



CLUB DEL ARN  
DEL URUGUAY



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**IFIBYNE**  
UBA - CONICET

Instituto de Fisiología,  
Biología Molecular y Neurociencias



INSTITUTO LECLAIR  
FUNDACIÓN



**iibce**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE

**INIA**  
URUGUAY



Institut Pasteur  
de Montevideo

# 1<sup>er</sup> CONGRESO BINACIONAL DE LOS CLUBES DEL ARN DE ARGENTINA Y URUGUAY

*“Prof. Otto Pritsch”*

*Centro Cultural AFE. Colonia del Sacramento.  
2 y 3 de diciembre de 2022.*

Patrocinan/Auspician:



LEXOGEN



PEDECIBA  
MEC-UDELAR

**CSIC**

COMISIÓN SECTORIAL DE  
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

biko



**BIOCHEMICAL  
JOURNAL**



*Agradecemos también al Departamento de Cultura de la Intendencia de Colonia por permitirnos realizar esta actividad en el Centro Cultural Nacional “Centro Cultural AFE”*

## Viernes 2 de diciembre de 2022:

12:00 – 14:00

Uruguay vs Ghana (Proyección). Almuerzo ligero (incluido).

14:00 hs: **BIENVENIDA.**

### SESIÓN 1

14:15 – 14:30: **Graciela Boccaccio** (Instituto Leloir, Argentina)

*Organelas sin membrana en regulación post-transcripcional: Smaug en el control del metabolismo celular*

14:35 – 14:50: **Gonzalo Moratorio** (FCien - UdelaR / IPMon, Uruguay)

*Pushing arboviruses into a hostile RNA sequence space*

14:55 – 15:10: **Lucía Gonzalo** (IAL - UNL, Argentina) *est. DOC*

*Identificación de procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs en plantas y la influencia de R-loops en loci codificantes en este mecanismo*

15:15 – 15:30: **Soledad Marton** (FMed - UdelaR, Uruguay)

*SOD1G93A astrocyte-derived extracellular vesicles induce motor neuron death by a miRNA-155-5p mediated mechanism.*

15:35 – 15:50: **Manuel de la Mata** (IFIByNE - UBA, Argentina)

*Impacto de la topología circular de RNAs sobre la estabilidad de microRNAs*

15: 55 – 16:30: **Pausa de café**

---

### SESIÓN 2

16:35 – 16:50: **Thomas Blein** (Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, Francia)

*LncRNAs, quantitative regulators of level and dynamic of gene expression*

16:55 – 17:10: **Bruno Costa** (FCien - UdelaR / IPMon, Uruguay) *est. MAE*

*tRNAs mellados como reservorio estable de mitades de ARNt en células y biofluidos*

17:15 – 17:30: **Julieta Mateos** (IFIBYNE - UBA, Argentina)

*Antagonistic effects of arginine methylation of a component of the U6snRNP LSM4 mediating plant stress responses*

17:35 – 17:50: **Ignacio López** (FCien - Udelar / IPMon, Uruguay)

*Más allá de la transcripción: En búsqueda de mecanismos de regulación post-transcripcional mediados por p53 durante la UPR*

17:55 – 18:10: **Horacio Pallarés** (Instituto Leloir, Argentina) *est. DOC*

*El virus del Zika reprime la traducción de factores antivirales mediante la activación de PKR*

---

### **SESIÓN 3 (pósters)**

18:15 – 18:30: sorteos (BIKO)

18:30 – 20:30 Sesión de póster [pizzas + bebidas incluidas]



**Biochemical Journal ofrece un “poster prize” de 150 libras esterlinas que se dividirá entre los dos mejor póster de entre aquellos presentados por estudiantes de posgrado.**

NOCHE EN COLONIA (por cuenta de los asistentes)

## **Sábado 3 de diciembre de 2022:**

### **SESIÓN 4**

09:00 – 09:15: **Ana Julia Fernandez-Alvarez** (Instituto Leloir, Argentina)

*Vault RNAs: un nuevo integrante en la respuesta al estrés*

09:20 – 09:35: **Joaquín Garat** (IIBCE, Uruguay) *est. DOC*

*Análisis de abundancia diferencial de ARNm codificante para proteínas ribosomales entre subtipos neuronales de corteza cerebral*

09:40 – 09:55: **Anabella Srebrow** (IFIBYNE - UBA, Argentina)

*La conjugación de SUMO regula la actividad del complejo “integrator”, responsable del procesamiento 3’ de snRNAs*

10:00 – 10:15: **Martín Rivara** (IIBCE / FMed - Udelar, Uruguay) *est. MAE*

*Reanotación y estudio de la composición de la maquinaria traduccional de Trypanosoma cruzi*

10:20 – 10:35: **Javier Palatnik** (IBR, Argentina)

*¿Qué información almacenan los precursores de microARNs en plantas?*

----

10:40 – 11:15: **pausa de café** y foto grupal

---

## SESIÓN 5

11:20 – 11:35: **Federico Ariel** (IAL - UNL, Argentina)

*Sequence-unrelated long noncoding RNAs converged to modulate the activity of conserved epigenetic machineries across kingdoms*

11:40 – 11:55: **Mauricio Castellano** (IPMon / FCien - UdelaR, Uruguay) *est. DOC*

*Biodisponibilidad y efectos inmunomoduladores de los ARNs extracelulares no vesiculares*

12:00 – 12:15: **Eugenia Zanetti** (UNLP, Argentina)

*Superkiller 3 influences miR172 directed cleavage of the mRNA encoding the ethylene regulated transcription factor Nodule Number Control 1 (NNC1), a negative modulator of the root nodule symbiosis*

12:20 – 12:35: **Carolina Oliveira** (FCien y FMed - UdelaR, Uruguay) *est. DOC*

*El ARN no codificante nc886 activa la vía del interferón en Cáncer de Próstata*

12:40 – 12:55: **Pablo Strobl-Mazzula** (INTECH - UNSAM, Argentina)

*Exosomal miR-203 is required for neural crest-placode communication during trigeminal ganglia condensation*

---

13:00 – 14:30: *Tiempo libre para almuerzo en Colonia (por cuenta de los asistentes)*

---

## SESIÓN 6

14:40 – 14:55: **Carlos Romeo** (IIBCE, Uruguay) *est. DOC*

*Patrones distintivos de procesamiento postranscripcional y generación de nuevas isoformas durante la espermatogénesis*

15:00 – 15:15: **Ignacio Schor** (IFIBYNE - UBA, Argentina)

*Variability in transcription: promoter architecture, regulatory mutations and noise*

15:20 – 15:35: **Pilar Moreno** (FCien - UdelaR / IPMon, Uruguay)

*Virus oncolíticos como una nueva herramienta para el tratamiento de cáncer*

15:40 – 15:55: **Esteban Erben** (IIB-UNSAM, Argentina)

*Identification of a novel regulator of the antigenic variation in Trypanosoma brucei*

---

**SESIÓN 7 (pósters, ROUND #2)** – acompañamiento de bebidas que hayan sobrado del día anterior

16:00 – 16:10: Entrega de premios del Biochemical Journal a los dos póster mejor evaluados.

16:10 – 16:25 “Flash talks” (5 min c/u) de los dos pósters premiados

16:30 – 17:30: SEGUNDA SESIÓN DE PÓSTERS.

*Todos los pósters se presentan los dos días, en la sesión 3 y en la sesión 7; la evaluación de pósters será únicamente en la sesión 3, por lo que en dicha sesión es necesario que las y los presentadores se mantengan al lado de sus respectivos pósters durante toda la sesión. La sesión 7 es más descontracturada, para seguir charlando lo que quedó pendiente, y visitar algún póster más.*

[En caso de que Argentina clasifique primero de serie, **la Sesión 7 se sustituirá por la proyección del partido de Octavos de Final**, que en dicho caso jugaría Argentina].

17:30: DESPEDIDA

## **HORARIOS DE SALIDA DE BARCOS A BUENOS AIRES (posterior a 17:00hs)**

### Colonia Express

Sale: 18:00, llega: 19:15

Sale: 20:30, llega: 21:45

### Buquebús

Sale: 17:01, llega: 18:16

Sale: 20:31, llega: 21:46

*Los horarios son los que salen en la web al día 31/10/2022 y corresponden al día sábado, 3 de diciembre. Los horarios pueden variar con el paso de los meses, y se ponen aquí solamente como referencia.*

# LIBRO DE RESÚMENES

## **Changes in phase of the circadian oscillation of transcripts induced by an environmental signal modulate flowering**

Agrofoglio Y.C.<sup>1</sup>, Iglesias M.J.<sup>1</sup>, Steffen A.I.<sup>2</sup>, Torchio J.<sup>3</sup>, Staiger D.<sup>2</sup>, Mateos J.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias · IFIBYNE - Ciudad Universitaria - UBA-CONICET.

<sup>2</sup> RNA Biology and Molecular Physiology, Faculty of Biology, Bielefeld University, Bielefeld, Germany. <sup>3</sup> Fundación Instituto Leloir, Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires, CONICET.

In plants, distinct environmental cues, such as daylength and ambient temperatures, as well as endogenous cues, such as plant age promote flowering. Early in their development, plants transition from a juvenile to an adult phase of vegetative growth. This transition is regulated by a decline in the abundance of miR156, which results in an increase in the expression of its target, SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) transcription factors. Mature miR156 is produced from different microRNA precursors encoded by ten genes (MIR156a-j) and from other four members of the mir157 family (MIR157a-d). Overexpressing miR156 in *Arabidopsis* cause a delay in flowering. We found that a specific member of the miR156 family showed a circadian waveform of expression that peaked during the day when plants were grown at 22°C and showed an opposite expression pattern to one SPL member. Plants grown at 12°C showed that the circadian phase of this miR156 is altered causing the disappearance of rhythmic SPL expression. We hypothesize that low temperature changes MIRNA expression pattern and diminishes the phase difference between the MIRNA and the SPL expression, contributing to a delay in flowering. Furthermore, flowering experiments at 22°C and 14°C using different mutants alleles of this specific miRNA showed an early flowering phenotype compared to wild-type plants. In addition, overexpression of this miRNA cause a delay in flowering. These results reinforced our hypothesis that this member is not redundant with the others of the family and it has an important role in flowering at low temperatures.

## Sequence-unrelated long noncoding RNAs converged to modulate the activity of conserved epigenetic machineries across kingdoms

Ariel F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, CONICET, Universidad Nacional del Litoral, Colectora Ruta Nacional 168 km 0, 3000, Santa Fe, Argentina.

RNA-DNA hybrid (R-loop)-associated long noncoding RNAs (lncRNAs), including the *Arabidopsis* lncRNA AUXIN-REGULATED PROMOTER LOOP (APOLO), are emerging as important regulators of three-dimensional chromatin conformation and gene transcriptional activity. Here, we showed that in addition to the PRC1-component LIKE-HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1), APOLO interacts with the methylcytosine-binding protein VARIANT IN METHYLATION 1 (VIM1), a conserved homolog of the mammalian DNA methylation regulator UBIQUITIN-LIKE CONTAINING PHD AND RING FINGER DOMAINS 1 (UHRF1). The APOLO-VIM1-LHP1 complex directly regulates the transcription of the auxin biosynthesis gene YUCCA2 by dynamically determining DNA methylation and H3K27me3 deposition over its promoter during the plant thermomorphogenic response. We demonstrated that the lncRNA UHRF1 Protein Associated Transcript (UPAT), a direct interactor of UHRF1 in humans, can be recognized by VIM1 and LHP1 in plant cells, despite the lack of sequence homology between UPAT and APOLO. In addition, we showed that increased levels of APOLO or UPAT hamper VIM1 and LHP1 binding to YUCCA2 promoter. Strikingly, spray of exogenous in vitro-transcribed APOLO on *Arabidopsis* plants achieves to alter auxin homeostasis and the response of the plant to external stimuli. Collectively, our results uncover a new mechanism in which a plant lncRNA coordinates Polycomb action and DNA methylation, and reveal that evolutionary unrelated lncRNAs may exert similar functions across kingdoms. Furthermore, our work opens new perspectives about the use of chromatin-related lncRNAs as bioactive molecules for the design of novel strategies for sustainable agriculture.

## **Long noncoding RNAs: a role in modulating the activity of partner transcription factors in *Arabidopsis thaliana*?**

Barrios A.<sup>1,2,3</sup>, Bazin J.<sup>1,2</sup>, Crespi M.<sup>1,2</sup>, Ariel F.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Plant Sciences Paris Saclay IPS2, CNRS, INRA, Université Evry, Université Paris-Saclay, Bâtiment 630, 91405 Orsay, France.

<sup>2</sup> Institute of Plant Sciences Paris-Saclay IPS2, Université de Paris, Bâtiment 630, 91405 Orsay, France.

<sup>3</sup> Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, CONICET, Universidad Nacional del Litoral, Colectora Ruta Nacional 168 km 0, 3000, Santa Fe, Argentina.

Plants survival relies on their fascinating capacity for adaptation to the changing environment. Plant developmental plasticity relies on transcriptional reprogramming, which largely depends on the activity of transcription factors (TFs). In this project, we aim at determining the role of the *Arabidopsis thaliana* TF NF-YA2 (Nuclear Factor A2) in root development in response to external stimuli. To this end, the combination of RNA-seq and ChIP-seq approaches revealed that NF-YA2 directly regulates key genes involved in water deprivation and lateral root development. Considering that the binding affinity of the mammalian TF NF-YA to its apoptosis-related targets is modulated by a long noncoding RNA (lncRNA) called PANDA, we searched for NF-YA2-associated lncRNAs in *Arabidopsis*. RNA-IP-seq allowed us to identify a subset of lncRNAs that could bind to NF-YA2, including a long intergenic transcript which we named AtBAMBOO after their counterpart in mammals. AtBAMBOO appeared as regulated by environmental stresses and differentially expressed during lateral root development, underlying its role in the plant capacity to integrate environmental cues. Furthermore, bamboo mutant plants exhibit a root developmental phenotype. Ongoing experiments will allow us to decipher the molecular basis of NF-A2-AtBAMBOO interaction and the related developmental outputs.

## Delving deeper into RNAPII degradation upon UV-induced DNA damage

Beckerman I.<sup>1</sup>, Muñoz J.C.<sup>1</sup>, Bouvier L.A.<sup>1</sup>, Muñoz M.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IFIBYNE - UBA - CONICET

DNA is the only biopolymer that is neither disposable nor recyclable so it must be repaired when damaged. Among the various repair systems that human cells have, the Nucleotide Excision Repair (NER) system is the most relevant for repair of ultraviolet (UV) light-induced DNA lesions. Damage detection by NER system occurs by two different lesion-sensing mechanisms: Global Genome repair (GG-NER) and Transcription-Coupled repair (TC-NER). In the GG-NER sub-pathway, damage recognition relies on factors XPE and XPC, which detect damage throughout the genome. In contrast, TC-NER detects damage exclusively on the template strands of actively transcribed genes, as recognition is accomplished by an RNA Polymerase II (RNAPII) which cannot bypass the insult and therefore gets stalled. Both detection systems then converge on the machinery that actually repairs the damage. RPB1, the major and catalytic subunit of human RNAPII, is specifically degraded by the ubiquitin-proteasome system upon induction of DNA damage by different agents, such as UV light. However, the mechanisms that control RPB1 degradation are not yet fully understood. The “last resort” model proposes that RPB1 is degraded at the damage site, or in cis, through TC-NER. According to this model, a lesion-stalled RNAPII backtracks in order to facilitate access to core NER factors or, when backtracking is not possible, RPB1 is ubiquitylated, evicted from chromatin by VCP/p97 segregase and finally degraded. The term “last resort” indicates that RNAPII degradation occurs as a last resort in an attempt to clear the lesion and allow DNA damage repair. However, RPB1 degradation might not necessarily occur only as a last resort. In fact, it has been recently demonstrated that, upon UV-irradiation, promoter-bound RPB1 is globally degraded, even in undamaged regions of the genome, suggesting an in trans degradation mechanism. Here, we propose an altogether different mechanism that regulates RNAPII degradation. Using CRISPR/Cas9, we generated human keratinocytes unable to globally recognize lesions through the GG-NER system (XPC & XPE double KO cells). RNAPII degradation in this GG-NER KO cell line was markedly inhibited therefore indicating that damage recognition through GG-NER also controls RNAPII levels. Accordingly with an in trans mechanism, UV-induced RNAPII degradation is not restricted to phosphorylated or chromatin-bound RNAPII molecules. Also, and in agreement with this model, degradation at late time points after UV-irradiation is not dependent on VCP/p97, which suggests that this process does not imply eviction of RNAPII from chromatin. Further strengthening the role of NER in the control of RNAPII levels, incomplete lesion repair due to the absence of any core NER factor induces an enhancement in RNAPII degradation. This demonstrates that signaling for RNAPII degradation is started by lesion recognition, either by TC- or GG-NER, and ends only after the repair process is complete. Having in mind that it has been recently demonstrated that RNAPII levels shape the gene expression response upon UV-irradiation, understanding the mechanisms that govern its degradation is of paramount importance.

## **Estudio de cuádruplex de guanina como elementos de regulación del virus SARS-CoV-2 y su interacción con ligandos y proteínas del hospedador**

Bezzi G.<sup>1</sup>, Diedrich L.<sup>1</sup>, Binolfi A.<sup>1,2</sup>, Armas P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR) – CONICET-UNR, Rosario S200E2P, Argentina.

<sup>2</sup> Plataforma Argentina de Biología Estructural y Metabólica (PLABEM), Rosario S200E2P, Argentina.

La pandemia de la enfermedad coronavirus 2019 (COVID-19) es causada por un virus de ARN llamado síndrome respiratorio agudo severo del coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Los cuádruplex de guanina (G4) son estructuras secundarias formadas por ácidos nucleicos (ADN o ARN). Estas estructuras secundarias se han propuesto como nuevos elementos reguladores transcripcionales y traduccionales que fueron descritos original y principalmente en oncogenes. Además, los G4 han estado involucrados en el control de una variedad de procesos biológicos, incluida la replicación viral. Usando varias herramientas de predicción de G4, encontramos secuencias putativas de G4 (PQS) dentro del genoma de ARN del SARS-CoV-2 (sentido positivo o +gRNA) y el ARN intermediario de sentido negativo durante la replicación viral (-gRNA). Algunas de las PQS identificadas se conservan en diversos betacoronavirus relacionados al SARS-CoV-2 mientras que otras son exclusivas del SARS-CoV-2. Mediante el uso de múltiples técnicas espectroscópicas y biofísicas, confirmamos la formación de tres G4 en el +gRNA y proporcionamos la primera evidencia de formación de G4 por cinco PQS en el -gRNA del SARS-CoV-2. Realizamos ensayos de CD melting en presencia y ausencia de pyridostatina (PDS), ligando específico que une y estabiliza G4, y demostramos que el ligando estabiliza varios G4 de ARN tanto en el +gRNA como -gRNA. Finalmente, se utilizaron enfoques espectroscópicos y bioquímicos para demostrar por primera vez que CNBP, la principal proteína celular humana unida al genoma del ARN del SARS-CoV-2, se une y promueve el despliegue de algunos de los G4 formados tanto en el +gRNA como el -gRNA del SARS-CoV-2. Nuestros resultados sugieren que los G4 que se encuentran en el genoma de ARN del SARS-CoV-2 y sus intermediarios replicativos de sentido negativo, así como las proteínas celulares y/o ligandos que interactúan con ellos, son factores relevantes para la expresión de genes virales y/o para el control del ciclo de replicación, y pueden constituir objetivos interesantes para desarrollo de fármacos antivirales.

## **Efectos de variantes genéticas en cuádruplex de guanina de ARN que afectan la traducción de oncogenes humanos**

Bezzi G.<sup>1</sup>, Piga E.<sup>1</sup>, Binolfi A.<sup>1,2</sup>, Armas P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR) – CONICET-UNR, Rosario S200E2P, Argentina.

