



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Efecto de moxifloxacino en la expresión y splicing del gen  
SMN2 en mioblastos de AME tipo II

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Regal Marqués, Celia

Tutor/a: García Gimeno, María Adelaida

Cotutor/a externo: KONIECZNY, PIOTR TADEUSZ

Director/a Experimental: ARTERO ALLEPUZ, RUBEN DARIO

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

# Efecto de moxifloxacino en la expresión y splicing del gen *SMN2* en mioblastos de AME tipo II.

*Laboratorio de Genómica Traslacional; Facultad de Biología de la Universidad de Valencia.*

Celia Regal Marqués

## Trabajo Fin de Grado en Biotecnología

Curso académico 2021-2022

Universidad Politécnica de Valencia (UPV)

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN)

**Tutor:**

- M<sup>a</sup> Adelaida García Gimeno

**Cotutores UV:**

- Piotr Tadeusz Konieczny

- Rubén Dario Artero Allepuz (IP)

Valencia, junio 2022

# Efecto de moxifloxacino en la expresión y splicing del gen SMN2 en mioblastos de AME tipo II.

**Autor:** Dña. Celia Regal Marqués

**Curso Académico:** 2021/2022

**Localidad y fecha:** Valencia, junio de 2022

**Tutor Académico:** Dña. María Adelaida García Gimeno

**Cotutores UV:** D. Piotr Tadeusz Konieczny y D. Rubén Dario Artero Allepuz

## Resumen:

La atrofia muscular espinal (AME) es un trastorno neuromuscular genético raro causado por la pérdida de neuronas  $\alpha$ -motoras de los núcleos de la médula espinal y el cerebro. Esta enfermedad afecta a 1 de cada 6.000/10.000 nacidos. La AME está causada principalmente por mutaciones en el gen *SMN1*. Sin embargo, como resultado de una duplicación en el genoma, el locus SMN contiene dos copias invertidas de SMN, llamadas *SMN1* y *SMN2*. Los pacientes con AME tienen el gen *SMN1* mutado y la copia *SMN2* no afectada, que sólo se traduce parcialmente en una proteína SMN funcional. Una de las estrategias terapéuticas se centra en la modulación del splicing de *SMN2* para aumentar la inclusión del exón 7 en el transcrito maduro. Se han descrito dos enfoques generales para corregir el patrón de splicing: (1) el uso de ASOs que promueven directamente la inclusión de Ex7 mediante el bloqueo de regiones silenciadoras de splicing exónicas o intrónicas, y (2) el uso de fármacos de moléculas pequeñas que modulan la actividad del espliceosoma en un evento de splicing determinado. La estrategia ASO dio lugar al primer fármaco aprobado por la FDA, llamado nusinersen (Spinraza™). Aun así, todavía hay muchas preocupaciones sobre la administración del fármaco (intratecal) y el coste de la terapia.

Aquí estudiamos el efecto de moxifloxacino, una molécula pequeña, caracterizado como un modulador del splicing que aumenta la inclusión del exón 7 en los fibroblastos derivados de pacientes de AME (Konieczny & Artero, 2020) sobre el splicing de *SMN2* y los niveles de proteína SMN en mioblastos de AME tipo II. Además, estudiamos si la formación de gemas se ve afectada por moxifloxacino en los mioblastos y durante la formación de los miotubos. Por último, queremos ver si el tratamiento con moxifloxacino puede mejorar el proceso de fusión de los mioblastos al aumentar los niveles de SMN. En este ensayo se observó que moxifloxacino aumenta la expresión del gen *SMN2*, por lo que modula el splicing aumentando la inclusión del exón 7, pero se obtiene una menor cantidad de proteína SMN. Además, se consiguió detectar gemas en los mioblastos control tratados con DMSO, pero no se consiguieron detectar gemas en los mioblastos AME tratados con moxifloxacino por lo que no se vio un aumento en la formación de las gemas. Y por último, se vio que moxifloxacino no producía una mejora en el proceso de fusión de los mioblastos.

**Palabras clave:** AME; molécula pequeña; reposicionamiento; mioblastos; terapia.

# The effect of moxifloxacin on SMN2 gene expression and splicing in SMA type II myoblasts.

## Abstract:

Spinal muscular atrophy (SMA) is a rare genetic neuromuscular disorder caused by loss of  $\alpha$ -motor neurons from nuclei in the spinal cord and brain. This disease affects 1 in 6,000/10,000 births. SMA is mainly caused by mutations in the *SMN1* gene. However, as a result of duplication in the genome, the SMN locus contains two inverted copies of SMN, called *SMN1* and *SMN2*. SMA patients have the mutated *SMN1* gene and the unaffected *SMN2* copy, which is only partially translated into a functional SMN protein. One of the therapeutic strategies focuses on the modulation of SMN2 splicing to increase the inclusion of exon 7 in the mature transcript. Two general approaches have been described to correct the splicing pattern: (1) the use of ASOs that directly promote Ex7 inclusion by blocking exonic or intronic splicing silencing regions, and (2) the use of small molecule drugs that modulate the activity of the spliceosome in a given splicing event. The ASO strategy gave rise to the first FDA-approved drug, called nusinersen (Spinraza™). Even so, there are still many concerns about the administration of the drug (intrathecal) and the cost of therapy.

Here we study the effect of moxifloxacin, a small molecule, characterized as a splicing modulator that increases exon 7 inclusion in fibroblasts derived from SMA patients (Konieczny & Artero, 2020) on *SMN2* splicing and SMN protein levels in SMA type II myoblasts. In addition, we studied whether gem formation is affected by moxifloxacin in myoblasts and during myotube formation. Lastly, we want to see if moxifloxacin treatment can enhance the myoblast fusion process by increasing SMN levels. In this trial, it was observed that moxifloxacin increases the expression of the *SMN2* gene, thus modulating splicing by increasing the inclusion of exon 7, but a smaller amount of SMN protein is obtained. In addition, gems were detected in DMSO-treated control myoblasts, but gems were not detected in moxifloxacin-treated SMA myoblasts, so no increase in gem formation was seen. And finally, it was seen that moxifloxacin did not produce an improvement in the fusion process of myoblasts.

**Key words:** SMA; small molecule; repurposing; myoblasts; therapy.

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	Página 1
<b>1.1. Mecanismo molecular</b> .....	Página 1
<b>1.2. Proteína SMN</b> .....	Página 2
<b>1.3. Presentación clínica</b> .....	Página 4
<b>1.5. Estrategias terapéuticas</b> .....	Página 5
<b>1.6. Objetivos</b> .....	Página 8
<b>2. Materiales y Métodos</b> .....	Página 9
<b>2.1. Condiciones de cultivo celular</b> .....	Página 9
<b>2.2. Tratamiento celular</b> .....	Página 9
<b>2.3. Extracción de RNA</b> .....	Página 10
<b>2.4. Retrotranscripción</b> .....	Página 10
<b>2.5. PCR cuantitativa</b> .....	Página 11
<b>2.6. Extracción de proteína</b> .....	Página 12
<b>2.7. Western blot</b> .....	Página 13
<b>2.8. Jess Simple Western</b> .....	Página 14
<b>2.9. Colocalización de la proteína SMN y coilina</b> .....	Página 14
<b>2.10. Análisis estadístico</b> .....	Página 15
<b>3. Resultados y Discusión</b> .....	Página 16
<b>3.1. Análisis de expresión de los transcritos del gen SMN2</b> .....	Página 16
<b>3.2. Análisis de los niveles de proteína SMN</b> .....	Página 17
<b>3.3. Colocalización de la proteína SMN y coilina</b> .....	Página 20
<b>4. Conclusiones</b> .....	Página 26
<b>5. Bibliografía</b> .....	Página 27

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.1.** Bases moleculares de AME y las diferencias entre el gen *SMN1* y *SMN2* (Adaptado: Butchbach & Burghes, 2004).

**Figura 1.2.** Representación esquemática de la proteína SMN (Singh et al., 2017).

**Figura 1.3.** Funciones propuestas de la proteína SMN en el metabolismo del RNA (Singh et al., 2017).

**Tabla 2.1.** Listado de los cebadores y sondas empleadas para la amplificación de los transcritos de SMN: *SMN2 FL* (incluye exón 7) y *SMN2 Δ7* (no incluye exón 7).

**Figura 3.1.** Niveles de expresión del gen *SMN2* de longitud completa (FL) y del gen *SMN2* en el que se excluye el exón 7 (Delta7) en las distintas condiciones celulares, normalizados frente los mioblastos AME con DMSO (AME DMSO).

**Figura 3.2.** Niveles de proteína SMN analizadas mediante western blot en las distintas condiciones celulares, normalizados frente los mioblastos AME con DMSO (AME DMSO).

**Figura 3.3.** Niveles de proteína SMN analizadas mediante Jess Simple Western en las distintas condiciones celulares, normalizados frente los mioblastos AME con DMSO (AME DMSO).

**Figura 3.4.** Detección de la proteína SMN y coilina mediante inmunofluorescencia en mioblastos control con DMSO a día 0 (D0), 2 (D2), 4 (D4) y 6 (D6).

**Figura 3.5.** Detección de la proteína SMN y coilina mediante inmunofluorescencia en mioblastos de pacientes AME con DMSO a día 0 (D0), 2 (D2), 4 (D4) y 6 (D6).

**Figura 3.6.** Detección de la proteína SMN y coilina mediante inmunofluorescencia en mioblastos de pacientes AME tratados con risdiplam a día 2 (D2), 4 (D4) y 6 (D6).

**Figura 3.7.** Detección de la proteína SMN y coilina mediante inmunofluorescencia en mioblastos de pacientes AME tratados con moxifloxacino a una concentración de 500 mM (M500) a día 2 (D2), 4 (D4) y 6 (D6).

**Figura 3.8.** Índice de fusión en mioblastos control DMSO, mioblastos de pacientes AME con DMSO y mioblastos de pacientes AME tratados con risdiplam y moxifloxacino a una concentración de 500 mM (M500) a día 6.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>AME:</b>	Atrofia muscular espinal
<b>SMN:</b>	Survival of motor neuron
<b>ASO:</b>	Antisense oligonucleotide
<b>SMN2<math>\Delta</math>7:</b>	Gen SMN2 que no incluye el exón 7
<b>RNP:</b>	Ribonucleoproteins
<b>hnRNP A1/A2:</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoparticule A1/A2
<b>snRNP:</b>	small nuclear ribonucleoproteins
<b>snORNP:</b>	small nucleolar ribonucleoprotein complex
<b>snRNA:</b>	small nuclear RNA
<b>UNRIP:</b>	Unr-interacting protein
<b>SRP:</b>	signal recognition particle
<b>FDA:</b>	Food and Drug Administration
<b>EMA:</b>	European Medicines Agency
<b>PCN:</b>	Programa de cribado neonatal
<b>scAAV9:</b>	Self-complementary adeno-associated viral vector serotype 9
<b>BDNF:</b>	Brain Derived Neurotrophic Factor
<b>hIGF-1:</b>	Insulin-like growth factor 1
<b>hEGF:</b>	Epidermal growth factor, human
<b>bFGF:</b>	Basic Fibroblast Growth Factor
<b>dNTP:</b>	Deoxyribonucleotide triphosphate
<b>DTT:</b>	Dithiothreitol
<b>PCR:</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>RT:</b>	Retrotranscriptasa
<b>PBS:</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PBS-T:</b>	Phosphate Buffered Saline with Tween™
<b>DMSO:</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>FBS:</b>	Fetal bovine serum
<b>EDTA:</b>	Ethylenediamine tretaacetic acid
<b>FL:</b>	Full length

<b>RNA:</b>	Ribonucleic acid
<b>mRNA:</b>	Messenger Ribonucleic acid
<b>DNA:</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>cDNA:</b>	Complementary Deoxyribonucleic acid

## 1. INTRODUCCIÓN

La atrofia muscular espinal (AME) era, hasta hace poco, la principal causa de mortalidad infantil, con una incidencia de 1 de cada 6.000 a 1 de cada 10.000 nacidos, y una frecuencia de portadores de 1 de cada 40 a 1 de cada 60 personas (D'Amico et al., 2011), ya que gracias a la reciente llegada a la clínica de tratamientos efectivos contra AME, se ha conseguido mejorar sustancialmente la esperanza de vida de los pacientes. Se trata de un trastorno neurodegenerativo autosómico recesivo caracterizado por una atrofia y debilidad muscular progresiva, causada por una degeneración de las  $\alpha$ -motoneuronas en la médula espinal y los núcleos del tronco cerebral (Mercuri et al., 2020).

