de la transportina (Fig. 10). En moscas *MHC>TNPO3mut*, el tamaño de la banda detectada fue ligeramente mayor que en moscas *MHC>TNPO3wt*, en consonancia con la extensión C-terminal de 15 aminoácidos generada por la mutación en los pacientes con *LGMDD2*. De acuerdo con la especificidad de los dos anticuerpos, las moscas control que no expresaban el transgén humano de la TNPO3 (moscas *MHC>GFP*) no eran inmunorreactivas. Es importante destacar que la cuantificación de los resultados reveló una cantidad significativamente mayor de TNPO3 en las moscas *MHC>TNPO3mut* respecto a las moscas *MHC>TNPO3wt*, lo que sugiere o bien que el mRNA mutante o la proteína son más estables, o que el mRNA mutante se traduce de manera más eficiente.

Resultados

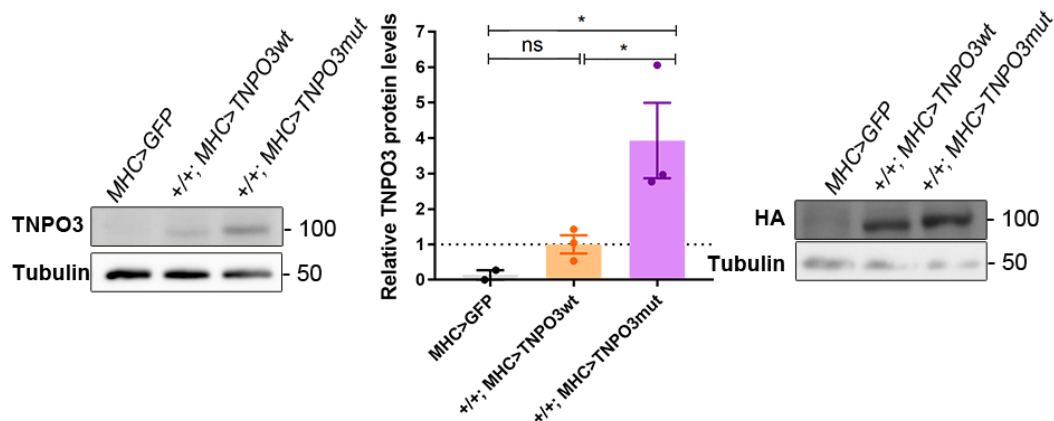


Figura 10. Expresión de la mutación de *TNPO3* causante de *LGMDD2* en *Drosophila melanogaster*. Membranas de western blot representativas y cuantificación de TNPO3 humana y HA realizadas con extractos de proteínas de tórax de moscas control (*MHC-Gal4>UAS-GFP*), moscas que expresan TNPO3 de tipo normal (*MHC-Gal4>UAS-TNPO3wt*) o TNPO3mut (*MHC-Gal4>UAS-TNPO3mut*). Se usó α -tubulina como control endógeno para normalizar los niveles de proteína ($n=3$). Los pesos moleculares, en kDa, de cada proteína detectada se marcan a la derecha de las membranas. El gráfico de barras muestra las medias relativas al control $\pm$ SEM. ns: no significativo, *: $p < 0.05$, según prueba t de Student.

Tras confirmar la expresión de la TNPO3 humana en las moscas transgénicas, estudiamos los principales fenotipos relacionados con la *LGMDD2*: locomoción, longevidad y atrofia muscular. Concretamente vimos que la expresión de *TNPO3mut* en el músculo afectaba a la locomoción de las moscas, ya que tenían la capacidad de escalada y vuelo significativamente reducida respecto a las moscas que expresaban *TNPO3wt* (Fig. 11A, B). Además, también se observó una afectación de la vida mediana de las moscas *MHC>TNPO3mut*, que vivían 24 días respecto a los 29 días que vivían las moscas *MHC>TNPO3wt* (Fig. 11C). Sin embargo, la expresión de *TNPO3mut* no produjo una reducción significativa del área de los *IFM*, indicativo de atrofia muscular, en las moscas en comparación con las moscas *MHC>TNPO3wt* de 1, 3 o 4 semanas (Fig. 11D-F), siendo este un fenotipo crítico en pacientes con *LGMDD2*. Los *IFM* son músculos fibrilares con una organización de sarcómeros muy similar a los humanos, ampliamente utilizados para reproducir la atrofia muscular asociada con las enfermedades musculares humanas¹²⁷. En paralelo también se dirigió la expresión del transgén *TNPO3mut* a las motoneuronas de mosca, mediante el *driver D42-Gal4*, ya que algunos pacientes de *LGMDD2* mostraron síntomas relacionados con el sistema nervioso¹². Cabe mencionar que el *driver D42-Gal4* también se expresa en el sistema nervioso periférico, incluidas las neuronas sensoriales de la pared corporal¹²⁸. Sin embargo, tampoco se observó atrofia muscular de los *IFM* de moscas de dos semanas de edad que expresaban *TNPO3mut* en motoneuronas (Fig. 11G). Por lo tanto, la expresión de *TNPO3mut* parecía ser insuficiente para inducir fenotipos característicos de *LGMDD2* en *Drosophila*.

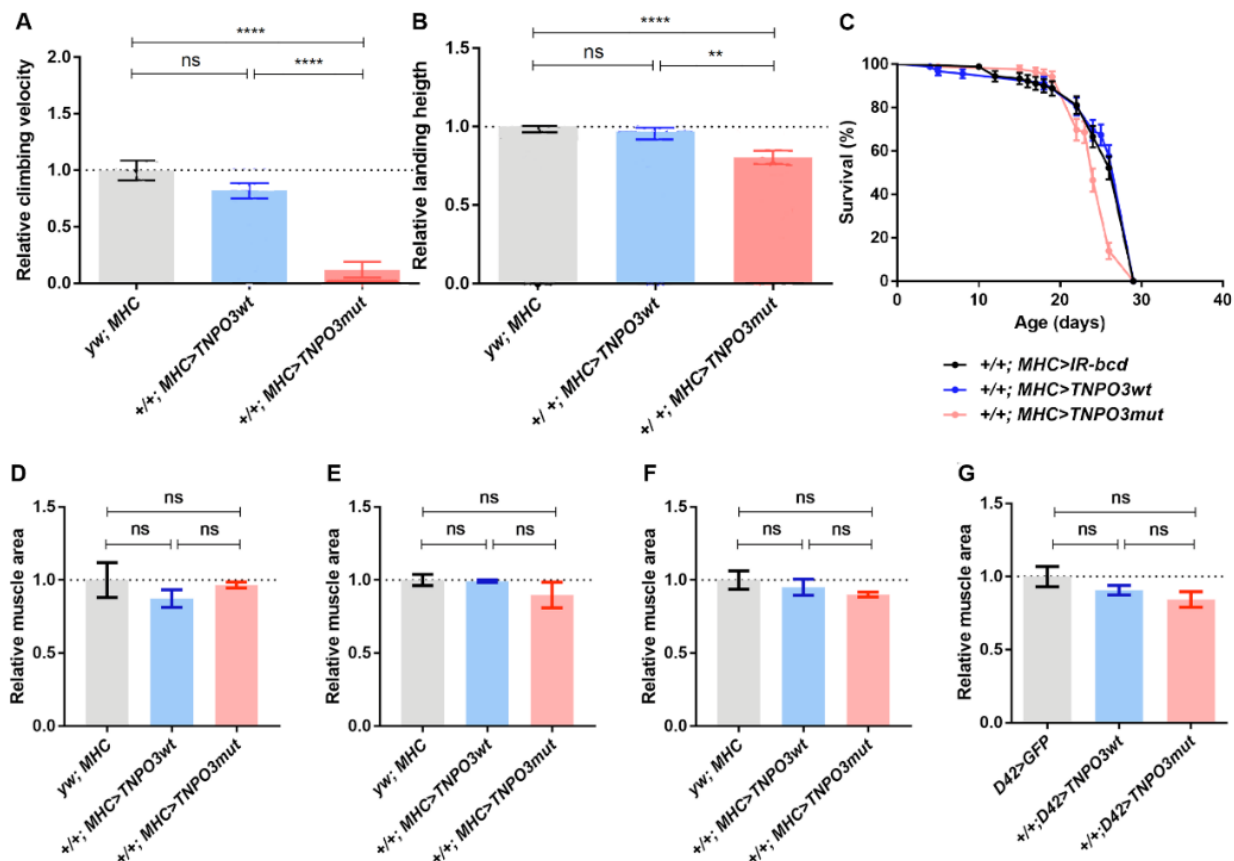


Figura 11. Fenotipos similares a *LGMDD2* estudiados en *Drosophila*. (A) Cuantificación de la velocidad de escalada como la media de la velocidad $\pm$ SEM ($n = 30$) comparando el control (gris; *yw; MHC*) y moscas que expresan *TNPO3wt* humano (azul; *+/+; MHC>TNPO3wt*) o *TNPO3* mutante (rosa; *+/+; MHC>TNPO3mut*) bajo el control del *driver MHC-Gal4* en un fondo de tipo normal para el gen endógeno *Tnpo-SR* (indicado como "*+/+*"). (B) Los gráficos de los ensayos de vuelo representan la distancia promedio de aterrizaje alcanzada en los grupos experimentales descritos en A ($n = 100$). (C) Las curvas de supervivencia se expresan como porcentajes de moscas vivas en cada punto temporal ($90 < n < 100$). (D-F) Cuantificación relativa del porcentaje medio del área muscular de los *IFM* de las moscas de los mismos genotipos anteriores. El estudio se realizó en individuos de 1 (D), 3 (E) o 4 (F) semanas de edad ($n = 6$). (G) Misma cuantificación que en D-F en moscas que expresan los transgenes en motoneuronas, bajo el control del *driver D42-Gal4*, en moscas de 2 semanas de edad. Los gráficos de barras muestran medias relativas al genotipo control $\pm$ SEM. ns: no significativo, **: $p < 0.01$, ****: $p < 0.0001$ según prueba t de Student.

Nuestra hipótesis sobre la falta de atrofia muscular fue que podría deberse a que las moscas tienen un homólogo funcional de *TNPO3*, *Tnpo-SR*⁵⁵, que podría estar rescatando la patogenicidad de la expresión de *TNPO3mut*. Para comprobar nuestra hipótesis, generamos dos líneas de *Drosophila* que contienen simultáneamente los transgenes *TNPO3wt* o *TNPO3mut* y una construcción de interferencia de *Tnpo-SR*¹²⁹. Estas líneas las abreviamos como *sTNPO3wt* y *sTNPO3mut*, indicando silenciamiento del endógeno con una "s". Las moscas *sTNPO3wt* sirven como control tanto para los efectos de la sobreexpresión de la transportina humana, como para los efectos del silenciamiento de la transportina de mosca. Para confirmar el silenciamiento de *Tnpo-SR*, cuantificamos los niveles del

Resultados

gen en moscas que expresan el RNAi bajo el control del *driver MHC-Gal4* y confirmamos alrededor del 50% del silenciamiento (Fig. 12A). Además, comprobamos que la construcción interferente funciona ya que la supervivencia de las moscas con el gen silenciado mostró una disminución significativa respecto a las moscas control. Al mismo tiempo, la vida media de las moscas silenciadas era un tercio menor respecto a la de las moscas control (10 y 29 días, respectivamente) (Fig. 12B).

Utilizamos las líneas *sTNPO3wt* y *sTNPO3mut* generadas para dirigir la expresión de los transgenes, sobre el fondo sensibilizado, en músculo de mosca con el *driver MHC-Gal4*. Lo primero que observamos fue que la expresión de *TNPO3mut* en un fondo sensibilizado aumentó los niveles de transcripción y proteína en el músculo de la mosca en comparación con las moscas *sTNPO3wt* (Fig. 12C, D). Para comprobar que la mutación *LGMD2* conducía a esta acumulación de TNPO3 en las moscas modelo, inhibimos la síntesis de mRNA tratando moscas con actinomicina D (ActD). Brevemente, ActD es un fármaco que se une al DNA a través de los residuos de guanina, actuando como inhibidor de la síntesis de RNA dependiente de DNA ¹³⁰. El tratamiento con ActD de moscas modelo *LGMD2* redujo drásticamente TNPO3 a nivel de transcripción y proteína (Fig. 12E, F), lo que sugiere que la mutación *LGMD2* podría estar favoreciendo la acumulación de TNPO3 a nivel de transcrito y proteína.

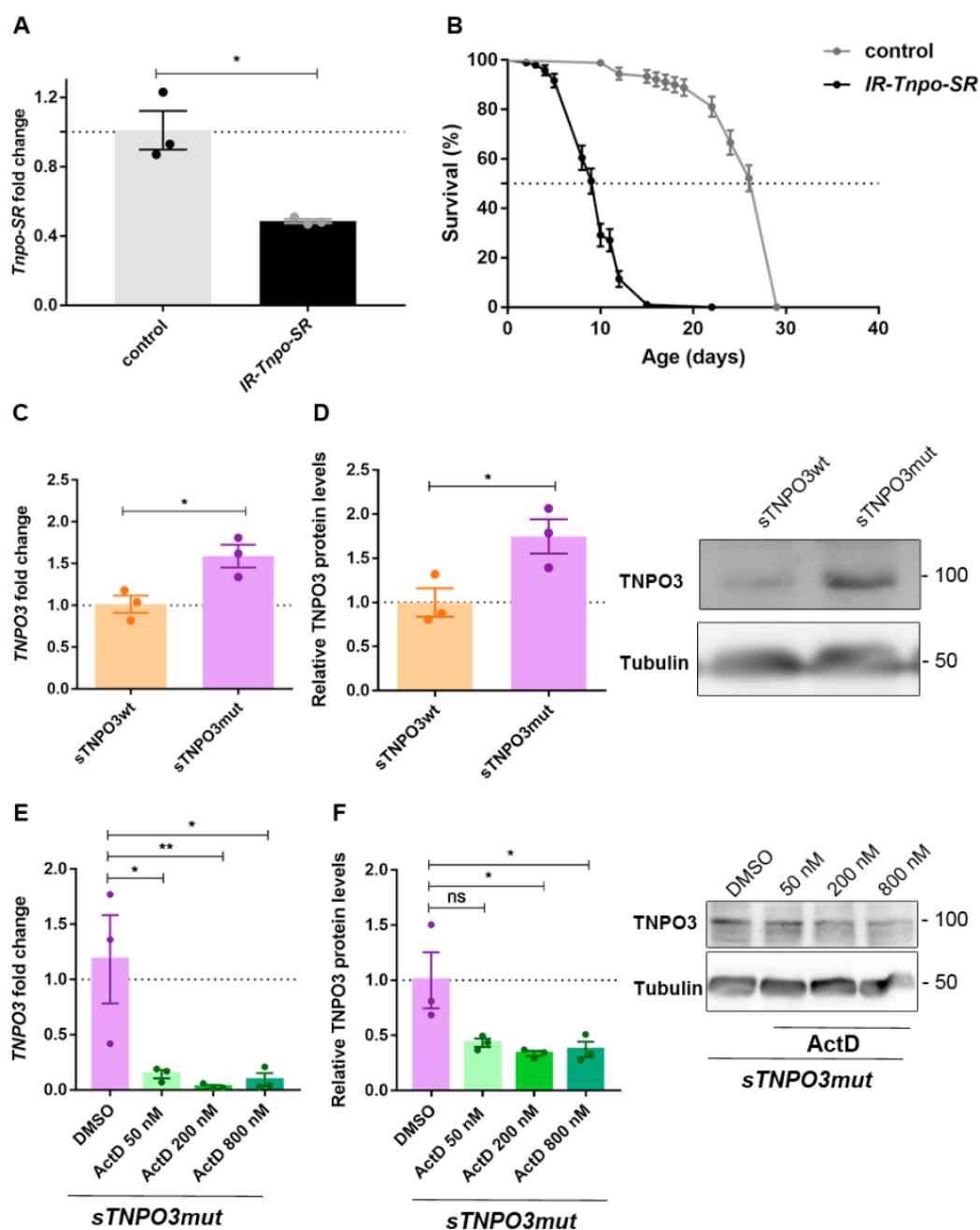


Figura 12. La mutación causante de *LGMD2* aumenta la expresión de *TNPO3* en un fondo sensibilizado de *Drosophila*. (A) Cuantificación por *qRT-PCR* de la expresión relativa de *Tnpo-SR* respecto a la del gen constitutivo *Tub48B*, en moscas control (*MHC-Gal4>UAS-IR-bcd*) y en moscas que expresan RNAi para *Tnpo-SR* bajo el driver *MHC-Gal4* (*MHC-Gal4>UAS-IR-Tnpo-SR*) ($n = 3$). (B) Curvas de supervivencia expresadas como porcentajes de moscas vivas de los mismos genotipos que en (A) ($90 < n < 100$). (C) Cuantificación por *qRT-PCR* de la expresión de *TNPO3* respecto a la del gen constitutivo *Tub48B* y *Rp49* en moscas *sTNPO3wt* (naranja; *MHC-Gal4>UAS-TNPO3wt*; *UAS-IR-Tnpo-SR*) y *sTNPO3mut* (morado; *MHC-Gal4>UAS-TNPO3mut*; *UAS-IR-Tnpo-SR*) y (E) en moscas *sTNPO3mut* alimentadas con DMSO al 0.1% como vehículo o con las concentraciones indicadas de ActD durante 15 días. (D, F) Membranas representativas de *western blot* y cuantificación de la *TNPO3* humana en extractos de tórax de moscas con los genotipos de (C) y (E). En ambos casos se usó α -tubulina como control endógeno para normalizar los niveles de proteína. El tamaño del peso molecular se indica en kDa ($n = 3$). Los gráficos de barras muestran las medias relativas a sus respectivos controles $\pm$ SEM. ns: no significativo, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, según prueba t de Student.

Resultados

2. La expresión de *TNPO3mut* dirigida al músculo o a las motoneuronas de *Drosophila* provoca atrofia y degeneración muscular

La *LGMD2* es una enfermedad muscular caracterizada por debilidad muscular progresiva y atrofia, pero como se ha indicado anteriormente también se han descrito síntomas relacionados con el sistema nervioso en pacientes ^{8,12}. Por ello, después de confirmar que se expresaban las versiones de *TNPO3* humana, dirigimos la expresión del transgén al músculo de la mosca y a las motoneuronas de forma independiente, con los *drivers* *MHC-Gal4* y *D42-Gal4* respectivamente, manteniendo el fondo silenciado de *Tnpo-SR*. La cuantificación del área total de los *IFM* de moscas de 7 días de edad que expresan *TNPO3mut* en músculo o motoneuronas no mostró cambios significativos en comparación con las moscas *sTNPO3wt* y control (*MHC>GFP* y *D42>GFP*; Fig. 13A-D y 12E-H, respectivamente). Sin embargo, a los 15 días de edad, el área de los *IFM* de las moscas *sTNPO3mut* disminuyó significativamente en comparación con los controles (27% y 23%, respectivamente) (Fig. 13I-L músculo; 13M-P motoneuronas). Añadir que la expresión de *TNPO3wt* en músculo de moscas de 15 días de edad, sobre un fondo sensibilizado, también provocó una reducción significativa del área de *IFM* en comparación con las moscas control, pero menor que la atrofia muscular provocada por *TNPO3mut*. Por tanto, el fenotipo de atrofia muscular de *IFM* necesita entre 8-15 días para manifestarse en *Drosophila*. Esto indica que la expresión de *TNPO3mut* en un fondo silenciado de *Tnpo-SR*, tanto en músculo como en motoneuronas de mosca, aumenta el fenotipo atrófico con el tiempo, lo que demuestra un fenotipo degenerativo.

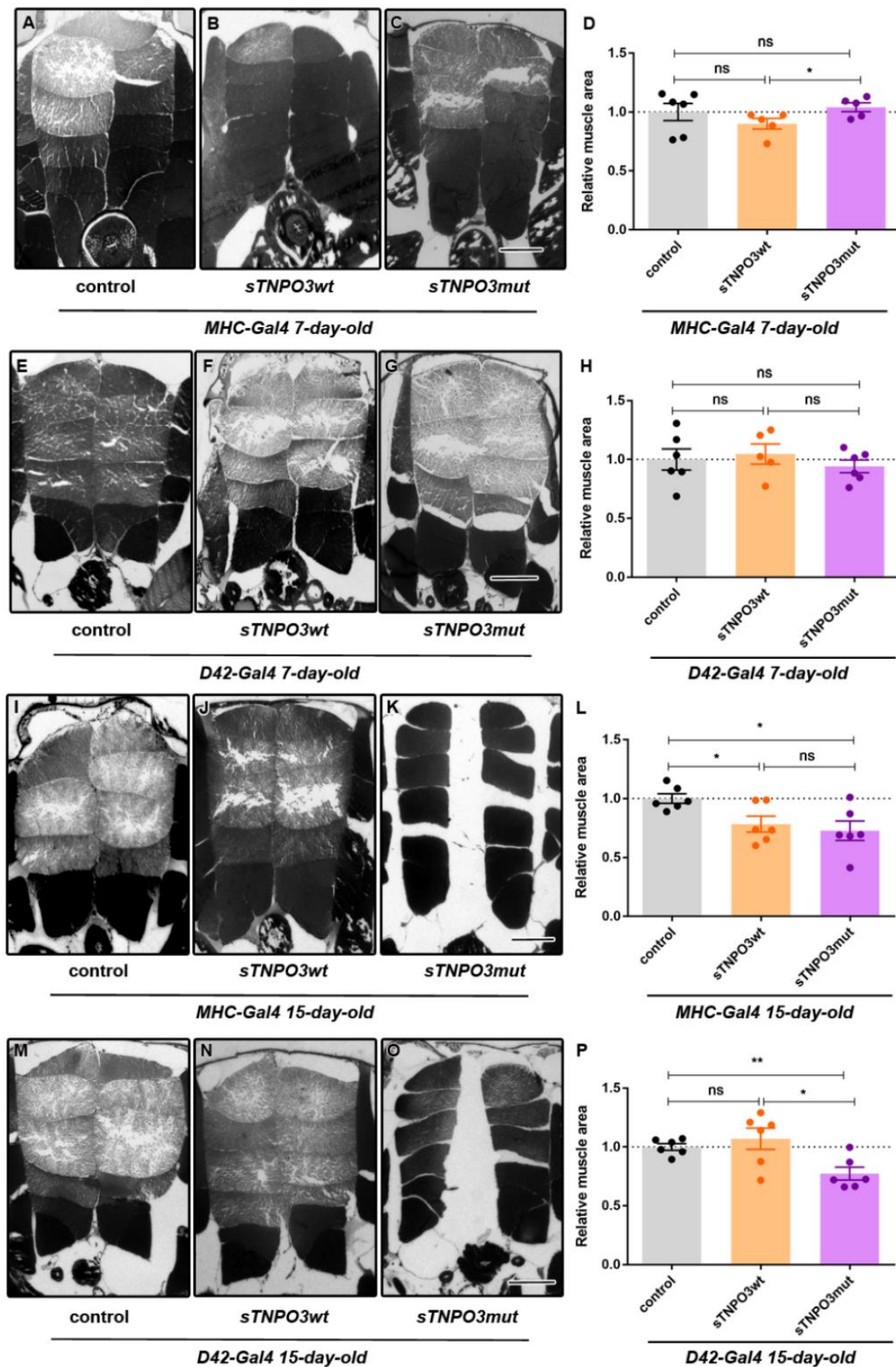


Figura 13. La expresión de *TNPO3mut* sobre un fondo sensibilizado, en músculo y motoneuronas, induce degeneración muscular en los IFM de mosca. Secciones dorsoventrales representativas de tórax embebidos en resina de moscas de 7 días que expresan los transgenes indicados, bajo el control de los drivers *MHC-Gal4* (A-C) o *D42-Gal4* (E-G). El área muscular se analizó en moscas control (gris; *MHC* o *D42-Gal4*>*UAS-GFP*), *sTNPO3wt*

Resultados

(naranja; *MHC o D42-Gal4>UAS-TNPO3wt*; *UAS-IR-Tnpo-SR*) y *sTNPO3mut* (morado; *MHC o D42 -Gal4>UAS-TNPO3mut*; *UAS-IR-Tnpo-SR*). (D, H) Cuantificación relativa del porcentaje medio de área muscular por condición (n = 6). (I-P) Representaciones del mismo experimento que anteriormente con moscas de 15 días de edad. Los diagramas de barras representan las medias relativas a los genotipos control $\pm$ SEM. ns: no significativo; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ según prueba t de Student. Barra de escala: 100 μ m.

Para comprobar si la mutación *LGMDD2* en *TNPO3* indujo fenotipos similares en diferentes tipos de músculos de *Drosophila*, analizamos la morfología de los músculos abdominales paralelos al vaso dorsal. Dentro de la musculatura somática de la mosca adulta, los músculos abdominales son tubulares, con sarcómeros alineados lateralmente y contracción sincrónica, a diferencia de los *IFM*, que son músculos fibrilares¹³¹. En concreto, analizamos los segmentos abdominales A4 ya que, tras la disección, estas fibras permanecían expuestas e intactas. En la expresión dirigida al músculo, las moscas *sTNPO3mut* de 15 días de edad mostraron fibras musculares A4 significativamente más delgadas que las del control (27%; *MHC>GFP*) o las moscas *sTNPO3wt* (22%) (Fig. 14A-D).

Se observaron resultados similares tras la expresión en motoneuronas (Fig. 14E-H). Sin embargo, a diferencia de los *IFM*, las moscas que expresan *TNPO3wt* en las motoneuronas, sobre un fondo sensibilizado, también tenían fibras A4 significativamente más delgadas (18%), mostrando un fenotipo similar a la expresión muscular.

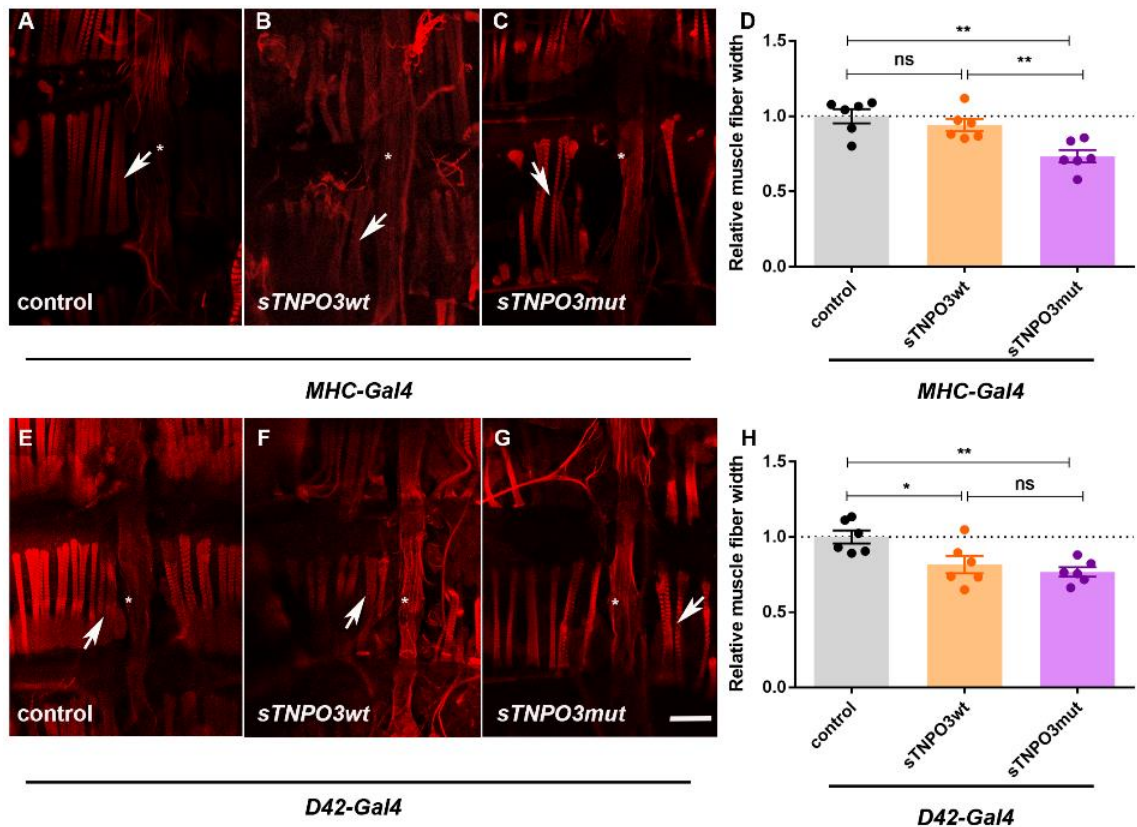


Figura 14. Fenotipo atrófico en los músculos abdominales de moscas modelo *LGMDD2*. (A-C, E-G) Imágenes de microscopía confocal representativas de secciones rostrocaudales del abdomen de moscas de 15 días teñidas con faloidina (rojo). La expresión de *TNPO3* estaba bajo el control de los *drivers* *MHC-Gal4* o *D42-Gal4*. El ancho de la fibra muscular abdominal A4 se midió en controles (gris; *MHC* o *D42-Gal4>UAS-GFP*), moscas *sTNPO3wt* (naranja; *MHC* o *D42-Gal4>UAS-TNPO3wt*; *UAS-IR-Tnpo-SR*), y moscas *sTNPO3mut* (morado; *MHC* o *D42-Gal4>UAS-TNPO3mut*; *UAS-IR-Tnpo-SR*). (D, H) Cuantificación del grosor de los músculos abdominales indicados en cada condición relativo a los controles (n = 6). Los asteriscos marcan el corazón de la mosca y las flechas, las fibras A4 representativas. Los diagramas de barras representan las medias relativas a los correspondientes controles $\pm$ SEM. ns: no significativo, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ según la prueba t de Student. Barra de escala: 50 μ m.

En conjunto, la expresión dirigida de *TNPO3mut* al músculo y motoneuronas de *Drosophila*, en un fondo silenciado para el ortólogo de mosca, reproduce la atrofia muscular de los pacientes con *LGMDD2* tanto en los *IFM*, como en los músculos abdominales de las moscas de 15 días. Pero, mientras que los *IFM* son refractarios a la degeneración muscular tras la expresión de *TNPO3wt* en las motoneuronas, los músculos abdominales muestran una respuesta similar a la observada con la expresión de *TNPO3mut* en motoneuronas.

3. Las moscas modelo *LGMDD2* muestran una actividad locomotora reducida

Para evaluar las consecuencias funcionales de la expresión de *TNPO3mut* en músculos o motoneuronas, sobre un fondo sensibilizado, cuantificamos la capacidad de escalada y vuelo de moscas de 7 y 15 días. Empezando por la expresión en músculo, a los 7 días de edad las moscas *sTNPO3wt* y moscas *sTNPO3mut* mostraron una disminución de la capacidad de escalada en comparación con las moscas control (*yw*; *MHC*; reducción del 54% y 64%, respectivamente). No obstante, en moscas de 15 días de edad la reducción significativa de esta capacidad locomotora sólo ocurría con la expresión de *TNPO3mut* (Fig. 15A, B). En términos de vuelo, las moscas *sTNPO3mut* de 15 días de edad mostraron una disminución significativa de la altura promedio de aterrizaje respecto a las moscas control (*MHC>GFP*) y *sTNPO3wt* (Fig. 15C). Esto indica que la expresión de *TNPO3mut* en los músculos de *Drosophila*, en un fondo sensibilizado, reduce la actividad locomotora de las moscas con el tiempo de forma específica.

La expresión de *TNPO3mut* en las motoneuronas de mosca, en un fondo silenciado para su ortólogo, también disminuyó alrededor de un 85% la capacidad de escalada en comparación con las moscas control de 7 y 15 días de edad (*yw*; *D42*) (Fig. 15D, E). Aunque las moscas *sTNPO3wt* también presentaban una reducción significativa de la velocidad de escalada a ambas edades, al comparar el efecto de *sTNPO3mut* frente a *sTNPO3wt* hubo una reducción adicional en la velocidad de escalada. Con respecto a la capacidad de vuelo, tanto las moscas *sTNPO3wt* como las *sTNPO3mut* de 15 días

Resultados

mostraron una disminución de la altura promedio de aterrizaje en comparación con las moscas control (*D42>GFP*). Esto indica que la sobreexpresión de TNPO3 en motoneuronas también afecta a la capacidad de vuelo de las moscas. No obstante, cabe destacar que las moscas *sTNPO3mut* tenían esta capacidad de vuelo afectada de forma adicional (Fig. 15F). Por tanto, sobre un fondo sensibilizado, la expresión de *TNPO3mut* en las motoneuronas de *Drosophila* también reduce la actividad locomotora de las moscas.

Adicionalmente, también estudiamos estos fenotipos funcionales en la mosca modelo *LGMDD2* tratada con ActD. Con ello observamos una mejora significativa tanto de la capacidad de escalar como de volar (Fig. 15G, H).

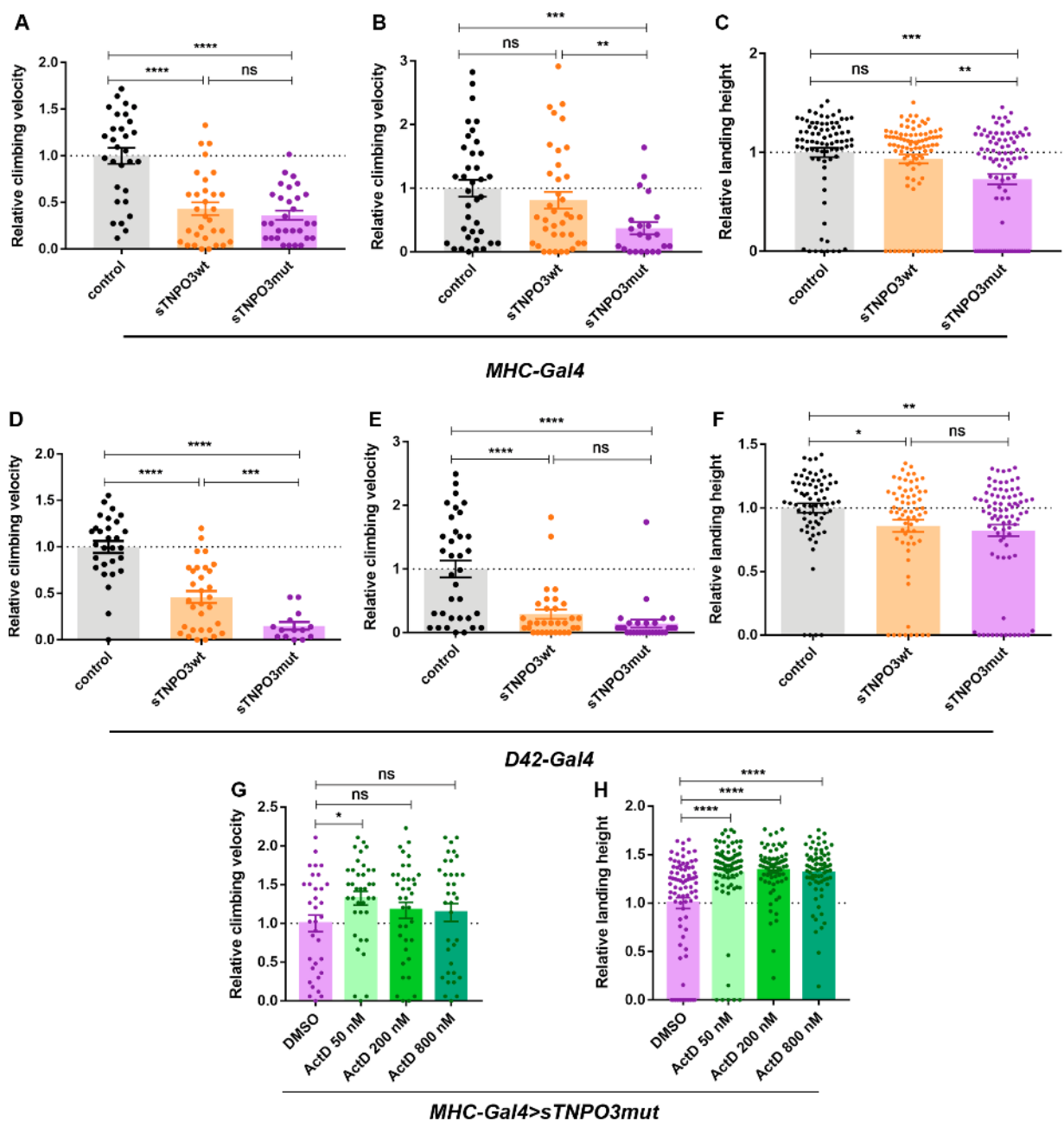


Figura 15. La actividad locomotora se ve afectada en las moscas modelo *LGMDD2*. Representación de la velocidad de escalada $\pm$ SEM ($80 < n < 100$) de moscas control (gris; *yw*; *MHC* o *D42-Gal4>UAS-GFP*), moscas *sTNPO3wt* (naranja; *MHC* o *D42-Gal4>UAS-TNPO3wt*; *UAS-IR-Tnpo-SR*) y moscas *sTNPO3mut* (morado; *MHC* o *D42-Gal4>UAS-TNPO3mut*; *UAS-IR-Tnpo-SR*) de 7 (A, D) o 15 días de edad (B, E). (C, F) Los gráficos de los ensayos de vuelo representan la distancia de aterrizaje alcanzada $\pm$ SEM por moscas con los mismos genotipos anteriores ($80 < n < 100$). (G, H) Representación del ensayo de escalada y vuelo de moscas de 15 días de edad que expresan *sTNPO3mut* bajo el control del *driver MHC-Gal4*, tratadas con ActD a 50, 200 u 800 nM o con DMSO al 0.1% como vehículo. Todos los datos se normalizaron a los valores obtenidos en la cohorte control correspondiente. ns: no significativo; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$ según la prueba de t de Student y ANOVA de una vía.

En conjunto, los estudios de escalada y vuelo de *Drosophila* demuestran que el modelo de mosca *LGMDD2* reproduce fenotipos de deterioro muscular similares a los descritos en los pacientes con *LGMDD2*. Además, nuestros datos prueban que la pérdida de función muscular en la mosca inducida por *TNPO3mut* ocurre con el tiempo, y esta pérdida de función puede estar relacionada con la degeneración muscular observada previamente. Además, el rescate de los fenotipos funcionales tras el tratamiento con ActD, junto con los resultados previos de que el tratamiento con ActD reduce los niveles de *TNPO3*, indican que *TNPO3mut* ejerce un efecto tóxico en el músculo de mosca (Fig. 14G, H).