<sup>2</sup> Plataforma Argentina de Biología Estructural y Metabólica (PLABEM), Rosario S200E2P, Argentina

Los cuádruplex de guanina (G4) son estructuras secundarias no canónicas de los ácidos nucleicos formadas en secuencias ricas en guanina y predominantes en regiones reguladoras de la expresión génica. Los G4 se han descrito, principalmente en oncogenes, como estructuras secundarias de ARN relevantes para la regulación de la traducción cuando están presentes en regiones 5' no traducidas (5'UTR) u otras regiones de ARNm implicadas en el control de la traducción. Por otro lado, los estudios de asociación a escala genómica mediante secuenciación masiva de ADN revelaron que existen numerosas variantes de un solo nucleótido (SNV) asociadas con enfermedades humanas solapadas con las 5' UTR. El objetivo de este trabajo fue identificar SNV superpuestas con secuencias formadoras de G4 (sG4) descritos como reguladores de la traducción (ubicados dentro de la 5'UTR), que puedan afectar el plegamiento de G4s, las que denominamos G4-Vars. Primero realizamos un análisis bioinformático utilizando la base de datos Ensembl para identificar las SNV superpuestas con las sG4 (y sus secuencias flanqueantes de +/- 5 b) descritas como reguladoras traduccionales de 14 oncogenes. Para cada secuencia de referencia, generamos una colección de secuencias variables que representan cada SNV y una secuencia con mutaciones que anulan la capacidad de formar G4. Luego usamos varios predictores de plegamiento y estabilidad de G4 de ADN y ARN para identificar aquellas G4-Vars que pueden afectar el plegamiento o la estabilidad de G4, tanto en la sG4 como en el contexto de la 5'UTR. De 245 secuencias de ARN correspondientes a las G4-Vars de los oncogenes analizados, elegimos 15 para su posterior análisis in vitro. A través de análisis espectroscópicos por Dicroísmo Circular (CD) demostramos que algunas SNV causan cambios espectrales cuantitativos y cualitativos. Además, ensayos de CD melting indicaron que las SNV inducen cambios en la estabilidad de los G4. En coincidencia, mediante espectroscopia 1D1H NMR confirmamos que las SNV inducen cambios cuantitativos y cualitativos para las G4-Vars de NRAS, ZIC1 y TRF2. Para las sG4 de esos mismos tres oncogenes, se clonaron las sG4 en el vector psiCHECK-2 y se generaron sus variantes y versión mutada. Además, para los casos de NRAS y TRF2, se clonaron en el vector psiCHECK-2 las 5'UTR completas conteniendo las sG4 analizadas y se generaron sus variantes y versión mutada. Estas construcciones se transfectaron en células HEK293. Los resultados revelaron que las SNV alteran la actividad del reportero de luciferasa por alteración de los niveles de traducción. Los resultados de este trabajo sugieren que las G4-Vars alteran el plegamiento de G4 y podrían ser la causa de la expresión diferencial de oncogenes que conducen a la predisposición, el establecimiento, la progresión o la metástasis de tumores, lo que indica que podrían actuar como mutaciones impulsoras del cáncer y deberían considerarse como un nuevo mecanismo de etiología molecular para la predisposición o establecimiento de enfermedades humanas.

## **Estudios de transcriptómica comparativa en amastigotas axénicas versus amastigotas celulares de *Trypanosoma cruzi***

Bilbao L.<sup>1,2</sup>, Garat B.<sup>1</sup>, Sotelo J.<sup>1,2</sup>, Pérez L.<sup>1</sup>, Smircich P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, UdelaR. <sup>2</sup> Departamento de Genómica, IIBCE

*Trypanosoma cruzi* es el agente causante de la enfermedad de Chagas, un serio problema de salud pública en gran parte de la población de las Américas. Este organismo tiene un ciclo de vida complejo alternando entre formas que viven en el insecto vector y formas que infectan el hospedero mamífero. En particular, la forma epimastigota presente en el aparato digestivo del insecto es el estadio más frecuentemente utilizado como modelo de laboratorio dada la practicidad de su cultivo. Sin embargo, preguntas específicas y relevantes para los modelos de la patología de la enfermedad crónica requieren de las formas intracelulares (amastigotas) y por lo tanto se han desarrollado métodos para su producción tanto in vitro (axénicos) como in vivo (celulares). Aunque los protocolos de amastigogénesis in vitro resultan más prácticos, su validez biológica ha sido cuestionada por la comunidad. En este proyecto se pretende caracterizar desde el punto de vista transcriptómico los amastigotas celulares y los axénicos, distinguiendo perfiles diferenciales que permitan evaluar los últimos como modelo molecular en diferentes tipos de preguntas biológicas. El modelo de amastigota axénico propuesto presentó características similares a los celulares en cuanto a la esperada regulación negativa de proteínas flagelares y glicoproteínas de superficie, mientras que los procesos vinculados a la división celular y proliferación, metabolismo del proteasoma y sobrevivencia del parásito, no fueron recapitulados por este modelo. Interesantemente, algunos de los resultados apuntan a que podrían representar fases iniciales del proceso de diferenciación. Actualmente nos encontramos optimizando el protocolo de amastigogénesis axénica mediante la evaluación de procesos metabólicos característicos de amastigotas celulares haciendo uso de marcadores moleculares definidos a partir de las listas de genes diferenciales obtenidas en los resultados anteriores.

## **lncRNAs, quantitative regulators of level and dynamic of gene expression**

Roulé T.<sup>1,2</sup>, Legascue M.F.<sup>3</sup>, Christ A.<sup>1,2</sup>, Hussain N.<sup>4</sup>, Huang Y.<sup>1,2</sup>, Hartmann C.<sup>1,2</sup>, Benhamed M.<sup>1,2</sup>, Gutierrez-Marcos J.<sup>4</sup>, Ariel F.<sup>3</sup>, Crespi M.<sup>1,2</sup>, Blein T.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, Centre Nationale de la Recherche, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Evry, Université Paris-Saclay, 91190 Gif-sur-Yvette, France

<sup>2</sup> Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, Université Paris Cité, 91190 Gif-sur-Yvette, France

<sup>3</sup> Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, CONICET, FBCB, Universidad Nacional del Litoral, Colectora Ruta Nacional 168 km 0, 3000 Santa Fe, Argentina

<sup>4</sup> School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry, CV4 7AL, UK

Long non-coding RNAs (lncRNA) have been shown to be able to regulate the expression of contiguous genes (cis action) or act at a distance (trans action) via interactions with ribonucleoproteins or other protein complexes. They are a major source of variation between species and ecotypes while the proteome is highly conserved. However, since the functions of lncRNAs are lower sequence constraints than for coding genes, the targets and the specific mechanisms through which most lncRNAs act remain poorly understood. Using co-expression analysis and gene regulatory network inference, we identify potential targets for several uncharacterized lncRNAs in *Arabidopsis*. Among them, MARNeral Silencing (MARS), localized inside the marneral cluster, controls the local epigenetic activation of its surrounding region in response to ABA. MARS modulates in a dose-dependent manner chromatin condensation and control the formation of a chromatin loop bringing together the MARNERAL SYNTHASE 1 (MRN1) locus and a distal ABA-responsive enhancer. We also identified lncRNAs cor-regulated with genes involved in root development. Deregulating several of them modify quantitatively the root system architecture, in particular lateral root growth. lncRNAs are key regulators of the plant plasticity through the regulation of the level and the dynamic of gene expression.

## **Organelas sin membrana en regulación post-transcripcional: Smaug en el control del metabolismo celular**

Boccaccio G.L.

Fundación Instituto Leloir -IIBBA CONICET- FCEyN, UBA

Las organelas sin membrana (MLOs) constituyen una familia creciente de cuerpos celulares que no poseen membrana que los delimiten. Existen MLOs involucradas en múltiples funciones, incluyendo la regulación de mRNAs. Nuestro laboratorio ha participado desde los inicios en la temática y logramos avances en la composición y dinámica de Gránulos de estrés (SGs), Processing Bodies (PBs) y MLOs relacionadas, las cuales albergan mRNAs silenciados por distintas vías. Mas recientemente, encontramos que las MLOs formadas por la proteína de unión a RNA Smaug contienen transcritos que codifican enzimas mitocondriales, y mutantes de Smaug con formación defectiva de MLOs afectan seriamente la función mitocondrial. Viceversa, la actividad mitocondrial y el balance energético afecta la condensación de las MLOs de Smaug. La activación de AMPK o de la ruta no-canónica de Smoothened, involucradas en el control del metabolismo energético, dispara la disolución de las MLOs de Smaug y la liberación de los transcritos asociados. Estos hallazgos sugieren que las MLOs de Smaug contribuyen a coordinar la expresión de mRNAs de enzimas metabólicas en tiempo y/o espacio en respuesta a vías de señalización claves en el control del balance energético (Fernandez-Alvarez et al., J Cell Sci 2022; Bruzzone et al. EMBO Rep, 2020).

## Study of the role of abundant extracellular sRNA on epithelia cells

Borini Etichetti C.<sup>1,2</sup>, Grosso J.<sup>1,3</sup>, Claus C.<sup>1,2</sup>, Ibañez M.<sup>4</sup>, Chorostecki U.<sup>5,6</sup>, Spinelli S.<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup> Institute of Clinical and Experimental Immunology of Rosario, IDICER, CONICET-UNR, Rosario, Argentina.

<sup>2</sup> Faculty of Biochemical and Pharmaceutical Sciences (UNR), Rosario, Argentina.

<sup>3</sup> Faculty of Medicine (UNR), Rosario, Argentina.

<sup>4</sup> Faculty of Engineering (UNER), Entre Rios, Argentina.

<sup>5</sup> Barcelona Supercomputing Center, Barcelona, Spain.

<sup>6</sup> Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain.

The discovery of RNAs in biological fluids has opened new questions about the function of these molecules besides their traditional role as intermediates in protein synthesis. Among them, small RNAs (sRNA) are particularly interesting since they are highly stable in these fluids. sRNAs circulate through the body both free and inside vesicles and it is postulated that they could participate in intercellular communication processes. Various studies have characterized the profile of these molecules in biofluids finding significant differences in their composition. A bioinformatic analysis carried out in our laboratory comparing sRNA-seq data from different human fluids (including serum, plasma, seminal plasma, sputum and synovial fluid, among others) shows that the most abundant sRNAs in extracellular compartments are fragments derived from RNAPol I and III transcripts (yRNA, tRNA and rRNA). To address their potential role in extracellular fluids, we focus on the top 10 most abundant sRNAs found in serum. Using synthetic RNA oligonucleotides we tested their effect on cell viability in different cell lines (HEK293, HaCat, THP1, Caco-2 and Vero) showing that these molecules do not affect cell proliferation in a wide range of concentrations. These abundant extracellular sRNA are more stable than average RNAs and most of them are detected even 24hs after incubation in cell culture medium at 37 °C. Also, we evaluated whether these sRNA could play a role in maintaining the epithelial layer's structure, integrity and functionality by actin cytoskeleton staining, migration studies and immunoassays. Our results are consistent with a mild effect of two of the tested sRNA in preserving barrier function, providing encouraging preliminary data regarding previously unknown functions of the extracellular sRNA cargo.

## Involvement of sumo conjugation in small nuclear RNA biogenesis

Bragado L.<sup>1</sup>, Magalnik, M.<sup>1</sup>, Gaioli, N.<sup>1</sup>, Pozzi B.<sup>1</sup>, Srebrow A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IFIBYNE-UBA-CONICET

Small nuclear RNAs (snRNAs) are non-coding RNA molecules, which associate with a large set of proteins giving rise to small nuclear ribonucleoparticles known as “snRNPs”. While the function of snRNAs and the assembly of snRNPs are well characterized, the regulation of snRNA gene expression is still poorly understood. Most snRNAs are transcribed by RNAPII, including U1, U2, U4 and U5. Unlike pre-mRNAs, snRNAs are intronless and non-polyadenylated. RNAPII transcribes snRNA genes in close proximity to Cajal bodies, subnuclear compartments that depend on the SUMO isopeptidase USPL1 for their assembly. However, the function of USPL1 in the CBs assembly is independent of the SUMO protease activity. We show here that overexpression of USPL1 alters snRNA 3'-end cleavage, a process carried out by the Integrator complex. Beyond its role in snRNA biogenesis, this complex is responsible for regulating the expression of different non-coding RNAs, including lncRNAs, tRNA, eRNAs, and coding transcripts. In several cases, reduced Integrator's function results in aberrant polyadenylation. We validated several subunits of the complex as SUMO conjugation substrates, and found that the SUMOylation of INTS11, subunit responsible for the endonucleolytic activity, is regulated by USPL1. We defined Lys 381, Lys 462 and Lys 475 as bona fide SUMO attachment sites within INTS11 and observed that SUMOylation of this protein is required for efficient Integrator activity, as assessed by quantification of polyadenylated snRNAs. Moreover, while an INTS11 SUMOylation deficient mutant is still capable of interacting with INTS4 and INTS9, its interaction with other subunits of the complex is affected. This mutant also shows a more cytoplasmic localization than the wild type protein. These findings point to a regulatory role of SUMO conjugation on Integrator activity and suggest the involvement of INTS11 SUMOylation in the assembly of the complex. Furthermore, this work adds the Integrator-dependent RNA processing to the growing list of cellular processes regulated by SUMO conjugation.

## **Biodisponibilidad y efectos inmunomoduladores de los ARNs extracelulares no vesiculares**

Castellano M.<sup>1,2</sup>, Blanco V.<sup>1,2</sup>, Cayota A.<sup>2,3</sup>, Segovia M.<sup>4,5</sup>, Tosar J.<sup>2,6</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR.

<sup>2</sup> Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur Montevideo.

<sup>3</sup> Hospital de Clínicas, UdelaR.

<sup>4</sup> Laboratorio de Inmunorregulación e Inflamación, Institut Pasteur Montevideo.

<sup>5</sup> Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Udelar.

<sup>6</sup> Bioquímica Analítica, CIN, Facultad de Ciencias, UdelaR.

Este trabajo busca comprender cómo las células del sistema inmune innato (SII) son capaces de sensor RNAs extracelulares (exRNA) no vesiculares, reconocerlos como moléculas señalizadoras del tipo de patrones moleculares asociados a daño y desentrañar el rol que jugarían las ribonucleasas (RNAsas) extracelulares en el proceso. El descubrimiento de que las células de organismos pluricelulares pueden comunicarse unas con otras mediante la liberación y posterior captura de exRNA está revolucionando varios aspectos de la biología celular, inmunología y biomedicina. Una vez capturados, los exRNAs pueden: ser reconocido por sensores de RNA, ser traducidos a proteínas o modificar la expresión génica de células receptoras. En el espacio extracelular, el exRNA está encapsulado dentro de vesículas extracelulares (exRNA-EV), o en la fracción no vesicular (exRNA-non-EV): asociado a ribonucleoproteínas (RNPs) o como exRNA desnudos. Inicialmente, el exRNA-non-EV se creía irrelevante por su susceptibilidad a ser degradado por RNAsas extracelulares. Sin embargo, estudios pioneros de nuestro y otros grupos sugieren que la mayoría de los exRNAs, son de hecho no vesiculares. Esta observación nos llevó a preguntarnos qué capacidad tendrán células del SII de reconocer estas moléculas, dado que disponen de sensores de RNA endosomales y citoplasmáticos. Estudios previos de otros grupos sugieren que las células del SII no serían capaces de reconocer exRNA-non-EV. Sin embargo, creemos que estos trabajos no consideraron los efectos inhibitorios que podrían tener las RNAsas de secreción, muy abundantes en biofluidos y por tanto en cultivos celulares sostenidos utilizando suero. Hemos observado que la actividad RNasa determina la composición del exRNAs-non-EV y constatamos que al inhibir las RNAsas extracelulares, las células liberan tRNAs, ribosomas y mRNAs al espacio extracelular. A lo que recientemente hemos sumado RNAs integrales del spliceosoma. En condiciones normales, las RNAsas extracelulares degradarían estos RNAs, produciendo RNAs más cortos sumamente estables. Sin embargo, si no son degradados, estos RNAs parecerían ser potentes inductores de la activación de células dendríticas (DCs). Además, hemos demostrado que existe un indisociable vínculo entre las RNAsas extracelulares y la biología del exRNA-non-EV. En diversos experimentos in-vitro demostramos que la actividad RNasa determina la composición, estabilidad, captura, reconocimiento y eventual traducción de exRNA-non-EVs por DCs y líneas celulares de origen epitelial. Estos resultados sugieren que las RNAsas extracelulares en biofluidos existirían para actuar como un brazo modulador de respuestas inflamatorias inducidas por exRNAs.

## **Altered levels of angiogenin and tRNA-derived fragments associates with severe asthma**

Claus C.<sup>1</sup>, Grosso J.B.<sup>1</sup>, Maraval M.B.<sup>1</sup>, Arduoso M.<sup>2</sup>, Arduoso L.<sup>2</sup>, Spinelli S.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Inmunología Clínica y experimental de Rosario (IDICER CONICET-UNR), 2 Hospital provincial centenario. Rosario-Argentina.

The heterogeneous nature of asthma has been understood for decades, but this feature of the disease is becoming increasingly important in the era of specific biologic therapy. Inhaled steroids are the gold standard, first-line therapy in the management of persistent asthma but results from our lab and others demonstrate that the corticosteroid response is altered in severe patients. Recent findings highlighted angiogenin (ANG) and tRNA-derived fragments (tRFs) produced by its ribonuclease activity as novel key players in stress response and cell survival. In this work we evaluated their role in asthma by screening expression levels in both sputum and blood samples of 40 patients: 13 healthy controls and 27 asthmatics, 13 of which were severe cases according to GINA guidelines. We found that ANG expression is significantly increased in circulating leukocytes from patients with severe asthma. Similar results were obtained when we discriminated patients according to sputum inflammatory phenotype, where ANG showed increased levels in those with eosinophilic infiltrates, a hallmark of severe patients. Interestingly, ANG expression significantly correlates with sputum 5' tRF<sub>Glu-CTC</sub> and 5' tRF<sub>Gly-GCC</sub>, two highly abundant tRFs in saliva. Their levels were assessed both in cells obtained from the sample (mainly leukocytes) and in sputum supernatants. We found that 5' tRF<sub>Gly-GCC</sub> levels are significantly elevated only in supernatants from severe and eosinophilic patients. Additionally, levels of 5' tRF<sub>Gly-GCC</sub> and ANG correlate with production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6 and IL-8 in sputum. To further validate these findings, we developed an in vitro model of pollutant aggravated allergic inflammation in the THP1 cell line by using particulate matter (PM) produced by diesel engine exhaust and house dust mite extracts (HDM, *D. pteronyssinus*). Our results showed that 24 hs treatment with PM, either alone or combined with HDM induce ANG expression and increase extracellular levels of 5' tRF<sub>Glu-CTC</sub> and 5' tRF<sub>Gly-GCC</sub>. In sum, our results contribute to shed light on the role of ANG and tRFs in the pathogenesis of asthma and suggest the potential use of these markers for asthma phenotyping.

## Efecto del vtRNA2-1/nc886 mediado por factores extracelulares en cáncer de próstata

Colantuono L.<sup>1,2</sup>, Oliveira-Rizzo, C.<sup>1,2</sup>, Fort R.S.<sup>1,3</sup>, Duhagon M.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup> Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

<sup>3</sup> Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

El cáncer de próstata (PrCa) es la neoplasia de mayor incidencia en hombres y la segunda en mortalidad a nivel mundial. Esta enfermedad aun requiere de mejores marcadores pronósticos para el estadio temprano, así como predictivos para el estadio avanzado, siendo los ARNs no codificantes (ncRNAs) objeto de intensa investigación para esta aplicación. Asimismo, cabe destacar que los ncRNAs tienen cada vez más aplicaciones en el área terapéutica. Nuestro grupo investiga la participación de un ncRNA de tipo bóveda denominado vtRNA2-1/nc886 en el PrCa. Este ARN posee un patrón de expresión de gen supresor tumoral viéndose regulado a la baja en tumor por la metilación aumentada de su promotor. Existen estudios en otras neoplasias que apoyan el efecto fundamentalmente supresor de tumor de este ARN, aunque también se ha visto que en algunos tejidos parece funcionar como oncogén. Si bien la acción moduladora del vtRNA2-1/nc886 se debe fundamentalmente a la interacción con proteínas (PKR, OAS1, Dicer, Snail, p62), sus mecanismos moleculares de acción no se encuentran del todo claros y probablemente varíen entre los tejidos. Estudios de secuenciación de próxima generación han revelado la presencia del vtRNA2-1/nc886 en vesículas extracelulares derivadas de próstata y otros tejidos. Además, el efecto de este ARN en la expresión génica global de líneas celulares de PrCa, indica que los genes modulados por el mismo son fundamentalmente proteínas de la vía exosomal. Esto sugiere que el vtRNA2-1/nc886 podría participar en la vía exosomal y que podría permanecer como cargo en exosomas o microvesículas. Por otro lado, nuestros datos preliminares de expresión génica junto a otros de la literatura indican que este ARN modula la expresión de citocinas que participan en la respuesta inmune innata, lo que sugiere que, aunque no fuera secretado en sí mismo, modifica específicamente la vía vesicular y el secretoma celular. En virtud de su asociación con la inmunidad innata y la vía exosomal posiblemente las moléculas efectoras del vtRNA2-1/nc886 en PrCa no se limiten a operar en un contexto intracelular, sino que también son secretadas hacia el medio extracelular ejerciendo una función comunicativa en el microambiente tumoral. En el presente trabajo se propone determinar si vtRNA2-1/nc886 induce señales secretadas capaces de modificar el comportamiento celular en PrCa modulando atributos neoplásicos básicos. Con este objetivo, se generaron transfectantes estables de nc886 o un ARN control (ctrl) en la línea celular LNCaP y se verificó el efecto anti-proliferativo esperado. Se analizó la modulación de un grupo de citoquinas y quimioquinas en los transfectantes vtRNA2-1/nc886+ vs vtRNA2-1/ctrl+. Se estudió el efecto del secretoma efectuado por vtRNA2-1/nc886 sobre líneas celulares prostáticas malignas y benignas. Adicionalmente, se realizó una primera evaluación de la localización de vtRNA2-1/nc886 en el compartimiento extracelular.

