

SOLICITUD DE PRORROGA DE BECA

TIPO DE BECA: Estudio

FECHA DE INICIACION DE LA PRORROGA SOLICITADA: 10/2/2015

1) DATOS PERSONALES

APELLIDO: Santalla

NOMBRES: Manuela

DOCUMENTO: TIPO: DNI N°: 35098908 CLASE:

DIRECCION PARTICULAR: CALLE: 11 N°: 1372

PISO: 2 DEPTO: B LOCALIDAD: La Plata

CP: 1900 PARTIDO: La Plata

T.E: 02281-15651195 DIRECCIÓN ELECTRÓNICA (que no sea Hotmail):

santallamanuela@gmail.com

ESTADO CIVIL: Soltero CANTIDAD DE HIJOS: 0

N° DE CUIL: 20-35098908-1

2) TEMA DE INVESTIGACIÓN

TEMA DE INVESTIGACIÓN: Rol de eIF4E en el desarrollo de arritmias cardíacas

Una nueva función de un futuro posible blanco terapéutico

DESCRIPCIÓN DEL PLAN (no más de 500 palabras): Hasta el momento se han logrado reproducir y estudiar patologías cardíacas humanas en otros mamíferos. En los últimos años, un nuevo organismo ha cobrado importancia en el área: *Drosophila melanogaster*. Presenta excelentes ventajas como modelo de estudio, su transcriptoma y proteoma cardíaco están descriptos y sus genes se encuentran conservados con los de humanos.

Utilizamos a *Drosophila melanogaster* para estudiar efecto del envejecimiento sobre la función cardíaca. Los estudios iniciales se enfocaron en genes que codifican proteínas responsables del acoplamiento eléctrico contráctil, necesario para la actividad cardíaca, como la quinasa dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII). En los mamíferos alteraciones de la actividad y/o expresión de esta quinasa se asocian a patologías durante el envejecimiento. Nosotros probamos cómo el envejecimiento y la sobreexpresión de CaMKII en *Drosophila melanogaster* altera el manejo del calcio intracelular (Ca²⁺). Los

resultados dieron lugar a una publicación (Santalla y col, 2014) y a presentaciones a congresos.

Además, en el plan de trabajo iniciamos estudios sobre proteínas que recientemente han sido vinculadas a la fisiopatología cardíaca en *Drosophila melanogaster*, como el factor de inicio de la traducción, eIF4E, integrante de la vía TOR (target of rapamicin) cuya función principal es promover la traducción en todos los tejidos. Sin embargo, efectos sobre la contractilidad cardíaca dependientes o independientes de la traducción, no han sido considerados aún en humanos ni en ningún otro modelo experimental. En este sentido, *Drosophila melanogaster* constituye una excelente plataforma para ensayos genéticos y fisiológicos sobre los cuales obtener información y potencialmente extrapolar al humano dado que eIF4E y otros genes de la vía TOR se encuentran conservados.

El plan se enfocó en estudiar efectos del envejecimiento sobre la función cardíaca en moscas con niveles diferenciales de expresión y/o activación de eIF4E y otros integrantes de la vía TOR. Utilizamos moscas transgénicas que contienen un sistema reportero fluorescente el cual sensa cambios en el Ca^{2+} . Estas moscas también sobreexpresan copias extra de eIF4E, o bien presentan una reducción en sus niveles mediante una copia mutante del gen. En paralelo, se iniciaron estudios con líneas transgénicas sobre otros integrantes de la vía TOR. Los parámetros medidos fueron frecuencia cardíaca, presencia de arritmias, tiempos de aumento y reducción de la señal fluorescente, intensidad de dicha señal, entre otros. Resultados preliminares indican que la función cardíaca y el manejo del Ca^{2+} se encuentran alterados en las distintas líneas transgénicas con niveles diferenciales de expresión de estos genes. Posiblemente, el mecanismo subcelular que medie esta respuesta, tenga que ver con la acción de eIF4E y efectores de la vía TOR en corazón, sobre la expresión/función de las proteínas que manejan el Ca^{2+} . Experimentos en curso- por los cuales se solicita la presente prórroga de beca- están enfocados en dilucidar dicho mecanismo.

Trabajo publicado como producto de las actividades realizadas en el período informado:

- Aging and CaMKII alter intracellular Ca^{2+} transients and heart rhythm in *Drosophila melanogaster*. Santalla M, Valverde CA, Harnichar E, Lacunza E, Aguilar-Fuentes J, Mattiazzi A, Ferrero P. PLoS One. 2014 Jul 8;9(7):e101871

3) DIRECTOR DEL BECARIO

APELLIDO Y NOMBRES: Ferrero, Paola Viviana

TITULO: Doctor en Ciencias Naturales

DIRECCIÓN ELECTRÓNICA: paoferrero@gmail.com

4) CO-DIRECTOR DEL BECARIO (Si corresponde)

APELLIDO Y NOMBRES:

TÍTULO:

DIRECCIÓN ELECTRÓNICA:

5) LUGAR DE TRABAJO (Indicar Universidad, Facultad, Departamento, Cátedra, etc.)