4. La expresión de *TNPO3mut* en *Drosophila* reduce la longevidad de las moscas

Para estudiar si la expresión de *TNPO3mut* en un fondo sensibilizado tenía algún efecto sobre la longevidad de las moscas obtuvimos sus curvas de supervivencia. Respecto a la expresión dirigida a músculo, las moscas *sTNPO3mut* mostraron una supervivencia significativamente menor a las de las moscas *sTNPO3wt* y moscas control (*MHC>IR-bcd*) y su vida mediana se redujo drásticamente, de 29 a 25 días, en comparación con ambas líneas control (Fig. 16A, B). Esto demuestra que el fenotipo de longevidad reducida es específico de la *TNPO3mut*. Con respecto a la expresión en las motoneuronas, hubo una reducción significativa en supervivencia y en la vida mediana de las moscas *sTNPO3mut* (25 días) frente a las moscas control (*D42>IR-bcd*; 30 días). No obstante, la sobreexpresión de *TNPO3wt* en motoneuronas de mosca también redujo ambos parámetros, aunque este fenotipo fue mayor con la expresión de *TNPO3mut* sobre el fondo sensibilizado (Fig. 16E, F).

Otro fenotipo relacionado con la longevidad de las moscas que estudiamos fue su desarrollo, cuantificando el porcentaje de individuos que alcanzan la etapa de pupa y adulto. En general, las moscas que expresan cualquiera de las construcciones tanto en el músculo como en las motoneuronas alcanzaron el estadio de pupa sin diferencias significativas. En términos de capacidad de eclosión de

Resultados

adultos, la expresión de *TNPO3mut* en el músculo, en un fondo sensibilizado, no afectó a este parámetro en comparación con moscas *sTNPO3wt* y control (*MHC>GFP*) (Fig. 16C). Sin embargo, es importante destacar que desde el día 7 en adelante una proporción de moscas *sTNPO3mut* desarrollaron un fenotipo característico de alas levantadas (Fig. 15D). Por el contrario, la expresión de *TNPO3mut* en las neuronas motoras, en fondo sensibilizado, provocó una disminución significativa de la eclosión de alrededor del 60% en comparación con moscas *sTNPO3wt* y control (*D42>GFP*) (Fig. 16G). De hecho, observamos varios ejemplos de moscas *sTNPO3mut* que morían durante su desarrollo dentro de las pupas maduras. Además, una alta proporción de moscas que expresaban *sTNPO3mut* en motoneuronas tenían un fenotipo de alas arrugadas desde la eclosión (Fig. 16H).

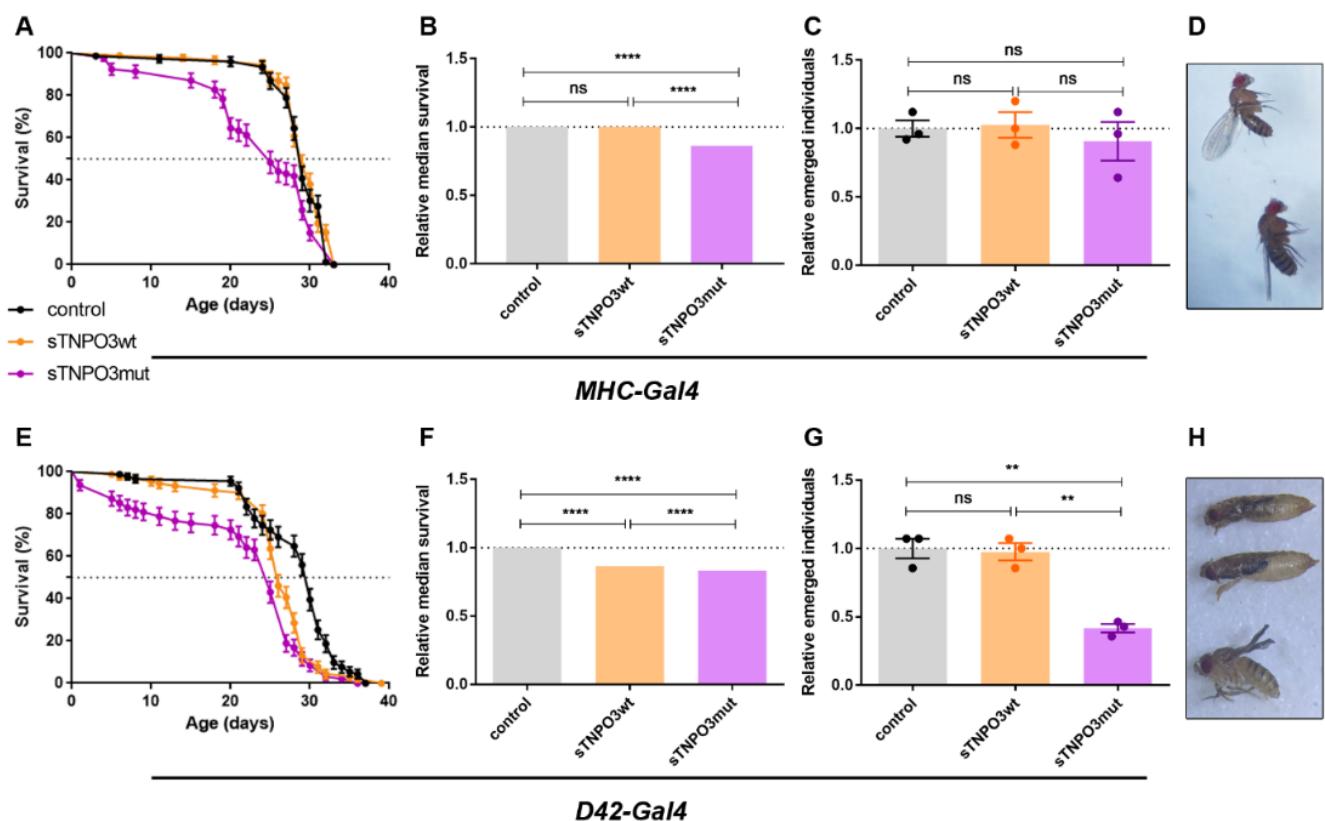


Figura 16. Las moscas modelo *LGMD2* muestran defectos en supervivencia y eclosión. (A, E) Curvas de supervivencia y (B, F) supervivencia media relativa de moscas control (gris; *UAS-IR-bcd*), *sTNPO3wt* (naranja; *UAS-TNPO3wt*; *UAS-IR-Tnp-SR*) y *sTNPO3mut* (morado; *UAS-TNPO3mut*; *UAS-IR-Tnp-SR*) bajo el control de los drivers *MHC-Gal4* (A, B) o *D42-Gal4* (E, F). Las curvas de supervivencia se representan como porcentaje de moscas vivas ($75 < n < 100$). (C, G) Análisis de los individuos que emergen de las pupas de las condiciones indicadas tras la expresión en músculo (C) o motoneuronas (G) ($n = 75$). En todos los casos, los diagramas de barras representan la media relativa a los respectivos controles $\pm$ SEM. ns: no significativo; **: $p < 0.01$; ****: $p < 0.0001$ según la prueba t de Student. (D, H) Imágenes representativas de moscas adultas *sTNPO3mut*: la expresión en la musculatura somática provoca un fenotipo de alas levantadas (D), mientras que la expresión en las motoneuronas conduce a moscas incapaces de emerger de las pupas y adultos con alas arrugadas (H).

En resumen, la expresión de *TNPO3mut* en músculos en un fondo sensibilizado genéticamente empeoró, de forma específica, la supervivencia. Este fenotipo también se produjo con la sobreexpresión de *TNPO3wt* en motoneuronas, siendo potenciado por la expresión de *TNPO3mut*. Además, *TNPO3mut* específicamente reduce la eclosión de las moscas cuando se expresa en las motoneuronas, afectando también la morfología de las alas de las moscas.

5. La autofagia está sobreactivada en las moscas modelo *LGMDD2* y el tratamiento con CQ rescata los fenotipos musculares

En biopsias de músculo *LGMDD2* se describe aumento de la autofagia¹⁷, por lo que analizamos si nuestro modelo de mosca lo reproducía. Primero, evaluamos los niveles de expresión de genes relevantes involucrados en diferentes pasos de la formación del autofagosoma⁴³. En las moscas *sTNPO3mut* observamos una expresión significativamente aumentada de transcritos *Atg4*, *Atg8a* y *Atg12*, en comparación con las moscas *sTNPO3wt*, mientras que *Atg7* y *Atg9* permanecieron sin cambios (Fig. 17A). La conjugación de *Atg8a* con fosfatidiletanolamina y su desconjugación por *Atg4* es un paso muy importante para el aislamiento, elongación y/o cierre completo de la membrana durante la formación del autofagosoma. *Atg8a* está presente tanto en las membranas internas como externas de estas estructuras. *Atg12* está presente en la membrana externa y también participa en la conjugación de *Atg8* con fosfatidiletanolamina y es fundamental en el proceso de elongación y aislamiento de la membrana del autofagosoma⁴³.

Seguidamente, realizamos la tinción *LysoTracker* en moscas modelo *LGMDD2*. *LysoTracker* es un fluoróforo con alta selectividad para organelas ácidas y, en consecuencia, un colorante para detectar lisosomas y autofagolisosomas en digestión¹³². Esta tinción específica permitirá corroborar si hay una sobreactivación de la autofagia en pasos posteriores o independientes a la formación de los autofagosomas. Concretamente, la tinción se hizo en cortes de tórax de moscas *sTNPO3wt* (*MHC-Gal4 UAS-TNPO3wt; UAS-IR-Tnpo-SR*), moscas *sTNPO3mut* (*MHC-Gal4 UAS-TNPO3mut; UAS-IR-Tnpo-SR*) y moscas *sTNPO3mut* tratadas, durante 15 días desde su nacimiento, con un inhibidor del flujo autofágico bien caracterizado: Cloroquina (CQ)¹³³. Los resultados mostraron una fuerte señal en moscas *sTNPO3mut* sin tratar (H₂O) con puntos brillantes repartidos por los *IFM* (Fig. 17C). Estos puntos no se observaron en las moscas *sTNPO3wt* (Fig. 17B). Tras el tratamiento con CQ a 10 y 100 μ M de las moscas modelo, la señal roja punteada desapareció recuperando un patrón similar al control de la tinción (Fig. 17D, E). En conjunto, el aumento en la expresión de genes autofágicos y en la señal de *LysoTracker* en mosca modelo *LGMDD2*, corroboran que la expresión de *TNPO3mut* causa la sobreactivación de la autofagia.

Resultados

Por otro lado, nos propusimos estudiar si *TNPO3mut* tenía también efecto sobre el flujo autofágico de la mosca. Para ello utilizamos el reportero *GFP:Atg8a*, una herramienta ampliamente utilizada para monitorear la degradación autofágica (o flujo autofágico) en *Drosophila* en los diferentes compartimentos a lo largo de la vía autofágica^{132,134}. El reportero *GFP:Atg8a* marca el autofagosoma sólo antes de su fusión con el lisosoma para formar el autolisosoma, ya que GFP se extingue rápidamente en un ambiente ácido¹³⁵. De manera que, mediante inmunofluorescencia, la inducción de autofagia se puede cuantificar en función de la cantidad de los puntos verdes. Sin embargo, la monitorización de *GFP:Atg8a* no determina el flujo a menos que se utilice junto con inhibidores de la fusión y/o degradación lisosomal, como CQ¹³². Entonces, probamos el efecto de la CQ en moscas que expresan *sTNPO3mut* y el reportero *GFP:Atg8a* bajo el control del driver *MHC-Gal4* (*MHC-Gal4 UAS-TNPO3mut; UAS-GFP: Atg8a UAS-IR-Tnpo-SR*), en lo sucesivo denominadas como moscas *sTNPO3mut; GFP:Atg8a*. Las moscas *sTNPO3mut; GFP:Atg8a* recién nacidas se trataron con CQ a 10 o 100 μ M durante 15 días y se comparó la señal GFP de sus tórax con la de moscas *sTNPO3mut; GFP:Atg8a* sin tratar (H_2O). Como control del efecto específico de la *TNPO3mut* se utilizó *MHC-Gal4 UAS-TNPO3wt; UAS-GFP: Atg8a UAS-IR-Tnpo-SR*, en lo sucesivo denominadas *sTNPO3wt; GFP:Atg8a* (Fig. 17F-I). Las moscas *sTNPO3mut; GFP:Atg8a* sin tratar mostraron una señal fluorescente de GFP más alta que *sTNPO3wt; GFP:Atg8a*, indicando un aumento anormal de la autofagia en los músculos que expresan *TNPO3mut*. Las moscas *sTNPO3mut; GFP:Atg8a* tratadas con CQ a 10 μ M redujeron ligeramente la señal fluorescente en comparación con las moscas no tratadas, y las moscas tratadas con 100 μ M de CQ redujeron significativamente este fenotipo patológico (Fig. 17F-J).

Un ensayo adicional de flujo autofágico es monitorear la escisión dependiente de autofagia de *Atg8:GFP*. En los autolisosomas, las hidrolasas lisosomales se encargan de cortar *Atg8a:GFP*, liberando a GFP, que permanece en las células debido a su estructura globular y compacta que le confiere mayor resistencia. En consecuencia, GFP libre se puede cuantificar mediante *western blot*¹³⁵. Este análisis mostró una mayor cantidad de GFP libre en *sTNPO3mut; GFP:Atg8a* en comparación con *sTNPO3wt; GFP:Atg8a*, que se redujo significativamente con CQ a 100 μ M (Fig. 17K). Estos datos confirman que el flujo autofágico está significativamente aumentado en las moscas modelo *LGMDD2* y que la inhibición de la autofagia por CQ restauró el flujo autofágico normal.

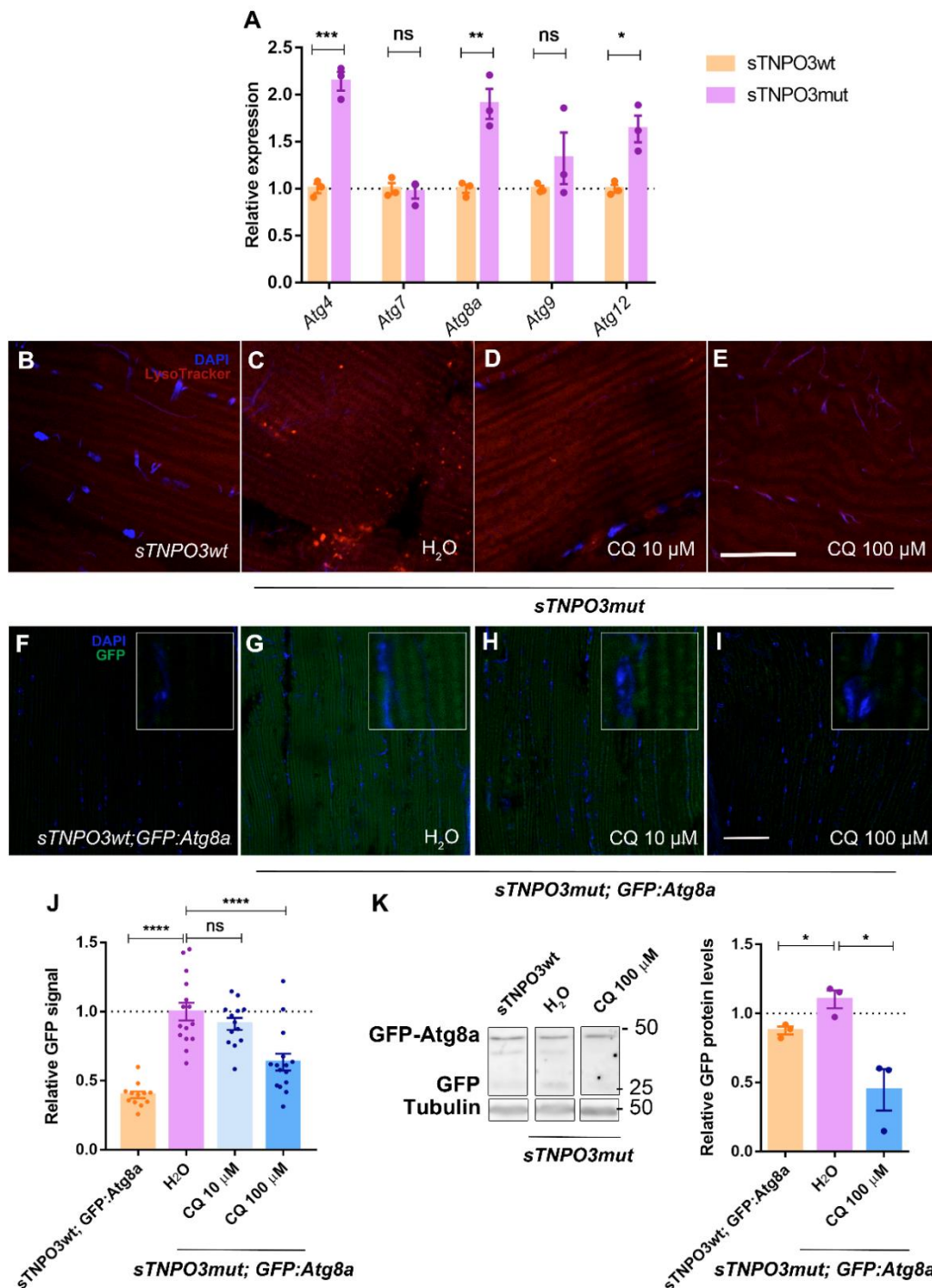


Figura 17. El flujo autofágico está aumentado en moscas modelo *LGMDD2* con un fondo sensibilizado. (A) Cuantificación por *qRT-PCR* de la expresión de genes implicados en autofagia en moscas *sTNPO3wt* (naranja; *MHC-Gal4>UAS-TNPO3wt; UAS-IR-Tnpo-SR*) y moscas *sTNPO3mut* (morado; *MHC-Gal4>UAS-TNPO3mut; UAS-IR-Tnpo-SR*). La expresión se normalizó a *Rp49* ($n = 3$). (B-E) Imágenes representativas de la tinción con *LysoTracker* (rojo) de IFM de moscas *sTNPO3wt* y *sTNPO3mut*, tratadas con H₂O o con CQ a 10 o 100 μ M. Barra de escala: 40 μ m. (F-I) Imágenes representativas de la inmunodetección del reportero *GFP* (verde) en los IFM de *sTNPO3wt; GFP:Atg8a* (*MHC-Gal4 UAS-TNPO3wt; UAS-GFP:Atg8a UAS-IR-Tnpo-SR*, C) y moscas *sTNPO3mut; GFP:Atg8a* (*MHC-Gal4 UAS-TNPO3mut; UAS-GFP:Atg8a UAS-IR-Tnpo-SR*), alimentadas con comida suplementada con H₂O, como vehículo, o con las concentraciones indicadas de CQ. Barra de escala: 20 μ m. (J) Cuantificación relativa de la señal GFP a partir de imágenes de las condiciones de F-I: *sTNPO3wt; GFP:Atg8a* (naranja); *sTNPO3mut; GFP:Atg8a* sin tratar (H₂O; morado), y tratadas con CQ (azul) ($n = 15$). (K) Membranas de *western blot* y

Resultados

cuantificación de extractos proteicos de moscas con los genotipos y condiciones de F-J con los anticuerpos indicados ($n = 3$). La expresión de tubulina se utilizó como control endógeno. Los núcleos de las células en ambas tinciones fluorescentes se contrastaron con *DAPI* (azul). Los gráficos de barras representan las medias relativas a los correspondientes controles $\pm$ SEM. ns: no significativa; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$ según la prueba t de Student.

Dado que el catabolismo excesivo por degradación autofágica podría explicar la atrofia muscular en pacientes con *LGMDD2*, estudiamos el efecto del tratamiento con CQ sobre la atrofia muscular en las moscas modelo. Primero comparamos los resultados de moscas *stNPO3mut* tratadas con CQ a 10 o 100 μ M durante 15 días desde su nacimiento, con moscas *stNPO3mut* no tratadas y moscas *stNPO3wt* (Fig. 18A-D). Mientras que no se detectó ningún efecto sobre el área de los *IFM* en moscas *stNPO3mut* tratadas con CQ a 10 μ M, las secciones de moscas modelo tratadas con CQ a 100 μ M mostraron un área de *IFM* significativamente mayor, similar al área de las moscas *stNPO3wt* (Fig. 18E). Por tanto, la administración oral de CQ a las moscas modelo de *LGMDD2* logró rescatar el fenotipo atrófico causado de forma específica por la *TNPO3mut*.

Para determinar si este rescate del área muscular por CQ se correlacionaba con una mejora de la locomoción de las moscas, estudiamos la capacidad de vuelo en moscas de 15 días de edad (Fig. 18F). Las moscas *stNPO3mut* sin tratar mostraron una disminución de su capacidad de vuelo al compararlas con moscas *stNPO3wt*, corroborando el fenotipo específico de la mutación. En cambio, las moscas *stNPO3mut* tratadas durante 15 días con CQ a 100 μ M mejoraron su capacidad de vuelo un 47% en comparación con las moscas modelo no tratadas. Teniendo en cuenta que las moscas modelo mostraron un fenotipo de longevidad reducida, estudiamos también el efecto de la CQ durante la vida adulta en moscas *stNPO3mut* (Fig. 18G). Si bien no se detectó ningún impacto en la supervivencia de los individuos tratados, se observó un claro efecto beneficioso en la vida mediana de las moscas modelo en función de la dosis de CQ. Específicamente, este parámetro en moscas *stNPO3mut* se prolongó 4 y 7 días después del tratamiento con CQ a 10 y 100 μ M, respectivamente. Además, las alas de estas moscas se observaron diariamente y se detectó una reducción en el fenotipo de alas levantadas en las moscas tratadas con CQ a 100 μ M (Fig. 18H).

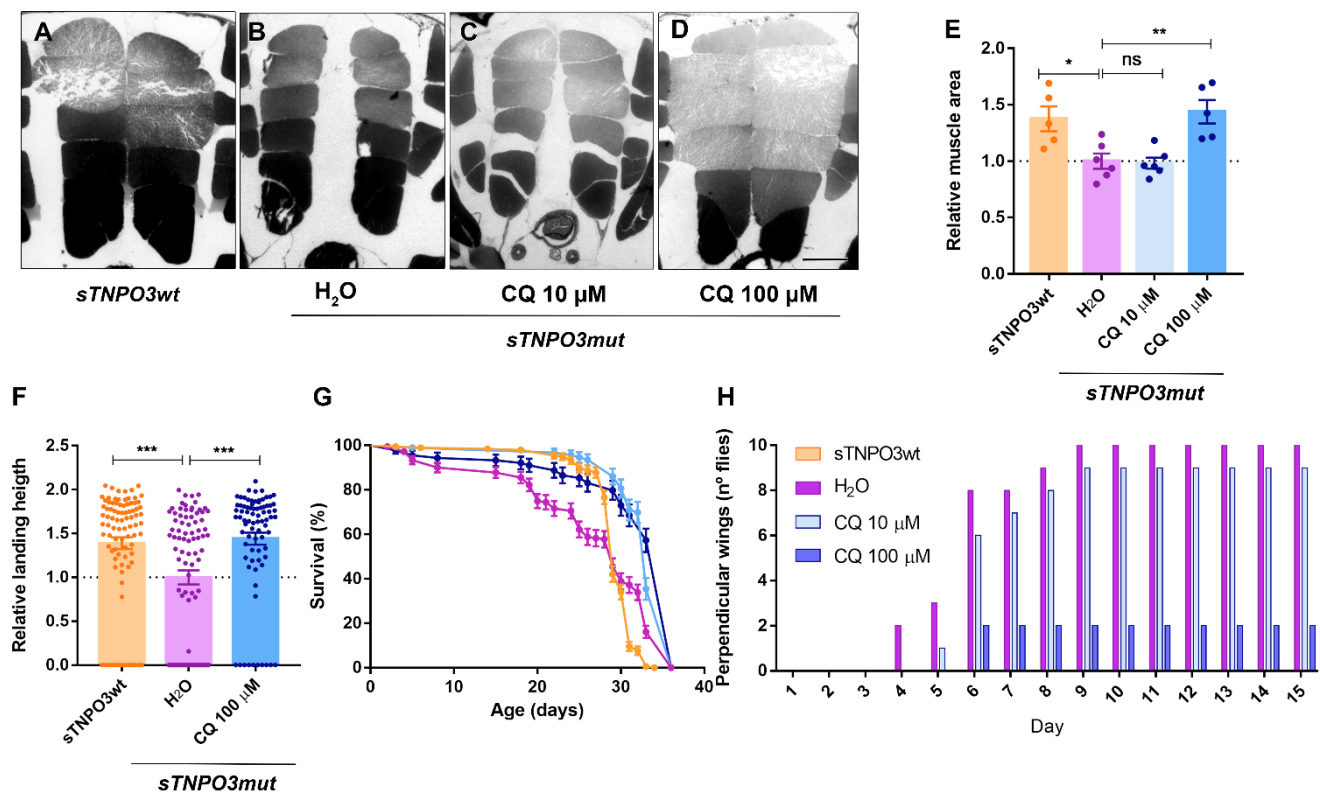


Figura 18. Los fenotipos relacionados con *LGMD2* mejoran con la inhibición de la autofagia con CQ. (A-D) Secciones dorsoventrales de tórax embebidos en resina, de moscas *sTNPO3wt* (*MHC-Gal4>UAS-TNPO3wt*; *UAS-IR-Tnpo-SR*) y moscas modelo *LGMD2* (*MHC-Gal4>UAS-TNPO3mut*; *UAS-IR-Tnpo-SR*) tratadas con disolvente (H₂O) o CQ en las concentraciones indicadas. Barra de escala, 100 μ m. (E) Cuantificación relativa del porcentaje medio del área muscular $\pm$ SEM de las condiciones anteriores (n = 6). (F) Gráfico de ensayos de vuelo que representa la distancia media de aterrizaje relativa al control $\pm$ SEM, alcanzada por moscas *sTNPO3wt* o moscas modelo *LGMD2* tratadas con H₂O o CQ a 100 μ M (80 < n < 100 en ambos casos). (G) Curvas de supervivencia en las mismas condiciones experimentales que las descritas en F (n = 100). (H) Análisis del porcentaje de moscas modelo tratadas con H₂O, CQ a 10 o 100 μ M con el fenotipo de alas levantadas en los tiempos indicados (n = 100). ns: no significativa; *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001 según prueba ANOVA de una vía.

En conjunto, tras la caracterización del primer modelo animal de *LGMD2* podemos concluir que mientras que la expresión de *TNPO3mut* en *Drosophila* generó fenotipos menores, el silenciamiento simultáneo de *Tnpo-SR* endógeno los potenció significativamente, dando lugar a atrofia muscular, afectación de la capacidad locomotora, reducción de la longevidad y sobreactivación de la autofagia, siendo todos ellos defectos similares a los observados en pacientes *LGMD2*. Es importante destacar que estos fenotipos no se detectaron al sobreexpresar *TNPO3wt* en un fondo silenciado para *Tnpo-SR* o fueron más débiles, apoyando así la especificidad de las alteraciones. Por lo tanto, nuestros datos demuestran que los 15 aminoácidos adicionales en *TNPO3mut* son suficientes para reproducir la enfermedad en *Drosophila*. Además, se demuestra que los fenotipos son reversibles con el inhibidor de la autofagia CQ, ya que rescata parcialmente el fenotipo atrófico y la función muscular de las moscas modelo.

Resultados

Objetivo 2: Identificar compuestos con potencial terapéutico en el modelo de LGMDD2 en *Drosophila*

1. La expresión dirigida de *TNPO3mut* a las motoneuronas de *Drosophila* altera el splicing de *SMN2*

La LGMDD2 no tiene tratamiento eficaz actualmente. Por ello decidimos utilizar el modelo en *Drosophila* no solo para conocer mejor esta distrofia, sino también como herramienta para probar diferentes estrategias terapéuticas en un modelo *in vivo* de la enfermedad. Concretamente, hemos realizado un rastreo de fármacos en las moscas que expresan *sTNPO3mut*. El rastreo aprovecha el uso de la automatización del laboratorio para ensayar rápidamente la actividad biológica/bioquímica de un gran número de compuestos diferentes e identificar compuestos activos que modulen una vía patológica específica ⁹⁰. Además, estos compuestos identificados pueden aportar ideas relevantes sobre los mecanismos fisiopatológicos implicados en la LGMDD2. Como ya vimos en el Objetivo 1 de la presente tesis, la expresión de *TNPO3mut* tanto en músculo como en motoneuronas de mosca, sobre un fondo sensibilizado, reproduce fenotipos claves de la LGMDD2 en *Drosophila*. Además, el modelo de LGMDD2 en motoneuronas presenta un fenotipo de viabilidad, que inicialmente pensamos que podría servir como ventana terapéutica sobre la que evaluar el efecto de los fármacos. Sin embargo, dada la variabilidad en los resultados y la dificultad para mantener las condiciones nos vimos obligados a diseñar un nuevo formato de rastreo.

Tras probar diferentes fenotipos, temperaturas, edad y sexo, conseguimos seleccionar las mejores condiciones para realizar el rastreo en la mosca. Decidimos utilizar una línea de *Drosophila* que expresa el minigen *SMN2* fusionado con el reportero luciferasa en motoneuronas: *D42-Gal4>UAS-SMN2:luciferase* (abreviado como *D42>SMN2:luc*) ¹⁰⁰. Esta línea fue generada previamente en el laboratorio para realizar un *rastreo* de fármacos que pudieran ser reposicionados como tratamiento para la AME. Brevemente, la AME está causada por mutaciones en el gen *SMN1*, que codifica la proteína *SMN* (*survival of motor neuron*). En humanos se expresa también el gen *SMN2* que incluye el exón 7 de forma regulada por factores de la familia SR, y en ese caso puede compensar la falta de *SMN1* ^{136,137}. En las moscas *D42>SMN2:luc* generadas, el minigen *SMN2*, fusionado con el reportero luciferasa, incluye el exón 7 flanqueado por dos exones constitutivos, de forma que cuanto mayor sea la inclusión del exón 7 de *SMN2*, mayores serán las lecturas de luminiscencia (Fig. 19A). Esta inclusión del exón 7 viene regulada por la presencia en el núcleo del factor SRSF1 de la familia de proteínas SR, que son un cargo típico de *TNPO3* ¹³⁸.

Cuando cruzamos la línea *D42>SMN2:luc* con la línea *stNPO3mut*, vimos que la descendencia criada a 25 °C producía una señal significativamente menor de luminiscencia respecto a la señal obtenida con la descendencia del cruce con la línea *stNPO3wt* (50-60%) (Fig. 19B). Este fenotipo de luminiscencia alterada demostró la capacidad del reportero para diferenciar la actividad de TNPO3 funcional frente a la afectada por la mutación, constituyendo una ventana significativa de rastreo. Esto puede deberse a que la mutación de TNPO3 interfiere con su función de translocación de las proteínas SR al núcleo de las células. De hecho, se ha visto que la mutación causante de la *LGMDD2* provoca la acumulación perinuclear de la transportina ^{12,18}, lo cual podría estar afectando a su propia función de transporte. Esto explicaría que, si las proteínas SR (como SRSF1) no entran al núcleo celular, no promueven la inclusión del exon 7 de *SMN2* y, entonces, no se expresa el reportero luciferasa porque queda fuera de pauta (Fig. 19C).

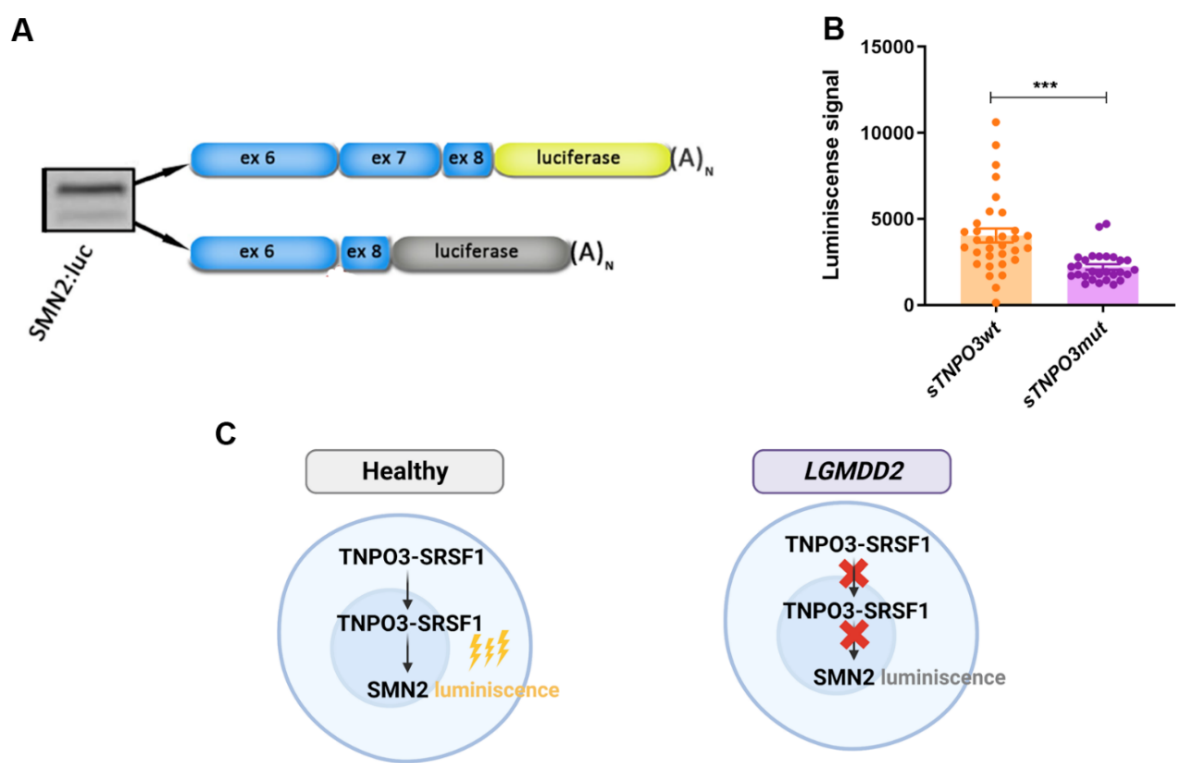


Figura 19. El minigen *SMN2* fusionado con el reportero *luciferasa* sirve para el rastreo farmacológico en las moscas modelo *LGMDD2*. (A) Imagen adaptada de Konieczny 2019 del patrón de empalme del minigen *SMN2:luc* expresado en las motoneuronas de *Drosophila* (moscas *D42>SMN2:luc*) ¹⁰⁰. El análisis del producto de PCR del minigen *SMN2:luc* mostró dos isoformas: una que incluye el Ex7 y que conduce a la traducción de luciferasa funcional (recuadro amarillo), y otra donde hay una exclusión del Ex7 ($\Delta 7$; banda inferior), que impide la generación de luminiscencia (recuadro gris). (B) Lecturas de luminiscencia de moscas *D42>SMN2:luc* que coexpresan las versiones indicadas del transgén *TNPO3*, en un fondo silenciado para su ortólogo. El gráfico de barras muestra la media $\pm$ SEM. ***: $p < 0.001$ (prueba t de Student). (C) Esquema simplificado de la hipótesis de que las moscas *LGMDD2* tienen afectada la expresión del reportero luc de forma dependiente de *TNPO3mut*. Imagen hecha con Biorender.com

Resultados

2. Cribado farmacológico en el modelo de *LGMDD2* en *Drosophila*

Siendo conscientes de la baja prevalencia que tiene la *LGMDD2* decidimos realizar el *rastreo* de moléculas pequeñas y compuestos naturales ya comercializados sobre el modelo de *Drosophila*, para así evitar los tiempos y costes que implica el desarrollo de fármacos generados *de novo*⁹². Para ello, se ha evaluado el efecto de los compuestos sobre el fenotipo de luminiscencia comentado anteriormente. Antes de iniciar el rastreo, la concentración máxima de disolvente no tóxico para moscas adultas se estableció en el 0.1%. Puesto que las quimiotecas de compuestos probados están disueltas en 100% DMSO a una concentración de 5 mM, la concentración más alta posible para nuestro rastreo era de 5 μ M. En total se ha evaluado el efecto de 1.400 compuestos. Brevemente, las larvas L1 se sembraron en placas que contenían un compuesto diferente en cada pocillo disuelto en medio nutritivo estándar. Las moscas se desarrollaron a 25 °C y a los 2-3 días de edad adulta se realizaron las lecturas de luminiscencia del homogenizado de cada pocillo. Una de las ventajas de usar la línea recombinante *D42>SMN2:luc* fue que no se necesita selección de moscas según sexo, ya que todas tienen el mismo genotipo y expresan por igual el transgén *UAS*.

Primero de todo, validamos la ventana de rastreo significativa de cada placa, comparando estadísticamente mediante la prueba de *t* de *Student*, los valores de luminiscencia de las moscas que expresaban *stNPO3mut*, sobre el fondo sensibilizado, frente a los valores de las moscas *stNPO3wt*. Tras validar cada placa, la señal de luminiscencia en las moscas modelo tratadas con cada compuesto se normalizó respecto a la media de la señal de las moscas no tratadas de su correspondiente placa. El análisis de los datos se basó en los cambios de la señal de luminiscencia normalizada y el valor de significancia calculado para cada compuesto. La representación de estos valores se abordó mediante un gráfico de tipo volcán, donde las coordenadas *Y* de cada punto representan el valor de significancia (*P-value*), y las coordenadas *X* son el correspondiente *Fold Change* (*FC*) de las lecturas de luminiscencia normalizadas (Fig. 20A). Estableciendo los valores para el cambio de luminiscencia a partir de 1 ($\log_2 |FC|$ diferente a 0) y con un máximo *P-valor* = 0.05 ($-\log_{10} |P-value| = 1.3$), el volcano plot sirvió para identificar los cambios significativos de una gran cantidad de datos. Además, esta representación muestra no sólo compuestos que mejoran (36%) el fenotipo de luminiscencia, sino también compuestos que lo empeoran (24%), que podrían dar pistas sobre la patología a partir del mecanismo de acción de cada uno. De hecho, uno de los compuestos que empeoran significativamente el fenotipo de luminiscencia actúa como antagonista de los receptores de glutamato NMDA, cuyo efecto puede relacionarse con la autofagia¹³⁹. Con todo, tras el cribado de más de 1.400 compuestos hemos

identificado 9 compuestos positivos, debido a que mejoran el fenotipo de forma significativa, y los proponemos como candidatos para el reposicionamiento de fármacos en *LGMD2* (Fig. 20B).