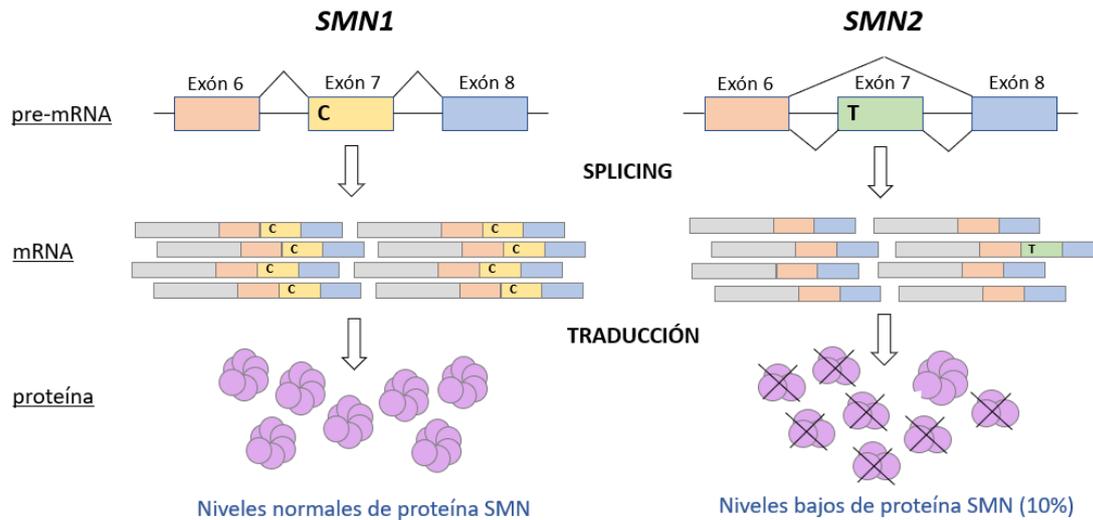
### 1.1. Mecanismo molecular

Este trastorno es debido a mutaciones en el gen *SMN1*. Este gen codifica la proteína *survival of motor neuron* (SMN) que se encuentra de forma ubicua en todas las células del cuerpo, tanto en el citoplasma como en el núcleo (Aslesh & Yokota, 2022).

Debido a un evento de duplicación único de los humanos, apareció una segunda copia del gen *SMN1*, llamado *SMN2* (Lorson et al., 1999), en el locus SMN que se encuentra en el cromosoma 5, concretamente en la región 5q13 (Butchbach, 2021).

Ambos genes son prácticamente iguales, la única diferencia que encontramos entre ellos es una transición de C a T en el exón 7 del gen *SMN2*, concretamente en la posición +6 (*SMN2* c.850C>T) (Butchbach, 2021). Este pequeño cambio se encuentra en medio de una secuencia promotora de empalme, dependiente de un factor de empalme (SF2/ASF) que actúa junto con otras proteínas dando lugar a la eliminación del intrón 6 e inclusión del exón 7. Esta transición en el gen *SMN2*, produce que el factor de empalme, SF2/ASF, no pueda reconocer el motivo de unión, y por lo tanto, se produce la exclusión del exón 7 (Cartegni & Krainer, 2002). Además, esta transición también produce en el gen *SMN2* la aparición de una región silenciadora de empalme exónico al que se unen ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP A1/A2) que favorecen la exclusión del exón 7 (Lunn & Wang, 2008).

Por lo tanto, esta pequeña diferencia entre ambos genes produce un cambio en el patrón de splicing que favorece la exclusión del exón 7 en una gran proporción de los transcritos del gen *SMN2*. La ausencia del exón 7 altera la capacidad de oligomerización de la proteína SMN, dando como resultado, una proteína de longitud incompleta, que es inestable y se somete rápidamente a la ruta ubiquitina-proteosoma. Aproximadamente solo el 10% de los transcritos de *SMN2* presentan la inclusión del exón 7 dando lugar a la proteína funcional de longitud completa, la proteína SMN, mientras que el 100% de los transcritos de *SMN1* presentan la inclusión del exón 7 (Lorson et al., 1999) (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Bases moleculares de AME y las diferencias entre el gen *SMN1* y *SMN2*. La principal diferencia entre *SMN1* y *SMN2* es una transición C-T en el exón 7 del gen *SMN2*, esta mutación produce un cambio en el patrón de splicing reduciendo la incorporación del exón 7 en el mRNA maduro, la traducción de este mRNA maduro *SMN2Δ7* da lugar a una proteína truncada (representadas como círculos tachados) que es inestable y se degrada rápidamente, aun así *SMN2* puede producir niveles bajos de la proteína SMN de longitud completa (10%) (Adaptado: Butchbach & Burghes, 2004).

Más del 95% de los casos de AME es resultado de la pérdida del gen *SMN1* mientras se mantiene el gen *SMN2* (Butchbach, 2021), por lo que la pérdida de función de *SMN1* es esencial para padecer la enfermedad. Además, se ha visto que la gravedad de la enfermedad se correlaciona inversamente con el número de copias del gen *SMN2* y que este puede llegar a compensar funcionalmente, de forma parcial, esta pérdida de función de *SMN1* mediante la obtención de una pequeña cantidad de la proteína SMN de longitud completa funcional (Butchbach, 2016).

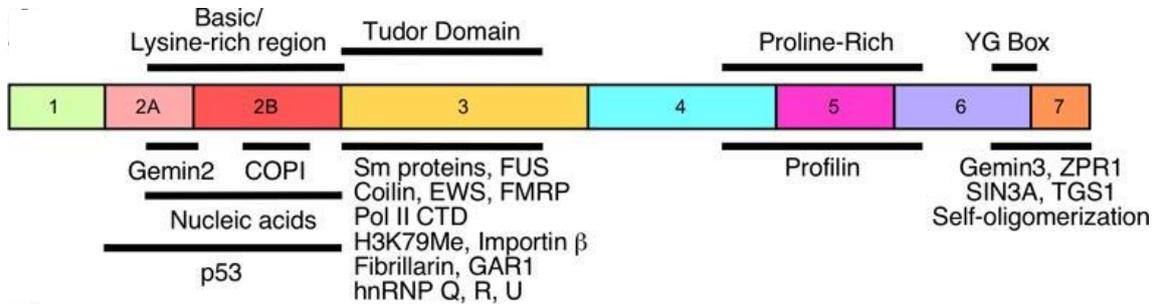
El 5% de los casos restantes de AME se debe a mutaciones intragénicas en el gen *SMN1*, como mutaciones de cambios en la pauta de lectura, mutaciones de empalme, mutaciones sin sentido o pequeñas deleciones, que generan cambios en el patrón de splicing de *SMN1*, apoyando la evidencia de que es el gen implicado en AME (Burghes & Beattie, 2009).

## 1.2. Proteína SMN

La proteína SMN se encuentra de forma ubicua en todas las células del cuerpo, tanto en el citoplasma como en el núcleo. Se trata de una proteína de 38 kDa, formada por 294 aminoácidos, que presenta unos niveles de expresión altos durante la etapa del desarrollo gestacional y neonatal, y en el sistema neuromuscular, seguido de una disminución de estos niveles con la edad, a excepción del sistema neuromuscular donde los niveles de expresión se mantienen estables (Aslesh & Yokota, 2022).

Esta proteína presenta múltiples dominios entre los que se encuentran: en el extremo N-terminal un dominio rico en lisina, zona de unión a Gemin2 y ácidos nucleicos (exón 2A y 2B), un dominio Tudor central, al que se unen distintas proteínas, como por ejemplo, proteínas Sm o la

proteína coilina (exón 3), un dominio rico en prolina, de unión a la proteína profilina (exón 4, 5 y 6) y una caja de tirosina-glicina (YG box) (exón 6 y 7) en el extremo C-terminal, importante en la auto-oligomerización de la proteína SMN (Singh et al., 2017) (Figura 1.2).

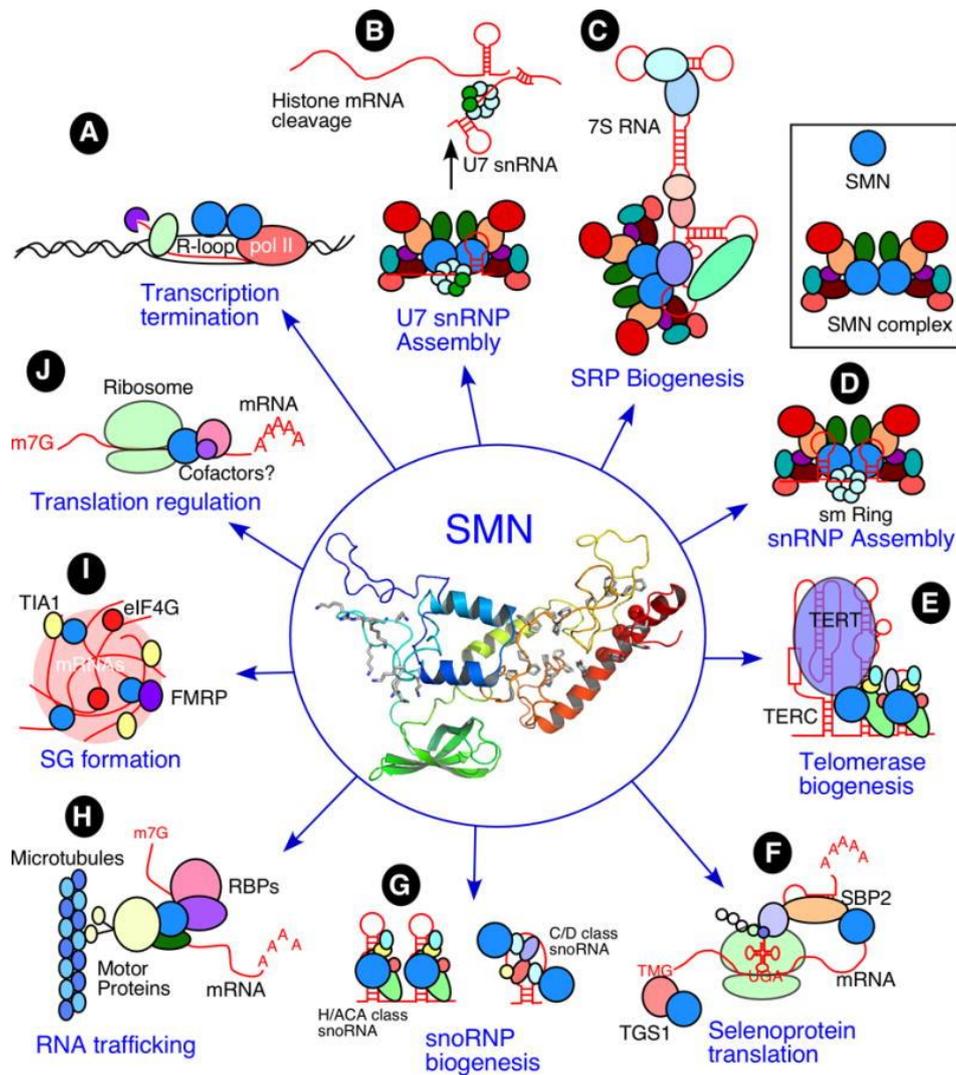


**Figura 1.2.** Representación esquemática de la proteína SMN. Los números que se encuentran en los recuadros hacen referencia a los exones del gen SMN1. Los dominios se encuentran en la parte superior a los recuadros, mientras que las proteínas que interactúan con SMN se encuentran en la parte inferior a los recuadros (Singh et al., 2017).

La proteína SMN forma un complejo multiproteico en el que interactúa con la familia de proteína Gemin2-8 y con la proteína que interactúa con Unr (UNRIP) formando el complejo SMN (Cauchi, 2010). Esta proteína se acumula en el núcleo, formando estructuras denominadas gemas, e interactúa con una proteína característica de los cuerpos de Cajal, la proteína coilina, gracias a la proteína WRAP53, que presenta el dominio WD40, esencial para la localización del complejo SMN en los cuerpos de Cajal. En el citosol, la proteína SMN se encuentra en los discos Z del sarcómero, en microtúbulos, en el aparato de Golgi y en gránulos de estrés citosólicos (Singh et al., 2017).

