

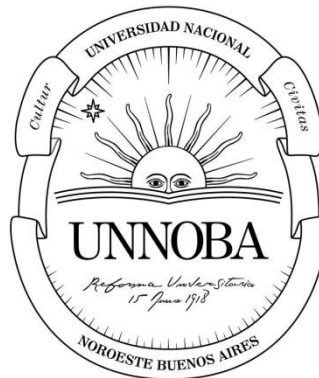
Trabajo final de grado

Drosophila melanogaster como modelo para el estudio de enfermedades cardiovasculares humanas.

Incidencia de la vía TOR y del efector eIF4E en la fisiopatología cardiovascular.

SANTALLA, MANUELA

Director: Dra. Paola Viviana Ferrero



Centro de Investigaciones Cardiovasculares- UNLP

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 2 de diciembre de 2013

Drosophila melanogaster como modelo para el estudio de enfermedades cardiovasculares humanas

Incidencia de la vía TOR y del efector eIF4E en la fisiopatología cardiovascular

Tesina del alumno

SANTALLA, MANUELA

Este trabajo ha sido presentado como requisito
para la obtención del título de:

LICENCIADO EN GENÉTICA

Carrera: Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 2 de diciembre de 2013

Agradecimientos.

En primer lugar, agradecer a la Dra. Paola Ferrero por aceptar dirigir este trabajo final de grado y ayudarme a dar los primeros pasos en el fantástico mundo de la ciencia.

A Ezequiel Harnichar, mi compañero de grupo, quien colabora de manera desinteresada con mi formación y acompaña en el trabajo diario.

A todo el grupo humano del Centro de Investigaciones Cardiovasculares de la Universidad Nacional de La Plata por su amabilidad, hospitalidad e integración al gran grupo de trabajo que conforman.

A la Ing. Susana Pistorale, por su incansable paciencia y excelente predisposición a colaborar, eliminar dudas y acompañar tanto en la realización de este trabajo como en el transcurso de la etapa regular de mi carrera.

A la Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires, mi hogar estos últimos años, de donde me llevo los mejores recuerdos y el más grato cariño.

A la familia Buratovich, por abrirme las puertas de su casa para que sea mi hogar y mi familia al final del camino.

Por último, pero no por ello menos importante, a mi familia y amigos, el gran pilar que me sostuvo y acompañó a crecer y caminar este nuevo camino que fue estudiar una carrera universitaria.

Este trabajo final está dedicado a Matías, por los juegos, paseos, vueltas en calesita, partidos de fútbol, veo-veo, escondidas y sonrisas que nos robó.

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires.**

Introducción

La importancia de *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio en investigaciones biomédicas

Desde las investigaciones del biólogo y premio Nobel de Medicina en 1933 Thomas Morgan, quien clarificó las leyes de la herencia mediante sus experimentos con *Drosophila melanogaster*, los trabajos con este modelo de estudio se han incrementado más allá de la genética.

Drosophila melanogaster se puede criar y manipular fácilmente en el laboratorio, presenta un corto ciclo de vida generacional y la extensión de vida del adulto es de 70-80 días. Su genoma está completamente secuenciado y existe gran homología entre sus genes y los de mamíferos. *Drosophila melanogaster* se ha utilizado como modelo para estudiar diversas enfermedades humanas. La posibilidad de generar innumerables moscas transgénicas hicieron factible el estudio de patologías como diabetes (Rulifson y col, 2002), cáncer (Bier, 2005) y enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Ambegaokar y col, 2010).

Más recientemente, *Drosophila melanogaster* ha cobrado importancia en el estudio de enfermedades cardiovasculares humanas. El transcriptoma y proteoma del corazón de *Drosophila melanogaster* han sido caracterizados (Zeitouni y col, 2007; Cammarato y col, 2011). Ahora es preciso identificar funciones de genes y proteínas, reconstruir vías de señalización, estudiar la regulación e interacciones de genes y correlacionar estos fenómenos con respuestas fisiopatológicas. Por ejemplo, la tabla muestra algunos mutantes generados en *Drosophila* que presentan una correspondencia con las afecciones cardiovasculares en humanos.

Modificación en <i>Drosophila</i>	Efecto Patología asociada	Referencia
Mutantes en proteínas estructurales como Tnl	Función sistólica y diastólica dañada que recapitulan el fenotipo clínico de la cardiomiopatía dilatada humana	(Wolf y col, 2006).

Kum ¹⁷⁰ y Kum ¹⁷⁵ : mutantes condicionales de SERCA (bomba Ca ²⁺ ATPasa)	Alteraciones del aumento transitorio de Ca ²⁺ en terminales nerviosas de larvas	(Sanyal y col, 2006).
KCNQ1: mutación en canal de potasio	Incremento de la incidencia de arritmias y muerte súbita	(Ocorr y col, 2007)
Silenciamiento/sobreex presión de presenilina, un gen asociado a enfermedad de Alzheimer	Alteración de la frecuencia cardíaca y de la expresión de proteínas responsables del manejo de Ca ²⁺ _i	(Li y col, 2011)
Mutaciones de miosina II	Fenotipo que se asemeja a cardiomiopatía dilatada	(Bloemink y col, 2011)

Características generales del organismo.

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo, perteneciente al orden díptera y a la familia drosophilidae. De hábitat cosmopolita, consume alimentos con alto contenido de ácido acético, como frutas en descomposición. Su ciclo de vida es relativamente corto (alrededor de 10 días a 25°C y 60 % humedad) e incluye cuatro fases: huevo, larva, pupa e imago o adulto. La duración del ciclo varía con la temperatura ambiente.

El organismo presenta metamorfosis completa. Las hembras adultas pueden poner huevos durante toda su vida. El desarrollo embrionario se produce dentro del huevo y dura aproximadamente 1 día a 25°C. La larva es blanca, segmentada y vermiforme. La región bucal comprende ganchos mandibulares de coloración negra que permiten introducir la región cefálica estrecha en el alimento, el cual es ingerido vorazmente. No tiene ojos ni apéndices, respira por tráqueas y posee un par de espiráculos visibles (poros aéreos) en los extremos anteriores y posteriores del cuerpo. Esta fase de desarrollo dura entre 3 y 5 días a 25°C y se subdivide en tres estadios. El primero y segundo de ellos terminan en mudas. Cada muda implica la eliminación completa de la piel y partes orales y es el mecanismo por medio del cual la larva crece. Inmediatamente antes de la pupación deja de comer, se arrastra hacia una superficie relativamente seca y sus espiráculos anteriores revierten. Durante la fase de pupa que dura alrededor de 4 a 5 días a 25°C, la mayoría de las estructuras larvarias son destruidas. El insecto empupa dentro de la última piel larvaria, que gradualmente se endurece y adquiere un color

más oscuro. La mosca adulta emerge o eclosiona del pupario forzando su salida por el extremo anterior. En un principio las alas están plegadas y los individuos son de color grisáceo. Se puede observar el meconio (restos de la última ingesta larval) en la región abdominal. Luego las alas se despliegan y el cuerpo se oscurece. Los adultos de *Drosophila melanogaster* pueden aparearse a partir de las 8 horas de emergidos. El promedio de supervivencia de una mosca adulta es de 70-80 días a 25°C. Un ciclo de vida de tales características, es particularmente ventajoso a la hora de trabajar con organismos vivos.

La figura 1 exhibe los distintos estadios de *Drosophila*.

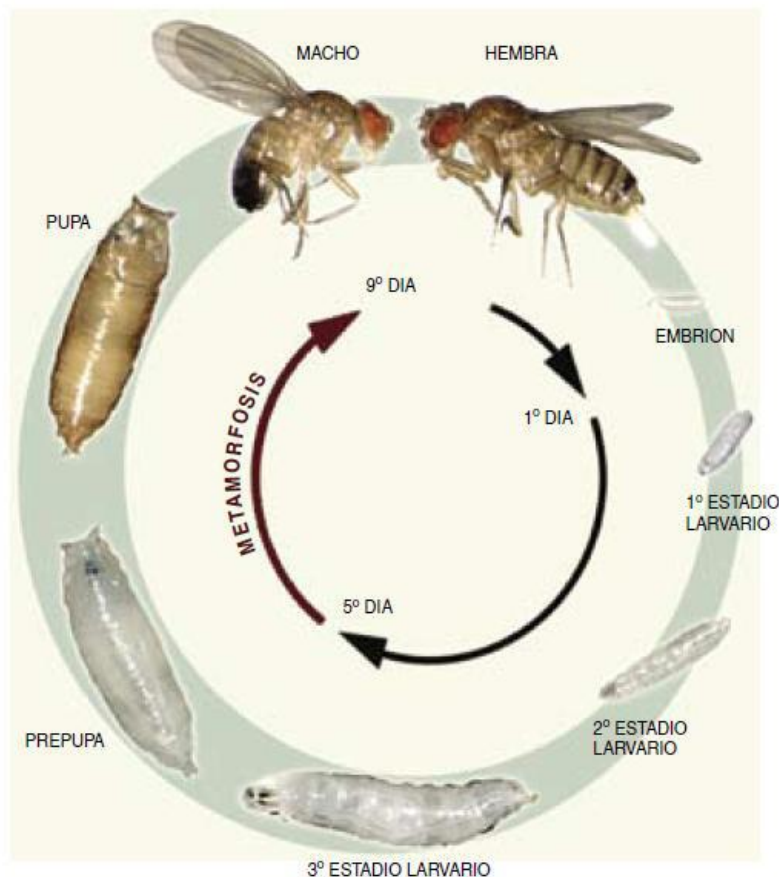


Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. El huevo fecundado tarda 24 horas en desarrollarse y convertirse en larva de primer estadio. Pasado el segundo y tercer estadio larval se forma la pupa. Concluida la metamorfosis en esta etapa, el imago emerge cuatro a cinco días después. Extraído de Pastor Pareja y col, 2006.

El corazón de Drosophila melanogaster.

El corazón adulto de *Drosophila melanogaster* es un tubo que se extiende dorsalmente y en sentido longitudinal, en la zona media entre el primer y sexto segmento abdominal (Medioni y col, 2009). Consta de cuatro cámaras cardíacas, dispuestas en serie. La primera cámara, también llamada cámara cónica, se ubica en la zona proximal del abdomen. En la cámara cónica y en la

última cámara se encuentran los centros marcapaso (Rizki y Rizki, 1978; Dowse y col, 1995; Johnson y col, 2002, Dulcis y Levine, 2003). La figura 2 muestra aspectos de su anatomía.

El ciclo cardíaco de *Drosophila* consiste de dos fases alternantes compuestas por latidos anterógrados y retrógrados que presentan diferente frecuencia, asociados a cambios en la dirección del flujo de circulación de la hemolinfa (Dulcis y Levine, 2005; Wasserthal 2007). La contracción cardíaca se origina en los dos extremos del corazón, a partir de estos centros marcapaso.

El músculo cardíaco consiste de una capa de cardiomiocitos que expresan el factor de transcripción tinC. Acompañando al tubo cardíaco, existe un conjunto de células de músculo estriado, que no expresan tinC, referidas como músculo longitudinal ventral (Curtis y col, 1999). Los cardiomiocitos contienen proteínas estructurales como sarcoglicanos, distrofinas, miosinas y troponinas (Taghli-Lamalle y col, 2008).

La naturaleza miogénica del corazón de *Drosophila* es comparable a la de mamífero. Sus propiedades ionotrópica y cronotrópica son de interés para estudiar principios fisiopatológicos de la función cardíaca de mamíferos en este organismo (Cooper y col, 2009).

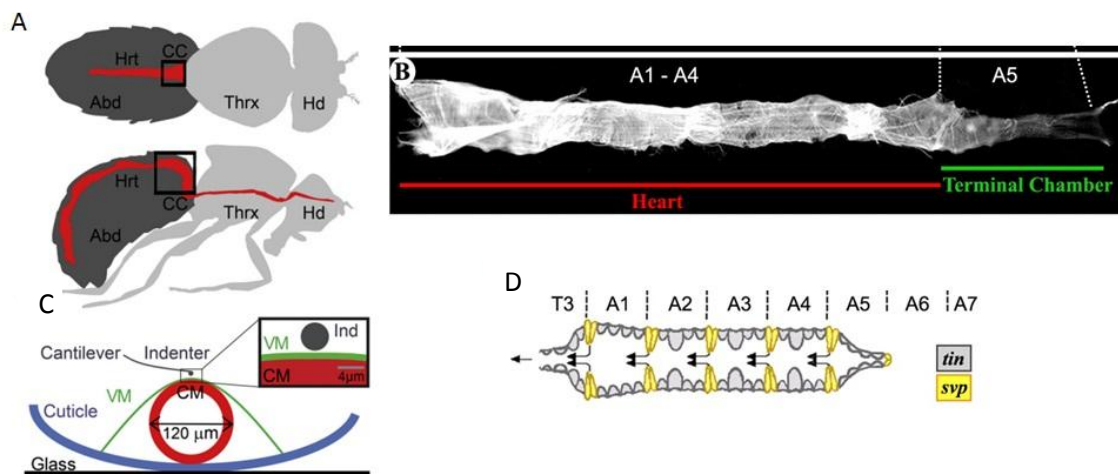


Figura 2. A: vista dorsal y lateral del corazón de *Drosophila*. Abd: abdomen. Thrx: torax. Hd: cabeza. Hrt: heart. CC: cámara cónica. B: vista del tubo cardíaco aislado: A1-A4, A5 son segmentos del abdomen. C: esquema en corte transversal de las capas musculares. VM: músculos ventrales. CM: cardiomiocitos. Cuticle: cutícula. D: esquema del tubo cardíaco y las válvulas. Tin: gen tin, svp: gen seven up. Modificado de Monier B y col, 2005 y de Kaushik y col, 2011.

La importancia del calcio intracelular en la contractilidad cardíaca.

En los mamíferos, la regulación de la concentración de calcio intracelular (Ca^{2+}_i) es esencial para la función cardíaca. La despolarización de la membrana celular se produce por la entrada del ion sodio (Na^+) a través de canales rápidos de Na^+ . Cuando el potencial de membrana, que en reposo es

de -80 milivoltios, llega a -40 milivoltios, se abren los canales de Ca^{2+} tipo L del sarcolema o membrana celular, operados por voltaje y se genera la corriente de Ca^{2+} . Cerca de estos canales se encuentran los receptores de rianodina (RyR2), ubicados en la membrana del retículo sarcoplasmático (RS). Cuando aumenta el Ca^{2+} en las proximidades, los RyR2 se abren y liberan Ca^{2+} desde el RS. En condiciones fisiológicas la concentración de Ca^{2+} aumenta de 0.1 a 1 micromolar y luego disminuye. A esta variación se la llama *transitorio* de Ca^{2+} . Una vez que el Ca^{2+} participó en el desplazamiento de los miofilamentos, su concentración en el citosol se reduce. Los sistemas de remoción rápida de Ca^{2+} son la bomba Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoplasmático (SERCA2a) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ del sarcolema (NCX). Entre los sistemas de remoción lenta se encuentran el transportador de Ca^{2+} mitocondrial y la bomba Ca^{2+} ATPasa del sarcolema. La actividad de algunas de estas proteínas y de sus reguladores está modulada por fosforilaciones. Un esquema simplificado de este mecanismo, llamado acoplamiento excito-contráctil se representa en la figura 3.

