



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Ref. Expte. N° 1117/2020

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 24/08/2020

VISTO:

La nota presentada por la Dirección del Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, mediante la cual eleva la información del curso de posgrado **Diversidad de Señalización Celular Contexto Dependiente** para el año 2020,

CONSIDERANDO:

lo actuado por la Comisión de Doctorado,
lo actuado por la Comisión de Posgrado,
lo actuado por este Cuerpo en la sesión realizada en el día de la fecha,
en uso de las atribuciones que le confiere el Artículo 113º del Estatuto Universitario,

**EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
R E S U E L V E:**

ARTÍCULO 1º: Aprobar el nuevo curso de posgrado **Diversidad de Señalización Celular Contexto Dependiente** de 40 horas de duración, que será dictado por el Dr. Eduardo Artz con la colaboración de los Dres. Ana Liberman, Susana Silberstein, Jesica Raingo, Tomás Falzone, Matías Blaustein, Alejandro Leroux, Diego Presman, Mariana Melani y Carolina Perez.

ARTÍCULO 2º: Aprobar el programa del curso de posgrado **Diversidad de Señalización Celular Contexto Dependiente** para su dictado en el segundo cuatrimestre de 2020.

ARTÍCULO 3º: Aprobar un puntaje máximo de dos (2) puntos para la Carrera del Doctorado.

ARTÍCULO 4º: Disponer que de no mediar modificaciones en el programa y la carga horaria, el presente Curso de Posgrado tendrá una vigencia de cinco (5) años a partir de la fecha de la presente Resolución.

ARTÍCULO 5º: Comuníquese a todos los Departamentos Docentes, a la Dirección de Estudiantes y Graduados, la Biblioteca de la FCEyN y a la Secretaría de Posgrado con copia del programa incluida. Cumplido, archívese.

RESOLUCIÓN CD N.º 0623


Dr. PABLO J. GROISMAN
Secretario Adjunto de Posgrado
FCEyN - UBA


Dr. JUAN CARLOS REBOREDA
DECANO

DIVERSIDAD DE SEÑALIZACION CELULAR CONTEXTO DEPENDIENTE

OBJETIVOS

- Proveer a los estudiantes de Doctorado de un panorama actualizado a partir del cual podrán entender cómo la diversidad de señalización en diferentes contextos biológicos y en múltiples situaciones fisiológicas o patológicas determinan una variedad de respuestas que permiten la adaptación a una situación ambiental particular en un determinado marco temporal y espacial. Expertos en distintos sistemas de experimentación presentarán los abordajes de su problema biológico así como la tecnología y metodología relevante de desarrollo y aplicación reciente.
- Discutir con los alumnos trabajos representativos y recientes de la diversificación de señales con énfasis en aspectos técnicos y fisiopatológicos de cada ejemplo específico.

PROGRAMA TEÓRICO

1-Mecanismos no clásicos de la regulación de canales de calcio operados por voltaje (CaV) por receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Revisión del concepto clásico de regulación de los CaV por la subunidad G $\beta\gamma$ de las proteínas G. Rol de la actividad constitutiva, la heterodimerización y la versatilidad de efectos de los ligandos de los GPCRs sobre la modulación de estos canales. Impacto funcional y relevancia farmacológica de estas regulaciones no canónicas. Cambios radicales que puede sufrir esta modulación dependiendo del contexto fisiopatológico en el que se encuentra una neurona.

2- Señalización celular no canónica: la conexión entre endocitosis y señalización. Señales agudas versus sostenidas en diferentes contextos celulares. Relevancia fisiológica. Los signalosomas como plataformas intracelulares de reclutamiento de efectores. Microdominios de señalización del AMP cíclico. La adenilil ciclase soluble. Abordajes metodológicos en tiempo real y célula única. La señalización del GPCR CRHR1 en contexto neuronal y endocrino.

3-Mecanismos de regulación del transporte axonal en diferentes modelos animales y humanos centrado en comprender el impacto de los defectos del transporte axonal en la inducción de enfermedades neurodegenerativas. Mecanismos fisiológicos en base a diferentes metodologías de estudio de dinámicas intracelulares. Alteraciones en el transporte axonal evaluadas en base a la inducción de anomalías y su asociación con la formación de patologías neuronales. Desarrollo de nuevos modelos humanos de estudio de dinámicas intracelulares en cultivos tridimensionales.