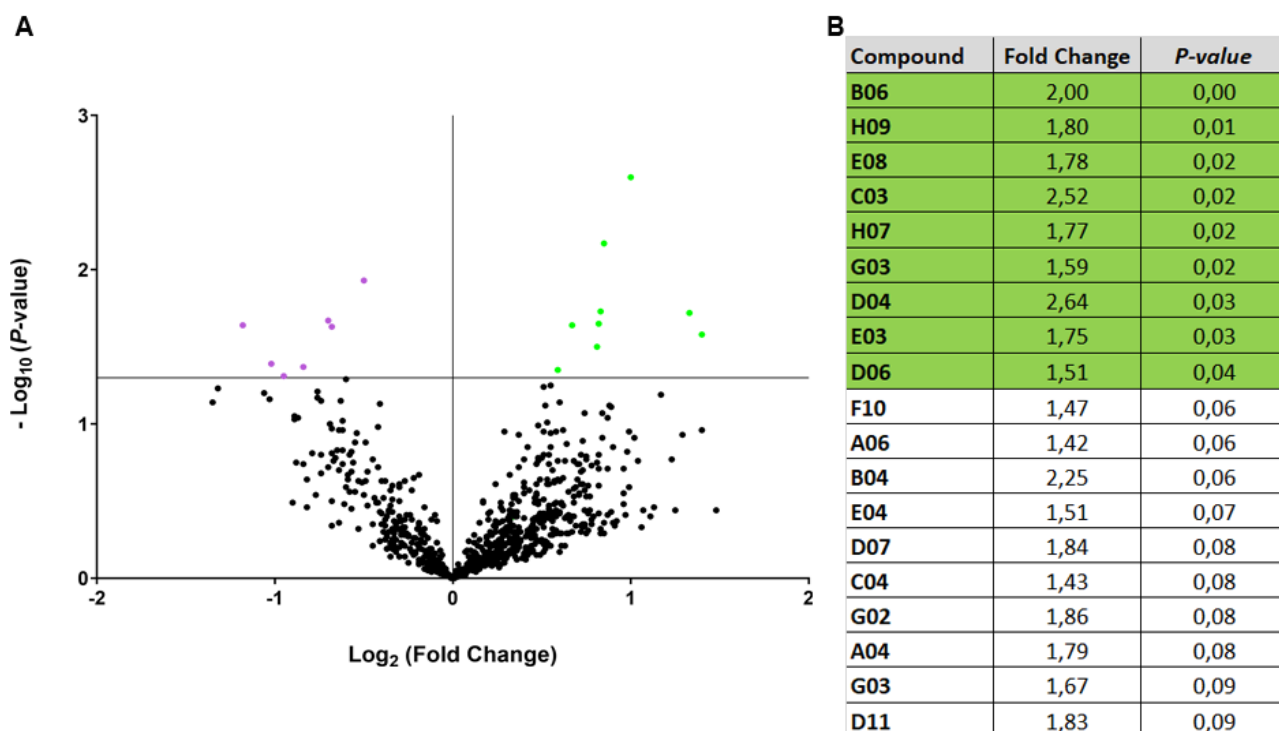


Figura 20. Rastreo farmacológico en el modelo en *Drosophila* de *LGMD2*. (A) Volcano plot que representa las lecturas de luminiscencia de las moscas *stNPO3mut* que expresan la construcción *SMN2:luc* tratadas con diferentes compuestos, normalizadas frente a las moscas del mismo genotipo sin tratar. Las líneas negras indican $\log_2(\text{Fold Change}) = 0$ en el eje X, $-\log_{10}(P\text{-value}) = 1.3$ en el eje Y, que son los umbrales de *Fold Change* y de significancia para identificar los fármacos que generan un efecto significativo sobre la luminiscencia. Los 7 puntos morados son los compuestos que tienen un efecto negativo sobre la luminiscencia de las moscas; mientras que los puntos verdes indican los 9 compuestos con efecto positivo. (B) Tabla de compuestos positivos ordenados según *P-valor* ajustados de mayor a menor. En verde se marcan los estadísticamente significativos ($P\text{-value} < 0.05$). Los *P-valor* se ajustaron realizando una prueba t múltiple con la corrección del *FDR* al 5%, según el método de Benjamini-Hochberg.

Resultados

Objetivo 3: Caracterizar mioblastos inmortalizados derivados de paciente y evaluar el potencial terapéutico de la edición de la mutación *LGMDD2* mediada por CRISPR-Cas9.

1. La expresión de *TNPO3* se restaura a niveles basales en mioblastos derivados de paciente corregidos con CRISPR-Cas9

Para avanzar con el reposicionamiento de los fármacos candidatos identificados en el modelo de *LGMDD2* de *Drosophila*, resultaba imprescindible disponer de un modelo celular. Al inicio de esta tesis, el Instituto de Miología de París había inmortalizado una línea de mioblastos primarios procedente de una biopsia de un paciente con *LGMDD2*, cedida por el grupo de Patología Neuromuscular y Ataxias del IIS La Fe, dirigido por el Dr. Vélchez. En colaboración con el grupo del Dr. Vélchez llevamos a cabo la caracterización a nivel fenotípico y molecular de la línea *LGMDD2* inmortalizada enferma y tras la edición génica de la mutación *c.2771delA en TNPO3*. Si la edición génica corrige la mutación de forma eficiente, esta línea de mioblastos editados podría servir como control isogénico para futuros estudios *in vitro*. Con todo, el presente objetivo fue estudiar diferentes fenotipos asociados a la distrofia en las tres líneas celulares siguientes: mioblastos inmortalizados derivados de un control sano (abreviado como CNT), mioblastos inmortalizados de *LGMDD2* (*LGMDD2*) y mioblastos inmortalizados de *LGMDD2* genéticamente editados (*LGMDD2* GE).

La necesidad de inmortalizar los mioblastos primarios *LGMDD2* se planteó debido a las limitaciones que supone trabajar con células primarias, como el bajo potencial proliferativo y la poca disponibilidad de estos cultivos. Los mioblastos *LGMDD2* primarios se inmortalizaron co-transduciéndolos con los transgenes *hTERT* y *Cdk-4*¹⁰⁷. La sobreexpresión de estos transgenes en los mioblastos inmortalizados *LGMDD2* se confirmó mediante un análisis que realizó el colaborador bioinformático Jorge Espinosa, comparando los datos del *RNA-seq* de estos mioblastos inmortalizados *LGMDD2* con los de mioblastos primarios control, disponibles de experimentos independientes. Concretamente, en los mioblastos inmortalizados *LGMDD2* se encontraron 184,13 y 182,89 transcritos por millón (TPM) de *hTERT* y *Cdk-4*, respectivamente, versus 6,47 y 0 TPM en mioblastos primarios control. También validamos la identidad de las células inmortalizadas *LGMDD2*, sin ambigüedades, analizando un perfil de *STR*. El perfil *STR* de la línea primaria e inmortalizada muestra los mismos 16 *STR* en los loci analizados (Fig. 21A). Por último, se analizó el potencial de proliferación de ambas líneas a las 24, 48, 72 y 96 h (Fig. 21B), confirmando que la línea inmortalizada proliferaba significativamente más que la primaria. En conjunto, estos datos validan esta línea de mioblastos inmortalizados como un modelo celular de la *LGMDD2*, ya que proviene de un paciente y con la que se podrá trabajar de forma ilimitada.

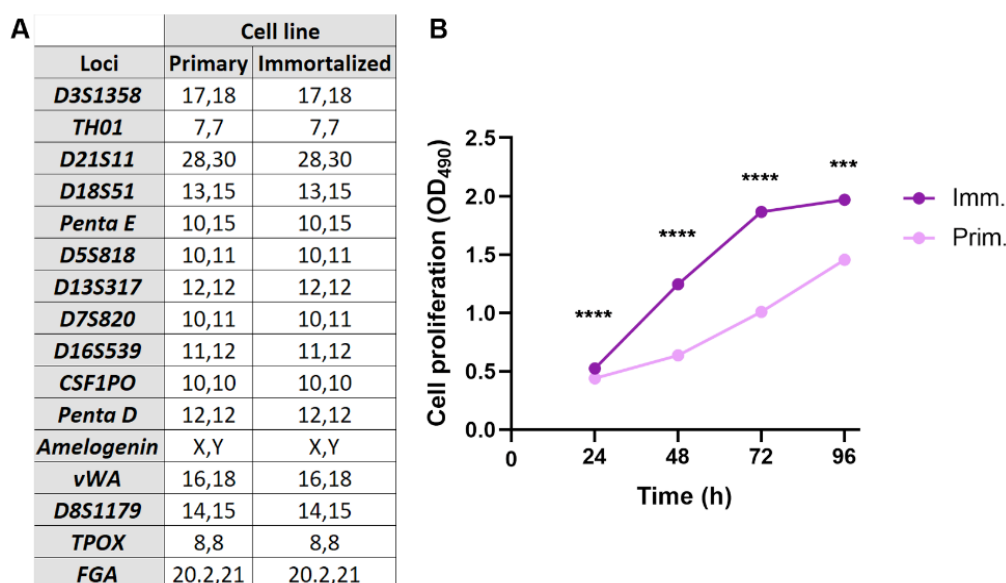


Figura 21. Validación de la línea de mioblastos inmortalizados LGMDD2. (A) Perfil STR de mioblastos LGMDD2 primarios e inmortalizados. Los números indican el número de repeticiones por alelo en el locus correspondiente en las líneas celulares indicadas. (B) Curvas de absorbancia a 490 nm, correspondientes a la cantidad de formazan, que representan el potencial de proliferación celular de los mioblastos LGMDD2 primarios (Prim.) e inmortalizados (Imm). Las medidas se tomaron a las 24, 48, 72 y 96 h de cultivo. Los asteriscos indican diferencias significativas en las comparaciones entre ambas líneas en cada momento. ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$, según prueba t de Student.

Puesto que estudios en biopsias de pacientes LGMDD2 y en el modelo de *Drosophila* demostraron que la proteína TNPO3 estaba regulada al alza¹⁸, el primer paso en la caracterización del modelo celular fue cuantificar la expresión de TNPO3. Concretamente, se midieron los niveles de mRNA y proteína en las tres líneas celulares a los 0, 4 y 7 días de diferenciación (Fig. 22A-B). En las células control, los transcritos de *TNPO3* aumentaron a medida que las células se diferenciaban en miotubos, alcanzando casi el doble de expresión en el día 7 que en el día 0 ($P = 0.0071$; Fig. 22A). Este efecto no fue tan evidente para la proteína, aunque se observó una tendencia (Fig. 22B). En miotubos LGMDD2, cuantificamos una sobreexpresión de TNPO3 en mRNA y proteína, que pasaron de 1.5 a 3 veces en comparación con el control, respectivamente. Además, en las células editadas, los niveles de TNPO3 disminuyeron al nivel de los miotubos control en todas las condiciones evaluadas.

Seguidamente, mediante *western blot*, comprobamos la especificidad del anticuerpo anti-TNPO3mut diseñado para detectar los 15 aminoácidos propios de la mutación *c.2771delA*. Esto se consiguió incubando extractos de células control y LGMDD2 con el suero pre-inmune y el anti-TNPO3mut y sólo detectando una banda de, aproximadamente 100 kDa, en los mioblastos LGMDD2 (Fig. 22C). Después, corroboramos la especificidad del anticuerpo al analizar las tres líneas de mioblastos inmortalizados y no detectar la banda correspondiente a TNPO3mut ni en las células sanas ni en las editadas con CRISPR.

Resultados

Además, los niveles de expresión de TNPO3mut en las células enfermas no cambiaron significativamente a lo largo de la diferenciación en miotubos (Fig. 22D).

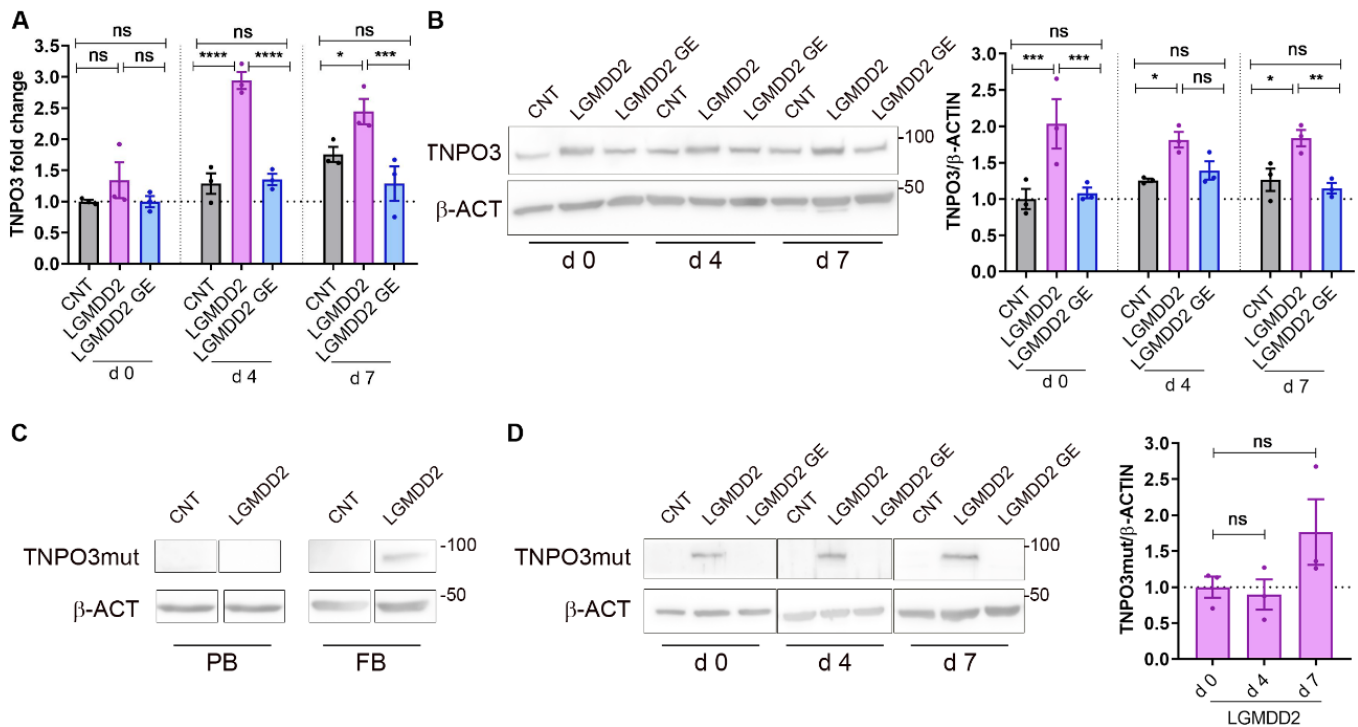


Figura 22. Los fenotipos causados por TNPO3mut se restauran en células corregidas con CRISPR-Cas9. (A) Cuantificación de *TNPO3* por *qRT-PCR* en mioblastos control (CNT; gris), *LGMD2* (LGMD2; morado) y mioblastos *LGMD2* editados con CRISPR-Cas9 (LGMD2 GE; azul). Se cuantificó *TNPO3* en células diferenciadas 0, 4 o 7 días y se normalizó frente a la media de los niveles de expresión de los genes constitutivos *GAPDH*, *GPI* y *HPRT1*. Todos los valores se relativizaron a los de CNT 0 días (línea discontinua) ($n = 3$). (B) Membranas representativas de *western blot* y cuantificación de *TNPO3*. Para normalizar los niveles de proteína se utilizó β -actina como control endógeno ($n = 3$). (C) Membranas de *western blot* de *TNPO3mut* en mioblastos CNT y *LGMD2* diferenciados 7 días. Las membranas se incubaron con suero preinmune (*prebleed*, PB) y anti-*TNPO3mut* (*final bleed*, FB) en las mismas condiciones. (D) Membranas de *western blot* y cuantificación de *TNPO3mut* en las mismas condiciones descritas en A ($n = 3$). Los valores se normalizaron a la señal detectada en células *LGMD2* en el día 0 de diferenciación. En todas las membranas se muestran los tamaños del peso molecular en kDa. Los gráficos de barras muestran la media $\pm$ SEM. ns: no significativo; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$ según la prueba ANOVA de una vía.

En biopsias de pacientes *LGMD2* se había identificado una señal citoplasmática de *TNPO3* más débil y desorganizada respecto a la señal de biopsias control¹⁴⁰. Para evaluar este fenotipo sobre la localización subcelular en nuestro modelo *in vitro*, realizamos inmunodetecciones de *TNPO3* (mutante y normal) con un anticuerpo policlonal a los 0 y 7 días de diferenciación (Fig. 23A-F). Observamos señales puntiformes nucleares y citoplásmicas en las células control y modelo a ambos tiempos de diferenciación, siendo una señal más débil en las células enfermas. Esto coincide con las observaciones en biopsias *LGMD2* y podría relacionarse con la deficiente función de *TNPO3*. Además,

tras la corrección de la mutación por CRISPR, el patrón e intensidad de TNPO3 era similar al de células control.

La TNPO3 actúa transportando proteínas SR al núcleo, las cuales están involucradas en el *splicing* y, también, en la estabilidad y traducción del mRNA entre otras funciones ^{28,141}. Teniendo en cuenta lo anteriormente comentado y dadas las similitudes en los fenotipos relacionados con la debilidad muscular y la atrofia entre la DM1 y *LGMDD2* ¹⁴², hipotetizamos que el *splicing alternativo* del gen que codifica para la isoenzima *PKM* (*pyruvate kinase M*) podría estar alterado en *LGMDD2*. Brevemente, el uso mutuamente excluyente del exón 9 o 10 produce las variantes de transcripción *PKM1* o *PKM2*, respectivamente. *PKM2* se induce específicamente en pacientes con DM1 y se ha sugerido que afecta la homeostasis metabólica y causa déficits de energía asociados con debilidad y desgaste muscular ¹⁴³. Con todo, analizamos este *splicing* en el modelo celular de *LGMDD2* y encontramos niveles significativamente mayores de isoforma *PKM2* respecto a las células control. Los niveles aumentados de *PKM2* se restablecieron tras la edición por CRISPR (Fig. 23G). Por lo tanto, nuestros datos respaldan que el *splicing* alternativo está alterado en la *LGMDD2*, al menos en el gen *PKM*.

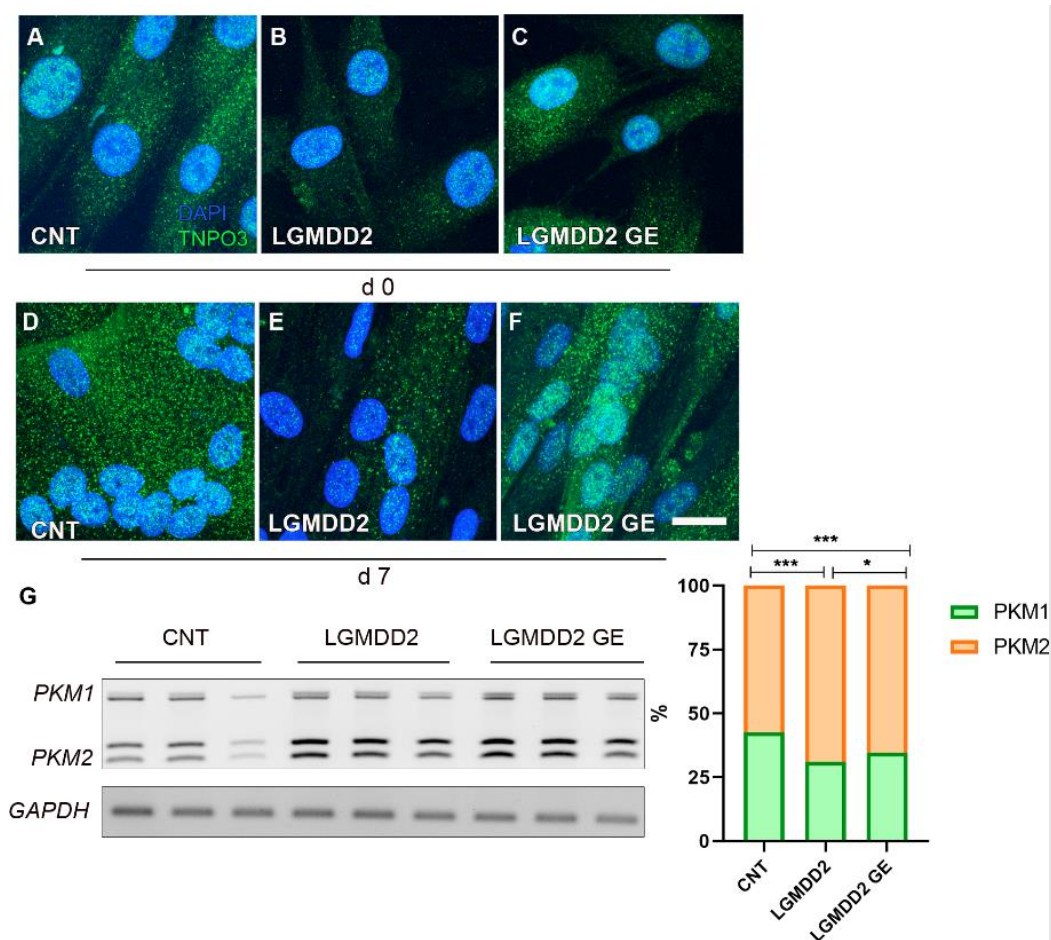


Figura 23. Los fenotipos causados por TNPO3mut se restauran en células corregidas con CRISPR-Cas9. (A-F) Imágenes representativas de inmunodetección de TNPO3 (verde) en las tres líneas de mioblastos a día 0 (A-C, respectivamente) y a 7 días de diferenciación (D-F). Los núcleos se tiñeron con DAPI y la barra de escala es de 20 μ m. (G) Geles de agarosa de análisis semicuantitativos de RT-PCR de las isoformas de *PKM* y porcentaje de mRNA

Resultados

de *PKM1* y *PKM2* en las células indicadas. Los gráficos de barras muestran la media $\pm$ SEM. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$; según la prueba ANOVA de una vía.

Cabe destacar que todos estos ensayos se realizaron con un único clon de mioblastos *LGMD2* editados con CRISPR-Cas9. Pero, posteriormente, evaluamos la edición por CRISPR de seis clones adicionales para así poder confirmar el potencial terapéutico de la edición génica en *LGMD2*. Con ello validamos el efecto de restauración de los niveles de TNPO3 total tras la edición de la mutación en los seis clones adicionales corregidos por CRISPR (Fig. 24A-B), y tampoco detectamos la proteína TNPO3mut en ninguno de estos seis clones editados (Fig. 24C).

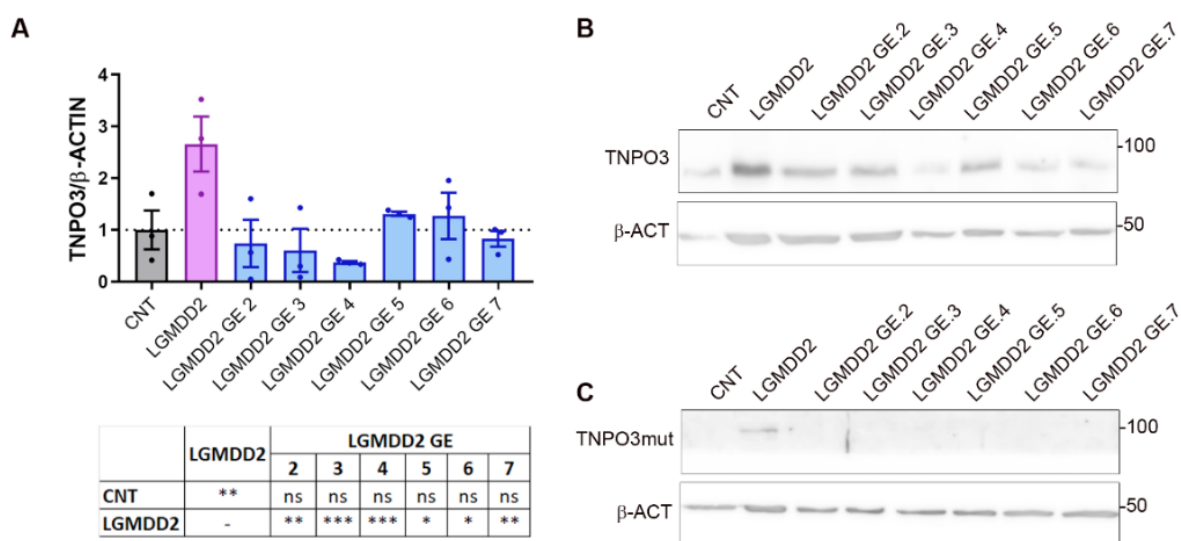


Figura 24. Los resultados obtenidos para *LGMD2* GE se confirman en líneas de mioblastos editados adicionales. (A, B) Cuantificación y membranas de *western blot* de TNPO3 en mioblastos control (CNT; gris), *LGMD2* (*LGMD2*; morado) y seis líneas celulares editadas con CRISPR-Cas9 (*LGMD2* GE 2-7; azul). Todos los valores se normalizaron a la condición CNT (línea discontinua). (C) Membranas de *western blot* para la detección de TNPO3mut en las mismas condiciones descritas en A. En ambas inmunodetecciones se usó β-actina como control endógeno y a la derecha se indica el peso molecular en kDa ($n = 3$). El gráfico de barras muestra la media $\pm$ SEM y la tabla los resultados de la prueba ANOVA de una vía. ns: no significativo; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

2. La edición génica por CRISPR-Cas9 rescata las alteraciones de la proliferación y diferenciación de los mioblastos *LGMD2*

En *LGMD2* podría haber una alteración de la capacidad proliferación de los miotubos tal y como se ha visto en otras *LGMD* ⁴⁰. Por ello, el primer fenotipo funcional que se evaluó de los mioblastos *LGMD2* fue el potencial de proliferación. Los resultados del ensayo de *MTS* confirmaron un aumento significativo de la proliferación en las células modelo en todos los puntos temporales

analizados. En cambio, en las células editadas con CRISPR-Cas9 se observó un rescate del potencial de proliferación a las 24, 48 y 72 h (Fig. 25).

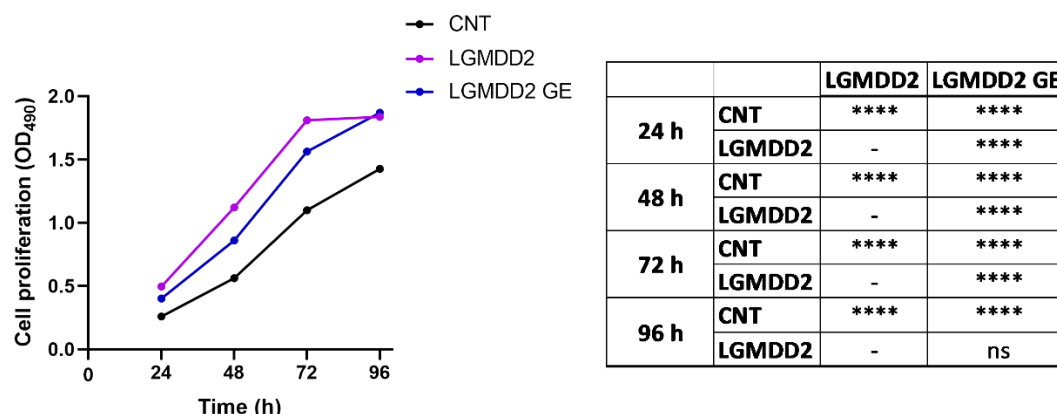


Figura 25. La edición génica por CRISPR-Cas9 restaura el potencial de proliferación de los mioblastos *LGMDD2*.

Curvas de absorbancia a 490 nm, correspondientes a la cantidad de formazan, que representan el potencial de proliferación celular de mioblastos inmortalizados control (CNT), enfermos (*LGMDD2*) y editados genéticamente (*LGMDD2* GE). Las medidas se tomaron a las 24, 48, 72 y 96 h de cultivo. Los asteriscos de la tabla indican diferencias significativas en las comparaciones entre ambas líneas en cada momento. ns: no significativo; ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$, según prueba t de Student.

Seguidamente, dado que la capacidad de diferenciación de las células musculares está alterada también en otras *LGMD* y en diferentes trastornos neuromusculares^{40,119,144}, decidimos estudiarla en mioblastos *LGMDD2*. Para abordar los cambios en la fusión de mioblastos y el diámetro de los miotubos asociados a *LGMDD2*, realizamos una inmunotinción de Desmina en las tres líneas celulares a 0 y 7 días de diferenciación (Fig. 26A-F). Brevemente, la Desmina es el mayor filamento intermedio de tipo III, específico de músculo, esencial para una correcta estructura y función muscular³⁹. La inmunotinción de Desmina de células indiferenciadas no mostró diferencias entre las tres líneas celulares, ya que no se detectó fusión. En miotubos *LGMDD2* diferenciados durante 7 días, ambos parámetros se redujeron significativamente a la mitad en comparación con los controles; mientras que las células corregidas con CRISPR recuperaron parcialmente la capacidad de fusión y el diámetro (Fig. 26G, H, respectivamente).

Resultados

También realizamos inmunotinción de MHC en las mismas células diferenciadas 7 días (Fig. 26I-L). La MHC es la proteína motora de los filamentos gruesos del músculo, y su inmunodetección sirve como marcador de la diferenciación tardía de miotubos³⁹. Nuestros análisis confirmaron la alteración de la diferenciación muscular terminal de las células LGMDD2, en las que menos del 10% de los núcleos correspondían a células positivas para la tinción con MHC (MHC⁺), en comparación con el 65% en los miotubos control. Similar al índice de fusión y diámetro de los miotubos, la edición CRISPR de la mutación fue suficiente para mejorar significativamente este fenotipo, mostrando el doble de núcleos de miotubos MHC⁺ que en las células enfermas (Fig. 26L). Se obtuvieron resultados similares de ambas inmunodetecciones con otros seis clones editados (Fig. 27).

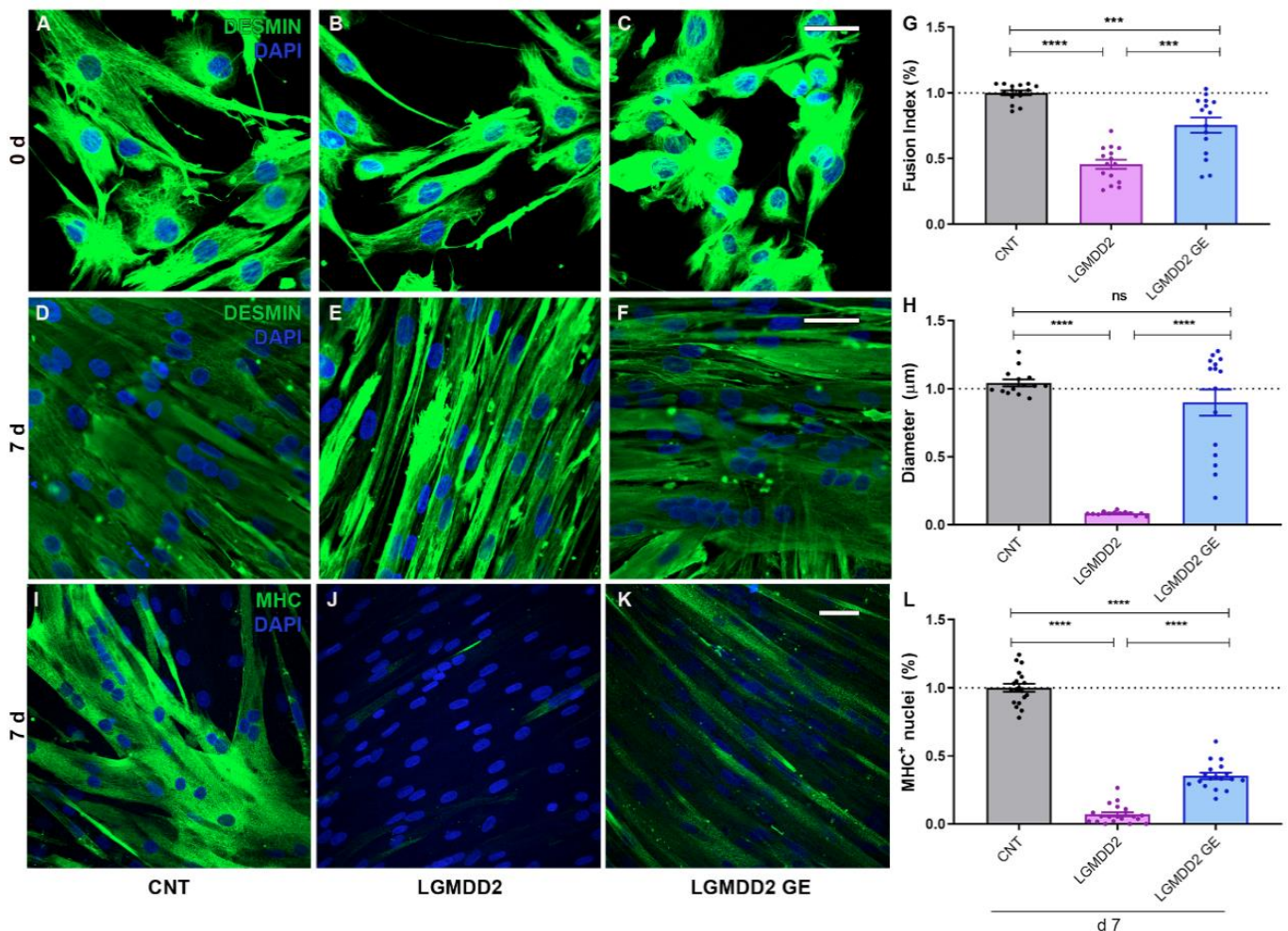


Figura 26. La edición génica por CRISPR-Cas9 mejora los defectos de diferenciación de los mioblastos *LGMDD2*.

(A–F) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de Desmina (verde) en mioblastos control (CNT, A, D), LGMDD2 (B, E) y mioblastos *LGMDD2* editados con CRISPR-Cas9 (*LGMDD2* GE; C, F) a día 0 (A–C) y 7 (D–F) de diferenciación. (G, H) Cuantificación del índice de fusión miogénica y diámetro de miotubos de las líneas celulares anteriores. (I–K) Micrografías representativas de inmunofluorescencia de MHC (verde) de las mismas líneas de mioblastos al séptimo día de diferenciación. (L) Cuantificación del porcentaje de núcleos dentro de las células teñidas con MHC (MHC⁺) en cada condición. Los núcleos se teñieron con *DAPI* y las barras de escala son de 40 μm en ambas inmunodetecciones. Todos los datos se normalizaron a la condición CNT. Los gráficos de barras muestran la media ± SEM. ns: no significativo; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$ según la prueba ANOVA de una vía.

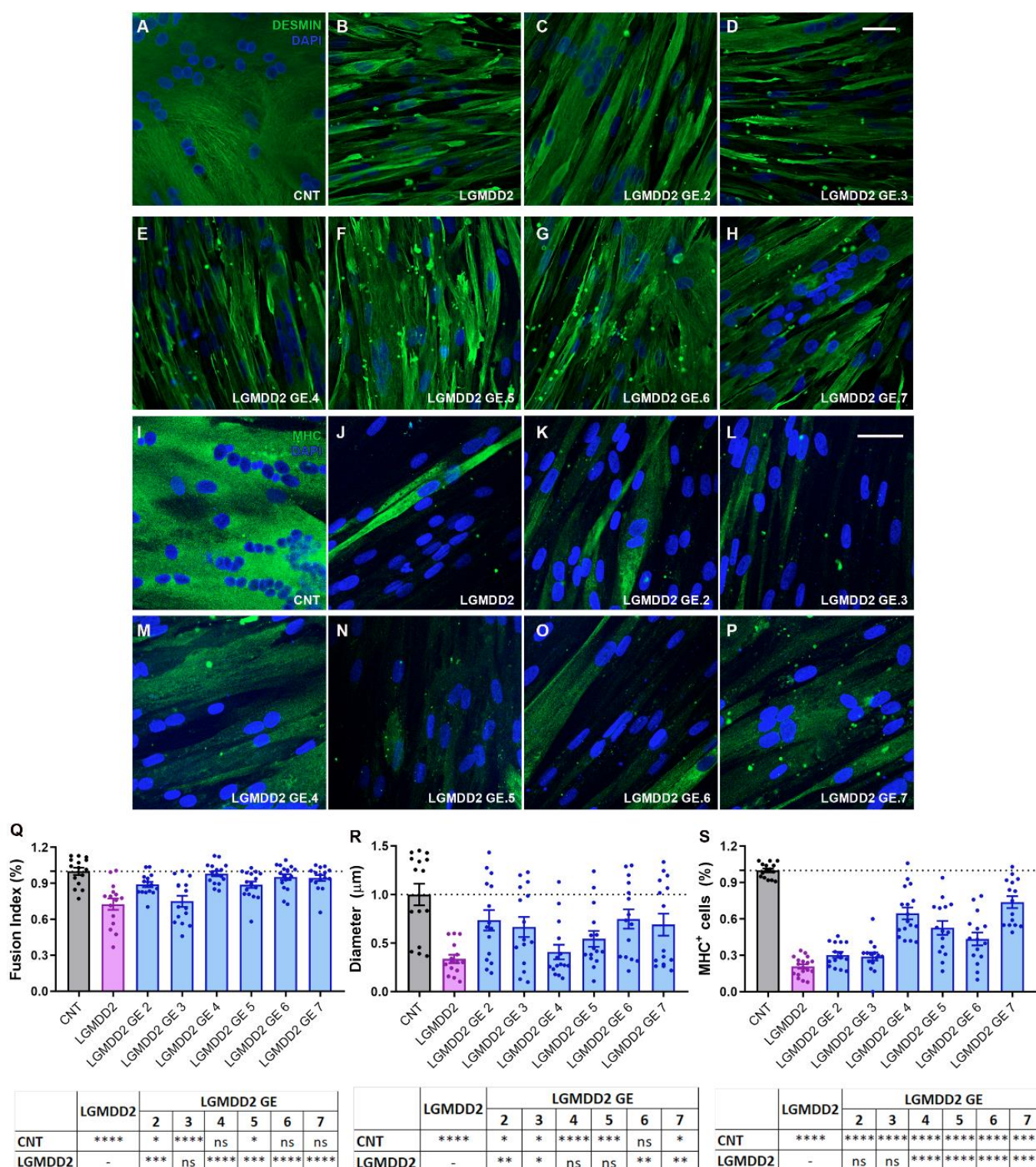


Figura 27. Los seis clones editados adicionales mejoran fenotipos de *LGMD2* de forma similar. (A-H) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de Desmina (verde) en células control (CNT; A), *LGMD2* (B) y seis clones diferentes editados con CRISPR-Cas9 (C-H) de 7 días de diferenciación. (I-P) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de MHC (verde) en las mismas condiciones que las presentadas en A-H. Los núcleos se contrastaron con *DAPI*. Las barras de escala representan 40 μm. (Q, R) Cuantificación del índice de fusión miogénica y el diámetro de los miotubos de A-H. (S) Cuantificación del porcentaje de núcleos dentro de las células teñidas con MHC (MHC⁺) en cada condición de I-P. Todos los datos se normalizaron a la condición CNT. Los

Resultados

gráficos de barras muestran la media $\pm$ SEM. ns: no significativo; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$ según la prueba ANOVA de una vía.

