

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie



**Marharyta Ramanava**

tsRNA – biogeneze, regulace a funkce v genové expresi  
tsRNA – biogenesis, regulation and function in gene expression

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Tomáš Mašek, Ph.D.

V Praze, 2022



## **Poděkování**

Rada bych poděkovala svému školiteli, RNDr. Tomáši Maškovi, Ph.D., za trpělivost a ochotu pomoci se stylistickou úpravou.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4.5.2022

Marharyta Ramanava



## **Abstrakt**

Transferová RNA (tRNA) tvoří přibližně 10 % celkové buněčné RNA a hraje klíčovou roli při translaci. V této práci se zaměřuji na alternativní funkci tRNA, která může sloužit jako prekurzor pro tvorbu tzv. „malých RNA odvozených z tRNA“ (tsRNA). Tyto malé nekódující RNA jsou primárně vytvářeny štěpením tRNA ribonukleázami Angiogeninem a Dicerem. tRF („tRNA-derived fragments“) a tiRNA („stress-induced RNA-derived RNAs“) jsou dvě hlavní třídy, které se liší polohou místa štěpení v rodičovské tRNA a délkou. Některé tsRNA působí jako regulátory posttranskripční genové exprese, mohou ovlivňovat stabilitu mRNA a iniciaci translace. tsRNA se podílejí na regulaci stresové odpovědi, buněčné diferenciaci, vývoje a apoptózy. Dále existují důkazy, že hrají roli v epigenetických procesech, komunikaci mezi orgány nebo dokonce mezi organizmy. Navíc, u lidí je jejich zastoupení závislé na buněčném typu a jeho změna v patofyziologických podmínkách činí z tsRNA vhodný diagnostický marker. Tato práce shrnuje současné poznatky o biologické funkci a významu tsRNA.

**Klíčová slova:** malé RNA odvozené z tRNA; tRNA; tiRNA; tRF; regulace genové exprese

## **Abstract**

Transfer RNA (tRNA) accounts for approximately 10% of total cellular RNA pool and plays a crucial role in translation. Here I focus on the alternative function of tRNA, which can serve as a precursor for the formation of so-called “small RNAs derived from tRNA” (tsRNAs). These small non-coding RNAs are primarily generated by the cleavage of tRNAs by the ribonucleases Angiogenin and Dicer. tRFs (tRNA-derived fragments) and tiRNAs (stress-induced RNA-derived RNAs) are two major classes that differ fundamentally in the position of the cleavage site in the parent tRNA and the length of the molecule. Some tsRNAs act as regulators of posttranscriptional gene expression, often affecting mRNA stability and translation initiation. tsRNAs are implicated in regulation of stress response, cell differentiation, development, and apoptosis. Further, there is strong evidence that they have a role in epigenetic processes, communication between organs or even between organisms. In addition, in humans, their profile is often cell-specific and its change in pathophysiological conditions makes tsRNAs a suitable diagnostic marker. This work summarizes current knowledge about tsRNAs and their biological function and significance.

**Keywords:** small RNAs derived from tRNA; tRNA; tiRNA; tRF; gene expression regulation



# Obsah

Úvod .....	1
1. Biogeneze tRNA .....	2
2. Klasifikace tsRNA.....	5
2.1 tRNA pŕlky/tiRNA – jejich strukturní klasifikace a vliv modifikací nukleotidů v tRNA na jejich vznik .....	5
2.2 tRF – strukturní klasifikace a vliv modifikací nukleotidů na jejich vznik .....	7
3. Biologická funkce.....	10
3.1 Funkce tsRNA v regulaci genové exprese.....	10
3.1.1 Regulace stability mRNA .....	10
3.1.2 Translace .....	11
3.2 Fyziologické funkce tsRNA .....	15
3.3 Funkce tsRNA jako epigenetického faktoru.....	16
3.4 Regulace stresové odpovědi.....	18
4 Význam tsRNA v patogenezi lidských onemocnění a jejich diagnostický potenciál .....	20
Závěr .....	21
Seznam použité literatury .....	22