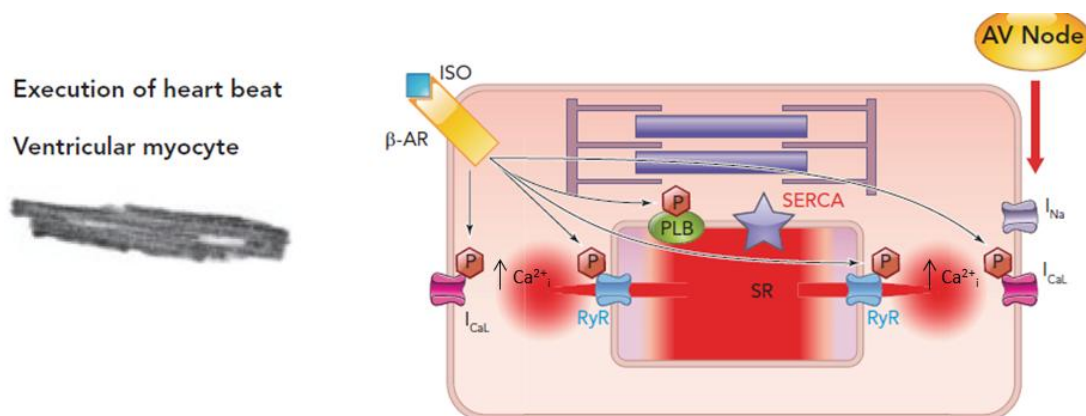


Figura 3. Esquema del Acoplamiento excito-contráctil. La corriente de Na^+ estimula la entrada de Ca^{2+} por el canal L y la liberación de Ca^{2+} del reservorio (mediante apertura de los RyR). Luego de la contracción, el Ca^{2+} se extruye de la célula por el modo directo del intercambiador NCX (no mostrado aquí) y se recaptura hacia el RS por medio de la SERCA. Este proceso es favorecido también por estimulación β -adrenérgica, por ejemplo, ante la unión de isoproterenol (ISO) al receptor. Esto activa proteínas quinasas que fosforilan varios blancos como el canal L, RyR, fosfolamban. AV: nodo auriculoventricular desde donde proviene la corriente que despolariza la membrana del miocito. Modificado de Monfredi y col, 2013.

Génesis y tipos de arritmias cardíacas.

Cuando el lugar donde se origina el latido cardíaco no es el marcapaso fisiológico o cuando la secuencia normal en la activación del corazón se altera, se habla de trastornos del ritmo cardíaco o arritmias. (Cingolani y Houssay, 2000).

Un tipo de arritmias cardíacas involucran el fenómeno llamado postdespolarización. Se trata de una actividad disparada o iniciada a nivel celular debido a oscilaciones espontáneas en el potencial de membrana (Carmeliet, 1999; Bers, 2006). Este último mecanismo puede llevar a arritmias sostenidas como en la taquicardia ventricular luego del infarto (Anderson, 2007).

En base al momento de aparición con respecto al potencial de acción, las postdespolarizaciones se dividen en dos tipos (Figura 4):

1.-postdespolarizaciones tempranas (EADs, *early afterdepolarizations*) que son despolarizaciones de la membrana celular que ocurren antes de la finalización del potencial de acción normal.

2.-postdespolarizaciones tardías (DADs, *delay afterdepolarizations*) que ocurren luego de la finalización del potencial de acción normal (Figura 4).

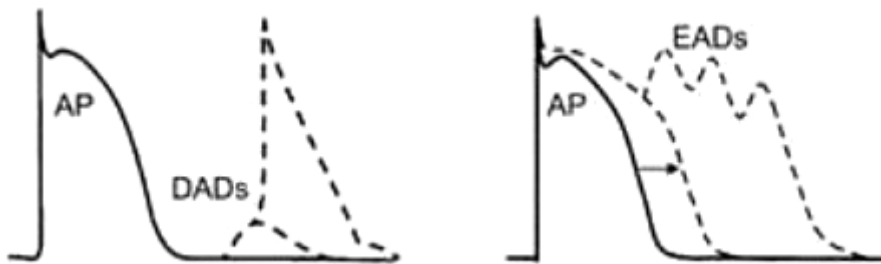


Figura 4. Esquema que representa las DADs y EADs. AP: potencial de acción

Efectos del envejecimiento sobre la función cardiovascular.

En humanos, se sabe que la incidencia de enfermedades cardíacas aumenta con la edad. La hipertensión, el mayor número de infartos y las arritmias son sólo algunos ejemplos de la influencia de la edad en las cardiomiopatías.

En *Drosophila melanogaster* se han realizado estudios de los efectos de envejecimiento utilizando dos tipos de estrés: temperatura y estimulación eléctrica externa (marcapaseo) (Paternostro y col, 2001). Mediante estos estudios, se observa que la frecuencia máxima alcanzable por las moscas disminuye con respecto a la edad, un efecto similar al que se encuentra en humanos. Además, en los corazones estimulados eléctricamente, se observa un mayor porcentaje de fibrilación y arritmias en las moscas adultas comparadas con las moscas jóvenes (Ocorr y col, 2007). Esto, sumado a su homología genética respecto al humano, su facilidad de manejo en el laboratorio y por la posibilidad de generar mutantes, *Drosophila* es un modelo útil para estudiar mecanismos asociados al deterioro de la función cardíaca.

Incidencia de la proteína eIF4E en la función cardiovascular.***¿eIF4E tiene un nuevo rol más allá de la regulación de la traducción?***

La proteína eIF4E se encuentra en todos los eucariotas, consiste en ocho cadenas de hojas beta antiparalelas soportadas por tres hélices alfa que forman la palma y el dorso de una mano " en forma de copa " (Marcotrigiano y col ,1997; Matsuo y col, 1997; Tomoo y col, 2002) .En el humano se reconocen tres isoformas de eIF4E. La mejor descrita es eIF4E-1, que interviene en el inicio de la síntesis proteica. Presenta tres aminoácidos importantes para su función: dos sitios (Trp⁵⁶ y Trp¹⁰²) se unen al residuo N 7- metil guanosina (cap) del extremo 5´del ARNm (Wieczorek y col, 1997). Un tercer residuo triptofano (Trp⁷³) reconoce y se une a diversas proteínas, como eIF4G con quien interactúa para la formación del complejo de inicio de la traducción eIF4F, y eIF4E-BP quien inhibe su actividad.

En *Drosophila* existen 7 isoforma de eIF4E. Para la isoforma eIF4E-1, aquí estudiada, los residuos encargados de la unión a cap son Trp¹⁰⁰ y Trp¹⁴⁶ mientras que el Trp¹¹⁷ media interacciones con las proteínas eIF4E-BP y eIF4EG. El núcleo de eIF4E representado por aproximadamente 170 aminoácidos se conserva en todos los eucariotas y es suficiente para el reconocimiento del cap y la unión a eIF4G y 4E -BPs (Vasilescu y col, 1996), Los dominios N- y C- terminales son considerablemente variables. Es posible que los dominios N- y C- terminales puedan estar involucrados en la regulación de la actividad de eIF4E o podrían afectar a la estabilidad de la proteína (Scheper y col, 2002; Gross y col, 2003). La fosforilación en Ser²⁰⁹ en mamíferos y Ser²⁵¹ en *Drosophila* es importante para su actividad. (McKendrick y col, 2001; Scheper y col, 2002; Lachance y col, 2002). Mnk1 y Mnk2 se identificaron como las quinasas encargadas de dicha fosforilación (Waskiewicz y col, 1997; Wang y col, 1998; Waskiewicz y col, 1999; Scheper y col, 2001).

Como lo mencionamos, su rol conocido es la acción en el inicio de la traducción del ARNm eucariótico. Además de unirse al cap, eIF4E interacciona con eIF4G y forma el complejo eIF4F integrado también por eIF4A, el cual se une a la unidad ribosomal 40S mediante su interacción con eIF3 y promueve el inicio de la traducción del ARNm (Gringras y col, 1999). Más recientemente, se ha demostrado que eIF4E está relacionado a funciones no asociadas con la síntesis proteica (Ferrero y col, 2012; Layana y col, 2012).

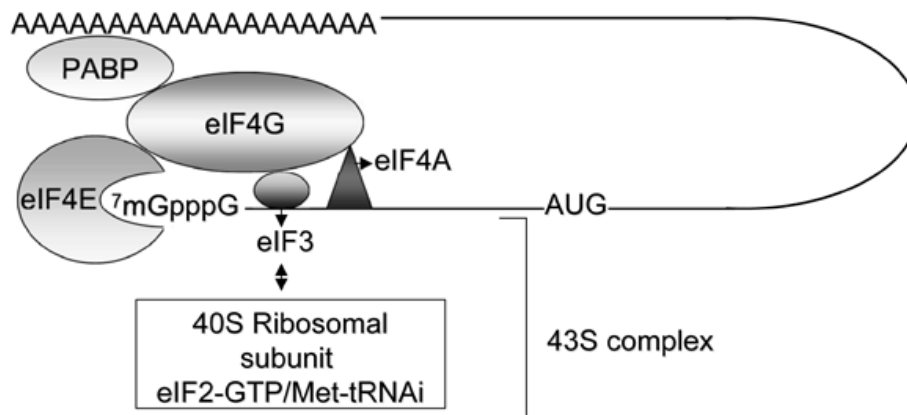


Figura 5. Estructura del complejo de inicio de la traducción eucariota eIF4F donde se aprecia la interacción de eIF4E con eIF4G y el cap m7GpppN. Extraído de www.biology-online.org.

La actividad de eIF4E es regulada por la proteína de unión a eIF4E, llamada 4E-BP. Ésta interacciona con eIF4E impidiendo su unión a eIF4G. 4E-BP y eIF4G poseen un dominio consenso de unión a eIF4E, por lo que 4E-BP actúa como un competidor inhibitorio de la interacción eIF4E-eIF4G. (Joshi y *col*, 2004).

Si bien aquí nos referiremos a la isoforma de eIF4E-1, el siguiente cuadro comparativo resume las distintas isoformas de eIF4E halladas en *Drosophila*.

Isoforma	Unión a cap	Unión a proteínas	¿Traduce?	Tejido	Estadio	Referencia
1	W ¹⁰⁰ W ¹⁴⁶	W ¹¹⁷ Une 4G y 4E-BP	Sí	Todo el organismo	Todos los estados	Hernández y <i>col</i> , 2005
2	W ⁸⁹ W ¹³⁵	W ¹⁰⁶ Une 4G y 4E-BP	Sí	Todo el organismo	Todos los estadios	Hernández y <i>col</i> , 2005
3	W ⁸⁶ W ¹³²	F ¹⁰³ Une 4G	Sí	Testículo	A partir del 3er estadio larvario	Hernández y <i>col</i> , 2012
4	W ⁷¹ W ¹¹⁷	W ⁸⁸	Sí	Todo el organismo	Después del 3er estadio larvario	Hernández y <i>col</i> , 2005
5	W ⁷⁴ W ¹²⁰	W ⁹¹		Todo el organismo	Después del 3er estadio larvario	Hernández y <i>col</i> , 2005
6	W ⁵² W ⁹⁸	W ⁶⁹	No			Hernández y <i>col</i> , 2005
7	W ⁴⁷⁰ W ³¹⁵	W ²⁸⁶	Sí	Todo el organismo	Después del 3er estadio larvario	Hernández y <i>col</i> , 2005
8	W ¹¹⁴	W ⁸⁵	No		Primeros estadios embrionarios	Hernández y <i>col</i> , 2005

En mamíferos, también existe más de una isoforma. Aquí observamos un cuadro comparativo que detalla aspectos importantes.

Isoforma	Unión a cap	Unión a proteínas	¿Traduce?	Tejido	Estadio	Referencia
1	W ⁵⁶ W ¹⁰²	Une 4G y 4E-BP	Sí	Todo el organismo	Todos los estadios	Joshi y col, 2004
2	Tyr ⁵⁶	Une 4E-BP	No	Todo el organismo		Joshi y col, 2004
3	Cys ⁵⁶	Une 4G	No	Corazón, músculo esquelético, hígado, bazo		Joshi y col, 2004

La figura 6 muestra la estructura de las isoformas de eIF4E en *Drosophila melanogaster* y en *Homo sapiens*, sobre las que nos enfocaremos aquí en relación a su participación sobre la función cardíaca. Iniciamos nuestro estudio sobre estas isoformas y no sobre otras, porque nos planteamos conocer si cambios en su función, podrían repercutir sobre la traducción de proteínas que manejan el Ca²⁺_i. Además de llevar a cabo su rol canónico como factor de traducción, se encuentran en el organismo a lo largo de su ciclo de vida y en todos los tejidos.

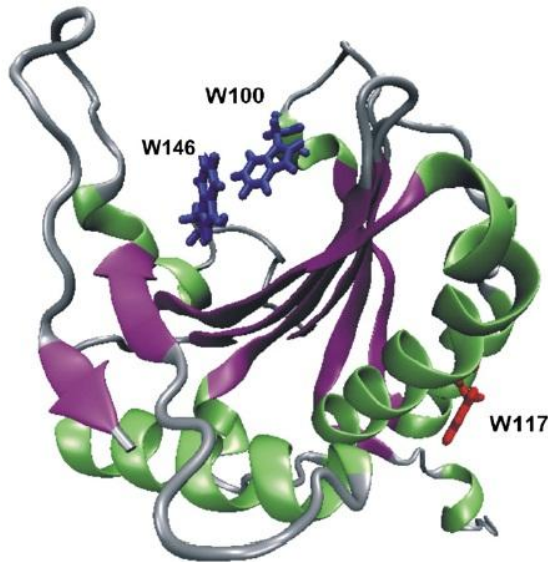


Figura 6.A: Modelo molecular de eIF4E-1 de *Drosophila melanogaster*. Tomado de Ferrero, y col, 2012.