Conjuntamente, nuestros datos muestran que las células musculares de paciente *LGMDD2* tienen tanto una alteración de la capacidad proliferativa como de diferenciación. Por otro lado, la edición génica de *c.2771delA* con CRISPR-Cas9 es suficiente para rescatar ambos fenotipos en los miotubos *LGMDD2*.

3. La elevada actividad autofágica en mioblastos *LGMDD2* se restaura con la edición génica por CRISPR-Cas9

En el primer objetivo de la presente tesis demostramos que la mosca modelo de *LGMDD2* presenta hiperactivación de la autofagia, congruente con los patrones anormales de los marcadores de autofagia descritos en biopsias de pacientes¹⁷. Con ello, decidimos corroborar la hiperactivación de la autofagia en el modelo celular de *LGMDD2*. En primer lugar, realizamos inmunodetección de la proteína autofágica LC3 (Fig. 28A-D). Se detectó un patrón punteado claro y más intenso en los miotubos modelo en comparación con los controles. El patrón punteado corresponde a LC3 conjugado con fosfatidiletanolamina unida a la membrana de los autofagosomas (LC3II)¹⁴⁵. En las células editadas, por el contrario, la señal se parece a la observada en los controles, volviéndose predominantemente citoplasmática y difusa, lo que indica la presencia de LC3I soluble y, en consecuencia, niveles reducidos de autofagia. La cuantificación del número de puntos LC3-II/unidad de área celular confirmó un aumento significativo de la autofagia de 2 veces en los mioblastos modelo y una reducción en las células corregidas por CRISPR (Fig. 28D).

Por otro lado, también se realizó la cuantificación de una de las principales proteínas autofágicas mediante *western blot*: ATG7 (Fig. 28E). La proteína ATG7 promueve el crecimiento del fagóforo mediante la lipidación de ATG8 a través de su actividad enzimática similar a E1¹⁴⁶. En las células enfermas observamos un aumento de 2 veces en la expresión de ATG7 en comparación con los controles. Además de la sobreactivación de la autofagia, quisimos estudiar si había alteraciones en el flujo autofágico del modelo celular, tal y como habíamos visto en el modelo de *Drosophila* previamente. Para ello, primero cuantificamos los niveles de LC3 soluble (LC3I) y asociado al autofagosoma (LC3II). La ratio LC3II/LC3I indicó activación del flujo autofágico en células *LGMDD2*, que se restaura en las células editadas con CRISPR (Fig. 28E). Esto también se confirmó en los seis clones editados adicionales (Fig. 28F). Además, cuantificamos los niveles de P62, una proteína de andamiaje que transporta cargas comprometidas con la degradación lisosomal al autofagosoma y que se elimina ella misma por actividad autofágica^{147,148}. En las células de paciente detectamos una reducción de P62

de aproximadamente 3 veces, comparado con las células control; mientras que en las células corregidas con CRISPR los niveles de P62 eran similares a los del control (Fig. 28E). Esta disminución de P62, junto con el aumento de LC3II/LC3I, confirman el aumento de flujo autofágico en el modelo celular y su rescate con la edición por CRISPR.

Finalmente, la sobreactivación de la autofagia por TNPO3mut se corroboró con la tinción de *LysoTracker* en las tres líneas celulares. Como ya se comentó, *LysoTracker* sirve para observar, de forma semicuantitativa, si hay un aumento o reducción de la actividad autofágica según haya más o menos señal que marque estos compartimentos celulares ácidos. Los resultados de esta tinción confirmaron una mayor actividad de la vía catabólica en *LGMDD2*, al aumentar la señal del *LysoTracker*; mientras que los miotubos editados con CRISPR mostraban un rescate (Fig. 28G-I).

Resultados

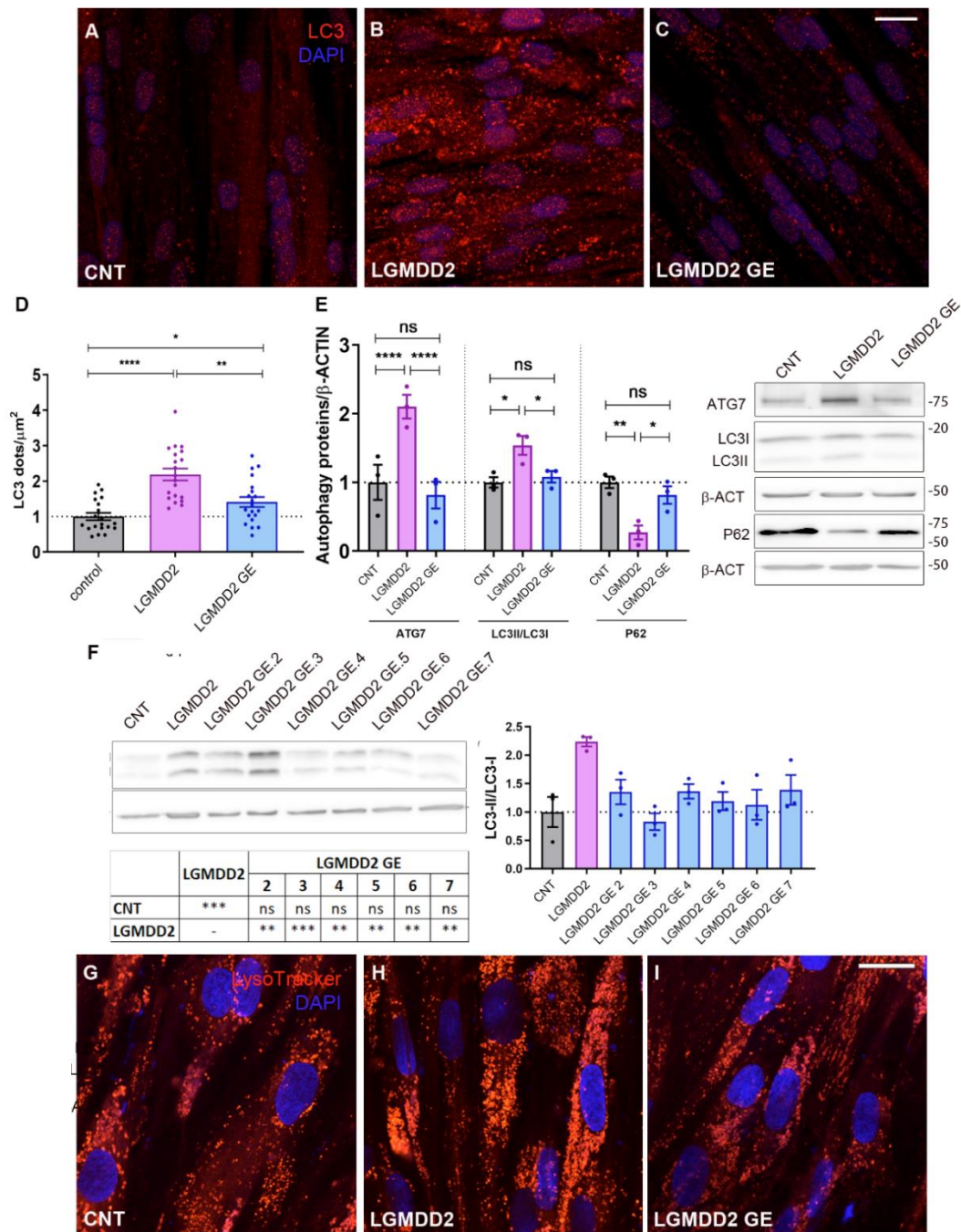


Figura 28. La sobreactivación de la autofagia en los miotubos *LGMDD2* se restaura con la edición CRISPR de la mutación. (A-C) Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencia LC3 (rojo) en miotubos control (CNT; A), modelo de enfermedad (*LGMDD2*; B) y miotubos editados con CRISPR-Cas9 (*LGMDD2* GE; C) diferenciados durante 7 días. (D) Cuantificación de puntos LC3 por micrómetro cuadrado en cada condición que se muestra en A-C. (E) Cuantificación y membranas de *western blots* representativos, con indicación del peso molecular a la derecha en kDa, de la proteína ATG7 total, el ratio LC3-II/LC3-I y P62 en extractos de proteínas de miotubos de las condiciones anteriores. (F) Membranas de *western blot*, cuantificación y tabla estadística del ratio LC3-II/LC3-I en miotubos CNT, *LGMDD2* y seis clones diferentes de mioblastos editados con CRISPR-Cas9 tras 7 días de diferenciación. Se usó β -actina como control endógeno para los *western blots* y los datos se normalizaron a la condición CNT (línea discontinua negra) ($n = 3$). (G-I) Tinción con *LysoTracker* (rojo) de las mismas condiciones de A-C. Los núcleos se tiñeron con *DAPI* y las barras de escala son de 20 μm . Los gráficos de barras muestran la media $\pm$ SEM. ns: no significativo; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$ según la prueba ANOVA de una vía.

Por último, como evidencia independiente del aumento del flujo autofágico, utilizamos vectores de expresión de proteínas LC3 y P62 fusionadas con mCherry-GFP. Brevemente, mientras que la señal de mCherry es más estable y permanece, GFP se extingue en un ambiente ácido. De este modo, la colocalización de la fluorescencia de GFP y la de mCherry (señal amarilla) 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 (señal roja) corresponde a una vesícula de autofagosoma que se ha fusionado con un lisosoma (autofagolisosoma) ¹³². De acuerdo con esto, la transfección de mCherry-GFP-LC3 denota una señal de mCherry dominante en *LGMDD2* en comparación con los miotubos sanos, lo que indica un mayor flujo autofágico en el modelo de la enfermedad (Fig. 29A, B). En cambio, en las células editadas con CRISPR hay un aumento de la señal de GFP sobre la de mCherry, lo que indica un alivio del flujo autofágico excesivo de los miotubos de paciente (Fig. 29C). Además, como control, se trataron las células *LGMDD2* con el inhibidor autofágico CQ, y la señal fue similar a la observada en las células editadas (Fig. 29D). Se obtuvieron resultados similares cuando los mioblastos se transfectaron con mCherry-GFP-P62 (Fig. 29E-H).

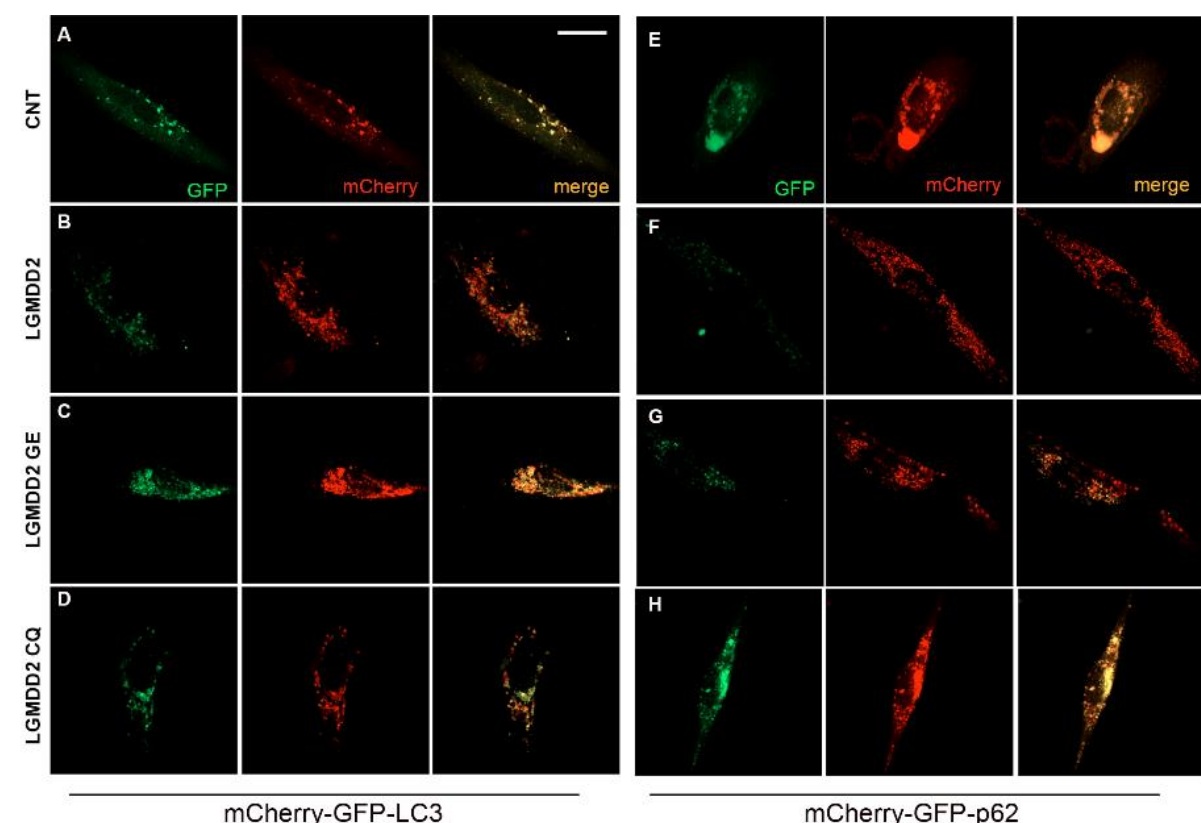


Figura 29. El flujo autofágico se revierte mediante la edición de la mutación por CRISPR-Cas9. Imágenes de microscopía confocal representativas de LC3 (A-D) o p62 (E-H) marcados con reporteros fluorescentes. Los mioblastos CNT, *LGMDD2* y *LGMDD2* GE se transfectaron con plásmidos mCherry-GFP-LC3 (A-C) o mCherry-GFP-p62 (E-G). Las células modelo de la enfermedad también se trataron con CQ a 10 μ M durante 16 h como control positivo del bloqueo de la autofagia (D, H). Las imágenes combinadas (amarillo) muestran la superposición de GFP (verde) y mCherry (rojo). La barra de escala representa 20 μ m.

Resultados

En conjunto, nuestros datos respaldan la hipótesis de que, por un lado, hay un aumento del flujo autofágico en los mioblastos derivados del paciente *LGMDD2* y, por otro lado, de que la edición génica de *c.2771delA* de *TNPO3* es suficiente para restaurar la actividad autofágica normal. Esta hiperactivación de la ruta autofágica indica que hay un exceso de degradación proteica, que podría estar contribuyendo a la desregulación de la homeostasis muscular en los pacientes.

4. La edición génica por CRISPR-Cas9 restaura la expresión de genes y miRNAs relacionados con la *LGMDD2*

Para profundizar sobre el impacto de la mutación *LGMDD2* y la corrección mediante CRISPR del modelo celular, con la ayuda del colaborador bioinformático Jorge Espinosa, abordamos el estudio de expresión génica a nivel del transcriptoma de las tres líneas de mioblastos diferenciados durante 7 días. Tras la secuenciación masiva, en total se obtuvieron lecturas para 16.300 genes, de los cuales 2.508 (15%) se expresaron diferencialmente entre miotubos control y los *LGMDD2* y se consideraron genes relacionados con la enfermedad (*Disease Related Genes, DRG*). Observamos una distribución homogénea entre la expresión génica regulada al alza o a la baja (1.236 y 1.272, respectivamente) (Fig. 30A). Resaltar la disminución significativa de *MyoG* y *MyoD*, con una función en activar la diferenciación de los mioblastos, ya que corrobora nuestros datos de diferenciación afectada del modelo celular *LGMDD2*. No obstante, cabe destacar que *TNPO3* no estaba aumentada significativamente en los mioblastos enfermos. Además, la expresión de los *DRG* se analizó en las células editadas por CRISPR-Cas9 y se clasificaron en cuatro categorías: (1) genes que no cambiaron significativamente con el tratamiento (no recuperados), (2) genes que se recuperaron entre 10-50% de la expresión normal (parcialmente recuperados), (3) genes que recuperaron entre el 50-150% de la expresión normal (totalmente recuperados) y (4) genes que cambiaron por encima del 150% de la expresión normal (sobrerrecuperados). Con esto encontramos que el 44% de *DRG* se recuperó significativamente con la edición CRISPR (729 parcialmente, 344 totalmente y 37 sobrerrecuperados; Fig. 30B).

Posteriormente, nos enfocamos en el 29% de genes totalmente recuperados (Fig. 30C). El agrupamiento no supervisado por distancia euclidiana mostró que la mayoría de los *DRG* rescatados por la edición CRISPR estaban sobreexpresados en células enfermas. Además, como muestra el dendrograma, el perfil de expresión de las células editadas estaba más cerca de los miotubos control que de *LGMDD2*.

Finalmente, realizamos un análisis de sobrerrepresentación (*ORA*; *P-valor* < 0.05) de la anotación funcional, considerando las rutas *GO* (Fig. 30D). Al realizar diferentes comparaciones identificamos

rutas alteradas por la enfermedad (CNT vs. *LGMDD2*; englobadas como "Enfermedad"), rutas que se aproximan a la expresión normal tras el editado génico (CNT vs. *LGMDD2* GE; "Tratamiento") y rutas que responden a la manipulación (*LGMDD2* vs. *LGMDD2* GE; "Especificidad"). La recuperación significativa implica que la comparación de tratamiento ya no se enriquece significativamente (por lo tanto, faltan puntos) y las comparaciones de enfermedad y especificidad se enriquecen significativamente. De particular interés fueron las rutas de señalización Wnt y BMP, que se recuperaron significativamente y de forma específica tras la edición con CRISPR. Estas rutas tienen efectos pleiotrópicos en la fisiología muscular ¹⁴⁹ y constituyen objetivos principales para una comprensión mecánica de la patogénesis de la enfermedad.

Debido a que la mayor parte del transcriptoma no recuperó los niveles normales con el editado por CRISPR, planteamos la hipótesis de que las alteraciones epigenéticas podrían soportar la manipulación genética y contribuir a los cambios en la expresión génica tras haber revertido la mutación original. La epigenética abarca la metilación del DNA, la variación de la cromatina y los RNA no codificantes, en particular los miRNAs ^{150,151}. Brevemente, los miRNAs son RNA monocatenarios no codificantes, de entre 21-25 nt, que están conservados evolutivamente y son capaces de regular la expresión génica a nivel postranscripcional. Los miRNAs expresados exclusivamente en músculo han sido etiquetados como *myomiRs*, que representan una parte integral del desarrollo y regeneración del músculo esquelético ¹⁵². Además, en el contexto patogénico, los miRNAs representan moléculas de gran relevancia debido a su implicación en enfermedades musculares, como en DM1 ^{120,153}, y su desregulación puede fomentar la atrofia muscular. De hecho, durante los últimos años se están desarrollando un número creciente de fármacos dirigidos a los miRNAs relacionados con miopatías ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Con todo, decidimos estudiar el miRNoma como una posible explicación del mantenimiento de los fenotipos de la enfermedad tras la edición génica. Tras la secuenciación de los pequeños RNAs de las tres líneas celulares y el posterior análisis del miRNoma, identificamos 764 miRNAs, de los cuales 214 se expresaron diferencialmente (28%) en los miotubos *LGMDD2* respecto al control. Especialmente, se observó una disminución de los principales *myomiRs* en los miotubos de paciente, *miR-1*, *miR-133a*, *miR-133b*, *miR-206*, *miR-208b*, *miR-486*, *miR-499a*, implicados en diferenciación y/o proliferación del músculo ¹⁵⁷. Mencionar también que se ha visto la disminución de dos miRNAs, *miR-128* y *miR-155*, los cuales inhiben la expresión de TNPO3 ^{158,159}, y el aumento observado en *miR-29b*, el cual está implicado en diferentes tipos de atrofia muscular ¹⁶⁰. Por último, añadir que de los miRNAs alterados en *LGMDD2*, alrededor del 49% se recuperó en la línea editada, mientras que el 50% permaneció sin cambios y el 1% restante de miRNAs se recuperó en exceso (Fig. 30E, F).

Resultados

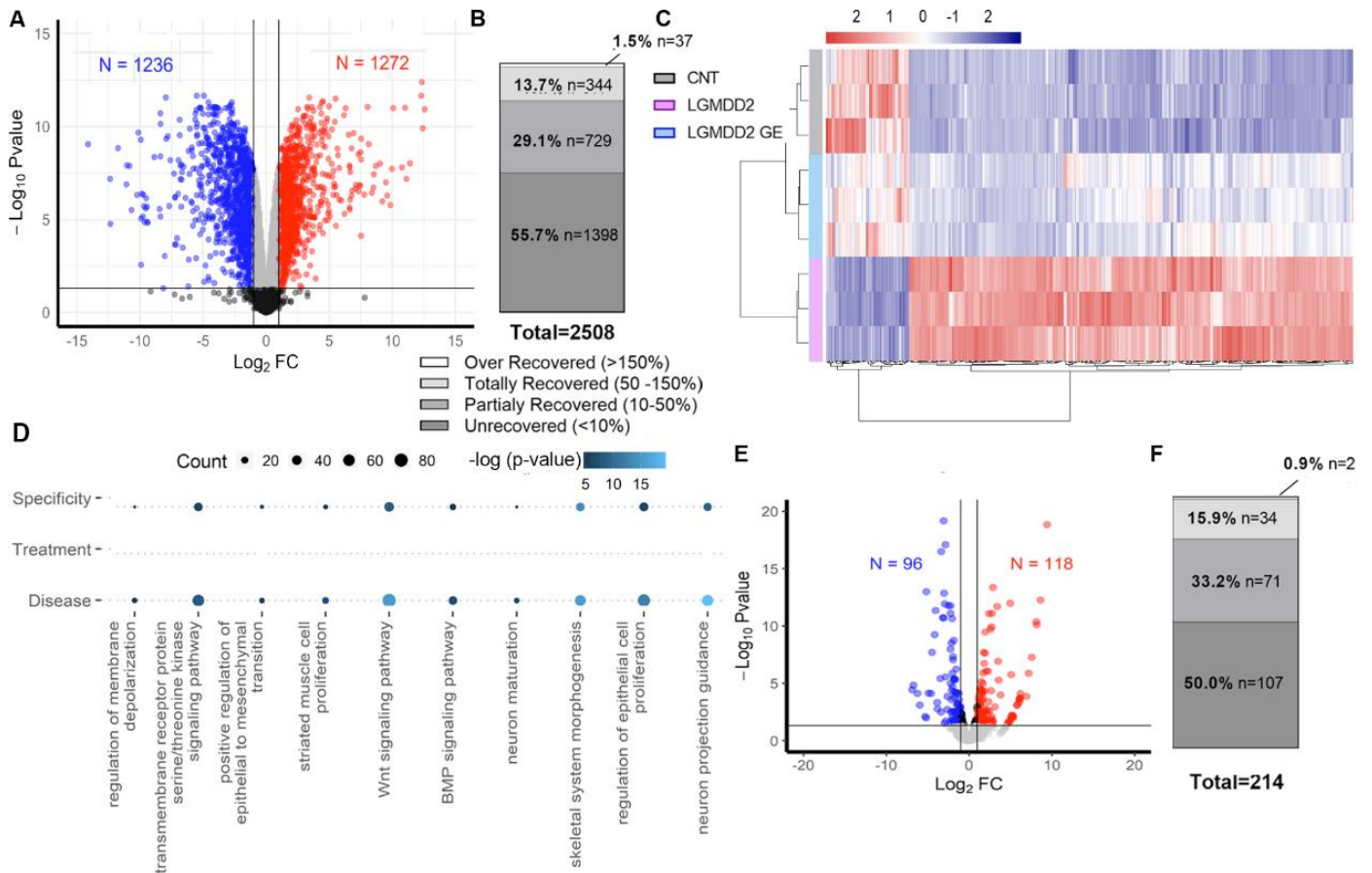


Figura 30. Parte de los cambios en el transcriptoma del modelo celular de *LGMDD2* se rescatan significativamente con la edición CRISPR-Cas9. (A) Volcano plot que representa genes expresados diferencialmente entre los miotubos control y *LGMDD2*. Las líneas negras indican $|\log_2 FC| = 1$ en el eje X y $|\log_{10} P\text{-value}| = 1.3$ en el eje Y, que son los umbrales de *Fold Change* (FC) y de significancia para identificar los genes expresados diferencialmente de forma significativa (DRG). Los puntos representan genes regulados a la baja (azul) o regulados al alza (rojo). (B) Porcentaje de los DRG cuya expresión, tras la edición con CRISPR, no se recuperaba o se recuperaba parcial, totalmente o que sobre recuperaban. (C) *Heat-map* que muestra la expresión de los DRG totalmente recuperados tras la edición CRISPR, en los miotubos sanos (CNT), enfermos (*LGMDD2*) o editados (*LGMDD2* GE), según la escala: rojo = sobreexpresado; azul = subexpresado. (D) Representación del análisis de sobrerepresentación considerando las rutas de *Gene Ontology*. Cada punto representa una ruta significativamente sobrerepresentada, su tamaño representa el recuento de genes alterados y el color denota la significancia de esta sobrerepresentación (*P-value*). Se hacen tres comparaciones: Disease (CNT vs. *LGMDD2*), Treatment (CNT vs. *LGMDD2* GE) y Specificity (*LGMDD2* vs. *LGMDD2* GE). (E) Volcano plot de los miRNAs expresados diferencialmente entre los miotubos control y *LGMDD2*, con las mismas condiciones que en (A). (F) Porcentaje de miRNAs no recuperados, recuperados parcial, totalmente o sobre recuperados después de la edición CRISPR de la mutación *TNPO3*.

En resumen, el análisis del *RNA-seq* aporta el listado de DRG y *miRNAs* alterados en el modelo celular de *LGMDD2* y confirma que parte de estas alteraciones se recuperan en las células genéticamente editadas con CRISPR. Además, hemos comprobado que esta recuperación parcial del transcriptoma podría deberse a que las dianas de los miRNAs no recuperados permanecen alteradas

en las células editadas. Esto corrobora nuestra hipótesis de que hay alteraciones epigenéticas en el modelo celular de *LGMDD2*, las cuales podrían estar contribuyendo de forma indirecta a la patología.

5. La mutación en *TNPO3* causante de *LGMDD2* induce cambios en el proteoma

Considerando que el estudio de la expresión génica a nivel de transcriptoma analiza un número de genes considerable (16.300), aportando información relevante, los resultados no siempre pueden indicar qué proteínas se acaban expresando, en qué cantidad y en qué forma. En la última década el estudio del proteoma, que examina las proteínas expresadas en un tejido o célula, se utiliza cada vez más en investigación biomédica para complementar los estudios transcriptómicos ^{161,162}. Por ello, decidimos realizar el estudio del proteoma en las líneas de mioblastos control y *LGMDD2* diferenciados a 7 días, y así tener una visión más completa sobre el impacto de la mutación *c.2771delA* de *TNPO3*. Mediante la técnica *SWATH-MS* se cuantificaron un total de 1.739 proteínas, de las cuales 424 (24%) se expresaron diferencialmente de forma significativa entre los miotubos control y los *LGMDD2* y se consideran, entonces, como proteínas relacionadas con la patología. De entre las proteínas expresadas diferencialmente, observamos que una mayoría estaban sobreexpresadas (239) respecto a las subexpresadas (185) en los mioblastos de paciente (Fig. 31A). En cambio, el análisis transcriptómico mostraba una distribución homogénea de la expresión de los *DRG*. Esto sugiere que la mutación de *TNPO3* provoca cambios a nivel traduccional que a nivel de transcriptoma no se aprecian. De hecho, al contrario que en el análisis transcriptómico, el análisis proteómico muestra aumentos significativos en mioblastos enfermos de varias proteínas principales que transporta *TNPO3* ³⁰ como la proteína *SRSF3*, que actúa como factor de *splicing* ¹⁶³, y la helicasa de RNA *DDX5*, la cual se ha visto que está relacionada con *DM1* ¹⁶⁴, entre otras. Además, se ha visto una disminución significativa de la proteína *RAB8A*, reguladora clave del tráfico de membranas intracelulares ¹⁶⁵ (Fig. 31B). Destacar que, según los datos de proteómica, la *TNPO3* no está aumentada de forma significativa en los mioblastos modelo respecto a los sanos.

Resultados

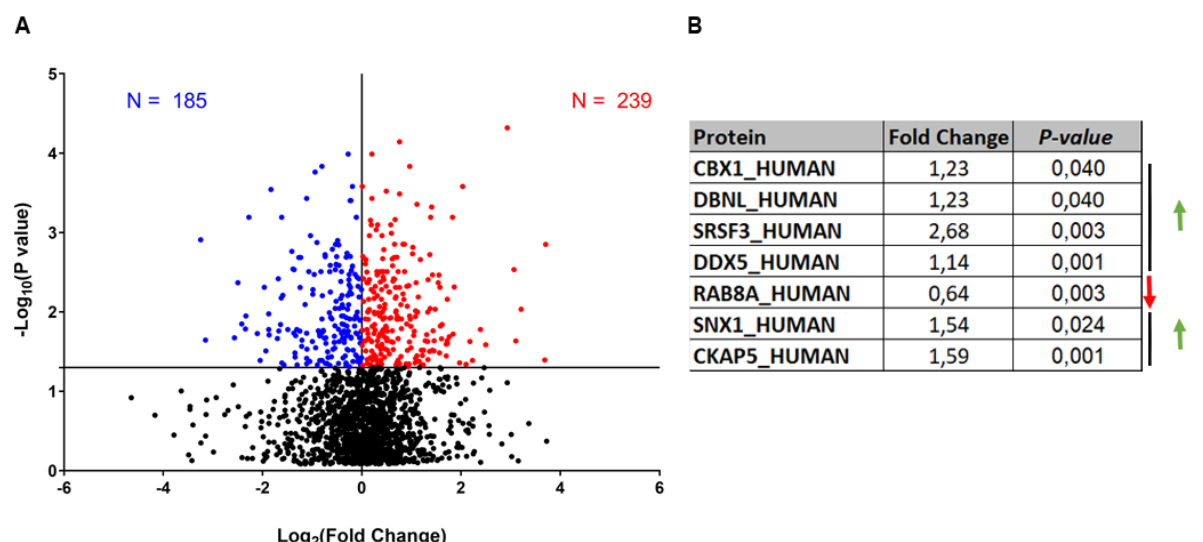


Figura 31. Cambios en la composición proteómica del modelo celular de *LGMDD2*. (A) Volcano plot que representa las proteínas expresadas diferencialmente entre los miotubos control y *LGMDD2*. Las líneas negras indican $|\log_2 \text{Fold Change}| = 0$ en el eje X y $|\log_{10} P\text{-value}| = 1.3$ en el eje Y son los umbrales establecidos para identificar las proteínas expresadas diferencialmente de forma significativa. Los puntos representan proteínas expresadas a la baja (azul) o reguladas al alza (rojo). (B) Listado de proteínas cargo de TNPO3³⁰ identificadas como significativamente alteradas en los mioblastos enfermos. Las flechas en verde muestran las proteínas aumentadas ($\text{Fold Change} > 1$) y la flecha roja la disminuida ($\text{Fold Change} < 1$) de forma significativa ($P\text{-value} < 0.05$).

Tras este análisis inicial, realizamos un estudio de enriquecimiento funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en los mioblastos *LGMDD2*, utilizando la base de datos STRING. Brevemente, STRING tiene como objetivo integrar todas las asociaciones conocidas y predichas entre proteínas en diferentes agrupaciones, según interacciones físicas o funcionales¹²⁶. El enriquecimiento funcional nos ha permitido detectar alteraciones en diferentes rutas de particular interés, agrupadas según la clasificación Kegg (Fig. 32). Concretamente, la ruta del proteasoma está sobreactivada en los mioblastos *LGMDD2*, siendo el sistema UPS uno de los dos principales procesos de degradación de componentes celulares⁴². También se ha visto una alteración en la ruta de fagosomas, que son vesículas necesarias para la formación, en última instancia, de autofagolisosomas durante la autofagia⁴². Esto apoya nuestra hipótesis de que hay una excesiva degradación proteica que podría estar alterando la homeostasis muscular en *LGMDD2*, no sólo a nivel de autofagia (como hemos visto anteriormente en las moscas y mioblastos), sino también a nivel del proteasoma.

Por otro lado, el enriquecimiento funcional demuestra que hay una sobreactivación del espliceosoma en los mioblastos de paciente. Esto sugiere que TNPO3mut altera el *splicing*, pudiendo afectar a la maduración de los pre-mRNAs y, en consecuencia, a la expresión proteica en *LGMDD2*. Por último, destacar la inhibición observada del ciclo del ácido tricarboxílico (también conocido como ciclo de

Krebs) y el metabolismo del piruvato, ya que son dos rutas relacionadas entre sí que demuestran una descompensación en el metabolismo de la glucosa.

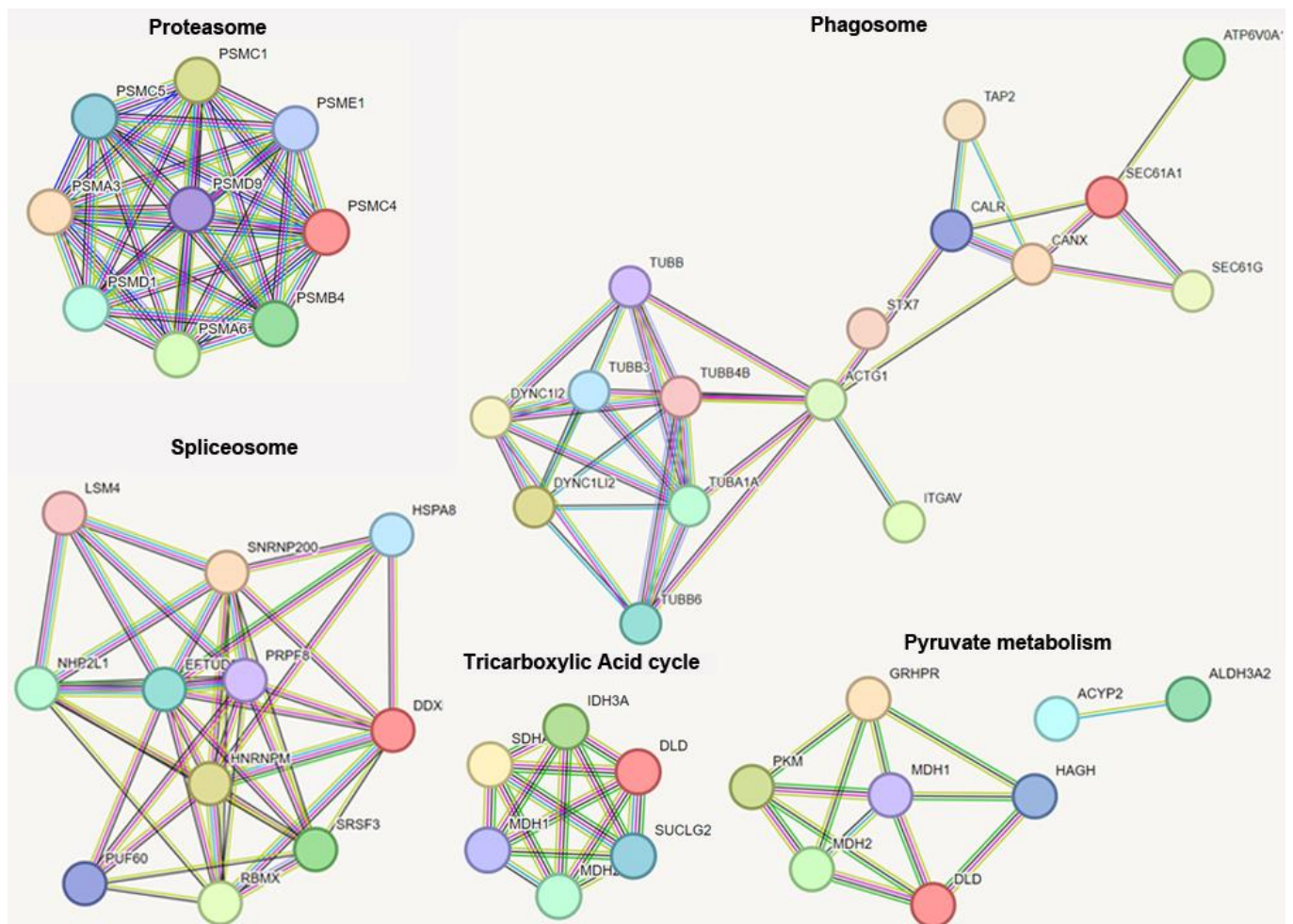


Figura 32. Rutas alteradas en el modelo celular de *LGMD2*. Representación del análisis del enriquecimiento funcional considerando las rutas Kegg. Se muestran algunas de las principales rutas alteradas e identificadas por el software STRING. Cada punto representa una proteína diferencialmente expresada en los mioblastos *LGMD2*. Las líneas representan asociaciones proteína-proteína específicas y significativas, que contribuyen conjuntamente a una función compartida.

En conjunto, el estudio proteómico del modelo celular de *LGMD2* nos permite tener una visión más completa sobre el impacto de la mutación *c.2771delA* en *TNPO3* y, junto con el estudio transcriptómico, nos aporta información relevante que ayudará a comprender mejor los mecanismos moleculares implicados en esta distrofia. Además, nos ha permitido identificar diferentes rutas afectadas en los mioblastos enfermos que permiten profundizar sobre la fisiopatología de la *LGMD2* y corroborar las hipótesis de que hay una relación entre la *TNPO3*mut y la alteración en la degradación proteica y en el *splicing*.

Resultados

Objetivo 4: Validar el efecto terapéutico de los compuestos candidatos en el modelo celular de LGMDD2

1. Seis fármacos candidatos mejoran la capacidad de fusión de los mioblastos LGMDD2

Una vez identificados los 9 fármacos candidatos contra la LGMDD2 mediante el rastreo en el modelo en *Drosophila*, realizado como el Objetivo 2 de la presente tesis, procedimos a validar su efecto en el modelo de mioblastos inmortalizados. Dada la relevancia de la defectiva capacidad de fusión de los mioblastos LGMDD2 y que su estudio permite evaluar varias condiciones en paralelo, seleccionamos este fenotipo para el rastreo secundario de los fármacos candidatos, nombrados a partir de ahora como C1-C9.

En concreto, analizamos el efecto de estos fármacos a diferentes concentraciones entre 4 nM – 25 μ M, en el fenotipo de capacidad de fusión afectada (Fig. 33A-D). A pesar de que el compuesto C2 mostraba un rescate significativo a la dosis de 1 μ M, el resto de las dosis probadas empeoraban el fenotipo de forma significativa, e incluso la dosis 1.5 μ M resultó tóxica para los mioblastos. En su conjunto, consideramos que C2 no era un compuesto válido para continuar nuestro estudio en el modelo celular, al igual que los fármacos C1 y C9 que no rescataban el fenotipo a ninguna dosis probada. En cambio, los fármacos C3-C8 mejoraban el fenotipo de fusión miogénica a diferentes dosis de forma significativa. De hecho, en la mayoría de ellos se observaba una respuesta a dosis, mejorando el fenotipo estudiado incluso en rangos de concentración nM. Entonces, decidimos continuar validando el potencial de estos 6 compuestos sobre diferentes fenotipos caracterizados del modelo celular LGMDD2.