## **tRNAs mellados como reservorio estable de mitades de tRNA en células y biofluidos**

Costa B.<sup>1,2</sup>, Li Calzi M.<sup>1</sup>, Castellano M.<sup>1,3</sup>, Blanco V.<sup>1,3</sup>, Cuevasanta E.<sup>2</sup>, Litvan I.<sup>4</sup>, Ivanov P.<sup>5</sup>,  
Witwer K.<sup>6</sup> Cayota A.<sup>1,7</sup>, Tosar J.P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo

<sup>2</sup> Unidad de Bioquímica Analítica, Universidad de la República

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Universidad de la República

<sup>4</sup> Department of Neuroscience, University of California San Diego

<sup>5</sup> Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School

<sup>6</sup> Molecular and Comparative Pathobiology, Neurology, and The Richman Family Precision Medicine Center of Excellence in Alzheimer's Disease, Johns Hopkins University School of Medicine

<sup>7</sup> Hospital de Clínicas, Universidad de la República

Las células son capaces de liberar ribosomas y ARNs (tRNAs) enteros al medio extracelular, siendo rápidamente degradados por RNAsas extracelulares en fragmentos de ARN ribosomal y tRNAs estables. Si bien estos RNAs no vesiculares (nv-exRNAs) constituyen la mayor parte del RNAoma extracelular, poco se sabe sobre su potencial como biomarcador o los mecanismos por los cuales estos RNAs se mantienen estables. Para investigar esto, medimos la estabilidad de RNAs desnudos en suero, orina y líquido cefalorraquídeo humano. Sorprendentemente, identificamos fragmentos de tRNAs de varias horas de vida media en biofluidos humanos. Contrario a como se los piensa comunmente, estas mitades de tRNAs no se encuentran en forma de fragmento, sino que están presentes como tRNAs mellados conteniendo varios enlaces fosfodiéster rotos, tal como observamos por electroforesis nativa. Las técnicas estándar utilizadas en biología molecular, incluyendo extracciones de RNA basadas en separaciones con fenol, inducen la desnaturalización de los tRNAs mellados, y la liberación de sus fragmentos. Para demostrar esto por un método alternativo, reparamos enzimáticamente tRNAs mellados con RtcB o T4 PNK y Rnl1, obteniendo una banda única de tamaño similar a un tRNA, que no se produce si previamente se induce la desnaturalización térmica de la muestra. Adicionalmente, separamos tRNAs mellados de fragmentos de tRNAs mediante métodos cromatográficos bajo condiciones nativas. Estos protocolos se utilizaron para identificar tRNAs mellados en células sometidas a estrés oxidativo y en biofluidos humanos depletados de vesículas extracelulares. Adicionalmente, mostramos que la disociación de tRNAs mellados producen mitades de tRNA simple cadena, que pueden ser captados por células epiteliales humanas. Este estudio presenta un flujo de trabajo para investigar posibles vías de comunicación intercelular mediadas por nv-exRNAs estables. Adicionalmente, presentamos métodos útiles para estudiar una capa hasta ahora desconocida del RNAoma extracelular, compuesto de RNAs mellados altamente estructurados e intrínsecamente estables.

## **Una estructura de RNA en la región codificante del genoma del virus de Zika es esencial para la replicación viral**

Costa Navarro G.S.<sup>1</sup>, Pallares H.M.<sup>1</sup>, Gonzalez Lopez Ledesma M.M.<sup>1</sup>, de Borba L.<sup>1</sup>, Gamarnik A.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fundación Instituto Leloir - CONICET

El virus de Zika es un virus transmitido por mosquitos del género Flavivirus, cuyo genoma es una molécula de ARN simple cadena de polaridad positiva. Dicho genoma posee regiones 5' y 3' no codificantes altamente estructuradas, fundamentales para la replicación viral, y actúa como un mensajero que se traduce como una poliproteína. Con el fin de estudiar posibles funciones de la región codificante de la proteína de cápside, se generaron virus recombinantes con deleciones en dicha región y se evaluó el impacto sobre funciones virales en células de mosquito y mamífero. Dichos virus recombinantes, además de mostrar un defecto en propagación, resultado de deleccionar regiones correspondientes a la proteína de cápside, mostraron un inesperado retraso en el paso de replicación del genoma, que fue mayor en células de mosquito. En consecuencia, se procedió a analizar en detalle la región delecionada donde se predijeron estructuras de ARN que podrían estar cumpliendo una función en cis. Como hipótesis planteamos que las deleciones realizadas en la región codificante de cápside afectan estructuras de ARN necesarias para la amplificación del genoma viral. Para estudiar esta posibilidad, se generaron mutantes individuales de cada una de las estructuras de ARN predichas en un virus reportero. Estos ensayos revelaron por un lado que, efectivamente, la síntesis del ARN requiere de elementos en cis presentes en la región codificante de cápside que no habían sido descritos anteriormente y por otro, que una única estructura de ARN es la responsable del fenotipo observado. A continuación, diseñamos nuevas mutantes para determinar los requerimientos específicos de estructura y secuencia de la región analizada, e identificamos el requerimiento estructural de un pseudoknot, cuya integridad fue esencial para la replicación viral. De este modo, logramos encontrar una mutante puntual en todo el genoma que impide la replicación en células de mosquito. Decidimos entonces evaluarla en el contexto de un clon infeccioso, y con los stocks generados, realizamos pasajes seriados en células de mosquito con el objetivo de encontrar virus revertantes. Los resultados demostraron que existe una presión de selección para mantener la función, dado que fue posible encontrar virus revertantes y pseudo revertantes que reestablecen la interacción de pseudoknot. En conclusión, identificamos una nueva estructura de ARN en la región codificante de cápside esencial para la replicación viral en células de mosquito.

## **An unconventional RNA-binding protein defines the mRNA-fate of the major variant surface antigen in *Trypanosoma brucei***

Cruz E.<sup>1</sup>, M. do Nascimento L.<sup>2</sup>, Egler F.<sup>2</sup>, Arnold K.<sup>2</sup>, Clayton C.<sup>2</sup>, Erben E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM, San Martín, Argentina

<sup>2</sup> Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg, Germany

*Trypanosoma brucei* is the causative agent of human sleeping sickness. The parasites' variant surface glycoprotein (VSG) enables them to evade adaptive immunity via antigenic variation. VSG comprises almost 10% of total mRNA and the high stability of VSG mRNA is essential for trypanosome survival. To determine how VSG mRNA stability is maintained, we used mRNA affinity purification to identify all its associated proteins. CFB2 (Cyclin F-box protein 2), an unconventional RBP, was specifically enriched with VSG mRNA. Further investigation demonstrated that, via an unknown RNA binding domain, CFB2 recognizes a conserved 16mer element that is found in the 3'-UTRs of all VSG mRNAs. Moreover, we could demonstrate the mechanism by which CFB2 acts: recruitment of a stabilizing complex that includes MKT1, PBP1, PABP2, and the cap-binding translation initiation complex EIF4E6/G5. CFB2 has a putative RNA-binding domain (RRM) surrounded by an N-terminal cyclin-F-box domain and a C-terminal MKT1-interaction linear motif. F-box proteins are found in SCF complexes (SKP1-Cullin-F-Box), which are E3 ligase components of the ubiquitination machinery. Our results suggested that the interaction of CFB2 with SKP1 promotes CFB2 degradation and that such interaction is required for CFB2 activity. CFB2 variants containing mutated or deleted F-Box domains are unable to promote reporter expression. Intriguingly, a CFB2 variant lacking conserved residues in the RBD domain is still active. To provide new insights into the mechanism by which CFB2 binds to VSG mRNA while being actively degraded, we adopted a random mutagenesis approach driven by error prone PCR to generate a library of CFB2 mutants. The library contains a 'faithful' C terminus and a mutagenized central region spanning the F-Box and RRM domains. Once transfected into cells expressing a reporter encoding a lethal gene under the control of the VSG 3'-untranslated region, plasmid inserts will be amplified from survival mutants unable to increase reporter expression and sequenced. Our approach not only will provide novel insights into the singular CFB2 RNA-binding activity but also could shed light into how SCF-complex formation and nucleic acid binding activity are coordinated.

## **Regulación transcripcional de proteínas con dominios DUF26 en soja involucradas en la inmunidad vegetal.**

Delgado-Cerrone L.<sup>1</sup>, Alvarez A.<sup>2</sup>, Mena E.<sup>1</sup>, Ponce de León I.<sup>1</sup>, Montesano M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup> Laboratorio de Fisiología Vegetal, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

La familia de proteínas que contienen el dominio de función desconocida 26 (DUF26) en plantas, son proteínas las cuales se le han asociados diversos roles, estando involucradas tanto en las respuestas de defensa vegetal frente a microorganismos patógenos así como también en respuestas frente al estrés ambiental. Las proteínas que contienen DUF26 se pueden dividir en 3 tipos, los receptores tipo quinasas ricos en cisteínas (CRKs), los receptores sin dominio quinasa denominados PDLPs (proteínas localizadas en los plasmodesmos) y las proteínas secretorias ricas en cisteínas (CRRSPs). En soja, nuestro equipo de investigación identificó 128 miembros, de los cuales 96 son CRKs, 21 son PDLPs y 11 CRRSPs. Respecto a los CRKs, se observó que 84 de los 96 miembros tienen dos módulos DUF26 en su ectodominio, mientras que los 12 miembros restantes tienen cuatro módulos de DUF26 en su ectodominio. En las CRRSPs 5 de las 11 presentan dos dominios DUF26 mientras que las 6 restantes tienen un solo dominio DUF26 y las todas las PDLPs presentan dos módulos DUF26 en su ectodominio. En cuanto a su distribución en los cromosomas, los CRKs se distribuyeron en 16 de los 20 cromosomas, mientras las CRRPs se distribuyeron en 8 cromosomas y los PDLPs en 12 cromosomas. Observando la distribución de los distintos tipos de proteínas se pudo observar que la mayoría de los CRKs (más del 87%) se agruparon en tandems, mientras que solo 5 de los 21 PDLPs se ubicaron en tandems estando alternados con los CRKs, y para las CRRSs 6 de las 11 CRRSs se agruparon en tandems. Respecto a los estudios de expresión génica obtenidos por RNA-seq se observó que frente a tratamientos con diferentes patógenos como *Fusarium virguliforme*, *Phytophthora sojae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phakopsora pachyrhizi* y *Diaporthe caulivora* así como frente a distintos patrones moleculares asociados a patógenos y/o daño, (PAMPs y/o DAMPs), varios genes que codifican proteínas con DUF26 se indujeron o reprimieron en los distintos tratamientos, sugiriendo que estas proteínas con DUF26 podrían estar involucrados en respuestas de defensa en las plantas. Estudios previos publicados por nuestro equipo de investigación mostraron que algunos genes se expresan de manera antagónica frente a un mismo tratamiento, incluyendo pares segmentales con un alto nivel de homología (identidad entre el 80 y el 90%), lo que indica una fina regulación génica. A su vez, para agregar complejidad además de la gran redundancia de estas proteínas, se ha observado que algunos genes pueden codificar distintos tipos de proteínas según sus variantes de splicing, por ejemplo, un CRK puede pasar a ser una CRRSs o PDLPs, según la variante expresada, lo que conlleva funciones distintas. La alta redundancia de estos genes más las variantes de splicing denotan un marco de estudio de alta complejidad. Nosotros abordaremos esta temática enfocándonos en la interacción de soja con *D. caulivora*.

## Identification of a novel regulator of the antigenic variation in *Trypanosoma brucei*

Mukherjee A.<sup>1</sup>, Campo V.<sup>2</sup>, Cruz E.<sup>2</sup>, Kim H.<sup>1</sup>, Erben E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Public Health Research Institute, New Jersey Medical School, Rutgers, The State University of New Jersey, Newark, NJ, United States

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM, San Martín, Argentina

*Trypanosoma brucei* causes sleeping sickness in humans and nagana in cattle. The unicellular parasite is transmitted by the bloodsucking tsetse fly. In the mammalian host's circulation, the parasite avoids the host immune response by periodically replacing a monolayer of variant surface glycoproteins (VSG) that covers its cell surface. Such antigenic variation is a key pathogenesis mechanism that enables *T. brucei* to establish long-term infections. VSG is expressed exclusively from subtelomere loci in a strictly monoallelic manner, and DNA recombination is an important VSG switching pathway. By purifying the VSG mRNA together with its associated proteins, we have recently identified Cyclin F-Box 2 (CFB2) as the protein responsible for VSG mRNA stability in bloodstream forms. As occurs in the active VSG KD, we observed that depletion of CFB2 leads to decreased levels of active VSG transcripts and a cytokinesis arrest. We have now validated additional candidates from this VSG mRNA-bound proteome and identified a novel protein as a regulator of the VSG switching pathway. RNA-seq analysis indicated that this novel protein is important in maintaining the level of active VSG mRNA, similarly to the CFB2 depletion. But unlike the CFB2 KD, its depletion did not induce a cytokinesis arrest. Surprisingly, its depletion caused a rapid increase in the levels of phosphorylated H2A and replication protein A1 (RPA1), proteins implicated in DNA double-strand break (DSB) repair. More notably, this led to a dramatic increment in the VSG switching rate (~150-fold up) with switchers arising predominantly by recombination processes. Reflecting this phenotype, we named this gene 'Suppressor of VSG Switching 1 (SVS1)'. Our findings raise a possibility that a crosstalk between VSG mRNA surveillance and VSG switching operates in this parasite. We are currently characterizing the mechanisms behind SVS1 function to further understand how VSG switching, and monoallelic VSG expression is controlled.

## **Vault RNAs: un nuevo integrante en la respuesta al estrés**

Gimenez M., Boccaccio G., Fernández-Alvarez A.

Fundación Instituto Leloir (FIL) - Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires (IIBBA) - (CONICET) Patricias Argentinas 435 C1405BWE, Buenos Aires, Argentina.

Los ARNs no codificantes constituyen un grupo heterogéneo de RNAs que representan a la mayoría de los transcriptos nucleares en eucariotas. Dentro de este grupo encontramos a los Vault RNAs, un sub-grupo de ARNs no codificantes altamente conservados. Aunque estos ARNs fueron descriptos inicialmente hace más de 30 años, han tenido poco protagonismo y sus funciones moleculares aún están siendo investigadas. Los Vault RNAs se identificaron en su origen como componentes de la llamada partícula vault, una organela citoplasmática ribonucleoproteica que participa en el transporte a través del poro nuclear, entre otras funciones. Sin embargo, la mayoría de los Vault RNAs (alrededor del 95%) no están asociados con la partícula vault lo cual sugiere su participación en otros procesos celulares e interacciones. En humanos existen 4 vault RNAs codificados en el mismo cromosoma en 2 loci diferentes. Los 4 genes se encuentran bajo el control de promotores tipo 2 de la Polimerasa III. Los vault RNAs presentan una vida media corta, lo que los convierte en una molécula apropiada para una respuesta rápida a estímulos específicos. Algunos estudios han demostrado recientemente que los Vault RNAs están implicados en el proceso de autofagia y tendrían además un rol importante en la respuesta antiviral. Infecciones mediadas por los virus de influenza, herpes o Epstein-Barr, presentan niveles aumentados de Vault RNA y su efecto sobre la respuesta celular a la infección depende de su estado de fosforilación. En nuestro laboratorio, observamos que los niveles de Vault RNAs se encuentran aumentados durante la respuesta al estrés modelado en células en cultivo mediante un tratamiento con arsenito de sodio. Ensayos de estabilidad frente a actinomicina D revelaron que varios Vault RNAs se tornan más estables en la fase aguda de la respuesta de estrés. Estos estudios sugirieron que los Vault RNAs son componentes relevantes en la respuesta integrada al estrés, posiblemente afectando la autofagia y/o estableciendo una conexión con la inmunidad innata.

## **snc886-5p derivado del extremo 5' de vtRNA2-1/nc886 un posible caso de cambio de preferencia de brazos.**

Fort R.S.<sup>1,2</sup>, Duhagon M.A.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay

<sup>2</sup> Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo 11600, Uruguay.

<sup>3</sup> Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay.

El cáncer de próstata (PrCa) es el primer cáncer en incidencia y segundo en mortalidad en hombres a nivel mundial. VtRNA2-1/nc886, fué un ncARN inicialmente clasificado como precursor de microARNs (hsa-miR-886-3p y hsa-miR-886-5p), posteriormente re-clasificado como un vault ARN (vtRNA2-1) y luego como un nuevo ncARN (nc886). Anteriormente reportamos que vtRNA2-1/nc886 y hsa-miR-886-3p/snc886-3p (sncARN derivado al 3' de vtRNA2-1/nc886) poseen actividad supresora de tumor en el PrCa, al igual que fue reportado en otros tipos de tumor. Contrariamente, hsa-miR-886-5p/snc886-5p (sncARN derivado al 5' de vtRNA2-1/nc886), el microARN derivado del otro brazo, ha sido postulado como oncogén en cáncer cervical, oral, linfoma, mama, tiroides, vejiga y mieloma. Mediante el meta-análisis de transcriptomas de sncARNs en PrCa (PRAD-TCGA) se evidenció que snc886-5p aumenta su expresión en el tumor respecto al tejido normal adyacente y que su expresión se asocia con peores parámetros clínicos de la enfermedad. Complementariamente, se estudió el potencial biomarcador de snc886-5p mediante metaanálisis los niveles de expresión de snc886-5p en muestras de plasma de pacientes que presentan hiperplasia prostática benigna (BPH) y aquellos que padecen PrCa. Este análisis reveló que snc886-5p se encuentra presente en el plasma de los pacientes y que el mismo se encuentra elevado significativamente en aquellos que presentan cáncer respecto a la condición de BPH. Estos resultados posicionan a snc886-5p como un posible oncogén en el PrCa, si bien también puede ser una alteración secundaria o pasajera sin efecto funcional. Esto a su vez supone que en la carcinogénesis prostática ocurriría una disminución de hsa-miR-886-3p/snc886-3p, concomitante al aumento de hsa-miR-886-5p/snc886-5p. Este fenómeno se conoce como cambio de preferencia de brazos siendo llamado en inglés "arm strand switching". Finalmente, buscando extender el estudio entorno al fenómeno de "arm switching" observado para vtRNA2-1/nc886, ampliamos el meta-análisis transcriptómico de sncARNs a sets de datos disponibles en repositorios públicos que comprenden 37 líneas celulares humanas primarias normales y 59 tumorales de diferente origen tisular. Este análisis evidenció el cambio de expresión opuesta entre snc886-3p (disminuye en las líneas celulares tumorales) y snc886-5p (aumenta en las líneas celulares tumorales), lo que constituye una nueva evidencia a favor de la hipótesis del fenómeno de "arm switching". El conjunto de resultados sugiere la posibilidad de que vtRNA2-1/nc886 sea blanco del fenómeno de procesamiento diferencial de brazos "arm switching" en la carcinogénesis y que hsa-miR-886-5p/snc886-5p podría actuar como oncogén.

# **La batalla entre el virus de dengue y la proteína de la leucemia promielocítica: splicing y más**

Gaioli N.<sup>1,2</sup>, García C.<sup>2</sup>, Srebrow A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IFIBYNE - UBA - CONICET

<sup>2</sup> IQIBICEN - UBA - CONICET

## **Análisis de abundancia diferencial de ARNm codificante para proteínas ribosomales entre subtipos neuronales de corteza cerebral**

Garat J.<sup>1</sup>, Smircich P.<sup>1,2</sup>, Sotelo-Silveira J.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura.

<sup>2</sup> Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

<sup>3</sup> Departamento de Biología Celular y Molecular, Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

En la última década, la visión clásica del ribosoma como una maquinaria constitutiva y homogénea ha sido cuestionada. Particularmente, existe evidencia que apoya la existencia de heterogeneidad ribosomal vinculada a un rol regulatorio de la traducción. Además, también existe numerosa evidencia que demuestra roles extra-ribosomales para gran parte de las proteínas ribosomales. Mediante análisis de bulk RNAseq se ha visto que los genes codificantes para proteínas ribosomales se expresan de manera diferencial entre diferentes tejidos; ahora el análisis RNAseq de célula única permite el estudio de la abundancia de ARNm codificantes para proteínas ribosomales en subtipos celulares profundamente clasificados. De esta manera, se puede analizar poblaciones celulares de manera independiente en órganos altamente heterogéneos como el cerebro. En el presente trabajo, con el fin de evaluar la expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales en subtipos neuronales de corteza cerebral de ratón, se re-analizaron datos de RNAseq de aproximadamente 90 mil células únicas obtenidos con Smart-seq2 y 10xGenomics por investigadores del consorcio BICCN. El análisis de expresión diferencial confirmó la variación en la expresión de varios genes codificantes para proteínas ribosomales entre las 13 subclases neuronales presentes. Interesantemente, se observó que un subgrupo de genes codificantes para proteínas ribosomales posee mayor variabilidad en cuanto a su expresión entre subtipos neuronales, entre los que se destacan Rpl21 y Rps27, con sobreexpresión en neuronas GABAérgicas Lamp5 y Vip respectivamente frente a neuronas Glutamatérgicas. A su vez, en análisis preliminares se observó que la sobreexpresión de Rps27 en neuronas Gabaérgicas Vip sería conservada a nivel de especie en Mono Tití, Macaco Rhesus y Humano. En suma, los resultados observados confirman la variabilidad en la expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales entre subtipos neuronales de corteza cerebral, y despiertan preguntas acerca de la funcionalidad de esta regulación, y si la misma se ve reflejada en diferencias de abundancia proteica.