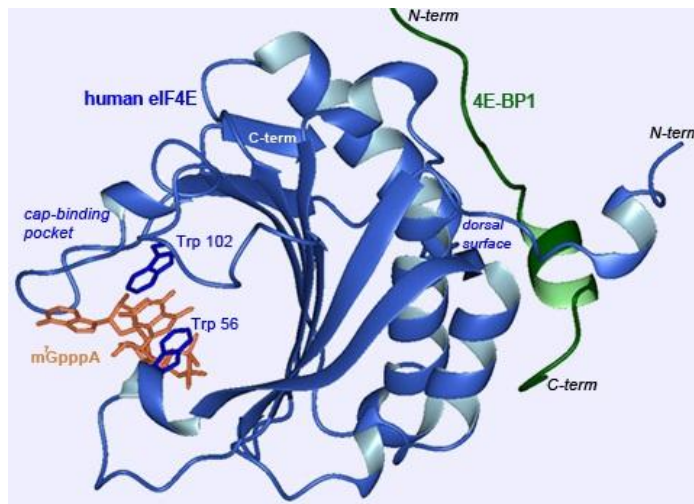


Figura6. B: Modelo molecular de eIF4E1 de *Homo sapiens* y su interacción con 4E-BP1. Tomado de atlasgeneticsoncology.org

eIF4E en el contexto de activación de la vía TOR

TOR es una quinasa de serina/treonina (target of rapamycin). En mamíferos, la señalización por mTOR (mammalianTOR) se activa por hormonas y factores de crecimiento como la insulina y el factor de crecimiento insulínico IGF-1. En cambio, su actividad se inhibe por señales de daño celular como bajas concentraciones de oxígeno, estrés oxidante y daño al ADN (Tsang y *col*, 2007). Una de las funciones celulares de la activación de esta vía en eucariontes es la importación de nutrientes, la traducción de ARN mensajeros y la biogénesis de ribosomas que conlleva el crecimiento del tamaño y masa celulares. Esta vía tiene un rol crítico en el control del crecimiento celular (Bjornsti y Houghton, 2004; Yang y Ming, 2012).

eIF4E y la vía TOR en la función cardíaca

La activación de la vía mTOR está vinculada con enfermedades cardiovasculares (Wang y *col*, 2009) y con la apoptosis en cardiomiocitos (Zhang y *col*, 2009). En modelos de síndrome metabólico de ratas la señalización de la vía mTOR está aumentada en el corazón, contribuyendo a la hipertrofia cardíaca (Soesanto W y *col*, 2009). En la isquemia la activación de mTOR induce fosforilación de 4E-BP, (Crozier y *col*, 2006) constituyendo una vía de control de la síntesis proteica mediada por eIF4E (Figura 7).

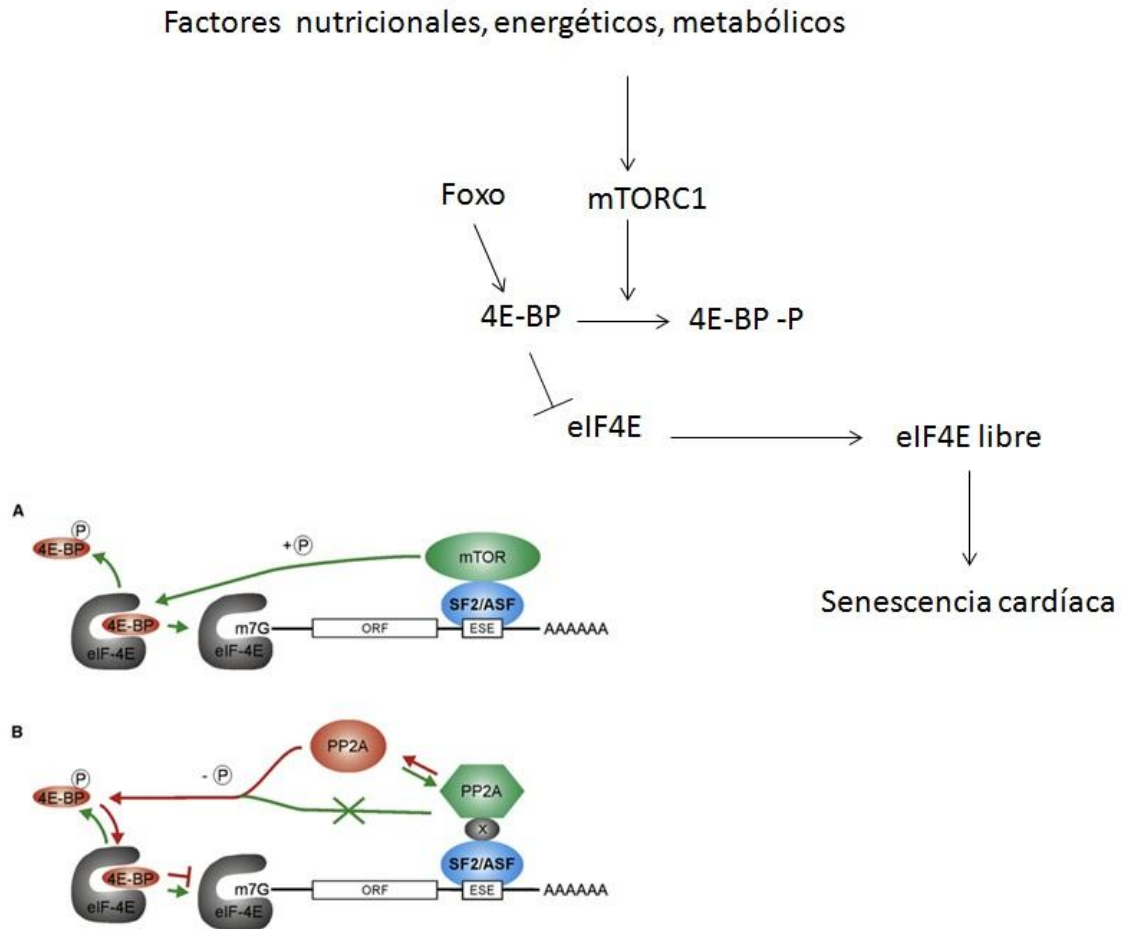


Figura 7. Factores nutricionales, energéticos y metabólicos confluyen en la activación de la quinasa TOR que fosforila a 4EBP. La fosforilación de 4E-BP es capaz de revertir su inhibición hacia eIF4E, liberando al factor de inicio de la traducción para promover la síntesis de proteínas. (Tomado de Michlewski *et al*, 2008).

Estudios recientes mostraron que la sobreexpresión de eIF4E en tejido cardíaco de *Drosophila melanogaster* muestra un incremento de arritmias y que la insuficiencia cardíaca inducida por estrés (marcapaseo) ocurre a edades más tempranas. La insuficiencia cardíaca temprana inducida por estrés también se observó en mutantes nulos de 4E-BP y en líneas que sobreexpresan TOR (Wessells *et al*, 2009).

Desarrollo de un sistema reportero para estudiar función cardiovascular en *Drosophila melanogaster*.

Mencionamos que la posibilidad de generar moscas transgénicas es una ventaja de nuestro modelo. En este caso, existen dos construcciones transgénicas que contienen proteínas fluorescentes reporteras (excitables a 488 nm y con emisión en 505-530 nm) capaces de detectar cambios en los niveles de Ca^{2+}_i (GCaMP2 y GCaMP3; Lin *et al*, 2011). Estas proteínas tienen adosado a la región C terminal de GFP un dominio de unión a calmodulina. Al aumentar el Ca^{2+}_i , éste se une a calmodulina, el complejo Ca^{2+}_i -calmodulina

cambia la conformación del fluoróforo y activa la emisión de fluorescencia. Así, se generaron moscas transgénicas que contienen estos sistemas reporteros. En nuestros estudios usaremos GCaMP3, que tiene un mayor rendimiento cuántico y por lo tanto una mayor sensibilidad. Las cepas fueron gentilmente cedidas por Matthew Wolf, Departamento de Medicina, Universidad de Duke, USA.

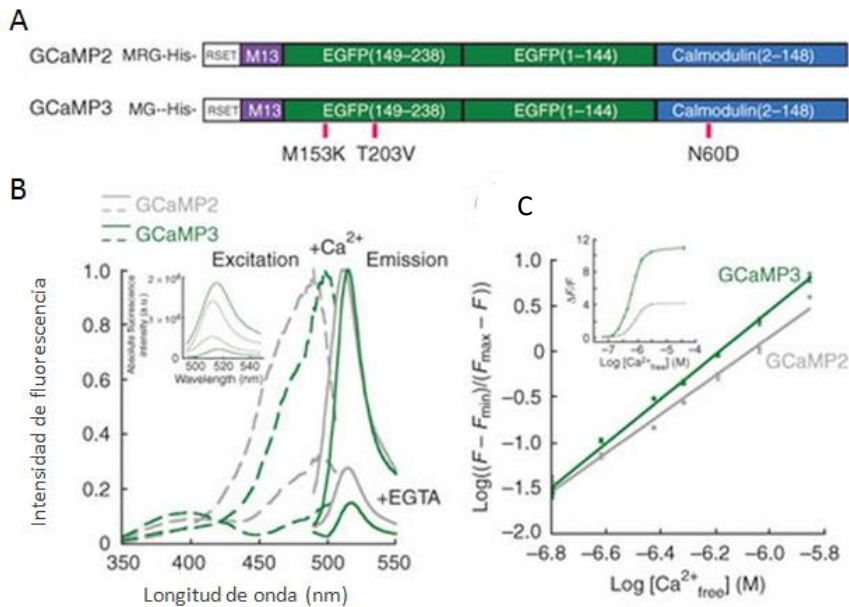


Figura 8. A: esquema de los dominios de las proteínas fluorescentes GCaMP2 y GCaMP3. Se indican residuos mutados en GCaMP3 respecto a GCaMP2. B: Espectros de excitación (alrededor de 488 nm) y emisión de ambas (entre 505 y 530 nm) en presencia (Ca²⁺) y ausencia de Ca²⁺ (+EGTA). C. Curva de titulación de Ca²⁺ utilizando 1 μ M de proteína. En el marco superior izquierdo se muestra el rango dinámico para ambos indicadores.

El presente trabajo se enfoca dentro de un proyecto en el cual estudiamos generación de arritmias cardíacas asociadas al envejecimiento y posibles mecanismos moleculares. En este contexto, analizamos la vía de señalización mediada por TOR y uno de sus efectores, eIF4E, ya que podría tener implicancia en la regulación de la traducción de proteínas asociadas al manejo del Ca²⁺_i.

Aquí nos enfocaremos específicamente en observar el impacto del envejecimiento sobre la frecuencia cardíaca y la aparición de arritmias. Estudiamos en particular el efecto de cambios en los niveles de expresión de TOR y eIF4E sobre la frecuencia cardíaca y las arritmias. Analizamos aspectos del transitorio de Ca²⁺_i – que se detallarán en materiales y métodos- mediante la señal emitida por el sistema reportero antes descrito, incorporado en moscas salvajes y transgénicas para las proteínas de interés.

Hipótesis de trabajo

Alteraciones de la expresión y/o actividad de eIF4E-efector de la vía TOR- contribuyen a la generación de arritmias cardíacas.

Objetivos generales

1- Caracterizar aspectos fundamentales de la función cardíaca en *Drosophila melanogaster* a dos edades diferentes.

Este paso es fundamental para caracterizar nuestro modelo ya que los parámetros funcionales se obtendrán a partir de un reportero fluorescente que detecta los aumentos de Ca^{2+}_i . Los parámetros fisiológicos serán medidos a 7 días y 60 días.

2- Analizar la participación de eIF4E y de la quinasa TOR en la génesis de arritmias con la edad.

Este objetivo se enfoca en evaluar la presencia de arritmias y el comportamiento del ciclado de Ca^{2+}_i en el corazón adulto de moscas salvajes y transgénicas que tienen niveles reducidos de eIF4E y sobreexpresada la quinasa TOR. Estudiaremos la respuesta funcional del corazón en cada línea.

Materiales y métodos

Análisis de homologías de las proteínas eIF4E y TOR.

Para validar la homología entre las proteínas presentes en *Drosophila melanogaster* y *Homo sapiens*, se realizó un alineamiento global entre las secuencias proteicas de las proteínas eIF4E y TOR.

Las secuencias proteicas de eIF4E y TOR de *Drosophila melanogaster* y *Homo sapiens* se obtuvieron de las bases de datos del NCBI y Uniprot para ser luego alineadas de manera global con la herramienta informática de alineamientos simples Needle, provista por el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI).

Amplificación de stocks.

Los stocks de moscas se amplificaron y mantuvieron en viales a 28°C, llenados parcialmente con una mezcla de harina de maíz, glucosa, agar y levadura, suplementado con 10% de antimicótico para evitar su contaminación. (Anexo I).

Utilización del sistema UAS-Gal4 y del sistema reportero GFP.

Gal4 es un gen que codifica para una proteína de 881 aminoácidos cuya expresión es inducida por galactosa, identificada inicialmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como regulador de la expresión génica. Es un factor de transcripción compuesto por dos dominios, el dominio activador ubicado en el extremo C-terminal interactúa con otras proteínas para estimular la transcripción a partir de un promotor cercano, mientras que el dominio de unión al ADN ubicado en el extremo N-terminal, se une directamente a una secuencia específica de 17 pares de bases denominada UAS. (Lodish, 2005)

Se pueden construir líneas transgénicas de moscas que contengan el gen que codifica para Gal4 cuya expresión esté dirigida espacial y/o temporalmente por promotores (*drivers*) específicos de tejido o de un momento determinado del desarrollo de las moscas. Por otra parte, se pueden generar líneas transgénicas que contengan un gen de interés que se quiere expresar a continuación de la secuencia UAS. Cuando se cruzan ambas líneas (la que porta Gal4 dirigido por un *driver* específico y la que tiene el gen de interés asociado a la secuencia UAS), los descendientes podrán producir Gal4 que al unirse a UAS, promueven la transcripción del gen de interés asociado (revisado en Duffy, 2002).

El sistema reportero que contiene el fluoróforo excitable y que responde a los aumentos de Ca^{2+}_i , se encuentra asociado a la secuencia UAS. Estas

moscas transgénicas *UASGCaMP3*; *TinC Gal4- UASGCaMP3* expresan *Gal4* bajo el control de *TinC*, un gen homeobox que produce un factor de transcripción expresado en corazón. Cuando *Gal4* se sintetiza, se une a la secuencia *UAS* y activa la transcripción de la proteína sensible a Ca^{2+}_i , *GCaMP3*. La figura 9 muestra cómo funciona la construcción transgénica con el gen reportero que capta los cambios en el Ca^{2+}_i , línea a la que llamaremos control, porque no tiene modificado otro gen de interés (lado izquierdo), y cómo el cruzamiento de ésta con una línea que posee un gen de interés bajo el control de *UAS*, permite obtener una *F1* que expresa ambos productos génicos.

