

# Distrofia Miotónica tipo 1: Fisiopatología y Avances en la Terapia Génica

## Type 1 Myotonic Dystrophy: Physiopathology and Advances in Gene Therapy

Fernando Morales Montero<sup>1</sup>

### Resumen

La distrofia miotónica tipo 1 (la enfermedad muscular hereditaria más común en el adulto joven) es causada por una expansión de la tripleta citosina-timina-guanina (CTG), la cual es inestable en las líneas germinal y somática.

Aunque la fisiopatología de esta enfermedad no se conoce todavía, existen tres hipótesis para explicarla: la haploinsuficiencia, la expresión alterada de genes vecinos y la ganancia de función del ácido ribonucleico (ARN). Ésta última hipótesis ha tomado fuerza recientemente y consiste en que el ARN con la expansión es retenido en el núcleo, donde forma agregados ribonucleares, que alteran la función de las proteínas involucradas en el procesamiento alternativo del ARN.

Con la función proteica alterada, se presentan en el paciente las isoformas fetales de proteínas importantes para la función muscular y cerebral normal. Por esta razón, los agregados ribonucleares son posibles blancos terapéuticos, e incluyen el ARN con la expansión, el complejo ARN/proteínas del procesamiento del ARN o solo las proteínas del procesamiento del ARN.

Algunas de las estrategias enfocadas en posibles terapéuticas incluyen los oligonucleótidos antisentido, los ARN de

### Abstract

Type 1 myotonic dystrophy (the most common form of hereditary muscular disease in the young adult) is caused by the expansion of the cytosine-thymine-guanine (CTG) triplet, which is unstable in the germ and somatic lines.

Although the pathophysiology of this disease is unknown, there are three hypotheses to explain it: a) haploinsufficiency, b) altered expression of neighbor genes and c) ribonucleic acid (RNA) gain of function. This latter hypothesis has gained followers and refers to a nuclear retention of the RNA containing the expansion, then RNA forms “foci” and alters the function of proteins involved in RNA alternative splicing.

The altered protein function leads in the patient to the presence of fetal isoforms of important proteins for normal muscle and brain function. Thus, the “foci” become possible therapeutic targets and include the expanded-RNA, the splicing proteins/expanded-ARN or just the splicing proteins.

The strategies used to treat the disease include the antisense oligonucleotides, the interference RNA and small molecules, all of them seeking to release the proteins, which are bound to the expanded RNA, so that the proteins become able to carry out their normal function.

1. PhD. Instituto de Investigaciones en Salud, Escuela de Medicina, Centro de Investigaciones en Neurociencias, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Contacto: Dr. Fernando Morales. Instituto de Investigaciones en Salud, Universidad de Costa Rica, 2060, San José, Costa Rica. Tel: 00-506-2511-2138. Fax: 00-506-2511-5130. Email: fernando.moralesmontero@ucr.ac.cr

interferencia y las moléculas pequeñas; todas ellas buscan la liberación de las proteínas unidas al ARN que tengan la mutación, con el fin de que lleven a cabo su función celular normal.

Varias de estas estrategias han logrado gran éxito, pues han podido restablecer los patrones de procesamiento alternativo de los individuos sanos, el fenotipo muscular normal y contrarrestar algunos de los síntomas de esta enfermedad. Con estas técnicas, a diferencia de hace cinco años, se puede vislumbrar ahora una esperanza en el horizonte, para un tratamiento más eficaz y efectivo contra la distrofia miotónica tipo 1.

**Palabras clave:** proteínas de unión al ARN, procesamiento alternativo, terapia génica, oligonucleótidos antisentido.

Some of these strategies have succeeded by restoring the alternative splicing patterns seen in healthy individuals, the normal muscular phenotype and counteract some of the disease symptoms. These strategies, unlike 5 years ago, allow us to see a light in the horizon for a more efficient and effective treatment for type 1 myotonic dystrophy.

**Key words:** RNA union proteins, alternative processing, gene therapy, antisense oligonucleotides.

## Aspectos generales de la distrofia miotónica tipo 1

La distrofia miotónica tipo 1 (DM1) o enfermedad de Steinert (OMIN:160900) es una enfermedad autosómica dominante, multisistémica, con un cuadro clínico que incluye la presencia de miotonía, distrofia con debilidad muscular, defectos en la conducción cardiaca, cataratas posteriores iridiscentes, trastornos endocrinos, problemas cognitivos e hipersomnia. Esta enfermedad es el problema muscular hereditario más común en el adulto, con una prevalencia estimada de 1/8000 en caucásicos.<sup>1</sup>

Los pacientes con DM1 pueden ser divididos en cuatro categorías principales, cada una con una presentación clínica y diferencias de manejo específicas: a) congénita, b) manifestación en la infancia (juvenil), c) clásica del adulto y d)

asintomática o de manifestación leve. La Tabla 1 resume estos subtipos.

Fenotipo H	hallazgos clínicos	Tamaño de mutación (expansión CTG)	Edad de inicio de los síntomas
Congénito	Hipotonía infantil Fallo respiratorio Complicaciones cardiorrespiratorias Discapacidad mental	450 a >1000	Nacimiento
Juvenil	Defectos de conducción Bajo CI Debilidad facial Desarrollo motor retrasado Problemas de aprendizaje Miotonía	300 a 1000	1-10 años
Clásica	Miotonía Debilidad Defectos de conducción Cataratas Resistencia a la insulina Fallo respiratorios	90 a 350 1	1-45 años
Leve/asintomática	Cataratas Miotonía y debilidad leve	50 a 100 4	0-80 años
Pre-mutación	Ninguno	39 a 49	N/A

Tabla 1. Rasgos clínicos principales en las diferentes formas clínicas de la DM1

El defecto genético responsable de la DM1 fue descubierto en 1992 y consiste en la expansión de una repetición CTG inestable, la cual está ubicada en la región 3' no traducida del gen myotonic dystrophy proteína kinase gene (DMPK: OMIN 605377) en el cromosoma 19q13.3; codifica para una quinasa miosina que se expresa principalmente en el músculo esquelético.<sup>2-5</sup>