## **Desentrañando el rol de la proteína germinal PIWIL1 como potencial firma molecular en cáncer**

García-Silva M.R.<sup>1</sup>, Dacosta S.<sup>1</sup>, Cayota A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Genómica Funcional. Institut Pasteur de Montevideo.

<sup>2</sup> Departamento Básico de Medicina. Facultad de Medicina. UDELAR

La subfamilia de proteínas argonautas denominada PIWI (P-element inducing Wimpy Testes) se encuentran predominantemente en células de la línea germinal y desempeñan un rol fundamental en el mantenimiento y renovación de células madres. Su función canónica, en este contexto, es la estabilidad y defensa del genoma contra elementos transponibles mediante su unión a pequeños ARNs denominados piARNs. Aunque la maquinaria de piARNs se expresa principalmente en células de línea germinal, existe extensa evidencia reciente de que la expresión de proteínas PIWIs, no necesariamente unidas a piARNs, se encuentra inducida de manera aberrante en varios tipos de cáncer. Por ello, son consideradas como miembros de la familia de antígenos de cáncer derivados de testículo (Cancer-Testis Antigens). Sin embargo, el mecanismo molecular independiente de piARNs por el cual las proteínas PIWI contribuyen a la iniciación y progresión del cáncer aún no está claro. En nuestro equipo contamos con resultados preliminares de que PIWIL1 se encuentra sobre-expresada en líneas de cáncer de colon en una localización subcelular dinámica semejante a proteínas dependientes del ciclo celular. La disminución en la expresión de PIWIL1 pareciera desencadenar desordenes cromosómicos y aneuploidía en dicho contexto tumoral. Por lo tanto, en el presente trabajo, pretendemos poner en evidencia la relevancia de un rol no canónico de las proteínas PIWI como nuevas reguladoras del ciclo celular y la expresión génica en células somáticas y su impacto en la transformación maligna. Estos resultados podrían revelar nuevos mecanismos moleculares en la iniciación y progresión del cáncer con potencial en la identificación de nuevos blancos terapéuticos en oncología.

## **Integrative single-cell transcriptomic analysis unveils alternative polyadenylation modulation in secretory tissue**

Garcia Sola<sup>1</sup>, Montani<sup>1</sup>, Beckerman<sup>1</sup>, Coso<sup>1</sup>, Kordon<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IFIBYNE-UBA-CONICET

The mammary gland (MG) is a highly dynamic organ which undergoes periods of expansion, differentiation and cell death in each reproductive cycle. Single cell RNA-seq (scRNA-seq) analyses have contributed to understand the cellular and transcriptional heterogeneity of this complex tissue. Alternative polyadenylation (APA) generates diverse mRNA isoforms, which contributes to transcriptome diversity and gene expression regulation by affecting mRNA stability, translation and intracellular localization. This study is based on publicly available data from 53,686 individual cells obtained during mammary post-natal development, from puberty to post-involution. The original data-sets correspond to three foundational reports that have explored the MG cell populations throughout development at single-cell level using 3'tag-based scRNA-seq. This feature of the sequencing protocol allowed us to analyze APA patterns in the mammary epithelial cells (MECs). Our results show relevant changes in gene families associated with mRNA processing, such as hnRNP, Eif and Srsf, in different mammary cell lineages throughout the post-natal phases. Besides, APA modulation is also observed in key mRNAs for MG development and function, as *Egfr1* and *Prlr.*, which encode EGF receptor and Prolactin receptor, respectively. In summary, this study reveals that APA may provide a new control layer on gene expression regulation in MECs throughout puberty and adulthood.

## **APEX-seq como herramienta para estudiar el transcriptoma de organelas sin membranas como Smaug-body**

Gimenez M., Prudêncio P., Carmo-Fonseca M., Fernández-Alvarez A.J., Boccaccio G.L.

Instituto Leloir y IIBBA- CONICET, Buenos Aires, Argentina

Instituto de Medicina Molecular, Lisboa, Portugal

Existen una diversidad de organelas sin membranas dentro de las células, formadas a partir de una separación de fase líquido-líquido donde diversas moléculas y transcritos se condensan en estos cuerpos celulares. Sin embargo, estudiar su composición con técnicas como el fraccionamiento bioquímico puede resultar complejo. Aquí, aplicamos una novedosa técnica de marcado por proximidad denominada APEX-seq, para estudiar la composición de unas organelas sin membrana citoplasmáticas denominadas Smaug-body. Dicha técnica utiliza una enzima ascorbato peroxidasa (APEX), la cual oxida sustratos de biotina en radicales libre altamente reactivos capaces de interactuar tanto con proteínas como ARNs en un radio de aproximadamente 25 nanómetros. Fusionamos APEX a las proteínas Smaug1 y Smaug2 componentes de los cuerpos de Smaug, y logramos comprobar el funcionamiento de la técnica mediante inmunofluorescencia. Esta herramienta nos permitirá estudiar la identidad de los ARNs enriquecidos dentro de los cuerpos de Smaug y lograr una mayor comprensión de estas organelas.

## **El complejo HOS15/HDA9 se asocia con HYL1 para reprimir la expresión de miARN en un contexto de respuesta a ABA**

Giudicatti A.<sup>1</sup>, Yun D.<sup>2</sup>, Yang S.<sup>3</sup>, Manavella P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET-UNL), Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

<sup>2</sup> Department of Biomedical Science and Engineering, Konkuk University, Seoul, South Korea

<sup>3</sup> Department of Systems Biology, College of Life Science and Biotechnology, Yonsei University, Seoul, Korea

El silenciamiento génico mediado por microARNs (miARNs) modula numerosas vías del desarrollo y respuesta a estrés. En un trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio por el Dr. Manavella, diseñamos un screening genético para identificar nuevos factores involucrados en la vía de biogénesis de miARNs. Dentro de las mutantes obtenidas en dicho trabajo, se encontraba el alelo HOS15. HOS15 fue previamente descrito como un componente de los complejos de HDAC y E3-Ubiquitin ligasa y típicamente asociado a respuestas de estrés por frío, sequía y a la hormona ABA. En este trabajo, presentamos a HOS15 como un nuevo co-factor en la regulación de la biogénesis de miARNs. Demostramos que HOS15 es capaz de interactuar con HYL1, pero no con otros componentes de la vía. Además, observamos que la expresión desregulada de HOS15 conduce a la degradación de HYL1, modulando así su estabilidad proteica. Por otro lado, nuestros resultados muestran que HYL1 es también capaz de interactuar con HDA9 y HDA19, quienes a su vez se sabe que interactúan con HOS15 y los complejos TPL-TPR. Esto sugiere la posibilidad de una asociación entre estos complejos de modificación de la cromatina y los locus de genes MIR en un mecanismo de regulación a nivel transcripcional sobre estos últimos. En ese sentido, demostramos que en un contexto de procesamiento co-transcripcional de miARNs, HYL1 es requerido para la localización de HOS15 en determinados locus de genes MIR. Sumado a ello, la dimerización de HYL1 es necesaria para que esto ocurra. Esto sugiere, en principio, que HYL1 es capaz de reclutar específicamente a HOS15 a determinados locus de genes MIR con el objetivo de promover la transcripción/biogénesis del mismo. Sin embargo, esto no es cierto para todos los miARN, ya que según lo observado en nuestros análisis de small RNA-seq, solo un subconjunto de miARNs se encuentran disminuidos en mutantes de HOS15. Estos resultados son más evidentes en un contexto de respuesta al estrés por ABA. En este trabajo, proponemos un rol dual para HOS15 en la biogénesis de miARNs. En primer lugar, HOS15 puede promover la transcripción de ciertos genes de miARN a través del reclutamiento por parte de HYL1 a los locus de los mismos. Y, por otro lado, HOS15 es capaz de modular la estabilidad proteica de HYL1, afectando indirectamente el procesamiento de miARNs.

## **Mecanismos de acoplamiento entre transcripción y splicing alternativo en *C. elegans***

Godoy Herz M.A.<sup>1</sup>, Monti G.<sup>1</sup>, Martín M.E.<sup>1</sup>, Buggiano V.<sup>1</sup>, Kornblihtt A.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias, CONICET, Buenos Aires, Argentina y Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Dentro del universo de procesos que regulan la expresión genética elegimos estudiar el splicing: una serie de pasos en los que las secuencias de los intrones son eliminadas y las secuencias de los exones unidas entre sí, dando origen a un mensajero maduro (mRNA). Desde hace unos años, nuestro grupo estudia la regulación del splicing alternativo en plantas. En un trabajo reciente demostramos que la regulación del splicing alternativo por acción de la luz en plantas responde al modelo cinético de acoplamiento descrito originalmente en células animales. Esta regulación ocurre a nivel de un organismo entero. El objetivo general del proyecto es estudiar la regulación del splicing alternativo en organismos enteros, usando *C. elegans* como modelo animal. Buscamos investigar mecanismos de acoplamiento entre la transcripción y el splicing alternativo en un organismo entero, en respuesta a estímulos externos del ambiente. Como estímulo elegimos un protocolo de hambre en larvas de *C. elegans*: se observa que se modifican los patrones de una serie de eventos de splicing alternativo en respuesta a la presencia de alimento. Elegimos dos eventos representativos para continuar nuestro estudio. Encontramos que la inclusión del exón alternativo de uno de ellos, el transcripto *hrpf-1*, aumenta en presencia de camptotecina, droga que inhibe la elongación de la transcripción. A su vez, la incubación con tricostatina A – droga que aumenta la acetilación en histonas- produce el efecto opuesto. Estos resultados nos llevan a postular que la elongación de la transcripción puede estar involucrada en esta regulación. Realizaremos experimentos futuros de silenciamiento de factores de elongación y estudios del estado de fosforilación de la RNA polimerasa II para entender cómo opera un complicado mecanismo molecular en la respuesta de un organismo vivo ante condiciones naturales.

## **Identificación de procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs en plantas y la influencia de R-loops en loci codificantes en este mecanismo**

Gonzalo L.<sup>1</sup>, Tossolini I.<sup>1</sup>, Cambiagno D.A.<sup>1</sup>, Marquardt S.<sup>2</sup>, Manavella P.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET-UNL), Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

<sup>2</sup> Copenhagen Plant Science Centre, Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark.

Los micro ARNs (miARNs), componentes principales de la vía de silenciamiento génico post-transcripcional, cumplen funciones críticas durante el desarrollo de organismos multicelulares. La biogénesis de miARNs en plantas es un proceso dinámico y altamente regulado. En los últimos años se descubrió que múltiples proteínas involucradas en la biogénesis de miARNs son capaces de asociarse a la cromatina en genes que codifican miARNs (genes MIR). Uno de los ejemplos más significantes, es la unión de DICER-LIKE 1 a los genes MIR mediante su interacción con el complejo MEDIATOR y HASTY. El reclutamiento en la cromatina del complejo de biogénesis de miARNs, nos lleva a pensar que el procesamiento de los pri-miARNs puede ocurrir de forma co-transcripcional. Para evaluar esta posibilidad, en este trabajo analizamos datos de secuenciación de transcriptos nacientes (plNET-seq) en búsqueda de intermediarios de procesamiento aún unidos a la ARN polimerasa II. Estos análisis nos permitieron confirmar que el procesamiento de los pri-miARN se produce de forma co-transcripcional y que varía dependiendo del pri-miARN procesado. En este sentido, encontramos que la biogénesis de miARNs procesados desde el loop a la base (LTB) del pri-miARN ocurre completamente de forma co-transcripcional. En contraste, cuando el procesamiento es desde la base al loop (BTL) el primer corte se realiza de forma co-transcripcional, pero se requiere un segundo paso post-transcripcional para culminar con la liberación del miARN maduro. Los niveles de miARN maduro en una célula requieren un balance entre procesamiento post-transcripcional y co-transcripcional, el cual es variable y dinámico dependiendo del estadio de las plantas y las condiciones ambientales. Nuestro estudio también demuestra que la presencia de híbridos ADN:ARN (R-loops) en loci que codifican miARNs promueve el procesamiento co-transcripcional. Un aspecto interesante es que algunos de los pri-miARNs que poseen alta tasa de procesamiento co-transcripcional, son conocidos por dar lugar a miARNs maduros capaces de moverse fuera de la propia célula. Esto abre la posibilidad de que exista una posible diferenciación de las funciones de miARNs maduros según el tipo de procesamiento por el cual se generen.

## Long noncoding RNAs in splicing regulation during lateral root formation

Heidecker M., Bazin J.

Institut des Sciences des Plantes - Paris-Saclay (IPS2)

In all eukaryotic model organisms, an increasing number of long noncoding RNAs (lncRNAs) are identified which regulate alternative splicing (AS), albeit little is known about the underlying molecular mechanisms. In the PhD project, we will use root development as a model to study the impact of lncRNA in AS regulations during organogenesis. Our scientific questions are whether lncRNAs are a general component of AS networks and how they contribute to AS selectivity. The project is conceptually based on the extensive knowledge about ASCO, the first example of a plant lncRNA which regulates AS events, which was identified by the host group. We will use a bioinformatic screen to identify the four-best candidate lncRNAs in the model plant *Arabidopsis thaliana* which physically interact with AS regulators (NSRa, GRP7 and GRP8), are differentially expressed in root during the development or by applying environmental cues. In a reverse genetic approach, the lncRNA candidates will be functionally characterised in planta using knockout (T-DNA insertion or CRISPR-CAS9-induced deletions) and overexpression lines (35S promotor) to assess their impact in AS patterns via RNAseq. Moreover, we will study the effect on splicing regulators (NSRa, GRP7 and GRP8) binding to mRNA targets and their potential interactions with central proteins of the spliceosome (e.g., SMD1 and PRP8a as it was shown for ASCO). Finally, similarities and differences between the interaction of splicing regulators or spliceosomal proteins with the four lncRNAs and ASCO will be used to correlate lncRNA structure and function in AS regulation. Domain swapping experiments between lncRNA segments which are bound by AS regulators will allow us to generate synthetic lncRNAs and test their impact on AS events. Therefore, the interaction of the synthetic lncRNAs with AS regulators (NSRa, GRP7 and GRP8) and spliceosome proteins (SMD1 and PRP8a) will be studied in vitro and in vivo. This approach will allow us to elucidate if conserved lncRNA structures enable them to regulate AS networks and thereby contributing to AS selectivity.

## **Novel bioinformatic approaches for the profiling of abundant sRNA identified by sRNA-seq in human biofluids**

Ibañez M.<sup>1</sup>, Claus C.<sup>2,3</sup>, Grosso J.<sup>2,4</sup>, Borini Etichetti C.<sup>2,3</sup>, Spinelli S.<sup>2,4</sup>, Chorostecki U.<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Engineering (UNER), Entre Rios, Argentina.

<sup>2</sup> Institute of Clinical and Experimental Immunology of Rosario, IDICER, CONICET-UNR, Rosario, Argentina.

<sup>3</sup> Faculty of Biochemical and Pharmaceutical Sciences (UNR), Rosario, Argentina.

<sup>4</sup> Faculty of Medicine (UNR), Rosario, Argentina.

<sup>5</sup> Barcelona Supercomputing Center, Barcelona, Spain.

<sup>6</sup> Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain.

Small RNAs are key players in the control of gene expression in humans and they have been extensively studied as potential new biomarkers for a wide range of diseases. Their discovery in extracellular fluids has shown they are stable outside the cells and it has been proposed that they could play a role in cell-to-cell communication. Due to the advent of NGS approaches, screening of all known human biofluids and data accumulation became possible. However, while traditional bioinformatical analyses of sRNA-SEQ samples are usually focused towards the identification of miRNAs, the profiling of these biofluids showed that most of the small RNAs present correspond to other small RNAs, such as Piwi-interacting RNAs, small Nuclear RNAs, Small Nucleolar RNAs, ribosomal RNAs, transfer RNA's fragments and Y-RNAs. We developed a bioinformatics platform and carried out a profiling of 20 different human biofluids (including serum, plasma, seminal plasma, sputum and synovial fluid, among others). Our platform is highly efficient in terms of storage and computational costs, as it was optimized to easily process new samples of known biofluids with nearly no additional overhead. It facilitates the analysis of sample composition, and contains tools for sample comparison and structural analysis of sequences of interest. We found that 75% - 95% of the reads correspond to sequences not identified as miRNAs. Additional analysis of these sequence origins revealed that most of them are 5'-end sequences derived from tRNA, rRNA and Y-RNAs. In all analyzed samples only 10 sequences represent at least 20% of all reads, with some samples going as high as 90%. These highly abundant and conserved sequences were further analyzed for structural stability in-silico and are currently being tested experimentally to study their role in biofluids and on epithelia.

## Exploración funcional de clusters de genes co-expresados de *Trypanosoma cruzi*

Inchausti L.<sup>1,2</sup>, Martín A.<sup>3</sup>, Pérez-Díaz L.<sup>2</sup>, Garat B.<sup>2</sup>, Sotelo-Silveira J.<sup>4,5</sup>, Smircich P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Bioinformática, Departamento de Genómica, IIBCE

<sup>2</sup> Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

<sup>3</sup> Instituto de Computación, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República

<sup>4</sup> Departamento de Genómica, IIBCE

<sup>5</sup> Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

*Trypanosoma cruzi* es un parásito protozoario que causa la enfermedad de Chagas, una enfermedad tropical desatendida que afecta a millones de personas y prolifera en entornos empobrecidos. *T. cruzi* está caracterizado por tener un ciclo de vida complejo, que implica diferentes etapas de diferenciación. Los genes *T. cruzi* son expresados de forma policistronica, siendo los mecanismos post-transcripcionales los principales reguladores de la expresión génica. Los análisis de coexpresión génica son una herramienta valiosa para estudiar los cambios en los niveles de expresión de grupos de genes que interactúan funcionalmente entre sí. El objetivo de este trabajo es caracterizar nuevos mecanismos de expresión a través de la caracterización y análisis funcional de grupos de co-genes expresados utilizando datos transcriptómicos de varias etapas del ciclo de vida de *T. cruzi*. En este contexto, hemos identificado varios grupos de genes co-expresados mediante el uso de diferentes metodologías de agrupamiento no supervisadas. Hemos optimizado estos métodos mediante el desarrollo de métricas que evalúen la agrupación funcional de genes conocidos y la consistencia funcional global de la red. Hemos realizado un análisis de las características funcionales de los genes en cada grupo. Esperamos que estos resultados realicen una contribución significativa a la comprensión de la biología molecular de este parásito de gran relevancia.

## **Alternative splicing and polyadenylation regulation in response to light in *Arabidopsis thaliana***

Kubaczka M.G.<sup>1</sup>, Godoy Herz M.A.<sup>1</sup>, Chen J.<sup>2</sup>, Tian B.<sup>2</sup>, Kornblihtt A.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias, CONICET, Buenos Aires, Argentina y Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

<sup>2</sup> The Wistar Institute, Philadelphia, United States of America.

Light is an essential environmental cue for plants. We have previously shown that light generates a chloroplast retrograde signal that regulates nuclear alternative splicing (AS) of a subset of *Arabidopsis thaliana* transcripts. The effect is seen in shoots and roots, but it is abolished in roots when the communication with the photosynthetic tissue is interrupted, suggesting that a signaling molecule travels through the plant. The mechanism involves changes in RNA polymerase II (RNAPII) transcriptional elongation: in the light, elongation is faster, whereas in darkness elongation is lower which is consistent with light-mimicking effects of drugs that promote faster elongation. In this work, we are investigating changes in alternative polyadenylation (APA), another central step in mRNA processing, in response to light. Using 3' region extraction and deep sequencing (3'READS), we mapped cleavage and polyadenylation sites (PAS) in *Arabidopsis thaliana*, discovering previously un-annotated PAS. We found that exposure of *Arabidopsis* seedlings to light promotes the usage of distal PAS, giving rise to longer 3'UTRs. With the validated data set, we are investigating the underlying mechanism. Our results suggest that, as it happens with AS, regulation of APA by light is not affected in plants with genetically disrupted phytochrome and cryptochrome pathways, is abolished by inhibition of the chloroplast photosynthetic electron transport and the effect is not observed in roots when communication with shoots is interrupted. Taken all together, these data imply that light controls different nuclear mRNA processing steps in plants through the chloroplast and throughout the whole organism.

## **Rol de los sistemas miR396/GRF y ARF en la regulación del desarrollo floral de *Arabidopsis thaliana***

Lazzara F.<sup>1</sup>, Beltramino M.<sup>1</sup>, Ferela A.<sup>1</sup>, Palatnik J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (CONICET)

El crecimiento y desarrollo de los órganos de las plantas es controlado por múltiples genes y vías de regulación. La familia de factores reguladores de crecimiento “Growth-Regulating Factors” (GRFs) está constituida por nueve miembros, siete de los cuales son regulados por el microARN miR396. El sistema miR396-GRFs se encuentra conservado tanto en angiospermas como en gimnospermas. Los GRFs actúan como promotores del crecimiento, y se ha visto que las plantas con alta actividad de GRFs, por disminución de la actividad del miR396, presentan hojas de mayor tamaño y retardo en la senescencia. ARF2 pertenece a la familia de los factores de transcripción de respuesta a auxina. ARF2 es regulado por ta-siRNAs (trans acting small RNAs). Las mutantes en *arf2* presentan un aumento en el tamaño de las hojas y semillas, y retardo en senescencia. Si bien en trabajos anteriores ya se ha caracterizado como estos sistemas regulan el crecimiento foliar, radicular y otros órganos vegetativos, poco se sabe de cómo interaccionan estos sistemas en el desarrollo floral y reproductivo de las plantas. En este trabajo, evaluamos la participación de los sistemas miR396/GRFs y ARF2 en el control del desarrollo floral de *Arabidopsis thaliana*. Estudiamos la interacción genética entre los dos sistemas mediante la cruce de plantas mutantes y transgénicas con modificación en los niveles del miR396 y GRFs, con plantas mutantes knock-outs en ARF2. Realizamos un análisis fenotípico de las cruces en relación con las plantas parentales. Además, evaluamos los niveles de expresión de los diferentes genes en estudio y otros genes involucrados en el desarrollo floral por ensayos RT-qPCR. En vista de los resultados obtenidos, presentamos un modelo de como estos dos sistemas definen las estructuras florales y por ende el desarrollo reproductivo en *Arabidopsis*.