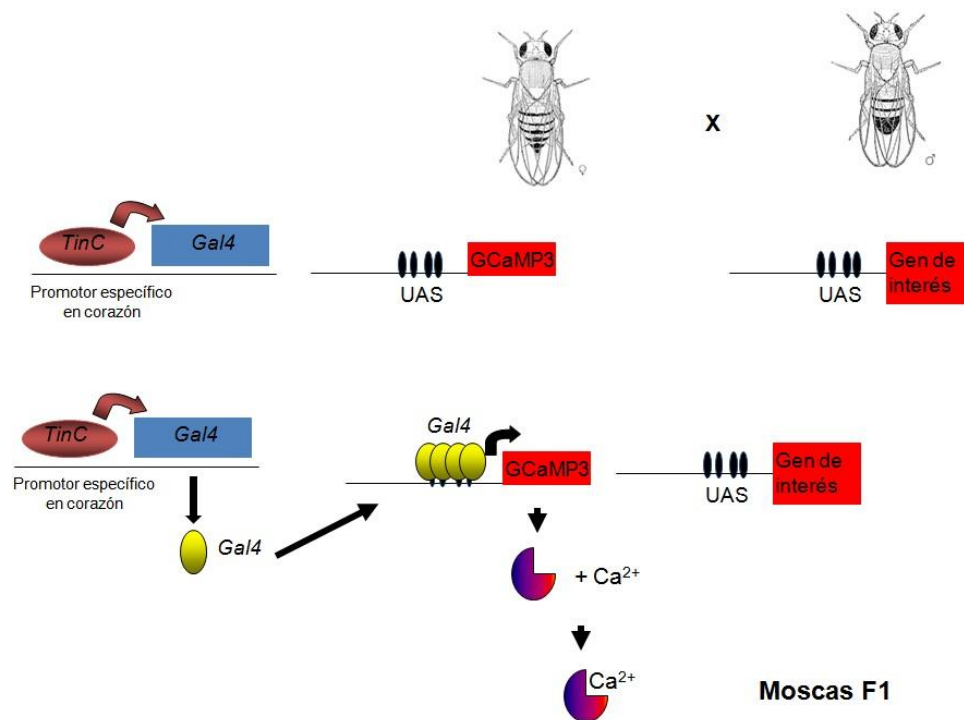
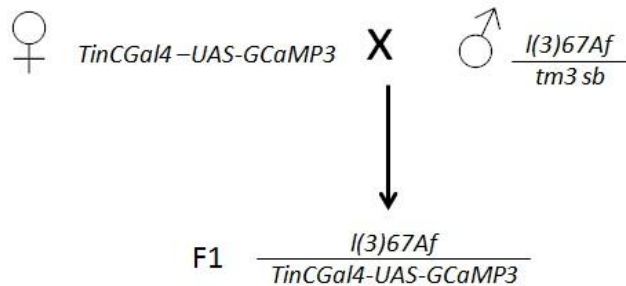


Figura 9. Esquema que muestra cómo se expresa GCaMP3 y el gen de interés. Ambos genes se encuentran corriente abajo de la secuencia UAS a la que se une Gal4, que se expresa en corazón bajo el control de TinC.

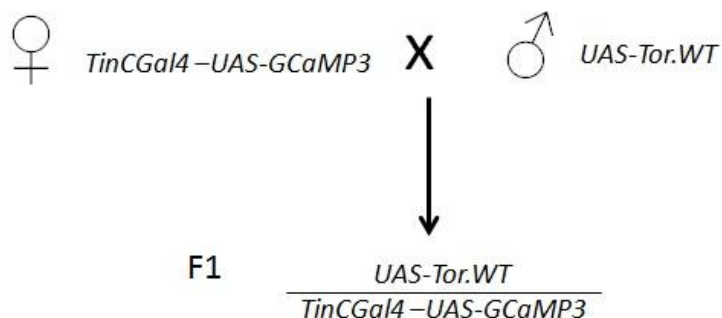
Cruzamientos genéticos:

1.- Línea GCaMP3 con una línea heterocigota que presenta una mutación puntual que produce la proteína eIF4E truncada, no funcional. La descendencia (F1) será heterocigota para el gen de interés, que se expresará selectivamente en corazón y tendrá dos copias del sistema reportero.



Se seleccionan los individuos de la F1 que posean pelo largo, ya que el balanceador TM3 Sb presenta un fenotipo de pelo corto. Esto se observa en el tercer cromosoma. La otra copia de UAS-GCaMP3 se encuentra en el segundo cromosoma.

2.- Línea GCaMP3 con una línea homocigota que contiene el gen que codifica para la quinasa TOR acoplado a la secuencia UAS. La descendencia (F1) será heterocigota para el gen de interés el que se expresará selectivamente en corazón y tendrá dos copias del sistema reportero.



Todos los individuos de la F1 son heterocigotas para el gen de interés. La otra copia de UAS-GCaMP3 se encuentra en el tercer cromosoma.

Obtención del preparado semi-intacto.

Para realizar los estudios funcionales, los experimentos con corazones de adultos se llevaron a cabo según lo descrito (Vogler y Ocorr, 2009). Las disecciones se realizaron en un microscopio estereoscópico Schonfeld Optik modelo XTD 217. Se tomaron individuos de 7 y 60 días de la línea salvaje

(GCaMP3) y las líneas transgénicas, los cuales fueron brevemente anestesiados con dióxido de carbono (CO_2), colocados en una caja de Petri de 60 mm que contenía una capa de vaselina y fijados por la región dorsal. Mediante un corte se eliminó la cabeza y la región ventral del tórax con el objeto de quitar la influencia neuronal en la actividad cardíaca. Se abrió la zona ventral media del abdomen y se retiraron los órganos internos como el intestino y órganos genitales. Se succionó el cuerpo graso mediante tubos capilares y el corazón quedó expuesto adherido a la pared dorsal. El preparado se mantuvo sumergido en solución de hemolinfa artificial oxigenada (HL3). (Anexo I)

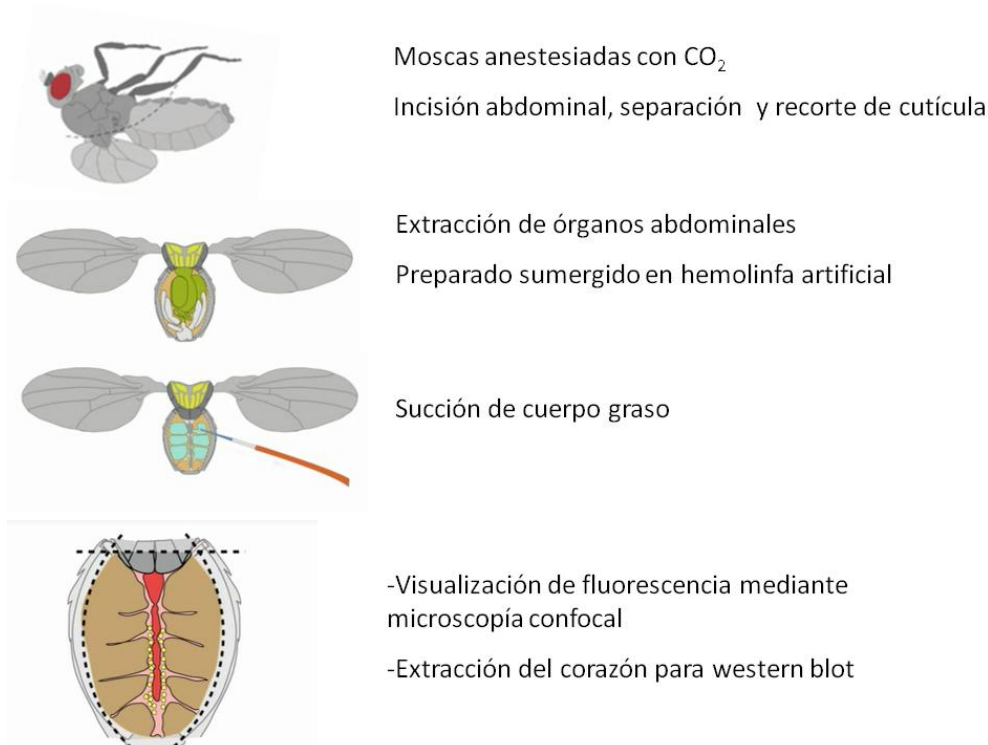


Figura 10. Preparado semi-intacto de *Drosophila melanogaster*. La mosca se posiciona sobre el dorso para realizar su disección. Modificado de Vloger y Ocorr, 2009.

Los preparados se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss 410 para medir los cambios en la fluorescencia emitida por la proteína sensible al Ca^{2+} (longitud de onda de excitación: 488 nanómetros, longitud de onda de emisión: 505-530 nanómetros).

La figura 7 muestra imágenes en pseudocolor del corazón de una mosca transgénica. Se trazó una línea en sentido transversal a la altura de la cámara cónica en el primer segmento abdominal para registrar los cambios de fluorescencia. A la derecha se observa un trazado típico, de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo. Los picos indican el aumento transitorio del Ca^{2+}_i para cada contracción.

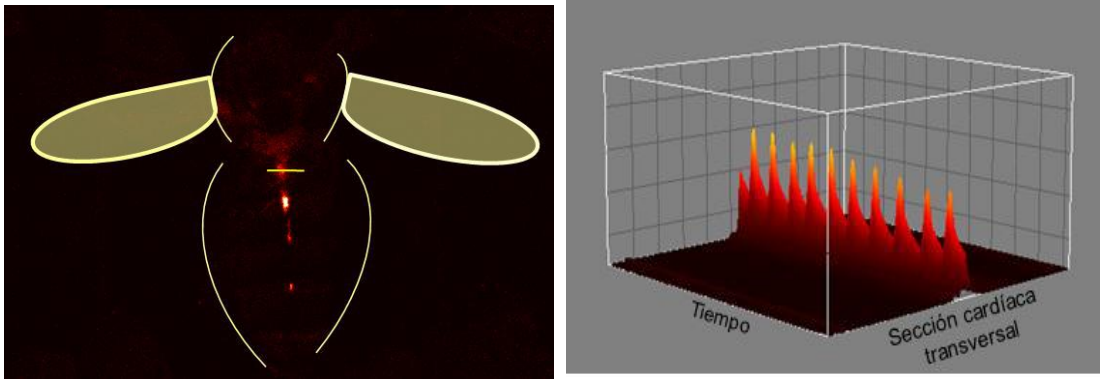


Figura 11. Izquierda línea extendida de manera transversal para escanear una cámara cardíaca. Derecha: registro del transitorio de Ca^{2+}_i .

Los parámetros fisiológicos medidos fueron:

- Número de transitorios en un registro (representativos de la frecuencia cardíaca), expresados en latidos/minuto (lat/min).
- Amplitud de los transitorios: expresado en unidades arbitrarias de fluorescencia según la fórmula $(F-F_0)/F_0$ siendo F la fluorescencia máxima del transitorio y F_0 la fluorescencia del preparado.
- Tiempo total: tiempo desde el inicio del transitorio hasta su finalización (milisegundos).
- $t_{1/2}$: tiempo desde la máxima señal fluorescente hasta la mitad de la caída de fluorescencia (milisegundos).
- Período cardíaco: intervalo entre los picos máximos de dos transitorios consecutivos (milisegundos).
- Índice de arritmias: desviación estándar del período cardíaco.

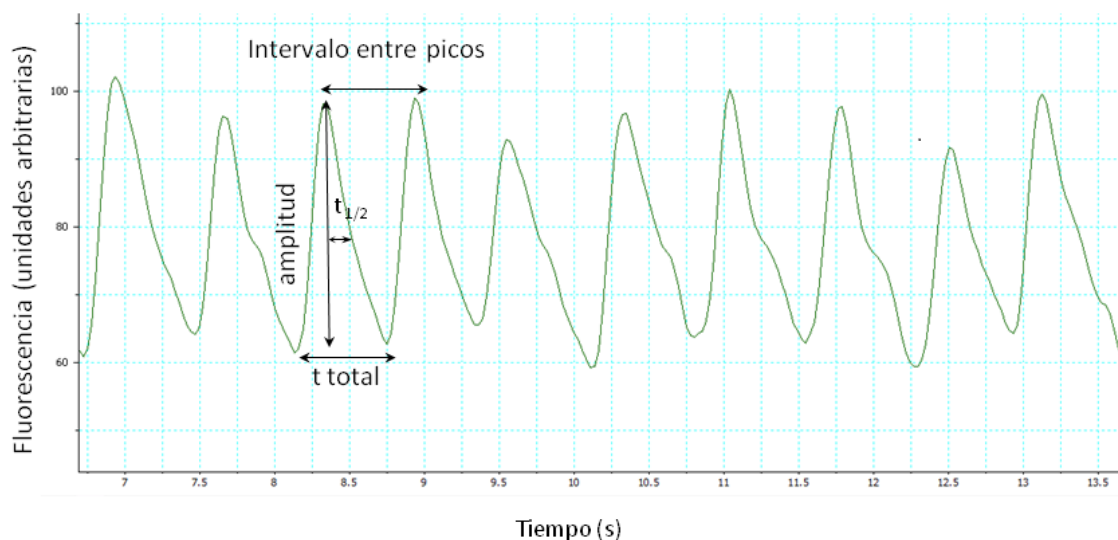


Figura 12. Registros de los transitorios de Ca^{2+}_i y parámetros medidos.

Ensayos bioquímicos.

La determinación de la cantidad relativa de eIF4E en el tejido cardíaco se evaluó por medio de Western Blot usando un anticuerpo anti-eIF4E (Maroto y Sierra, 1989).

Los geles de separación y apilamiento se diseñaron de acuerdo a lo descrito (Laemmli 1970) (Anexo I). Muestras de moscas enteras, corazones y cabezas se homogeneizaron en buffer de homogenización y se sembraron junto con buffer de siembra 1x. Se utilizó un marcador de peso molecular dual-color (Biorad. Inc) para identificar la proteína de acuerdo a su posición respecto de las bandas de proteínas de peso molecular conocido. Las muestras se sometieron a campo eléctrico en buffer de corrida (Anexo I).

Una vez finalizada la corrida, se llevó a cabo la transferencia a membrana de PVDF durante 60 minutos en buffer de transferencia (Anexo I).