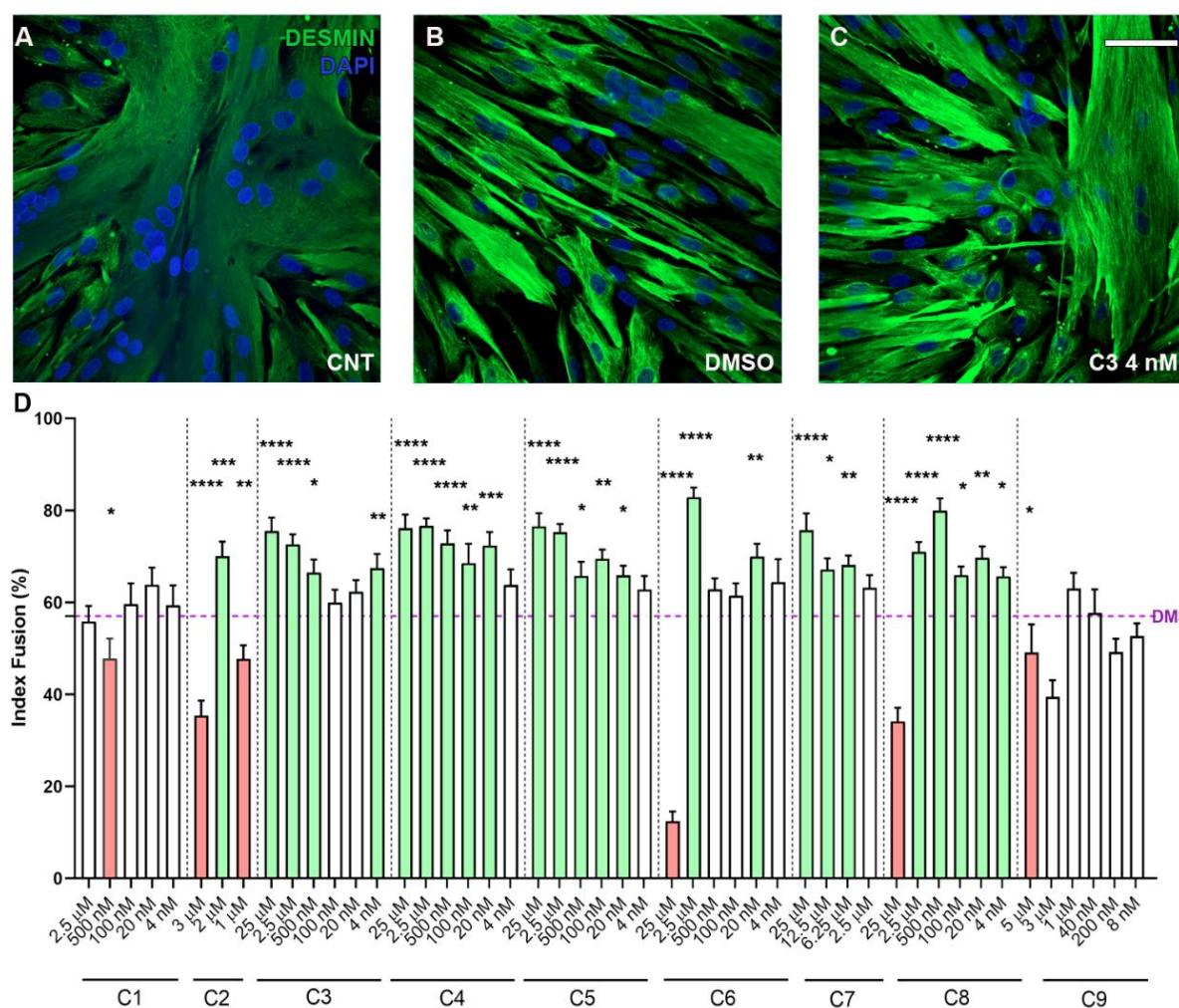


Figura 33. Evaluación de los nueve compuestos identificados en el rastreo *in vivo* sobre la diferenciación del modelo celular de *LGMDD2*. (A–C) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de Desmina (verde) en mioblastos control (CNT, A) y *LGMDD2* tratados con 0.5% DMSO, como vehículo (DMSO, B) y con el compuesto 3 a una dosis de 4 nM (C3 4 nM, C) durante 7 días de diferenciación. Los núcleos se tiñeron con DAPI y la barra de escala es de 40 μ m. (D) Cuantificación del índice de fusión de las células musculares *LGMDD2* tratadas con diferentes dosis (4 nM - 25 μ M) de los 9 compuestos propuestos, durante 7 días de diferenciación. El promedio de los valores obtenidos para mioblastos de paciente sin tratar está representado con una línea discontinua horizontal morada (DMSO) (14 < n < 35). Las barras verdes indican las condiciones que mejoran significativamente el fenotipo de diferenciación del modelo, mientras que las barras rojas indican las condiciones que lo empeoran de forma significativa. Los gráficos de barras muestran la media $\pm$ SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$ según la prueba ANOVA de una vía.

Resultados

2. Los seis fármacos candidatos mejoran niveles de TNPO3mut, LC3 y MHC en mioblastos *LGMDD2*

Tras haber seleccionado los 6 compuestos candidatos, C3-C8, decidimos validar el efecto de cada fármaco sobre los niveles de proteínas clave estudiadas en la anterior caracterización de los mioblastos *LGMDD2*. De entre las distintas dosis que rescataban el índice de fusión, tratamos las células con dos dosis diferentes de cada fármaco para evaluar su efecto en un rango amplio. Concretamente, probamos la concentración efectiva intermedia (2.5 μ M, generalmente) y la más baja de cada fármaco (4, 20 nM y 6.25 μ M). Dada su directa implicación con la *LGMDD2*, lo primero que analizamos fueron los niveles de TNPO3 en los mioblastos modelo tratados, para ver si algún fármaco disminuía su característica sobreexpresión. Sin embargo, ningún tratamiento consiguió este efecto de forma significativa respecto a los mioblastos modelo no tratados (DMSO) (Fig. 34A). En cambio, al analizar los niveles de TNPO3mut en paralelo, vimos que las dosis más bajas de 5 de los compuestos sí disminuían significativamente los niveles de la proteína mutante (Fig. 34B). En este punto pensamos proponer un parámetro que nos permita seleccionar el fármaco más efectivo contra la enfermedad. Partiendo de la hipótesis que TNPO3mut podría ejercer un efecto dominante negativo sobre TNPO3, buscamos fármacos que actuaran o bien reduciendo la cantidad de TNPO3mut, o aumentando la cantidad total de TNPO3, o una combinación de ambos efectos. Para tener una medida cuantitativa con la que priorizar los compuestos candidatos establecimos la relación TNPO3mut/TNPO3, de modo que cuanto menor este parámetro, mejores expectativas de actividad deseable en la *LGMDD2* (Fig. 34C). A pesar de que el compuesto C4 no rescataba significativamente los niveles de TNPO3mut, es de los más efectivos según su relación TNPO3mut/TNPO3. Con todo, tras realizar el ranking de los compuestos testados, proponemos los compuestos C7, C5, C3 y C4 como los cuatro fármacos más efectivos, en sus dosis más bajas probadas. No obstante, para tener una visión más completa del efecto de los seis fármacos, decidimos continuar evaluándolo en posteriores análisis.

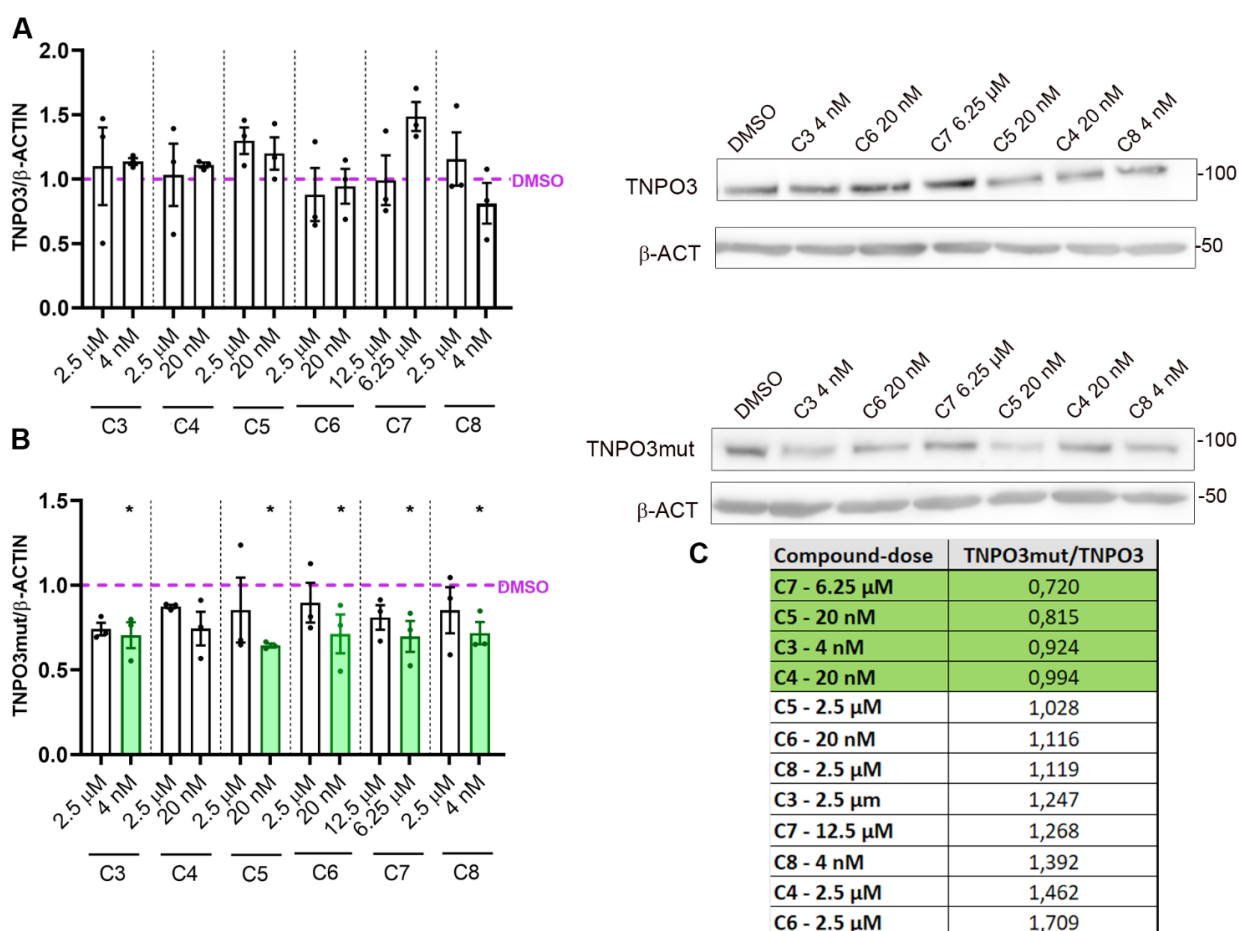


Figura 34. Validación de los seis compuestos propuestos sobre niveles de TNPO3 y TNPO3mut en el modelo celular de LGMDD2. (A, B) Cuantificación y membranas de *western blot* representativas de la proteína TNPO3 (A) y TNPO3mut (B) en extractos de proteínas de mioblastos LGMDD2. Los mioblastos se trataron durante los 7 días de diferenciación con DMSO como vehículo (DMSO) y con los 6 compuestos candidatos (C3-C8) a las dosis que se indica. Se utilizó β -actina como control endógeno y los datos se normalizaron a la condición DMSO (línea morada discontinua) ($n = 3$). En verde se indican las dosis de cada compuesto que rescatan significativamente los niveles de las proteínas cuantificadas. Los gráficos de barras muestran la media $\pm$ SEM. *: $p < 0.05$ según la prueba ANOVA de una vía. (C) Ranking de los compuestos-dosis ordenados por su parámetro TNPO3mut/TNPO3. En verde se resaltan los 3 compuestos-dosis más efectivos en disminuir el parámetro.

Como última parte de la validación, nos propusimos estudiar el efecto de los 6 compuestos sobre proteínas implicadas en dos de los fenotipos caracterizados del modelo celular LGMDD2: el flujo autofágico (ratio LC3-II/LC3-I) y la diferenciación muscular (MHC). En cuanto al flujo autofágico, se ha visto un rescate significativo al tratar las células enfermas con los 6 compuestos a las dosis más bajas, e incluso los compuestos C6-C8 rescatan el fenotipo a ambas dosis probadas (Fig. 35A). No obstante, a nivel de diferenciación (Fig. 35B) sólo los compuestos C5, C7, C8 son capaces de aumentar significativamente los niveles de MHC.

Resultados

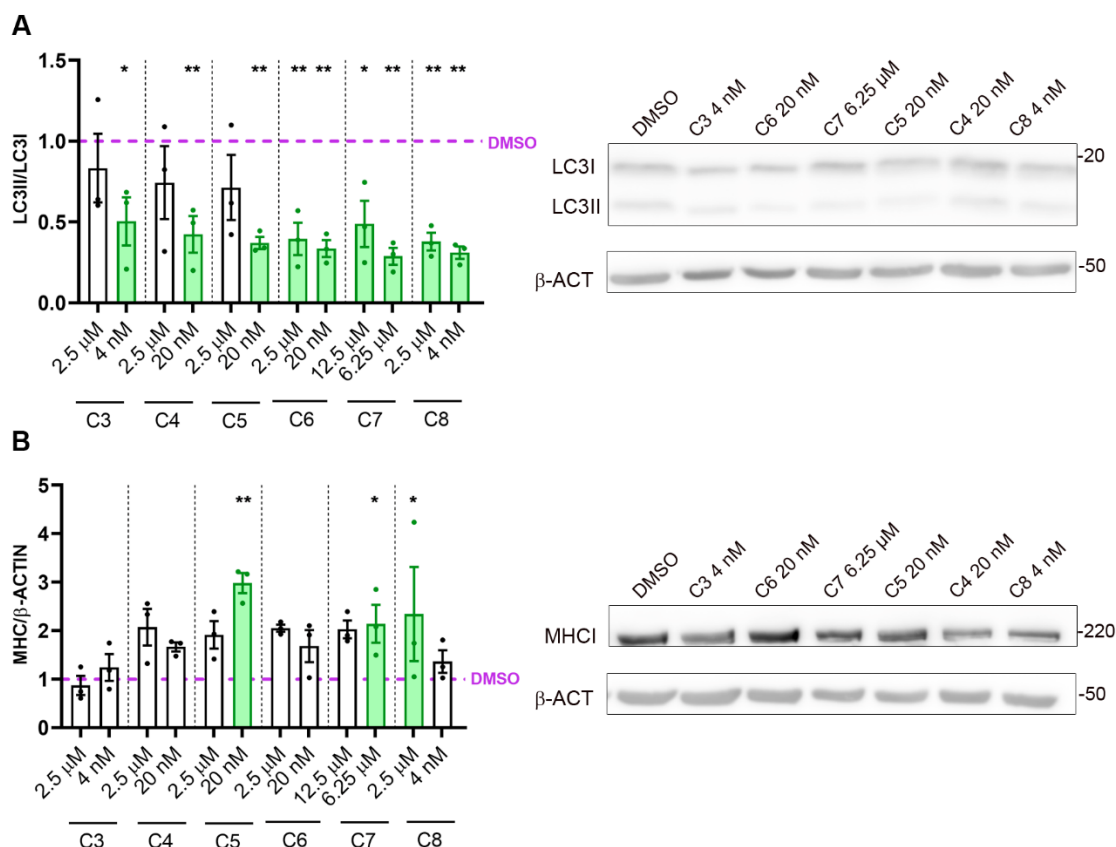


Figura 35. Evaluación del efecto de los seis compuestos propuestos sobre la autofagia y marcadores de diferenciación del modelo celular de *LGMDD2*. (A, B) Cuantificación y membranas de *western blot* representativas de la proteína LC3I-LC3II (A) y MHC (B) en extractos de proteínas de mioblastos *LGMDD2* tratados con vehículo (DMSO) o con los compuestos candidatos (C3-C8) a las dosis que se indica, durante 7 días de diferenciación. Se utilizó β -actina como control endógeno y los datos se normalizaron a la condición DMSO (línea morada discontinua) ($n = 3$). En verde se indican las dosis de cada compuesto que rescatan significativamente los niveles de las proteínas cuantificadas. Los gráficos de barras muestran la media $\pm$ SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ según la prueba ANOVA de una vía.

En conjunto, los 6 compuestos propuestos no sólo rescatan los niveles de TNPO3mut en el modelo *in vitro* de *LGMDD2*, sino que también están rescatando fenotipos claves relacionados con la enfermedad como es el flujo autofágico. De hecho, el rescate del ratio LC3I/LC3II podría deberse, directa o indirectamente, a la disminución de TNPO3mut conseguida con las dosis más bajas de cada fármaco. Por tanto, nuestro estudio avala el potencial terapéutico de los 6 compuestos candidatos contra la *LGMDD2* y proponemos los compuestos C3, C4, C5 y C7 para continuar sus estudios y llegar a reposicionarlos para tratar la distrofia.

DISCUSIÓN

1. Los modelos *in vivo* e *in vitro* de *LGMDD2* generados sirven para profundizar sobre los mecanismos moleculares implicados en la distrofia

La *LGMDD2* es una enfermedad genética ultra rara de la que apenas hay información debido a que se identificó hace relativamente poco tiempo y a la falta de modelos biomédicos que permitan investigarla y testar diferentes terapias. En la presente tesis hemos desarrollado y caracterizado el primer modelo de *LGMDD2 in vivo* en *Drosophila* y el modelo *in vitro* de mioblastos inmortalizados derivados de un paciente. Este último en colaboración con el grupo de Patología Neuromuscular y Ataxias del IIS La Fe. Los estudios de ambos modelos son complementarios y han aportado información relevante sobre TNPO3 y posibles mecanismos fisiopatológicos que intervienen en la *LGMDD2* causando la degeneración muscular. Sin embargo, es importante recordar que el modelo celular deriva de un solo paciente, por lo que no podemos descartar que haya efectos específicos de la propia línea celular. Para corroborar nuestros resultados y establecer generalidades de la patogénesis de la *LGMDD2*, sería necesario realizar ambos estudios en biopsias de pacientes y así tener en cuenta la variabilidad intrínseca de la propia patología.

1.1. Las herramientas generadas de *LGMDD2* dan información sobre cómo afecta la mutación *c.2771delA* a *TNPO3* en el músculo

Nuestros estudios en *Drosophila* demuestran el papel patogénico de los 15 aminoácidos extra de la TNPO3mut ya que su expresión en músculo y motoneuronas, en un fondo genético sensibilizado, reproduce síntomas claves de los pacientes con *LGMDD2* como problemas locomotores y degeneración muscular^{8,12}. En cambio, la expresión dirigida de *TNPO3mut* al músculo sin el silenciamiento de la *Tnpo-SR* endógena fue insuficiente para desencadenar atrofia muscular, incluso en moscas de cuatro semanas de edad. Esto podría ser porque la expresión de los dos alelos de *Tnpo-SR* estuvieran compensando el posible efecto tóxico de TNPO3mut, impidiendo ver su naturaleza dominante en la mosca. Cabe destacar que, aunque TNPO3 es un homólogo funcional de Tnpo-SR⁵⁵, en nuestro modelo de *Drosophila* se observaron diferencias significativas entre el control y las moscas *sTNPO3wt* en algunos ensayos. Esto podría deberse a que la expresión de una copia de *TNPO3wt* desencadena fenotipos de ganancia de función y/o que la conservación funcional entre las proteínas humanas y de *Drosophila* no es completa. Sin embargo, es importante enfatizar varios ejemplos, como la capacidad de escalada y la atrofia muscular de los *IFM*, en los que los fenotipos desencadenados por TNPO3mut o TNPO3wt eran diferentes, lo que distingue los efectos patogénicos causados por la mutación en sí de los fenotipos de sobreexpresión (Fig. 36).

Discusión

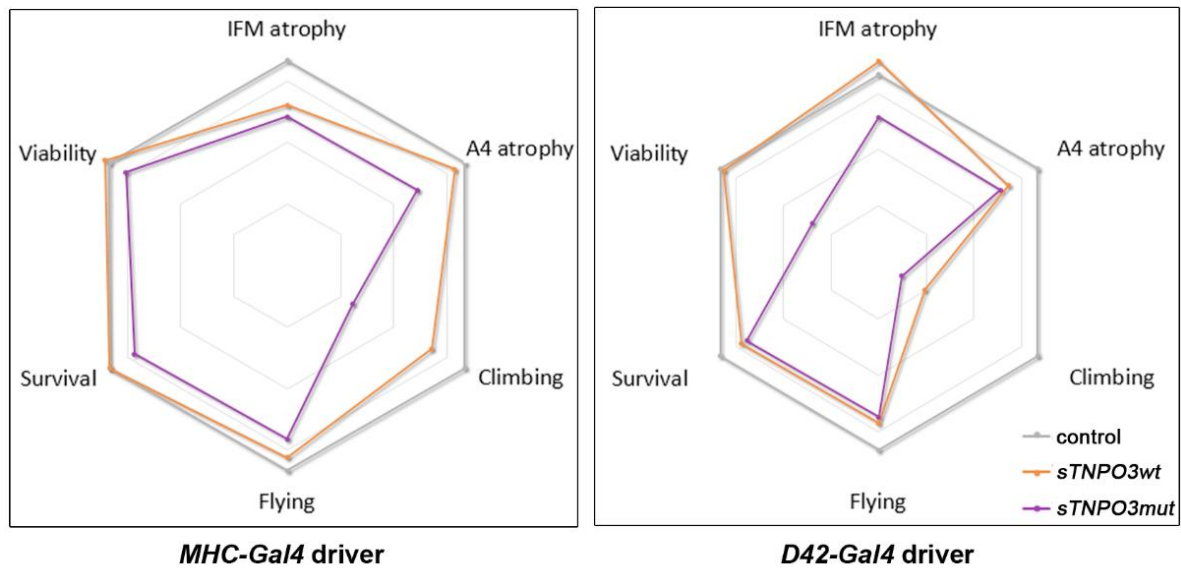


Figura 36. Caracterización global de las moscas *LGMD2* generadas. Representación en gráfico de radar de los seis fenotipos analizados en moscas modelo *LGMD2*. La cuantificación de cada fenotipo se normalizó a valores de control en una escala relativa de 0 a 100 (normal), de modo que el hexágono externo representa los parámetros normales. La expresión dirigida a músculo de mosca se consiguió utilizando el *driver MHC-Gal4* y *D42-Gal4* para la expresión en motoneuronas de mosca.

Tanto en el modelo de *Drosophila* como en el modelo de mioblastos inmortalizados de *LGMD2* se observa **acumulación de TNPO3** a nivel de transcrito y proteína, al igual que en algunas biopsias de pacientes ¹⁸. De hecho, en *Drosophila* ocurre esta acumulación a pesar de que los transgenes *TNPO3wt* como *TNPO3mut* se insertaron en la misma posición genómica en las moscas transgénicas. Esto sugiere que la mutación podría favorecer la estabilidad del transcrito ¹⁶⁶, y de la proteína mutante, tal y como ocurre en DM1 donde la mutación de *DMPK* afecta a la estabilidad de su propio mRNA ¹⁶⁷. La acumulación de TNPO3 podría explicar el efecto tóxico que tiene la mutación en *LGMD2*, ya que al tratar las moscas modelo con el inhibidor de la transcripción, ActD, recuperaban fenotipos funcionales. Sin embargo, para demostrar que el origen de la acumulación de TNPO3 en los modelos estudiados es debido a diferencias de estabilidad del mRNA y/o de la proteína mutante, podríamos tratar las moscas *sTNPO3wt* con ActD y establecer la comparativa con las *sTNPO3mut* tratadas. Tras comparar los niveles de TNPO3, si las moscas modelo tratadas mantuvieran el aumento, se apoyaría la teoría de que la mutación favorece la estabilidad del mRNA y/o proteína. Añadir que, gracias al estudio en el modelo celular, vemos que el aumento de TNPO3 depende de la mutación ya que, después de la edición de la mutación con CRISPR-Cas9, los niveles son similares a los de los controles sanos. Es importante destacar que los datos transcriptómicos y proteómicos del modelo celular no muestran este aumento significativo de TNPO3. A nivel del *RNA-seq*, la diferencia entre la secuencia mutante y la de referencia es de un único nucleótido, por lo que se deberían de contabilizar ambas secuencias en el análisis. No obstante, habría que tener en cuenta los sesgos asociados con los

ensayos de *RNA-seq*, como la variabilidad de las propias muestras analizadas, preparación de las bibliotecas y el contenido de GC ¹⁶⁸. De hecho, en estudios independientes se proponen ciertas mejoras para evitar discrepancias entre los niveles de expresión medidos por *qRT-PCR* y *RNA-seq* como el procesamiento uniforme de todas las muestras (mismo protocolo de aislamiento de RNA, tiempo de almacenamiento/descongelación, integridad del RNA) y mapear lecturas que tengan en cuenta polimorfismos e isoformas, entre otras ¹⁶⁹. Para elucidar esta controversia, algo interesante a estudiar sería cuantificar la expresión de los transcritos en las otras mutaciones en *TNPO3*, analizando el *RNA-seq* de los mioblastos de pacientes de otras familias *LGMDD2*. Otro estudio relevante podría ser generar nuevos modelos en *Drosophila* que expresaran las diferentes mutaciones descritas en *TNPO3* y comparar niveles de expresión. En cuanto a la proteómica, cabe mencionar que la librería espectral frente a la que se comparan los datos de los péptidos ionizados puede que no incluya la secuencia peptídica de TNPO3mut y, por tanto, no la esté contabilizando, influyendo con ello en la cantidad total de TNPO3 cuantificada. Es importante resaltar también que el análisis de los miRNAs del modelo de mioblastos demuestra que hay efectos en la epigenética que podrían estar afectando también a la expresión de TNPO3. De hecho, este análisis revela la disminución de *miR-128* y *miR-155*, ambos represores directos (confirmados experimentalmente) de la síntesis de TNPO3 ^{158,159}. Esta disminución de los inhibidores podría explicar, en parte, el aumento de TNPO3 observado en el modelo celular estudiado.

Por otro lado, la inmunofluorescencia de TNPO3 presenta una señal más débil en los mioblastos de pacientes y una recuperación de la señal en los mioblastos editados. Esto concuerda con experimentos previos en biopsias de pacientes que informaron de una señal más leve de TNPO3 ¹⁴⁰. Una de las hipótesis que se ha planteado en *LGMDD2* es que la TNPO3mut podría estar ejerciendo un **efecto dominante negativo** sobre la TNPO3wt ²¹. Larue et al. (2012) describieron la capacidad de dimerización de TNPO3 para llevar a cabo sus funciones de importina, específicamente cuando hay altas concentraciones de proteína ²⁵. En el contexto *LGMDD2* es posible que el aumento de TNPO3 fomente la formación de heterodímeros, debido a la presencia de las formas de tipo normal y mutado, y el efecto dominante negativo podría alterar la dimerización ^{13,34,140}. Esto podría explicar nuestros resultados en el modelo celular, ya que probablemente en condiciones nativas, la región inmunogénica no es accesible para el anticuerpo en la conformación heterodimérica, mostrando así una señal más suave. Por lo tanto, mientras que mediante *western blot* el anticuerpo detectaría simultáneamente TNPO3wt y TNPO3mut, la inmunofluorescencia preferentemente detectaría la del tipo normal. Además, los 15 aminoácidos extra podrían dar mayor estabilidad al heterodímero y consecuentemente contribuir a su acumulación. No obstante, las herramientas bioinformáticas disponibles no predicen ningún papel específico para los 15 aminoácidos adicionales en TNPO3mut ¹⁷⁰. Para dilucidar estas

Discusión

hipótesis, intentamos poner a punto la inmunofluorescencia usando el anticuerpo generado en este trabajo contra la TNPO3mut. Sin embargo, todavía no hemos encontrado las condiciones óptimas de la técnica como para detectar señal específica de TNPO3mut. Una explicación de ello sería que la conformación heterodimérica tampoco permite que el anticuerpo de TNPO3mut reconozca la región inmunogénica por lo que el siguiente estudio podría ser realizar una técnica de desenmascarar antígenos previa a la inmunodetección¹⁷¹ que permitiera detectar la TNPO3mut en los mioblastos de paciente.

En biopsias de pacientes *LGMD2D*, se ha informado que TNPO3 cambia su localización, acumulándose perinuclearmente, pudiendo afectar a su **función de β -importina**^{12,17}. Nuestros resultados no muestran cambios notables en la localización de TNPO3. Sin embargo, sería interesante realizar una inmunodetección tanto de TNPO3wt como de TNPO3mut en el modelo celular para comprobar, primeramente, si colocalizan formando los heterodímeros y, en ese caso, analizar si hay cambios en la localización de estos heterodímeros respecto a la de los homodímeros formados por TNPO3wt-TNPO3wt. Además, se podría profundizar el estudio analizando la colocalización de TNPO3mut y sus proteínas cargo, para detectar cambios en la ubicación de estas proteínas en las células musculares. Nuestros resultados del análisis proteómico muestran un aumento de expresión de algunas proteínas cargo de TNPO3, pero ese aumento no necesariamente implica una afectación de la función de estas proteínas. Por lo que estudiar la localización de las proteínas cargo complementaría nuestros resultados y demostraría si la mutación de la TNPO3 afecta a su funcionalidad de β -importina.

Dado que la extensión provocada por la mutación causante de *LGMD2D* es en el dominio de unión a proteínas cargo, una de las hipótesis planteadas sobre TNPO3mut es que podría afectar al transporte al núcleo de las proteínas SR y, por consiguiente, al *splicing* alternativo^{12,21}. El músculo esquelético es el tejido con el mayor número de exones alternativos expresados diferencialmente, que genera una gran diversidad de proteínas para su desarrollo y mantenimiento, incluyendo isoformas de factores de transcripción miogénicos, enzimas metabólicas y proteínas miofibrilares^{172,173}. De hecho, enfermedades musculares donde hay una profunda y generalizada alteración del *splicing* alternativo se conocen como espliceopatías, como es el caso de la DM1^{174,175}. Los dos modelos de *LGMD2D* generados en la presente tesis confirman alteraciones del *splicing* alternativo en la distrofia (Fig. 37). Concretamente, en el modelo de *Drosophila* hemos detectado una disminución del *splicing* que incluye en el exón 7 en *SMN2*, el cual está regulado por el factor de *splicing* SRSF1 y es una diana terapéutica contra la AME para compensar la ausencia de SMN1^{138,176}. En el modelo celular hemos visto un aumento en la inclusión del exón 10 en *PKM2*, que debe ser causado por TNPO3mut ya que se revierte cuando la mutación es corregida por CRISPR-Cas9. El *splicing* alternativo que produce *PKM2* es

regulado por el factor de *splicing* SRSF3, aumentado también en los datos proteómicos del modelo celular, el cual a su vez se asocia con atrofia y debilidad muscular en DM1^{143,177,178}. Entonces, a partir de nuestros resultados podríamos establecer una conexión entre TNPO3mut-SRSF3-PKM2 y la atrofia muscular de *LGMDD2*. Por otro lado, cabe destacar que los datos proteómicos del modelo celular muestran el aumento de la helicasa de RNA DDX5, la cual es cargo de TNPO3, está relacionada con el *splicing* alternativo y, a su vez, con DM1^{30,164,179}. No obstante, para confirmar que *LGMDD2* es una espliceopatía habría que estudiar en profundidad los datos obtenidos del *RNA-seq* del modelo celular, concretamente, a nivel de *splicing* alternativo y así ver el efecto que tiene TNPO3mut sobre este proceso.

Además del *splicing* alternativo, es importante enfatizar que los estudios proteómicos revelan un aumento de expresión de las proteínas del propio espliceosoma en los mioblastos modelo. Esto sugiere que en *LGMDD2* hay una alteración al *splicing* constitutivo y, con ello, podría estar afectando a la expresión proteica del músculo de pacientes. Para confirmar si esta sobreactivación del espliceosoma es causada directamente por TNPO3mut, se podría realizar un análisis de la proteómica de la línea de mioblastos editada y comprobar si se revierte la alteración, o incluso cuantificar las principales proteínas del espliceosoma aumentadas mediante *western blot* en los dos modelos de *LGMDD2* generados.

1.2. Los modelos de *LGMDD2* generados dan información sobre las posibles causas de la atrofia muscular

A diferencia de la expresión de *TNPO3mut* en músculo, la expresión en motoneuronas redujo drásticamente la viabilidad de las moscas (Fig. 35). De hecho, una fracción de moscas eclosionaban con una morfología defectuosa en las alas y morían durante los primeros días de vida. Esto demuestra la importancia de TNPO3 para el desarrollo de las moscas. Aunque *LGMDD2* es considerada como un trastorno muscular degenerativo, algunos pacientes presentan síntomas relacionados con el sistema nervioso, como vértigos, ataxias y disartia^{8,12}. En otros trastornos neuromusculares degenerativos, como la AME y la ELA, la pérdida de la **inervación muscular** conduce a la degeneración progresiva de las fibras musculares, además de posibles efectos autónomos dentro de los propios músculos¹⁸⁰. Si bien TNPO3mut se ha descrito en el músculo de pacientes con *LGMDD2*, en base al patrón de expresión informado de TNPO3 en humanos, la proteína mutante también se expresa en la médula espinal¹⁸¹. Nuestro modelo de *Drosophila* que expresa *TNPO3mut* en motoneuronas permite profundizar sobre si hay un componente neurogénico en la *LGMDD2* que desencadene en la atrofia muscular (Fig. 37). Es importante mencionar que *Drosophila* conserva los mecanismos fundamentales de la función

Discusión

neuromuscular, en procesos que van desde la generación y propagación del potencial de acción en la neurona hasta la transmisión sináptica en la unión neuromuscular y el acoplamiento de excitación-contracción en el músculo ^{51,127,180}. Sin embargo, son necesarios más estudios que avalen esta nueva hipótesis. Gracias al sistema Gal4/UAS de *Drosophila* se puede dirigir la expresión a tejidos concretos, en tiempos de desarrollo y en momentos específicos, por lo que permitirá estudiar la sinergia entre la expresión de TNPO3mut en sistema nervioso y músculo en futuros ensayos. De hecho, el *driver* *D42-Gal4* dirige la expresión a motoneuronas de mosca, pero también a otras partes del sistema nervioso periférico, incluidas las neuronas sensoriales de la pared corporal ¹²⁸. Además, sería conveniente descartar que este *driver* también dirige la expresión a músculo de mosca, para corroborar nuestros resultados. Una forma sería cruzar las moscas *D42-Gal4* con moscas *UAS-GFP* y comprobar si la señal del reportero se observa en músculo. También se podría utilizar un *driver* más específico de motoneuronas como es *OK6-Gal4* ¹²⁸, para comprobar si TNPO3mut pudiera estar afectando a la innervación del músculo y, en última instancia, provocando degeneración muscular.

Por otro lado, se ha visto que la atrofia muscular puede desencadenarse también por la alteración de la **capacidad de diferenciación** y/o proliferación. De hecho, diferentes tipos de *LGMD* tienen problemas a estos niveles ⁴⁰. En este trabajo hemos confirmado que el modelo celular de *LGMD2* presenta un aumento en su potencial de proliferación, sugiriendo que los mioblastos podrían tener problemas para salir del ciclo celular. Sin embargo, se necesitan más estudios para corroborar esta nueva hipótesis como, por ejemplo, medir los niveles del factor de transcripción Pax7 en el modelo celular para ver si están aumentados. Otro estudio interesante sería cuantificar los niveles de los inhibidores de quinasas p21, p19 y p57, implicados en la salida del ciclo celular ⁴⁰.

Por otro lado, el modelo celular también presenta una capacidad de diferenciación notablemente disminuida. Además, gracias al análisis del *RNA-seq* de los mioblastos *LGMD2*, hemos visto una disminución de los niveles de los factores reguladores miogénicos *MyoD* y *MyoG* y de *miR-1*, que actúa inhibiendo la enzima Hdac4 que participa en la diferenciación de mioblastos a miotubos ¹⁵⁷. Esto avala nuestros resultados y sugiere que los mioblastos *LGMD2* podrían tener un problema en su capacidad de diferenciación (Fig. 37). Este problema de diferenciación podría deberse a la alteración de la vía de señalización Wnt observada tras el análisis del transcriptoma del modelo celular. En el músculo esquelético adulto, la señalización Wnt regula la diferenciación y autorrenovación de las células satélite y el crecimiento de las fibras musculares ¹⁸². Brevemente, cuando hay una activación de la vía Wnt, la β -catenina se libera del complejo de degradación, que incluye a la serina-treonina quinasa GSK-3 β , y se transloca al núcleo, donde funciona como activador transcripcional de genes implicados en la miogénesis. De hecho, otra evidencia de que la vía Wnt está relacionada en la diferenciación de los mioblastos surge de los estudios de cultivos celulares que demuestran que la inhibición de GSK3 β

conduce a una mayor diferenciación de las células miogénicas C2 ¹⁸³. Esto, junto con que la edición mediante CRISPR rescata totalmente la alteración de esta vía, sugiere que hay una relación entre TNPO3 y la vía Wnt, que podría explicar los defectos en la diferenciación observados en los mioblastos derivados de paciente.

No obstante, es importante resaltar que, de entre los *myomiRs* disminuidos en los mioblastos de paciente, únicamente la expresión de *miR-206* y *miR-208b* se recupera tras la edición de las células con CRISPR. Esto sugiere que TNPO3 podría tener un efecto sobre la biogénesis de estos miRNAs.

Los modelos estudiados en la presente tesis también aportan información relevante sobre las posibles causas del **desequilibrio de la homeostasis muscular** en *LGMD2*. Hay que tener en cuenta que en el modelo de mosca podría haber un componente de desarrollo que estuviera influyendo también en los fenotipos detectados, ya que la expresión de TNPO3mut está mediada por *drivers* que se expresan durante el desarrollo de la mosca ¹⁸⁴.