Esta proteína juega un papel esencial en aspectos del metabolismo del RNA, destacando su papel en el ensamblaje de pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs), importantes para el reconocimiento de sitios de empalme y eliminación catalítica de intrones en pre-mRNA, ya que las snRNPs están formadas por un pequeño RNA nuclear (snRNA), proteínas específicas de cada snRNP y por proteínas Sm que son ensambladas en el snRNP gracias a la proteína SMN (Burghes & Beattie, 2009).

Entre las funciones de la proteína SMN en el metabolismo del RNA encontramos: (A) la terminación de la transcripción, (B) el ensamblaje de snRNP U7, (C) biogénesis de partículas de reconocimiento de señales (SRP), (D) el ensamblaje de snRNP spliceosomal, (E) biogénesis de la telomerasa, (F) en la traducción de la selenoproteína, (G) la biogénesis de RNAs nucleolares pequeños (snoRNP), (H) en el tráfico de RNA, (I) en la formación de gránulos de estrés, y (J) en la regulación de la traducción (Figura 1.3) (Singh et al., 2017)



**Figura 1.3.** Funciones propuestas de la proteína SMN en el metabolismo del RNA. Las proteínas se encuentran representadas mediante óvalos, el DNA mediante líneas negras, y el RNA mediante líneas rojas (Singh et al., 2017).

Por último, también se ha visto que la proteína SMN participa en la maduración de las uniones neuromusculares, en la diferenciación neuronal (Kariya et al., 2008) y en el mantenimiento de las células madre embrionarias (Chang et al., 2015).

### 1.3. Presentación clínica

Esta enfermedad se ha clasificado según la gravedad de los síntomas y del genotipo en AME tipo 0, I, II, III y IV (Keinath et al., 2021). La gravedad de los síntomas se relaciona con los niveles de la proteína survival of motor neuron (SMN), en los que se presentan bajos niveles de proteína SMN en los tipos más graves (tipo 0, I y II) y niveles más altos en los casos más leves (tipo III y IV) (Mercuri et al., 2020).

Desde un punto de vista clínico, podemos encontrar defectos menores sin una reducción significativa de la esperanza de vida en los tipos más leves, hasta una ausencia de la función motora y mortalidad infantil en los tipos más graves. La debilidad característica de la

enfermedad es predominantemente proximal, con una mayor afectación de las extremidades inferiores y arreflexia difusa, además en casos graves de la enfermedad se puede ver una debilidad del bulbo y músculos respiratorios, y por lo general, los músculos faciales y oculares no se encuentran afectados en los pacientes (Keinath et al., 2021).

La AME tipo 0 representa menos del 1% de los pacientes, y presentan el fenotipo más grave en el que encontramos una única copia de *SMN2*, siendo la esperanza de vida sin tratamiento de unas semanas tras el parto (Dakhoul, 2017). Los síntomas de estos pacientes se pueden notar incluso antes de su nacimiento, ya que se puede observar una disminución de los movimientos intrauterinos y en las contracciones, además, ya desde el nacimiento se observa una debilidad generalizada, hipotonía, dificultad respiratoria y problemas en la alimentación (Keinath et al., 2021).

La AME tipo I (enfermedad de Werding-Hoffmann, OMIM #253300) representa el 45% de los pacientes, siendo la forma más común, en la que encontramos entre 1 y 2 copias de *SMN2*, y presentan una esperanza de vida de 2 años tras el nacimiento si no recibe ningún tipo de tratamiento. Los síntomas se empiezan a desarrollar en los 6 primeros meses de vida, y entre ellos se incluye debilidad predominante proximal de las extremidades, insuficiencia respiratoria y una alimentación deficiente, aun así, la función cognitiva es normal o superior a la media.

La AME tipo II (enfermedad de Dubowitz, OMIM #253550) representa el 30% de los pacientes, en el que encontramos 3 copias de *SMN2*, siendo la esperanza de vida de unos 25 años. Los síntomas se empiezan a desarrollar a los 6-18 meses y los pacientes en un primer momento son capaces de sentarse sin ayuda, pero después de unos 9 meses pierdan esa habilidad, y tampoco son capaces de andar de forma independiente. Además, presentan debilidad de los músculos proximales, de forma más grave en las extremidades inferiores, atrofia y fasciculaciones de la lengua, e insuficiencia respiratoria y disfagia en los casos más graves.

La AME tipo III (enfermedad de Kugelberg-Welander, OMIM #253400) representa el 15% de los pacientes, en el que encontramos entre 3 y 4 copias de *SMN2*, presentando una esperanza de vida normal. Los síntomas se pueden desarrollar entre los 8 meses y los 30 años, y los pacientes se caracterizan por la capacidad de estar de pie y caminar sin ayuda, aunque podrían llegar a perder esta habilidad debido a la progresión de la enfermedad. Los pacientes no presentan debilidad muscular respiratoria, pero presentan debilidad muscular proximal lo que resulta en caídas, marcha anormal y dificultad para subir escaleras.

La AME tipo IV (OMIM #271150) representa el 10% de los pacientes, en el que se encuentran 4 copias o más de *SMN2*, presentando una esperanza de vida normal. Los síntomas se empiezan a desarrollar a los 20-30 años, y los pacientes se caracterizan por un deterioro motor sutil sin problemas respiratorios ni nutricionales, además son capaces de caminar sin ayuda (Keinath et al., 2021).

#### **1.4. Estrategias terapéuticas**

Los avances en investigación básica y los estudios clínicos han permitido el desarrollo de terapias para la AME. Todas las terapias aprobadas tanto por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos, EE.UU) como por la EMA (Agencia Europea de Medicamentos, UE) se basan en aumentar la expresión de la proteína SMN, ya sea mediante la modulación del empalme de *SMN2* aumentando la inclusión del exón 7 gracias al uso de oligonucleótidos antisentido (ASOs)

o moléculas pequeñas (Jablonka et al., 2022), o mediante terapia de reemplazo génico, en el que se proporciona el gen completamente funcional (Naveed & Calderon, 2021).

Nusinersen (Spinraza, Biogen, Cambridge, MA) fue el primer fármaco aprobado por la FDA, en 2016, para el tratamiento de la AME, y aprobado por la EMA, en 2017 (Gidaro & Servais, 2019). Se trata de un ASO dirigido al intrón 7 del gen *SMN2*, llamado ISS-N1, que se encuentra en el sitio de empalme 5', aguas abajo del exón 7. ISS-N1 es una molécula que modula el empalme alternativo del exón 7 de *SMN* y está asociado con la patogénesis de AME, ya que recluta represores hnRNP A1 y A2 que inhiben la inclusión del exón 7. Nusinersen actúa hibridándose con ISS-N1, lo que da como resultado la inclusión del exón 7 de *SMN2* aumentando los niveles de la proteína *SMN* de longitud completa (Li, 2020). Este fármaco está aprobado para todos los tipos de AME y se administra por vía intratecal, ya que debido al tamaño de los ASOs no pueden atravesar la barrera hematoencefálica (Jablonka et al., 2022). Se trata de un tratamiento crónico que consta de 4 dosis iniciales, seguidas de dosis de mantenimiento cada 4 meses (Naveed & Calderon, 2021).

Desde que se aprobó en 2016, nusinersen fue el único fármaco aprobado para el tratamiento de AME, hasta 2019, cuando la FDA aprobó Onasemnogén abeparvovec (Zolgensma, AveXis Inc, Bannockburn, IL), anteriormente conocido como AVSX-101. Se trata de una terapia génica basada en un vector viral adenoasociado (scAAV9) no replicante, que proporciona un gen totalmente funcional que codifica la proteína *SMN* en las motoneuronas. El scAAV9, aparte de transportar el gen funcional al músculo y otros tejidos periféricos, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica para llegar al sistema nervioso central y las motoneuronas de la medula espinal, donde se produce un aumento de los niveles de la proteína *SMN*. Este fármaco está aprobado para el tratamiento de pacientes con AME de hasta dos años y se administra mediante una única inyección intravenosa (Jablonka et al., 2022).

Otra opción para mantener unos niveles de proteína *SMN* normales es mediante el uso de moléculas pequeñas. Entre estos encontramos el fármaco risdiplam (Evrysdi®), el único fármaco de administración oral aprobado, en 2020 por la FDA, para el tratamiento de la AME en pacientes con al menos dos meses de edad (Kakazu et al., 2021). Risdiplam funciona como un modificador de empalme del gen *SMN2* que produce un aumento de la proteína *SMN*. Al tratarse de una molécula pequeña, puede cruzar la barrera hematoencefálica, y al administrarse vía oral, produce el aumento de la proteína *SMN* tanto en los tejidos periféricos como en el sistema nervioso central (Jablonka et al., 2022).

También se está investigando neuroprotectores como Loganin, un glucósido iridoide que regula la señalización del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y Akt, lo que produce una mejora en la función motora y una esperanza de vida mayor en ratones *SMNΔ7*. También se ha visto que IPLEX, un complejo de hIGF-1 recombinante junto con rhIGFBP-3, reduce la degeneración de las motoneuronas y la pérdida de las funciones motoras en ratones *SMNΔ7*. También se ha probado Olesoxime que en ensayos preclínicos se vio que producía una preservación de la homeostasis mitocondrial y por lo tanto, de la integridad de las motoneuronas, y una reducción de la denervación muscular, la astrogliosis y la activación

microglial, sin embargo en los ensayos clínicos no se vieron resultados beneficiosos (Jablonka et al., 2022).

Por último, encontramos estrategias que van dirigidas al músculo. Para evitar la pérdida de masa muscular se ha propuesto la inhibición de la miostatina, bloqueándola mediante un anticuerpo monoclonal selectivo anti-promiostatina, el [SRK-015/Apitegromap](#), que se encuentra bajo investigación (Barrett et al., 2021). También encontramos el activador de troponina, [Reldesemtiv](#) (CK-2127107) sensibilizando la respuesta del sarcómero al calcio, aumentando la contractilidad, por ello, produce un incremento de la respuesta del músculo esquelético (Jablonka et al., 2022).

Aun así, las terapias aprobadas actualmente presentan unas ciertas limitaciones, entre ellas, que son estrategias dependientes de SMN, por lo tanto, no se tienen en cuenta otras vías moleculares que contribuyen a la patogénesis de AME, por lo que se deberían emplear terapias combinadas para poder afrontar características independientes de SMN. Otras limitaciones que encontramos es que la eficacia de los tratamientos es dependiente de la edad de inicio del tratamiento y el tipo de paciente, siendo más eficaz el tratamiento conforme antes se administre. También pueden presentar una administración invasiva (en el caso de nusinersen) y efectos secundarios. Y por último, una limitación importante es el precio de los tratamientos (Menduti et al., 2020), siendo estos de los mas caros que hay en el mercado, ya que, por ejemplo, se estima que nusinersen cuesta 750,000 \$ el primer año, y tras el primer año, unos 375,000 \$/anuales (Neil & Bisaccia, 2019).

Por todo esto, es necesario seguir investigando otro tipo de tratamientos y fármacos contra la AME, en los que cobran importancia los fármacos de moléculas pequeñas como modulador del empalme de *SMN2*, ya que, debido al pequeño tamaño de estas moléculas, pueden ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, y al poder administrarse por vía oral, se puede distribuir sistémicamente en el organismo, dirigiéndose tanto al sistema nervioso central como al sistema nervioso periférico y órganos periféricos (Jablonka et al., 2022). El grupo del Prof. Artero, en trabajos anteriores, desarrolló un sistema reportero basado en *Drosophila* sobre la inclusión del exón 7 de *SMN2* en la neurona motora. Este sistema reportero se empleó para examinar 1100 moléculas pequeñas aprobadas por la FDA, de los cuales, se seleccionaron 27 como compuestos primarios ya que alteraban de forma significativa la lectura de luminiscencia del sistema reportero, y eran capaces de atravesar la barrera hematoencefálica homóloga a los humanos en *Drosophila*. De estos 27 compuestos primarios, se seleccionaron 10 fármacos para su evaluación en fibroblastos derivados de pacientes AME humanos, y descubrieron que 3 de ellos aumentaban los niveles de proteína SMN. Uno de los compuestos, el moxifloxacino, se caracterizó como un modulador del splicing que aumenta la inclusión del exón 7 en los fibroblastos derivados de pacientes de AME y a su vez, se producía un aumento en los niveles de la proteína SMN (Konieczny & Artero, 2020).