Luego de la transferencia, el bloqueo de la membrana se realizó con solución amortiguadora TBS (Tris buffer salino) más Tween 20 0,1% (TBS-T) y 5% de leche, durante 60 minutos, transcurridos los cuales se efectuó la incubación con anticuerpo primario anti-eIF4E 1:2500 (Maroto y Sierra, 1989) durante toda la noche a 4°C.

Se realizaron 3 lavados de 12 minutos con TBS-T para eliminar el excedente de anticuerpo primario, y se procedió a la incubación con anticuerpo secundario contra IgG de conejo acoplado a peroxidasa, durante 60 minutos a temperatura ambiente en agitación continua.

Luego de la incubación con anticuerpo secundario se repitió el procedimiento de lavado y se reveló la membrana mediante reacción quimioluminiscente con un reactivo comercial (ECL, GE, Inc) en un equipo de obtención de imágenes Chemidoc (Bio-rad) acoplado a una computadora con un software para la detección y análisis de imágenes.

Resultados

El envejecimiento modifica la distribución de períodos cardíacos.

Al analizar el período cardíaco a edades tempranas y avanzadas en el desarrollo de moscas salvajes, se observa una mayor cantidad períodos prolongados a edades avanzadas (60 días) en relación a edades tempranas (7 días).

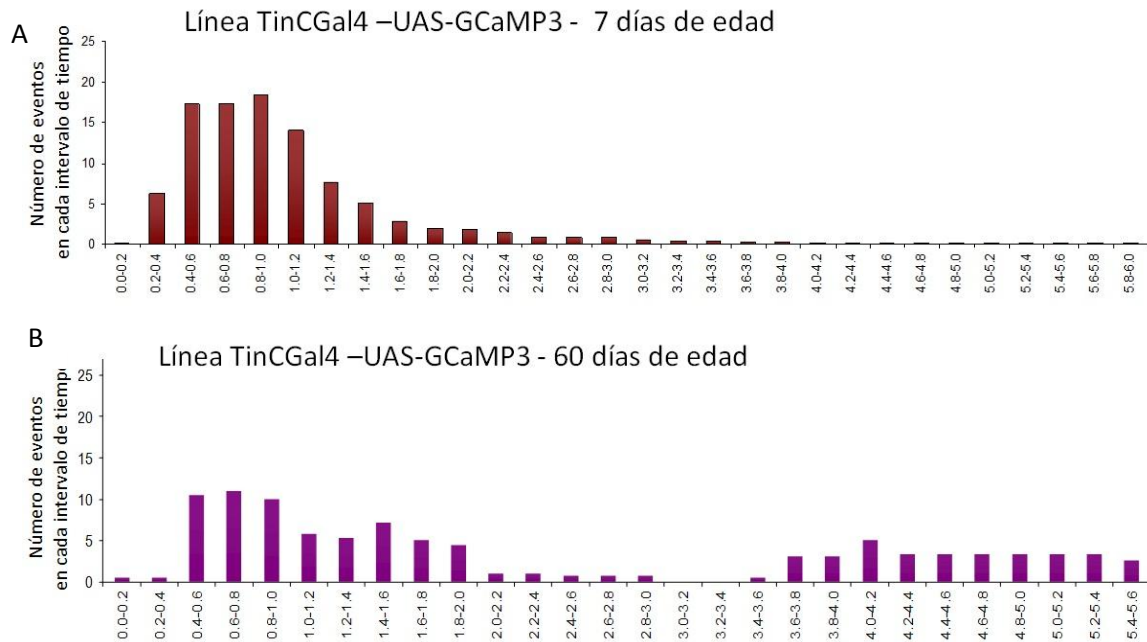


Figura 13. Distribución de períodos cardíacos de moscas salvajes a los 7 (A) y 60 (B) días de edad. 7 días n=38, 60 días n=3.

Esta variabilidad de la frecuencia con la edad, muestra una reducción de los latidos por minuto –bradicardia – al tiempo que se incrementan las arritmias, tal como se observa en los gráficos de barras en donde se representa la frecuencia, expresada en latidos por minuto (figura 14) y el índice de arritmias (figura 15), como medida de la variabilidad de la frecuencia, al tiempo que registramos la presencia de latidos ectópicos.

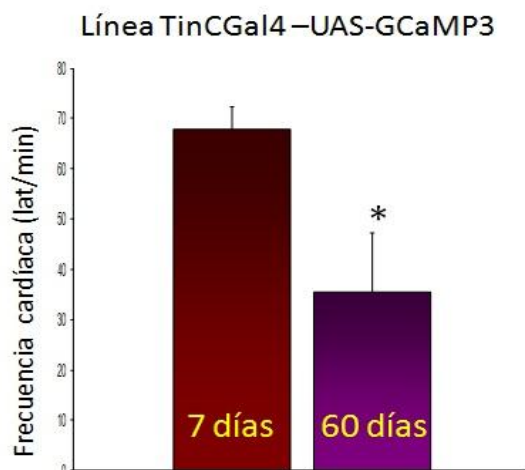


Figura 14. Variación de la frecuencia cardíaca con el envejecimiento en moscas salvajes. 7 días n=38, 60 días n=3, * p≤ 0,05.

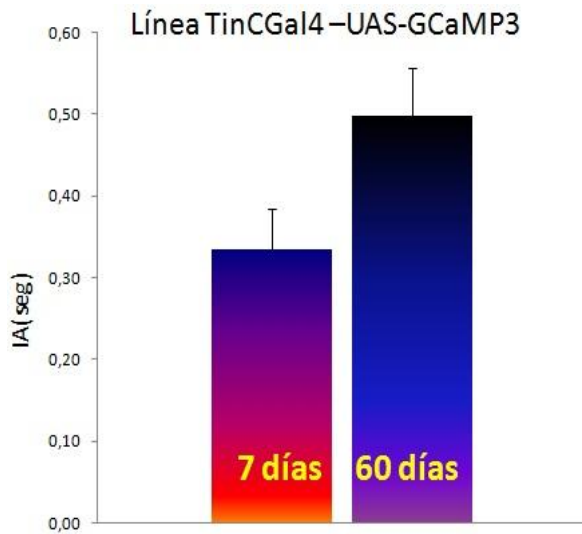


Figura 15. Variación del índice de arritmias con el envejecimiento en moscas salvajes. 7 días n=38, 60 días n=3.

Seguidamente nos enfocamos en el efecto de los cambios en los niveles de expresión de las proteínas eIF4E y TOR en la función cardíaca a estas dos edades. Previamente, realizamos un abordaje bioinformático para corroborar la homología entre las proteínas de interés en el humano y en *Drosophila*.

La proteína eIF4E se encuentra conservada en humano y *Drosophila*.

Las secuencias proteicas de eIF4E-1 de humano y eIF4E-1 de *Drosophila* se obtuvieron a partir de la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org>), y se alinearon con la herramienta informática Needle, tal como se describió en materiales y métodos. Este tipo de alineamiento permite comparar las secuencias en toda su extensión entre sí y se utiliza para identificar regiones de similitud que pueden indicar relaciones funcionales, estructurales y / o evolutivas entre dos secuencias biológicas.

En el marco de nuestro análisis, el término identidad hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos presentes en el alineamiento de las secuencias y el término similitud indica la semejanza en las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos (Claverie y Notredame en Bioinformatics for Dummies, 2007). Por convención, dos proteínas se consideran homólogas cuando poseen una identidad mayor o igual al 25%, por lo que se puede afirmar que la proteína eIF4E-1 de *Drosophila* es homóloga a eIF4E-1 del humano. La figura muestra a continuación, el porcentaje de identidad y similitud entre la isoforma eIF4E-1 de *Homo sapiens* y de *Drosophila*.

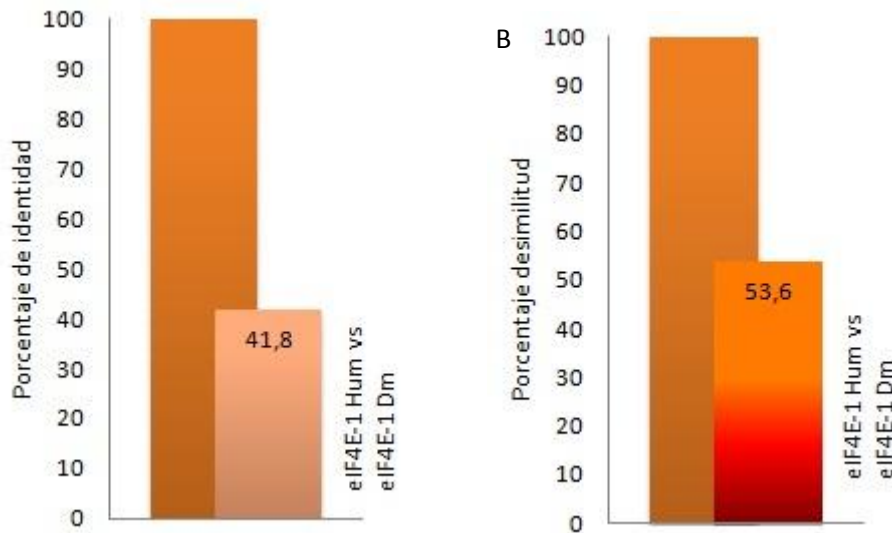


Figura 16. Representación gráfica del grado de identidad (A) y similitud (B) entre las secuencias proteicas de eIF4E-1 humana y eIF4E-1 de *Drosophila*.

De manera complementaria, a raíz de la búsqueda bibliográfica para este trabajo y de acuerdo a las isoformas mostradas en el cuadro comparativo de la introducción, nos llamó la atención la isoforma 3 de eIF4E en humanos. Esta isoforma se expresa predominantemente en corazón (Joshi y col, 2004). Por lo tanto quisimos hallar cuál de las isoformas de eIF4E de *Drosophila melanogaster* presenta mayor homología con ésta. Para ello, obtuvimos la secuencia proteica de eIF4E-3 humana a partir de la base de datos de Uniprot y realizamos un BLAST sobre la base de datos de *Drosophila melanogaster* (FlyBase).

Como resultado, se obtuvo que dentro de la base de datos de secuencias proteicas de *Drosophila*, la secuencia ingresada de eIF4E-3 de humano se relaciona con eIF4E-5 de *Drosophila*. Para corroborar su homología, ambas secuencias se compararon mediante la herramienta Needle.

Los resultados arrojados por el alineamiento son mostrados en la siguiente figura.

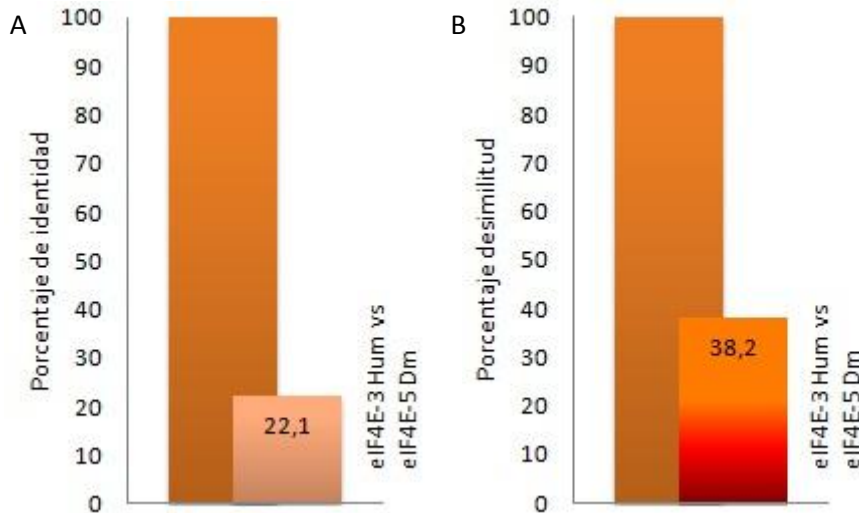


Figura 17. Representación gráfica del grado de identidad (A) y similitud (B) entre las secuencias proteicas de la isoforma 3 de eIF4E humana y la 5 de eIF4E de *Drosophila*.

Los valores de identidad se encuentran levemente por debajo del límite a partir del cual por convención se establece una homología entre las secuencias de interés. Sin embargo, es interesante cierta similitud entre estas proteínas, que debería ser explorada posteriormente.

La proteína TOR se encuentra conservada en humano y en *Drosophila*.

Llevando a cabo el mismo procedimiento para la proteína TOR de *Homo sapiens* y de *Drosophila* se obtuvieron resultados que se muestran en la figura 18. Como eIF4E-1, la proteína TOR se encuentra conservada.

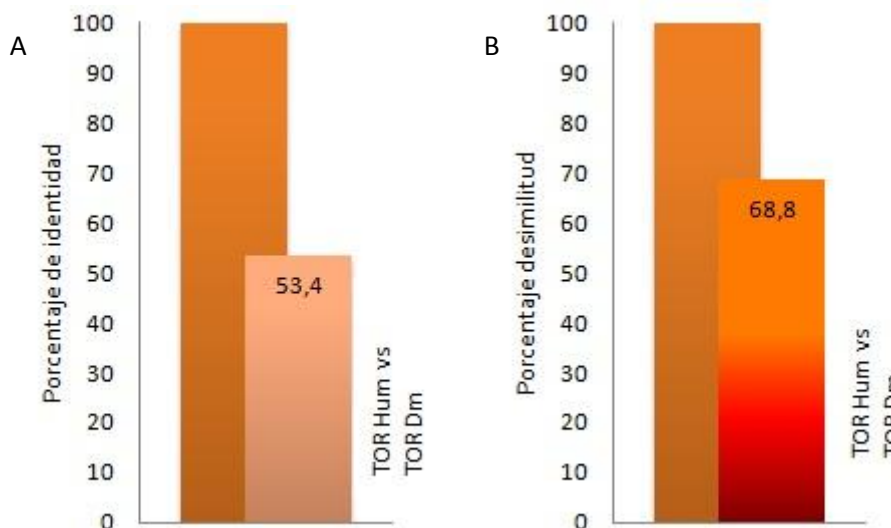


Figura 18. Representación gráfica del grado de identidad (A) y similitud (B) entre las secuencias proteicas de la quinasa TOR de humanos y la de *Drosophila*.

Estudios funcionales sobre el transitorio de Ca^{2+}_i

La disminución de los niveles de expresión de eIF4E aumenta la frecuencia cardíaca.

La disminución de los niveles de expresión de eIF4E produce un aumento de la frecuencia cardíaca en adultos de *Drosophila* de 7 días de edad. Si bien no contamos con suficientes moscas de 60 días, se puede observar una tendencia similar sobre la frecuencia como ocurre a los 7 días.