Dr. JUAN CARLOS REBOREDA
DECANO

4- Biología de sistemas y señalización celular. Complejidad, variabilidad célula- célula y heterogeneidad fenotípica: relevancia en señalización celular y en cáncer. La vía de señalización de PI3K-Akt y su rol en el desarrollo tumoral. Complejidad y variabilidad célula-célula en la vía de Akt: modificaciones posttraduccionales, localizaciones subcelulares, especificidad de sustratos y código molecular de Akt. Uso de reporteros fluorescentes, inmunofluorescencia y microscopía de fluorescencia para estudiar la vía de Akt.

5- Señalización intracelular por fosforilación de proteínas. Familias de proteínas quinasa y ejemplos de vías en las que participan. Relevancia fisiopatológica. Estructura tridimensional de las proteínas quinasa y comparación de los mecanismos moleculares que regulan su actividad. Relevancia de la modulación alóstérica de la actividad quinasa. Análisis de las metodologías para el estudio de las vías de señalización por fosforilación. Biología química como herramienta para la modulación de la actividad de proteína quinasa in vitro y en cultivo celular.

6- Tipos de receptores intracelulares. Receptores esteroideos y mecanismos de acción. Importancia fisiopatológica del receptor de glucocorticoides. Mecanismos moleculares de señalización del receptor de glucocorticoides. Modulación de su actividad contexto dependiente. Importancia de las modificaciones post-traduccionales en la señalización del receptor de glucocorticoides contexto dependiente. El interactoma del receptor de glucocorticoides y su importancia fisiopatológica. Complejo de chaperonas asociadas al receptor de glucocorticoides y su importancia funcional. Desarrollo de fármacos para patologías asociadas a la disfunción del receptor de glucocorticoides y su co-chaperona FKBP51.

7- El receptor de glucocorticoides como factor de transcripción. Relevancia farmacológica. El modelo disociado de acción glucocorticoidea. Génesis del modelo. El GRdim. Críticas al modelo disociado. Técnica de Número y Brillo. El GRmon. Tetramerización del GR. Inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación profunda. Factores pioneros. El GR como factor pionero. Dinámica de factores de transcripción. Estudios de moléculas individuales. Relación estructura-función del GR. Nuevo paradigma de acción glucocorticoidea.

8- La autofagia como mecanismo de adaptación al estrés. Mecanismos moleculares de inducción, formación y maduración del autofagosoma. Su papel central en la degradación de agregados proteicos y componentes intracelulares defectuosos y como mecanismo principal de reciclado de aminoácidos y otros precursores utilizados en las distintas vías biosintéticas. Contextos fisiológicos de inducción de la autofagia y en el desarrollo de patologías asociadas a su desregulación: cáncer y enfermedades

neurodegenerativas. La autofagia como mecanismo de muerte celular.

9-Conceptos de Plasticidad celular y reprogramación. Reguladores de la plasticidad celular. Cambios generales en las vías de señalización, cambios genómicos y epigenéticos en la reprogramación de células somáticas a iPSC y comparados en el cáncer. Glioblastoma (GBM) como modelo de células madre del cáncer. La

complejidad de la heterogeneidad inter e intratumoral en el glioblastoma. La complejidad del GBM como un factor que afecta la invasión y la respuesta de la terapia. Comunicación Multidimensional en el microambiente del GBM. Rutas y modos de comunicación entre células tumorales y células del entorno tumoral.

PROGRAMA PRÁCTICO

Trabajo Práctico:

MEDICIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES AL NÚCLEO.

Objetivos:

- *Estudiar la localización citoplasma/núcleo del receptor de glucocorticoides en presencia o ausencia de su ligando.
- *Estudiar como componentes del complejo asociado al receptor de glucocorticoides modulan su localización citoplasma/núcleo.
- *Discutir los resultados obtenidos en el contexto de vías de señalización, receptores y motores moleculares en general y el modelo de translocación del receptor de glucocorticoides en particular.

Desarrollo:

MODALIDAD PRESENCIAL

Se utilizará la línea celular HeLa. Estas células serán sembradas por los docentes en placas de cultivo de 60 mm y transfectadas con:

Transfección 1: vector de expresión del GR acoplado a la proteína fluorescente amarilla (*yellow fluorescent protein*, YFP) y vector vacío como control.

Transfección 2: vector de expresión del GR acoplado a la proteína fluorescente amarilla y el vector de expresión de FKBP51.