En cuanto a la **síntesis proteica**, el aumento del *miR-29b* observado en el modelo celular podría estar relacionado con la alteración de la vía anabólica. Recientemente se ha descrito que *miR-29b* induce atrofia muscular a través de la inhibición a sus dianas *IGF*, *PI3K* e *YY1* y la consecuente disminución de la ruta de síntesis proteica Akt/FoxO/mTOR ¹⁸⁵. De hecho, recientemente se ha demostrado que la inhibición del *miR-29b* es una estrategia terapéutica efectiva para reducir la atrofia muscular en modelos *in vitro* e *in vivo* ^{186,187}. Además, la expresión de *miR-29b* es activada por el factor de *splicing* SRSF1, siendo éste diana de TNPO3 ¹⁸⁸. De este modo, nuestros resultados sugieren que podría haber una alteración en la síntesis proteica, a través de la conexión entre TNPO3mut-SRSF1-*miR-29b*-Akt/FoxO/mTOR, que pudiera estar contribuyendo a la atrofia muscular de *LGMD2*. Es importante mencionar que en los datos proteómicos no se detectan las principales proteínas implicadas en la ruta Akt/FoxO/mTOR, posiblemente debido a su baja expresión, por lo que no podemos corroborar la alteración de esta vía. Sin embargo, para confirmar esta nueva hipótesis se podrían cuantificar las principales proteínas de la ruta, como Akt, FoxO, mTOR o PI3K (fosforiladas y no fosforiladas), mediante *western blot* en ambos modelos generados en la presente tesis. También cabe destacar que la expresión del *miR-29b* no se restablece tras la edición de la mutación en TNPO3, por lo que no podemos confirmar que TNPO3mut sea causa directa del aumento de este miRNA. No obstante, para confirmar si *miR-29b* contribuye a la atrofia muscular en *LGMD2*, se podría tratar los mioblastos de paciente con un antagomiR-29b y comprobar si inhibiendo la expresión del *miR-29b* se revierten los fenotipos caracterizados del modelo.

En cuanto a la **degradación proteica** en *LGMD2*, previamente se ha identificado una sobreactivación de la autofagia en biopsias de pacientes ¹⁷. Nuestros modelos no sólo confirman que hay un aumento de expresión de proteínas autofágicas e hiperactivación del flujo autofágico (Fig. 37), sino que

Discusión

demuestran que esta alteración es causada por TNPO3mut, ya que la edición de la mutación con CRISPR lo revierte. Además, hemos probado que al bloquear esta vía mediante el tratamiento con CQ de las moscas *LGMDD2*, rescatamos los fenotipos a niveles histológicos, funcionales y moleculares. Estos hallazgos son particularmente interesantes por dos razones: primero confirman que hay un exceso de la vía catabólica autofagia que conduce a fenotipos característicos de la miopatía, destacando esta ruta como una nueva diana terapéutica para diseñar tratamientos de la enfermedad. En segundo lugar, confirman que los fenotipos generados por TNPO3mut son reversibles, ya que la inhibición farmacológica de la autofagia rescata la atrofia muscular en un modelo en el que la mutación se expresa desde etapas iniciales del desarrollo en los músculos de la mosca. Esto es especialmente alentador a la hora de diseñar una estrategia terapéutica ya que, además de evitar la aparición de síntomas, abre la posibilidad de revertir fenotipos de la miopatía ya desarrollados tras el tratamiento. Añadir que, la regulación de la autofagia por CQ no es una propuesta novedosa como terapia para las distrofias musculares ¹¹⁷. Actualmente existen alternativas más seguras que actúan al mismo nivel en la vía de la autofagia, como la Hidroxicloroquina ¹⁸⁹, y que podrían ser propuestas como tratamiento de la *LGMDD2*.

Además, con el análisis proteómico del modelo celular hemos visto una sobreactivación del proteasoma que también podría estar contribuyendo a la degeneración muscular en *LGMDD2* (Fig. 37). Al igual que la autofagia, el sistema UPS presenta una actividad basal que permite eliminar proteínas y orgánulos defectuosos para mantener así la homeostasis entre síntesis y degradación proteica. Sin embargo, en condiciones patológicas en las que hay hiperactivación de la actividad UPS y autofagia, la excesiva degradación puede conducir a degeneración muscular, como ocurre en DM2 ^{42,190}. De hecho, recientemente se ha visto que los sistemas UPS y de autofagia, que antes se consideraban como independientes, están relacionados entre sí en el músculo esquelético ¹⁹¹. Para confirmar y profundizar sobre si ocurre un aumento de la actividad UPS en *LGMDD2*, se podría utilizar los dos modelos generados en la presente tesis para analizar las principales proteínas implicadas en esta ruta, tales como las ubiquitin ligasas encargadas de marcar con ubiquitinas las proteínas a degradar, y proteínas que conforman el complejo proteolítico proteasoma 26S.

En conjunto, estos resultados avalan la hipótesis de que también hay una afectación en la vía anabólica del modelo celular que, junto con el exceso de activación de la vía catabólica, contribuye a la rotura de la homeostasis muscular. Sin embargo, esto se debería confirmar a nivel de proteína en modelos que permitan estudiar el sistema muscular esquelético completo.

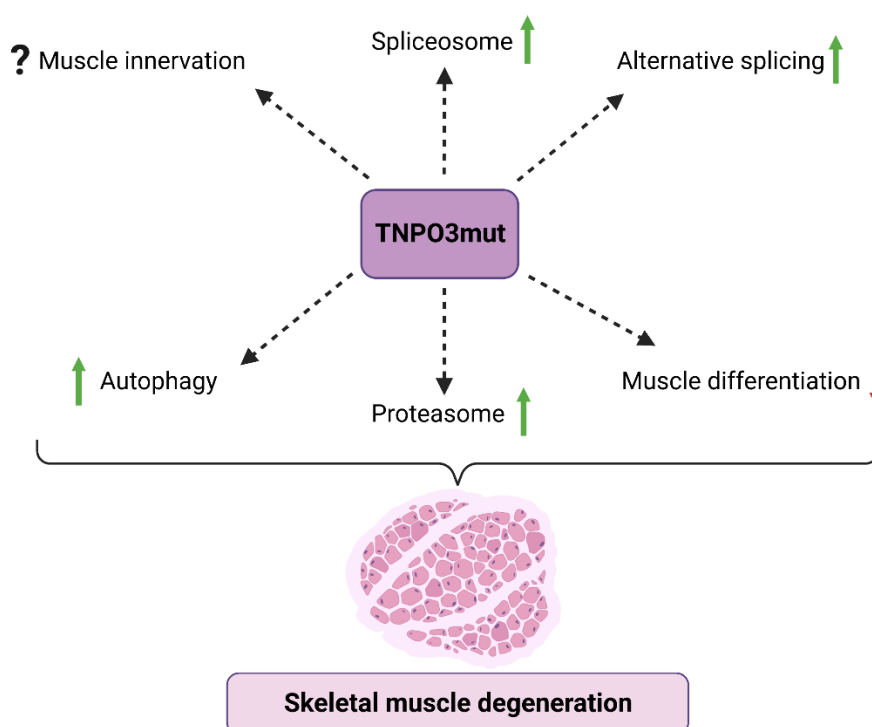


Figura 37. Rutas alteradas identificadas en los modelos de *LGMD2*. Representación de los efectos globales descritos en el modelo de *Drosophila* y de mioblastos inmortalizados de *LGMD2*. Las flechas punteadas indican una posible relación entre TNPO3mut y las rutas alteradas identificadas tras la presente tesis, las flechas verdes representan aumento y las rojas disminución de cada ruta. Imagen hecha con Biorender.com.

Por último, resaltar el valor de los datos obtenidos del *RNA-seq* y de proteómica del modelo celular, que han servido para identificar tanto los genes, miRNAs y proteínas, como rutas alteradas por la TNPO3mut sobre los que profundizar para intentar explicar la *LGMD2*. La inhibición del ciclo de Krebs y el metabolismo del piruvato mostrada en el análisis proteómico dan pistas sobre una posible alteración en el **metabolismo de la glucosa** en el modelo celular. Teniendo en cuenta que el mantenimiento de la masa muscular está relacionado con el metabolismo de la glucosa, esta alteración podría estar contribuyendo a la degeneración muscular. De hecho, la sarcopenia, enfermedad progresiva caracterizada por la pérdida de masa, fuerza y función muscular, parece estar entrelazada con el metabolismo de la glucosa ¹⁹². El aumento de PKM2 observado en el modelo celular podría relacionarse con esta alteración del metabolismo de la glucosa. PKM2 es una enzima glucolítica que se induce específicamente en pacientes con DM1 y se ha sugerido que causa déficits de energía asociados con debilidad y desgaste muscular ¹⁴³. En línea con lo comentado, en el contexto de cáncer se ha visto que PKM2 promueve el efecto Warburg, fomentando la glucólisis en células cancerosas ¹⁹³. Es importante mencionar también que este aumento de PKM2 es rescatado en las células editadas con CRISPR, por lo que nuestros datos sugieren que podría haber una relación entre TNPO3-PKM y el metabolismo energético.

Discusión

2. Los modelos experimentales de *LGMDD2* generados son válidos para probar diferentes estrategias terapéuticas

Los modelos experimentales generados en la presente tesis se han utilizado para estudiar dos estrategias terapéuticas diferentes, la farmacológica y la génica, que nos han permitido avanzar en la búsqueda de un tratamiento contra la *LGMDD2* y profundizar sobre los mecanismos moleculares implicados en esta patología.

Concretamente, tras el rastreo de 1400 **fármacos conocidos** realizado en el modelo de *Drosophila*, 6 de los 9 compuestos candidatos han sido validados en el modelo celular de la distrofia. Los estudios del modelo *in vitro* aportan más evidencias preclínicas que corroboran los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* y avala el potencial terapéutico de los 6 compuestos contra la *LGMDD2*. Estos compuestos candidatos no sólo podrían reposicionarse como tratamiento para la *LGMDD2*, sino que también proporcionan pistas sobre la fisiopatología de esta distrofia ya que las dianas moleculares de todos los candidatos son bien conocidas debido a su uso en humanos. Además, de forma indirecta, los compuestos candidatos también pueden dar información relevante relacionada con el VIH-1 y su proceso de infección, dada su relación con TNPO3^{34,194,195}. Destacar que los mecanismos de acción de los compuestos que empeoran también se conocen y podrían aportar más información sobre los efectos de la mutación en TNPO3 a nivel funcional. De hecho, uno de los compuestos que empeoran significativamente actúa como antagonista de los receptores de glutamato NMDA. En mosca, estos receptores se expresan principalmente en cerebro, promoviendo las uniones sinápticas, aunque también se expresan en motoneuronas¹⁹⁶. El bloqueo de estos receptores se ha relacionado con el aumento de la autofagia a través de la proteína autofágica Beclin-1¹³⁹. De este modo, el compuesto podría estar contribuyendo al aumento de autofagia descrito en las moscas modelo debido a la expresión de TNPO3mut.

Es importante resaltar que el reposicionamiento de fármacos exige plantearse una serie de criterios, como absorción, distribución y toxicidad del compuesto, entre otros, a la hora de priorizar con qué candidatos promover futuros estudios en animales mamíferos para estimar dosis efectivas. Estas propiedades se podrían analizar en modelos mamíferos como el ratón, que conserva el desarrollo, organización y regeneración del sistema músculo esquelético y la homología de alrededor del 99% de los genes humanos¹⁹⁷. Un criterio es priorizar fármacos con usos crónicos frente a los de uso puntual, como los antibióticos, debido a que su perfil toxicológico se adecúa más a la nueva indicación buscada para el tratamiento de *LGMDD2*. De hecho, en el caso de los antibióticos, su uso crónico conlleva el riesgo de desarrollo de resistencias frente a infecciones oportunistas, lo cual puede ser un riesgo es pacientes ya seriamente afectados. Todas estas consideraciones complementarían nuestro trabajo y

aportaría más evidencias que garantizaran nuestra propuesta de algún candidato para futuros ensayos clínicos. Como ejemplo, hay un fármaco candidato a comenzar los ensayos clínicos para ser reposicionado como tratamiento contra la AME, cuyo potencial ha sido demostrado en el modelo de *Drosophila*, en células derivadas de pacientes y recientemente en ratón^{100,101}. Otro ejemplo es que ya hay fármacos de reposicionamiento contra la DM1 que han conseguido pasar la fase II de ensayos clínicos y está previsto su paso a fase III^{198–200}. Por último, destacar que, para lograr el éxito en futuros ensayos clínicos, es esencial que tengamos una comprensión clara del fenotipo y la historia natural de la *LGMDD2*, pautas de atención estándar, registros de pacientes actualizados e, idealmente, biomarcadores que puedan ayudar a evaluar la gravedad de la enfermedad y la respuesta a los fármacos candidatos a reposicionar.

La recuperación de todos los fenotipos estudiados mediante la corrección de *c.2771delA* de *TNPO3* del modelo celular validan la **edición génica mediada por CRISPR-Cas9** como prueba de concepto para tratar la *LGMDD2*. A su vez, esto avala que la línea de mioblastos editados podría usarse como control isogénico válido para futuros estudios *in vitro*. Por otro lado, la edición CRISPR tiene un efecto de rescate sobre proteínas relevantes en nuestro estudio que nos ha permitido corroborar resultados y establecer relaciones, comentadas en el apartado anterior, que sirven para profundizar sobre *TNPO3*mut y los mecanismos involucrados en *LGMDD2*. No obstante, es importante resaltar que el rescate de la expresión diferencial no fue total en las células editadas y que existe la posibilidad de que un pequeño subconjunto de los genes corregidos tras la edición CRISPR-Cas9 lo hayan hecho debido a la propia manipulación genética. De manera similar, en otras miopatías en las que se usó CRISPR-Cas9 para corregir una sola mutación, como en DM1, los fenotipos patológicos no se revirtieron por completo después de la eliminación de la mutación²⁰¹. Es posible que el tiempo de cultivo de la línea editada influya en los efectos de CRISPR, ya que puede que no sea suficiente como para reducir totalmente los niveles de *TNPO3*mut y/o para cambiar la expresión del resto genes afectados por la mutación a pesar de que se haya corregido. Por lo que sería interesante estudiar los efectos de la edición génica a mayores tiempos de cultivo e incluso de diferenciación. Además, es importante destacar que gracias a nuestro estudio de las células editadas con CRISPR hemos visto que hay alteraciones en la epigenética que se conservan independientemente de la mutación, manteniendo así los efectos en cascada en sus mRNA diana correspondientes. Por lo que aquí se aportan las primeras evidencias de existen alteraciones epigenéticas que podrían estar contribuyendo también a la patogenia de la *LGMDD2*.

Con todo el estudio de la línea celular editada ha aportado gran cantidad de información relevante sobre el mecanismo patogénico de la *LGMDD2* y demuestra que CRISPR-Cas9 podría ser una herramienta válida para probar futuros ensayos clínicos. El primer ensayo clínico con CRISPR se realizó

Discusión

en humanos en 2016 como tratamiento de cáncer de pulmón ²⁰². Desde entonces un número cada vez mayor de estudios han entrado en ensayos clínicos en humanos, la mayoría de los cuales se centran en la edición del genoma *ex vivo* para tratar diversos tipos de tumores y enfermedades como la β -talasemia o la anemia falciforme ^{80,203}. Sin embargo, a pesar de los avances recientes, siguen existiendo limitaciones importantes en la aplicación de CRISPR a la clínica, como la eficacia de la administración, la mutagénesis de los *off-target* y el mantenimiento a largo plazo de la edición génica. Por lo tanto, se necesitan más estudios que se centren en la seguridad y la precisión del sistema CRISPR antes de la traslación a la clínica para tratar la *LGMDD2* ²⁰⁴.

CONCLUSIONES

Las conclusiones generales que se pueden extraer a partir de los resultados presentados en este trabajo son las siguientes:

1. Las moscas que expresan TNPO3mut humano en un fondo genético sensibilizado para *Tnpo-SR* son el primer modelo experimental de *LGMD2* *in vivo* que reproduce las principales alteraciones moleculares, histológicas y funcionales de los pacientes, como atrofia y degeneración muscular y reducida capacidad locomotora.
2. El modelo de *LGMD2* en *Drosophila* proporciona evidencias de la hiperactivación del flujo autofágico que contribuye de forma significativa al fenotipo de degeneración muscular ya que su reducción, mediante un fármaco anti-autofágico, fue suficiente para mejorar los fenotipos relacionados con la atrofia muscular.
3. A partir del estudio del modelo *LGMD2* de *Drosophila* proponemos la implicación de un componente neurogénico en esta distrofia, basado en los fenotipos detectados en moscas que expresan TNPO3mut en motoneuronas.
4. Los mioblastos inmortalizados de *LGMD2* constituyen el primer modelo *in vitro* proveniente de pacientes, que muestra una alteración en la capacidad de diferenciación y proliferación. Asimismo, aporta evidencias de una desregulación de la homeostasis en el músculo por el exceso de activación de las vías catabólicas, representado por la sobreactivación del flujo autofágico y alteración del proteasoma.
5. El estudio de ambos modelos experimentales de *LGMD2* ha brindado información crucial sobre los mecanismos de patogénesis implicados en esta distrofia. Hemos confirmado un aumento significativo de TNPO3, a nivel de transcrito y proteína, desencadenado por la mutación *c.2771delA*. A su vez, los resultados son congruentes con la hipótesis de que la TNPO3mut ejerce un efecto de dominancia negativa. Además, se han revelado las primeras evidencias directas de alteraciones en el *splicing* constitutivo y alternativo en la *LGMD2*, así como en el metabolismo energético.
6. El modelo celular de *LGMD2* proporciona la base para una prueba de concepto de que la edición mediante CRISPR-Cas9 es un enfoque terapéutico válido para la distrofia y otorga evidencias de que se producen alteraciones a nivel del miRNoma en esta enfermedad.

Conclusiones

7. Tanto el modelo de *Drosophila* como el modelo celular generados son una importante herramienta para la búsqueda de tratamientos contra la *LGMDD2*. Concretamente se ha realizado un rastreo de compuestos sobre el modelo de mosca para identificar 9 fármacos, de los cuales 6 se han validado en los mioblastos derivados de pacientes.

8. De los 6 fármacos validados, se proponen a 4 de ellos como compuestos candidatos con los que continuar su validación preclínica, por ser más eficaces reduciendo el parámetro TNPO3mut/TNPO3. Los mecanismos de acción conocidos de los fármacos identificados proporcionan información sobre posibles nuevas rutas implicadas en la *LGMDD2*.

REFERENCIAS

1. Walton, J.N., and Nattrass, F.J. (1954). ON THE CLASSIFICATION, NATURAL HISTORY AND TREATMENT OF THE MYOPATHIES. *Brain* 77, 169–231.
2. Bushby, K. (2009). Diagnosis and management of the limb girdle muscular dystrophies. *Pract. Neurol.* 9, 314–323.
3. Nigro, V., and Savarese, M. (2014). Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: The 2014 update. *Acta Myol.* 33, 1–12.
4. Vissing, J. (2016). Limb girdle muscular dystrophies: Classification, clinical spectrum and emerging therapies. *Curr. Opin. Neurol.* 29, 635–641.
5. Angelini, C. (2020). LGMD. Identification, description and classification. *Acta Myol. myopathies cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol.* 39, 207–217.
6. Straub, V., Murphy, A., and Udd, B. (2018). 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies – Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17–19 March 2017. In *Neuromuscular Disorders* (Elsevier Ltd), pp. 702–710.
7. Orphanet: Distrofia muscular de cinturas [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=ES&data_id=8734&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=lgmd&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Enfermedad\(es\)/grupo de enfermedades=Distrofia-muscular-de-cinturas&title=Distrofia muscular de cinturas&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=ES&data_id=8734&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=lgmd&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Enfermedad(es)/grupo de enfermedades=Distrofia-muscular-de-cinturas&title=Distrofia muscular de cinturas&search=Disease_Search_Simple).
8. Gamez, J., Navarro, C., Andreu, A.L., Fernandez, J.M., Palenzuela, L., Tejeira, S., Fernandez-Hojas, R., Schwartz, S., Karadimas, C., DiMauro, S., et al. (2001). Autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy: A large kindred with evidence for anticipation. *Neurology* 56, 450–454.
9. Palenzuela, L., Andreu, A.L., Gámez, J., Vilà, M.R., Kunimatsu, T., Meseguer, A., Cervera, C., Cadenas, I.F., Van der Ven, P.F.M., Nygaard, T.G., et al. (2003). A novel autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD 1F) maps to 7q32.1-32.2. *Neurology* 61, 404–406.
10. Fanin, M., Peterle, E., Fritegatto, C., Nascimbeni, A.C., Tasca, E., Torella, A., Nigro, V., and Angelini, C. (2015). Incomplete penetrance in limb-girdle muscular dystrophy type 1F. *Muscle Nerve* 52, 305–306.
11. Costa, R., Rodia, M.T., Pacilio, S., Angelini, C., and Cenacchi, G. (2022). LGMD D2 TNPO3-Related: From Clinical Spectrum to Pathogenetic Mechanism. *Front. Neurol.* 13, 840683.
12. Melià, M.J., Kubota, A., Ortolano, S., Vílchez, J.J., Gámez, J., Tanji, K., Bonilla, E., Palenzuela, L., Fernández-Cadenas, I., Přistoupilová, A., et al. (2013). Limb-girdle muscular dystrophy 1F is caused by a microdeletion in the transportin 3 gene. *Brain* 136, 1508–1517.
13. Díez-Fuertes, F., López-Huertas, M.R., García-Pérez, J., Calonge, E., Bermejo, M., Mateos, E., Martí, P., Muelas, N., Vílchez, J.J., Coiras, M., et al. (2022). Transcriptomic Evidence of the Immune Response Activation in Individuals With Limb Girdle Muscular Dystrophy Dominant 2 (LGMDD2) Contributes to Resistance to HIV-1 Infection. *Front. cell Dev. Biol.* 10.
14. Gaffen, S.L. (2011). Life before Seventeen: Cloning of the IL-17 Receptor. *J. Immunol.* 187, 4389–4391.
15. Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* 5, 461.
16. Peterle, E., Fanin, M., Semplicini, C., Padilla, J.J.V., Nigro, V., and Angelini, C. (2013). Clinical phenotype, muscle MRI and muscle pathology of LGMD1F. *J. Neurol.* 260, 2033–2041.
17. Cenacchi, G., Peterle, E., Fanin, M., Papa, V., Salaroli, R., and Angelini, C. (2013). Ultrastructural changes in LGMD1F. *Neuropathology* 33, 276–280.
18. Vihola, A., Palmio, J., Danielsson, O., Penttilä, S., Louiselle, D., Pittman, S., Weihi, C., and Udd, B. (2019). Novel mutation in TNPO3 causes congenital limb-girdle myopathy with slow progression. *Neurol. Genet.* 5, 1–9.
19. Kataoka, N., Bachorik, J.L., and Dreyfuss, G. (1999). Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J. Cell Biol.* 145, 1145–1152.
20. Transcript: ENST00000265388.10 (TNPO3-201) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 109 https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000064419;r=7:128954185-129055111;t=ENST00000265388.
21. Torella, A., Fanin, M., Mutarelli, M., Peterle, E., Del Vecchio Blanco, F., Rispoli, R., Savarese, M., Garofalo, A., Piluso, G., Morandi, L., et al. (2013). Next-Generation Sequencing Identifies Transportin 3 as the Causative Gene for LGMD1F. *PLoS One* 8, 1–7.
22. Pál, E., Zima, J., Hadzsiev, K., Ito, Y.A., Hartley, T., Boycott, K.M., and Melegh, B. (2019). A novel pathogenic variant in TNPO3 in a Hungarian family with limb-girdle muscular dystrophy 1F. *Eur. J. Med. Genet.* 62, 103662.
23. Gibertini, S., Ruggieri, A., Saredi, S., Salerno, F., Blasevich, F., Napoli, L., Moggio, M., Nigro, V., Morandi, L., Maggi, L., et al. (2018). Long term follow-up and further molecular and histopathological studies in

- the LGMD1F sporadic TNPO3-mutated patient. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 141.
24. TNPO3 - Transportin-3 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9Y5L0/entry>.
 25. Larue, R., Gupta, K., Wuensch, C., Shkriabai, N., Kessl, J.J., Danhart, E., Feng, L., Taltynov, O., Christ, F., Van Duyne, G.D., et al. (2012). Interaction of the HIV-1 intasome with transportin 3 protein (TNPO3 or TRN-SR2). *J. Biol. Chem.* 287, 34044–34058.
 26. Lai, M.-C., Lin, R.-I., Huang, S.-Y., Tsai, C.-W., and Tarn, W.-Y. (2000). A Human Importin- β Family Protein, Transportin-SR2, Interacts with the Phosphorylated RS Domain of SR Proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 7950–7957.
 27. Lai, M.C., Lin, R.I., and Tarn, W.Y. (2001). Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10154–10159.
 28. Maertens, G.N., Cook, N.J., Wang, W., Hare, S., Gupta, S.S., Öztop, I., Lee, K.E., Pye, V.E., Cosnefroy, O., Snijders, A.P., et al. (2014). Structural basis for nuclear import of splicing factors by human Transportin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2728–2733.
 29. Lai, M.C., Kuo, H.W., Chang, W.C., and Tarn, W.Y. (2003). A novel splicing regulator shares a nuclear import pathway with SR proteins. *EMBO J.* 22, 1359–1369.
 30. Kimura, M., Morinaka, Y., Imai, K., Kose, S., Horton, P., and Imamoto, N. (2017). Extensive cargo identification reveals distinct biological roles of the 12 importin pathways. *Elife* 6.
 31. Christ, F., Thys, W., De Rijck, J., Gijssbers, R., Albanese, A., Arosio, D., Emiliani, S., Rain, J.C., Benarous, R., Cereseto, A., et al. (2008). Transportin-SR2 Imports HIV into the Nucleus. *Curr. Biol.* 18, 1192–1202.
 32. Zhou, L., Sokolskaja, E., Jolly, C., James, W., Cowley, S.A., and Fassati, A. (2011). Transportin 3 Promotes a Nuclear Maturation Step Required for Efficient HIV-1 Integration. *PLOS Pathog.* 7, e1002194.
 33. Valle-Casuso, J.C., Di Nunzio, F., Yang, Y., Reszka, N., Lienlaf, M., Arhel, N., Perez, P., Brass, A.L., and Diaz-Griffero, F. (2012). TNPO3 Is Required for HIV-1 Replication after Nuclear Import but prior to Integration and Binds the HIV-1 Core. *J. Virol.* 86, 5931–5936.
 34. Rodríguez-Mora, S., De Wit, F., García-Perez, J., Bermejo, M., López-Huertas, M.R., Mateos, E., Martí, P., Rocha, S., Vigón, L., Christ, F., et al. (2019). The mutation of Transportin 3 gene that causes limb girdle muscular dystrophy 1F induces protection against HIV-1 infection. *PLoS Pathog.* 15.
 35. Rice, B.L., Stake, M.S., and Parent, L.J. (2020). TNPO3-Mediated Nuclear Entry of the Rous Sarcoma Virus Gag Protein Is Independent of the Cargo-Binding Domain. *J. Virol.* 94.
 36. Zou, J., Yu, L., Zhu, Y., Yang, S., Zhao, J., Zhao, Y., Jiang, M., Xie, S., Liu, H., Zhao, C., et al. (2022). Transportin-3 Facilitates Uncoating of Influenza A Virus. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 4128.
 37. Kottyan, L.C., Zoller, E.E., Bene, J., Lu, X., Kelly, J.A., Rupert, A.M., Lessard, C.J., Vaughn, S.E., Marion, M., Weirauch, M.T., et al. (2015). The IRF5-TNPO3 association with systemic lupus erythematosus has two components that other autoimmune disorders variably share. *Hum. Mol. Genet.* 24, 582–596.
 38. Veitia, R.A., Caburet, S., and Birchler, J.A. (2018). Mechanisms of Mendelian dominance. *Clin. Genet.* 93, 419–428.
 39. Chal, J., and Pourquié, O. (2017). Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* 144, 2104–2122.
 40. Morgan, J., and Partridge, T. (2020). Skeletal muscle in health and disease. *Dis. Model. Mech.* 13, dmm042192–dmm042192.
 41. Tedesco, F.S., Dellavalle, A., Diaz-Manera, J., Messina, G., and Cossu, G. (2010). Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J. Clin. Invest.* 120, 11–19.
 42. Bonaldo, P., and Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* 6, 25–39.
 43. Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005> 27, 107–132.
 44. Sabater-Arcís, and María (2022). Ruta de la autofagia, msi2 y mir-7 como nuevas dianas terapéuticas para la disfunción muscular en distrofia miotónica tipo 1.
 45. Lee, E.J., and Neppl, R.L. (2021). Influence of Age on Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy Signaling: Established Paradigms and Unexpected Links. *Genes* 2021, Vol. 12, Page 688 12, 688.
 46. Sciorati, C., Rigamonti, E., Manfredi, A.A., and Rovere-Querini, P. (2016). Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. *Cell Death Differ.* 23, 927–937.
 47. Zhao, J., Brault, J.J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2007). FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells. *Cell Metab.* 6, 472–483.
 48. Pandey, U.B., and Nichols, C.D. (2011). Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role

- of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacol. Rev.* 63, 411–436.
49. Crossley, A.C. (1978). The morphology and development of the *Drosophila* muscular system. *Genet. Biol. Drosoph.*, 499–560.
 50. Taylor, M. V (2013). Comparison of Muscle Development in *Drosophila* and Vertebrates.
 51. Rai, M., Nongthomba, U., and Grounds, M.D. (2014). Skeletal Muscle Degeneration and Regeneration in Mice and Flies. In *Current Topics in Developmental Biology* (Academic Press Inc.), pp. 247–281.
 52. Schnorrer, F., Schönbauer, C., Langer, C.C.H., Dietzl, G., Novatchkova, M., Schernhuber, K., Fellner, M., Azaryan, A., Radolf, M., Stark, A., et al. (2010). Systematic genetic analysis of muscle morphogenesis and function in *Drosophila*. *Nat.* 2010 4647286 464, 287–291.
 53. Anant, S., Roy, S., and Vijayraghavan, K. (1998). Twist and Notch negatively regulate adult muscle differentiation in *Drosophila*. *Development* 125, 1361–1369.
 54. Gene: Tnpo-SR (FBgn0031456) - Summary - *Drosophila melanogaster* - Ensembl genome browser 109 https://www.ensembl.org/Drosophila_melanogaster/Gene/Summary?db=core;g=FBgn0031456;r=2L:2759924-2763889.
 55. Allemand, E., Dokudovskaya, S., Bordonné, R., and Tazi, J. (2002). A conserved *Drosophila* transportin-serine/arginine-rich (SR) protein permits nuclear import of *Drosophila* SR protein splicing factors and their antagonist repressor splicing factor 1. *Mol. Biol. Cell* 13, 2436–2447.
 56. Brand, H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.
 57. de Haro, M., Al-Ramahi, I., De Gouyon, B., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N.A., Ashizawa, T., Cooper, T.A., and Botas, J. (2006). MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2138–2145.
 58. Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Garcia-Alcover, I., Vicente-Crespo, M., Alvarez-Abril, M.C., and Artero, R.D. (2008). Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*. *PLoS One* 3.
 59. Picchio, L., Plantie, E., Renaud, Y., Poovthumkadavil, P., and Jagla, K. (2013). Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2795–2810.
 60. Allikian, M.J., Bhabha, G., Dospoy, P., Heydemann, A., Ryder, P., Earley, J.U., Wolf, M.J., Rockman, H.A., and McNally, E.M. (2007). Reduced life span with heart and muscle dysfunction in *Drosophila* sarcoglycan mutants. *Hum. Mol. Genet.* 16, 2933–2943.
 61. Li, S., Zhang, P., Freibaum, B.D., Kim, N.C., Kolaitis, R.M., Molliex, A., Kanagaraj, A.P., Yabe, I., Tanino, M., Tanaka, S., et al. (2016). Genetic interaction of hnRNPA2B1 and DNAJB6 in a *Drosophila* model of multisystem proteinopathy. *Hum. Mol. Genet.* 25, 936–950.
 62. Arandel, L., Espinoza, M.P., 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. *DMM Dis. Model. Mech.* 10, 487–497.
 63. Beskow, L.M. (2016). Lessons from HeLa Cells: The Ethics and Policy of Biospecimens. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 17, 395–417.
 64. Bigot, A., Klein, A.F., Gasnier, E., Jacquemin, V., Ravassard, P., Butler-Browne, G., Mouly, V., and Furling, D. (2009). Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells. *Am. J. Pathol.* 174, 1435–1442.
 65. 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.* 2010 178 17, 1315–1324.
 66. Beaulieu, D., Thebault, P., Pelletier, R., Chapdelaine, P., Tarnopolsky, M., Furling, D., and Puymirat, J. (2012). Abnormal prostaglandin E2 production blocks myogenic differentiation in myotonic dystrophy. *Neurobiol. Dis.* 45, 122–129.
 67. Krom, Y.D., Dumonceaux, J., Mamchaoui, K., Den Hamer, B., Mariot, V., Negroni, E., Geng, L.N., Martin, N., Tawil, R., Tapscott, S.J., et al. (2012). Generation of isogenic D4Z4 contracted and noncontracted immortal muscle cell clones from a mosaic patient: a cellular model for FSHD. *Am. J. Pathol.* 181, 1387–1401.
 68. Wattin, M., Gaweda, L., Muller, P., Baritaud, M., Scholtes, C., Lozano, C., Gieseler, K., and Kretz-Remy, C. (2018). Modulation of Protein Quality Control and Proteasome to Autophagy Switch in Immortalized Myoblasts from Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
 69. Bittel, A.J., Sreetama, S.C., Bittel, D.C., Horn, A., Novak, J.S., Yokota, T., Zhang, A., Maruyama, R., Lim, K.R.Q., Jaiswal, J.K., et al. (2020). Membrane Repair Deficit in Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–18.

70. Lim, K.R.Q., Maruyama, R., Echigoya, Y., Nguyen, Q., Zhang, A., Khawaja, H., Chandra, S. Sen, Jones, T., Jones, P., Chen, Y.W., et al. (2020). Inhibition of DUX4 expression with antisense LNA gapmers as a therapy for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *117*, 16509–16515.
71. Liu, W., Pajusalu, S., Lake, N.J., Zhou, G., Ioannidis, N., Mittal, P., Johnson, N.E., Weihl, C.C., Williams, B.A., Albrecht, D.E., et al. (2019). Estimating prevalence for limb-girdle muscular dystrophy based on public sequencing databases. *Genet. Med.* *21*, 2512–2520.
72. Chu, M.L., and Moran, E. (2018). The Limb–Girdle Muscular Dystrophies: Is Treatment on the Horizon? *Neurotherapeutics* *15*, 849–862.
73. Pozsgai, E., Griffin, D., Potter, R., Sahenk, Z., Lehman, K., Rodino-Klapac, L.R., and Mendell, J.R. (2021). Unmet needs and evolving treatment for limb girdle muscular dystrophies. *Neurodegener. Dis. Manag.* *11*, 411–429.
74. Young, C.S., Pyle, A.D., and Spencer, M.J. (2019). CRISPR for Neuromuscular Disorders: Gene Editing and Beyond. *Physiology* *34*, 341–353.
75. Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J.K., and Carroll, D. (2003). Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* (80-.). *300*, 764.
76. Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2010). Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* *186*, 757–761.
77. Zhang, H.X., Zhang, Y., and Yin, H. (2019). Genome Editing with mRNA Encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Mol. Ther.* *27*, 735–746.
78. Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., and Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J. Mol. Evol.* *60*, 174–182.
79. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* (80-.). *337*, 816–821.
80. Sharma, G., Sharma, A.R., Bhattacharya, M., Lee, S.S., and Chakraborty, C. (2021). CRISPR-Cas9: A Preclinical and Clinical Perspective for the Treatment of Human Diseases. *Mol. Ther.* *29*, 571–586.
81. Yun, Y., and Ha, Y. (2020). CRISPR/Cas9-Mediated Gene Correction to Understand ALS. *Int. J. Mol. Sci.* *21*.
82. Min, Y.L., Chemello, F., Li, H., Rodriguez-Caycedo, C., Sanchez-Ortiz, E., Mireault, A.A., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Zhang, Y., Bassel-Duby, R., et al. (2020). Correction of Three Prominent Mutations in Mouse and Human Models of Duchenne Muscular Dystrophy by Single-Cut Genome Editing. *Mol. Ther.* *28*, 2044–2055.
83. Turan, S., Farruggio, A.P., Srifa, W., Day, J.W., and Calos, M.P. (2016). Precise Correction of Disease Mutations in Induced Pluripotent Stem Cells Derived From Patients With Limb Girdle Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* *24*, 685–696.
84. ClinicalTrials.gov ClinicalTrials.gov.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=crispr&cntry=&state=&city=&dist=>.
85. CRISPR Therapeutics Announces FDA Regenerative Medicine... | CRISPR <https://crisprtx.com/about-us/press-releases-and-presentations/crispr-therapeutics-announces-fda-regenerative-medicine-advanced-therapy-rmat-designation-granted-to-ctx110-for-the-treatment-of-relapsed-or-refractory-cd19-b-cell-malignancies>.
86. FDA approves first test of CRISPR to correct genetic defect causing sickle cell disease | Berkeley News <https://news.berkeley.edu/2021/03/30/fda-approves-first-test-of-crispr-to-correct-genetic-defect-causing-sickle-cell-disease/>.
87. Third International Summit on Human Genome Editing - National Academy of Medicine https://nam.edu/event/third-international-summit-on-human-genome-editing/?gclid=Cj0KCQiApKagBhC1ARIsAFc7Mc6dEB4Cf5pioLlxa9maoA2qG_O_j5agOJST0n35gbZR_rOKu31qns8aAloDEALw_wcB.
88. Jayasundara, K., Hollis, A., Krahn, M., Mamdani, M., Hoch, J.S., and Grootendorst, P. (2019). Estimating the clinical cost of drug development for orphan versus non-orphan drugs. *Orphanet J. Rare Dis.* *14*, 1–10.
89. Wouters, O.J., McKee, M., and Luyten, J. (2020). Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *JAMA* *323*, 844–853.
90. Roessler, H.I., Knoers, N.V.A.M., van Haelst, M.M., and van Haaften, G. (2021). Drug Repurposing for Rare Diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* *42*, 255–267.
91. Fetro, C., and Scherman, D. (2020). Drug repurposing in rare diseases: Myths and reality. *Therapies* *75*, 157–160.
92. Breckenridge, A., and Jacob, R. (2018). Overcoming the legal and regulatory barriers to drug

- repurposing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018 181 18, 1–2.
93. Kuemmerle-Deschner, J.B., Wittkowski, H., Tyrrell, P.N., Koetter, I., Lohse, P., Ummenhofer, K., Reess, F., Hansmann, S., Koitschev, A., Deuter, C., et al. (2013). Treatment of Muckle-Wells syndrome: analysis of two IL-1-blocking regimens. *Arthritis Res. Ther.* 15.
94. Teachey, D.T., Greiner, R., Seif, A., Attiyeh, E., Bleesing, J., Choi, J., Manno, C., Rappaport, E., Schwabe, D., Sheen, C., et al. (2009). Treatment with sirolimus results in complete responses in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Br. J. Haematol.* 145, 101.
95. Prosdociimi, M., Zuccato, C., Cosenza, L.C., Borgatti, M., Lampronti, I., Finotti, A., and Gambari, R. (2022). A Rational Approach to Drug Repositioning in β -thalassemia: Induction of Fetal Hemoglobin by Established Drugs. *Wellcome open Res.* 7, 150.
96. Aldewachi, H., Al-Zidan, R.N., Conner, M.T., and Salman, M.M. (2021). High-Throughput Screening Platforms in the Discovery of Novel Drugs for Neurodegenerative Diseases. *Bioeng.* 2021, Vol. 8, Page 30 8, 30.
97. Hindle, S.J., and Bainton, R.J. (2014). Barrier mechanisms in the *Drosophila* blood-brain barrier. *Front. Neurosci.* 8.
98. McGurk, L., Berson, A., and Bonini, N.M. (2015). *Drosophila* as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease. *Genetics* 201, 377–402.
99. Sanz, F.J., Solana-Manrique, C., Torres, J., Masiá, E., Vicent, M.J., and Paricio, N. (2021). A High-Throughput Chemical Screen in DJ-1 β Mutant Flies Identifies Zaprinas as a Potential Parkinson's Disease Treatment. *Neurotherapeutics* 18, 2565–2578.
100. Konieczny, P., and Artero, R. (2020). *Drosophila* SMN2 minigene reporter model identifies moxifloxacin as a candidate therapy for SMA. *FASEB J.* 34, 3021–3036.
101. Januel, C., Menduti, G., Mamchaoui, K., Martinat, C., Artero, R., Konieczny, P., and Boido, M. (2022). Moxifloxacin rescues SMA phenotypes in patient-derived cells and animal model. *Cell. Mol. Life Sci.* 79, 1–20.
102. Yamaguchi, M., and Yoshida, H. (2018). *Drosophila* as a Model Organism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1076, 1–10.
103. Muqit, M.M.K., and Feany, M.B. (2002). Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 237–243.
104. Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific ϕ C31 integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3312–3317.
105. Markstein, M., Pitsouli, C., Villalta, C., Celniker, S.E., and Perrimon, N. (2008). Exploiting position effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes. *Nat. Genet.* 40, 476–83.
106. Marek, K.W., Ng, N., Fetter, R., Smolik, S., Goodman, C.S., and Davis, G.W. (2000). A Genetic Analysis of Synaptic Development: Pre-and Postsynaptic dCBP Control Transmitter Release at the *Drosophila* NMJ highly localized and limited amount of trophic factor or signaling molecule (Arancio et al A second possibility is that regulation of synaptic function is achieved locally at the synapse by a biochemical tag that specifies those select synapses. *Neuron* 25, 537–547.
107. Mamchaoui, K., Trollet, C., Bigot, A., Negroni, E., Chaouch, S., Wolff, A., Kandalla, P.K., Marie, S., Di Santo, J., St Guily, J.L., et al. (2011). Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet. Muscle* 1.
108. Oliveros, J.C., Franch, M., Tabas-Madrid, D., San-León, D., Montoliu, L., Cubas, P., and Pazos, F. (2016). Breaking-Cas-interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Res.* 44, W267–W271.
109. Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J., and Kim, J.S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 24, 1012–1019.
110. Tian, X., Gu, T., Patel, S., Bode, A.M., Lee, M.H., and Dong, Z. (2019). CRISPR/Cas9 – An evolving biological tool kit for cancer biology and oncology. *npj Precis. Oncol.* 2019 31 3, 1–8.
111. Mengstie, M.A., and Wondimu, B.Z. (2021). Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics* 15, 353–361.
112. Fuster-García, C., García-García, G., González-Romero, E., Jaijo, T., Sequedo, M.D., Ayuso, C., Vázquez-Manrique, R.P., Millán, J.M., and Aller, E. (2017). USH2A Gene Editing Using the CRISPR System. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 8, 529–541.
113. Soblechero-Martín, P., Albiasu-Arteta, E., Anton-Martínez, A., de la Puente-Ovejero, L., García-Jiménez, I., González-Iglesias, G., Larrañaga-Aiestaran, I., López-Martínez, A., Poyatos-García, J., Ruiz-Del-Yerro, E., et al. (2021). Duchenne muscular dystrophy cell culture models created by CRISPR/Cas9 gene editing and their application in drug screening. *Sci. Rep.* 11.

114. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408.
115. Selma-Soriano, E., Artero, R., and Llamusi, B. (2018). Optical Cross-Sectional Muscle Area Determination of *Drosophila Melanogaster* Adult Indirect Flight Muscles. *J. Vis. Exp.*
116. Selma-Soriano, E., Chakraborty, M., Llamusi, B., and Artero, R. (2018). Ex-vivo characterization of *Drosophila* heart functional parameters. *Protoc. Exch.*
117. Bargiela, A., Sabater-Arcis, M., Espinosa-Espinosa, J., Zulaica, M., De Munain, A.L., and Artero, R. (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, 25203–25213.
118. Hunt, L.C., and Demontis, F. (2013). Whole-mount immunostaining of *Drosophila* skeletal muscle. *Nat. Protoc.* 2013 812 8, 2496–2501.
119. Sabater-Arcis, M., Bargiela, A., Moreno, N., Poyatos-Garcia, J., Vilchez, J.J., and Artero, R. (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.
120. 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.
121. 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.
122. Babcock, D.T., and Ganetzky, B. (2014). An improved method for accurate and rapid measurement of flight performance in *drosophila*. *J. Vis. Exp.* 13, e51223.
123. Aparicio-Puerta, E., Lebrón, R., Rueda, A., Gómez-Martín, C., Giannoukakos, S., Jaspez, D., Medina, J.M., Zubkovic, A., Jurak, I., Fromm, B., et al. (2019). sRNAbench and sRNAtoolbox 2019: intuitive fast small RNA profiling and differential expression. *Nucleic Acids Res.* 47, W530–W535.
124. Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140.
125. Ludwig, C., Gillet, L., Rosenberger, G., Amon, S., Collins, B.C., and Aebersold, R. (2018). Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* 14.
126. Szklarczyk, D., Gable, A.L., Nastou, K.C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N.T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., et al. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* 49, D605–D612.
127. Lloyd, T.E., and Taylor, J.P. (2010). Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1184.
128. Sanyal, S. (2009). Genomic mapping and expression patterns of C380, OK6 and D42 enhancer trap lines in the larval nervous system of *Drosophila*. *Gene Expr. Patterns* 9, 371–380.
129. Perkins, L.A., Holderbaum, L., Tao, R., Hu, Y., Sopko, R., McCall, K., Yang-Zhou, D., Flockhart, I., Binari, R., Shim, H.S., et al. (2015). The transgenic RNAi project at Harvard medical school: Resources and validation. *Genetics* 201, 843–852.
130. M, G., CE, S., D, N., and G, F. (1965). ACTINOMYCIN BINDING TO DNA: MECHANISM AND SPECIFICITY. *J. Mol. Biol.* 11, 445–457.
131. Dobi, K.C., Schulman, V.K., and Baylies, M.K. (2015). Specification of the somatic musculature in *Drosophila*. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 4, 357–375.
132. Klionsky, D.J., Abdel-Aziz, A.K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M.H., Abudu, Y.P., Acevedo-Arozena, A., et al. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 17, 1–382.
133. Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.J., Coppes, R.P., Engedal, N., Mari, M., and Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 14, 1435–1455.
134. 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. *DMM Dis. Model. Mech.* 8, 679–690.
135. Mauvezin, C., Ayala, C., Braden, C.R., Kim, J., and Neufeld, T.P. (2014). Assays to monitor autophagy in *Drosophila*. *Methods* 68, 134–139.
136. Lunn, M.R., and Wang, C.H. (2008). Spinal muscular atrophy. *Lancet (London, England)* 371, 2120–2133.
137. Reilly, A., Chehade, L., and Kothary, R. (2022). Curing SMA: Are we there yet? *Gene Ther.* 2022, 1–10.

138. Cartegni, L., and Krainer, A.R. (2002). Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat. Genet.* **30**, 377–384.
139. Corsi, L., Mescola, A., and Alessandrini, A. (2019). Glutamate Receptors and Glioblastoma Multiforme: An Old “Route” for New Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, Vol. 20, Page 1796 **20**, 1796.
140. Costa, R., Rodia, M.T., Vianello, S., Santi, S., Lattanzi, G., Angelini, C., Pegoraro, E., and Cenacchi, G. (2020). Transportin 3 (TNPO3) and related proteins in limb girdle muscular dystrophy D2 muscle biopsies: A morphological study and pathogenetic hypothesis. *Neuromuscul. Disord.* **30**, 685–692.
141. Kumar, K., Sinha, S.K., Maity, U., Kirti, P.B., and Kumar, K.R.R. (2022). Insights into established and emerging roles of SR protein family in plants and animals. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, e1763.
142. van der Plas, E., Gutmann, L., Thedens, D., Shields, R.K., Langbehn, K., Guo, Z., Sonka, M., and Nopoulos, P. (2021). Quantitative muscle MRI as a sensitive marker of early muscle pathology in myotonic dystrophy type 1. *Muscle Nerve* **63**, 553–562.
143. 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. U. S. A.* **110**, 13570–13575.
144. Spreafico, M., Cafora, M., Bragato, C., Capitanio, D., Marasca, F., Bodega, B., De Palma, C., Mora, M., Gelfi, C., Marozzi, A., et al. (2021). Targeting HDAC8 to ameliorate skeletal muscle differentiation in Duchenne muscular dystrophy. *Pharmacol. Res.* **170**, 105750.
145. Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. In, pp. 77–88.
146. Collier, J.J., Suomi, F., Oláhová, M., McWilliams, T.G., and Taylor, R.W. (2021). Emerging roles of ATG7 in human health and disease. *EMBO Mol. Med.* **13**, e14824.
147. Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A., and Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzym.* **452**, 181–197.
148. Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2010). p62, an autophagy hero or culprit? *Nat. Cell Biol.* **12**, 207–209.
149. Cisternas, P., Henriquez, J.P., Brandan, E., and Inestrosa, N.C. (2014). Wnt signaling in skeletal muscle dynamics: myogenesis, neuromuscular synapse and fibrosis. *Mol. Neurobiol.* **49**, 574–589.
150. Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nat.* 2007 4477143 **447**, 396–398.
151. Yao, Q., Chen, Y., and Zhou, X. (2019). The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **51**, 11–17.
152. Horak, M., Novak, J., and Bienertova-Vasku, J. (2016). Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Dev. Biol.* **410**, 1–13.
153. 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**.
154. Roberts, T.C., Langer, R., and Wood, M.J.A. (2020). Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020 1910 **19**, 673–694.
155. Cerro-Herreros, E., González-Martínez, I., Moreno-Cervera, N., Overby, S., Pérez-Alonso, M., Llamusi, B., and Artero, R. (2020). Therapeutic Potential of AntagomiR-23b for Treating Myotonic Dystrophy. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **21**, 837–849.
156. 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., et al. (2021). Preclinical characterization of antagomiR-218 as a potential treatment for myotonic dystrophy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **26**, 174–191.
157. Diniz, G.P., and Wang, D.Z. (2016). Regulation of Skeletal Muscle by microRNAs. *Compr. Physiol.* **6**, 1279–1294.
158. Bochnakian, A., Zhen, A., Zisoulis, D.G., Idica, A., KewalRamani, V.N., Neel, N., Daugaard, I., Hamdorf, M., Kitchen, S., Lee, K., et al. (2019). Interferon-Inducible MicroRNA miR-128 Modulates HIV-1 Replication by Targeting TNPO3 mRNA. *J. Virol.* **93**.
159. Swaminathan, G., Rossi, F., Sierra, L.J., Gupta, A., Navas-Martín, S., and Martín-García, J. (2012). A role for microRNA-155 modulation in the anti-HIV-1 effects of Toll-like receptor 3 stimulation in macrophages. *PLoS Pathog.* **8**.
160. Li, J., Chan, M.C., Yu, Y., Bei, Y., Chen, P., Zhou, Q., Cheng, L., Chen, L., Ziegler, O., Rowe, G.C., et al. (2017). miR-29b contributes to multiple types of muscle atrophy. *Nat. Commun.* **8**.
161. Vogel, C., and Marcotte, E.M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 2012 134 **13**, 227–232.
162. Rozanova, S., Barkovits, K., Nikolov, M., Schmidt, C., Urlaub, H., and Marcus, K. (2021). Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview. *Methods Mol. Biol.* **2228**, 85–116.

163. Kim, J., Park, R.Y., Chen, J.K., Kim, J., Jeong, S., and Ohn, T. (2013). Splicing factor SRSF3 represses the translation of programmed cell death 4 mRNA by associating with the 5'-UTR region. *Cell Death Differ.* 2014 213 21, 481–490.
164. Laurent, F.X., Sureau, A., Klein, A.F., Trouslard, F., Gasnier, E., Furling, D., and Marie, J. (2012). New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats. *Nucleic Acids Res.* 40, 3159–3171.
165. Bryant, D.M., Datta, A., Rodríguez-Fraticelli, A.E., PeräCurrenny Signnen, J., Martín-Belmonte, F., and Mostov, K.E. (2010). A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen. *Nat. Cell Biol.* 12, 1035–1045.
166. Mauger, D.M., Joseph Cabral, B., Presnyak, V., Su, S. V., Reid, D.W., Goodman, B., Link, K., Khatwani, N., Reynders, J., Moore, M.J., et al. (2019). mRNA structure regulates protein expression through changes in functional half-life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 24075–24083.
167. Lanni, S., and Pearson, C.E. (2019). Molecular genetics of congenital myotonic dystrophy. *Neurobiol. Dis.* 132, 104533.
168. T'Hoën, P.A.C., Friedländer, M.R., Almlöf, J., Sammeth, M., Pulyakhina, I., Anvar, S.Y., Laros, J.F.J., Buermans, H.P.J., Karlberg, O., Brännvall, M., et al. (2013). Reproducibility of high-throughput mRNA and small RNA sequencing across laboratories. *Nat. Biotechnol.* 2013 3111 31, 1015–1022.
169. Aguiar, V.R.C., Castelli, E.C., Single, R.M., Bashirova, A., Ramsuran, V., Kulkarni, S., Augusto, D.G., Martin, M.P., Gutierrez-Arcelus, M., Carrington, M., et al. (2023). Comparison between qPCR and RNA-seq reveals challenges of quantifying HLA expression. *Immunogenetics*.
170. Mukherjee, S., and Zhang, Y. (2011). Protein-protein complex structure predictions by multimeric threading and template recombination. *Structure* 19, 955–966.
171. Dunkenberger, L., and Del Valle, L. (2022). Antigen Retrieval and Signal Amplification. *Methods Mol. Biol.* 2422, 65–74.
172. Pistoni, M., Ghigna, C., and Gabellini, D. (2010). Alternative splicing and muscular dystrophy. <http://dx.doi.org/10.4161/rna.7.4.12258> 7, 441–452.
173. Nakka, K., Ghigna, C., Gabellini, D., and Dilworth, F.J. (2018). Diversification of the muscle proteome through alternative splicing. *Skelet. Muscle* 2018 81 8, 1–18.
174. Nakamori, M., Kimura, T., Fujimura, H., Takahashi, M.P., and Sakoda, S. (2007). Altered mRNA splicing of dystrophin in type 1 myotonic dystrophy. *Muscle Nerve* 36, 251–257.
175. 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 I. *Genes (Basel)*. 11, 1–27.
176. Cléry, A., Krepl, M., Nguyen, C.K.X., Moursy, A., Jorjani, H., Katsantoni, M., Okoniewski, M., Mittal, N., Zavolan, M., Sponer, J., et al. (2021). Structure of SRSF1 RRM1 bound to RNA reveals an unexpected bimodal mode of interaction and explains its involvement in SMN1 exon7 splicing. *Nat. Commun.* 12.
177. Wang, Z., Chatterjee, D., Jeon, H.Y., Akerman, M., Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Krainer, A.R. (2012). Exon-centric regulation of pyruvate kinase M alternative splicing via mutually exclusive exons. *J. Mol. Cell Biol.* 4, 79–87.
178. Kuranaga, Y., Sugito, N., Shinohara, H., Tsujino, T., Taniguchi, K., Komura, K., Ito, Y., Soga, T., and Akao, Y. (2018). SRSF3, a Splicer of the PKM Gene, Regulates Cell Growth and Maintenance of Cancer-Specific Energy Metabolism in Colon Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, Vol. 19, Page 3012 19, 3012.
179. Kar, A., Fushimi, K., Zhou, X., Ray, P., Shi, C., Chen, X., Liu, Z., Chen, S., and Wu, J.Y. (2011). RNA helicase p68 (DDX5) regulates tau exon 10 splicing by modulating a stem-loop structure at the 5' splice site. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1812–1821.
180. Kreipke, R.E., Kwon, Y. V., Shcherbata, H.R., and Ruohola-Baker, H. (2017). *Drosophila melanogaster* as a Model of Muscle Degeneration Disorders. In *Current Topics in Developmental Biology* (Academic Press Inc.), pp. 83–109.
181. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues The GTEx Consortium* Downloaded from.
182. Girardi, F., and Le Grand, F. (2018). Wnt Signaling in Skeletal Muscle Development and Regeneration. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 153, 157–179.
183. von Maltzahn, J., Chang, N.C., Bentzinger, C.F., and Rudnicki, M.A. (2012). Wnt Signaling in Myogenesis. *Trends Cell Biol.* 22, 602.
184. FlyBase Gene Report: Dmel\Mhc <http://flybase.org/reports/FBgn0264695>.
185. Li, J., Yang, T., Sha, Z., Tang, H., Hua, X., Wang, L., Wang, Z., Gao, Z., Sluijter, J.P.G., Rowe, G.C., et al. (2021). Angiotensin II-induced muscle atrophy via PPAR γ suppression is mediated by miR-29b. *Mol.*

- Ther. - *Nucleic Acids* 23, 743–756.
186. Li, J., Wang, L., Hua, X., Tang, H., Chen, R., Yang, T., Das, S., and Xiao, J. (2020). CRISPR/Cas9-Mediated miR-29b Editing as a Treatment of Different Types of Muscle Atrophy in Mice. *Mol. Ther.* 28, 1359–1372.
 187. Chen, R., Yuan, W., Zheng, Y., Zhu, X., Jin, B., Yang, T., Yan, Y., Xu, W., Chen, H., Gao, J., et al. (2022). Delivery of engineered extracellular vesicles with miR-29b editing system for muscle atrophy therapy. *J. Nanobiotechnology* 20, 1–16.
 188. Wu, H., Sun, S., Tu, K., Gao, Y., Xie, B., Krainer, A.R., and Zhu, J. (2010). A Splicing-Independent Function of SF2/ASF in MicroRNA Processing. *Mol. Cell* 38, 67–77.
 189. Tavakol, S., Ashrafizadeh, M., Deng, S., Azarian, M., Abdoli, A., Motavaf, M., Poormoghadam, D., Khanbabaie, H., Ghasemipour Afshar, E., Mandegary, A., et al. (2019). Autophagy modulators: Mechanistic aspects and drug delivery systems. *Biomolecules* 9, 530.
 190. Salisbury, E., Schoser, B., Schneider-Gold, C., Wang, G.L., Huichalaf, C., Jin, B., Sirito, M., Sarkar, P., Krahe, R., Timchenko, N.A., et al. (2009). Expression of RNA CCUG repeats dysregulates translation and degradation of proteins in myotonic dystrophy 2 patients. *Am. J. Pathol.* 175, 748–762.
 191. Kitajima, Y., Yoshioka, K., and Suzuki, N. (2020). The ubiquitin-proteasome system in regulation of the skeletal muscle homeostasis and atrophy: from basic science to disorders. *J. Physiol. Sci.* 70.
 192. Daily, J.W., and Park, S. (2022). Sarcopenia Is a Cause and Consequence of Metabolic Dysregulation in Aging Humans: Effects of Gut Dysbiosis, Glucose Dysregulation, Diet and Lifestyle. *Cells* 2022, Vol. 11, Page 338 11, 338.
 193. Yang, W., and Lu, Z. (2013). Nuclear PKM2 regulates the Warburg effect. *Cell Cycle* 12, 3154.
 194. De Iaco, A., and Luban, J. (2011). Inhibition of HIV-1 infection by TNPO3 depletion is determined by capsid and detectable after viral cDNA enters the nucleus. *Retrovirology* 8, 98.
 195. Diaz-Griffero, F. (2012). The Role of TNPO3 in HIV-1 Replication. *Mol. Biol. Int.* 2012, 1–6.
 196. FlyBase Gene Report: Dmel\Nmdar1 <http://flybase.org/reports/FBgn0010399>.
 197. Gaina, G., and Popa (Gruianu), A. (2021). Muscular dystrophy: Experimental animal models and therapeutic approaches (Review). *Exp. Ther. Med.* 21.
 198. Bassez, G., Audureau, E., Hogrel, J.Y., Arrouasse, R., Baghdoyan, S., Bhugaloo, H., Gourlay-Chu, M.L., Le Corvoisier, P., and Peschanski, M. (2018). Improved mobility with metformin in patients with myotonic dystrophy type 1: a randomized controlled trial. *Brain* 141, 2855–2865.
 199. Heatwole, C., Luebke, E., Rosero, S., Eichinger, K., Martens, W., Hilbert, J., Dekdebrun, J., Dilek, N., Zizzi, C., Johnson, N., et al. (2021). Mexiletine in Myotonic Dystrophy Type 1. *Neurology* 96, e228–e240.
 200. Horrigan, J., Gomes, T.B., Snape, M., Nikolenko, N., McMorn, A., Evans, S., Yaroshinsky, A., Della Pasqua, O., Oosterholt, S., and Lochmüller, H. (2020). A Phase 2 Study of AMO-02 (Tideglusib) in Congenital and Childhood-Onset Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1). *Pediatr. Neurol.* 112, 84–93.
 201. Dastidar, S., Ardui, S., Singh, K., Majumdar, D., Nair, N., Fu, Y., Reyon, D., Samara, E., Gerli, M.F.M., Klein, A.F., et al. (2018). Efficient CRISPR/Cas9-mediated editing of trinucleotide repeat expansion in myotonic dystrophy patient-derived iPS and myogenic cells. *Nucleic Acids Res.* 46, 8275–8298.
 202. Cyranoski, D. (2016). First trial of CRISPR in people: Chinese team approved to test gene-edited cells in people with lung cancer. *Nature* 535, 476–477.
 203. Li, Y., Glass, Z., Huang, M., Chen, Z.Y., and Xu, Q. (2020). Ex Vivo Cell-Based CRISPR/Cas9 Genome Editing for Therapeutic Applications. *Biomaterials* 234, 119711.
 204. Erkut, E., and Yokota, T. (2022). CRISPR Therapeutics for Duchenne Muscular Dystrophy. *Int. J. Mol. Sci.* 23.

ANEXO

Expresión diferencial del proteoma de los mioblastos inmortalizados derivados de paciente

A continuación, se presentan los resultados de la proteómica de los mioblastos inmortalizados control (CNT) y derivados de paciente *LGMDD2* (LGMDD2) en la Tabla 5. La tabla muestra las medias y valores de *Fold Change* (FC) de cada línea, y los valores estadísticos *P-value* y *False Discovery Rate* (FDR).

Tabla 5. Expresión diferencial del proteoma de los mioblastos inmortalizados *LGMDD2*

Protein	mean CNT	mean LGMDD2	FC	Log2 (FC)	P-value	FDR	-log10 (FDR)
sp P04792 HSPB1_HUMAN	92598.698	706314.209	7.628	2.931	<0.0001	<0.0001	4.3188
sp Q15746 MYLK_HUMAN	39451.713	66860.668	1.695	0.761	<0.0001	<0.0001	4.1427
sp P06756 ITAV_HUMAN	174021.158	200392.162	1.152	0.204	<0.0001	0.0001	3.9872
sp Q9UNE7 CHIP_HUMAN	9613.688	7947.448	0.827	-0.275	<0.0001	0.0001	3.9872
sp Q16891 MIC60_HUMAN	318731.299	182509.383	0.573	-0.804	<0.0001	0.0001	3.8327
sp P50479 PDLI4_HUMAN	132130.792	257688.958	1.950	0.964	<0.0001	0.0001	3.8327
sp O15075 DCLK1_HUMAN	101044.091	52576.361	0.520	-0.942	<0.0001	0.0002	3.7620
sp Q05209 PTN12_HUMAN	2467.999	10096.562	4.091	2.032	<0.0001	0.0003	3.5800
sp P49591 SYSC_HUMAN	49794.835	43699.833	0.878	-0.188	<0.0001	0.0003	3.5800
sp Q96199 SUCB2_HUMAN	32361.171	32562.609	1.006	0.009	<0.0001	0.0003	3.5800
sp P33991 MCM4_HUMAN	20368.922	5732.618	0.281	-1.829	<0.0001	0.0003	3.5421
sp Q9UKF6 CPSF3_HUMAN	5741.807	8089.012	1.409	0.494	<0.0001	0.0003	3.5200
sp Q9NR12 PDLI7_HUMAN	186575.192	316240.031	1.695	0.761	<0.0001	0.0003	3.4855
sp P14406 CX7A2_HUMAN	283033.767	130978.362	0.463	-1.112	<0.0001	0.0004	3.4295
sp P49588 SYAC_HUMAN	351610.452	404854.963	1.151	0.203	<0.0001	0.0004	3.4295
sp P17612 KAPCA_HUMAN	34786.658	29880.830	0.859	-0.219	<0.0001	0.0004	3.4012
sp Q8IY17 PLPL6_HUMAN	16887.572	14349.714	0.850	-0.235	<0.0001	0.0004	3.4012
sp P37108 SRP14_HUMAN	6373.313	13775.341	2.161	1.112	<0.0001	0.0004	3.3556
sp Q00341 VIGLN_HUMAN	118535.194	314415.685	2.653	1.407	<0.0001	0.0005	3.3215
sp P62854 RS26_HUMAN	132763.205	347481.867	2.617	1.388	<0.0001	0.0006	3.1911
sp P20674 COX5A_HUMAN	70640.512	23082.619	0.327	-1.614	<0.0001	0.0006	3.1911
sp Q9Y6M1 IF2B2_HUMAN	6952.516	24660.602	3.547	1.827	<0.0001	0.0006	3.1911
sp O94919 ENDD1_HUMAN	47403.545	9784.195	0.206	-2.276	<0.0001	0.0006	3.1911
sp Q9UKK3 PARP4_HUMAN	17431.273	16148.330	0.926	-0.110	<0.0001	0.0006	3.1911
sp Q14008 CKAP5_HUMAN	22786.921	36306.318	1.593	0.672	<0.0001	0.0007	3.1630
sp Q99622 C10_HUMAN	2197.872	2480.230	1.128	0.174	<0.0001	0.0007	3.1543
sp Q03135 CAV1_HUMAN	182493.190	273349.350	1.498	0.583	<0.0001	0.0008	3.0969
sp P22626 ROA2_HUMAN	537439.974	669402.609	1.246	0.317	<0.0001	0.0008	3.0969
sp P17844 DDX5_HUMAN	121580.558	138891.619	1.142	0.192	<0.0001	0.0008	3.0969
sp Q8IWA5 CTL2_HUMAN	72206.753	88148.169	1.221	0.288	<0.0001	0.0009	3.0357
sp P36776 LONM_HUMAN	68593.643	103715.749	1.512	0.596	<0.0001	0.0010	2.9897
sp P30048 PRDX3_HUMAN	705347.828	344542.415	0.488	-1.034	<0.0001	0.0011	2.9606
sp O00233 PSMD9_HUMAN	19266.762	25547.940	1.326	0.407	<0.0001	0.0011	2.9606
sp Q8N0X7 SPART_HUMAN	11756.773	13078.602	1.112	0.154	<0.0001	0.0011	2.9606

Anexo

sp Q8WZ42 TITIN_HUMAN	776621.208	81764.686	0.105	-3.248	<0.0001	0.0012	2.9083
sp Q86UU1 PHLB1_HUMAN	22405.130	15978.684	0.713	-0.488	<0.0001	0.0013	2.8989
sp O95674 CDS2_HUMAN	8291.820	4433.718	0.535	-0.903	<0.0001	0.0013	2.8742
sp P48047 ATPO_HUMAN	229096.817	406760.124	1.775	0.828	<0.0001	0.0014	2.8523
sp P17812 PYRG1_HUMAN	53960.075	85219.994	1.579	0.659	<0.0001	0.0014	2.8523
sp Q96K17 BT3L4_HUMAN	22388.353	40556.416	1.811	0.857	<0.0001	0.0014	2.8523
sp Q9BUF5 TBB6_HUMAN	61797.244	805505.364	13.035	3.704	<0.0001	0.0014	2.8505
sp P62805 H4_HUMAN	13841546.920	9587719.890	0.693	-0.530	<0.0001	0.0014	2.8505
sp Q08379 GOGA2_HUMAN	18234.789	13204.238	0.724	-0.466	<0.0001	0.0014	2.8425
sp P42167 LAP2B_HUMAN	30418.542	62027.926	2.039	1.028	<0.0001	0.0015	2.8119
sp O75935 DCTN3_HUMAN	124344.011	82347.397	0.662	-0.595	<0.0001	0.0016	2.7897
sp O75964 ATP5L_HUMAN	11190.585	15210.131	1.359	0.443	<0.0001	0.0016	2.7846
sp O75923 DYSF_HUMAN	406559.682	152991.347	0.376	-1.410	<0.0001	0.0017	2.7615
sp P12268 IMDH2_HUMAN	191881.467	155979.480	0.813	-0.299	<0.0001	0.0018	2.7395
sp O00303 EIF3F_HUMAN	34911.530	70902.042	2.031	1.022	<0.0001	0.0019	2.7321
sp P15559 NQO1_HUMAN	74907.191	193599.578	2.585	1.370	<0.0001	0.0019	2.7215
sp P13804 ETFHA_HUMAN	185736.949	111131.680	0.598	-0.741	<0.0001	0.0019	2.7215
sp P27797 CALR_HUMAN	1759804.133	1499227.559	0.852	-0.231	<0.0001	0.0020	2.6977
sp P08237 PFKAM_HUMAN	62511.700	37519.000	0.600	-0.737	<0.0001	0.0020	2.6966
sp P54819 KAD2_HUMAN	544066.615	383040.380	0.704	-0.506	<0.0001	0.0020	2.6966
sp Q9Y265 RUVB1_HUMAN	71103.818	72185.356	1.015	0.022	<0.0001	0.0020	2.6966
sp P62191 PRS4_HUMAN	54957.255	89682.785	1.632	0.707	<0.0001	0.0020	2.6891
sp O43396 TXNL1_HUMAN	40598.453	32629.282	0.804	-0.315	<0.0001	0.0020	2.6891
sp Q96TA1 NIBA2_HUMAN	158084.599	248159.768	1.570	0.651	<0.0001	0.0021	2.6847
sp P99999 CYC_HUMAN	552316.741	234925.460	0.425	-1.233	<0.0001	0.0021	2.6847
sp P23327 SRCH_HUMAN	5038.910	2089.286	0.415	-1.270	<0.0001	0.0021	2.6847
sp P22090 RS4Y1_HUMAN	29895.648	40026.023	1.339	0.421	<0.0001	0.0021	2.6706
sp Q8N163 CCAR2_HUMAN	48080.165	73601.623	1.531	0.614	<0.0001	0.0022	2.6676
sp Q15042 RB3GP_HUMAN	6745.681	15288.035	2.266	1.180	<0.0001	0.0022	2.6586
sp P49736 MCM2_HUMAN	7116.226	7536.439	1.059	0.083	<0.0001	0.0022	2.6586
sp P63220 RS21_HUMAN	269764.324	284961.075	1.056	0.079	0.0001	0.0022	2.6535
sp Q9H3S7 PTN23_HUMAN	20660.626	21754.844	1.053	0.074	0.0001	0.0025	2.6036
sp P09622 DLDH_HUMAN	219969.715	153482.963	0.698	-0.519	0.0001	0.0025	2.5996
sp P61006 RAB8A_HUMAN	37221.166	23929.251	0.643	-0.637	0.0001	0.0026	2.5870
sp O75947 ATP5H_HUMAN	162791.334	118318.542	0.727	-0.460	0.0001	0.0026	2.5870
sp O15523 DDX3Y_HUMAN	7405.367	11387.928	1.538	0.621	0.0001	0.0026	2.5807
sp P11142 HSP7C_HUMAN	3893013.059	3417985.363	0.878	-0.188	0.0001	0.0026	2.5776
sp P30050 RL12_HUMAN	824504.936	723513.161	0.878	-0.189	0.0001	0.0027	2.5741
sp P19237 TNNT1_HUMAN	858090.144	328112.517	0.382	-1.387	0.0001	0.0029	2.5402
sp P51648 AL3A2_HUMAN	85731.737	33332.541	0.389	-1.363	0.0002	0.0029	2.5321
sp Q99808 S29A1_HUMAN	1351.122	11309.081	8.370	3.065	0.0002	0.0029	2.5321
sp P04179 SODM_HUMAN	267916.502	185099.396	0.691	-0.533	0.0002	0.0029	2.5321
sp P54578 UBP14_HUMAN	35314.564	30519.535	0.864	-0.211	0.0002	0.0030	2.5214
sp P30101 PDIA3_HUMAN	2304169.444	3107420.790	1.349	0.431	0.0002	0.0031	2.5075
sp Q7KZF4 SND1_HUMAN	497337.237	614028.428	1.235	0.304	0.0002	0.0031	2.5075
sp P51659 DHB4_HUMAN	179842.273	114859.991	0.639	-0.647	0.0002	0.0031	2.5075

sp P29590 PML_HUMAN	88083.145	146314.011	1.661	0.732	0.0002	0.0031	2.5075
sp Q9BTV4 TMM43_HUMAN	112669.578	63625.078	0.565	-0.824	0.0002	0.0031	2.5075
sp O75306 NDUS2_HUMAN	59341.876	28295.917	0.477	-1.068	0.0002	0.0031	2.5075
sp P07814 SYEP_HUMAN	283902.631	403375.510	1.421	0.507	0.0002	0.0031	2.5075
sp P62851 RS25_HUMAN	1439664.192	1084410.530	0.753	-0.409	0.0002	0.0031	2.5075
sp Q14839 CHD4_HUMAN	20434.176	26797.882	1.311	0.391	0.0002	0.0031	2.5075
sp Q92643 GPI8_HUMAN	6198.690	11250.630	1.815	0.860	0.0002	0.0031	2.5075
sp P33176 KINH_HUMAN	279378.367	355211.263	1.271	0.346	0.0002	0.0032	2.5013
sp P23246 SFPQ_HUMAN	164389.542	176367.195	1.073	0.101	0.0002	0.0032	2.5013
sp Q9NVI7 ATD3A_HUMAN	62110.881	56557.303	0.911	-0.135	0.0002	0.0034	2.4726
sp P05141 ADT2_HUMAN	252571.231	130068.752	0.515	-0.957	0.0002	0.0034	2.4711
sp Q9UHX1 PUF60_HUMAN	59485.799	49890.311	0.839	-0.254	0.0002	0.0034	2.4711
sp P84103 SRSF3_HUMAN	27953.423	75024.467	2.684	1.424	0.0002	0.0034	2.4655
sp O15400 STX7_HUMAN	7432.150	9216.047	1.240	0.310	0.0002	0.0034	2.4655
sp Q9BXK5 B2L13_HUMAN	9064.037	26601.153	2.935	1.553	0.0002	0.0034	2.4634
sp P84098 RL19_HUMAN	181094.671	243852.330	1.347	0.429	0.0002	0.0036	2.4397
sp Q9UM00 TMCO1_HUMAN	63011.875	58973.908	0.936	-0.096	0.0002	0.0037	2.4369
sp Q96P70 IPO9_HUMAN	12038.381	3745.370	0.311	-1.684	0.0003	0.0038	2.4170
sp P42785 PCP_HUMAN	7385.967	11521.651	1.560	0.641	0.0003	0.0038	2.4170
sp P50402 EMD_HUMAN	7296.438	6997.715	0.959	-0.060	0.0003	0.0038	2.4170
sp A0FGR8 ESYT2_HUMAN	30102.301	30826.367	1.024	0.034	0.0003	0.0038	2.4170
sp Q8N1F7 NUP93_HUMAN	25849.190	40790.031	1.578	0.658	0.0003	0.0039	2.4116
sp P27824 CALX_HUMAN	709144.918	787095.336	1.110	0.150	0.0003	0.0039	2.4066
sp P62841 RS15_HUMAN	3285.595	8287.199	2.522	1.335	0.0003	0.0039	2.4052
sp P50452 SPB8_HUMAN	1104.028	1502.021	1.360	0.444	0.0003	0.0039	2.4052
sp O95302 FKBP9_HUMAN	50952.549	42537.132	0.835	-0.260	0.0003	0.0039	2.4052
sp P35754 GLRX1_HUMAN	72670.487	112246.686	1.545	0.627	0.0003	0.0041	2.3872
sp Q03001 DYST_HUMAN	91071.475	67890.219	0.745	-0.424	0.0003	0.0041	2.3824
sp Q07020 RL18_HUMAN	387217.883	500963.260	1.294	0.372	0.0003	0.0042	2.3753
sp P04264 K2C1_HUMAN	4211240.355	745429.467	0.177	-2.498	0.0003	0.0043	2.3674
sp P55209 NP1L1_HUMAN	104369.018	303110.450	2.904	1.538	0.0003	0.0043	2.3674
sp O95747 OXSR1_HUMAN	1908.488	4076.593	2.136	1.095	0.0003	0.0043	2.3674
sp P13639 EF2_HUMAN	2225506.007	2429972.620	1.092	0.127	0.0003	0.0043	2.3674
sp P09211 GSTP1_HUMAN	728181.959	781042.419	1.073	0.101	0.0003	0.0043	2.3674
sp Q9Y266 NUDC_HUMAN	46917.214	39322.674	0.838	-0.255	0.0004	0.0046	2.3394
sp Q96N66 MBOA7_HUMAN	896.830	1728.311	1.927	0.946	0.0004	0.0047	2.3320
sp P18124 RL7_HUMAN	456794.916	856446.533	1.875	0.907	0.0004	0.0048	2.3228
sp Q13617 CUL2_HUMAN	6067.866	8522.342	1.405	0.490	0.0004	0.0048	2.3228
sp Q15029 U5S1_HUMAN	66613.166	63240.659	0.949	-0.075	0.0004	0.0048	2.3217
sp Q99460 PSMD1_HUMAN	134828.788	162645.762	1.206	0.271	0.0004	0.0048	2.3195
sp P09936 UCHL1_HUMAN	144683.155	526059.916	3.636	1.862	0.0004	0.0049	2.3126
sp P24539 AT5F1_HUMAN	107444.091	27543.794	0.256	-1.964	0.0004	0.0049	2.3102
sp Q71U36 TBA1A_HUMAN	119843.758	356563.648	2.975	1.573	0.0004	0.0049	2.3102
sp P61604 CH10_HUMAN	2088000.772	882585.288	0.423	-1.242	0.0004	0.0049	2.3087
sp Q9GZT4 SRR_HUMAN	18219.638	30809.740	1.691	0.758	0.0004	0.0049	2.3087
sp Q66K74 MAP1S_HUMAN	11746.105	18822.224	1.602	0.680	0.0004	0.0049	2.3087