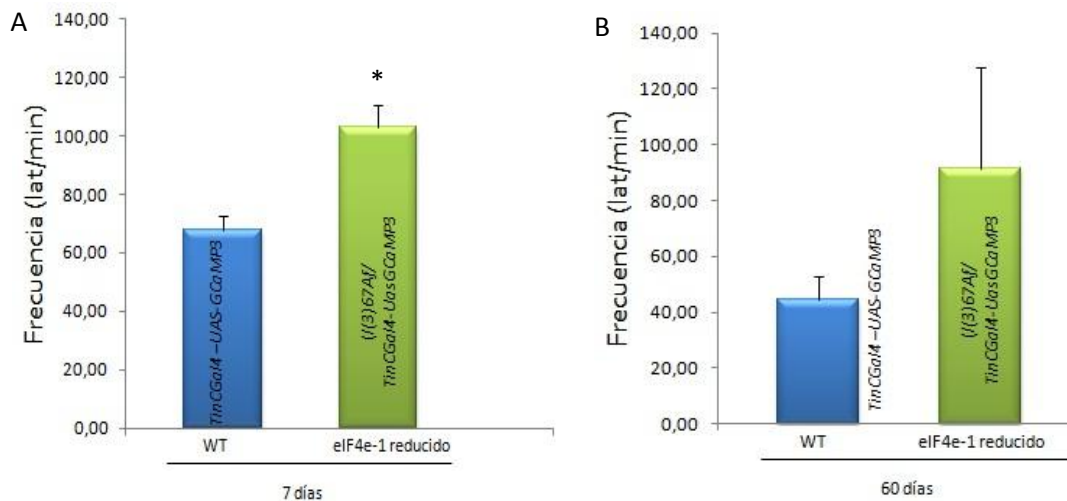


Figura 19. A: Variación de la frecuencia cardíaca entre las distintas líneas de moscas a los 7 días de edad. Salvaje (WT) n=38, transgénica n=16, * $p \leq 0,05$ B: Variación de la frecuencia cardíaca entre moscas salvajes y transgénicas a los 60 días de edad. Salvaje (WT) n=2, transgénica n=3.

La sobreexpresión de TOR aumenta la frecuencia cardíaca.

La sobreexpresión de TOR incrementa la frecuencia cardíaca en comparación con moscas salvajes a edades tempranas. No se muestran datos de TOR para moscas de 60 días debido a la falta de moscas de esa edad.

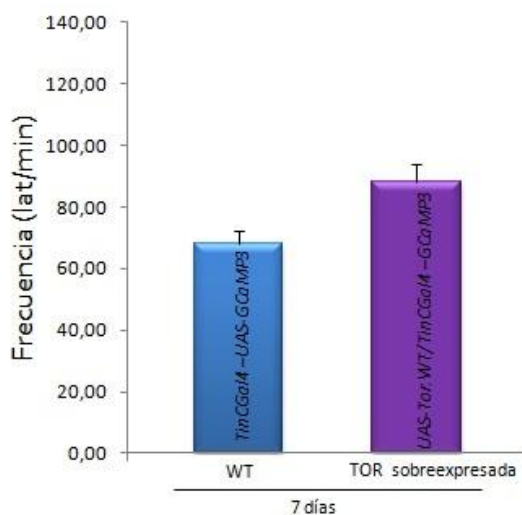


Figura 20. Variación en la frecuencia cardíaca entre moscas salvajes y transgénicas a los 7 días de edad. Salvaje (WT) n= 38, transgénica n=14.

La disminución de los niveles de expresión de eIF4E disminuye el índice de arritmias.

Se analizó el índice de arritmias como la desviación estándar del período cardíaco para las distintas líneas de moscas tanto a los 7 como 60 días de edad. La reducción de eIF4E disminuye el índice de arritmias a los 7 y 60 días de edad.

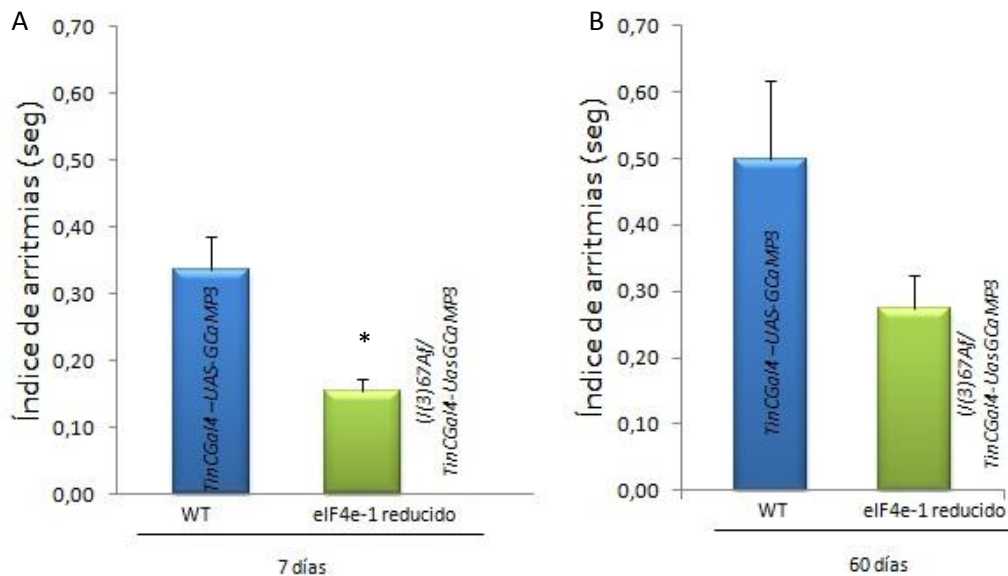


Figura 21. Variación del índice de arritmias entre las moscas salvajes y transgénicas a los 7 de edad. Salvaje (WT) n=38, transgénica n=14, * p<0,05. Variación del índice de arritmias entre moscas salvajes y transgénicas a los 60 días de edad: Salvaje (WT) n=4, transgénica n=3.

La sobreexpresión de TOR reduce el índice de arritmias.

De manera similar al efecto provocado por la reducción de eIF4E, el aumento en los niveles de expresión de TOR reduce el índice de arritmias en moscas de 7 días. No contamos aún con datos para moscas de 60 días.

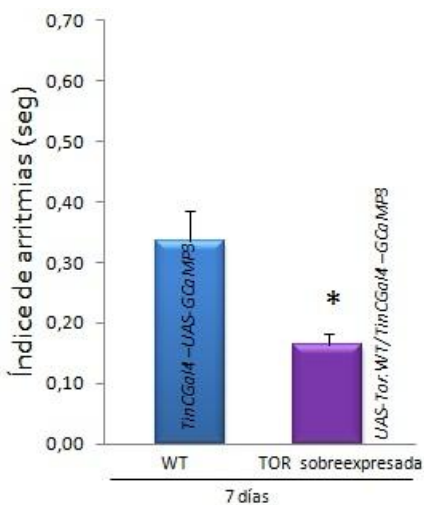


Figura 22. Variación del índice de arritmias entre moscas salvajes y transgénicas a los 7 días de edad. Salvaje (WT) n=38, transgénica n=14, * p<0,05.

La disminución de los niveles de expresión de eIF4E reduce la amplitud de los transitorios de Ca^{2+}_i .

Se produjo una disminución en la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i a los 7 días de edad. Debido a la irregularidad de la señal en los registros para moscas de 60 días en principio este parámetro no pudo ser evaluado a dicha edad.

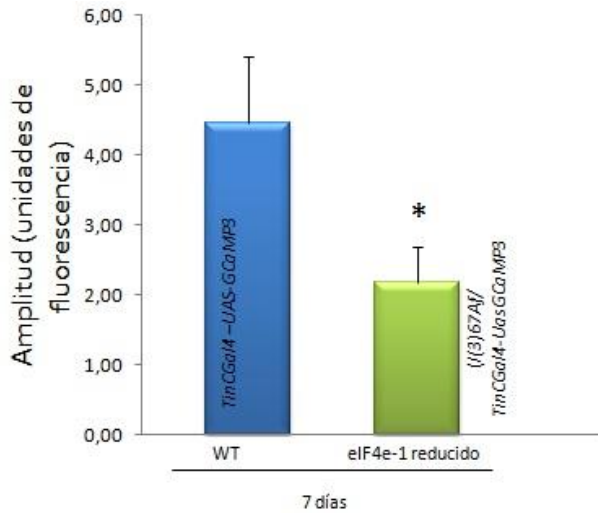


Figura 23. Variación de la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i entre moscas salvajes y transgénicas a los 7 días de edad. Salvaje (WT) n=34, transgénicas n=13, * p<0,05

El aumento de expresión de TOR tiende a reducir la amplitud de los transitorios de Ca^{2+}_i .

Los resultados obtenidos en moscas que sobreexpresan TOR muestran una tendencia a reducir la amplitud, si bien no son al momento, significativamente diferentes. En principio se atribuye a la necesidad de un mayor número de muestras para reducir la variabilidad de los valores.

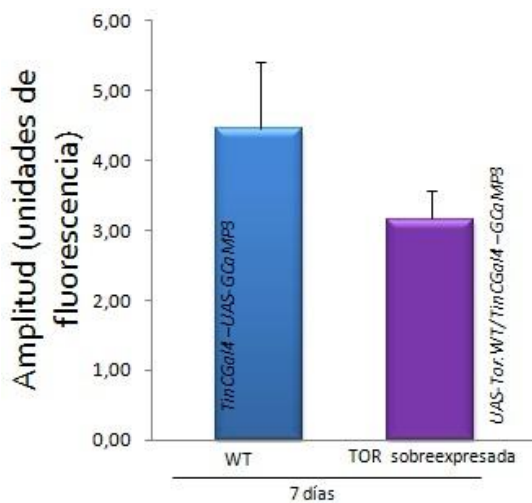


Figura 24. Variación en la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i entre moscas salvajes y transgénicas a los 7 días de edad. Salvaje (WT) n=34, transgénica n=14.

La disminución de los niveles de expresión de eIF4E reduce la duración del transitorio de Ca^{2+}_i .

Tanto a 7 como a 60 días, la disminución en la expresión de eIF4E contribuye a una reducción en la duración del transitorio de Ca^{2+}_i . Estos resultados, son consistentes con un aumento de la frecuencia cardíaca observado en las líneas transgénicas.

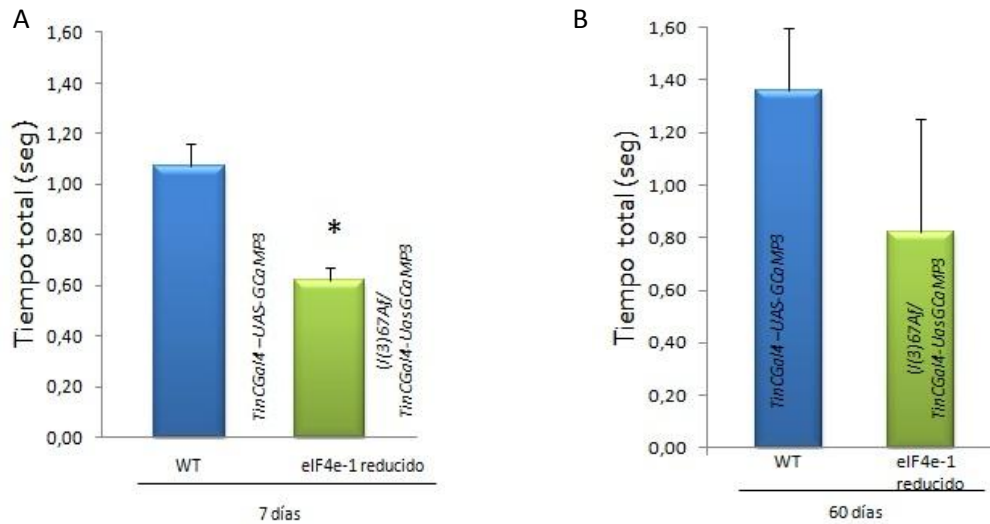


Figura 25. Variación en el tiempo total de duración del transitorio de Ca^{2+}_i entre moscas salvajes y transgénicas que presentan una disminución en los niveles de eIF4E a los 7 (A) y 60 días de edad (B). 7 días: Salvaje (WT) n=37, transgénica n=16, * p≤0,05. 60 días: Salvaje (WT) n=2, transgénica n=3.

La sobreexpresión de TOR reduce la relajación del transitorio de Ca^{2+}_i .

De manera similar a lo que ocurre con la reducción de eIF4E-1, el aumento de la frecuencia cardíaca se corresponde con la reducción de la duración del transitorio de Ca^{2+}_i en la línea de moscas que sobreexpresa la quinasa TOR. Debido a la falta de individuos de 60 días de la línea TOR este dato no se muestra.

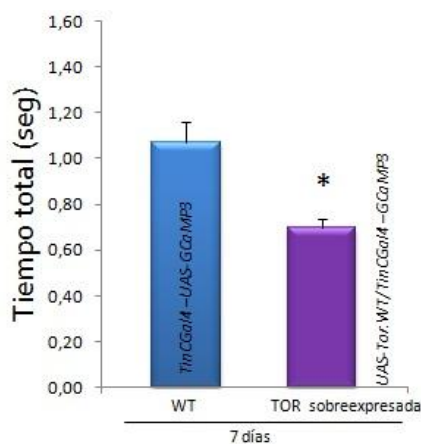


Figura 26. Variación del tiempo total de duración del transitorio de Ca^{2+}_i entre moscas salvajes y transgénicas a los 7 días de edad. Salvaje (WT) n=37, transgénica n=14, * p≤0,05.

La disminución de los niveles de expresión de eIF4E no modifica la relajación del transitorio de Ca^{2+}_i .

El análisis del $t_{1/2}$ de las distintas líneas a los 7 días de edad muestran que la reducción de eIF4E no modifica el $t_{1/2}$. No se muestran datos de moscas de 60 días debido a la complejidad del registro, por lo que no se pudo medir este parámetro.