En pacientes afectados con la DM1, el tamaño de la repetición va desde 50 a más de 4000 tripletas. El tamaño de la mutación presenta una relación proporcional directa con la severidad de los síntomas y una relación inversa con la edad de inicio de los síntomas.<sup>6</sup>

Los individuos sanos tienen entre 5-37 repeticiones CTG. Entre 38-49 son consideradas premutaciones, mientras que alelos con 50-100 repeticiones son protomutaciones. Estas últimas dos situaciones presentan inestabilidad incrementada hacia futuras expansiones. Los pacientes portadores de pre o protomutaciones son usualmente asintomáticos o presentan síntomas muy leves, como cataratas, pero tienen riesgo de transmitir mutaciones patogénicas de mayor tamaño a su descendencia.<sup>7</sup>

En la DM1, la mutación es un defecto genético dinámico y muestra inestabilidad con variación en diferentes tejidos y tipos de células, lo cual causa un mosaicismo somático.<sup>8, 9</sup> El tamaño de la repetición incrementa con el tiempo en el mismo individuo y a través de las generaciones. Los hijos pueden heredar tamaños de mutación mucho mayores que los encontrados en los padres, lo que ocasiona un aumento en la severidad y una disminución en la edad de aparición de los primeros síntomas. Este

fenómeno es conocido como anticipación genética.<sup>10,11</sup>

La enfermedad es transmitida por ambos padres, pero hay diferencias en cuanto al sexo transmisor. Para más información relacionada con la transmisión de la mutación DM1, el lector puede revisar Morales et. al.<sup>12</sup>

Recientemente, se han identificado familias con DM1 donde los alelos expandidos contienen interrupciones (repeticiones CCG y GGC) dentro de la repetición CTG, principalmente hacia el extremo 3' de la repetición CTG.<sup>13, 14</sup> Los síntomas de éstos pacientes son menos severos que aquellos observados en DM1 clásica. Estas interrupciones parecen tener un efecto estabilizador dramático, pues reducen la tasa de expansión en tejidos afectados, lo cual lleva a un retraso en la edad de inicio y a una progresión más lenta de los síntomas de la enfermedad.<sup>13</sup>

## Mecanismos fisiopatológicos propuestos para la DM1

El efecto bioquímico de la alteración causante de la DM1 aún continúa en estudio. Sin embargo, hay tres hipótesis que desde 1995 han tratado de explicar el mecanismo por el cual se producen los síntomas. Los primeros estudios mostraron una reducción en los niveles citoplasmáticos del transcrito en pacientes con la enfermedad, lo cual posiblemente estaba atribuido a un efecto deletéreo de las repeticiones en el procesamiento o estabilidad del ARN, o bien, el transporte núcleo-citoplasma. Así, se propuso que la reducción del transcrito llevaba a una disminución del 50% de los niveles de la proteína correspondiente, la cual estaría siendo codificada únicamente por el cromosoma sin la mutación DM1.<sup>15-18</sup>

Si bien se han encontrado niveles equivalentes del pre-ARN mensajero (ARNm) para el alelo mutado y silvestre, los niveles del ARNm procesado del alelo DM1 se ven reducidos conforme el tamaño de las expansiones aumenta. Esto indicó que la mutación no tenía un efecto a nivel de iniciación de la transcripción del gen DMPK, pero sí en el procesamiento postranscripcional de los ARNm portadores de expansiones. Además, se logró detectar que transcritos con más de 80-400 repeticiones tendían a ser retenidos en foci (focos) intranucleares, y esto lleva a una reducción de los niveles de la proteína DMPK.<sup>15-18</sup>

La disminución en los niveles de la proteína DMPK podría tener efecto en el desarrollo de la enfermedad. Esta proteína es una serina-treonina quinasa, cuyos sustratos incluyen la miogenina, la subunidad beta de canales de calcio tipo L y el fosfolamban (PLN). Dado que los pacientes con DM1 muestran anomalías en las corrientes de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, las alteraciones de las marcas postraduccionales de las proteínas implicadas en estos procesos fisiológicos, como PLN y la subunidad beta de canales de calcio, podrían explicar parte de los signos observados en la enfermedad, como la miotonía y los defectos en la conducción cardíaca.<sup>19-25</sup>

De acuerdo con lo anterior, se consideró inicialmente la haploinsuficiencia del gen DMPK como el origen de la enfermedad (entendiendo haploinsuficiencia cuando la presencia de un cromosoma normal no es suficiente para evitar la manifestación de la enfermedad). Sin embargo, en modelos de ratones knockout para el gen DMPK, aunque presentaban un inicio tardío de anomalías en la conducción cardíaca y miopatía, no mostraban las características multisistémicas típicas de la DM1. Además, la ausencia de

casos reportados de pacientes con DM1 originados por mutaciones puntuales en el gen DMPK, sugería que la enfermedad no era únicamente causada por haploinsuficiencia de este gen.<sup>26-28</sup>

Otro posible mecanismo de patogénesis propuesto consiste en que la expansión de las tripletas CTG afectan la expresión de múltiples genes en la región, puesto que se ha observado que estas expansiones son sitios fuertes de unión del nucleosoma, lo cual podría alterar la estructura de la cromatina y por tanto la expresión de múltiples genes cercanos. Se ha logrado establecer que la región donde se hallan las repeticiones asociadas con la DM1 constituye una zona rica en genes, con al menos seis de ellos ubicados en un intervalo de 200kb alrededor de las repeticiones, por lo que el efecto simultáneo de alteración de la expresión de algunos de estos genes vecinos podría explicar algunos (o todos) de los efectos multisistémicos de la enfermedad.<sup>29-31</sup>