## Seznám použitých zkratek

AGO2	argonaut protein 3	argonaute protein 3
ALKBH1	demetyláza ALKBH1	demethylase ALKBH1
ALKBH3	demetyláza ALKBH3	demethylase ALKBH3
APAF-1	proapoptotický faktor APAF-1	apoptotic protease activating APAF actor 1
Asp	kyselina asparagová	aspartic acid
ATP	adenosintrifosfát	adenosine triphosphate
BCL-2	antiapoptotický protein BCL-2	B-cell lymphoma protein 2
Cca1p	kvasinková ATP(CTP): tRNA nukleotidyltransferáza	ATP(CTP): tRNA nucleotidyltransferase
C-MYC	transkripční faktor C-MYC	transcription factor C-MYC
CTP	cytidintrifosfát	cytidine triphosphate
DNMT2	DNA metyltransferáza 2	DNA methyltransferase 2
Dnmt2	gen pro DNA metyltransferázu 2	DNA methyltransferase 2 gene
eIF2 $\alpha$	eukaryotický iniciační faktor 2 alfa	eukaryotic Initiation factor 2 alfa
eIF4A	eukaryotický iniciační faktor 4A	eukaryotic initiation factor 4A
eIF4E	eukaryotický iniciační faktor 4E	eukaryotic initiation factor 4E
4E-BP	vazebný protein eukaryotického iniciačního faktoru 4E	eukaryotic initiation factorm 4E binding protein
eIF4G	eukaryotický iniciační faktor 4G	eukaryotic initiation factor 4G
Gln	glutamin	glutamine
Glu	kyselina glutamová	glutamic acid
Gly	glycin	glycine
GW182	protein GW182	GW182 protein
HEK293	buněčná linie HEK293	human embryonic kidney cell line
HeLa	buněčná linie HeLa	HeLa cell line
HepG2	buněčná linie HepG2	human liver cancer cell line
HF	buněčná linie HF	human fibroblast cell line
iCLIP	sekvenační metodika imunoprecipitovaných RNA	individual-nucleotide resolution UV cross-linking and immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing
IGF2BP1	protein IGF2BP1	insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 1
KO	vyřazení genu	knockout

La	La autoantigen	La autoantigen
Lhp1	kvasinkový chaperon Lhp1	like heterochromatin protein 1
LIF	faktor LIF	leukemia inhibitory factor
LTR	dlouhé koncové repetice	long terminal repeat
Maf1p	kvasinkový negativní regulátor transkripce RNA polymerázy III	negative regulator of RNA polymerase III
mESC	buněčná linie mESC	mouse embryonic stem cells
Met	metionin	methionine
MINTbase	databáze tsRNA	tsRNA database
miRNA	microRNA	microRNA
mRNA	mediátorová RNA	messenger RNA
NSUN2	NOP2/Sun RNA Metyltransferáza 2	NOP2/Sun RNA Methyltransferase 2
nt	nukleotid	nucleotide
P53	protein P53	protein P53
PBS	fosfátový pufr	phosphate-buffered saline
pre-tRNA	prekurzorová transferová RNA	precursor transfer RNA
PUS7	pseudouridin syntáza 7	pseudouridine synthase 7
Rat1p	kvasinková 5'→3' exoribonukleáza	5'→3' exoribonuclease
Rex1p	kvasinková exoribonukleáza Rex1	reduced expression-1
RISC	ribonukleoproteinový komplex RISC	RNA-induced silencing complex
RNáza	ribonukleáza	ribonuclease
Rny1p	kvasinková rybonukleáza 1	yeast ribonuclease 1
RPM	normalizovaná jednotka množství RNA	reads per million reads, a normalized gene expression unit
RPS28	ribosomální protein S28	ribosomal protein S28
RRL	translační lyzát RRL	rabbit reticulocyte lysate
Rrp44	kvasinková RNáza Rrp44	RNase Rrp44
RTD	degradační dráha RTD	rapid tRNA decay
S2	buněčná linie S2	S2 cell line
Sen	endonukleázový komplex	splicing endonuclease complex
SG	stresové granule	stress granules
snRNA	malá jaderná RNA	small nuclear RNA
sRNA	malá RNA	small RNA
tiRNA	RNA odvozené z tRNA za stressových	tRNA-derived stress-induced RNA

podmínek

TOR	serin/treoninová kináza TOR	target of rapamycin
TRAMP	Trf4p/Air2p/Mtr4p polyadenylační komplex	Trf4p/Air2p/Mtr4p polyadenylation complex
tRF	fragmenty RNA odvozené z tRNA	tRNA-derived fragment
TRF4	poly(A) polymeráza	poly(A) polymerase
Trf4	gen pro TRF4	TRF4 gene
tRFdb	tRF databáze	tRF database
TRMT2A	metyltransferáza TRMT2A	tRNA methyltransferase 2 homolog A
tRNA	transferová RNA	transfer RNA
tRNA <sub>i</sub>	iniciátorová tRNA	initiator tRNA
tsRNA	málo RNA odvozené z tRNA	tRNA-derived small RNA
Tyr	tyrozin	tyrosine
U7 snRNA	U7 malá jaderná RNA	U7 small nuclear RNA
UPR	stresová odpověď na nesbalené bílkoviny	unfolded protein response
Val	valin	valine
WGE	pšeničný translační lysát	wheat germ extract
Xrn1p	kvasinková 5'→3' exoribonukleáza 1	5'→3' exoribonuclease 1
YB-1	protein, který se váže na Y-box	Y-box-binding protein 1
YBX	protein, který se váže na Y-box	Y-box-binding protein 1
Ψ	pseudouridin	pseudouridine