## **APOLO-mediated protein complex involved in transcriptional feedback mechanism in response to UV-B**

Legascue M.F., Mammarella M.F., Mansilla N., Lucero L., Ariel F.

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, CONICET, FCB, Universidad Nacional del Litoral, Colectora Ruta Nacional 168 km 0, 3000 Santa Fe, Argentina

From the total spectrum of solar radiation reaching the Earth's surface, about 8% constitutes ultraviolet (UV) radiation. Particularly, UV-B is filtered by the stratospheric ozone layer and therefore only 1,5% of it, gets to the Earth. UV-B is known to cause DNA damage and to affect growth and development of plants. Thus, the ozone layer acts as a key component of the environment and its depletion involves an increase in UV-B radiation affecting living organisms constantly exposed. In *Arabidopsis thaliana*, UV-B perception is mediated by the UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8) as a UV-B specific photoreceptor. The UV-B driven monomerization of UVR8 dimer is followed by the interaction with the E3 ubiquitin ligase CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) to mediate photomorphogenesis and plant acclimation. Downstream of UVR8 and COP1, the bZIP transcription factor ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) is required for the transcriptional regulation of a subset UV-B-regulated genes. Furthermore, it has been demonstrated that UV-B increases acetylation of lysines K9 and/or K14 of histone H3 (H3K9,14diac) at UVR8-regulated gene loci including HY5, in a UVR8-dependent manner. However, no evidence was obtained by performing yeast 2-hybrid assays to demonstrate a direct interaction between UVR8 and any of the histone acetyl-transferases encoded in the *Arabidopsis* genome. While genetic variation is the primary source of long-term adaptation and evolution in multicellular organisms, induced epigenetic changes can facilitate rapid adaptation to short-term environmental fluctuations potentially serving as an alternative and rapid mode of evolution. Plants can efficiently integrate environmental signals to respond to repeated exposure to the same stress and it has been demonstrated that this acclimation involves changes in chromatin and in the activation of long non-coding RNAs (lncRNAs). In particular, the lncRNA APOLO (AUXIN REGULATED PROMOTER LOOP RNA) regulates the activity of its neighbour gene PID and a plethora of auxin-responsive genes across the *Arabidopsis* genome. It has been shown that APOLO recognizes its target loci by sequence complementarity and R-loop (DNA-RNA duplex) formation. APOLO interacts with the H3K27me3-related protein LHP1 (LIKE HETEROCHROMATIC PROTEIN 1), the DNA methylation-binding protein VIM1 (VARIANT IN METHYLATION 1) and with the transcription factor WRKY42, modulating chromatin conformation dynamics and gene expression. Contrary to LHP1 and VIM1, here we show that APOLO is involved in the regulation of the activation mark H3K9,14diac through the formation of a ribonucleoprotein complex with UVR8 and HAC5 (HISTONE ACETYLTRANSFERASE 5) over the HY5 locus after UV-B exposure. Similarly to other targets, APOLO can recognize the HY5 locus through sequence complementarity and R-loop formation. Interestingly, we found that the APOLO promoter is directly activated by HY5, resulting in a transcriptional feedback mechanism. A further increase in APOLO levels triggers a decoy of UVR8 and HAC5 away from the HY5 locus, buffering down its transcriptional activity. Furthermore, we show that APOLO is expressed in the guard cells and its deregulation impairs stomata closure in response to UV-B. Altogether, our results serve to uncover a novel mechanism of environmental adaptation in *Arabidopsis* given by the direct interaction between a long noncoding RNA, histone modifiers and the key UV-B photoreceptor UVR8.

## **Mecanismos de internalización y efectos transcriptómicos inducidos por ARNs pequeños encapsulados en vesículas extracelulares**

Li Calzi M.<sup>1</sup>, Blanco V.<sup>1,2</sup>, Cayota A.<sup>1,3</sup>, Tosar J.P.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo

<sup>2</sup> Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

<sup>3</sup> Departamento Básico de Medicina, Hospital de Clínicas, Universidad de la República

<sup>4</sup> Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Se sabe que la comunicación intercelular puede estar mediada por diferentes macromoléculas, como los ARNs, y que pueden viajar encapsulados en vesículas extracelulares (EVs). Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la internalización y reconocimiento de ARNs encapsulados en EVs aún no se comprenden del todo. Para profundizar en estos aspectos, se estudió mediante microscopía láser confocal en células vivas la dinámica de la internalización de EVs marcadas con una tinción lipídica y purificadas por métodos cromatográficos, pudiendo así realizar un seguimiento en tiempo real del camino desde el medio extracelular hacia el interior de la célula. Además, se marcó zonas ácidas intracelulares con sondas dependientes de pH, de modo tal de poder estudiar las interacciones EV-(endo)lisosoma. Nuestros resultados son consistentes con una captación de EVs mediante macropinocitosis, al menos en las líneas celulares estudiadas (MCF-7 y U-2 OS). Inhibidores de la endocitosis afectaron la internalización de las EVs, pero no su interacción con la membrana plasmática. Por otra parte, se marcó el ARN intravesicular con un fluorocromo para poder visualizarlo dentro de EVs y nos encontramos actualmente trabajando en la elaboración de herramientas para estudiar el escape endosomal del ARN vesicular endocitado. Para comprender cuáles son los cambios transcriptómicos inducidos por la llegada de ARNs en EVs a células receptoras, cargamos EVs con ARNs sintéticos, correspondientes a los ARNs más abundantes en el medio extracelular, y las incubamos con células receptoras. Nuestros resultados son compatibles con un reconocimiento independiente de secuencia a nivel endosomal, presuntamente mediado por receptores de la inmunidad innata.

## Más allá de la transcripción: en búsqueda de mecanismos de regulación post-transcripcional mediados por p53 durante la UPR

Larghero I.<sup>1</sup>, Ehrlich R.<sup>1,2</sup>, Portela M.M.<sup>3,4</sup>, Perelmuter K.<sup>5</sup>, Fernández-Calero T.<sup>6,7</sup>, Chalar C.<sup>1</sup>, Fåhraeus R.<sup>8,9,10</sup>, Durán R.<sup>3</sup>, Bollati-Fogolín M.<sup>5</sup>, Marín M.<sup>1</sup>, López I.<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

<sup>2</sup> Institut Pasteur de Montevideo

<sup>3</sup> Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

<sup>4</sup> Facultad de Ciencias, Universidad de la República

<sup>5</sup> Unidad de Biología Celular, Institut Pasteur de Montevideo

<sup>6</sup> Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo

<sup>7</sup> Departamento de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Católica del Uruguay

<sup>8</sup> INSERM UMR 1131 Institut Saint-Louis, Université Paris Cité, París, Francia

<sup>9</sup> RECAMO, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, República Checa

<sup>10</sup> Department of Medical Biosciences, Umeå University, Umeå, Suecia

La proteína supresora de tumores p53 es un nodo de control de la homeostasis celular que regula procesos vitales como el ciclo celular, la apoptosis y el metabolismo, entre varios otros. Si bien su faceta más conocida es la de factor de transcripción, estudios más recientes sugieren que p53 también coordina mecanismos de regulación post-transcripcional en diferentes contextos celulares. Entre ellos se encuentra la respuesta a proteínas desplegadas (UPR, “Unfolded Protein Response”), una vía adaptativa inducida en condiciones fisiológicas frente a alteraciones de la proteostasis dentro del retículo endoplásmico (RE) y alterada en enfermedades como la diabetes, enfermedades neurodegenerativas y cáncer. En este marco, p53 inhibe la traducción de algunos ARN mensajeros (ARNm) mediante mecanismos moleculares aún desconocidos. Nuestro grupo busca identificar blancos moleculares y procesos controlados por p53 de forma post-transcripcional durante la UPR y explorar los mecanismos involucrados. En este trabajo estudiamos de forma comparativa la variación del transcriptoma y del proteoma de células H1299 derivadas de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humanas, en presencia y ausencia de p53 en condiciones de estrés en el RE inducido por taspigargina. El transcriptoma se analizó usando microarreglos de ADN y el estudio proteómico cuantitativo sin marcado (“label-free”) se realizó mediante aproximación “shotgun” y usando las intensidades extraídas del cromatograma iónico (XIC, “Extracted-Ion Chromatogram”). En línea con el conocimiento previo sobre la UPR, nuestros resultados muestran que la respuesta al estrés en el RE está caracterizada por la inhibición de la expresión de un gran número de genes, evidenciado tanto a nivel de ARN como de proteínas. Sin embargo, estudios de ontología realizados con los datos proteómicos sugieren que algunas de las respuestas típicamente asociadas a la UPR son reforzadas por p53, como son la inhibición de la replicación y el ciclo celular, mientras que otras son detectadas exclusivamente en presencia de p53. Entre estas últimas se destacan la alteración del ensamblado y procesamiento de complejos ribonucleoproteicos como la maquinaria de “splicing” y el ribosoma. En conjunto, estos datos permiten comenzar a definir la firma de p53 durante la UPR. Por otro lado, y apuntando a la descripción de mecanismos de regulación post-transcripcional, resultados preliminares indican que la disminución de la expresión de algunas proteínas en presencia de p53 en condiciones de estrés, no se condice con los niveles de expresión de sus ARNm, lo que insinúa un desacople entre ambos niveles. Una mirada más fina de esas proteínas “desacopladas” indica que los 5’UTRs de algunos de sus ARNm comparten un motivo de secuencia que no está presente en los ARNm de las proteínas “acopladas”. Es tentador pensar que este motivo funcione como plataforma molecular de regulación, por lo que nos proponemos estudiar las posibles implicancias de esta observación.

## **Caracterización de la actividad pro-inflamatoria y antiviral de la proteína celular RBM10 ante la infección por el virus de dengue**

Magalnik M.<sup>1</sup>, Pozzi B.<sup>1</sup>, Srebrow A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IFIBYNE (UBA-CONICET)

En el contexto de una infección de células de mamífero por el virus del dengue (DENV) se activan múltiples mecanismos que forman parte de lo que se conoce como respuesta inmune innata celular. Entre ellos, se activa el receptor de ARN citoplasmático RIG-I, evento que dispara cascada de señalización que llevan a la expresión de genes de citoquinas pro-inflamatorias y de interferón (IFN). El interferón secretado al exterior celular luego actúa en forma autocrina o parácrina, desencadenando una fuerte inducción de genes conocidos como ISGs (Interferon Stimulated Genes). Uno de ellos es la acetil-transferasa de spermidina/spermina "SAT1", cuyo pre-ARNm es regulado por splicing alternativo, dando lugar a una isoforma de ARNm codificante antiviral y a otra isoforma no codificante que es degradada por NMD (Non-sense Mediated Decay). Este evento de splicing es regulado por la proteína de unión al RNA y factor auxiliar RBM10. Recientemente reportamos que altos niveles de RBM10 reprimen la replicación de DENV, inducen la expresión de genes de respuesta inmune innata y aumentan la proporción de la isoforma anti-viral del pre-ARNm de SAT1. Mas aún, encontramos que RBM10 interacciona con el ARN viral y con RIG-I y estimula su ubiquitinación no-degradativa. En la misma línea, hallamos un aumento de la localización citoplasmática de RBM10 en el contexto de infección, así como también al tratar células en cultivo con interferón. Al analizar una mutante de localización más citoplasmática de RBM10, vimos que, si bien su actividad de splicing disminuye, no pierde su interacción con RIG-I ni su capacidad de regular la ubiquitinación de esta proteína. Proponemos que RBM10 ejerce su acción antiviral no sólo mediante su actividad como factor de splicing dentro del núcleo celular, sino también mediante su interacción citoplasmática con RIG-I. En el contexto de infección por DENV, planificamos analizar el interactoma de RBM10 como así también sus modificaciones post-traduccionales que puedan llevar a regular su localización sub-celular, su interacción con RIG-I y con el ARN viral, su actividad como factor de splicing y como inductor de genes de respuesta inmune.

## Long noncoding RNA-mediated epigenetic regulation of shade avoidance syndrome in *Arabidopsis thaliana*

Mammarella M.<sup>1</sup>, Lucero L.<sup>1</sup>, Ariel F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, CONICET, FBCB, Universidad Nacional del Litoral, Colectora Ruta Nacional 168 km 0, 3000 Santa Fe, Argentina.

Plants can adapt their architecture in response to environmental conditions and endogenous signals throughout their entire life cycle. This ability allows plants to survive and optimize the use of resources. The shade avoidance syndrome (SAS) is the mechanism by which plants modify their architecture to reduce the current or future shade. It occurs in response to light signals from the neighboring vegetation and triggers different effects depending on the plant age. In adult plants, some of the responses are branching repression and hyponasty. Shoot branching relies on the capacity of axillary buds to grow and form a new branch or remain dormant. The axillary bud outgrowth is regulated by BRANCHED1 (BRC1), a transcription factor of the TCP class II family. BRC1 is expressed in axillary buds and acts to prevent branch development integrating numerous endogenous and exogenous signals as hormones or light quality (low Red/Far Red, R/FR, ratio). Hyponasty is the upright movement of leaves determined by auxin redistribution in response to a low ratio R/FR sensed by phytochromes (phyB). However, the molecular basis of this mechanism modulating auxin homeostasis remains largely unknown. Plant developmental plasticity during SAS depends on a wide range of gene expression regulatory mechanisms. Among them, chromatin structure dynamics determines the spatial context of genes and the DNA accessibility. Chromatin conformation depends on its compaction, which results from the action of histones modifiers, long noncoding RNAs (lncRNAs), transcription factors and mediator proteins. In general terms, the acetylation and phosphorylation of histone tails are marks associated with an open chromatin conformation. While methylation, as H3K27me3 or H3K9me2, are linked to chromatin compaction and frequently characterize the epigenetic profile of silent genes and transposons, respectively. Interestingly, lncRNAs participate in histone modification dynamics and chromatin compaction through the recruitment or decoy of specific ribonucleoproteins to/from target regions. Moreover, it has been shown that lncRNAs can directly or indirectly affect gene activity by fine-tuning chromatin 3D loop formation. In the model species *Arabidopsis thaliana*, the lncRNA APOLO recognizes its neighbor gene PID in cis and a subset of target genes in trans through sequence complementarity and R-loop (DNA-RNA duplex) formation. As a result, APOLO modulates local chromatin 3D conformation and gene transcriptional activity. In this study we show that APOLO is activated by low R/FR ratio and participates in SAS. In axillary buds, APOLO directly regulates the transcription of the master regulator BRC1 expression by controlling a local chromatin loop encompassing BRC1 promoter, thus determining the number of plant branches. In addition, APOLO is involved in leaf hyponasty through the epigenetic regulation of PID and WAG2, two kinases implicated in the phosphorylation of PIN transporters and auxin redistribution under FR conditions. Strikingly, the spray of in vitro transcribed APOLO to *Arabidopsis* plants triggers auxin-related disorders and an altered response of the plant to the environment. Altogether, our results served to uncover the role of the lncRNA APOLO in the epigenetic regulation of SAS and suggest that exogenous lncRNAs can be used as active biomolecules to modulate the behavior of plants.

## Molecular and functional evolution of PRC1 protein LHP1 in Brassicaceae

Mansilla N.<sup>1</sup>, Ariel F.<sup>1</sup>, Lucero L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EPILAB, Instituto de Agrobiotecnología del litoral

The protein LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1) was first discovered in the plant *Arabidopsis thaliana* and is part of the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1). LHP1 recognize the H3K27me3 mark and regulate its spreading through gene bodies, affecting the 3D shape of the chromatin. The Brassiceae tribe within the Brassicaceae family has three homologs of LHP1. We selected the species *Brassica rapa* for functional analyses of the LHP1 copies named here BrLHP1A, BrLHP1B, and BrLHP1C. The phylogenetic analysis revealed that BrLHP1A is the ortholog of AtLHP1, and BrLHP1C is the most divergent paralog. Between BrLHP1A and BrLHP1C, the main divergent regions are the Hinge (H) and the Chromo Domain (CD), responsible for RNA binding and H3K27me3 recognition, respectively. We observed a different localization pattern in the nuclei of transiently transformed *B. rapa* and *Nicotiana benthamiana* leaves. BrLHP1A showed a classical speckle pattern (similar to AtLHP1 and H3K27me3 dependent), while BrLHP1C was observed more homogeneous through the nucleus exhibiting few speckles. To further explore this, we generate mutant versions of BrLHP1A lacking the CD or resembling the deletion of the H domain of BrLHP1C. The H mutant showed an increased speckle intensity and accumulation in nucleolus. On the other hand, the CD deletion showed a localization that resemble BrLHP1C pattern where speckle accumulation is minimum. Due to the difficulty in obtaining *B. rapa* stable transformants, we rescue the *lhp1 Arabidopsis* mutant with BrLHP1A and BrLHP1C. In T2 plants we observed that BrLHP1A was able to almost fully complement the mutant phenotypes. Contrarily, the BrLHP1C protein was only able to produce a very weak rescue of the *lhp1* mutant, probably due to its different subcellular localization. Additionally, we performed a ChIP-qPCR assay to determine if both proteins were able to bind the FLC loci in *B. rapa*. Notably, both proteins recognize the FLC loci, however, they showed a different enrichment through the gene bodies. Altogether, these results show that the BrLHP1A probably conserve most of the AtLHP1 properties, while the BrLHP1C paralog would have a divergent function. This could be the result of a different H3K27me3 recognition capacity and interaction with RNAs, due to the changes in the CD and H regions. All this together prompted us to postulate that BrLHP1C would be under sub/neo-specialization process while BrLHP1A would be performing the canonical regulation process.

## **SOD1G93A astrocyte-derived extracellular vesicles induce motor neuron death by a miRNA 155-5p mediated mechanism.**

Marton<sup>1</sup>, Miquel E.<sup>1</sup>, Acosta-Rodríguez J.<sup>1</sup>, Fontenla S.<sup>2</sup>, Cassina P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup>Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by upper and lower motor neuron (MN) degeneration. Astrocytes surrounding MNs are known to modulate ALS progression. MNs in co-culture with astrocytes over-expressing the ALS-linked mutant Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1G93A) or MNs in culture treated with conditioned medium of SOD1G93A astrocytes experiment a reduction in survival. However, the exact nature of the neurotoxic agent is unknown. Astrocytes secrete exosomes that transport proteins, mRNA, and microRNAs from one cell to another. Here we analyzed the microRNA content of SOD1G93A astrocytes derived extracellular vesicles (EVs) and evaluated its role in astrocyte ability to support MNs survival. EVs isolated from cultured astrocytes display the size and protein markers of exosomes. Purified MNs exposed to SOD1G93A astrocyte exosomal fraction showed reduced survival and neurite length compared to those exposed to non-Tg astrocyte exosomes. Analysis of the miRNA content of the exosomal fraction revealed that miR-155-5p and miR-582-3p are differentially expressed in SOD1G93A fractions compared with non-Tg ones. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis indicates that miR-155-5p and miR-582-3p predicted targets are enriched in the neurotrophin-signaling pathway. Importantly, when levels of miR-155-5 were reduced by incubation with a specific antagomir, SOD1G93A exosomes did not induce MNs death nor reduce neurite length. These results demonstrate that SOD1G93A-derived exosomes are sufficient to induce MNs death, and miRNA-155-5p contributes to this effect. miRNA-155-5p may offer a new therapeutic target to modulate disease progression in ALS.

## **Antagonistic effects of arginine methylation of a component of the U6snRNP LSM4 mediating plant stress responses.**

Agrofoglio Y.<sup>1</sup>, Iglesias M.J.<sup>1</sup>, Perez-Santángelo S.<sup>2</sup>, de Leone M.J.<sup>3</sup>, Koester T.<sup>4</sup>, Yanovsky M.J.<sup>3</sup>, Staiger D.<sup>4</sup>, Mateos J.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE-CONICET-UBA), Buenos Aires, Argentina

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, University of Otago, Dunedin 9054, New Zealand

<sup>3</sup> Fundación Instituto Leloir, Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires–Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), C1405BWE Buenos Aires, Argentina

<sup>4</sup> RNA Biology and Molecular Physiology, Faculty of Biology, Bielefeld University, 33615 Bielefeld, Germany

Protein post-translational modifications (PTMs) are among the fastest and earliest of plant responses to changes in the environment, therefore these mechanisms are essential for plant adaptation. Arginine methylation is mediated by PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASES (PRMTs) in eukaryotes, being PRMT5 the most characterised PRMT. PRMT5 targets in plants include several RNA binding proteins involved in splicing and alternative splicing, suggesting a key role for this PTM in regulating splicing *in vivo*. Here we use LSM4, part of the multisubunit complex U6 snRNP, as a paradigm to show how far methylation by PRMT5 is important to fine-tune its action in splicing.