Dos de estos genes vecinos corresponden al gen *sine oculis homeobox* (*Drosophila*) homólogo 5 (*SIX5*); y el gen de la proteína con repeticiones-WD asociada con la distrofia miotónica (*DMWD*), localizados a menos de 1kb del extremo 3' y 5' del gen DMPK, respectivamente. El gen *SIX5* codifica para una proteína homeodominio que presenta homología con otras proteínas que están implicadas en la regulación de la diferenciación de células musculares y de la homeostasis de canales de sodio. Por su parte, el gen *DMWD* codifica para una proteína que contiene un extremo N-terminal rico en prolina y con cuatro motivos de repeticiones-WD, pero se sabe poco de su función. El gen *DMWD* presenta una alta expresión en cerebro y testículos, por lo que se piensa que podría estar relacionado con el retardo mental

y la atrofia testicular presentes en la DM1, sin embargo, su relación con la DM1 nunca se logró clarificar.<sup>32-34</sup>

El análisis de expresión alelo-específico ha permitido observar una reducción del 20-50% en los niveles del transcrito de SIX5 proveniente del cromosoma que porta la mutación DM1, y se detecta una mayor reducción en muestras con expansiones CTG más grandes.<sup>33</sup> La eliminación de la expresión de uno de los alelos de SIX5 a causa de la expansión CTG es suficiente para causar cataratas en ratones, apoyando la hipótesis de un efecto de la mutación en el silenciamiento de genes vecinos.<sup>35-37</sup> No obstante, para DMWD esta reducción ha sido detectada únicamente en los niveles citoplasmáticos, pero no así en la fracción nuclear del transcrito.<sup>33</sup> Así, diferencias en la expresión de estos genes en pacientes con DM1 no han sido claramente confirmadas.<sup>17, 38, 39</sup>

La evidencia experimental apoya una tercer hipótesis: un mecanismo de ganancia de función del ARN, en el cual, los transcritos de ARN que contienen la expansión CTG se acumulan en el núcleo de las células en forma de foci, también llamados inclusiones ribonucleares, y que son responsables de los rasgos patogénicos de la enfermedad. Estas inclusiones de ARN interactúan con diversas proteínas, las secuestran en el núcleo y les impiden que lleven a cabo su función normal en el núcleo o en el citoplasma celular. Además, este ARN mutante forma estructuras de doble hebra imperfectas, las cuales llevan a cabo una regulación alterada de varios factores de unión al ARN, donde se incluyen proteínas de la familia muscle blind-like (MBNLs), CUGBP1, hnRNP-H y Staufen-1, las cuales funcionan como reguladores del procesamiento alternativo

del ARN en diferentes tejidos; es decir, el ARN con la expansión se vuelve tóxico para la célula.<sup>40-46</sup>

Las proteínas MBNL parecen jugar un papel prominente en la patogénesis de la DM1, ya que cada una de las tres isoformas de MBNL (MBNL1, MBNL2 y MBNL3) son secuestradas por ARN con la expansión en el núcleo celular.<sup>43,47</sup> Las proteínas MBNL se localizan junto con las inclusiones ribonucleares (foci) y tienen gran afinidad entre sí, esto impide que se lleve a cabo la función normal de reguladoras del procesamiento de estas proteínas.<sup>43, 47</sup>

La MBNL1 es la isoforma más abundante en el músculo esquelético, juega un papel predominante en la regulación del procesamiento alternativo tanto en el músculo esquelético como en el cardíaco. La MBNL2 tiene niveles que decrecen en el músculo esquelético durante el desarrollo postnatal; parece tener una función similar a MBNL1 pero en el sistema nervioso central.<sup>48-50</sup>

El apoyo para el modelo de pérdida de función de MBNL proviene de estudios con ratones knockout para MBNL1 y MBNL2, los cuales muestran un fenotipo de DM1, al igual que con la desregulación del procesamiento alternativo. Los ratones knockout para MBNL1 desarrollan anomalías en músculo, ojos y en el procesamiento alternativo de ARNs, que son característicos de la DM1 (aunque con efectos modestos en la regulación del procesamiento en el cerebro). La pérdida de MBNL2 conlleva a cambios amplios en los patrones del procesamiento postnatal en el cerebro, muchos de los cuales son similarmente desregulados en el cerebro de pacientes con DM1, pero no en el músculo esquelético.<sup>42,48,51,52</sup>

Con respecto a MBNL3, se sabe muy poco sobre su función *in vivo*, aunque se conoce que esta proteína también es secuestrada por el ARN tóxico con la expansión DM1.<sup>47</sup> Estudios *in vitro* muestran que MBNL3 actúa como un antagonista de la miogénesis, posiblemente al mantener los mioblastos en un estado proliferativo. Los ratones knockout para MBNL3 tienen daño en la regeneración del músculo adulto dependiente de la edad, lo que sugiere que la inhibición de MBNL3 por la expresión tóxica de ARN podría ser un factor contribuyente a la debilidad y desgaste muscular progresiva característico de la DM1.<sup>49,53-55</sup>

Por otra parte, el CUGBP1 es un miembro de la familia de proteínas CELF (CUGBP, Elav-like family), que funciona como regulador del procesamiento alternativo del ARN, específicamente de la traducción y la estabilidad del ARNm. El CUGBP no se localiza junto con los foci ribonucleares en las células DM1, no es secuestrado como MBNL1 y fue identificado por su capacidad de unirse a ARN con la expansión *in vitro*.<sup>43,47,56-60</sup>