## Úvod

V oblasti molekulární biologie posun v poznání živých systému jde ruku v ruce se zaváděním nových citlivějších a robustnějších metodických přístupů. Vysokoprůchodné sekvenační techniky stojí za objevem celého spektra nekódujících RNA včetně skupiny tzv. malých RNA (sRNA). Role současné vědy je zkoumat jejich biologické funkce a jejich možnou roli v regulaci genové exprese. Starším příkladem malých RNA jsou miRNA, jejichž identifikace a další jejich studium vedlo k objevu celé nové úrovně regulace exprese. Zkoumání dalších druhů nekódujících RNA má za cíl zodpovědět na otázku, zdá existují i další univerzální a dříve přehlížené regulační mechanismy. V tomto ohledu se stala jedním z perspektivních kandidátů skupina malých RNA odvozených z tRNA (tsRNA), které jsou ústředním tématem této práce.

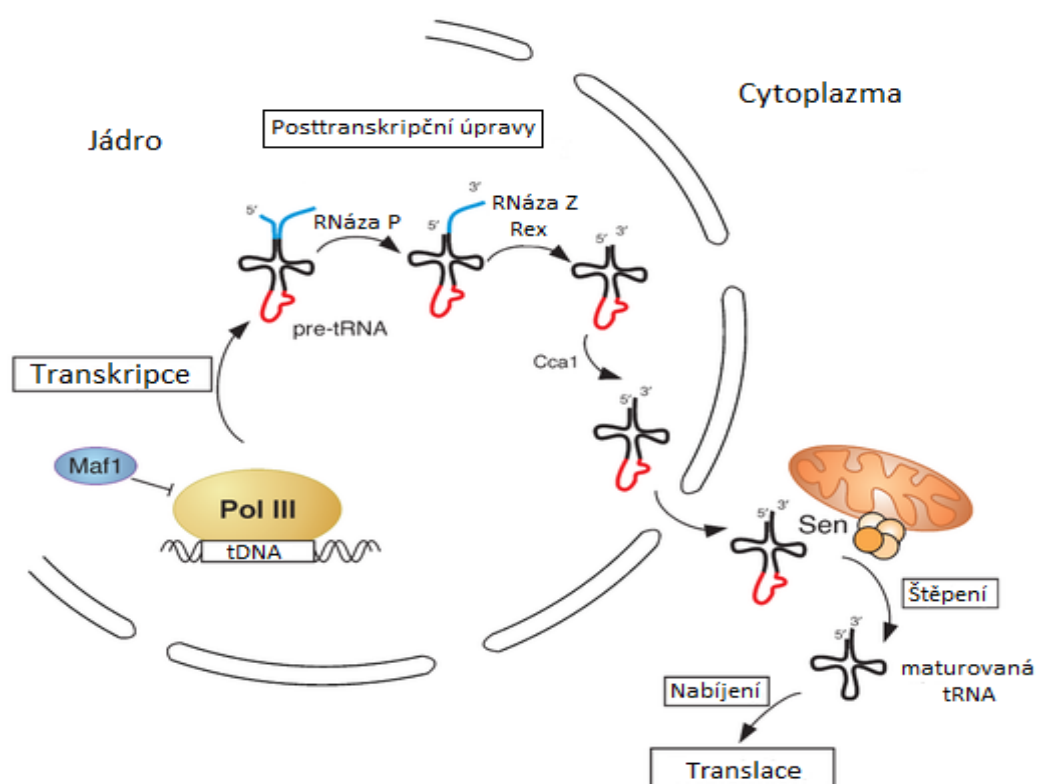
Transferová RNA představuje nepostradatelnou součást translačního aparátu všech organismů. Stejně jako u ostatních esenciálních a vysoce evolučně konzervovaných biomolekul, i tRNA si prošla dlouhým vývojem, kdy došlo k optimalizaci její funkce v translaci, ale pravděpodobně i ke vzniku dalších, nekanonických funkcí. Odvozené tsRNA jsou právě molekuly, které by mohly plnit tyto alternativní funkce v regulaci genové exprese.