Luego las células serán re-plaqueadas por los docentes sobre cubreobjetos dentro de placas de 6 pocillos. Luego, las células serán tratadas por los docentes con el glucocorticoide sintético dexametasona (Dex) o vehículo. Se incubarán las células durante 40 min en la estufa de cultivo.

PLACA A

GR- yfp (vehí- culo)	GR - yf p (D ex)	
GR-	GR	

PLACA B

GR- yfp +FKB P51 (vehí- culo)	GR- yfp +FKB P51 (Dex)	
GR- yfp	GR- yfp	

Cada grupo de aprox. 5 alumnos se hará cargo de una de las placas. Los alumnos lavarán cada pocillo con PBS a temperatura ambiente. Luego fijarán las células durante 20 min con paraformaldehido (PFA). A continuación, lavarán el PFA. Por último, montarán los cubreobjetos sobre portaobjetos utilizando medio de montaje.

Una vez secos, los docentes sellarán los preparados y los conservarán protegidos de la luz.

Los docentes y los alumnos observarán las muestras al microscopio de fluorescencia y sacarán fotos de varios campos de los cubreobjetos provenientes de las placas. Las fotos de las placas se compartirán con cada grupo para el análisis posterior que comprende documentación de las observaciones, contestar un cuestionario y sacar conclusiones del TP.

MODALIDAD VIRTUAL

Contamos con fotos de estos preparados ya que estos experimentos fueron realizados previamente por nosotros (Antunica Nougerol M, et al, 2016, Cell Death and Differentiation). Los docentes explicarán el TP y luego se les brindará a cada grupo de 5 alumnos las fotos de cada condición de cada placa. Además contamos con filmaciones de la translocación del GR bajo las mismas condiciones experimentales adquiridas en el microscopio de fluorescencia con *live imaging*, lo que les permitirá a los alumnos poder ver la translocación del GR *in vivo*. Con esta información estarán en óptimas condiciones para documentar sus observaciones y contestar el mismo cuestionario y sacar conclusiones del TP.

SEMINARIOS:

Discusión de trabajos originales presentados por los alumnos.

9 seminarios (1 de cada tema), dos o tres trabajos por seminario.

PRESENTACIÓN DE POSTERS:

Los alumnos presentarán a discusión posters describiendo su trabajo experimental de Tesis.

DISTRIBUCIÓN HORARIA Y FACILIDADES

PRESENCIAL: Aula de Seminarios del IBioBA y espacio para TP. 5 días hábiles, incluye examen al final

Una semana de 20 hs de clases teóricas, 5 hs de TP, 15 hs de Seminarios y presentación de posters. Evaluación escrita: 2 hs

VIRTUAL: Aula de Zoom del IBioBA.
9 días hábiles + examen al lunes siguiente

7 días de clases teóricas de 3 hs
cada una 2 días de TP de 2h 30
min cada uno

7 días de de Seminarios (15 hs totales) y presentación de posters (6 hs totales), estimados 15 min por presentador y 5 min discusión grupal

Evaluación: examen por entrevista individual virtual

SEMINARIOS

Seminario I

"Mecanismos no clásicos de la regulación de canales de calcio operados por voltaje por receptores acoplados a proteína G"

A. Modulation of high-voltage activated Ca(2+) channels by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Suh BC et al. *Neuron*. 2010 Jul 29;67(2):224-38. doi: 10.1016/j.neuron.2010.07.001.

B. Constitutive and ghrelin-dependent GHSR1a activation impairs CaV2.1 and CaV2.2 currents in hypothalamic neurons. López Soto EJ et al. *J Gen Physiol*. 2015 Sep;146(3):205-19. doi: 10.1085/jgp.201511383.

C. Dopamine Receptor Type 2 and Ghrelin Receptor Coexpression Alters CaV2.2 Modulation by G Protein Signaling Cascades. Cordisco Gonzalez S et al. *ACS Chem Neurosci*. 2020 Jan 2;11(1):3-13. doi:10.1021/acschemneuro.9b00426.

Seminario II

"Señalización celular no canónica: la conexión entre endocitosis y señalización."