Contrario a lo que sucede con MBNL1, los niveles de CUGBP están incrementados en diferentes tejidos DM1, lo cual lleva a una ganancia en la actividad de esta proteína. Ha sido demostrado que la expresión de ARN con expansiones CUG produce una hiperfosforilación y estabilización de la proteína CUGBP, a través de una activación inapropiada de la proteína quinasa C (PKC). El papel patogénico de CUGBP en la DM1 es apoyado por el hecho que ratones transgénicos que sobreexpresan CUGBP reproducen la desregulación del procesamiento al igual que los rasgos musculares en la DM1. Así, la elevación de los niveles de CUGBP podrían estar participando en el fenotipo muscular

de la DM1, al desregular el procesamiento alternativo en la DM1.<sup>62-66</sup>

Las proteínas mencionadas (MBNL1 y CUGBP) tienen efectos antagonistas con respecto a sus actividades, pues la expresión de CUGBP promueve la inclusión de exones normalmente expresados durante el desarrollo fetal (en DM1 hay una sobreexpresión de esta proteína), mientras que la expresión de MBNL contribuye con las isoformas del procesamiento adulto (en DM1 hay una reducción en los niveles funcionales de esta proteína). En otras palabras, debido a que estos dos factores son reguladores del procesamiento alternativo durante el desarrollo, especialmente durante la transición fetal-adulto, las modificaciones en sus actividades en tejidos DM1 hacen que en pacientes con DM1 se presenten las isoformas embrionarias de un grupo grande proteínas, lo que hace que esta desregulación juegue un papel central en el desarrollo de síntomas importantes en la DM1.<sup>67-71</sup>

Entre los síntomas de la DM1, la miotonía, la resistencia a la insulina y los problemas cardíacos, están correlacionados con la ruptura del procesamiento alternativo del canal de cloruro de músculo esquelético (CLC-1), el receptor de la insulina (IR) y la troponina cardíaca T (TNNT3), respectivamente.<sup>44,72-75</sup>

Más recientemente, la debilidad muscular ha sido asociada con un procesamiento aberrante del gen BIN1 (bridging integrator 1). BIN 1 es una proteína de unión a lípidos que está involucrada en la biogénesis de la red de túbulos T en el músculo y en la regulación del acoplamiento de excitación-contracción. Además de estos transcritos, se han descrito más de 30 ARNs que muestran patrones de procesamiento alternativo aberrantes en

muestras de pacientes con DM1 y en modelos animales. Sin embargo, por el momento no hay evidencia directa de una relación causa-efecto entre los síntomas y el procesamiento erróneo. Ahora está claro que los errores del procesamiento no podrían explicar completamente el espectro multisistémico de la enfermedad.<sup>40,76-78</sup>

## Avances en la terapia génica en la distrofia miotónica

De momento, el tratamiento en la DM1 está limitado a la intervención sintomática y no hay un alcance terapéutico para prevenir y revertir la progresión de la enfermedad. Es bien aceptado que la expresión y la retención nuclear de los transcritos DM1 con expansiones CUG (mutados) en la región 3' no codificante son de importancia primaria en el desarrollo de la patología en la DM1. Estos ARNs con expansiones que inducen un efecto trans-dominante son centrales y podrían ser los elementos causales del mecanismo de ganancia de función tóxica del ARN involucrado en la DM1. Así, la inhibición de la toxicidad del ARN al elegir como blanco los ARNs con expansiones, representan una estrategia terapéutica prometedora en la DM1.<sup>69</sup>

Los recientes avances en nuestro entendimiento de los mecanismos moleculares subyacentes involucrados en la DM1 han generado nuevos alcances para tratamientos más específicos y efectivos para la esta enfermedad. El desarrollo de tratamientos moleculares puntuales, especialmente la terapia con oligonucleótidos antisentido (ASO), ha conseguido éxito en modelos in vitro y animales, aunque el traslado de estos resultados a pruebas clínicas en humanos se ha quedado atrás debido a las dificultades para atacar tejidos afectados con

dosis no tóxicas. Sin embargo, hay ejemplos de estudios recientes que han proporcionado motivos para ser optimistas al mostrar una reducción en esa brecha.<sup>79</sup>

El primer grupo de métodos basados en ARN que apunta a los transcritos del gen DMPK, fueron desarrollados al usar vectores virales. La expresión de ARN catalítico (hammerhead ribozimas) y ARN antisentido diseñado para atacar el ARNm del gen DMPK fueron capaces de degradar y reducir los niveles de ARN patogénico, una caída en el número de inclusiones ribonucleares, una restauración parcial del procesamiento alternativo en algunos genes, una corrección de la expresión de CUGBP, al igual que una restauración de las funciones de los mioblastos DM1 in vitro.<sup>80,81</sup>

Desafortunadamente, los métodos anteriores no discriminaban entre los transcritos mutados (reducción de un 60%) y silvestres (reducción de un 50%), lo que ocasionaba la degradación de ambos productos génicos. Sin embargo, en ratones, la pérdida de DMPK induce solo un fenotipo leve en ratones viejos.<sup>82</sup> Estos datos iniciales sugirieron que la destrucción del ARNm DMPK por métodos antisentido que activan la ARNasa H son una atractiva y potencial estrategia terapéutica para la DM1.

Otra estrategia terapéutica empleada ha sido el uso de ARN de interferencia (RNAi por sus siglas en inglés). Las repeticiones (CUG)<sub>n</sub> forman estructuras en horquilla estables, en las cuales el tronco podría adoptar una conformación muy similar a la forma A del ARN, a pesar de los desapareamientos U•U. Cualquiera de esas estructuras de ARN podrían ser un blanco para la vía de RNAi.<sup>83-</sup>

<sup>85</sup>

Krol y colaboradores brindaron evidencia que el ARN-expCUG es reconocido por la proteína Dicer, la cual corta el ARN de doble banda en pequeños fragmentos de 21 nucleótidos. El tratamiento de fibroblastos de pacientes con DM1 con un oligo de ARN (AGC)<sub>7</sub> 5' monofosforilado resultó en una reducción de los transcritos DMPK mutantes. Sin embargo, el mecanismo de acción no es del todo entendido.<sup>86</sup>

Más recientemente, Sobczak y colaboradores usaron RNAi sintético para atacar las repeticiones CUG y probar el concepto que la inhibición de la expresión de ARN-expCUG puede mitigar algunos rasgos de la DM1 en ratones transgénicos. Sus resultados mostraron que la inyección intramuscular y la electroporación de ARN de interferencia pequeño (siRNA por sus siglas en inglés) resultó en una disminución en la expresión de transcritos ARN-expCUG de hasta un 70-80%, con un efecto mínimo sobre transcritos sin la expansión. Con esta estrategia, el número y la intensidad de las inclusiones ribonucleares disminuyeron y el procesamiento de los exones dependientes de MBNL1 mejoró significativamente. Estos datos sugieren que las repeticiones CUG expandidas son un blanco potencial para un procedimiento RNAi alelo-selectivo.<sup>87</sup>