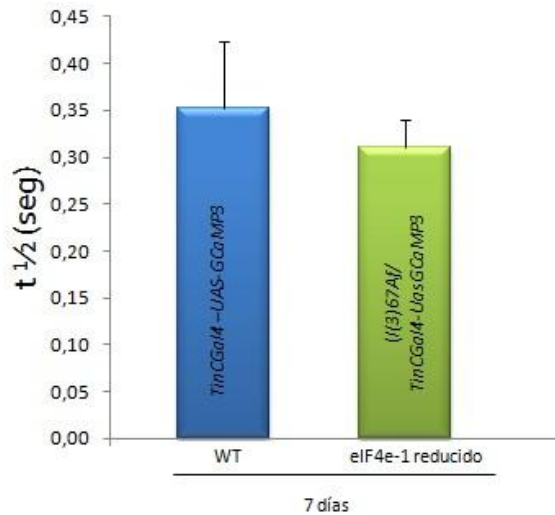


Figura 27. Valores de $t_{1/2}$ entre las distintas líneas de moscas a los 7 días de edad. Salvaje (WT) n=18, transgénica n=16.

La sobreexpresión de TOR no modifica la cinética del transitorio de Ca^{2+}_i .

Se observa que el $t_{1/2}$ no se modifica en las moscas que sobreexpresan la quinasa TOR, comparadas con moscas salvajes a los 7 días de edad. Debido a la falta de individuos de la línea TOR de 60 días, este parámetro no se muestra en los resultados.

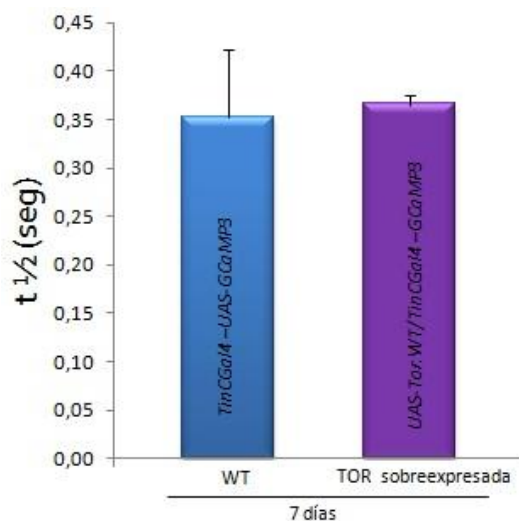


Figura 28. Cinética del transitorio de Ca^{2+}_i observada en moscas salvajes y transgénicas. Salvaje (WT) n=18, transgénica n=1

Discusión

En este trabajo caracterizamos la función cardíaca de *Drosophila melanogaster* a dos edades diferentes con el objeto de estudiar luego, la acción de proteínas que podrían alterar dicha función. Estudios llevados a cabo por otros grupos de investigación (Ocorr y col, 2007, Wessells y col, 2009), muestran que el envejecimiento conlleva la aparición de arritmias y falla cardíaca.

Estudiamos aspectos de la contractilidad en *Drosophila* mediante el uso del sistema reportero que produce una proteína sensible a los aumentos del Ca^{2+}_i diseñado por Lin y col, 2011, cedido por el Dr Mathew Wolf. Para cumplir el objetivo 1, mediante este trabajo pusimos a punto el preparado semi-intacto y los métodos de obtención y cuantificación de parámetros cardíacos. Utilizamos este tipo de preparado semi-intacto para eliminar la influencia neuronal sobre el corazón. La observación de cambios en la fluorescencia del sistema reportero, se diferencia de los métodos empleados por otros grupos de investigación que utilizan técnicas como tomografía de coherencia óptica (Ocorr y col, 2007). No utilizamos indicadores, cuya dificultad para atravesar las membranas celulares ha sido descripta (Lin y col, 2011) y además, el sistema reportero GCaMP3 cedido para nuestros experimentos, no había sido probado aún mediante su inducción con Gal4. El objetivo 1 consistía en poder analizar mediante los parámetros descriptos en este trabajo, cambios de la función cardíaca en *Drosophila*. Pusimos a punto este sistema y mediante la caracterización del transitorio de Ca^{2+} , observamos que la edad reduce la frecuencia cardíaca y aumenta las arritmias. No pudimos discriminar sistemáticamente aún entre EADs y DADs, tipos de arritmias que se describen en la introducción. En algunas moscas hemos observado latidos ectópicos que por su aparición en el tiempo, se disparan cuando el latido previo no ha finalizado, lo que podría sugerir que se trata de EADs. Sin embargo, un estudio más exhaustivo será necesario para confirmar que se trata de latidos ectópicos y el incremento de la arritmicidad no sea debido solamente a la variabilidad de la frecuencia cardíaca.

A continuación, estudiamos la proteína eIF4E. En primer lugar, hicimos una búsqueda en las bases de datos y un análisis informático para analizar la homología entre distintas isoformas de eIF4E en el humano y en *Drosophila*. Establecimos similitudes y diferencias entre las isoformas. Inicialmente en este trabajo, modificamos los niveles de expresión de la isoforma eIF4E-1 mediante el uso de una línea transgénica heterocigota que presenta una reducción sistémica de los niveles de esta proteína. Hallamos que una reducción de los niveles proteicos de eIF4E-1 aumenta la frecuencia cardíaca y reduce las arritmias. Esto último se corresponde con lo observado por Wessells y col, 2009, mediante experimentos en los que la sobreexpresión en corazón de eIF4E aumenta la falla cardíaca inducida por estimulación eléctrica. Sin

embargo, aquí analizamos estos aspectos a frecuencia espontánea sin estimulación.

Por otro lado, la reducción de los niveles de eIF4E-1 redujo la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i pero no modificó su cinética. Aún no conocemos el mecanismo por el cual la reducción de eIF4E modifica la contractilidad (amplitud). Además, estos resultados indican una acción de eIF4E en el tejido cardíaco, independiente a su rol canónico como factor de traducción, dado que en la condición heterocigota con menores niveles de eIF4E no se altera esta función (Hernández y col, 2005). Experimentos en curso están dirigidos a dilucidar si la sobreexpresión en tejido cardíaco de eIF4E, rescata el fenotipo salvaje, modificado por la reducción sistémica de la proteína.

No conocemos cual es el rol que tiene eIF4E para que cambios en sus niveles de expresión tengan efectos funcionales como los observados. Una posibilidad es que eIF4E interactúe con proteínas presentes en corazón relevantes para la función cardíaca. Podría, como factor de inicio de la traducción, afectar los niveles de expresión de proteínas que intervienen en el manejo del Ca^{2+}_i . Para ello estamos poniendo a punto la técnica de western blot con el objeto de analizar niveles de expresión de proteínas que intervienen en el acoplamiento éxcito-contráctil y hacer experimentos de coimmunoprecipitación con eIF4E-1, para conocer posibles interactores de un complejo proteico con eIF4E. Si bien hemos iniciado estos experimentos, sobre todo enfocándonos en detectar niveles de expresión de eIF4E mediante western blot, aún no resolvimos aspectos técnicos para visualizar correctamente la proteína, tarea que se encuentra en curso.

Estudios posteriores dentro de los cuales se enmarca este trabajo final de grado, se enfocan en estudiar las otras isoformas de eIF4E en corazón.

Dado que eIF4E es un efector de la vía TOR, presente en los eucariotas, estudiamos la quinasa serina/treonina TOR. Según lo conocido hasta el momento, la quinasa TOR forma dos complejos: TORC1 y TORC2, ambos diferencialmente regulados. El complejo TORC1 actúa sobre la proteína 4E-BP y S6K, fosforilándolas, tanto en *Drosophila* como en el mamífero (De Virgilio y Loewith, 2006; Wessells y col, 2009). Otros estudios indican también que TOR regula a S6k por inhibir a una fosfatasa más que por fosforilarla directamente (revisado en Bjornsti y Houghton, 2004). Según lo conocido, cuando TOR está activa fosforila a 4E-BP. 4E-BP normalmente interactúa con eIF4E y lo aparta de la maquinaria de inicio de la traducción, por lo cual tiene efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas. Si 4E-BP está fosforilada, no interactúa con eIF4E y este factor se encuentra disponible para traducir.

Estudios en donde sobreexpresaron TOR en corazón, observaron los mismos efectos que al sobreexpresar eIF4E, ya que integran una misma vía (Wessells y col, 2009). Se observó además, que el retraso en el envejecimiento

cardíaco observado cuando la vía TOR está parcialmente inactivada, podría ser debido a un aumento de actividad de 4E-BP, que inhibiría a eIF4E.

De manera contraria en un trabajo realizado en ratones, la reducción de TOR en tejido cardíaco indujo un aumento de la expresión de 4E-BP y daño de la función cardíaca. Esta ablación produjo cardiomiopatía dilatada, caracterizada por apoptosis, autofagia, estructura mitocondrial alterada y acumulación de 4E-BP. El grupo concluye que la pérdida de fosforilación de 4E-BP cuando se ablaiona mTOR, reduce su degradación y por lo tanto se acumula. Estos ratones expuestos a sobrecarga de presión mostraron progresión acelerada de insuficiencia cardíaca.

En este trabajo abordamos el estudio de TOR y su rol sobre la fisiopatología cardiovascular, en *Drosophila*.

En primer lugar, nuestro análisis informático muestra que TOR se encuentra conservada en *Drosophila* y en humano. Luego, evaluamos la función cardíaca mediante el aumento de los niveles de expresión de TOR en corazón. Nuestros resultados muestran que a edades tempranas la activación de TOR es beneficiosa, puesto que la sobreexpresión reduce las arritmias. Los resultados arrojan las mismas tendencias que al reducir los niveles de eIF4E. Este resultado es inesperado, porque de acuerdo a lo conocido, sobreexpresar TOR, aumentaría la fosforilación de 4E-BP, liberando más eIF4E disponible y funcional para sintetizar proteínas que impacten de manera negativa, directa o indirectamente, sobre la función cardíaca.

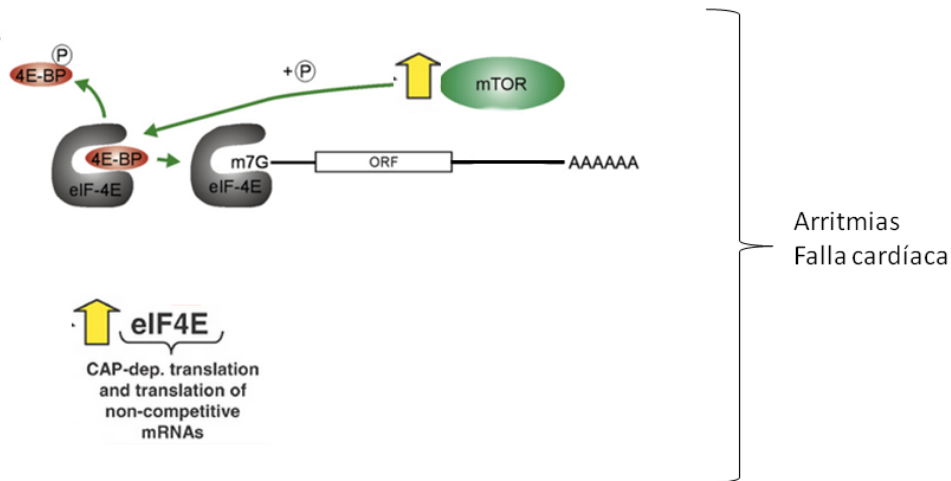
Una posible explicación es que TOR tenga otros efectores en corazón, relacionados o no con eIF4E. Si es lo primero, la activación de otros efectores por TOR, regularía negativamente a eIF4E. Otra posibilidad es que eIF4E interactúe con otras proteínas no relacionadas con la vía (figura 29). Tal vez eIF4E mediante una posible interacción con proteínas aún desconocidas, afecte la función cardíaca sin intervenir como factor de traducción. Otros roles nuevos de eIF4E aún no completamente dilucidados también han sido descritos (Ferrero y col, 2012, Ferrero y col, resultados no publicados). Experimentos en curso están dirigidos a sobreexpresar TOR en la línea transgénica que presenta niveles reducidos de eIF4E.

Dado que la acción de estas proteínas podría variar durante el envejecimiento, repetiremos los estudios en moscas de 60 días. Si bien aquí presentamos algunos resultados, no son suficientes para confirmar el efecto de la modificación de estas proteínas con la edad.

De acuerdo a lo expuesto, experimentos futuros nos permitirán disecar componentes de esta vía de señalización aún no conocidos. Las cualidades de *Drosophila*, nos permiten realizar manipulaciones drásticas y en menor tiempo

que en otros modelos animales, con el propósito de extrapolar resultados a la condición del mamífero.

Modelo vigente



Modelo planteado según nuestros resultados

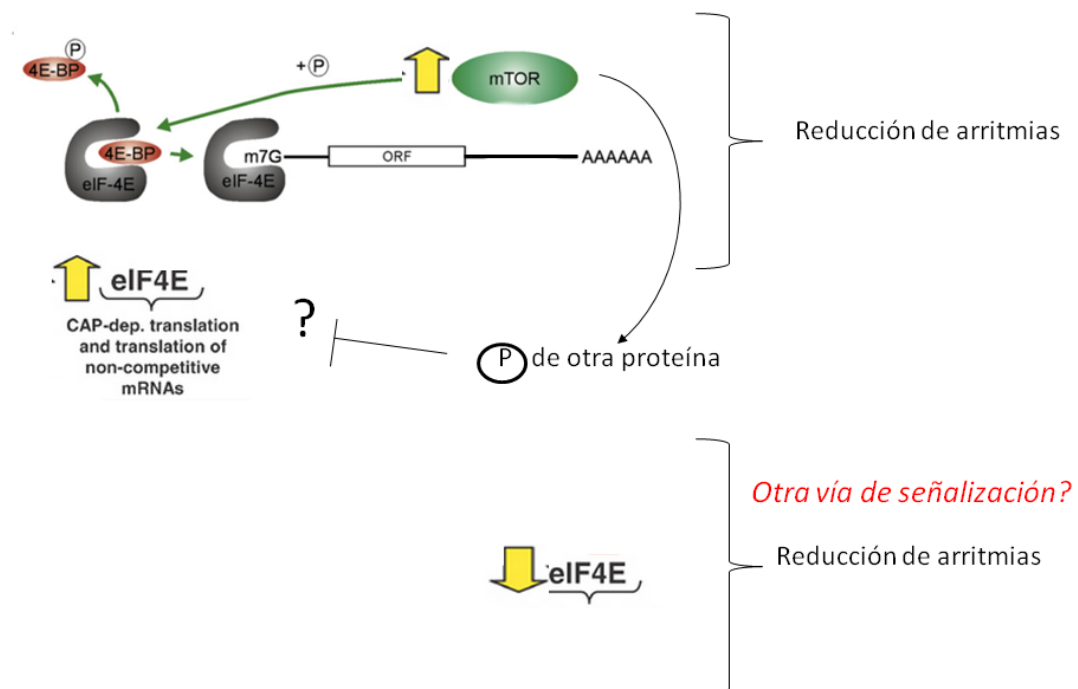


Figura 29. Esquema que muestra nuestro modelo en función de los resultados obtenidos, que presenta diferencias con el modelo vigente sobre el rol de la vía TOR en la función cardiovascular.