A. Catalytic activation of β-arrestin by GPCRs. Eichel K, Jullié D, Barsi-Rhyne B, et al.. *Nature*. 2018. 557(7705):381-386. doi:10.1038/s41586-018-0079-1

B. β2-adrenergic receptor control of endosomal PTH receptor signaling via Gβγ. Jean-Alphonse FG, Wehbi VL, Chen J, et al. *Nat Chem Biol*. 2017. 13(3):259–261. doi:10.1038/nchembio.2267

C. Endothelial CD99 signals through soluble adenylyl cyclase and PKA to regulate leukocyte transendothelial migration. Watson RL, Buck J, Levin LR, et al. *J Exp Med*. 2015. 212(7):1021-1041. doi:10.1084/jem.20150354

Seminario III

"Mecanismos de regulación del transporte axonal"

A. Tau Isoforms Imbalance Impairs the Axonal Transport of the Amyloid Precursor Protein in Human Neurons. Lacovich V, Espindola SL, Alloatti M, et al. *Journal of Neuroscience*. 2017. 37 (1) 58-69; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2305-16.2016

B. αSynuclein Control of Mitochondrial Homeostasis in Human-Derived Neurons Is Disrupted by Mutations Associated With Parkinson's Disease. Pozo Devoto VM, Dimopoulos N, Alloatti M, et

al. *Sci Rep* **7**, 5042. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05334-9>

Seminario IV

"Biología de sistemas y señalización celular"

A. Patterns of basal signaling heterogeneity can distinguish cellular populations with different drug sensitivities. Singh DK, Ku CJ, Wichaidit C, Steininger RJ, et al. Mol Syst Biol. 2010. 6, 369. doi:msb201022 [pii]

B. Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. Liu P, Begley M, Michowski W, Inuzuka H, Ginzberg M, Gao D, Wei W. Nature. 2014. 508(7497), 541-545. doi:10.1038/nature13079

C. SETDB1-mediated methylation of Akt promotes its K63-linked ubiquitination and activation leading to tumorigenesis. G Wang, et al. Nat Cell Biol. 2019. Feb;21(2):214-225. doi: 10.1038/s41556-018-0266-1. Epub 2019 Jan 28.

Seminario V

"Señalización intracelular por fosforilación de proteínas"

A. Discovery of an AKT Degrader with Prolonged Inhibition of Downstream Signaling. You I, et al. 2020. Cell Chem Biol, 27(1), 66-73 e67. doi:10.1016/j.chembiol.2019.11.014.

B. Activation of atypical protein kinase C by sphingosine 1-phosphate revealed by an aPKC-specific activity reporter. Kajimoto T, et al. 2019. Sci Signal, 12(562). doi:10.1126/scisignal.aat6662

C. RAF inhibitors promote RAS-RAF interaction by allosterically disrupting RAF autoinhibition. Jin T, et al. 2017. Nat Commun, 8(1), 1211. doi:10.1038/s41467-017- 01274-0

Seminario VI

"Señalización mediada por receptores esteroideos y mecanismos de acción"

A. The glucocorticoid receptor-FKBP51 complex contributes to fear conditioning and posttraumatic stress disorder. H Li, et al. 2020. J Clin Invest. Feb 3;130(2):877-889. doi: 10.1172/JCI130363.

B. Stress-responsive FKBP51 regulates AKT2-AS160 signaling and metabolic function. AS Häusl, et al. 2017. Nat Commun. Nov 23;8(1):1725. doi: 10.1038/s41467-017- 01783-y.

C. Glucocorticoid-induced tethered transrepression requires SUMOylation of GR and formation of a SUMO-SMRT/NCoR1-HDAC3 repressing complex. G Hua, et al. 2016. Proc Natl Acad Sci U S A. Feb 2;113(5):E635-43. doi: 10.1073/pnas.1522826113. Epub 2015 Dec 28.

Seminario VII

"El Receptor de Glucocorticoides como factor de transcripción"

A. Genomic redistribution of GR monomers and dimers mediates transcriptional response to exogenous glucocorticoid in vivo. HW Lim, NH Uhlenhaut, A Rauch, J Weiner, et al. 2015. *Genome Res*, 25 836-844.

B. Glucocorticoid receptor quaternary structure drives chromatin occupancy and transcriptional outcome. V Paakinaho, TA Johnson, DM Presman, GL Hager. 2019. *Genome Res*, Aug;29(8):1223-1234.

C. Transcriptional Bursting and Co-bursting Regulation by Steroid Hormone Release. 2019. *Molecular Cell*, Sep 19;75(6):1161-1177.e11. doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.042. Epub 2019 Aug 14.