První studie, která odhalila přítomnost tsRNA v buňkách, byla publikována v roce 1977 (Ernest Borek; et al., 1977). V této a dalších ranných studiích byly tyto fragmenty považovány spíše za náhodné meziprodukty odbourávání tRNA. Postupem doby v návaznosti na technologický pokrok se začaly publikovat výsledky pokusů, které odhalily mnoho dalších tsRNA a začala se intenzivně studovat jejich funkce v buňce. Postupně se ukázalo, že tyto fragmenty jsou přítomny v buňkách člověka (Y Lee et al., 2009), bakterií (Levitz et al., 1990), prvoků (S Lee et al., 2005), kvasinek (Thompson et al., 2008), rostlin (S Zhang et al., 2009) a dalších organismů. Zpravidla vznik fragmentů tRNA probíhá za stresových podmínek (Yamasaki et al., 2009), ale některé druhy tsRNA jsou přítomny i za podmínek fyziologických (Cole et al., 2009) a podílí se např. na buněčných diferenciačních pochodech nebo mezidruhové komunikaci. Štěpení je často zprostředkováno nukleázami Dicer (Cole et al., 2009) a Angiogeninem (Yamasaki et al., 2009).

Cílem této bakalářské práce je zpracovat aktuální rešerši o tsRNA, zaměřit se na popis jejich biologických úloh a pokusit se zodpovědět otázku, zda skutečně jen nepředstavují stabilní meziprodukty degradace tRNA nebo naopak, zda lze vysledovat univerzální molekulární mechanismus, jakým ovlivňují genovou expresi nebo další buněčné procesy napříč stromem života.

# 1. Biogeneze tRNA

O nezastupitelné roli tRNA v buňce svědčí fakt, že její existence byla předpověděna dříve, než byla fyzicky izolována. Tzv. adaptorová hypotéza postulována F.H. Crickem v roce 1958 předpověděla existenci molekuly, která musí zprostředkovat překlad „z jazyka nukleových kyselin na jazyk aminokyselin“ (H C Crick, 1958). V současnosti je nanejvýš zřejmé, že tato „adaptorová“ molekula, tRNA, hraje nejen konstitutivní, ale i regulovanou složku translačního aparátu. Kritickou roli tRNA podtrhuje fakt, že např. každá kvasinková buňka obsahuje 3 miliony molekul tRNA, což činí asi 10% celkové RNA (Waldron et al., 1975).