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata

FACULTAD: Ciencias Médicas

DEPARTAMENTO:

CATEDRA:

OTROS: Centro de Investigaciones Cardiovasculares.UNLP-CONICET

DIRECCION DEL LUGAR DE TRABAJO:

CALLE: 60 y 120 N°: s/n°

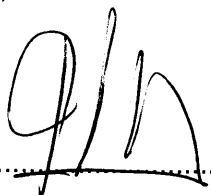
LOCALIDAD: La Plata CP: 1900

T.E:

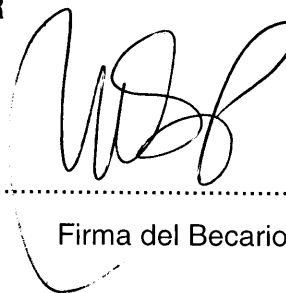
6) AREA TEMÁTICA A LA QUE PERTENECE

Indicar una de las siguientes:

MEDICINA, BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



Firma del Director



Firma del Becario

NOTA: La presente solicitud deberá estar acompañada del Informe de Tareas desarrolladas por el Becario.

Labor realizada en el período abril 2014- febrero 2015

Rol de eIF4E en el desarrollo de arritmias cardíacas
Una nueva función de un futuro posible blanco terapéutico

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

La quinasa dependiente de calcio y calmodulina II (CaMKII) es un componente fundamental del manejo de calcio intracelular (Ca^{2+}) durante el acoplamiento éxito-contráctil (AEC). Es sabido que, en mamíferos, los cambios en los niveles de expresión de CaMKII conducen a distintas patologías cardíacas, entre ellas, la generación de arritmias.

En humanos, el envejecimiento conduce a una mayor incidencia de enfermedades cardíacas, tales como hipertensión, mayor riesgo de infarto y arritmias. 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.

En *Drosophila*, la vía en la que interviene dTOR (el homólogo de mamíferos), media el envejecimiento cardíaco (Wessells y col, 2009). La actividad de dTOR en el miocardio es importante para regular la sensibilidad cardíaca al stress y la reducción de su actividad promueve el mantenimiento de una función cardíaca juvenil durante el envejecimiento. La actividad de eIF4E es suficiente para inducir síntomas prematuros de envejecimiento funcional cardíaco, mientras que su regulador negativo 4E-BP, es suficiente para disminuir o incluso bloquear tales síntomas. A su vez, se evidenció que el incremento en la expresión cardíaca de eIF4E en edades tempranas causa un elevado incremento de arritmias, similares a las observadas normalmente en moscas adultas. Por lo tanto, estudiar la activación de esta vía y la acción de efectores como eIF4E en la fisiopatología cardíaca en *Drosophila* pueden aportar conocimiento nuevo extrapolable a mamíferos dado el grado de conservación entre las proteínas.

El **objetivo general** es caracterizar la función cardíaca de *Drosophila melanogaster* y estudiar proteínas que intervienen en el acoplamiento éxito-contráctil y manejo del calcio intracelular (Ca^{2+}) y, puesto que, eIF4E participa en la vía que media el

envejecimiento cardíaco (Wessells y col, 2009) nos propusimos estudiar cómo eIF4E se vincula a la arritmogénesis en nuestro modelo midiendo aumentos transitorios de Ca^{2+} .

Dentro de este marco, formulamos la siguiente **hipótesis**: el envejecimiento produce cambios en la fisiología cardíaca posiblemente asociados a anomalías en el manejo del Ca^{2+} . Además, cambios en los niveles de la quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKII) y de eIF4E se vinculan a la aparición y desarrollo de arritmias.

Objetivos específicos de este primer período:

- 1.- Evaluar la función cardíaca y el aumento transitorio de Ca^{2+} en adultos de dos edades diferentes (7 y 40 días) en una línea transgénica de moscas que expresa una proteína sensible al aumento de Ca^{2+} en el corazón.
- 2.- Evaluar la función cardíaca y el aumento transitorio de Ca^{2+} en adultos de 7 y 40 días con niveles normales de CaMKII y adultos con niveles aumentados de la quinasa.