Conclusiones

La reducción de los niveles de expresión de eIF4E tiene impacto sobre la función cardíaca: reduce las arritmias, aumenta la frecuencia y reduce la amplitud. No modifica la cinética del transitorio de Ca^{2+}_i .

La sobreexpresión de la quinasa TOR reduce las arritmias, aumenta la frecuencia, tiende a reducir la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i y no modifica la cinética.

TOR y eIF4E participarían en vías distintas de señalización, o un intermediario no conocido activado por TOR promovería un efecto inhibitorio sobre eIF4E cuando TOR se encuentra sobreexpresada.

Bibliografía

Ambegaokar SS, Roy B, Jackson GR. Neurodegenerative models in *Drosophila*: polyglutamine disorders, Parkinson disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2010; 40(1):29-39.

Anderson ME. Multiple downstream proarrhythmic targets for calmodulin kinase II: moving beyond an ion channel-centric focus. *Cardiovasc Res.* 2007; 73(4):657-66.

Bers DM. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda)*. 2006; 21:380-7.

Bier, E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* 2005; 6(1):9–23.

Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(5):335-48.

Bloemink MJ, Melkani GC, Dambacher CM, Bernstein SI, Geeves MA. Two *Drosophila* myosin transducer mutants with distinct cardiomyopathies have divergent ADP and actin affinities. *J Biol Chem* 2011; 286(32):28435-43.

Cammarato A, Ahrens CH, Alayari NN, Qeli E, Rucker J, Reedy MC, Zmasek CM, Gucek M, Cole RN, Van Eyk JE, Bodmer R, O'Rourke B, Bernstein SI, Foster DB. A mighty small heart: the cardiac proteome of adult *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 2011; 6(4) e18497.

Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev.* 1999; 79(3):917-1017.

Cingolani HE-Houssay AB. *Fisiología humana*. Ed El Ateneo, Buenos Aires. 7ma edición. 2000, 260-264.

Claverie JM, Notredame C. *Bioinformatics por Dummies*, 2da edición. Wiley Publishing, Inc. 2007.

Cooper AS, Rymond KE, Ward MA, Bocoock EL, Cooper RL. Monitoring heart function in larval *Drosophila melanogaster* for physiological studies. *J Vis Exp* 2009;16(33) e1596.

Crozier SJ, Zhang X, Wang J, Cheung J, Kimball SR, Jefferson LS. Activation of signaling pathways and regulatory mechanisms of mRNA translation following myocardial ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol (1985)*. 2006; 101(2):576-82.

Curtis NJ, Ringo JM, Dowse HB. Morphology of the pupal heart, adult heart, and associated tissues in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *J Morphol* 1999; 240(3):255-35.

De Virgilio C, Loewith R . The TOR signalling network from yeast to man. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38(9):1476-81.

Duffy JB. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis.* 2002; 34(1-2):1-15.

Dowse H, Ringo J, Power J, Johnson E, Kinney K, White L. A congenital heart defect in *Drosophila* cause by an action-potential mutation. *J Neurogenet* 1995; 10(3):153-68.

Dulcis D, Levine RB. Innervation of the heart of the adult fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol.* 2003; 465(4):560-78.

Dulcis D, Levine RB. Glutamatergic innervations of the heart initiates retrograde contractions in adult *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 2005; 25(2):271–80.

Ferrero PV, Layana C, Paulucci E, Gutiérrez P, Hernández G, Rivera-Pomar RV. Cap binding-independent recruitment of eIF4E to cytoplasmic foci. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1823(7):1217-24.

Gingras, AC, Raught, B, Sonenberg, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 1999; 68, 913–963.

Gross, JD, Moerke, N., von der Haar, T, Lugovskoy, AA, Sachs, AB, McCarthy, JEG, Wagner, G. Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 2003; 115, 739–750.

Hernández G, Altmann M, Sierra JM, Urlaub H, Diez del Corral R, Schwartz P, Rivera-Pomar R. Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. *Mech Dev.* 2005; 122(4):529-43.

Hernández G, Han H, Gandin V, Fabian L, Ferreira T, Zuberek J, Sonenberg N, Brill JA, Lasko P. Eukaryotic initiation factor 4E-3 is essential for meiotic chromosome segregation, cytokinesis and male fertility in *Drosophila*. *Development.* 2012; 139(17):3211-20.

Johnson E, Sherry T, Ringo J, Dowse H. Modulation of the cardiac pacemaker of *Drosophila*: cellular mechanisms. *J Comp Physiol B* 2002;172(3):227-36.

Joshi, B, Cameron, A, Jagus, R, Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur. J. Biochem.* 2004; 271, 2189–2203.

Kaushik G, Fuhrmann A, Cammarato A, Engler AJ. In situ mechanical analysis of myofibrillar perturbation and aging on soft, bilayered *Drosophila* myocardium. *Biophys J.* 2011; 101(11):2629-37.

Lachance, PED, Miron, M, Raught, B, Sonenberg, N, Lasko, P. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is critical for growth. *Mol. Cell. Biol.* 2002; 22,1656–1663.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. 15;227(5259):680-5.

Layana C, Ferrero P, Rivera-Pomar R. Cytoplasmic Ribonucleoprotein Foci in Eukaryotes: Hotspots of Bio (chemical) Diversity. *Comp Funct Genomics.* 2012; 2012:504292.

Li A, Zhou C, Moore J, Zhang P, Tsai TH, Lee HC y col. Changes in the expression of the Alzheimer's disease-associated presenilin gene in *Drosophila* heart leads to cardiac dysfunction. *Curr Alzheimer Res* 2011; 8(3):313-22.

Lin N, Badle N, Yu L, Abraham D, Cheng H, Bursac N y col. A method to measure myocardial calcium handling in adult *Drosophila*. *Circ Res* 2011; 108(11):1306-15.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. *Biología celular y molecular.* 5ta Edición. Editorial Medica Panamericana, 2005; 457-458.

Marcotrigiano, J, Gingras, AC, Sonenberg, N, Burley, SK. Cocystal structure of the messenger RNA 50 cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 1997; 89, 951–961.

Maroto FG, Sierra JM. Purification and characterization of mRNA cap-binding protein from *Drosophila melanogaster* embryos. *Mol Cell Biol.* 1989; 9(5):2181-90.

Matsuo, H, Li, H, McGuire, AM, Fletcher, CM, Gingras, AC, Sonenberg, N, Wagner, G. Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat. Struct. Bio* 1997; 717–724.

McKendrick, L, Morley, SJ, Pain, VM, Jagus, R, Joshi, B. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) at Ser209 is not required for protein synthesis in vitro and in vivo. *Eur. J. Biochem.* 2001; 268, 5375–5385.

Medioni C, Senatore S, Salmand PA, Lalevee N, Perrin L, Semeriva M. The fabulous destiny of the *Drosophila* heart. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19(5):518-25.

Michlewski G, Sanford JR, Cáceres JF. The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol Cell.* 2008 25;30(2):179-89.

Monfredi O, Maltsev VA, Lakatta EG. Modern concepts concerning the origin of the heartbeat. *Physiology (Bethesda).* 2013; 28(2):74-92.

Monier B, Astier M, Sémériva M, Perrin L. Steroid-dependent modification of Hox function drives myocyte reprogramming in the *Drosophila* heart. *Development*. 2005;132(23):5283-93.

Ocorr K, Reeves NL, Wessells RJ, Fink M, Chen HS, Akasaka T, Yasuda S, Metzger JM, Giles W, Posakony JW, Bodmer R. KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(10):3943–8.

Pastor Pareja JC, Blanco, EM, Garcia-Bellido, A. Eversión y cierre de los discos imaginales. *Investigación y ciencia* 2006:72-81.

Paternostro G, Vignola C, Bartsch DU, Omens JH, McCulloch AD, Reed JC. Age-associated cardiac dysfunction in *Drosophila melanogaster*. *Circ Res* 2001; 88(10):1053-58.

Rizki TM, Rizki RM. Larval adipose tissue of homoerotic bithorax mutants of *Drosophila*. *Dev Biol* 1978; 65(2):476-82.

Rulifson EJ, Kim SK, Nusse R. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science* 2002; 296(5570):1118-20.

Sanyal S, Jennings T, Dowse H, Ramaswami M. Conditional mutations in SERCA, the sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, alter heart rate and rhythmicity in *Drosophila*. *J Comp Physiol B* 2006; 176(3):253-63.

Scheper GC, Morrice NA, Kleijn M, Proud CG. The mitogen-activated protein kinase signal-integrating kinase Mnk2 is a eukaryotic initiation factor 4E kinase with high levels of basal activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(3):743-54.

Scheper, GC, van Kollenburg, B, Hu, J, Lou, Y, Goss, DJ, Proud, CG, Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *J. Biol. Chem*. 2002; 277,3303–3309.

Soesanto W, Lin HY, Hu E, Lefler S, Litwin SE, Sena S, Abel ED, Symons JD, Jalili T. Mammalian target of rapamycin is a critical regulator of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2009; 54(6):1321-7.

Taghli-Lamalle Oy col. Dystrophin deficiency in *Drosophila* reduces lifespan and causes a dilated cardiomyopathy phenotype. *Aging Cell* 2008; 7(2):237-49.

Tomoo, K, Shen, J, Okabe, K, Nozoe, Y, Fukuhara, S, Morino, S, Ishida T, Taniguchi T, Hasegawa H, Terashima A, Sasaki M, Katsuya Y, Kitamura K, Miyoshi H, Ishikawa M, Miura K. Crystal structures of 7-methylguanosine 50-triphosphate (m7GTP)- and P1-7-methylguanosine-P3-adenosine-50, 50-triphosphate (m7GpppA)-bound human full-length eukaryotic initiation factor 4E:

biological importance of the C-terminal flexible region. *Biochem. J.* 2002; 362, 539–544.

Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XF. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today.* 2007;12(3-4):112-24.

Vasilescu S, Ptushkina M, Linz B, Müller PP, McCarthy JE. Mutants of eukaryotic initiation factor eIF-4E with altered mRNA cap binding specificity reprogram mRNA selection by ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 1996;271(12):7030-7.

Vogler G, Ocorr K. Visualizing the beating heart in *Drosophila*. *J Vis Exp* 2009; (31).

Wang CY, Kim HH, Hiroi Y, Sawada N, Salomone S, Benjamin LE, Walsh K, Moskowitz MA, Liao JK. Obesity increases vascular senescence and susceptibility to ischemic injury through chronic activation of Akt and mTOR. *Sci Signal.* 2009; 2(62):ra11.

Wang X, Flynn A, Waskiewicz AJ, Webb BL, Vries RG, Baines IA, Cooper JA, Proud CG. The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. *J Biol Chem.* 1998; 273(16):9373-7.

Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* 1997; 16(8):1909-20.

Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR, Cooper JA. Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(3):1871-80.

Wasserthal LT. *Drosophila* flies combine periodic heartbeat reversal with a circulation in the anterior body mediated by a newly discovered anterior pair of ostial valves and 'venous' channels. *J Exp Biol* 2007; 210(Pt 21):3707-19.

Wessells R, Fitzgerald E, Piazza N, Ocorr K, Morley S, Davies C, Lim HY, Elmén L, Hayes M, Oldham S, Bodmer R. d4eBP acts downstream of both dTOR and dFoxo to modulate cardiac functional aging in *Drosophila*. *Aging Cell.* 2009; 8(5):542-52.

Wieczorek Z, Zdanowski K, Chlebicka L, Stepiński J, Jankowska M, Kierdaszuk B, Temeriusz A, Darzynkiewicz E, Stolarski R. Source Fluorescence and NMR studies of intramolecular stacking of mRNA cap-analogues. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1354(2):145-52.

Wolf MJ, Amrein H, Izatt JA, Choma MA, Reedy MC, Rockman HA. *Drosophila* as a model for the identification of genes causing adult human heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(5):1394-9.

Yang Z, Ming XF. mTOR signalling: the molecular interface connecting metabolic stress, aging and cardiovascular diseases. *Obes Rev.* 2012; Suppl 2:58-68.

Zhang Z, Yu B, Tao GZ. Apelin protects against cardiomyocyte apoptosis induced by glucose deprivation. *Chin Med J (Engl).* 2009;122(19):2360-5.

Zeitouni B, Sénatore S, Séverac D, Aknin C, Sémériva M, Perrin L. Signalling pathways involved in adult heart formation revealed by gene expression profiling in *Drosophila*. *PLoS Genet* 2007; 3(10):1907-21.

ANEXO I**Medio de cultivo para *Drosophila*:**

- Agua 225 ml
- Glucosa 22 g
- Levadura 4,4 g
- Agar 2,65 g
- Harina de maíz 25 g
- Nipagin 10% w/v.

Llevar los 225 ml de agua destilada a hervor, agregar la glucosa, levadura, agar y harina de maíz consecutivamente. Espesar hasta la consistencia deseada. Una vez entibiada la mezcla agregar el antimicótico y colocar en los viales.

Hemolinfa artificial:

- NaCl 108mM
- KCl 5mM
- CaCl₂ 2mM
- MgCl₂ 8mM
- NaH₂PO₄ 1mM
- NaHCO₃ 4mM
- sacarosa 10mM
- trehalosa 5mM
- HEPES (pH 7,1) 5mM.

Gel separador Laemmli 10% acrilamida:

- Acrilamida-bis (30: 0,8) 2 ml
- Tris-Hcl 1,5M pH=8,8 1,3 ml
- SDS 10% 50 µl
- APS 10% 50 µl
- Temed 5 µl
- Agua bidestilada 1,6 ml

Gel de apilamiento Laemmli 4% acrilamida:

-Acrilamida-bis (30: 0,8) 266,5 ml

-Tris-HCl 0,5M pH=6,8 500 μ l

-SDS 10% 20 μ l

-Persulfato de amonio 10% 25 μ l

-Temed 2,5 μ l

-Agua bidestilada 1,233 ml

Buffer de corrida (1 litro):

-Tris 3,03 g (25 mM, conc. Final)

-Glicina 14,4 g (192 mM, conc final)

-SDS 1g (0.1%)

Llevar a volumen final (1 litro) con agua bidestilada.

Buffer de transferencia (1 litro):

-Tris 3,0275 g (25 mM, conc. Final)

-Glicina 14,41 g (192 mM, conc final)

-Metanol 100 ml (10% vol final)

Llevar a volumen final (1 litro) con agua bidestilada.