Anexo

sp Q9BPX5 ARP5L_HUMAN	26484.154	22591.807	0.853	-0.229	0.0004	0.0049	2.3087
sp P49748 ACADV_HUMAN	495714.641	250335.753	0.505	-0.986	0.0005	0.0052	2.2802
sp P08238 HS90B_HUMAN	582420.914	767243.982	1.317	0.398	0.0005	0.0052	2.2802
sp Q15293 RCN1_HUMAN	138703.743	158303.665	1.141	0.191	0.0005	0.0052	2.2802
sp P60059 SC61G_HUMAN	48425.047	48179.283	0.995	-0.007	0.0005	0.0052	2.2802
sp Q02952 AKA12_HUMAN	8311.252	7034.968	0.846	-0.241	0.0005	0.0056	2.2500
sp P17858 PFKAL_HUMAN	63630.694	93718.661	1.473	0.559	0.0005	0.0056	2.2496
sp P20700 LMNB1_HUMAN	39758.074	58115.656	1.462	0.548	0.0005	0.0056	2.2496
sp P42330 AK1C3_HUMAN	61950.934	39921.739	0.644	-0.634	0.0005	0.0056	2.2496
sp P61247 RS3A_HUMAN	378462.893	446867.989	1.181	0.240	0.0005	0.0056	2.2496
sp P33121 ACSL1_HUMAN	149260.034	129059.246	0.865	-0.210	0.0006	0.0059	2.2278
sp P04181 OAT_HUMAN	71944.984	127749.621	1.776	0.828	0.0006	0.0059	2.2266
sp Q6P587 FAHD1_HUMAN	15340.043	7730.947	0.504	-0.989	0.0006	0.0060	2.2218
sp Q8WTS6 SETD7_HUMAN	34822.366	11559.976	0.332	-1.591	0.0006	0.0062	2.2084
sp P40925 MDHC_HUMAN	191536.206	157479.185	0.822	-0.282	0.0006	0.0062	2.2075
sp P61586 RHOA_HUMAN	123683.218	93765.068	0.758	-0.400	0.0006	0.0062	2.2068
sp P16070 CD44_HUMAN	67413.297	38850.302	0.576	-0.795	0.0006	0.0063	2.2038
sp P78417 GSTO1_HUMAN	328967.379	408760.325	1.243	0.313	0.0006	0.0063	2.2038
sp Q5EB52 MEST_HUMAN	3523.497	5683.673	1.613	0.690	0.0007	0.0064	2.1914
sp P78330 SERB_HUMAN	72357.497	69585.140	0.962	-0.056	0.0007	0.0065	2.1876
sp Q9NP97 DLRB1_HUMAN	18907.367	41622.119	2.201	1.138	0.0007	0.0065	2.1870
sp Q5BKX8 CAVN4_HUMAN	48572.861	15760.180	0.324	-1.624	0.0007	0.0067	2.1747
sp O95573 ACSL3_HUMAN	254386.705	406512.286	1.598	0.676	0.0007	0.0067	2.1729
sp P49773 HINT1_HUMAN	50481.597	37545.645	0.744	-0.427	0.0007	0.0068	2.1689
sp O95861 BPNT1_HUMAN	10668.613	12668.349	1.187	0.248	0.0007	0.0068	2.1689
sp Q9HD20 AT131_HUMAN	5529.618	18236.603	3.298	1.722	0.0007	0.0069	2.1583
sp P36578 RL4_HUMAN	363007.826	477564.177	1.316	0.396	0.0007	0.0069	2.1583
sp Q9Y295 DRG1_HUMAN	14543.974	16025.815	1.102	0.140	0.0007	0.0069	2.1583
sp O15260 SURF4_HUMAN	194902.434	350433.122	1.798	0.846	0.0008	0.0070	2.1568
sp Q01082 SPTB2_HUMAN	950513.401	662978.300	0.697	-0.520	0.0008	0.0073	2.1340
sp P36871 PGM1_HUMAN	101451.420	103770.326	1.023	0.033	0.0008	0.0074	2.1309
sp P61619 S61A1_HUMAN	66317.216	91584.453	1.381	0.466	0.0009	0.0080	2.0943
sp O43707 ACTN4_HUMAN	1691541.978	766090.374	0.453	-1.143	0.0009	0.0081	2.0920
sp P98179 RBM3_HUMAN	9430.307	7180.035	0.761	-0.393	0.0009	0.0081	2.0912
sp Q15102 PA1B3_HUMAN	15678.947	13044.458	0.832	-0.265	0.0009	0.0081	2.0912
sp P51572 BAP31_HUMAN	54835.246	94603.907	1.725	0.787	0.0009	0.0081	2.0906
sp Q8WZA0 LZIC_HUMAN	1355.617	2557.031	1.886	0.916	0.0010	0.0085	2.0702
sp P22059 OSBP1_HUMAN	2250.908	2887.489	1.283	0.359	0.0010	0.0086	2.0648
sp Q9ULC4 MCTS1_HUMAN	58130.618	44670.043	0.768	-0.380	0.0010	0.0088	2.0557
sp P18206 VINC_HUMAN	1693180.137	1167266.790	0.689	-0.537	0.0011	0.0090	2.0440
sp P51668 UB2D1_HUMAN	10822.385	7911.838	0.731	-0.452	0.0011	0.0090	2.0440
sp Q96EK6 GNA1_HUMAN	6480.018	16806.233	2.594	1.375	0.0011	0.0091	2.0419
sp Q13636 RAB31_HUMAN	1410.946	1935.675	1.372	0.456	0.0011	0.0091	2.0411
sp Q15417 CNN3_HUMAN	64176.552	179069.532	2.790	1.480	0.0011	0.0093	2.0325
sp Q9UBQ7 GRHPR_HUMAN	116938.271	95761.256	0.819	-0.288	0.0011	0.0093	2.0325
sp P68371 TBB4B_HUMAN	12185.670	112637.896	9.243	3.208	0.0011	0.0093	2.0320

sp P61019 RAB2A_HUMAN	159312.104	176459.396	1.108	0.147	0.0011	0.0093	2.0301
sp P54577 SYYC_HUMAN	87574.482	185312.193	2.116	1.081	0.0012	0.0097	2.0133
sp Q53H96 P5CR3_HUMAN	12549.224	20248.954	1.614	0.690	0.0012	0.0097	2.0133
sp Q9UMY4 SNX12_HUMAN	66909.016	73274.754	1.095	0.131	0.0012	0.0099	2.0038
sp P12956 XRCC6_HUMAN	126435.669	137342.406	1.086	0.119	0.0012	0.0100	1.9992
sp Q96KP4 CNDP2_HUMAN	73281.832	117793.992	1.607	0.685	0.0013	0.0101	1.9965
sp Q9BQE5 APOL2_HUMAN	7306.733	15921.153	2.179	1.124	0.0013	0.0101	1.9965
sp Q8N2F6 ARM10_HUMAN	1987.182	4991.215	2.512	1.329	0.0013	0.0101	1.9965
sp Q8WX93 PALLD_HUMAN	764497.913	717551.515	0.939	-0.091	0.0013	0.0101	1.9965
sp Q96AQ6 PBIP1_HUMAN	33339.354	44507.701	1.335	0.417	0.0013	0.0101	1.9965
sp Q6IAA8 LTOR1_HUMAN	26094.940	30987.918	1.188	0.248	0.0013	0.0101	1.9948
sp P36542 ATPG_HUMAN	243327.809	154596.338	0.635	-0.654	0.0013	0.0102	1.9900
sp P36969 GPX4_HUMAN	27961.327	35183.105	1.258	0.331	0.0013	0.0103	1.9890
sp P53621 COPA_HUMAN	634698.144	799835.572	1.260	0.334	0.0014	0.0106	1.9749
sp P13929 ENOB_HUMAN	198450.930	54024.981	0.272	-1.877	0.0014	0.0106	1.9749
sp P13797 PLST_HUMAN	213818.374	256035.788	1.197	0.260	0.0014	0.0106	1.9749
sp P78559 MAP1A_HUMAN	167795.047	126495.689	0.754	-0.408	0.0015	0.0112	1.9491
sp O75489 NDUS3_HUMAN	25537.009	5053.507	0.198	-2.337	0.0015	0.0112	1.9491
sp P46379 BAG6_HUMAN	16377.872	31875.091	1.946	0.961	0.0015	0.0112	1.9491
sp P23396 RS3_HUMAN	1106616.972	1420992.217	1.284	0.361	0.0015	0.0112	1.9491
sp P31937 3HIDH_HUMAN	72128.888	55793.943	0.774	-0.370	0.0015	0.0112	1.9491
sp P62937 PPIA_HUMAN	8832752.895	8129316.772	0.920	-0.120	0.0015	0.0112	1.9491
sp P08670 VIME_HUMAN	5105813.330	8379230.447	1.641	0.715	0.0015	0.0114	1.9443
sp O14828 SCAM3_HUMAN	9591.799	20271.473	2.113	1.080	0.0016	0.0114	1.9421
sp O75251 NDUS7_HUMAN	43157.297	27944.922	0.648	-0.627	0.0016	0.0117	1.9311
sp Q96B97 SH3K1_HUMAN	8180.598	7671.594	0.938	-0.093	0.0016	0.0118	1.9271
sp P06748 NPM_HUMAN	189378.999	284059.293	1.500	0.585	0.0017	0.0118	1.9264
sp P24844 MYL9_HUMAN	54299.469	74791.116	1.377	0.462	0.0017	0.0118	1.9264
sp O60271 JIP4_HUMAN	2380.985	1916.555	0.805	-0.313	0.0017	0.0118	1.9264
sp Q9Y678 COPG1_HUMAN	205914.038	305320.924	1.483	0.568	0.0017	0.0121	1.9189
sp P68104 EF1A1_HUMAN	5031415.285	8743336.958	1.738	0.797	0.0018	0.0123	1.9114
sp P55084 ECHB_HUMAN	677379.966	387756.955	0.572	-0.805	0.0018	0.0123	1.9114
sp Q9HB71 CYBP_HUMAN	77740.077	51239.222	0.659	-0.601	0.0018	0.0123	1.9114
sp Q14696 MESD_HUMAN	1526.116	3002.481	1.967	0.976	0.0017	0.0123	1.9114
sp Q9BUL8 PDC10_HUMAN	5893.591	9797.197	1.662	0.733	0.0018	0.0123	1.9114
sp Q9NYF8 BCLF1_HUMAN	4889.926	7983.034	1.633	0.707	0.0018	0.0123	1.9109
sp O75083 WDR1_HUMAN	787930.112	665392.472	0.844	-0.244	0.0018	0.0123	1.9109
sp P53992 SC24C_HUMAN	91109.755	81984.493	0.900	-0.152	0.0018	0.0123	1.9109
sp Q13907 IDI1_HUMAN	95634.936	100622.016	1.052	0.073	0.0018	0.0123	1.9109
sp O14974 MYPT1_HUMAN	11889.722	23368.762	1.965	0.975	0.0018	0.0124	1.9078
sp P61225 RAP2B_HUMAN	42503.169	57139.072	1.344	0.427	0.0019	0.0124	1.9069
sp Q702N8 XIRP1_HUMAN	33861.799	55370.306	1.635	0.709	0.0019	0.0124	1.9069
sp E9PAV3 NACAM_HUMAN	123028.480	134549.278	1.094	0.129	0.0019	0.0124	1.9059
sp P38571 LICH_HUMAN	12223.123	11900.588	0.974	-0.039	0.0019	0.0128	1.8944
sp O14618 CCS_HUMAN	12218.002	22867.915	1.872	0.904	0.0021	0.0142	1.8482
sp Q9UKX2 MYH2_HUMAN	99527.723	18596.305	0.187	-2.420	0.0022	0.0142	1.8476

Anexo

sp Q16775 GLO2_HUMAN	83000.268	62986.508	0.759	-0.398	0.0022	0.0142	1.8476
sp P40261 NNMT_HUMAN	511243.976	1566793.220	3.065	1.616	0.0022	0.0144	1.8407
sp Q8TAT6 NPL4_HUMAN	41138.704	32104.750	0.780	-0.358	0.0022	0.0144	1.8407
sp P42766 RL35_HUMAN	248661.054	297440.295	1.196	0.258	0.0022	0.0144	1.8407
sp P60520 GBRL2_HUMAN	14301.212	4601.195	0.322	-1.636	0.0023	0.0145	1.8399
sp P60660 MYL6_HUMAN	1022358.673	701772.752	0.686	-0.543	0.0023	0.0150	1.8241
sp Q86VP6 CAND1_HUMAN	477929.390	668092.618	1.398	0.483	0.0024	0.0151	1.8205
sp Q96EP5 DAZP1_HUMAN	1026.751	3076.282	2.996	1.583	0.0024	0.0151	1.8205
sp P46459 NSF_HUMAN	189702.956	171388.169	0.903	-0.146	0.0024	0.0151	1.8205
sp Q96QR8 PURB_HUMAN	64311.966	52197.410	0.812	-0.301	0.0024	0.0151	1.8205
sp P31946 1433B_HUMAN	159115.091	183720.397	1.155	0.207	0.0024	0.0152	1.8170
sp P15880 RS2_HUMAN	363322.195	721359.396	1.985	0.989	0.0025	0.0153	1.8165
sp Q8NB37 GALD1_HUMAN	6445.482	7519.394	1.167	0.222	0.0025	0.0153	1.8160
sp Q15819 UB2V2_HUMAN	24909.118	35052.485	1.407	0.493	0.0025	0.0157	1.8031
sp O00186 STXB3_HUMAN	18010.874	31329.618	1.739	0.799	0.0026	0.0163	1.7885
sp Q9Y2J8 PADI2_HUMAN	13431.739	2645.954	0.197	-2.344	0.0027	0.0164	1.7847
sp P62873 GBB1_HUMAN	74761.975	53980.450	0.722	-0.470	0.0027	0.0165	1.7817
sp O94979 SC31A_HUMAN	276798.205	374100.138	1.352	0.435	0.0028	0.0167	1.7778
sp P23229 ITA6_HUMAN	191971.918	68331.152	0.356	-1.490	0.0028	0.0167	1.7778
sp P42224 STAT1_HUMAN	100487.118	526671.418	5.241	2.390	0.0028	0.0167	1.7778
sp P50895 BCAM_HUMAN	37537.216	10232.744	0.273	-1.875	0.0028	0.0167	1.7778
sp P13693 TCTP_HUMAN	248688.530	267381.698	1.075	0.105	0.0028	0.0167	1.7777
sp Q9H307 PININ_HUMAN	2423.801	978.157	0.404	-1.309	0.0028	0.0167	1.7774
sp P48509 CD151_HUMAN	174093.623	209598.436	1.204	0.268	0.0029	0.0169	1.7710
sp Q68EM7 RHG17_HUMAN	16913.302	9873.377	0.584	-0.777	0.0029	0.0171	1.7671
sp P14618 KPYM_HUMAN	15431318.452	15607460.916	1.011	0.016	0.0029	0.0171	1.7671
sp P62829 RL23_HUMAN	251035.173	384486.449	1.532	0.615	0.0030	0.0173	1.7608
sp Q01844 EWS_HUMAN	30594.182	16686.735	0.545	-0.875	0.0030	0.0173	1.7608
sp P55291 CAD15_HUMAN	2709.533	7332.374	2.706	1.436	0.0030	0.0173	1.7608
sp P28070 PSB4_HUMAN	152458.125	118828.606	0.779	-0.360	0.0030	0.0174	1.7606
sp O43678 NDUA2_HUMAN	97622.429	30647.665	0.314	-1.671	0.0030	0.0174	1.7592
sp P40926 MDHM_HUMAN	1420144.659	597201.065	0.421	-1.250	0.0031	0.0175	1.7580
sp O75347 TBCA_HUMAN	62178.058	36335.638	0.584	-0.775	0.0031	0.0175	1.7580
sp P13674 P4HA1_HUMAN	146845.725	209378.905	1.426	0.512	0.0031	0.0176	1.7555
sp O60831 PRAF2_HUMAN	8414.218	17509.307	2.081	1.057	0.0031	0.0176	1.7555
sp P25788 PSA3_HUMAN	242391.681	200752.185	0.828	-0.272	0.0031	0.0176	1.7555
sp Q27J81 INF2_HUMAN	30681.102	40834.224	1.331	0.412	0.0031	0.0176	1.7555
sp P30041 PRDX6_HUMAN	2056059.352	2035753.508	0.990	-0.014	0.0031	0.0176	1.7555
sp Q9BWM7 SFXN3_HUMAN	243767.537	183341.680	0.752	-0.411	0.0033	0.0184	1.7345
sp Q8IWX7 UN45B_HUMAN	78653.673	30424.035	0.387	-1.370	0.0033	0.0185	1.7329
sp O60506 HNRPO_HUMAN	260266.440	239923.137	0.922	-0.117	0.0033	0.0185	1.7329
sp P28331 NDUS1_HUMAN	255617.635	145700.798	0.570	-0.811	0.0034	0.0186	1.7305
sp O96011 PX11B_HUMAN	21833.606	10102.887	0.463	-1.112	0.0034	0.0186	1.7305
sp Q01581 HMCS1_HUMAN	35881.168	42586.007	1.187	0.247	0.0034	0.0187	1.7281
sp P20073 ANXA7_HUMAN	44797.771	33784.789	0.754	-0.407	0.0034	0.0187	1.7281
sp P00505 AATM_HUMAN	374768.826	207673.312	0.554	-0.852	0.0035	0.0188	1.7268

sp P54289 CA2D1_HUMAN	83531.745	19411.432	0.232	-2.105	0.0035	0.0188	1.7268
sp P84085 ARF5_HUMAN	7507.804	10006.496	1.333	0.414	0.0035	0.0188	1.7268
sp Q04323 UBXN1_HUMAN	12977.226	14127.631	1.089	0.123	0.0035	0.0188	1.7268
sp Q15149 PLEC_HUMAN	1532822.871	1972331.869	1.287	0.364	0.0035	0.0189	1.7228
sp Q9NSD9 SYFB_HUMAN	138825.549	130267.835	0.938	-0.092	0.0036	0.0189	1.7228
sp P80297 MT1X_HUMAN	30893.015	110554.625	3.579	1.839	0.0036	0.0191	1.7198
sp P78371 TCPB_HUMAN	472168.099	385715.412	0.817	-0.292	0.0036	0.0191	1.7193
sp P60900 PSA6_HUMAN	228306.860	185362.485	0.812	-0.301	0.0037	0.0193	1.7154
sp O60664 PLIN3_HUMAN	203294.503	502624.478	2.472	1.306	0.0037	0.0193	1.7139
sp P54709 AT1B3_HUMAN	127311.183	34860.383	0.274	-1.869	0.0037	0.0195	1.7103
sp P30536 TSPO_HUMAN	31671.112	65354.399	2.064	1.045	0.0038	0.0198	1.7026
sp P49755 TMEDA_HUMAN	131747.477	107298.706	0.814	-0.296	0.0038	0.0198	1.7026
sp Q9Y2R5 RT17_HUMAN	52895.748	21020.699	0.397	-1.331	0.0038	0.0199	1.7012
sp P53004 BIEA_HUMAN	101414.441	56431.580	0.556	-0.846	0.0039	0.0201	1.6970
sp Q15631 TSN_HUMAN	98783.218	67270.121	0.681	-0.554	0.0039	0.0202	1.6939
sp Q32P28 P3H1_HUMAN	119523.893	151697.330	1.269	0.344	0.0040	0.0205	1.6887
sp O43852 CALU_HUMAN	21565.215	73033.807	3.387	1.760	0.0040	0.0206	1.6864
sp Q9UJ70 NAGK_HUMAN	46165.171	63358.012	1.372	0.457	0.0041	0.0207	1.6841
sp P63000 RAC1_HUMAN	224355.399	192443.052	0.858	-0.221	0.0041	0.0207	1.6831
sp Q9BR76 COR1B_HUMAN	125739.321	76087.654	0.605	-0.725	0.0042	0.0212	1.6738
sp O60662 KLH41_HUMAN	1360074.036	229900.962	0.169	-2.565	0.0042	0.0212	1.6733
sp Q16543 CDC37_HUMAN	89548.263	86836.486	0.970	-0.044	0.0042	0.0212	1.6727
sp P08133 ANXA6_HUMAN	6380694.250	3783657.833	0.593	-0.754	0.0043	0.0214	1.6697
sp Q99497 PARK7_HUMAN	834775.417	638978.951	0.765	-0.386	0.0043	0.0214	1.6697
sp P19623 SPEE_HUMAN	47840.632	52447.760	1.096	0.133	0.0043	0.0214	1.6697
sp Q06323 PSME1_HUMAN	160735.441	138228.261	0.860	-0.218	0.0043	0.0214	1.6697
sp O95831 AIFM1_HUMAN	21040.246	6474.565	0.308	-1.700	0.0044	0.0217	1.6640
sp P48444 COPD_HUMAN	140789.323	199807.551	1.419	0.505	0.0044	0.0217	1.6640
sp Q03519 TAP2_HUMAN	21999.518	36513.945	1.660	0.731	0.0045	0.0218	1.6622
sp P63261 ACTG_HUMAN	4969123.647	8231874.171	1.657	0.728	0.0045	0.0218	1.6622
sp O15067 PUR4_HUMAN	3559.342	10837.280	3.045	1.606	0.0045	0.0218	1.6614
sp O95865 DDAH2_HUMAN	116106.637	90878.950	0.783	-0.353	0.0046	0.0222	1.6546
sp P58546 MTPN_HUMAN	11698.755	1318.414	0.113	-3.149	0.0047	0.0227	1.6440
sp P98160 PGBM_HUMAN	68017.011	29476.003	0.433	-1.206	0.0047	0.0228	1.6425
sp P23381 SYWC_HUMAN	215736.310	306285.733	1.420	0.506	0.0048	0.0230	1.6383
sp P62753 RS6_HUMAN	120195.981	329722.424	2.743	1.456	0.0048	0.0231	1.6360
sp P61077 UB2D3_HUMAN	39712.455	96365.334	2.427	1.279	0.0049	0.0231	1.6360
sp P17987 TCPA_HUMAN	273349.238	287599.042	1.052	0.073	0.0049	0.0231	1.6360
sp Q9HBL0 TENS1_HUMAN	9176.078	30211.227	3.292	1.719	0.0049	0.0231	1.6359
sp P52306 GDS1_HUMAN	83842.925	95411.015	1.138	0.186	0.0049	0.0231	1.6359
sp P83916 CBX1_HUMAN	11513.777	14319.712	1.244	0.315	0.0049	0.0231	1.6359
sp Q13509 TBB3_HUMAN	13350.214	114805.607	8.600	3.104	0.0050	0.0232	1.6344
sp P63151 2ABA_HUMAN	20697.451	21493.251	1.038	0.054	0.0050	0.0232	1.6344
sp P51808 DYLT3_HUMAN	3998.324	10030.339	2.509	1.327	0.0051	0.0236	1.6272
sp Q92974 ARHG2_HUMAN	233717.970	117193.170	0.501	-0.996	0.0051	0.0236	1.6270
sp P05161 ISG15_HUMAN	6804.691	30768.720	4.522	2.177	0.0052	0.0236	1.6262

Anexo

sp Q9BRF8 CPPED_HUMAN	79908.779	58186.120	0.728	-0.458	0.0051	0.0236	1.6262
sp O75643 U520_HUMAN	69041.197	79307.773	1.149	0.200	0.0052	0.0236	1.6262
sp Q9H9B4 SFXN1_HUMAN	25193.532	28866.025	1.146	0.196	0.0052	0.0236	1.6262
sp Q9NVD7 PARVA_HUMAN	105464.745	158971.616	1.507	0.592	0.0052	0.0237	1.6254
sp Q9NUU7 DD19A_HUMAN	8736.660	16976.540	1.943	0.958	0.0053	0.0239	1.6208
sp Q13596 SNX1_HUMAN	34955.450	53984.421	1.544	0.627	0.0054	0.0242	1.6154
sp P14621 ACYP2_HUMAN	16146.991	10984.642	0.680	-0.556	0.0054	0.0242	1.6154
sp P63167 DYL1_HUMAN	77252.395	52703.825	0.682	-0.552	0.0054	0.0243	1.6138
sp Q0ZGT2 NEXN_HUMAN	65363.277	51092.623	0.782	-0.355	0.0054	0.0243	1.6138
sp O75368 SH3L1_HUMAN	91724.500	89631.483	0.977	-0.033	0.0056	0.0249	1.6046
sp P07858 CATB_HUMAN	217375.603	718362.850	3.305	1.725	0.0056	0.0249	1.6031
sp Q93050 VPP1_HUMAN	25093.945	15188.773	0.605	-0.724	0.0056	0.0249	1.6031
sp Q9UNL2 SSRG_HUMAN	9538.558	30995.773	3.250	1.700	0.0058	0.0256	1.5920
sp Q6P2Q9 PRP8_HUMAN	71373.752	94576.846	1.325	0.406	0.0058	0.0256	1.5911
sp P60866 RS20_HUMAN	33530.127	189335.841	5.647	2.497	0.0059	0.0260	1.5858
sp P54687 BCAT1_HUMAN	27714.936	27874.154	1.006	0.008	0.0060	0.0265	1.5769
sp Q9NS86 LANC2_HUMAN	9283.188	11595.252	1.249	0.321	0.0061	0.0268	1.5724
sp P26038 MOES_HUMAN	1212466.536	1508201.502	1.244	0.315	0.0061	0.0268	1.5720
sp P09417 DHPR_HUMAN	46641.019	20145.028	0.432	-1.211	0.0062	0.0272	1.5658
sp Q9BRA2 TXD17_HUMAN	153890.029	199433.541	1.296	0.374	0.0065	0.0284	1.5470
sp P31040 SDHA_HUMAN	92917.411	48796.248	0.525	-0.929	0.0066	0.0284	1.5470
sp P26583 HMGB2_HUMAN	13915.087	27641.151	1.986	0.990	0.0066	0.0284	1.5470
sp P12814 ACTN1_HUMAN	1872071.294	1282485.769	0.685	-0.546	0.0066	0.0285	1.5451
sp P35270 SPRE_HUMAN	19132.784	26357.755	1.378	0.462	0.0068	0.0292	1.5347
sp P42704 LPPRC_HUMAN	457857.711	306646.571	0.670	-0.578	0.0070	0.0296	1.5292
sp Q13561 DCTN2_HUMAN	66757.655	86834.181	1.301	0.379	0.0069	0.0296	1.5292
sp P52434 RPAB3_HUMAN	3988.327	1854.332	0.465	-1.105	0.0069	0.0296	1.5292
sp O96019 ACL6A_HUMAN	7659.000	6247.456	0.816	-0.294	0.0070	0.0296	1.5282
sp O15460 P4HA2_HUMAN	230074.384	356906.631	1.551	0.633	0.0070	0.0297	1.5271
sp Q14677 EPN4_HUMAN	726.369	1718.425	2.366	1.242	0.0072	0.0303	1.5180
sp P52272 HNRPM_HUMAN	164132.295	377099.770	2.298	1.200	0.0072	0.0304	1.5174
sp P61956 SUMO2_HUMAN	21278.171	56974.181	2.678	1.421	0.0073	0.0304	1.5171
sp O14672 ADA10_HUMAN	14037.484	20081.043	1.431	0.517	0.0073	0.0304	1.5171
sp O95336 6PGL_HUMAN	193960.174	171979.748	0.887	-0.174	0.0073	0.0304	1.5171
sp Q96T76 MMS19_HUMAN	21007.590	17379.307	0.827	-0.274	0.0073	0.0304	1.5171
sp P29966 MARCS_HUMAN	13188.880	24931.641	1.890	0.919	0.0074	0.0305	1.5150
sp Q13203 MYBPH_HUMAN	47710.636	12496.067	0.262	-1.933	0.0075	0.0310	1.5089
sp P63244 RACK1_HUMAN	908225.586	958813.059	1.056	0.078	0.0075	0.0310	1.5089
sp A1L0T0 HACL2_HUMAN	10380.594	28442.724	2.740	1.454	0.0076	0.0310	1.5085
sp P43686 PRS6B_HUMAN	107390.745	123454.856	1.150	0.201	0.0076	0.0312	1.5065
sp P55769 NH2L1_HUMAN	8604.046	22155.123	2.575	1.365	0.0077	0.0316	1.5007
sp Q9P0L0 VAPA_HUMAN	20749.901	12863.825	0.620	-0.690	0.0078	0.0317	1.4984
sp Q9UPN3 MACF1_HUMAN	406904.081	159808.453	0.393	-1.348	0.0081	0.0329	1.4826
sp P27635 RL10_HUMAN	12494.872	36981.078	2.960	1.565	0.0081	0.0329	1.4826
sp O60716 CTND1_HUMAN	100157.943	147080.504	1.468	0.554	0.0084	0.0339	1.4698
sp P62917 RL8_HUMAN	282436.557	368815.013	1.306	0.385	0.0085	0.0340	1.4679

sp Q9UBW8 CSN7A_HUMAN	24492.901	29023.175	1.185	0.245	0.0086	0.0344	1.4637
sp Q2TAA2 IAH1_HUMAN	9744.303	8959.865	0.919	-0.121	0.0087	0.0348	1.4579
sp P27816 MAP4_HUMAN	102161.539	238528.492	2.335	1.223	0.0089	0.0354	1.4508
sp O00429 DNM1L_HUMAN	36193.387	78207.446	2.161	1.112	0.0090	0.0358	1.4463
sp Q9Y3U8 RL36_HUMAN	19681.537	63919.247	3.248	1.699	0.0091	0.0358	1.4457
sp O00264 PGRC1_HUMAN	66283.442	52564.450	0.793	-0.335	0.0090	0.0358	1.4457
sp Q63ZY3 KANK2_HUMAN	10744.000	18581.361	1.729	0.790	0.0093	0.0365	1.4376
sp O43237 DC1L2_HUMAN	32531.158	39622.493	1.218	0.284	0.0094	0.0367	1.4350
sp P50213 IDH3A_HUMAN	106611.340	69694.555	0.654	-0.613	0.0093	0.0367	1.4350
sp P56556 NDUA6_HUMAN	94433.425	37199.371	0.394	-1.344	0.0095	0.0370	1.4319
sp Q9BT78 CSN4_HUMAN	37879.702	35650.822	0.941	-0.087	0.0095	0.0370	1.4319
sp Q9H3N1 TMX1_HUMAN	29055.057	39926.333	1.374	0.459	0.0096	0.0373	1.4286
sp P25205 MCM3_HUMAN	18215.394	11371.694	0.624	-0.680	0.0097	0.0375	1.4264
sp P13861 KAP2_HUMAN	47155.909	53252.136	1.129	0.175	0.0097	0.0375	1.4264
sp Q96CT7 CC124_HUMAN	10056.366	10030.094	0.997	-0.004	0.0098	0.0378	1.4226
sp Q9UHD8 SEPT9_HUMAN	392460.413	301727.075	0.769	-0.379	0.0099	0.0380	1.4207
sp P02751 FINC_HUMAN	827046.719	1751797.854	2.118	1.083	0.0101	0.0385	1.4143
sp P51970 NDUA8_HUMAN	100790.586	46641.764	0.463	-1.112	0.0100	0.0385	1.4143
sp Q6IBS0 TWF2_HUMAN	50681.127	58244.534	1.149	0.201	0.0103	0.0392	1.4070
sp Q13409 DC1I2_HUMAN	71809.748	77323.682	1.077	0.107	0.0104	0.0397	1.4009
sp Q9UL15 BAG5_HUMAN	1016.299	2560.389	2.519	1.333	0.0105	0.0399	1.3986
sp P07437 TBB5_HUMAN	110099.413	1417265.579	12.873	3.686	0.0107	0.0405	1.3927
sp Q9UJU6 DBNL_HUMAN	11155.464	13733.174	1.231	0.300	0.0107	0.0405	1.3927
sp Q93052 LPP_HUMAN	6960.619	8087.606	1.162	0.216	0.0107	0.0405	1.3927
sp Q6NYC8 PPR18_HUMAN	1081.269	1327.601	1.228	0.296	0.0108	0.0405	1.3926
sp Q9NZ08 ERAP1_HUMAN	29884.829	49617.678	1.660	0.731	0.0108	0.0406	1.3918
sp Q16630 CPSF6_HUMAN	11144.385	14577.921	1.308	0.387	0.0108	0.0406	1.3918
sp P23528 COF1_HUMAN	218194.771	1023125.935	4.689	2.229	0.0110	0.0409	1.3881
sp Q9GZQ8 MLP3B_HUMAN	257306.937	147818.975	0.574	-0.800	0.0111	0.0409	1.3881
sp P09132 SRP19_HUMAN	5204.765	1259.112	0.242	-2.047	0.0110	0.0409	1.3881
sp Q96DB5 RMD1_HUMAN	9041.545	5022.968	0.556	-0.848	0.0111	0.0409	1.3881
sp Q99816 TS101_HUMAN	10692.470	10267.054	0.960	-0.059	0.0113	0.0418	1.3792
sp P52907 CAZA1_HUMAN	223431.686	197330.812	0.883	-0.179	0.0115	0.0421	1.3755
sp Q9Y6D6 BIG1_HUMAN	1296.908	2892.615	2.230	1.157	0.0115	0.0421	1.3755
sp P15170 ERF3A_HUMAN	31486.823	29601.761	0.940	-0.089	0.0115	0.0421	1.3755
sp P45877 PPIC_HUMAN	145016.454	70097.754	0.483	-1.049	0.0116	0.0422	1.3747
sp P36507 MP2K2_HUMAN	2208.794	3611.016	1.635	0.709	0.0119	0.0435	1.3611
sp P16615 AT2A2_HUMAN	435750.047	142743.897	0.328	-1.610	0.0121	0.0439	1.3576
sp Q13155 AIMP2_HUMAN	34117.098	71871.522	2.107	1.075	0.0121	0.0439	1.3576
sp P01033 TIMP1_HUMAN	41171.019	161492.838	3.922	1.972	0.0122	0.0440	1.3569
sp P47755 CAZA2_HUMAN	76577.147	61435.297	0.802	-0.318	0.0122	0.0440	1.3569
sp O00116 ADAS_HUMAN	20234.466	12170.125	0.601	-0.733	0.0124	0.0445	1.3518
sp P28482 MK01_HUMAN	136502.410	98588.862	0.722	-0.469	0.0125	0.0446	1.3502
sp Q15165 PON2_HUMAN	29558.428	37001.949	1.252	0.324	0.0125	0.0446	1.3502
sp Q14195 DPYL3_HUMAN	133947.205	82278.666	0.614	-0.703	0.0125	0.0447	1.3497
sp Q9UKM9 RALY_HUMAN	74765.741	80810.699	1.081	0.112	0.0125	0.0447	1.3497

Anexo

sp Q9NPJ3 ACO13_HUMAN	68376.834	31632.409	0.463	-1.112	0.0127	0.0450	1.3466
sp Q6UB35 C1TM_HUMAN	15974.079	27120.584	1.698	0.764	0.0127	0.0451	1.3457
sp Q06210 GFPT1_HUMAN	111298.190	214878.554	1.931	0.949	0.0128	0.0451	1.3456
sp P36404 ARL2_HUMAN	6856.349	12694.429	1.851	0.889	0.0128	0.0451	1.3456
sp O95299 NDUAA_HUMAN	3932.316	16863.703	4.288	2.100	0.0130	0.0458	1.3392
sp O14773 TPP1_HUMAN	106241.948	140337.124	1.321	0.402	0.0130	0.0458	1.3392
sp P62195 PRS8_HUMAN	32356.882	60099.589	1.857	0.893	0.0132	0.0462	1.3351
sp P22314 UBA1_HUMAN	684404.570	672923.138	0.983	-0.024	0.0133	0.0463	1.3342
sp P69905 HBA_HUMAN	6928.007	16353.449	2.360	1.239	0.0133	0.0463	1.3340
sp Q9Y4Z0 LSM4_HUMAN	10320.190	4183.903	0.405	-1.303	0.0134	0.0465	1.3330
sp Q9NZB2 F120A_HUMAN	746.155	400.844	0.537	-0.896	0.0134	0.0465	1.3329
sp Q14152 EIF3A_HUMAN	151084.522	170718.720	1.130	0.176	0.0134	0.0465	1.3329
sp O75534 CSDE1_HUMAN	44656.515	35826.335	0.802	-0.318	0.0135	0.0465	1.3329
sp P38159 RBMX_HUMAN	49878.598	80348.097	1.611	0.688	0.0135	0.0465	1.3329
sp Q16270 IBP7_HUMAN	24806.131	8367.880	0.337	-1.568	0.0135	0.0465	1.3329
sp P50552 VASP_HUMAN	1479.866	3394.915	2.294	1.198	0.0137	0.0471	1.3273
sp Q9P035 HACD3_HUMAN	28832.266	29161.338	1.011	0.016	0.0138	0.0471	1.3273
sp Q13510 ASAH1_HUMAN	160844.777	103032.644	0.641	-0.643	0.0138	0.0471	1.3266
sp P08708 RS17_HUMAN	97500.377	79259.784	0.813	-0.299	0.0139	0.0474	1.3243
sp Q15435 PP1R7_HUMAN	20774.032	25263.594	1.216	0.282	0.0142	0.0483	1.3163
sp Q86WV6 STING_HUMAN	139058.330	116992.901	0.841	-0.249	0.0145	0.0490	1.3094
sp Q6NZI2 CAVN1_HUMAN	240403.694	460865.905	1.917	0.939	0.0146	0.0492	1.3080
sp Q9Y320 TMX2_HUMAN	3340.652	7473.073	2.237	1.162	0.0150	0.0503	1.2985

Publicaciones

Los resultados obtenidos para alcanzar el objetivo 1 de la presente tesis doctoral vienen recogidos en la siguiente publicación, en la que la doctoranda es autora:

Blázquez-Bernal Á, Fernandez-Costa JM, Bargiela A, Artero R. Inhibition of autophagy rescues muscle atrophy in a *LGMDD2* Drosophila model. FASEB J. 2021 Oct 1;35(10)

Los resultados obtenidos, en colaboración con el grupo de Patología Neuromuscular y Ataxias del IIS La Fe, con los que se ha conseguido el objetivo 3 de la presente tesis doctoral están en la siguiente publicación, en la que la doctoranda es co-autora :

Poyatos-Garcia J, **Blázquez-Bernal Á**, Selva-Giménez M, Bargiela A, Espinosa-Espinosa J, Vázquez-Manrique RP, et al. CRISPR-Cas9 editing of a TNPO3 mutation in a muscle cell model of Limb-Girdle Muscular Dystrophy type D2. Mol Ther - Nucleic Acids. 2023 Jan