## **Análisis del transcriptoma de dos cultivares de soja en respuesta a la infección con *Diaporthe caulivora***

Mena E.<sup>1</sup>, Reboledo G.<sup>1</sup>, Stewart S.<sup>2</sup>, Montesano M.<sup>1,3</sup>, Ponce de León I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa Nacional de Cultivos de Secano, La Estanzuela, Colonia, Uruguay

<sup>3</sup> Laboratorio de Fisiología Vegetal, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

En Uruguay la soja constituye el principal producto de exportación. Una de las enfermedades que afecta este cultivo es el cancro del tallo, causado por *Diaporthe caulivora*. En este estudio se compararon dos cultivares de soja contrastantes, Williams (susceptible) y Génesis 5601 (resistente), en respuesta a la infección con *D. caulivora*. La enfermedad se desarrolla en ambos cultivares, observándose mayor largo de las lesiones y biomasa del patógeno en el cultivar Williams. Mediante análisis transcriptómicos, se observaron diferentes patrones de expresión de genes entre plantas inoculadas respecto a sus controles y también entre cultivares. En condiciones basales Genesis 5601 presenta mayor expresión de genes que codifican receptores involucrados en detectar a los patógenos y genes relacionados con la defensa vegetal. Además, se observó una activación de la respuesta de defensa más rápida en el cultivar resistente, detectándose a tiempos tempranos 1028 genes sobreexpresados en Genesis 5601 y solo 434 genes en Williams. Los patrones de expresión de genes regulados positivamente y el análisis de enriquecimiento de ontología mostraron que en la activación de defensa vegetal juegan un rol importante la percepción del patógeno, la señalización, las vías hormonales, la ruta de los fenilpropanoides y las proteínas relacionadas con la patogenicidad. Los resultados obtenidos constituyen aportes originales sobre este patosistema y brindan información relevante sobre las bases moleculares y la activación de mecanismos de defensa en la interacción soja-*D. caulivora*, los cuales pueden ser utilizados en los programas de mejoramiento de la soja.

## El dúo EFR-XIK en la regulación de respuestas frente a patógenos mediada por cambios en la cromatina

Mencia R.<sup>1</sup>, Arce A.<sup>1</sup>, Manavella P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Santa Fe, Argentina

Los genomas de plantas contienen una gran proporción de elementos transponibles (TEs), alcanzando hasta un 90% en algunas especies de gramíneas. La planta modelo *Arabidopsis thaliana* presenta un 20% de su genoma compuesto por TEs y otros elementos repetitivos. Para mantener la tranposición de estos elementos bajo control, las plantas utilizan la vía de metilación del ADN dependiente de ARN (RdDM) con el fin de silenciarlos transcripcionalmente. Como efecto secundario, el silenciamiento de TEs puede además impactar en la transcripción de genes vecinos. En nuestro grupo hemos identificado un elemento derivado de un TE con repeticiones invertidas (IR) que se encuentra adyacente a los 3' UTR de los genes de *Arabidopsis* EF-Tu RECEPTOR (EFR) y Miosyn XI-K (XIK). Llamativamente encontramos una versión del transcripto del gen XIK, que incluye al IR, este transcripto sería capaz de ser procesado por la maquinaria de síntesis de ARNs pequeños dando lugar a siRNA de 24 nucleótidos que a su vez activan la metilación del IR. Esta metilación del ADN induce un cambio conformacional de la cromatina creando un loop de ADN de corto alcance que contiene la región codificante de EFR. EFR es un receptor de patrones asociados a patógenos (PAMPs) capaz de activar respuestas de inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI), actuando de esta manera en la primera línea de respuestas inmunes. Encontramos que el IR estudiado, el cual no se encuentra conservado en las variedades naturales de *Arabidopsis*, afecta dinámicamente la expresión de EFR. La variación natural en la presencia del IR se correlaciona con diferencias en la topología en del genoma entre ecotipos, la expresión de EFR, y la respuesta de las plantas frente al ataque del patógeno *Pseudomonas syringae*. Nuestros resultados representan un caso único de potencial evolución adaptativa a patógenos causada por el movimiento de TEs y la consecuente alteración de la organización tridimensional de la cromatina en un proceso dinámico que involucra a dos genes adyacentes en el genoma.

## **Regulation of RAC 1 gene expression by vGPCR. influence of post-transcriptional processing variants.**

Montani M.<sup>1</sup>, Naipauer J.<sup>1</sup>, Coso O.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, IFIByNE - CONICET - Argentina

Normal cell proliferation is regulated by multiple factors, the deregulation of any of the mechanisms in which these factors intervene can cause dysregulated proliferation of cells leading to cell transformation and cancer. Kaposi's sarcoma (KS), an AIDS-defining cancer caused by the KS herpesvirus (KSHV), is a vascular sarcoma characterized by angiogenesis and spindle-cell proliferation. KSHV-encoded G protein-coupled receptor (vGPCR) can initiate KS-like tumors in mice. Moreover, it has been found that endothelial cells expressing the KSHV – encoded G protein-coupled receptor (vGPCR), show RAC1 upregulation, and, inhibition of RAC1 activation in these cells diminishes vGPCR-induced tumorigenesis *in vivo*. Different signal transduction mechanisms, like cell migration, proliferation, and cell growth share the Rac 1 oncogene product as the main component. This oncogene has been widely reported in different subcellular sites such as nucleus and mitochondrial outer membrane, but mainly in the plasma membrane associated with G protein-coupled receptors and tyrosine kinase receptors. This small GTPase is important for tumor formation, progression, and metastasis. In the last two decades, processes involved in the regulation of alternative 3'UTR expression have gained interest, such as mRNA stability and alternative polyadenylation. Recent results from our laboratories show that the stability of messenger RNAs and alternative polyadenylation contribute to modulating the quantity and/or quality of these molecules to be translated. This mechanism leads alternative messenger RNA subpopulations to different subcellular compartments, contributing to a new functional regulation factor. In the present work, we hypothesized that vGPCR not only can regulate RAC1 activation but also would impact the production of different mRNA isoforms of RAC 1 generated by alternative polyadenylation, changing the mRNA stability and protein localization of RAC1. Therefore, we evaluated the existence of different mRNAs of RAC 1 generated by this mechanism, its stability, and subcellular distribution in the murine endothelial cell lines SVEC and SVEC vGPCR, which stably express the oncogene vGPCR. We performed 3'RACE assays in this mouse endothelial cell line and found two mRNA isoforms of RAC1 generated by alternative polyadenylation. Importantly, endothelial cells overexpressing vGPCR showed upregulation of the longest mRNA isoform. Furthermore, we designed expression vectors that allow us to observe by fluorescence microscopy if these mRNA isoforms are found differentially distributed in different cellular compartments. In addition, these vectors also enable us to evaluate the stability of the different mRNA isoforms by RT-qPCR. These results revealed that an alternative polyadenylation mechanism generates different isoforms of RAC 1 messenger RNA; this mechanism can be regulated by the viral oncogene vGPCR and could be associated with mRNA stability regulation and RAC1 protein subcellular location, leading to RAC1 activation.

## Pushing arboviruses into a hostile RNA sequence space

Moratorio G.

FCien-UdelaR & IPMon

The compositional properties of viral genomes are informative about their origin and evolution. Arboviruses (arthropod-borne viruses) replicate in insects that transmit them to vertebrates, their second host. Thus, arboviruses have been exposed to the compositional biases of both hosts from significantly different phyla. Compositional properties are genomic signatures across a genome and result in different arrays of oligonucleotides. Here, to reduce the high dimensionality of the data and being able to extract meaningful patterns, we applied principal component analysis (PCA) and multidimensional scaling (MDS) approaches to more than 8000 reference viral genomes. Thus, we observed that arboviruses present a dinucleotide under-representation in CpG and UpA, whereas insect-specific viruses (ISVs) were only under-represented in UpA. Using Mayaro virus (MAYV) as a model, we have, by computer design and synthetic biology, rationally altered this dinucleotide frequency balance towards insect-specific viruses (ISVs). Our results show that recoded MAYVs grow as the wild-type virus in insect cells but are significantly attenuated in mammalian cells and in the mouse model. Importantly, the attenuated phenotype of the recoded MAYV can be reverted by targeting the zinc-finger antiviral protein (ZAP). Overall, here we suggest insights about the influence of both arthropod and vertebrate immune systems that shape the genetic composition of arboviruses.

## **Virus oncolíticos como una nueva herramienta para el tratamiento de cáncer**

Moreno P., Moratorio G.

FCien-UdelaR & IPMon

El cáncer constituye uno de los mayores desafíos para la salud pública. A pesar de los excelentes avances conferidos por los tratamientos clásicos, como la cirugía o la quimioterapia, muchas veces estos presentan un alto grado de resistencia y nocividad. En este contexto, se genera la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas innovadoras. Los virus oncolíticos (VOs) surgen como una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento del cáncer, siendo virus capaces de replicar selectivamente y destruir células tumorales. En el laboratorio actualmente trabajamos con dos modelos de VOs pertenecientes a diferentes familias virales que han demostrado previamente tener tropismo natural por células tumorales: el virus Coxsackie B3 (CVB3) y el virus Mayaro (MAYV). Estos virus han sido modificados por ingeniería genética en el laboratorio a fin que, por un lado, estén atenuados, lo que disminuiría el riesgo de desarrollar formas peligrosas de la enfermedad con la cual está asociado, y por otro lado aumentar su tropismo por células tumorales. En este sentido ambos virus han sido atenuados por la estrategia 1-to-stop. Por otra parte, a fin de aumentar el tropismo de estos virus por las células tumorales y disminuir su tropismo por células normales, se insertaron por ingeniería genética secuencias diana del miR145 en el genoma viral. Este miR145 se expresa en células normales, pero se encuentra reprimido en numerosos tumores, lo que generará que en células normales la replicación viral se verá reprimida mientras que, en células tumorales, que carecen de este miR, la replicación viral no estará restringida. Tanto para los virus wild type (wt) como para los virus sintéticos, se realizaron ensayos de cinética de replicación viral y se analizaron sus características oncolíticas. Los resultados preliminares indican que tanto CVB3 como MAYV replican selectivamente en células tumorales derivadas de diferentes tipos de cáncer y que, además, se observan diferencias en el fitness viral de los candidatos atenuados cuando se compara con el virus wt. Asimismo, comprobamos que el mecanismo mediado por miR145 disminuye la replicación viral en células normales. Como conclusión, aquí presentamos resultados preliminares prometedores que muestran tanto a CVB3 como a MAYV como posibles candidatos a VOs.

## Transcriptomic response of stinkbug *Piezodorus guildinii* during infection by *Beauveria bassiana*

Oberti H.<sup>1</sup>, Sessa L.<sup>1</sup>, Seidl M.<sup>2</sup>, Pessio M.<sup>3</sup>, Cibils X.<sup>3</sup>, Abreo E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Bioproducción, Plataforma de Bioinsumos, INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay

<sup>2</sup> Theoretical Biology and Bioinformatics, Department of Biology, Faculty of Science, Utrecht, Netherlands

<sup>3</sup> Laboratorio de Entomopatología, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay

The stinkbug *Piezodorus guildinii* is the most important phytophagous insect affecting soybean grains in USA, Argentina, Brazil and Uruguay. This is of major importance because of the economical losses as a consequence of decrease in grain yield and seed quality. Also, this insect is not under natural control and is increasingly tolerant to chemical insecticides. The use of insecticides is also costly for the environment and new strategies must be developed. Because of this, new approaches have been investigated like the use of the entomopathogen *Beauveria bassiana*. Several strains of this entomopathogen, obtained from *P. guildinii* and other insects, were tested in vitro and showed good perspectives to be developed as a low environmental impact control system of this insect. However, the speed to kill is a disadvantage for the use of microbial biological control agents like *B. bassiana*. Because of this, it is relevant to understand the insect response to infection by *B. bassiana* isolates during the first few days after penetration. A recently high-quality genome sequence of *P. guildinii* has been available and the utilization of this information, in combination with extensive transcriptomic analyses, is expected to provide new insights for its control. In the present study, we established a structural annotation of the reference genome of *P. guildinii* and performed a detailed examination of the gene expression during the infection of this insect with two strains of *B. bassiana* with high and low virulence against *P. guildinii*. The sequences were mapped into the reference genome assembly and the transcriptomic expression was investigated in each condition against a control condition of *P. guildinii* without infection. We found different patterns of expression during the infection and unique genes expressed in each condition. Interestingly, we found that there are differences in the expression against *B. bassiana* strains with high and low virulence. This could provide important data on key genes involved in defense of this insects that could be targeted for developing improved fungal strains for its control, or new approaches like RNAi particles. Also, these preliminary results will provide basic knowledge on *P. guildinii*, which will contribute to further advances in entomological research and to get insight in the biology of this insect.

## El ARN no codificante nc886 activa la vía del interferón en cáncer de próstata

Oliveira-Rizzo C.<sup>1,2</sup>, Fort R.S.<sup>1,3</sup>, Colantuono L.<sup>2</sup>, Khan S.<sup>4</sup>, Ignatchenko V.<sup>4</sup>, Liu S.<sup>5,6,7</sup>, Kislinger T.<sup>4,5</sup>, Garat, B.<sup>1</sup>, Sotelo-Silveira J.R.<sup>3,8</sup>, Duhagon M.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup> Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

<sup>3</sup> Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

<sup>4</sup> Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network, Toronto, Canada.

<sup>5</sup> Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, Canada.

<sup>6</sup> Department of Radiation Oncology, University of Toronto, Toronto, Canada.

<sup>7</sup> Odette Cancer Research Program, Sunnybrook Research Institute, Toronto, Canada.

<sup>8</sup> Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

El Cáncer de Próstata (PrCa) es el segundo cáncer de mayor incidencia en hombres en todo el mundo. Aún no se dispone de marcadores que permitan distinguir entre las formas indolentes y las formas agresivas de la enfermedad, o la sensibilidad del paciente a las terapias, por lo que el desarrollo de nuevos biomarcadores es necesario. Los ARNs no codificantes (ncRNAs) han surgido recientemente como actores clave en la iniciación y la progresión del cáncer y como prometedores biomarcadores en orina y plasma. Nuestro grupo estudia la desregulación de un ARN no codificante de tamaño mediano, llamado pre-mir-886/vtRNA2-1/nc886, el cual surge en mamíferos placentarios como una expansión del clúster de los ARNs de tipo “vault” (vtRNAs). Encontramos que nc886 tiene un perfil de expresión de un gen supresor de tumor en PrCa debido al aumento de la metilación en su promotor en tejido tumoral, y que modula la proliferación e invasión. Adicionalmente, demostramos que nc886 es procesado por DICER, resultando en la producción de pequeños ARNs derivados (snc886-3p y snc886-5p) capaces de producir silenciamiento génico mediado por RISC, mientras que snc886-3p contribuye con la acción supresora tumoral de nc886 en PrCa. El objetivo de este trabajo es identificar las principales vías en las que participa nc886 en PrCa mediante un abordaje ómico. Para esto, realizamos ensayos de pérdida y ganancia de función de nc886 en células normales y tumorales de próstata usando un oligo anti-sentido y el nc886 sintetizado mediante transcripción in-vitro, respectivamente. Analizamos los cambios a nivel del transcriptoma y del proteoma 48 horas luego de la modulación de la expresión de nc886, mediante la secuenciación masiva del ARN poli-A con la plataforma Illumina Hi-seq y la detección y cuantificación libre de marcaje de las proteínas mediante espectrometría de masas con la plataforma Orbitrap Fusion Tribrid. Identificamos genes diferencialmente expresados (DEGs) y vías de señalización celular enriquecidas, y utilizamos ensayos de genes reporteros y RT-qPCR para validar algunas de ellas. Adicionalmente, analizamos la correlación de la expresión de los DEGs con la accesibilidad de la cromatina del locus de nc886 usando los datos de ATAC-Seq disponibles en el repositorio The Cancer Genome Atlas (TCGA). Los resultados de los análisis integrados indican que nc886 modula principalmente transcritos de proteínas relacionados al sistema inmune, como la vía del interferón, la expresión de citoquinas, y la presentación de antígenos. Globalmente, esto sugiere que estas vías son las principales moduladas por nc886 en PrCa in-vitro y posiblemente a nivel clínico.

## **Requerimientos estructurales del ARN viral para el reclutamiento de la ARN-polimerasa en flavivirus**

Oviedo Rouco S., Pallarés H.M., Costa Navarro G.C., González López Ledesma M.M., Gamarnik A.V.

Fundación Instituto Leloir-IIBBA Conicet

El género *Flavivirus* incluye alrededor de 100 virus emergentes y re-emergentes que ciclan entre distintas especies. Teniendo en cuenta a los hospedadores que infectan se los puede dividir en cuatro subgrupos ecológicos. Hay flavivirus que ciclan entre insectos y mamíferos o aves, hay flavivirus que solo infectan artrópodos o que solo infectan mamíferos. Dentro de los flavivirus se encuentran importantes patógenos que alternan entre mosquitos y humanos como el virus del dengue, de fiebre amarilla, Zika, el virus de la encefalitis de San Luis entre otros. Colectivamente los miembros de este género causan anualmente cientos de millones de personas infectadas y miles de muertes. Sin embargo, aún se carece de antivirales y vacunas para controlar infecciones de los flavivirus. El material genético de los flavivirus consiste en una molécula de ARN de polaridad positiva de ~11 kb de largo. Esta cadena, además de codificar para las proteínas virales, presenta múltiples estructuras de ARN que son capaces de modular los procesos virales, la patogénesis y la alternancia de replicación en distintos hospedadores. Empleando al virus del dengue como modelo, estudios pioneros de nuestro laboratorio permitieron definir el mecanismo de replicación del genoma viral. Dicho mecanismo incluye el reconocimiento de un elemento de ARN como promotor para el pegado y la activación de la polimerasa viral llamado stem-loop A (SLA) que se ubica en el extremo 5' no codificante del genoma viral. Asimismo, análisis de secuencia y predicciones de estructuras secundarias de ARN de todos los virus del género en conjunto con evidencia experimental sugieren fuertemente que el rol de promotor de replicación viral del SLA se encuentra conservado en todos los flavivirus. En este trabajo estudiamos los requerimientos estructurales y de secuencia para la función del SLA. Con este fin construimos una biblioteca de virus con SLA modificados empleando al virus de Zika como modelo. La biblioteca de mutantes fue diseñada reemplazando el SLA original por la secuencia del SLA de una variedad de flavivirus distintos y por secuencias diseñadas para modificar racionalmente la estructura del SLA. La replicación de estos virus se evaluó en células de mosquito y humanas a partir de la transfección de los ARNs virales. Los resultados permitieron identificar una serie de elementos estructurales esenciales para la función promotora que están presentes en distintos virus. Sin embargo, uno de estos elementos esenciales parece ser específico de virus capaces de infectar mamíferos. De esta forma, estos estudios nos permiten agrupar elementos estructurales comunes y aquellos que son específicos de hospedador. Con el fin de determinar la función de estos elementos estructurales en el ARN estamos analizando los requerimientos para la unión a la polimerasa y aquellos necesarios para el inicio de la síntesis de ARN. En conjunto, nuestros estudios permitirán identificar elementos universalmente conservados en el complejo SLA-polimerasa como posibles blanco para el desarrollo de nuevos antivirales.

## **¿Qué información almacenan los precursores de microARNs en plantas?**

Palatnik J.

Instituto de Biología Celular y Molecular de Rosario (IBR, CONICET – UNR)

Los microARN son reguladores endógenos de la expresión génica esenciales en plantas y animales. Son generados a partir de precursores que contienen una estructura de tallo y burbuja por el microprocesador, cuyo componente principal en plantas es DICER-LIKE1. Los microARN maduros de ~21 nt de longitud se incorporan a los complejos ARGONAUTA, que guían hacia los ARNm blancos para su degradación o inactivación traduccional. A diferencia de sus contrapartes animales que tienen tamaños estereotípicos, los precursores de microARN de plantas son heterogéneos en forma y tamaño. Hemos descrito que los microARNs pueden generarse por varias rutas diferentes en plantas, lo que explica la variabilidad en las secuencias de ARN que pueden actuar como precursores de estos ARNs pequeños. Sin embargo, los precursores también llevan información importante para la funcionalidad de los microARNs, y algunas de estas características serán discutidas en la presentación.