Los **abordajes experimentales** fueron los siguientes:

1. **Adquisición de líneas transgénicas y amplificación de stocks.**

Se cultivaron moscas transgénicas que portan la proteína UASGCaMP3, sensible a cambios en el Ca^{2+} , expresada en miocardio bajo el control de TinCGal4 (Lin y col, 2011) (figura 1). La línea fue provista por el laboratorio del Dr Mathew Wolf, USA. Los ejemplares fueron mantenidos y alimentados en viales a 28°C. Los individuos fueron re-amplificados y de esta progenie se colectaron adultos de diferentes edades para realizar los experimentos.

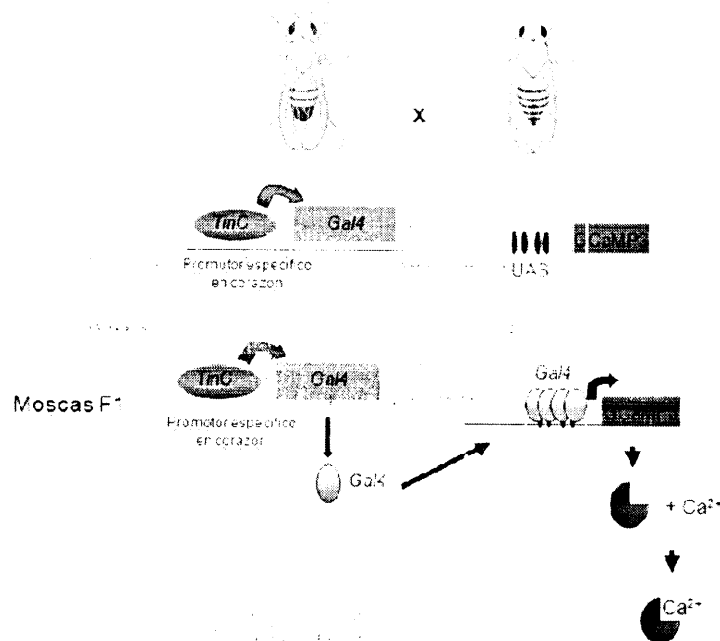


Figura 1. Esquema que muestra cómo se expresa GCaMP3. El gen que codifica para la proteína se encuentra corriente abajo de la secuencia aumentadora UAS. A esta secuencia UAS, se une Gal4 (un factor de transcripción), cuyo ARNm se expresa en corazón bajo el control de TinC.

2. Visualización del corazón intacto, medición de la frecuencia cardíaca y Ca^{2+} en adultos de diferentes edades.

Los experimentos con corazones de adultos se llevaron a cabo según lo descrito (Vogler y Occor, 2009). Las disecciones se realizaron en un microscopio estereoscópico Schonfeld Optik modelo XTD 217. Las moscas fueron brevemente anestesiadas con CO_2 , colocadas en una caja de Petri de 60 mm que contiene una capa de vaselina y fijadas por la región dorsal. El preparado se mantuvo sumergido en solución de hemolinfa artificial oxigenada (pH 7.1). El corazón de 1 mm de largo por 100 micrones de ancho, quedó expuesto para su observación.

Para medir Ca^{2+} , utilizamos un microscopio confocal Carl Zeiss 410. Luego de la excitación con un láser a 488 nm, la proteína sensible al Ca^{2+} emite fluorescencia en un rango de longitud de onda entre 505-530 nm. La figura 2 muestra imágenes en seudocolor del corazón de una mosca transgénica. Los picos indican el aumento transitorio del Ca^{2+} para cada contracción. Detalles del procedimiento y parámetros medidos se observan en la figura 2.