Actualmente, se ha evaluado un segundo grupo de métodos que atacan directamente la repetición expandida CUG, usando pequeñas secuencias (CAG)<sub>n</sub> antisentido. Este método previene la unión anormal de la proteína a las estructuras en horquilla de las expansiones CUG. Las secuencias (CAG)<sub>n</sub> pequeñas de oligonucleótidos modificados, o secuencias antisentido ligados al ARN nuclear pequeño U7 (U7-snrRNA) modificado, son capaces de atacar los ARNs con expansión e inhibir su toxicidad en modelos celulares y de ratón.<sup>88-90</sup>

Las estrategias mencionadas exhibieron una exportación y/o degradación eficiente de los ARNs con expansiones CUG y estuvieron asociadas con la corrección de defectos de DM1, como la mala regulación del procesamiento alternativo del ARN. El uso de morfolinós CAG25 en ratones DM1 resultaron en la liberación y redistribución de MBLN1 de las inclusiones ribonucleares, una disminución de estas inclusiones, la exportación de los ARN-expCUG al citoplasma y su subsecuente degradación, además de una normalización del procesamiento alternativo de varios genes importantes.<sup>90</sup>

En un modelo de ratón para DM1, la administración sistemática de ASOs modificados causó una caída rápida del ARN-expCUG en el músculo esquelético, con lo que se corrigieron algunos aspectos fisiológicos, histopatológicos y transcriptómicos de la enfermedad, aún un año después de la terminación del tratamiento.<sup>91</sup>

El uso de (CAG)<sub>7</sub> 2'-O-metil fosforotiotatos (PS58) y hU7-snrRNA-(CAG)<sub>15</sub> inducen una degradación selectiva de los transcritos mutantes en células DM1 y tienen poco o ningún efecto en los transcritos DMPK silvestres.<sup>88,89</sup>

El PS58 fue dirigido contra la repetición (CUG)<sub>n</sub> y redujo los niveles de los transcritos DMPK mutados en un 70-90% en un modelo celular de ratón DM1 y en un cultivo de mioblastos de pacientes con DM1. Estos hallazgos fueron corroborados en dos modelos adicionales de ratón DM1, donde la administración local de PS58 en el músculo esquelético resultó en una reducción de un 50% del ARN-expCUG en ambos modelos. Como resultado de esto, dos marcas de la toxicidad de ARN relacionada con la DM1

fueron aliviadas: hubo una reducción en el número de inclusiones ribonucleares y las anormalidades del procesamiento típicas de DM1 mejoraron, aunque no hubo una mejoría en la miotonía.<sup>88,92-93</sup>

El o los mecanismos precisos que logran la inhibición de la toxicidad del ARN al usar pequeñas secuencias antisentido que atacan la repetición CUG expandida, no son del todo entendidos en estos momentos. Sin embargo, la ruptura de los complejos ARN-expCUG/MBNL1 y/o la prevención de la formación de nuevos loci al usar secuencias (CAG)<sub>n</sub> antisentido podrían permitir la degradación de los transcritos mutantes por procesos independientes de ARNasa H endógenos.

De forma interesante, la liberación de MBNL1 de las inclusiones ribonucleares (foci) usando compuestos pequeños capaces de unirse a repeticiones (CUG) como la pentamidina, ha mostrado una reversión de algunos de los defectos del procesamiento alternativo en modelos DM1.<sup>94</sup>

La pentamidina es una droga usada para el tratamiento de infecciones por *Pneumocystis carini* en pacientes con SIDA, sin embargo, el uso de esta es fuertemente limitado debido a su alta toxicidad. Un trabajo futuro debería enfocarse en modificaciones químicas estratégicas para incrementar la afinidad y especificidad, para minimizar los efectos secundarios.

Como se mencionó anteriormente, MBNL1 y CUGBP tienen papeles antagonistas en la DM1, donde una reducción en los niveles de MBNL1 y un aumento en los niveles de CUGBP parecen explicar muchos de los rasgos fisiopatológicos y transcriptómicos vistos en modelos celulares, animales y en pacientes con DM1. Así, esas proteínas

podrían servir como blancos terapéuticos en la DM1, pues redireccionamiento contrario en los niveles de esas proteínas, respectivamente, restaurarían muchos de los rasgos silvestres.

Consistente con la idea anterior, la sobreexpresión de MBNL1 en un modelo de *Drosophila* de DM1 (con 480 repeticiones CUG), redujo el número de inclusiones ribonucleares, suprimió el fenotipo degenerativo causado por las repeticiones expandidas en el músculo y ojos.<sup>95</sup> Además, la sobreexpresión de MBNL1 mediada por un vector adenoviral corrigió la desregulación del procesamiento de genes dependientes de MBNL, tales como *Clcn1*, *Serca1* y *Tnnt3*, y revirtió la miotonía en un modelo de ratón de DM1.<sup>95-96</sup>

Con respecto a CUGBP y su efecto a través de PKC, un estudio reciente mostró que un bloqueo en la actividad de PKC en un modelo de ratón DM1 resultó en una conducción cardiaca mejorada, así como una reducción en los efectos desreguladores del procesamiento alternativo mediados por CUGBP. Lo anterior se correlacionó además con una fosforilación y niveles decrecidos de CUGBP. Así, una disminución en la actividad CUGBP parece ser un posible blanco terapéutico en la DM1.<sup>63</sup>

Además de los problemas asociados con la entrega de las moléculas terapéuticas en los tejidos blancos, la corrección de la desregulación del procesamiento alternativo por medio de la modulación de la expresión de MBNL1 y CUGBP debería ser considerada con precaución; esto debido a que la alteración artificial de los niveles de estas proteínas podrían alterar patrones de procesamiento de un número de genes regulados por ellas

mismas, con consecuencias desconocidas para la función muscular.<sup>79</sup>

Conforme estos tratamientos avanzan hacia los ensayos clínicos, hay una presión para la identificación de biomarcadores que sirvan para evaluar la progresión de la enfermedad y la respuesta terapéutica. En este sentido, los defectos del procesamiento alternativo sirven para este propósito durante las fases preclínicas del desarrollo de las drogas.