## **El virus del Zika reprime la traducción de factores antivirales mediante la activación de PKR**

Pallarés H.M.<sup>1</sup>, López González Ledesma M.M.<sup>1</sup>, Oviedo Rouco S.<sup>1</sup>, Costa Navarro G.S.<sup>1</sup>, Gamarnik A.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fundación Instituto Leloir - IIBBA

El virus del Zika (ZIKV) es un virus emergente del género Flavivirus que a partir de su introducción en Brasil en 2015 se ha extendido causando brotes y epidemias en más de 60 países. La rápida propagación del virus y sus características únicas respecto a la patogénesis y transmisión han despertado el interés de la comunidad científica para entender los procesos moleculares que transcurren durante la infección. La vía de señalización del Interferón Beta (IFN- $\beta$ ) constituye uno de los principales mecanismos antivirales de la respuesta inmune innata humana. La inducción de IFN- $\beta$  desencadena la expresión de genes de respuesta a Interferón (ISGs), quienes interfieren con la replicación viral modificando el entorno celular o afectando la maduración del virus. Dentro de los ISGs se destaca la proteína quinasa R (PKR), que es capaz de reconocer RNA doble cadena (dsRNA) característico de intermediarios virales de replicación. El principal blanco de esta quinasa es la subunidad  $\alpha$  del factor de elongación 2 (eIF2 $\alpha$ ). Su fosforilación desencadena la inhibición de la traducción cap-dependiente, constituyendo esta una estrategia para limitar la replicación viral afectando la síntesis de las proteínas virales. Aunque se ha documentado que PKR constituye un factor clave para limitar la replicación de distintos agentes infecciosos, aún no se ha estudiado su rol durante la infección con ZIKV. Con el objetivo de caracterizar la respuesta de IFN-B montada durante la infección con ZIKV se realizaron infecciones en células humanas A549 con ZIKV proveniente de un aislamiento realizado en nuestro país en el año 2016 (Genbank MT636065). Mediante análisis por RT-qPCR de células infectadas se observó que las mismas expresan IFN- $\beta$  y gatillan la expresión de ISGs en etapas tempranas de infección. Además, se determinó por análisis de Western-Blot y microscopía que la infección con ZIKV activa a PKR, desencadenando la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y posterior arresto traduccional. Este proceso se evidenció también mediante la observación de gránulos de estrés de manera PKR dependiente y la expresión de genes regulatorios de la respuesta a estrés integrada (ISR) durante la infección. Con el fin de evaluar el impacto de PKR sobre la infección con ZIKV, se realizó el knock-down (KD) de esta proteína mediante siRNA. Sorprendentemente, el KD de PKR redujo la replicación y secreción de partículas del ZIKV, sugiriendo un rol proviral de esta proteína para ZIKV. En particular, observamos que la activación de PKR durante la infección con ZIKV inhibió la traducción del mRNA de IFNB, lo cual afectó la expresión de ISGs. Estos hallazgos son únicos para el ZIKV, en donde la activación del factor antiviral PKR conforma un entorno favorable para la replicación del virus al inhibir la traducción de proteínas antivirales.

## **Characterization of regulatory genetic variation in transcriptional promoters and its impact on neuronal differentiation**

Pinkasz M.<sup>1</sup>, Lungman M.<sup>1</sup>, Schor I.E.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> IFIBYNE-UBA-CONICET.

<sup>2</sup> DFBMC-FCEN-UBA

The genomes of all living organisms are affected by genetic variability that can have functional effects. Non-coding variants, for example those affecting transcriptional regulatory elements, make an important contribution to phenotypic variability by modulating the expression levels of a number of genes. To study the phenotypic impact of regulatory genetic variants, we collected expression data from different neuronal differentiation experiments of human embryonic stem cells (hESCs) (Yao et al. Cell stem cell, 2017) and pluripotent stem cells (hPSC) (Strano et al. Cell Reports, 2020; Floruta et al. Stem Cell Reports, 2017), identified genes that are likely to drive this process and analyzed the distribution of single nucleotide variations (SNVs) in their promoter regions. Using SNV data from NCBI dbSNP, we identified a total of 322,422 polymorphisms. Of these, 19,911 were assigned as potential deleterious SNVs by using the Combined Annotation Dependent Depletion tool (CADD). To better understand the distribution of non-coding SNVs in neural differentiation, we evaluated how this is affected by different promoter- and gene-associated features, such as the presence of basal promoter motifs, overlap of CpG islands with regulatory regions, median gene expression and the role of the genes in the neuronal differentiation gene regulatory network. Our preliminary analysis showed a positive association between the presence of TATA-box, Inr motif and CCAT motif with the presence of high-impact variants, whereas CpG islands showed a negative association. In addition, while network regulators of neuronal differentiation have more deleterious variants within their promoters than network targets, the minor allele frequency (MAF) of these variants were significantly smaller, suggesting different selective forces acting in the promoter regions of these two groups. This first analysis identified candidate variants in regulator genes driving neural differentiation that could have an impact in neural differentiation and function in humans. We have selected a set of key differentiation genes harboring multiple potentially deleterious variants in their promoters to experimentally test the effects of the different variants and their combinations in the promoters' activity. We are using a dual fluorescent reporter that allows us to measure corrected reporter expression in single cells, in order to detect variations in both transcriptional activity and noise. Those variants that are experimentally validated will be also tested to assess their impact in the outcome of the neuronal differentiation process using the pluripotent NT2 human cell line as a cell culture model.

## The export factor Mex67 sets boundaries for polymerase I transcription in *Trypanosoma brucei*

Pozzi B.<sup>1</sup>, Naguleswaran A.<sup>1</sup>, Roditi I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cell Biology - University of Bern

Consistent with the established fact of polycistronic transcription in trypanosomes, ChIP-seq data from our laboratory did not show striking differences in Pol II occupancy across polycistronic transcription units (PTU) [1]. By contrast, while global run-on sequencing (GRO-Seq) gives fairly homogeneous incorporation of 5-ethynyl-uridine (5EU) in some PTUs, we find that others show marked differences between adjacent genes. To explore the mechanisms underlying this uneven incorporation, and since co-transcriptional mRNA export in *T. brucei* has been reported recently [2], we performed GRO-seq with cells depleted of export factors by RNAi. Although we did not find significant differences in overall 5EU incorporation, two regions of the genome on chromosomes 6 and 10 showed heavy labelling upon depletion of Mex67 and complementation with a dominant negative variant Mex67-DN. These regions span the procyclin loci which, in contrast to most protein-coding genes, are transcribed by RNA Pol I. 5EU labelling and Pol I ChIP-seq suggest that readthrough transcription proceeds until Pol II transcription start sites on the opposite strand, easily identifiable by a histone H3K4me3 trimethylation mark. Mex67-DN lacks the N-terminal zinc finger (nucleotide binding) motif, only present in Trypanosomatids [3], and seems to have a reduced nuclear localisation compared to wild-type Mex67. This might explain its diminished binding to DNA at the procyclin loci and other highly transcribed regions, as determined by ChIP-seq. These findings, together with its interaction with RNA Pol II and the chromatin remodelling factor RRM1, support a novel role for Mex67 in regulating transcription in Trypanosomatids. [1] PMID: 30544263 [2] PMID: 30418648 [3] PMID: 23560737.

## Reanotación y estudio de la composición de la maquinaria traduccional de *Trypanosoma cruzi*

Rivara Espasandín M.<sup>1,2</sup>, Radío S.<sup>1,5</sup>, Chávez S.<sup>1,2,3</sup>, Duhagon M.A.<sup>2,3</sup>, Smircich P.<sup>1,3</sup>, Sotelo-Silveira J.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC

<sup>2</sup> Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República

<sup>3</sup> Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

<sup>4</sup> Departamento de Biología Celular y Molecular, Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

<sup>5</sup> Institute of Evolutionary Biology (CSIC-Universitat Pompeu Fabra), 08003, Barcelona, Spain

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, tiene una regulación de la expresión génica principalmente post-transcripcional, observándose diferentes mecanismos moduladores. Nuestro grupo ha observado que la regulación traduccional es un mecanismo importante durante la metacicloogénesis. Dado que recientemente se ha descrito en otros modelos biológicos que la composición de los ribosomas podría ser variable a nivel proteico y a su vez tendría impacto a nivel regulatorio, nos planteamos como objetivo un estudio detallado de la composición de la maquinaria traduccional de *T. cruzi* en los estadios epimastigota y tripomastigota metacíclico. En primer lugar, revisamos la anotación de proteínas ribosomales (PR) y proteínas asociadas al ribosoma de *T. cruzi* mediante el uso de herramientas de alineamiento local de secuencias, así como de bases de datos específicas de tripanosomátidos, con un posterior curado manual mediante búsquedas bibliográficas exhaustivas. Esta reanotación, incluye el análisis de número de copias, ubicación espacial en el ribosoma, extensiones en extremos terminales, datos de expresión, así como posibles funciones extra-ribosomales, entre otros. Mediante esta aproximación logramos depurar la anotación existente y sistematizar la información. Por otro lado, logramos aislar fracciones enriquecidas tanto en monosomas como en polisomas en ambos estadios, mediante ultracentrifugación diferencial en gradiente de sacarosa. Estas fracciones serán analizadas mediante espectrometría de masas, con el objetivo de caracterizar la maquinaria traduccional y comparar abundancias relativas de las PR y proteínas asociadas al ribosoma tanto entre diferentes estadios como entre fracciones asociadas a niveles de expresión diferentes (monosomas y polisomas).

## **Patrones distintivos de procesamiento postranscripcional y generación de nuevas isoformas durante la espermatogénesis**

Romeo C.<sup>1,2</sup>, Trovero M.F.<sup>2\*</sup>, Radío S.<sup>1\*\*</sup>, Sotelo-Silveira J.<sup>1,3</sup>, Geisinger A.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), MEC, Uruguay.

<sup>2</sup> Laboratorio de Biología Molecular de la Reproducción, Departamento de Biología Molecular, IIBCE, MEC, Uruguay.

<sup>3</sup> Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR),

<sup>4</sup> Sección Bioquímica/Biología Molecular, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay.

\*Filiación presente: Boston Children's Hospital. Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

\*\*Filiación presente: Institute of Evolutionary Biology (CSIC-Universitat Pompeu Fabra).

La espermatogénesis es un proceso esencial para las especies con reproducción sexual. Su alteración se encuentra en la base de la infertilidad y otras patologías, como el cáncer testicular. Los estudios a nivel molecular del testículo de mamíferos muestran que es un tejido sumamente complejo, siendo el tejido con mayor número de genes expresados, mayor cantidad de ARNs no codificantes largos (lncRNAs), y mayor tasa de procesamiento alternativo. No obstante, la caracterización de la complejidad transcriptómica durante la espermatogénesis está aún por develarse, en parte debido a la complejidad del testículo, que posee más de 30 tipos celulares diferentes coexistentes. Empleando poblaciones celulares altamente puras de las distintas etapas clave de la espermatogénesis del ratón, hemos generado datos transcriptómicos de alta calidad y con un nivel de confiabilidad sin precedentes, lo que nos permitió identificar 33.000 transcritos nuevos. Focalizándonos en estudios de procesamiento alternativo, identificamos gran cantidad de variantes de procesamiento nuevas de cada etapa. Muchas de las nuevas variantes poseen alto potencial codificante, generando ya sea probables isoformas no anotadas de proteínas con funciones en importantes procesos espermatogénicos, así como isoformas testículo-específicas de proteínas conocidas en otros tejidos (y en ocasiones notablemente diferentes de éstas). Hemos confirmado la existencia de algunas de estas nuevas variantes de procesamiento, y caracterizado en mayor detalle sus probables isoformas proteicas. Por otro lado, identificamos un gran número de lncRNAs no anotados, diferencialmente expresados en las distintas etapas, al menos parte de los cuales podría desempeñar roles regulatorios en relación con la espermatogénesis. Adicionalmente, encontramos más de 200 genes no anotados con alto potencial codificante, que dirigirían la síntesis de proteínas testiculares estadio-específicas aún no conocidas. Esto nos lleva a pensar que, al poder aislar las poblaciones celulares, somos capaces de detectar genes específicos hasta el momento no descritos. Un estudio detallado de las variantes de procesamiento nos permitió caracterizarlas con respecto a abundancia, tipos de procesamiento alternativo predominante, etc. Por ejemplo, determinamos que los genes codificantes suelen presentar más variantes de splicing que los no codificantes, lo que, sumado a otras evidencias, sugiere que los lncRNAs son más sencillos que los ARNs mensajeros. En suma, este trabajo evidencia que, aún en un organismo tan estudiado como el ratón, cuando se trata de un proceso altamente complejo como la espermatogénesis, existe todavía muchísima variabilidad transcriptómica y variantes de procesamiento específicas por descubrir.

## **La energía de interacción del dúplex microARN/microARN\* modula el procesamiento de microARNs en plantas**

Rosatti S.<sup>1</sup>, Moro B.<sup>1</sup>, Rojas A.<sup>1</sup>, Palatnik J.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)

Los microARNs (miARNs) juegan un papel fundamental en el silenciamiento génico post-transcripcional. Estos ARNs pequeños (de 20-22 nt) provienen de precursores más largos que adoptan una estructura de tallo-burbuja. La proteína DICER-LIKE1 (DCL1) reconoce y corta estos precursores, liberando un dúplex miARN/miARN\*, que usualmente tiene bases desapareadas (mismatches). El miARN se carga en una proteína efectora ARGONAUTA (AGO), guiándola hacia sus ARNs blanco por complementariedad de bases. En plantas, la longitud, la secuencia primaria y la estructura secundaria del precursor son muy heterogéneas, y afectan varios aspectos de la biogénesis y función de los miARNs. En algunos casos, DCL1 realiza dos cortes (precursores cortos) para liberar un solo dúplex; en otros, debe realizar tres o cuatro cortes (precursores secuenciales), generando más de un dúplex, de los cuales el último en ser liberado es el de función biológica conocida (el miARN/miARN\*). Por otro lado, la identidad del nucleótido 5' determina la afinidad de una AGO por un miARN (Por ejemplo, 5'-U dirige al miARN a AGO1; 5'-A, a AGO2). En nuestro trabajo, estudiamos el rol de la estructura secundaria del dúplex miARN/miARN\* durante el procesamiento del precursor por DCL1. Al eliminar mismatches del dúplex miARN/miARN\* por mutagénesis, aumentando el apareamiento, observamos una mejora significativa en el procesamiento y en la acumulación de miARNs in vivo, pero únicamente en caso de los precursores cortos, y no de los secuenciales. Para éstos, en cambio, sí observamos alteraciones en el procesamiento al mejorar el apareamiento (y aumentar la energía de interacción) de los otros dúplex liberados. Estos dúplex normalmente se acumulan en bajos niveles, mientras que el miARN/miARN\* de los precursores secuenciales tiene una mayor energía de interacción, acumulando más miARN. De esta forma, y añadiendo a la noción de que la estructura y secuencia del dúplex miARN/miARN\* son importantes para la carga en AGO, demostramos que su energía de interacción regula la eficiencia de biogénesis, y que los requerimientos estructurales para el procesamiento del miARN dependen del tipo de mecanismo. Así, estos determinantes son esenciales para el procesamiento de los precursores por DCL1.

## Specific interactions between copies of the long noncoding RNA ENOD40 and NSR proteins in peanut (*Arachis hypogaea* L.)

Rodríguez J.<sup>1</sup>, Mansilla N.<sup>1</sup>, Mammarella F.<sup>1</sup>, Lucero L.<sup>1</sup>, Ibañez F.<sup>2</sup>, Ariel F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, Colectora Ruta Nacional No 168 km. 0, Paraje El Pozo, Santa Fe, Argentina.

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Agrobiotecnológicas (CONICET-UNRC), Ruta 36 Km 601, Río Cuarto, Argentina.

The gene EARLY NODULIN 40 (ENOD40) is a classic early nodulin reported as essential for nodulation in several legumes. Although it does not encode proteins, the ENOD40 transcript bears two short open reading frames (ORFs), coding for two peptides apparently linked to its biological activity. However, it has been shown that the ENOD40 RNA exerts a role by itself, thus it has been classified as a functional long noncoding RNA (lncRNA). In the model legume *Medicago truncatula*, the lncRNA MtENOD40 interacts with the NUCLEAR SPECKLE RNA-BINDING PROTEINS (NSRs) and induces their relocalization from nucleus to cytoplasm. According to the role of NSRs in *Arabidopsis*, this mechanism may be linked to the regulation of the alternative splicing machinery during nodulation. The aim of this work was to identify and characterize the components of the lncRNA AhENOD40-AhNSR complex in peanut plants, a non-model legume. To this end, we first identified two ENOD40 transcripts and two NSR proteins in the peanut genome. The four genes were cloned for their expression in plant cells (35S:AhENOD40\_1 and 2; and 35S:GFP:AhNSR\_1 and 2). Then, we analyzed the sub-cellular localization of the potential AhENOD40-AhNSR complexes by co-transformation in *N. benthamiana* leaves and evaluated all the possible AhENOD40-AhNSR combinations. We determined by confocal microscopy that only the AhENOD40\_1 is able to induce AhNSR\_1 relocalization from nucleus to cytoplasm. In agreement, we demonstrated by RNA immunoprecipitation that among all combinations between ENOD40s and NSRs pairs, only the AhENOD40\_1-AhNSR\_1 interaction occurs in vivo. Taken together, our results reveal a high degree of specificity in the AhENOD40-AhNSR interaction in peanut plants. Further studies are required to elucidate the basis of this restrictive interaction and how this lncRNA-protein complex could participate in the regulation of the alternative splicing machinery during nodulation in peanut roots.

## **Variability in transcription: promoter architecture, regulatory mutations and noise**

Schor I.E.

IFBYNE (UBA-CONICET), DFBMC (FCEN, UBA), Buenos Aires, Argentina

Gene expression involves a series of tightly regulated steps that allows a certain sequence of the DNA to be expressed into its final product, either protein or RNA. Precise spatio-temporal regulation of this process is crucial to ensure proper development and most functions of a multicellular organism. We therefore expect that gene regulatory networks are robust to intrinsic noise of their components as well as to perturbations, both environmental and genetic. However, it is still not completely understood if robustness can be reached at the level of individual transcriptional regulation events (i.e. control of the expression of specific key genes). We explored how promoters of genes that participate in different physiological and pathological processes are affected by non-coding genetic variability and/or mutations, how this can relate to their promoter architecture and the role of the gene within gene regulatory networks. We also made use of whole-genome sequencing data of breast cancer samples to explore the impact of non-coding mutations in cancer progression and, together with measurements of the activity of breast cancer master regulators, used their recurrence in gene regulatory regions to uncover relevant pathways. Finally, we explored the characteristics of alternative promoters and assessed possible changes in expression noise upon promoter switch.

## Desarrollo e implementación de pipeline para la identificación de lncRNAs en *Trypanosoma cruzi*

Sosa P.<sup>1,2</sup>, Sotelo J.<sup>1,3</sup>, Duhagon M.A.<sup>2,4</sup>, Smircich P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup> Sección Genómica Funcional, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias (UdelaR), Montevideo, Uruguay.

<sup>3</sup> Sección Biología Celular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias (UdelaR), Montevideo, Uruguay

<sup>4</sup> Departamento de Genética, Facultad de Medicina (UdelaR), Montevideo, Uruguay

*Trypanosoma cruzi* es el protozoo responsable de la enfermedad de Chagas, patología de gran importancia sanitaria en América Central y del Sur, ya que afecta a más de 8 millones de personas al año. Este parásito presenta mecanismos de regulación de la expresión génica particulares los cuales muchos de ellos no están explorados. Los ARNs largos no codificantes (lncRNA), son una clase de ARNs cuya secuencia supera los 200 nucleótidos y que poseen potencial codificante nulo o casi nulo. En diversos organismos se ha descrito que los lncRNAs tienen diversas funciones en regulación génica, diferenciación celular e interacción con ADN, ARN, proteínas y cromatina. Actualmente, no hay reporte de lncRNAs en *T. cruzi*, y la caracterización de estos ncRNAs es un área que ha sido escasamente abordada en los tripanosomátidos. En este trabajo se ha desarrollado e implementado un pipeline para identificar lncRNAs en *T. cruzi*. Este, toma sets de datos obtenidos por RNAseq de diferentes estadios del parásito, los mapea a un genoma de referencia, se ensamblan transcritos y selecciona aquellos no anotados y pseudogenes. Los últimos se evalúan calculando el potencial codificante por Coding Potential Calculator 2 (CPC2), y por métodos Random Forest con el software FLEXible Extraction of Long non-coding RNAs (FEELnc). Los transcritos que son resultado de la intersección de los clasificadores anteriores se analizan con el software UTRme en búsqueda de evidencia de mini-exon y poli-A. Así, se obtiene una lista de lncRNAs de *T. cruzi* anotados y curados, los cuales servirán como punto de partida para estudiar su potencial funcional, ya sea como esponjas moleculares, búsqueda de conservación evolutiva, producción de micropéptidos, entre otros. Este pipeline se ha implementado y ya se han identificado y anotado aproximadamente 2000 lncRNAs en el parásito.