Seminario VIII

"La autofagia como mecanismo de adaptación al estrés"

A. Autophagic Degradation of NBR1 Restricts Metastatic Outgrowth during Mammary Tumor Progression. Marsh T, et al. 2020. *Dev Cell*. Mar 9;52(5):591- 604.e6. doi: 10.1016/j.devcel.2020.01.025

B. Control of basal autophagy rate by vacuolar peduncle. Bourouis M, Mondin M, Dussert A, Leopold P. 2019. *PLoS One*. Feb 8;14(2):e0209759. doi: 10.1371/journal.pone.0209759

C. Selective Autophagy of Mitochondria on a Ubiquitin-Endoplasmic-Reticulum Platform. Zachari M, et al. 2019. *Dev Cell*. Sep 9;50(5):627-643.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2019.06.016

Seminario IX

A. Phenotypic Plasticity of Invasive Edge Glioma Stem-like Cells in Response to Ionizing Radiation. M Minata, et al. 2019. *Cell Rep*. Feb 12;26(7):1893-1905.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.076.

B. Epigenetic Activation of WNT5A Drives Glioblastoma Stem Cell Differentiation and Invasive Growth. Hu B, et al. 2016. *Cell*. Nov 17;167(5):1281-1295.e18. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.039.

C. Identifying conserved molecular targets required for cell migration of glioblastoma cancer stem cells. Josephine Volovetz, et al. 2020. *Cell Death Dis*. Feb 26;11(2):152. doi: 10.1038/s41419-020-2342-2.

MODALIDAD DE EVALUACIÓN

80% de asistencia obligatoria a Teóricas, Seminarios y presentaciones de posters. Examen Final: se deberá aprobar un examen final escrito.

Se otorgarán certificados de asistencia y

aprobación BIBLIOGRAFÍA

Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. 2010. Neuron. 68(4):610–638. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.039

AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. Manning BD, & Toker A. 2017. Cell. 169(3), 381-405. doi:10.1016/j.cell.2017.04.001

Emerging Paradigm of Intracellular Targeting of G Protein-Coupled Receptors. Chaturvedi M, Schilling J, Beautrait A, Bouvier M, Benovic JL, Shukla AK. 2018. Trends Biochem Sci. 43(7):533-546. doi:10.1016/j.tibs.2018.04.003.

A General Introduction to Glucocorticoid Biology. Timmermans S, Souffriau J, Libert C. 2019. Front Immunol. Jul 4;10:1545. doi: 10.3389/fimmu.2019.01545. eCollection 2019.

Renaissance of Allostery to Disrupt Protein Kinase Interactions. Leroux AE & Biondi R. M. 2020. Trends Biochem Sci, 45(1), 27-41. doi:10.1016/j.tibs.09.007.

Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. Taylor S S, et al. 2012. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 367(1602), 2517-2528. doi:10.1098/rstb.2012.0054

Maps and legends: the quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor. Clark AR, Belvisi MG. 2012. Pharmacol Ther., 134 54-67.

More than meets the dimer: What is the quaternary structure of the glucocorticoid receptor?. Presman DM, Hager GL. 2017. Transcription, 8 32-39.

Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery. Weikum ER, Knuesel MT, Ortlund EA & Yamamoto KR. 2017. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 18(3):159-174. doi: 10.1038/nrm.2016.152.

A molecular perspective of mammalian autophagosome biogenesis. Mercer TJ, Gubas A, Tooze SA. 2018. J Biol Chem. 13;293(15):5386-5395. doi: 10.1074/jbc.R117.810366.

ER platforms mediating autophagosome generation. Ktistakis NT. 2020. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 1865(1). pii: S1388-1981(19)30041-1. doi: 10.1016/j.bbalip.2019.03.005.

Targeting autophagy in cancer. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. 2017. *Nat Rev Cancer*. 17(9):528-542. doi: 10.1038/nrc.2017.53.

Life, death and autophagy. Doherty J, Baehrecke EH. 2018. *Nat Cell Biol*. 20(10):1110-1117. doi: 10.1038/s41556-018-0201-5.

Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. Osuka S, Van Meir EG. 2017. *J Clin Invest*. Feb 1;127(2):415-426. doi: 10.1172/JCI89587.

Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. Colombo M, et al. 2014. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 30:255-89. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.

Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. Tkach M, et al. 2016. *Cell*. 164(6):1226-1232. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.043.