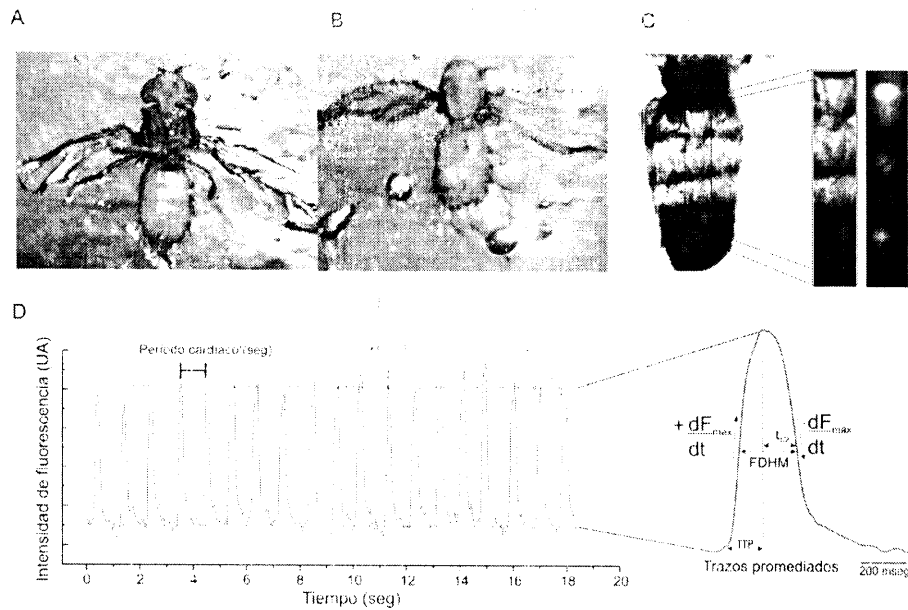


Figura 2. A: mosca ubicada en una caja de Petri con la región ventral hacia arriba. B: mosca luego de remover cabeza y tórax. C: corazón expuesto a lo largo de la región abdominal visualizado por microscopía de campo claro y fluorescencia, donde se aprecia en rojo y amarillo el aumento de intensidad de fluorescencia emitida por la proteína GCaMP3 unida a Ca^{2+} . D: un registro típico y un trazo promedio en donde se indican parámetros medidos. TTP: tiempo al pico, FDHM: tiempo desde la mitad del aumento hasta la mitad de la caída de fluorescencia, $t_{1/2}$, tiempo desde el máximo de fluorescencia hasta la mitad de la relajación. $+dF/dt$ y $-dF/dt$, máximas velocidades de aumento y de reducción de fluorescencia.

Resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos se resumen en las siguientes conclusiones:

- 1.- El envejecimiento reduce la frecuencia cardíaca, aumenta las arritmias y modifica la cinética del transitorio de Ca^{2+} prolongando el $t_{1/2}$ y la máxima velocidad de relajación ($-dF/dt$).
- 2.- La sobreexpresión de una copia de CaMKII aumenta la frecuencia cardíaca, reduce las arritmias y modifica el transitorio de Ca^{2+} , por aumentar la amplitud de fluorescencia, el TTP, la máxima velocidad de contracción ($+dF/dt$).

Producción científica durante el período:

1. Presentaciones a congresos:

- XLIII Congreso Argentino de Genética- IV Reunión Regional SAG-La Pampa Patagonia. eIF4E multifacética: de la traducción a la generación de arritmias cardíacas. Santalla M, Valverde CA, Lacunza E, Mattiazzzi A, Ferrero P. Bariloche, Argentina. Octubre 2014. Journal of Basic and Applied Genetics. Suppl. Vol. XXV (1) 2014.
- CaMKII y eIF4E están involucrados en las arritmias por envejecimiento de *Drosophila melanogaster*. Santalla M, Harnichar E, Valverde CA, Mattiazzzi A, Ferrero P. Sociedad Argentina de Fisiología. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Noviembre 22-26, 2013
- Congreso "Señalización celular y expresión génica"-- Sociedad Argentina de Bioquímica y Biología Molecular. CaMKII and eIF4E participate in arrhythmias generation during aging. Harnichar E, Santalla M, Valverde CA, Mattiazzzi A, Ferrero P. Buenos Aires, Argentina. Noviembre 6 - 7, 2013. BIOCELL 37 (Suppl.), 2013
- Primer congreso internacional científico y tecnológico de la provincia de Buenos Aires. Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires. *Drosophila melanogaster* en el estudio de enfermedades cardiovasculares. Harnichar E, Santalla M, Valverde CA, Mattiazzzi A, Ferrero P. La Plata. Septiembre 19-20, 2013.

2. Trabajos publicados:

- Aging and CaMKII alter intracellular Ca^{2+} transients and heart rhythm in *Drosophila melanogaster*. Santalla M, Valverde CA, Harnichar E, Lacunza E, Aguilar-Fuentes J, Mattiazzzi A, Ferrero P. PLoS One. 2014 Jul 8;9(7):e101871

Referencias.

- Cooper AS, K.E. Rymond, M.A. Ward, Bocook E.L., Cooper R.L. Monitoring heart function in larval *Drosophila melanogaster* for physiological studies, *J Vis Exp* (2009).
- Lin N, Badie N, Yu L, Abraham D, Cheng H, Bursac N, Rockman HA, Wolf MJ. A method to measure myocardial calcium handling in adult *Drosophila*. *Circ Res* 108 (11) (2011):1306-1315.
- Medioni C, S. Senatore, P.A. Salmand, N. Lalevee, L. Perrin, M. Semeriva, The fabulous destiny of the *Drosophila* heart, *Curr Opin Genet Dev* 19 (2009) 518-525.
- Ocorr K, Reeves NL, Wessells RJ, Fink M, Chen HS, et al. (2007) KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3943–3948.
- 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.
- Vogler G, Ocorr K. Visualizing the beating heart in *Drosophila*. *J Vis Exp* 2009;(31).
- 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*. 8(5) (2009):542-52.