Con el fin de proveer evidencia útil, recientemente se desarrolló un estudio que buscaba la identificación de biomarcadores del procesamiento de la severidad de la enfermedad y de la respuesta terapéutica en la DM1. Este estudio identificó un grupo significativo de cambios y eventos del procesamiento alterado en la DM1, incluso antes de que haya evidencia de debilidad muscular, por lo que parece altamente probable que la intervención en los eventos del procesamiento alternativo tienen un buen potencial para funcionar como biomarcadores de la severidad en la DM1 y en la respuesta terapéutica.<sup>97</sup>

### Conclusión

Cerca de 80 años después de la primera descripción de la DM1 y casi 20 años después del descubrimiento de la mutación responsable de la enfermedad, están surgiendo en estos momentos una serie de estrategias prometedoras para una eliminación o neutralización de transcritos con la expansión CUG. ASOs y moléculas pequeñas están en vías de desarrollo, pero todavía hay mucho trabajo que realizar.

Uno de los obstáculos más grandes por superar es la entrega eficiente de los

compuestos activos en los tejidos diana (además de la sostenibilidad y efectividad de la molécula terapéutica). En el caso de la DM1, esto se vuelve un dilema por ser una enfermedad multisistémica y clínicamente muy variable, lo que podría dificultar la identificación de biomarcadores confiables para los ensayos clínicos.

También es requerido el desarrollo de modelos animales y celulares adicionales más sofisticados, con el fin de modelar más certeramente los rasgos multisistémicos de la enfermedad. En resumen, aunque se ha logrado mucho progreso en el entendimiento de la DM1 y sus posibles estrategias terapéuticas, aun se necesitan muchos estudios básicos y traslacionales para comprender mejor la patogénesis molecular de la enfermedad y desarrollar estrategias de tratamiento más seguras y eficaces.<sup>79,98</sup> Sin embargo, a diferencia de hace unos cinco años, una vía prometedoras para el desarrollo de terapias farmacológicas contra la DM1 se ve ya en el horizonte.

### Contribuciones

La autoría y desarrollo de este trabajo de revisión es obra completa del autor.

### Conflictos de interés

Nada por declarar.

### Referencias

1. Harper PS. Myotonic Dystrophy. 3rd ed. London: Harcourt Publishers Ltd; 2001.
2. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein

kinase family member. *Cell* 1992; 68(4):799-808.

3. Buxton J, Shelbourne P, Davies J, et al. Detection Of an Unstable Fragment Of DNA Specific to Individuals With Myotonic Dystrophy. *Nature* 1992; 355(6360):547-548.

4. Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG, et al. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 1992; 255(5049):1256-1258.

5. Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 1992; 255(5049):1253-1255.

6. Morales F, Couto JM, Higham CF, et al. Somatic instability of the expanded CTG triplet repeat in myotonic dystrophy type 1 is a heritable quantitative trait and modifier of disease severity. *Hum Mol Genet* 2012; 21(16):3558-3567.

7. Thornton CA, Griggs RC, Moxley RT. Myotonic dystrophy with no trinucleotide repeat expansion. *Ann Neurol* 1994; 35(3):269-272.

8. Monckton DG, Wong LJC, Ashizawa T, et al. Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Hum Mol Genet* 1995; 4(1):1-8.

9. Wong L-JC, Ashizawa T, Monckton DG, et al. Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent. *Am J Hum Genet* 1995; 56(1):114-122.

10. Ashizawa T, Dubel JR, Dunne PW, et al. Anticipation In Myotonic Dystrophy .2. Complex Relationships Between Clinical Findings and Structure Of the GCT Repeat. *Neurology* 1992; 42(10):1877-1883.

11. Ashizawa T, Dunne CJ, Dubel JR, et al. Anticipation In Myotonic Dystrophy .1. Statistical Verification Based On Clinical and Haplotype Findings. *Neurology* 1992; 42(10):1871-1877.

12. Morales F, Vasquez M, Cuenca P, et al. Parental age effects, but no evidence for an intrauterine effect in the transmission of myotonic dystrophy type 1. *Eur J Hum Genet* 2014. doi: 10.1038/ejhg.2014.138.

13. Braida C, Stefanatos RK, Adam B, et al. Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum Mol Genet* 2010; 19(8):1399-1412.

14. Musova Z, Mazanec R, Krepelova A, et al. Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *Am J Med Genet A* 2009; 149A(7):1365-1374.

15. Davis BM, McCurrach ME, Taneja KL, et al. Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc Natl Aca Sci USA* 1997; 94(14):7388-7393.

16. Hamshere MG, Newman EE, Alwazzan M, et al. Transcriptional abnormality in myotonic dystrophy affects DMPK but not neighboring genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(14):7394-7399.