## Los cuádruplex de guanina regulan la biogénesis de miARNs en embriones de pez cebra.

Steeman T.J.<sup>1</sup>, Weiner A.M.J.<sup>1</sup>, David A.<sup>1</sup>, Binolfi, A.<sup>1</sup>, Calcaterra, N.B.<sup>1</sup>, Armas P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular del Desarrollo; Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - CONICET-UNR, Rosario, Santa Fe, Argentina

Los cuádruplex de guanina (G4) son estructuras secundarias no canónica de ácidos nucleicos formadas en secuencias ricas de guanina, predominantes en regiones regulatorias. Pueden funcionar como reguladores de metabolismo, procesamiento y traducción de ARNm. Los G4s formados en precursores de microARNs (pre-miARNs) puede competir con las clásicas estructuras de tallo-burbuja, impidiendo la maduración mediada por la enzima DICER, o el ensamblaje del complejo miRISC. Debido a que los miARNs cumplen funciones importantes como reguladores durante el desarrollo embrionario, nos propusimos usar embriones de pez cebra (*Danio rerio*) como organismo modelo para estudiar el efecto de los G4s sobre la maduración y función de los miARNs. Realizamos una búsqueda in-silico de secuencias putativas de G4 (pG4) en pre-miARNs de pez cebra, utilizando la secuencia consenso G3-5N1-7G3-5N1-7G3-5N1-7G3-5N1-7. El pre-miR-150 contiene una pG4 que se solapa parcialmente con la región tallo-burbuja, y que se encuentra evolutivamente conservada en vertebrados. Experimentos de espectroscopía de dicroísmo circular y resonancia magnética nuclear mostraron que este pG4 es capaz de formarse in-vitro como G4. El gen *myb*, involucrado en el desarrollo de células hematopoyéticas, fue identificado como un blanco conservado del miR-150. Además, existen reportes con fenotipos claros en embriones de pez cebra sobreexpresantes de miR-150 o silenciados para *myb*. Por lo tanto, estudiamos el rol in-vivo del G4 presente en el pre-miR-150 microinyectando embriones en estadio de 1-célula con transcriptos in-vitro de pre-miR-150 sintetizados con GTP o 7-deazaGTP (7dG-pre-miR-150), el cual puede formar estructuras secundarias dependientes de enlaces de Watson-Crick, pero no los enlaces de Hoogsten que estabilizan la estructura G4. Los embriones inyectados con 7dG-miR-150 mostraron mayores niveles de miR-150 maduro y menores niveles de *myb*, así como fenotipos correspondientes a una disminución de *myb* más marcada (reducción en el tamaño de los ojos y longitud del tronco) que los inyectados con GTP-miR-150. Además, el tratamiento con el ligando piridostatina (PDS, estabilizador de G4) disminuyó los efectos observados con la sobreexpresión con GTP-miR-150, pero no alteró los resultados de 7dG-miR-150, indicando que la formación del G4 podría regular la maduración del miR-150 y los fenotipos asociados. Estos resultados sugieren que el G4 formado en el pre-miR-150 funciona in vivo como una estructura reguladora capaz de competir con la estructura de tallo-burbuja necesaria para el procesamiento de los miARNs. Como perspectivas a futuro se plantea caracterizar con mayor profundidad la competencia entre las estructuras de G4 y tallo-burbuja, así como completar los análisis in vivo de los fenotipos asociados a la disminución de *myb*.

## Delving deeper into the mechanisms of ASO treatment in SMA

Marasco L.E.<sup>1</sup>, Dujardin G.<sup>2</sup>, Sousa-Luís R.<sup>3</sup>, Liu Y.H.<sup>4</sup>, Stigliano J.N.<sup>1</sup>, Nomakuchi T.<sup>4</sup>, Proudfoot N.J.<sup>2</sup>, Krainer A.R.<sup>4</sup>, Kornblihtt A.R.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Buenos Aires (UBA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular and CONICET-UBA, Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE), 1428 Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford OX1 3RE, UK.

<sup>3</sup> Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes, University of Lisbon, 1649-028 Lisboa, Portugal.

<sup>4</sup> Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 11724, USA.

<sup>5</sup> Universidad de Buenos Aires (UBA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular and CONICET-UBA, Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE), 1428 Buenos Aires, Argentina. Electronic address: ark@fbmc.fcen.uba.ar.

Previous work from our laboratory (Marasco et al., *Cell*, 2022) has demonstrated that histone deacetylase inhibitors (HDACis) have a cooperative effect with antisense oligonucleotides (ASO) on SMN2 Exon 7 (E7) inclusion in the treatment for spinal muscular atrophy (SMA). The model which has been proposed to explain such result is that ASO treatment has a secondary effect on chromatin which reduces its potential to increase SMN2 E7 inclusion; besides its primary role in competing for hnRNPA1/A2 binding which does promote E7 inclusion. Through the deposition of repressive chromatin marks, specifically H3K9me2, around the ASO target site, a roadblock to elongation is formed which slows down the speed of RNA Pol II and hampers E7 inclusion as it allows more time for negative splicing factors to bind to their target sites in the pre-mRNA and promote exon exclusion. We proposed that HDACis like valproic acid (VPA) promotes the removal of the repressive chromatin mark H3K9me2, and increased the upregulations of E7 inclusion caused by the ASO, compared to the ASO treatment alone. This was shown both in cell culture and in a SMA model mice. In this work we decided to investigate further into the chromatinic effect of the ASO to better understand the therapeutic strategies which might arise to treat this disease. Our findings suggest that the G9a (EHMT2) is the histone methyltransferase involved in the deposition of this inhibitory chromatin mark because Crispr/CAS9 ablation of the G9a gene potentiates the effect of the ASO on SMN2 E7 inclusion in cultured cells. Furthermore, our findings also suggest that the ASO may be binding not only to RNA but to the coding strand of DNA as well. Using a sense oligo (SO), whose sequence complementary to that of the ASO, which does not bind the RNA transcript but can bind to the non-coding DNA strand, we observed the same deposition of the repressive chromatin mark H3K9me2, as previously observed with the ASO treatment. These findings might explain why the ASO has an effect on chromatin. Future work will focus on investigating if the ASO treatment might also be generating modifications not only on chromatin, but also DNA or RNA. In addition, as VPA and other HDACis are pleiotropic drugs, we will also try and target local acetylation of the ASO binding site using a CRISPR/dCAS9 fused to an HDACi aiming at reproducing the effects of the combined treatment of VPA + ASO in a specific and targeted manner. Together, these results will help us to better understand the landscape behind the treatment for spinal muscular atrophy, paving the way for improved therapeutic strategies in the near future.

## **Exosomal miR-203 is required for neural crest-placode communication during trigeminal ganglia condensation**

Bernardi Y., Strobl-Mazzulla P.

Laboratorio de Biología del Desarrollo. Instituto Tecnológico de Chascomús (CONICET-UNSAM). Chascomús, ARGENTINA.

In vertebrates, the trigeminal ganglia (TG) formation requires a precise cell-cell communication that facilitates the intermixing, positioning, condensation and differentiation of neural crest (NCC) and ectodermal placode cells. However, the signals and effector molecules that coordinate their proper aggregation are largely uncharacterized. Here, we demonstrated the reactivation of miR-203, which had been epigenetically silenced to give rise to the beginning of migration, in the coalescent cells of the TG. Overexpression of miR-203 induced the ectopic NCC condensation and increased the TG size. Whereas its loss of function using a “sponge” vector was only able to affect the TG condensation when it was performed on placode cells, but not on the NCC. Overexpressing miR-203 in NCC was able to affect the expression of a sensor vector electroporated in placode cells demonstrating the intercellular communication during TG condensation. Using a pHluorin-CD63 vector to visualize vesicles lifecycle, we demonstrated that vesicles secreted by NCC are incorporated into the cytoplasm of placode cells during TG condensation. Finally, we demonstrated that small extracellular vesicles (sEVs) isolated from condensing TG contains miR-203. Together, our findings revealed the reactivation of miR-203 expression and its cargo into sEVs which is required for NCC-placode communication during their coalescence to form the TG.

## Las vías de AMPK y SMO en la regulación de las organelas sin membranas de Smaug1

Boscaglia L.<sup>1</sup>, Lizarazo C.<sup>1</sup>, Fernández-Álvarez A.J.<sup>1,2</sup>, Boccaccio G.L.<sup>1,2,3</sup>, Thomas M.G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Fundación Instituto Leloir (FIL). Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires (IIBBA) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup> Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular (FBMC), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN), Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Smaug1/Samd4A es una proteína de unión a RNA involucrada en la regulación de mRNAs. Smaug fue descrita inicialmente en *Drosophila* y está conservada en levaduras y mamíferos. Los ortólogos de Smaug forman organelas sin membrana citosólicas (MLOs por membraneless organelles). Las MLOs constituyen una familia creciente de cuerpos celulares involucrados en múltiples funciones y varias de ellas están vinculadas a la regulación de mRNAs. Encontramos que las MLOs de Smaug1 humana están en contacto con las mitocondrias y que su KD afecta a la dinámica mitocondrial y la respiración celular. El fenotipo de mitocondrias fragmentadas provocado por el KD de Smaug1 es rescatado por la proteína completa, pero no por los mutantes incapaces de formar Smaug1-MLOs (Fernández-Álvarez et al, 2022). Analizamos si la actividad mitocondrial y el balance entre las vías de señalización antagónicas AMPK/mTOR afectan a las MLOs de Smaug1. Observamos que la metformina, hipoglucemiante de amplio uso en clínica que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria; la rotenona, un inhibidor agudo del complejo I mitocondrial y la rapamicina, un inhibidor de mTOR, inducen la disolución de las MLOs de Smaug1. Recientemente se ha descrito que la vía no canónica de Smoothened (SMO) controla metabolismo energético activando AMPK. Encontramos que la activación de SMO mediante Smoothened Agonist (SAG) induce la inmediata disolución de las MLOs de Smaug1. En contraste, la co-expresión de un mutante de SMO que no puede ser activado (SMO-SA) potenció la formación de las MLOs de Smaug1. La respuesta a metformina, rotenona o SAG es bloqueada totalmente por Compound C, un inhibidor de AMPK. En conjunto, estos resultados indican que la activación de AMPK río debajo de SMO gobierna la disolución de las MLOs de Smaug1.

## **Level up! nuevo nivel regulatorio en la biogénesis de miarns en plantas desbloqueado: procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs potenciado por la formación de R-loops**

Tossolini I.<sup>1</sup>, Gonzalo L.<sup>1</sup>, Cambiagno D.A.<sup>1</sup>, Marquardt S.<sup>2</sup>, Manavella P.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET-UNL).

<sup>2</sup> Copenhagen Plant Science Centre, Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen.

Los micro ARNs (miARNs), pequeñas moléculas de ARN de 20-22 nucleótidos de longitud, son una de las clases más abundantes de ARNs pequeños no codificantes endógenos en plantas. La biogénesis de los mismos implica una serie de pasos bien coordinados que suceden en el núcleo celular. La producción de miARNs comienza con la transcripción de los genes MIR por la ARN polimerasa II (ARNPII) generando así los transcritos primarios (pri-miARNs), los cuales se pliegan sobre sí mismos debido a regiones largas de secuencias *invertidas* complementarias, para generar estructuras de tallo-bucle imperfectas. Los pri-miARNs son procesados luego por el complejo que contiene a la enzima DICER-Like1 (DCL1) desde la base hacia el bucle (BTL) o viceversa (LTB), en dos o más cortes secuenciales. En los últimos años, diversos estudios han revelado que parte de dicha maquinaria de procesamiento se recluta tempranamente a los loci de genes MIR. En este trabajo demostramos que el procesamiento de los pri-miARNs se realiza total o parcialmente de forma co-transcripcional. Utilizamos datos obtenidos por plaNET-seq en *Arabidopsis thaliana*, técnica que se usa para perfilar todos los ARNs nacientes aún unidos a la ARNPII a escala genómica, para analizar el procesamiento co-transcripcional de los pri-miARNs según su tipo de biogénesis. Encontramos que el procesamiento BTL ocurre en un primer paso co-transcripcional seguido de uno post-transcripcional, en el cual se libera el miARN maduro, mientras que todos los pasos de la biogénesis LTB ocurren co-transcripcionalmente. Además, analizamos los datos de diferentes condiciones de plaNET-seq, y logramos definir la dirección del procesamiento de ciertos pri-miARNs con perfiles desconocidos o con mecanismos de procesamientos inusuales. También, observamos que el procesamiento co-transcripcional y post-transcripcional co-existen y fluctúan en función de las condiciones de crecimiento para gran parte de los pri-miARNs. Adicionalmente, mediante el análisis de datos obtenidos por ssDRIP-seq, descubrimos que el procesamiento co-transcripcional de pri-miRNAs es potenciado en gran medida por la formación de R-loops cerca del sitio de inicio de la transcripción de genes MIR. En conclusión, en este trabajo identificamos un nuevo nivel regulatorio en la biogénesis de miARNs en plantas, demostrando que los miARNs se procesan de forma co-transcripcional y que dicho mecanismo se basa en la formación de R-Loops, lo cual desplaza el equilibrio de la biogénesis de miARNs de la vía post-transcripcional canónica a un proceso co-transcripcional que fluctúa dependiendo de las diversas condiciones medioambientales.

## **Superkiller 3 influences miR172 directed cleavage of the mRNA encoding the ethylene regulated transcription factor nodule number control 1 (NNC1), a negative modulator of the root nodule symbiosis**

Traubenik S.<sup>1</sup>, Reynoso M.A.<sup>1</sup>, Yacullo M.<sup>1</sup>, Hummel M.<sup>2</sup>, Crespi M.<sup>3</sup>, Bailey-Serres J.<sup>2</sup>, Blanco F.A.<sup>1</sup>, Zanetti M.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Centro Científico y Tecnológico-La Plata, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, 1900-La Plata, Argentina.

<sup>2</sup> Department of Botany and Plant Sciences, Center for Plant Cell Biology, University of California, Riverside, CA 92521-0124, USA.

<sup>3</sup> Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), CNRS, INRA, Universities Paris-Sud, Evry and Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cite, University of Paris-Saclay, Batiment 630, 91405 Orsay, France.

Legumes and rhizobia establish a nitrogen-fixing symbiosis that involves the formation of a lateral root organ, the nodule, and the suppression of the immune response of the plant, which allows the rhizobia to infect the root tissue. The activation and coordination of these two genetic programs is accompanied by significant changes in gene expression that are regulated at the transcriptional and the post-transcriptional levels. We have previously showed that a transcript encoding the Subunit 3 of the Superkiller Complex (SKI), which acts along with the exosome in the 3'-5' degradation of mRNAs, is required for nodule formation, bacterial survival, and induction of early nodulation genes during the symbiosis between the legume *Medicago truncatula* and its symbiotic partner *Sinorhizobium meliloti*. Here we present a degradome analysis that revealed that MtSKI3 affected the miR172-directed endonucleolytic cleavage of the Nodule Number Control 1 mRNA (MtNNC1), which encodes a transcription factor of the APETALA2 family that acts as a negative regulator of nodulation. Expression of MtNNC1 is down regulated at late stages of the symbiosis, and its expression is restricted to the nodule apex. Specific silencing of MtNNC1 enhanced nodule number and bacterial infection upon inoculation with *S. meliloti*.

## Contenido

Changes in phase of the circadian oscillation of transcripts induced by an environmental signal modulate flowering .....	1
Sequence-unrelated long noncoding rnas converged to modulate the activity of conserved epigenetic machineries across kingdoms .....	2
Long noncoding RNAs: a role in modulating the activity of partner transcription factors in <i>Arabidopsis thaliana</i> ? .....	3
Delving deeper into rnapii degradation upon uv-induced dna damage.....	4
Estudio de cuádruplex de guanina como elementos de regulación del virus SARS-CoV-2 y su interacción con ligandos y proteínas del hospedador .....	5
Efectos de variantes genéticas en cuádruplex de guanina de arn que afectan la traducción de oncogenes humanos .....	6
Estudios de transcriptómica comparativa en amastigotas axénicos versus amastigotas celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	7
lncRNAs, quantitative regulators of level and dynamic of gene expression .....	8
Organelas sin membrana en regulación post-transcripcional: smaug en el control del metabolismo celular.....	9
Study of the role of abundant extracellular sRNA on epithelia cells .....	10
Involvement of sumo conjugation in small nuclear rna biogenesis .....	11
Biodisponibilidad y efectos inmunomoduladores de los ARNs extracelulares no vesiculares.....	12
Altered levels of angiogenin and tRNA-derived fragments associates with severe asthma .....	13
Efecto del vtRNA2-1/nc886 mediado por factores extracelulares en cáncer de próstata .....	14
tRNAs mellados como reservorio estable de mitades de arnt en células y biofluidos.....	15
Una estructura de rna en la región codificante del genoma del virus de Zika es esencial para la replicación viral.....	16
An unconventional RNA-binding protein defines the mRNA-fate of the major variant surface antigen in <i>Trypanosoma brucei</i> .....	17
Regulación transcripcional de proteínas con dominios DUF26 en soja involucradas en la inmunidad vegetal.....	18
Identification of a novel regulator of the antigenic variation in <i>Trypanosoma brucei</i> .....	19
Vault RNAs: un nuevo integrante en la respuesta al estrés.....	20
snc886-5p derivado del extremo 5' de vtRNA2-1/nc886 un posible caso de cambio de preferencia de brazos.....	21
La batalla entre el virus de dengue y la proteína de la leucemia promielocítica: splicing y más .....	22
Análisis de abundancia diferencial de ARNm codificante para proteínas ribosomales entre subtipos neuronales de corteza cerebral .....	23

Desentrañando el rol de la proteína germinal PIWI-L1 como potencial firma molecular en cáncer .....	24
Integrative single-cell transcriptomic analysis unveils alternative polyadenylation modulation in secretory tissue .....	25
Apex-seq como herramienta para estudiar el transcriptoma de organelas sin membranas como smaug-bodys .....	26
El complejo HOS15/HDA9 se asocia con HYL1 para reprimir la expresión de miARN en un contexto de respuesta a ABA .....	27
Mecanismos de acoplamiento entre transcripción y splicing alternativo en <i>C. elegans</i> .....	28
Identificación de procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs en plantas y la influencia de r-loops en loci codificantes en este mecanismo .....	29
Long noncoding RNAs in splicing regulation during lateral root formation .....	30
Novel bioinformatic approaches for the profiling of abundant sRNA identified by sRNA-seq in human biofluids .....	31
Exploración funcional de clusters de genes co-expresados de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	32
Alternative splicing and polyadenylation regulation in response to light in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	33
Rol de los sistemas miR396/GRF y ARF en la regulación del desarrollo floral de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	34
Apolo-mediated protein complex involved in transcriptional feedback mechanism in response to UV-B35	
Mecanismos de internalización y efectos transcriptómicos inducidos por ARNs pequeños encapsulados en vesículas extracelulares .....	36
Más allá de la transcripción: en búsqueda de mecanismos de regulación post-transcripcional mediados por p53 durante la UPR .....	37
Caracterización de la actividad pro-inflamatoria y antiviral de la proteína celular RBM10 ante la infección por el virus de dengue .....	38
Long noncoding RNA-mediated epigenetic regulation of shade avoidance syndrome in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	39
Molecular and functional evolution of PRC1 protein LHP1 in Brassicaceae .....	40
SOD1G93A astrocyte-derived extracellular vesicles induce motor neuron death by a miRNA 155-5p mediated mechanism. ....	41
Antagonistic effects of arginine methylation of a component of the U6snRNP LSM4 mediating plant stress responses .....	42
Análisis del transcriptoma de dos cultivares de soja en respuesta a la infección con <i>Diaporthe caulivora</i> .....	43
El dúo EFR-XIK en la regulación de respuestas frente a patógenos mediada por cambios en la cromatina .....	44
Regulation of RAC 1 gene expression by vGPCR. influence of post-transcriptional processing variants ..	45
Pushing arboviruses into a hostile RNA sequence space .....	46

Virus oncolíticos como una nueva herramienta para el tratamiento de cáncer .....	47
Transcriptomic response of stinkbug <i>Piezodorus guildinii</i> during infection by <i>Beauveria bassiana</i> .....	48
El ARN no codificante NC886 activa la vía del interferón en cáncer de próstata .....	49
Requerimientos estructurales del ARN viral para el reclutamiento de la ARN-polimerasa en flavivirus... 50	
Qué información almacenan los precursores de microARNs en plantas?.....	51
El virus del Zika reprime la traducción de factores antivirales mediante la activación de PKR.....	52
Characterization of regulatory genetic variation in transcriptional promoters and its impact on neuronal differentiation .....	53
The export factor Mex67 sets boundaries for polymerase I transcription in <i>Trypanosoma brucei</i> .....	54
Reanotación y estudio de la composición de la maquinaria traduccional de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	55
Patrones distintivos de procesamiento postranscripcional y generación de nuevas isoformas durante la espermatogénesis .....	56
La energía de interacción del dúplex microARN/microARN* modula el procesamiento de microARNs en plantas.....	57
Specific interactions between copies of the long noncoding RNA ENOD40 and NSR proteins in peanut ( <i>Arachis hypogaea</i> L.) .....	58
Variability in transcription: promoter architecture, regulatory mutations and noise .....	59
Desarrollo e implementación de pipeline para la identificación de lncrnas en <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	60
Los cuádruplex de guanina regulan la biogénesis de miarns en embriones de pez cebra. ....	61
Delving deeper into the mechanisms of ASO treatment in SMA.....	62
Exosomal miR-203 is required for neural crest-placode communication during trigeminal ganglia condensation .....	63
Las vías de AMPK y SMO en la regulación de las organelas sin membranas de Smaug1 .....	64
level up! nuevo nivel regulatorio en la biogénesis de miarns en plantas desbloqueado: procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs potenciado por la formación de r-loops .....	65
Superkiller 3 influences miR172 directed cleavage of the mRNA encoding the ethylene regulated transcription factor nodule number control 1 (NCC1), a negative modulator of the root nodule symbiosis .....	66