## **1.6. Objetivos**

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de moxifloxacino, una molécula pequeña, en mioblastos de pacientes de AME tipo II, gracias al cultivo de estos con el compuesto, que ha sido seleccionado previamente mediante el cribado de una quimioteca de fármacos conocidos (reposicionamiento de fármacos).

Por ello, los objetivos específicos de este informe son:

1. Evaluar el efecto de moxifloxacino en mioblastos de pacientes de AME tipo II, en el splicing del gen SMN2, mediante el análisis de expresión del gen.
2. Evaluar el efecto de moxifloxacino en mioblastos de pacientes de AME tipo II, en los niveles de expresión de la proteína SMN.
3. Evaluar el efecto de moxifloxacino en mioblastos y miotubos en formación de pacientes AME tipo II, en la formación de gemas, sitios nucleares de acumulación de la proteína SMN, y en la diferenciación celular, mediante la colocalización de la proteína SMN y coilina.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Condiciones de cultivo celular

Para los experimentos se emplearon mioblastos sanos (control) y mioblastos de pacientes que presentaban la enfermedad (AME). Para ello, se solicitaron los mioblastos sanos de la línea celular 'AB1190' y las células mioblastos AME de la línea celular 'KM1150SMAll7PV', a través del *Center of Research in Myology* (INSERM U974, Paris, France). Las células se transportaron en un recipiente con nitrógeno líquido (-196°C), después se descongelaron los crioviales mediante un baño en agua caliente a 37°C, y se añadió, en un frasco de cultivo celular con tapas de filtro, 1 mL de células provenientes de los crioviales descongelados en 24 mL de medio KMEM. Por último, se incubaron los frascos de cultivo a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>.

Los mioblastos, tanto de la línea control como AME, se cultivaron a 37°C en frascos para cultivo celular con tapas de filtro. Se empleó el medio KMEM que está formado por 4 volúmenes de DMEM Glutamax 4.5 g (Gibco) y 1 volumen de Medio 199 (Gibco). Esto se suplementó con un 10% de suero de bovino fetal inactivado (FBS; Gibco), 0.04% de Fetuina 25 ng/mL (10344026; Life Technologies), 0.01% de hEGF 5 ng/mL (PHG0311; Life Technologies), 0.001% de bFGF a una concentración de 0.5 ng/mL (PHG0026; Life Technologies), 0.5% de insulina 5 µg/mL (91077C; Sigma), 0.002% de dexametasona 0.2 µg/mL (D4902; Sigma) y un 1% de una mezcla 1:1 de penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 mg/mL) (P/S; Gibco), formando de esta forma el medio KMEM completo.

Para sembrar las células, en un primer paso se levantaron las células de la superficie del frasco de cultivo celular, para ello, primero se lavaron los frascos con 20 mL de PBS 1x (Gibco) y se trataron con 2 mL de tripsina-EDTA 0,25% rojo fenol (Gibco), se dejó actuar durante 3 minutos en el incubador a 37°C, y posteriormente se añadieron 23 mL de medio para inactivar la tripsina. Por último, se sembraron 1x10<sup>5</sup> células/mL en placas Petri, que previamente habían sido tratadas con colágeno.

En este estudio se emplearon placas Petri de 100 mm para estudiar los niveles de proteína SMN, de 60 mm para estudiar los niveles de inclusión del exón 7 en SMN2 y placas de 24 pocillos con cubres para el estudio de colocalización de la proteína SMN y la proteína coilina mediante inmunofluorescencia. Las placas se incubaron a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Tratamiento celular

Para poder observar si moxifloxacino tiene efecto en el splicing de *SMN2*, se sembraron, en medio KMEM, 1x10<sup>5</sup> células/mL en las diferentes placas de cultivo celular.

Tras un día con el medio KMEM, este se cambió por medio KMEM con las distintas concentraciones de moxifloxacino que se estudiaron. La concentración de moxifloxacino más alta empleada fue la concentración más alta no tóxica, en este caso, 500 mM, y cuatro concentraciones más, siendo estas 375 mM, 250 mM, 125 mM y 62.5 mM. También se empleó el compuesto risdiplam, como control positivo, y los controles de mioblastos sanos y de mioblastos AME con un 0.25% DMSO.

Para poder analizar los niveles de RNA y proteína, se realizó la extracción de RNA y de proteína de los cultivos celulares de los mioblastos tratados con los distintos compuestos, cuando las placas presentaban una confluencia del 80% aproximadamente.

### **2.3. Extracción de RNA**

El RNA se extrajo de los cultivos celulares de mioblastos tratados para poder observar, posteriormente tras una retrotranscripción y una qRT-PCR, los niveles de expresión del gen *SMN2* de longitud completa, que incluyen el exón 7.

Para realizar la extracción de RNA, primero se eliminó el medio de cultivo de las placas de 60mm y se lavaron con PBS 1x, después se añadió 600  $\mu$ L de Trizol (ThermoFisher Scientific) y se recogieron las células tratadas con la ayuda de un raspador de células en eppendorfs estériles, una vez recolectadas, en la cabina extractora de gases, se añadió 120  $\mu$ L de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 15 minutos a 12,000 g a una temperatura de 4°C. Tras la centrifugación, se recogió la fase acuosa, que es donde se encontraba el RNA, ya que en la otra fase se encontraban las proteínas y el Trizol. Después, se le añadió, a esa primera fase recogida, isopropanol en una relación 1:1, se agitó vigorosamente y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos, tras esto, se centrifugó durante 15 minutos a 12,000 g a una temperatura de 4°C. Una vez realizada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, se lavó con 600  $\mu$ L de etanol al 75%, y tras un rápido vortex se centrifugó durante 5 minutos a 7,400 g a una temperatura de 4°C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente, y por último se disolvió en 50  $\mu$ L de agua libre de RNasa.

Finalmente, se midió la concentración de RNA mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) y las muestras se guardaron a -80°C.

### **2.4. Retrotranscripción**

Para obtener cDNA a partir del RNA extraído anteriormente, y de esta forma poder realizar la PCR cuantitativa, se realizó un tratamiento de DNasa y una retrotranscripción.

Lo primero que se realizó fue un tratamiento con DNasa, ya que la extracción de RNA se realizó de forma manual sin este paso. Para ello, se emplearon para cada muestra 8  $\mu$ L de RNA, 1 unidad de DNasa (10 U/ $\mu$ L, Roche), 0.9  $\mu$ L de agua libre de RNasa y 1  $\mu$ L de *DNase I Buffer* (Roche) y se introdujeron en un termociclador donde en un primer momento se alcanzó la temperatura de 37°C durante 15 minutos y después 75°C durante 10 minutos.

Para realizar la retrotranscripción, las muestras de RNA se diluyeron con agua libre de RNasa para tener la misma concentración en todas. Una vez tuvimos las muestras a la concentración deseada, se utilizó SuperScript™ II RT (Invitrogen) para sintetizar la primera cadena de cDNA a partir del RNA. Para ello, se empleó para cada muestra 1  $\mu$ L de 50-250 ng random primers, 1  $\mu$ L de dNTPs Mix 10 mM (Roche) y 10  $\mu$ L de RNA muestra que se incubaron a durante 5 minutos a una temperatura de 65°C, y después, se añadió 4  $\mu$ L de 5x First-strand Buffer, 2  $\mu$ L de DTT 0,1

M, 1.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y 0.5  $\mu\text{L}$  de la transcriptasa SuperScript™ II RT, y se introdujo en el termociclador en el que se alcanzó la temperatura de 25°C durante 10 minutos, 42°C durante 50 minutos y por último, 70°C durante 15 minutos.

## 2.5. qRT-PCR

Para analizar el grado de inclusión del exón 7 debido a las distintas concentraciones de moxifloxacino se realizó una qRT-PCR con sondas TaqMan, con la que se pudo detectar la cantidad de productos generados en cada ciclo.

Se realizaron 2 qRT-PCR mediante los cuales se observaron por un lado, la proporción de transcritos que presentaban el exón 7 (FL) y la proporción de transcritos que no presentaban el exón 7 ( $\Delta 7$ ). Para normalizar los resultados obtenidos de cada qRT-PCR se empleó GAPDH.

Al tratarse de reacciones distintas se emplean distintas mezclas de cebadores en cada reacción. En la reacción para cuantificar FL se empleó un mix (Mix FL) formado por: el *SMN2 FL Forward Primer* 5  $\mu\text{M}$ , el *SMN2 FL Reverse Primer* 5  $\mu\text{M}$  y el *SMN2 Forward sonda* 5  $\mu\text{M}$ . En la reacción para cuantificar  $\Delta 7$  se empleó un mix (Mix  $\Delta 7$ ) formado por: el *SMN2  $\Delta 7$  Forward Primer* 5  $\mu\text{M}$ , el *SMN2 FL Reverse Primer* 5  $\mu\text{M}$  y el *SMN2 Forward sonda* 5  $\mu\text{M}$ . Y por último, en la reacción para cuantificar GAPDH se empleó un mix (Mix GAPDH) formado por: el *hGAPDH Forward Primer* 3  $\mu\text{M}$ , el *hGAPDH Reverse Primer* 3  $\mu\text{M}$  y el *hGAPDH Forward Sonda* 5  $\mu\text{M}$  (Tabla 1).

Para realizar la qRT-PCR, se realizó un primer paso en el que las muestras fueron diluidas en una proporción 1:20, y se añadieron a una placa de 384 pocillos 3  $\mu\text{L}$  de cDNA junto con 7  $\mu\text{L}$  de un mix formado por: 2  $\mu\text{L}$  de PCR Mix 5X (Solis BioDyne), 0.5  $\mu\text{L}$  de Mix FL,  $\Delta 7$  o GAPDH (dependiendo de la reacción que se esté llevando a cabo) y 4  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Se incluyó un control negativo, en el que en vez de cDNA se añadieron 3  $\mu\text{L}$  de agua, para ver que no había contaminación. En la qRT-PCR se realizó un primer ciclo de 95°C durante 15 minutos, tras esto, se realizaron 40 ciclos formados por una primera fase de 95°C durante 15 segundos, seguido de una segunda fase a 60°C durante un minuto. Se realizó con una temperatura de anillamiento de 60°C.

**Tabla 2.1.** Listado de cebadores y sondas empleados para la amplificación de los transcritos de SMN: SMN2 FL (incluye exón 7) y SMN2Δ7 (no incluye exón 7). En las sondas, 6 FAM/VIC es un fluoróforo y TAMRA es el quencher.

Primer/Sonda	Secuencia	Exón/Uniones de exones
SMN2 FL Forward Primer	GCTCACATTCCTTAAATTAAGGAGAAA	Exón 7 – Exón 8
SMN2Δ7 Forward Primer	TGGCTATCATACTGGCTATTATATGGAA	Exón 6 – Exón 8
SMN2 Reverse Primer	TCCAGATCTGTCTGATCGTTTCTT	Exón 8
SMN2 Forward Sonda	6FAM- CTGGCATAGAGCAGCACTAAATGACACCAC -TAMRA	Exón 8
hGAPDH Forward Primer	CAACGGATTTGGTCGTATTGG	Exón 2- Exón 3
hGAPDH Reverse Primer	TAGATGGCAATATCCACTTTACC	Exón 3
hGAPDH Forward Sonda	VIC- CGCCTGGTCACCAGGGCTGCT - TAMRA	Exón 3

Una vez obtenidos los resultados de la proporción de los transcritos FL, Δ7 y GAPDH, se empleó el método de análisis  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

## 2.6. Extracción de proteína

Para cuantificar la variación en los niveles de proteína debido al efecto de moxifloxacino, se extrajeron las proteínas de los mioblastos tratados con el compuesto.

Para ello, la extracción de proteínas se realizó a partir de los cultivos cuando se había alcanzado en las placas una confluencia del 80%. El primer paso para la extracción fue quitar el medio de las placas mediante una bomba de vacío, se lavaron con PBS 1x, y después se añadió 300 μL del tampón de extracción RIPA (ThermoScientific) al que se le adicionó un coctel inhibidor de proteasas (cOmplete, Roche), se recogieron las células, con la ayuda de un raspador de células. Después, se centrifugó durante 20 minutos a 15,000 g, a una temperatura de 4°C.

Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante, ya que es donde se encuentran las proteínas, y se transfirieron a un nuevo tubo. La cantidad de proteína se cuantificó mediante BSA Protein Assay (Pierce) siguiendo el protocolo del fabricante.

## 2.7. Western blot

Para el western blot se emplearon 10 µg de proteína extraída de los cultivos celulares tratados con las diferentes concentraciones de moxifloxacino, se añadieron 7 µL del tampón de carga al 6x y se alcanzó un volumen final de 38 µL con agua Milli-Q. Después, los tubos se sellaron con Parafilm y las proteínas se desnaturalizaron en agua en ebullición durante unos 5 minutos, tras esto, se transfirieron rápidamente a hielo.

Las proteínas se separaron mediante una electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida SDS-PAGE con el sistema de electroforesis Mini-protean (Bio-Rad) en un tampón de electroforesis formado por 27 mM de Tris, 200 mM de glicina y 0.1% de SDS, a un amperaje de 12 mA. También se empleó como marcador molecular el Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad).

El gel empleado para la electroforesis estaba formado por un gel de concentración y un gel de resolución. El gel de concentración estaba formado por: 0.13 M Tris-HCl pH 6.8, un 5% de acrilamida/bisacrilamida (5:1), 0.5% de SDS, 0.1% de APS y 0.1% de TEMED. El gel de resolución estaba formado por: 0.39 M Tris-HCl pH 8.8, un 12% de acrilamida/bisacrilamida (5:1), 0.1% de SDS, 0.1% de APS y 0.04% de TEMED.

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) mediante el sistema de electrotransferencia semiseco (Bio-Rad), este proceso se realizó a un voltaje de 15 voltios durante 30 min, siguiendo el protocolo del fabricante. Las membranas y los filtros de papel empleado fueron previamente humedecidos con un tampón de transferencia compuesto por: 48 mM Tris, 39 mM glicina, 0.025% de SDS y 20% metanol. Las membranas se tiñeron con el colorante Ponceau (0.5% Ponceau y 1% ácido acético) durante menos de 1 minuto para confirmar que las proteínas se habían transferido correctamente. Después, la membranas se lavaron con agua hasta que se eliminó el colorante sobrante y posteriormente, se bloquearon con una solución de bloqueo formado por PBS-T (PBS 1x y 0.1% Tween 20) con un 5% de leche desnatada en polvo, que estuvo en agitación durante al menos 1 hora a temperatura ambiente.

Una vez realizado el bloqueo de la membrana, esta se incubó con el anticuerpo primario SMN (ratón anti-SMN, BD Bioscience; 610646) a una dilución 1:500, disueltos en la solución de bloqueo durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Tras la incubación, la membrana se lavó con PBS 1x, tres veces durante 5 minutos en agitación, y después se incubó con el anticuerpo secundario Anti-ratón IgG peroxidasa conjugados con HRP, durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Una vez acabada la incubación, la membrana se lavó otra vez con PBS 1x, tres veces durante 5 minutos en agitación, y después se detectó la quimioluminiscencia con SuperSignal West Pico PLUS (Pierce) siguiendo el protocolo del fabricante.

Para la posterior normalización se empleó como control del carga GAPDH. Una vez se detectó la proteína SMN, se eliminaron los anticuerpos de la membrana para poder usarla de nuevo para detectar otras proteínas. El proceso de eliminación de estos anticuerpos se realizó lavando la membrana durante 5 minutos con agua destilada, 5 minutos con NaOH 0.2 N y por último, otros 5 minutos con agua destilada.

Cuando los anticuerpos fueron eliminados, la membrana se volvió a bloquear de la manera explicada anteriormente, y se volvió a realizar el protocolo de inmunodetección, pero esta vez empleando el anticuerpo primario anti-GAPDH (G-9) HRP de ratón monoclonal IgG-1 (Santa Cruz Biotechnology). Las imágenes con los resultados de la quimioluminiscencia se recogieron con ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

## **2.8. Jess Simple Western**

Para el análisis de los niveles de la proteína SMN en células AME se empleó también la técnica Jess Simple Western, un sistema alternativo al western blot tradicional en el que se automatizan todos los pasos desde la separación de proteína, el inmunosondeo, la detección y el análisis de datos.

La separación de las proteínas se realizó durante 25 minutos a 375 voltios en un sistema capilar (un capilar por muestra) en el que se realizan de forma automática todos los pasos de la técnica. A continuación, la proteína total se biotinizó durante 30 minutos y se incubó con una solución bloqueadora (diluyente de anticuerpos) durante 5 minutos. Las muestras se incubaron con el anticuerpo SMN (anti-SMN de ratón, BD Bioscience 610646) a una dilución 1:50, durante 30 minutos, y con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) durante otros 30 minutos. Posteriormente, los capilares se lavaron con la solución RePlex™ durante 30 minutos y se incubaron con la solución de Total Protein Streptavidin-HRP para detectar la señal de quimioluminiscencia. Todos los anticuerpos y soluciones secundarias fueron proporcionados por Bio-technie y se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se analizaron y presentaron mediante el software Compass para SW, un software de control y análisis para datos de Simple Western.

## **2.9. Colocalización de la proteína SMN y coilina**

Para la detección de la proteína SMN y su colocalización con la proteína coilina en mioblastos de pacientes mediante inmunofluorescencia, se emplearon cultivos de mioblastos en placas de 24 pocillos tratadas previamente con colágeno y con cubres donde se fijaron las células para su posterior observación en el microscopio confocal. Se emplearon tres placas distintas en las que los mioblastos se cultivaron durante 2, 4 y 6 días con células control tratadas con DMSO y células AME tratadas con DMSO, risdiplam y moxifloxacino a una concentración de 500 mM.

Cuando las placas llevaban en cultivo 2, 4 y 6 días se procedió a fijar las células, para ello, se añadió PFA (Sigma Aldrich), en una relación 1:1 con el medio presente en el pocillo, y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, posteriormente, se eliminó el contenido de los pocillos y se realizaron tres lavados con PBS 1x, y por último, se añadió PBS 1x cubriendo toda la superficie del pocillo y se guardaron en la nevera a 4°C.

Una vez fijadas las células tanto del día 2, 4 y 6, se eliminó el PBS 1x, con el que se guardaron las placas, haciendo uso de la pipeta para no romper las células, y se añadió 250 µL de PBS-T (PBS 1x + 0.3% del detergente Triton (Sigma Aldrich)) y se incubó durante 30 minutos.

Posteriormente, se eliminó el medio y se añadió la solución de bloqueo (PBS-T + 4% de suero normal de cabra, NGT) y se incubó durante 1 hora. Tras esto, se eliminó la solución de bloqueo y se añadió en los pocillos una mezcla formada por la solución de bloqueo junto con los distintos anticuerpos disueltos, el anticuerpo SMN (anti-SMN de ratón, ref. MABE230 (Merck Millipore)), en una dilución 1:200, y el anticuerpo coilina (GENOCHEM, ref PA5 66995) 1:400, y se dejó incubando en la nevera a 4°C durante toda la noche.

Tras la incubación con los anticuerpos, se realizaron tres lavados con PBS-T durante 5 minutos y, posteriormente, se añadieron 250 µL de una mezcla de la solución de bloqueo con el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con rodamina, que se une a la proteína SMN, en una dilución 1:400, y con el anticuerpo anti-conejo FITC, que se une a la proteína coilina, en una dilución 1:400, y se incubó durante 1 hora, sin luz a temperatura ambiente.

Por último, tras la incubación, con la ayuda de unas pinzas se pusieron los cubres, con las células fijadas, en los portaobjetos a lo que previamente se les había añadido 10 µL de DAPI. Una vez los cubres se encontraban en los portaobjetos, las células se pudieron observar, haciendo uso de la inmunofluorescencia, gracias al microscopio confocal con el que se observaron los núcleos de las células, la proteína SMN y la proteína coilina, permitiendo ver si ambas proteínas colocalizaban. Las imágenes del microscopio confocal fueron obtenidas gracias al software ZEN.

## **2.10. Análisis estadístico**

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos durante el estudio se empleó el programa GraphPad Prism 7 v.7.0.0. En los distintos ensayos se emplearon tres réplicas de cada condición celular para obtener una estimación del error experimental.

Para los análisis de la expresión del gen *SMN2* se realizó la prueba estadística One-way ANOVA ordinaria, sin emparejamiento de muestras, ya que cada muestra es independiente, y se asumió normalidad en las muestras, ya que se realizó de forma previa el test Shapiro-Wilk test para saber si podíamos asumir normalidad. Mediante esta prueba estadística que se analizó las diferencias entre las distintas condiciones celulares y los mioblastos AME tratados con DMSO tanto de los niveles de transcritos de longitud completa que incluían el exón 7, como los niveles de transcritos que excluían el exón 7 por separado.

Para los análisis de los niveles de proteína SMN se realizó, tanto en los datos obtenidos mediante western blot como en los obtenidos mediante Jess Simple Western, la prueba estadística One-way ANOVA ordinaria, sin emparejamiento de muestras, ya que cada muestra es independiente, y se asumió normalidad en las muestras, ya que se realizó de forma previa el test Shapiro-Wilk test para saber si podíamos asumir normalidad.

Para el análisis del índice de fusión se realizó la prueba estadística T-test no paramétrico sin emparejamiento de muestras, ya que no tenemos datos para asumir normalidad en los datos y se comparan réplicas biológicas. Concretamente se realizó la prueba estadística Mann-Whitney para ver las diferencia entre las células control tratadas con DMSO y, las células AME tratadas con risdiplam y moxifloxacino 500 mM, frente a las células AME tratadas con DMSO.

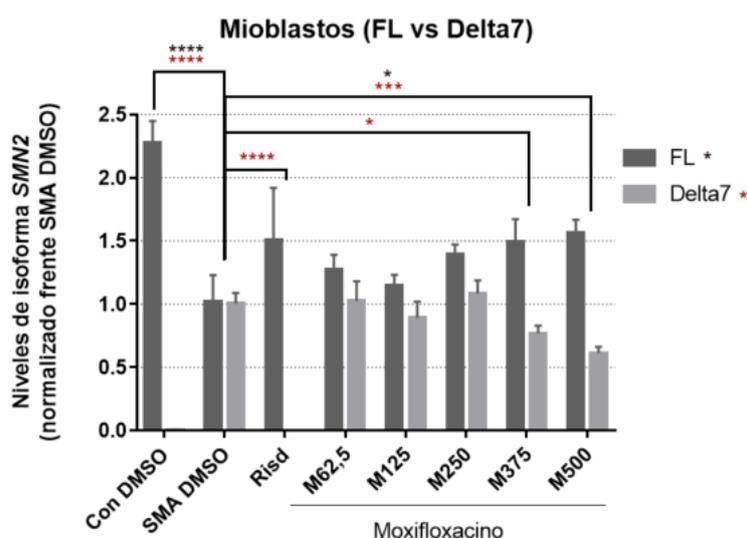
### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Análisis de expresión de los transcritos del gen *SMN2*

En este ensayo se ha estudiado el efecto de moxifloxacino en mioblastos de pacientes, ya que previamente se observó que en fibroblastos producía un aumento de la inclusión del exón 7 en los transcritos del gen *SMN2* (Konieczny & Artero, 2020).

Se observó que moxifloxacino producía un aumento de los transcritos del gen *SMN2* de longitud completa en los mioblastos de pacientes, con una diferencia significativa entre la expresión de las células AME tratadas con DMSO y las células control tratadas con DMSO y con las células AME tratadas con moxifloxacino 500 mM. Risdiplam, a pesar de ser un control positivo, no presenta una diferencia significativa frente a las células AME tratadas con DMSO, puede deberse a que las muestras presentan mucha variabilidad (Figura 3.1).

También se observó una disminución en los transcritos del gen *SMN2* que no incluían el exón 7, con diferencias significativas entre las células AME tratadas con DMSO frente a las células control tratadas con DMSO, las células AME tratadas con risdiplam, y las células AME tratadas con moxifloxacino 500 mM y 375 mM.