17. Krahe R, Ashizawa T, Abbruzzese C, et al. Effect of myotonic dystrophy trinucleotide repeat expansion on DMPK transcription and processing. *Genomics* 1995; 28(1):1-14.
18. Taneja KL, McCurrach M, Schalling M, et al. Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol* 1995; 128(6):995-1002.
19. Timchenko L, Nastainczyk W, Schneider T, et al. Full-length myotonin protein kinase (72 kDa) displays serine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:5366-5370.
20. Kaliman P, Catalucci D, Lam JT, et al. Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates phospholamban and regulates calcium uptake in cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2005; 280(9):8016-8021.
21. Mounsey JP, John JE, Helmke SM, et al. Phospholemman is a substrate for myotonic dystrophy protein kinase. *J Biol Chem* 2000; 275(30): 23362-23367.
22. Benders A, Oubrie A, Oosterhof A, et al. Atp-Driven Ion Pumps and Voltage-Sensitive Ion Channels In Cultured Muscle-Cells and or Skeletal Muscle Of Myotonic Dystrophy Patients. *J Muscle Res Cell Motil* 1993; 14(2):226-226.
23. Benders AA, Groenen PJ, Oerlemans FT, et al. Myotonic dystrophy protein kinase is involved in the modulation of the Ca<sup>2+</sup> homeostasis in skeletal muscle cells. *J Clin Invest* 1997; 100(6):1440-1447.
24. Benders AAGM, Timmermans JAH, Oosterhof A, et al. Deficiency of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in skeletal muscle and cultured muscle cells of myotonic dystrophy patients. *Biochem J* 1993; 293(Pt1):269-274.
25. Lee HC, Patel MK, Mistry DJ, et al. Abnormal Na channel gating in murine cardiac myocytes deficient in myotonic dystrophy protein kinase. *Physiol Genomics* 2003; 12(2):147-157.
26. Berul CI, Maguire CT, Aronovitz MJ, et al. DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J Clin Invest* 1999; 103(4):R1-7.
27. Jansen G, Groenen PJ, Bachner D, et al. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet* 1996; 13(3):316-324.
28. Ranum LP, Day JW. Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet* 2004; 74(5):793-804.
29. Otten AD, Tapscott SJ. Triplet Repeat Expansion In Myotonic Dystrophy Alters the Adjacent Chromatin Structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(12):5465-5469.
30. Alwazzan M, Hamshere MG, Lennon GG, et al. Six transcripts map within 200 kilobases of the myotonic dystrophy expanded repeat. *Mamm Genome* 1998; 9(6):485-487.
31. Harris S, Moncrieff C, Johnson K. Myotonic dystrophy: will the real gene please step forward! *Hum Mol Genet* 1996; 5:1417-1423.
32. Harris SE, Winchester CL, Johnson

- KJ. Functional analysis of the homeodomain protein SIX5. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(9):1871-1878.
33. Alwazzan M, Newman E, Hamshere MG, et al. Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum Mol Genet* 1999; 8(8):1491-1497.
34. Frisch R, Singleton KR, Moses PA, et al. Effect of triplet repeat expansion on chromatin structure and expression of dmpk and neighboring genes, six5 and dmwd, in myotonic dystrophy. *Mol Genet Metab* 2001; 74(1-2):281-291.
35. Eriksson M, Ansved T, Edstrom L, et al. Simultaneous analysis of expression of the three myotonic dystrophy locus genes in adult skeletal muscle samples: the CTG expansion correlates inversely with DMPK and 59 expression levels, but not DMAHP levels. *Hum Mol Genet* 1999; 8(6):1053-1060.
36. Morrone A, Pegoraro E, Angelini C, et al. RNA metabolism in myotonic dystrophy: patient muscle shows decreased insulin receptor RNA and protein consistent with abnormal insulin resistance. *J Clin Invest* 1997; 99(7):1691-1698.
37. Winchester CL, Ferrier RK, Sermoni A, et al. Characterization of the expression of DMPK and SIX5 in the human eye and implications for pathogenesis in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 1999; 8(3):481-492.
38. Hamshere MG, Harley H, Harper P, et al. Myotonic dystrophy: the correlation of (CTG) repeat length in leucocytes with age at onset is significant only for patients with small expansions. *J Med Genet* 1999; 36(1):59-61.
39. Ranum LP, Day JW. Pathogenic RNA repeats: an expanding role in genetic disease. *Trends Genet* 2004; 20(10):506-512.
40. Meola G, Cardani R. Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2014. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.05.019.
41. Ho TH, Charlet BN, Poulos MG, et al. Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *Embo J* 2004; 23(15):3103-3112.
42. Kanadia RN, Johnstone KA, Mankodi A, et al. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 2003; 302(5652):1978-1980.
43. Miller JW, Urbinati CR, Teng-Umuay P, et al. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *Embo J* 2000; 19(17):4439-4448.
44. Philips AV, Timchenko LT, Cooper TA. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 1998; 280(5364):737-741.
45. Timchenko LT, Miller JW, Timchenko NA, et al. Identification of a (CUG)n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(22):4407-4414.
46. Ravel-Chapuis A, Belanger G, Yadava RS, et al. The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* 2012; 196(6):699-712.

47. Fardaei M, Rogers MT, Thorpe HM, et al. Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* 2002; 11(7):805-814.
48. Charizanis K, Lee KY, Batra R, et al. Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* 2012;75(3):437-450.
49. Holt I, Jacquemin V, Fardaei M, et al. Muscleblind-like proteins: similarities and differences in normal and myotonic dystrophy muscle. *Am J Pathol* 2009; 174(1):216-227.
50. Wang ET, Cody NA, Jog S, et al. Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell* 2012; 150(4):710-724.
51. Kanadia RN, Urbinati CR, Crusselle VJ, et al. Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3. *Gene Expr Patterns* 2003; 3(4):459-462.
52. Suenaga K, Lee KY, Nakamori M, et al. Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. *PLoS One* 2012; 7(3):e33218.
53. Lee KS, Smith K, Amieux PS, et al. MBNL3/CHCR prevents myogenic differentiation by inhibiting MyoD-dependent gene transcription. *Differentiation* 2008; 76(3):299-309.
54. Poulos MG, Batra R, Li M, et al. Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Hum Mol Genet* 2013; 22(17):3547-3558.
55. Squillace RM, Chenault DM, Wang EH. Inhibition of muscle differentiation by the novel muscleblind-related protein CHCR. *Dev Biol* 2002; 250(1):218-230.
56. Barreau C, Paillard L, Mereau A, et al. Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions. *Biochimie* 2006; 88(5):515-525.
57. Huichalaf C, Sakai K, Jin B, et al. Expansion of CUG RNA repeats causes stress and inhibition of translation in myotonic dystrophy 1 (DM1) cells. *Faseb J* 2010; 24(10):3706-3719.
58. Huichalaf C, Schoser B, Schneider-Gold C, et al. Reduction of the rate of protein translation in patients with myotonic dystrophy 2. *J Neurosci* 2009; 29(28):9042-9049.
59. Lee JE, Lee JY, Wilusz J, et al. Systematic analysis of cis-elements in unstable mRNAs demonstrates that CUGBP1 is a key regulator of mRNA decay in muscle cells. *PLoS One* 2010; 5(6):e11201.
60. Mankodi A, Teng-Ummuay P, Krym M, et al. Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Ann Neurol* 2003; 54(6):760-768.
61. Timchenko NA, Cai ZJ, Welm AL, et al. RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* 2001; 276(11):7820-7826.
62. Kuyumcu-Martinez NM, Wang GS, Cooper TA. Increased steady-state levels of

- CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell* 2007; 28(1):68-78.
63. Wang GS, Kuyumcu-Martinez MN, Sarma S, et al. PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1. *J Clin Invest* 2009; 119(12):3797-3806.
64. Koshelev M, Sarma S, Price RE, et al. Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 2010; 19(6):1066-1075.
65. Ward AJ, Rimer M, Killian JM, et al. CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 2010; 19(18):3614-3622.
66. Orengo JP, Chambon P, Metzger D, et al. Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(7):2646-2651.
67. Day JW, Ranum LP. RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Neuromuscul Disord* 2005; 15(1):5-16.
68. Ho TH, Savkur RS, Poulos MG, et al. Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 13):2923-2933.
69. Klein AF, Gasnier E, Furling D. Gain of RNA function in pathological cases: Focus on myotonic dystrophy. *Biochimie* 2011; 93(11):2006-2012.
70. Osborne RJ, Thornton CA. RNA-dominant diseases. *Hum Mol Genet* 2006; 15:R162-169.
71. Ranum LP, Cooper TA. RNA-Mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci* 2006; 29:259-277.
72. Charlet BN, Savkur RS, Singh G, et al. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 2002; 10(1):45-53.
73. Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, et al. Expanded CUG Repeats Trigger Aberrant Splicing of CIC-1 Chloride Channel Pre-mRNA and Hyperexcitability of Skeletal Muscle in Myotonic Dystrophy. *Mol Cell* 2002; 10(1):35-44.
74. Savkur RS, Philips AV, Cooper TA. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 2001; 29(1):40-47.
75. Savkur RS, Philips AV, Cooper TA, et al. Insulin receptor splicing alteration in myotonic dystrophy type 2. *Am J Hum Genet* 2004; 74(6):1309-1313.
76. Fugier C, Klein AF, Hammer C, et al. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med* 2011; 17(6):720-725.
77. Ashizawa T, Sarkar PS. Myotonic dystrophy types 1 and 2. *Handb Clin Neurol* 2011; 101:193-237.
78. Udd B, Krahe R. The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and

- therapeutic challenges. *Lancet Neurol* 2012; 11(10):891-905.
79. Magana JJ, Cisneros B. Perspectives on gene therapy in myotonic dystrophy type 1. *J Neurosci Res* 2011; 89(3):275-285.
80. Furling D, Doucet G, Langlois MA, et al. Viral vector producing antisense RNA restores myotonic dystrophy myoblast functions. *Gene Ther* 2003; 10(9):795-802.
81. Langlois MA, Lee NS, Rossi JJ, et al. Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Mol Ther* 2003; 7(5 Pt 1):670-680.
82. Reddy S, Smith DB, Rich MM, et al. Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet* 1996; 13(3):325-335.
83. Broda M, Kierzek E, Gdaniec Z, et al. Thermodynamic stability of RNA structures formed by CNG trinucleotide repeats. Implication for prediction of RNA structure. *Biochemistry* 2005; 44(32):10873-10882.
84. Napierala M, Krzyosiak WJ. CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable "slippery" hairpins. *J Biol Chem* 1997; 272(49):31079-31085.
85. Mooers BH, Logue JS, Berglund JA. The structural basis of myotonic dystrophy from the crystal structure of CUG repeats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(46):16626-16631.
86. Krol J, Fiszler A, Mykowska A, et al. Ribonuclease Dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets. *Mol Cell* 2007; 25(4):575-586.
87. Sobczak K, Wheeler TM, Wang W, et al. RNA interference targeting CUG repeats in a mouse model of myotonic dystrophy. *Mol Ther* 2013; 21(2):380-387.
88. Mulders SA, van den Broek WJ, Wheeler TM, et al. Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(33):13915-13920.
89. Francois V, Klein AF, Beley C, et al. Selective silencing of mutated mRNAs in DM1 by using modified hU7-snRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18(1):85-87.
90. Wheeler TM, Sobczak K, Lueck JD, et al. Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science* 2009; 325(5938):336-339.
91. Wheeler TM, Leger AJ, Pandey SK, et al. Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature* 2012; 488(7409):111-115.
92. Mankodi A, Logigian E, Callahan L, et al. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 2000; 289(5485):1769-1773.
93. Seznec H, Lia-Baldini AS, Duros C, et al. Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability. *Hum Mol Genet* 2000; 9(8):1185-1194.
94. Warf MB, Nakamori M, Matthys CM, et al. Pentamidine reverses the splicing defects

associated with myotonic dystrophy. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(44):18551-18556.

95. de Haro M, Al-Ramahi I, De Gouyon B, et al. MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy type 1. Hum Mol Genet 2006; 15(13):2138-2145.

96. Kanadia RN, Shin J, Yuan Y, et al. Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(31):11748-11753.

97. Nakamori M, Sobczak K, Puwanant A, et al. Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy. Ann Neurol 2013; 74(6):862-872.

98. Mulders SA, van Engelen BG, Wieringa B, et al. Molecular therapy in myotonic dystrophy: focus on RNA gain-of-function. Hum Mol Genet 2010; 19(R1):R90-97.