**Figura 3.1.** Niveles de expresión de los transcritos del gen *SMN2* de longitud completa (FL) y del gen *SMN2* en el que se excluye el exón 7 (Delta7) en las distintas condiciones celulares, normalizados frente los mioblastos AME con DMSO (AME DMSO), en mioblastos control DMSO (Con DMSO), mioblastos AME tratados con risdiplam (Risid) y mioblastos tratados con moxifloxacino a una concentración de 62,5 mM (M62,5), 125 mM (M125), 250 mM (M250), 375 mM (M375) y 500 mM (M500). Se realizó el test estadístico 2-way ANOVA para las distintas condiciones frente AME DMSO de FL (\*) y Delta7 (\*) en el que el valor de p es: \*\*\*\*<0,05 / \*\*\*<0,01 / \*\*<0,001 / \*<0,0001, cuando hay diferencias significativas.

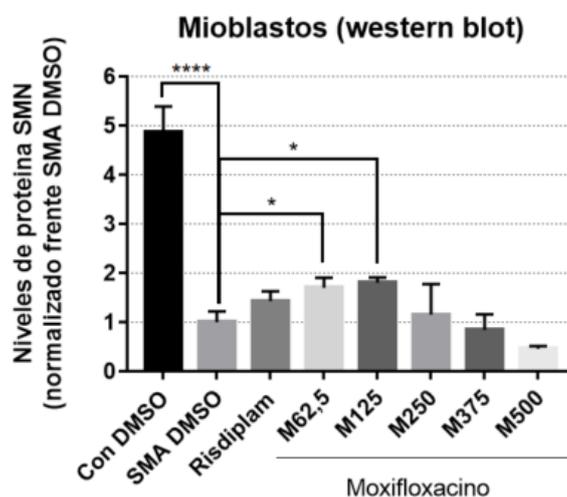
Encontramos una tendencia clara, en la que conforme aumenta la concentración de moxifloxacino se produce un aumento en los transcritos del gen *SMN2* de longitud completa, resultado esperado tras lo observado en fibroblastos previamente (Konieczny & Artero, 2020).

Una posible explicación a los resultados obtenidos podría ser que moxifloxacino afecta a la topoisomerasa II, inhibiéndola, lo que afecta a la expresión de algunos genes (Konieczny & Artero, 2020). De esta forma, podría generar un aumento en la expresión de factores de splicing que aumentan la inclusión del exón 7 en *SMN2*.

### 3.2. Análisis de los niveles de proteína SMN

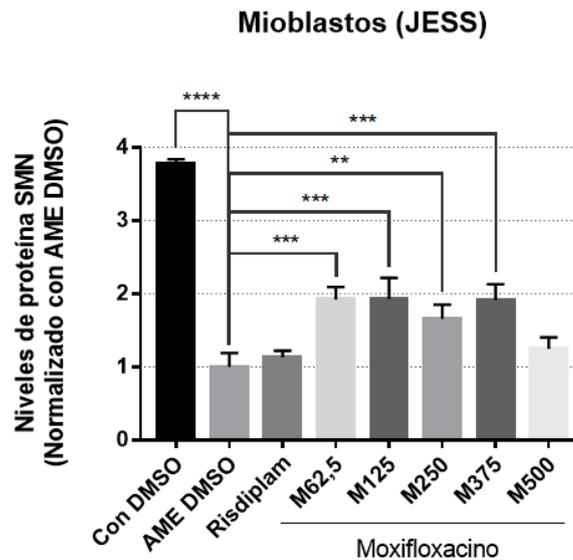
También en este ensayo se ha estudiado el efecto de moxifloxacino en los niveles de proteína SMN en células de mioblastos de pacientes, ya que, previamente se observó que en fibroblastos de pacientes se producía un aumento de la proteína, resultado esperado ya que el compuesto producía un aumento en la inclusión del exón 7 en los transcritos del gen *SMN2* (Konieczny & Artero, 2020).

En un primer momento, se estudiaron los niveles de SMN mediante western blot, normalizados con los niveles de GAPDH (Figura 3.2), en los que se vio que existía un aumento significativo en los niveles de proteína de los mioblastos control tratados con DMSO y los mioblastos AME tratados con moxifloxacino 125 mM y 62,5 mM frente a los mioblastos AME tratados con DMSO. También se observó que no había diferencias significativas entre los mioblastos AME tratados con DMSO y las células AME tratadas con risdiplam y moxifloxacino 250 mM, 375 mM y 500 mM, aun así, se puede observar un comportamiento en forma de campana con un óptimo a una concentración cercana a moxifloxacino 125 mM, y un menor efecto a menores y mayores que el óptimo.



**Figura 3.2.** Niveles de proteína SMN analizadas mediante western blot, normalizado con GAPDH, las distintas condiciones celulares: mioblastos AME tratados con DMSO (AME DMSO), mioblastos control tratados con DMSO (Con DMSO), mioblastos AME tratados con risdiplam (Risdi) y mioblastos AME tratados con moxifloxacino a una concentración de 62,5 mM (M62,5), 125 mM (M125), 250 mM (M250), 375 mM (M375) y 500 mM (M500). Los resultados se normalizaron frente a los mioblastos AME tratados con DMSO. Se realizó el test estadístico 1-way ANOVA ordinario para las distintas condiciones frente AME DMSO en el que el valor de p es: \*\*\*\*<0,05 / \*\*\*<0,01 / \*\*<0,001 / \*<0,0001, cuando hay diferencias significativas.

Para confirmar los resultados obtenidos mediante western blot, también se estudiaron los niveles proteína SMN mediante la técnica Jess Simple Western, normalizados con los niveles de proteína total (Figura 3.3). Mediante esta técnica se obtuvieron resultados un poco diferentes con respecto a los obtenidos por western blot. En ella se vieron diferencias significativas, en las que aumentaban los niveles de proteína SMN, en mioblastos control tratados con DMSO y en los mioblastos AME tratados con moxifloxacino 375 mM, 250 mM, 125 mM y 62,5 mM, frente a los mioblastos AME tratados con DMSO.



**Figura 3.3.** Niveles de proteína SMN analizadas mediante Jess Simple Western, normalizado frente a los niveles totales de proteína, las distintas condiciones celulares: mioblastos AME tratados con DMSO (AME DMSO), mioblastos control tratados con DMSO (Con DMSO), mioblastos AME tratados con risdiplam (Risdi) y mioblastos AME tratados con moxifloxacino a una concentración de 62,5 mM (M62,5), 125 mM (M125), 250 mM (M250), 375 mM (M375) y 500 mM (M500). Los resultados se normalizaron frente a los mioblastos AME tratados con DMSO. Se realizó el test estadístico 1-way ANOVA ordinario para las distintas condiciones frente AME DMSO en el que el valor de p es: \*\*\*\*<0,05 / \*\*\*<0,01 / \*\*<0,001 / \*<0,0001, cuando hay diferencias significativas.

Los resultados obtenidos mediante ambas técnicas son un poco diferentes entre sí, esto puede deberse a que se trata de técnicas que son distintas en muchos aspectos, aunque ambas sirvan para cuantificar los niveles de proteína.

El western blot es una técnica en la que se emplea una mayor cantidad de muestra, se normaliza frente a una proteína endógena, el GAPDH, y presenta muchos pasos en los que puede haber errores durante la manipulación y en los que se asume que todo ha ocurrido de forma correcta durante el procedimiento, como por ejemplo, que la transferencia haya sido igual de eficiente en todos los puntos entre el gel y la membrana.

Por otro lado, el Jess Simple Western es una técnica en la que se emplea una menor cantidad de muestra, se normaliza frente a los niveles de proteína total, que es más fiable que la normalización frente a una proteína endógena, y tiene lugar una inmunodetección directa, sin transferencia.

Como se ha comentado anteriormente, mediante western blot, se ve un comportamiento en forma de campana donde la concentración óptima de moxifloxacino, para el tratamiento de los mioblastos AME, está entre 125 mM y 62,5 mM, con un aumento significativo en los niveles de proteínas en el tratamiento con ambas concentraciones de moxifloxacino. Como en cualquier fármaco, se ve un efecto menor en los niveles de proteína SMN a concentraciones mayores y menores a las óptimas, esto podría deberse a un efecto tóxico del compuesto, ya que, aunque previamente se ha visto que moxifloxacino no produce toxicidad celular a una concentración de 500 mM en fibroblastos de pacientes (Konieczny & Artero, 2020), al tratarse de un tipo celular distinto, podría estar afectando a nuestra proteína de interés o podría deberse a un efecto de inespecificidad. Mediante la técnica Jess Western Blot vemos un aumento significativo de proteína SMN en los mioblastos AME tratados con moxifloxacino 375 mM, 250 mM, 125 mM y 62,5 mM, aunque, mediante el tratamiento con moxifloxacino 500 mM se puede ver un menor efecto en los niveles de proteína, ya que se observa menor cantidad de proteína con respecto a las obtenidas con las demás concentraciones, lo que podría deberse a la toxicidad mencionada anteriormente.

Risdiplam no ha presentado un aumento significativo de la proteína SMN, a pesar de ser un control positivo. Esto puede deberse a que se trata de un control positivo en fibroblastos y no se había empleado antes en este tipo celular, por lo que, al tratarse de tipos celulares diferentes, este compuesto podría actuar de forma distinta y no producir ese aumento en los niveles de la proteína SMN que produce en los fibroblastos AME de pacientes (Konieczny & Artero, 2020).

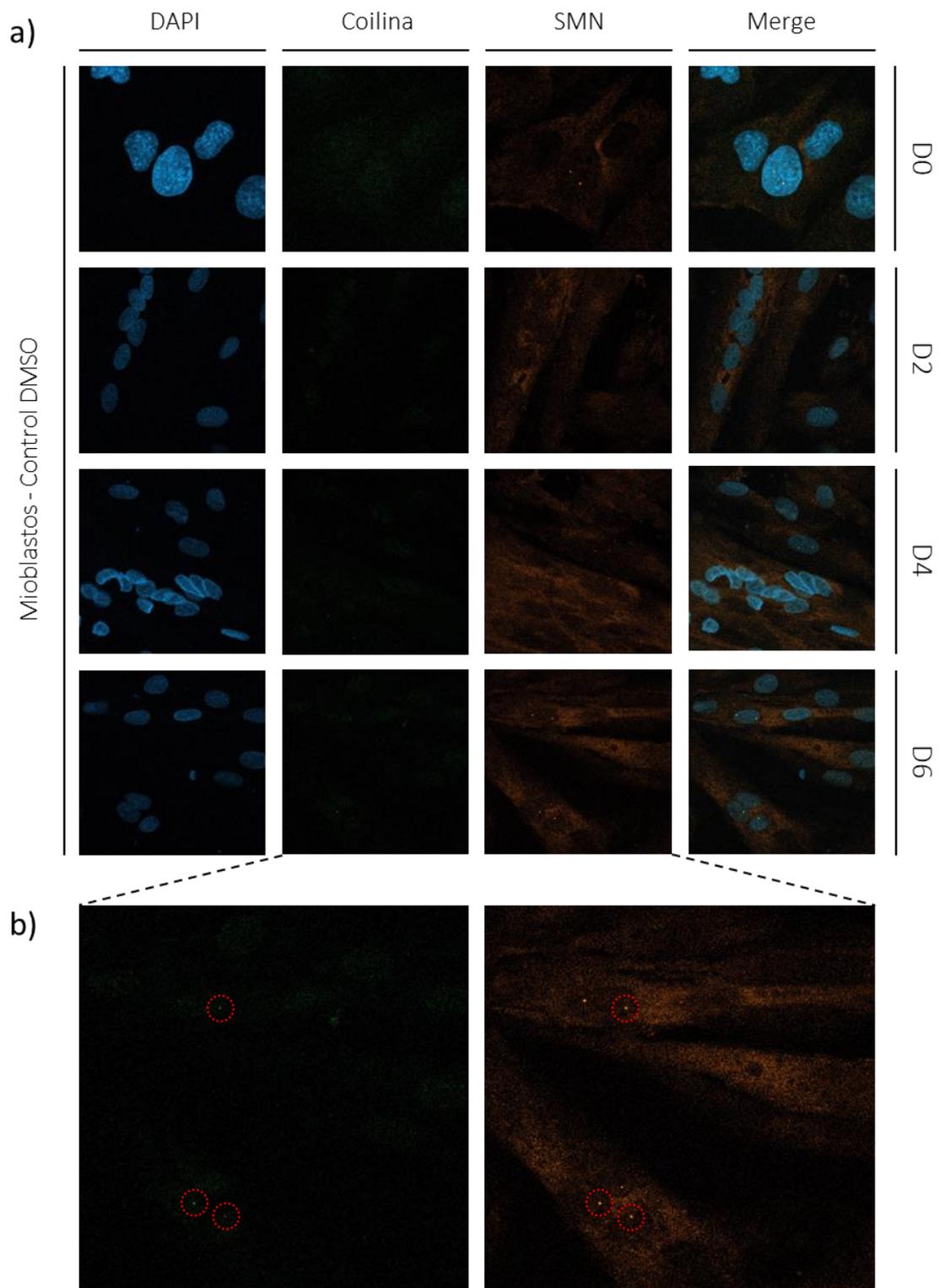
### **3.3. Colocalización de la proteína SMN y coilina**

Para ver si el tratamiento produce un aumento en la formación de gemas, sitio nuclear de acumulación de la proteína SMN, y una mejora en la diferenciación celular en los mioblastos de pacientes, se empleó el microscopio confocal mediante el cual se estudió la colocalización de la proteína SMN y coilina haciendo uso de la inmunofluorescencia, ya que, la colocalización de las gemas con los cuerpos de Cajal, donde se acumula la proteína coilina, es un indicador del buen funcionamiento de la proteína SMN.

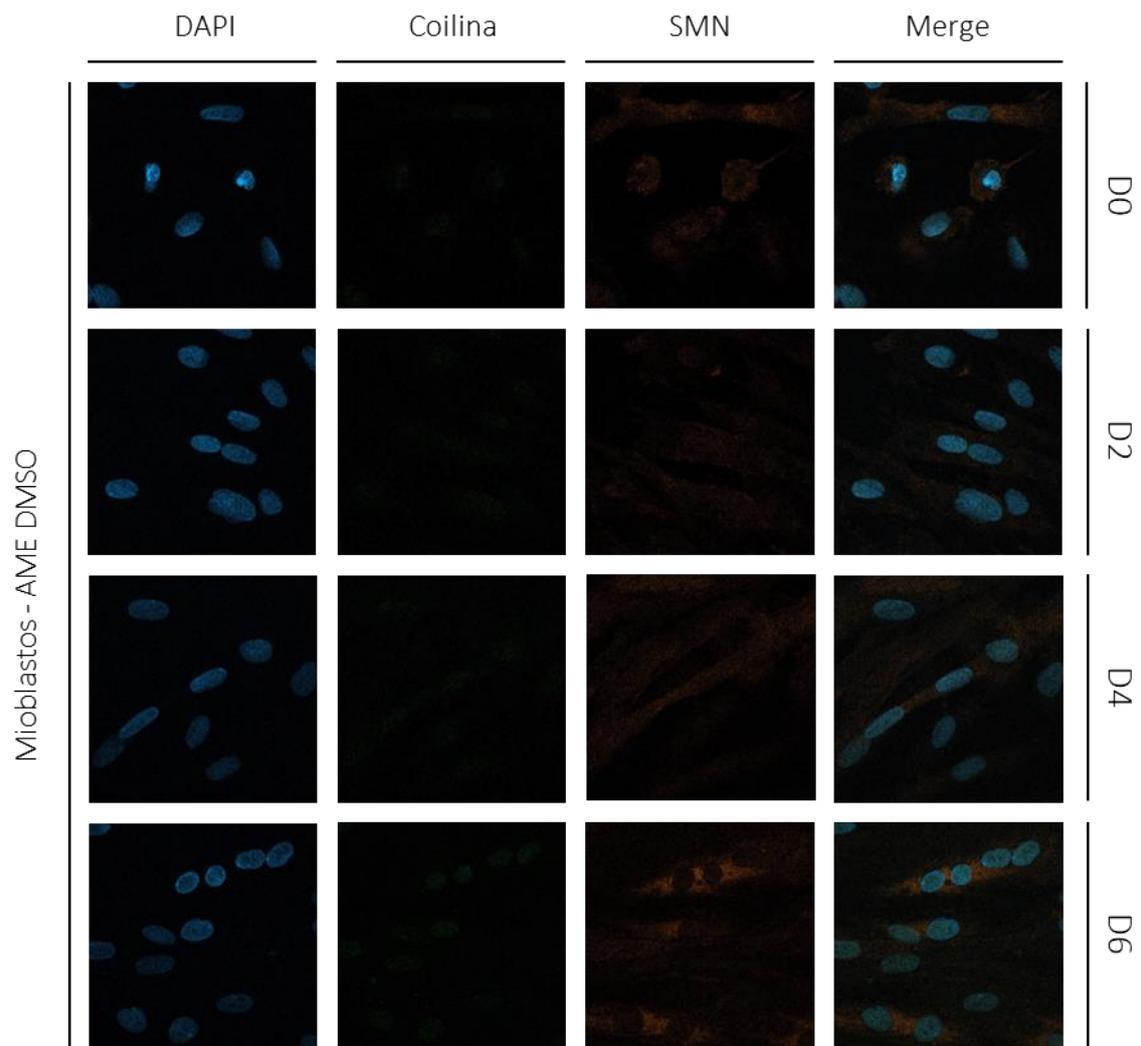
Mediante el protocolo empleado para la colocalización de la proteína SMN y coilina, hemos sido capaces de detectar las gemas en los mioblastos control DMSO (Figura 3.4 b)).

En las imágenes obtenidas mediante el microscopio confocal, se han podido observar 63 células control tratadas con DMSO en las cuales se han podido observar 10 gemas, por lo que el porcentaje de gemas obtenido fue de 15,87%, aunque se trata de un porcentaje orientativo debido al bajo número de células observadas y que no hay precedentes sobre el rango normal de gemas en mioblastos, ya que no se ha descrito previamente en la literatura científica. Por lo tanto, con la información obtenida podemos concluir que mediante este método somos capaces de observar las gemas que colocalizan con los cuerpos de Cajal (Figura 3.4).

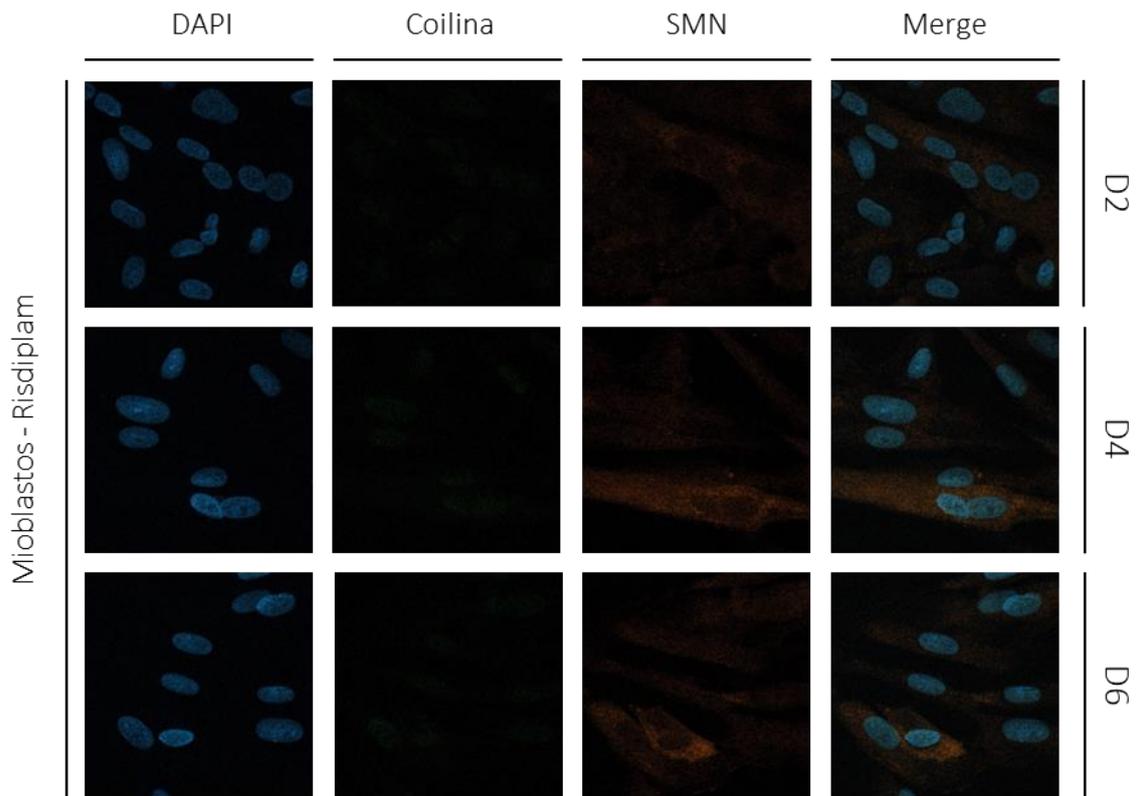
Tras esto, se intentó detectar gemas en células AME tratadas con DMSO, para ello, se observaron 73 células AME tratadas con DMSO en las cuales no se detectaron gemas, el porcentaje de gemas es 0%, por lo que existe margen de mejora (Figura 3.5). Por ello, se realizó el mismo procedimiento con las células AME tratadas con risdiplam (Figura 3.6) y moxifloxacino 500 mM (Figura 3.7), para ver si se mejoraba la formación de gemas en células AME a lo largo de la diferenciación celular, a día 2, 4 y 6, pero no se detectaron gemas en ninguna de las dos condiciones, por lo que no se obtuvo una mejora en la formación de gemas. Debido a lo visto anteriormente mediante la técnica Jess Simple Western, el tratamiento de mioblastos AME con moxifloxacino 500 mM tiene un efecto menor en el aumento de los niveles de proteína SMN, con respecto a el tratamiento a concentraciones menores, en los que se obtienen niveles de proteína mayores, por ello, es posible que a una concentración menor se pueda obtener una mejora en la formación de gemas.



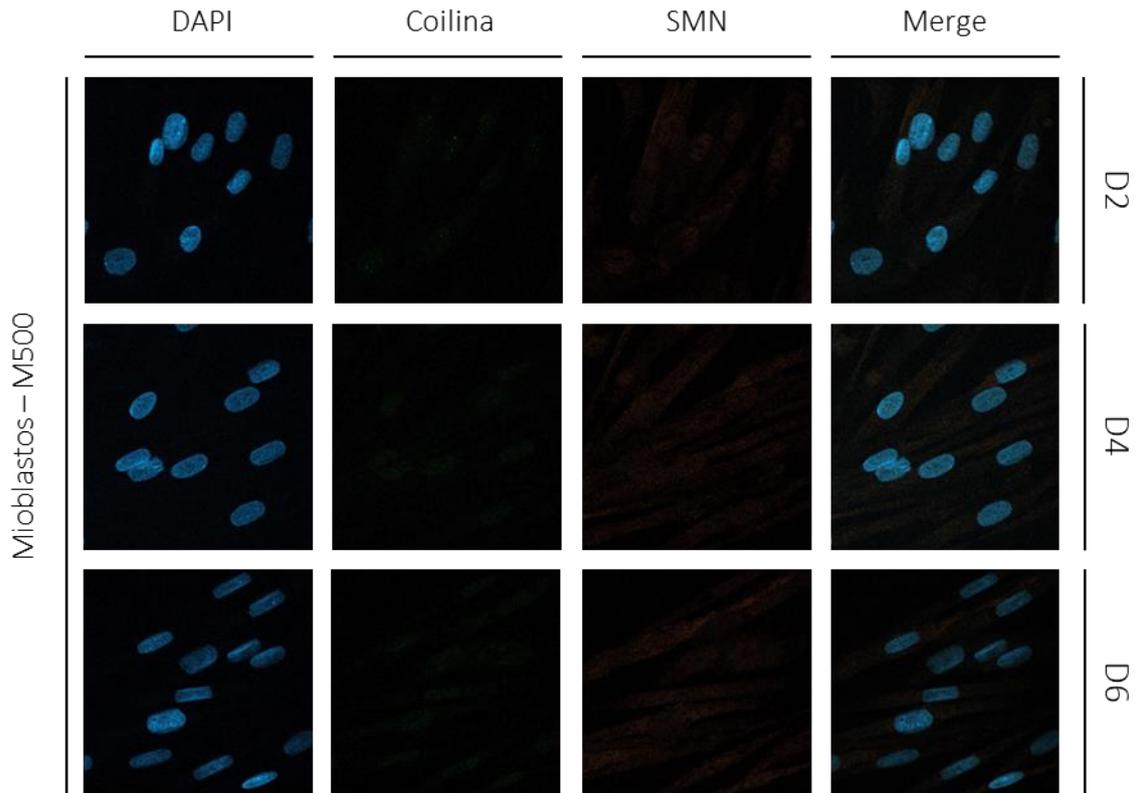
**Figura 3.4.** a) Detección de la proteína SMN y coilina mediante inmunofluorescencia en mioblastos control con DMSO a día 0 (D0), 2 (D2), 4 (D4) y 6 (D6). Se presenta el canal DAPI (núcleo celular), SMN, Coilina y Merge (los tres canales anteriores superpuestos). b) Zoom de coilina y SMN del día 6 donde se puede observar rodeadas en rojo la colocalización de ambas proteínas.



**Figura 3.5.** Detección de la proteína SMN y coilina mediante inmunofluorescencia en mioblastos de pacientes AME con DMSO a día 0 (D0), 2 (D2), 4 (D4) y 6 (D6). Se presenta el canal DAPI (núcleo celular), SMN, Coilina y Merge (los tres canales anteriores superpuestos). Esto permite observar la colocalización de la proteína SMN y coilina, y la fusión celular de los mioblastos durante la diferenciación.



**Figura 3.6.** Detección de la proteína SMN y coilina mediante inmunofluorescencia en mioblastos de pacientes AME tratados con risdiplam a día 2 (D2), 4 (D4) y 6 (D6). Se presenta el canal DAPI (núcleo celular), SMN, Coilina y Merge (los tres canales anteriores superpuestos). Esto permite observar la colocalización de la proteína SMN y coilina, y la fusión celular de los mioblastos durante la diferenciación.

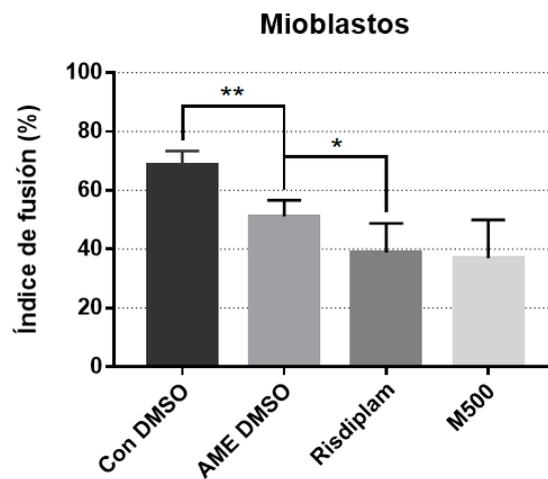


**Figura 3.7.** Detección de la proteína SMN y coilina mediante inmunofluorescencia en mioblastos de pacientes AME tratados con moxifloxacino 500 mM (M500) a día 2 (D2), 4 (D4) y 6 (D6). Se presenta el canal DAPI (núcleo celular), SMN, Coilina y Merge (los tres canales anteriores superpuestos). Esto permite observar la colocalización de la proteína SMN y coilina, y la fusión celular de los mioblastos durante la diferenciación.

También se estudió si el tratamiento de las células AME producían una mejora en la diferenciación celular. Para ello, lo primero fue ver si existía una diferencia significativa en el índice de fusión, de los cultivos celulares de 6 días, entre células control tratadas con DMSO y células AME tratadas DMSO. Se observaron 194 células control tratadas con DMSO que presentaban un índice de fusión del 68,56% y 225 células AME tratadas con DMSO con un índice de fusión de 51,79% (Figura 3.8). Para ver si existía una diferencia significativa entre ambas condiciones se realizó un test estadístico, el T-test no paramétrico, y se obtuvo un valor de p de 0,0025 por lo que existe cierto margen de mejora.

Como se vio que había una diferencia significativa entre ambas condiciones, se estudió el índice de fusión, del día 6, de los cultivos de células AME tratadas con risdiplam y moxifloxacino a una concentración de 500 mM, para ver si se producía una mejora en la diferenciación celular. En las células tratadas con risdiplam se obtuvo un índice de fusión de 38,92%, y mediante el T-test no paramétrico se obtuvo un valor de p de 0,0350 comparándolo frente el índice de fusión de las células AME tratadas con DMSO y en las células tratadas con moxifloxacino se obtuvo un índice de fusión de 38,41%, que mediante el T-test no paramétrico se obtuvo un valor de p de 0,0734. Por lo que se vio que existía una diferencia significativa entre el índice de fusión de las células AME tratadas con DMSO y las células AME tratadas con risdiplam, pero no había diferencias

significativas entre las células AME tratadas con DMSO y las células AME tratadas con moxifloxacino, aun así, con ninguno de los tratamientos se vio una mejora en la diferenciación celular ya que se obtuvo un índice de fusión menor en ambas condiciones (Figura 3.8). Aun así, es posible que mediante el tratamiento, de los mioblastos AME, con concentraciones de moxifloxacino menores a 500 mM se pueda obtener una mejora en la diferenciación celular, ya que, como se ha observado mediante el Jess Simple Western, el tratamiento con moxifloxacino 500 mM, tiene un efecto menor en el aumento de los niveles de proteína SMN con respecto a el tratamiento con moxifloxacino a concentraciones menores, en los que se obtienen niveles de proteína mayores.



**Figura 3.8.** Índice de fusión en mioblastos control DMSO, mioblastos de pacientes AME con DMSO y mioblastos de pacientes AME tratados con risdiplam y moxifloxacino a una concentración de 500 mM (M500) a día 6. Se realizó el test estadístico t-test, para las distintas condiciones de los mioblastos, en el que el valor de p es: \*\*\*\*<0,05 / \*\*\*<0,01 / \*\*<0,001 / \*<0,0001, cuando hay diferencias significativas.

#### 4. CONCLUSIONES

Sobre el estudio del efecto de moxifloxacino en la expresión y splicing del gen *SMN2* en mioblastos de pacientes AME tipo II sacamos las siguientes conclusiones:

- En cuanto a nivel de expresión del gen *SMN2*, se vio que el tratamiento con moxifloxacino conseguía aumentar la inclusión del exón 7, dando lugar a transcritos de longitud completa de *SMN2*.
- En cuanto a nivel de proteína SMN, se vio una tendencia a aumentar su concentración con el tratamiento a concentraciones bajas de moxifloxacino mediante la técnica western blot, que se confirmó mediante la técnica Jess Simple Western. También se observó que las dosis más altas de moxifloxacino podrían presentar un efecto tóxico o inespecífico, lo que hace que los niveles de proteína sean menores en comparación con los obtenidos con moxifloxacino a concentraciones más bajas.
- En cuanto a nivel de formación de gemas, hemos sido capaces de detectar las gemas en los mioblastos control tratadas con DMSO. No se vio una mejora en la formación de gemas entre los mioblastos AME tratados con DMSO y los mioblastos AME tratadas con risdiplam y moxifloxacino 500 mM.
- Por último, se vio que el tratamiento, de los mioblastos AME, con risdiplam y moxifloxacino 500 mM no produce una mejora en la diferenciación celular de los mioblastos de pacientes.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Aslesh, T., & Yokota, T. (2022). Restoring SMN Expression: An Overview of the Therapeutic Developments for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *Cells*, *11*(3), 417. <https://doi.org/10.3390/cells11030417>
- Barrett, D., Bilic, S., Chyung, Y., Cote, S. M., Iarrobino, R., Kacena, K., Kalra, A., Long, K., Nomikos, G., Place, A., Still, J. G., & Vrishabhendra, L. (2021). A Randomized Phase 1 Safety, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of the Novel Myostatin Inhibitor Apitegromab (SRK-015): A Potential Treatment for Spinal Muscular Atrophy. *Advances in Therapy*, *38*(6), 3203-3222. <https://doi.org/10.1007/s12325-021-01757-z>
- Burghes, A. H. M., & Beattie, C. E. (2009). Spinal muscular atrophy: Why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(8), 597-609. <https://doi.org/10.1038/nrn2670>
- Butchbach, M. E. R. (2016). Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00007>
- Butchbach, M. E. R. (2021). Genomic Variability in the Survival Motor Neuron Genes (SMN1 and SMN2): Implications for Spinal Muscular Atrophy Phenotype and Therapeutics Development. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(15), 7896. <https://doi.org/10.3390/ijms22157896>
- Butchbach, M. E. R., & Burghes, A. H. M. (2004). Perspectives on models of spinal muscular atrophy for drug discovery. *Drug Discovery Today: Disease Models*, *1*(2), 151-156. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2004.07.001>
- Cartegni, L., & Krainer, A. R. (2002). Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nature Genetics*, *30*(4), 377-384. <https://doi.org/10.1038/ng854>

- Cauchi, R. J. (2010). SMN and Gemins: 'We are family' ... or are we?: Insights into the partnership between Gemins and the spinal muscular atrophy disease protein SMN. *BioEssays*, 32(12), 1077-1089. <https://doi.org/10.1002/bies.201000088>
- Chang, W.-F., Xu, J., Chang, C.-C., Yang, S.-H., Li, H.-Y., Hsieh-Li, H. M., Tsai, M.-H., Wu, S.-C., Cheng, W. T. K., Liu, J.-L., & Sung, L.-Y. (2015). SMN is required for the maintenance of embryonic stem cells and neuronal differentiation in mice. *Brain Structure and Function*, 220(3), 1539-1553. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0743-7>
- D'Amico, A., Mercuri, E., Tiziano, F. D., & Bertini, E. (2011). Spinal muscular atrophy. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 6(1), 71. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-71>
- Gidaro, T., & Servais, L. (2019). Nusinersen treatment of spinal muscular atrophy: Current knowledge and existing gaps. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 61(1), 19-24. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14027>
- Jablonka, S., Hennlein, L., & Sendtner, M. (2022). Therapy development for spinal muscular atrophy: Perspectives for muscular dystrophies and neurodegenerative disorders. *Neurological Research and Practice*, 4(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s42466-021-00162-9>
- Kakazu, J., Walker, N. L., Babin, K. C., Trettin, K. A., Lee, C., Sutker, P. B., Kaye, A. M., & Kaye, A. D. (2021). Risdiplam for the Use of Spinal Muscular Atrophy. *Orthopedic Reviews*, 13(2). <https://doi.org/10.52965/001c.25579>
- Kariya, S., Park, G.-H., Maeno-Hikichi, Y., Leykekhman, O., Lutz, C., Arkovitz, M. S., Landmesser, L. T., & Monani, U. R. (2008). Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 17(16), 2552-2569. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn156>
- Konieczny, P., & Artero, R. (2020). *Drosophila* SMN2 minigene reporter model identifies moxifloxacin as a candidate therapy for SMA. *The FASEB Journal*, 34(2), 3021-3036. <https://doi.org/10.1096/fj.201802554RRR>

- Li, Q. (2020). Nusinersen as a Therapeutic Agent for Spinal Muscular Atrophy. *Yonsei Medical Journal*, 61(4), 273. <https://doi.org/10.3349/ymj.2020.61.4.273>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lorson, C. L., Hahnen, E., Androphy, E. J., & Wirth, B. (1999). A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6307-6311. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6307>
- Lunn, M. R., & Wang, C. H. (2008). Spinal muscular atrophy. *The Lancet*, 371(9630). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60921-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60921-6)
- Menduti, G., Rasà, D. M., Stanga, S., & Boido, M. (2020). Drug Screening and Drug Repositioning as Promising Therapeutic Approaches for Spinal Muscular Atrophy Treatment. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 592234. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.592234>
- Mercuri, E., Pera, M. C., Scoto, M., Finkel, R., & Muntoni, F. (2020). Spinal muscular atrophy—Insights and challenges in the treatment era. *Nature Reviews Neurology*, 16(12), 706-715. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00413-4>
- Naveed, A., & Calderon, H. (2021). Onasemnogene Apeparvovec (AVXS-101) for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*, 26(5), 437-444. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-26.5.437>
- Neil, E. E., & Bisaccia, E. K. (2019). Nusinersen: A Novel Antisense Oligonucleotide for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*, 24(3), 194-203. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-24.3.194>

Singh, R. N., Howell, M. D., Ottesen, E. W., & Singh, N. N. (2017). Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(3), 299-315. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.12.008>