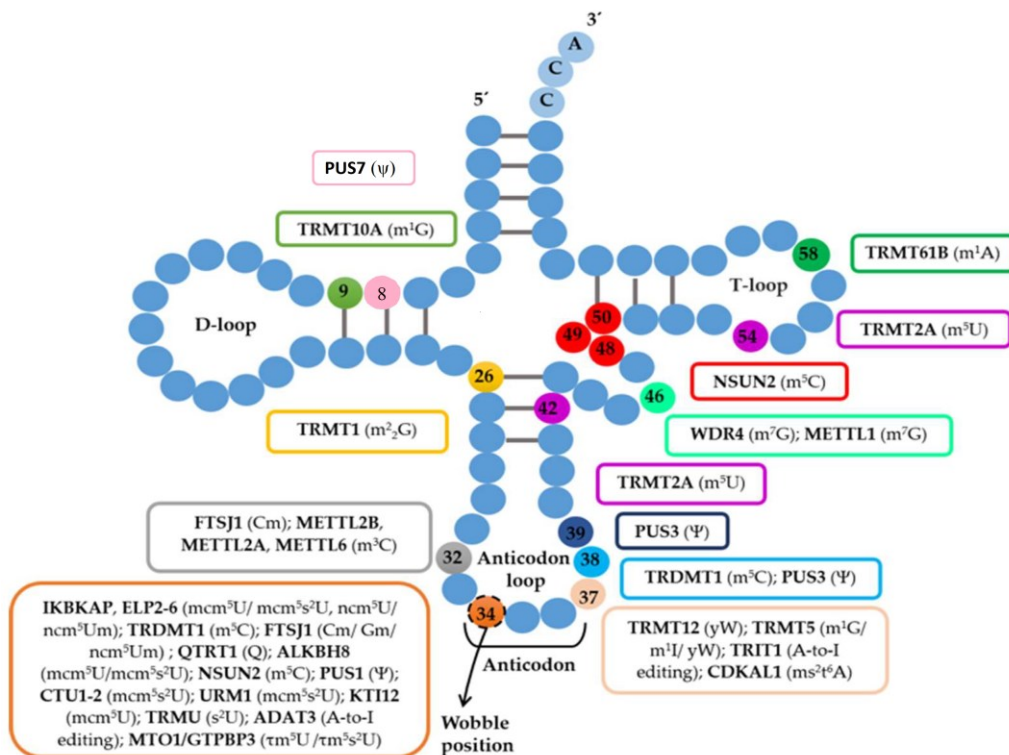


**Obrázek 1:** Schéma biogeneze tRNA v buňkách *Saccharomyces cerevisiae*. Transkripce probíhá v jádře prostřednictvím RNA polymerázy III, a to po uvolnění represoru Maf1p z polymerázy (prorůstová kináza TOR fosforyluje Maf1p a ten je vyloučen z jádra, čímž se aktivuje transkripce). Primární transkript tRNA (pre-tRNA) následně podléhá štěpení RNázou P, která zbavuje molekulu tzv. „leader“ sekvence na její 5'-konci. Pak probíhá odstranění tzv. „trailer“ sekvence na 3'-konci prostřednictvím RNázy Z, 5'→3' exoribonukleázy Rex1p a chaperonu Lhp1p (homolog lidského La autoantigenu). Posledním krokem před transportem tRNA do cytoplazmy je syntéza CCA trinukleotidu na jejím 3'-konci prostřednictvím tzv. „CCA-adding enzyme“. Vyštěpení intronu u kvasinek probíhá na vnější mitochondriální membráně proteinovým komplexem Sen. V uvedeném komplexu se nachází heterotetramerická endonukleáza, tRNA ligáza a 2'-fosfotransferáza. Alternativně, intron může být odstraněn ještě před úpravou 3' konce, avšak tento způsob není dominantní v kvasinkových buňkách. Maturovaná, správně sbalená tRNA může sloužit jako substrát pro aminoacylační reakci, kde 2' nebo 3' hydroxylová skupina koncového adenosínu reaguje s příslušným aminoacyl adenylát monofosfátem. Nabíjená tRNA se pak podílí na elongaci translace (a iniciace, pokud se jedná o iniciátorovou tRNA<sub>i</sub>). Převzato a upraveno z Wichtowska et al. 2013.

Transferová RNA je 70 až 95 nukleotidů dlouhá, má takzvanou „jetelovitou“ sekundární strukturu a terciální strukturu, připomínající tvar písmene „L“. Transkripce této RNA je

prováděna prostřednictvím DNA dependentní RNA polymerázy III. Primární transkript následně podléhá posttranskripčním úpravám, které jsou shrnuty v obrázku 1.

Modifikace nukleotidů mohou být prováděny v každém stupni biogeneze tRNA a prostřednictvím posttranskripčních modifikací buňka může selektivně navádět transkripty k stabilizaci nebo degradaci. Je popsáno více než sto typů modifikací, některé jsou přítomny v každém typu tRNA (například dihydrouridin nebo pseudouridin podle kterých jsou pojmenovány tRNA smyčky), většina z nich je však typická jen pro určitý okruh tRNA. Nejčastější modifikace nukleotidů v tRNA jsou uvedeny na obrázku 2. Modifikace určují strukturní a funkční charakteristiky tRNA, zejména ovlivňují termodynamickou stabilitu molekuly a zaujmutí správné terciální struktury. Z hlediska dekódování hrají zvláštní roli modifikace na první pozici antikodónu, neboť modifikované nukleotidy se mohou párovat s kodónem prostřednictvím kolísavého párování bází (wobble pairing).



**Obrázek 2:** Sekundární struktura tRNA s barevně zvýrazněnými pozicemi nukleotidů, které jsou nejčastěji modifikovány. Barevné rámečky obsahují nejčastější modifikace v uvedených pozicích (v závorkách) a enzymy, které danou modifikaci nukleotidu katalyzují (tučné písmo). Z hlediska této práce jsou důležité modifikace, které jsou prováděny NSUN2, PUS7 a TRMT2A. Informace o ostatních modifikacích lze nalézt v přehledovém článku Pereira et al. 2018, z kterého je obrázek převzat. Modifikace na 8. pozici byla přidána v rámci úpravy.

Aby tRNA mohla splnit svojí hlavní funkci adaptorové molekuly, musí být nabitá příslušnou aminokyselinou. Tento děj je katalyzován enzymem aminoacyl-tRNA syntetázou za hydrolýzy jedné molekuly ATP. V buňce je pro každou aminokyselinu přítomna alespoň jedna varianta tohoto enzymu.

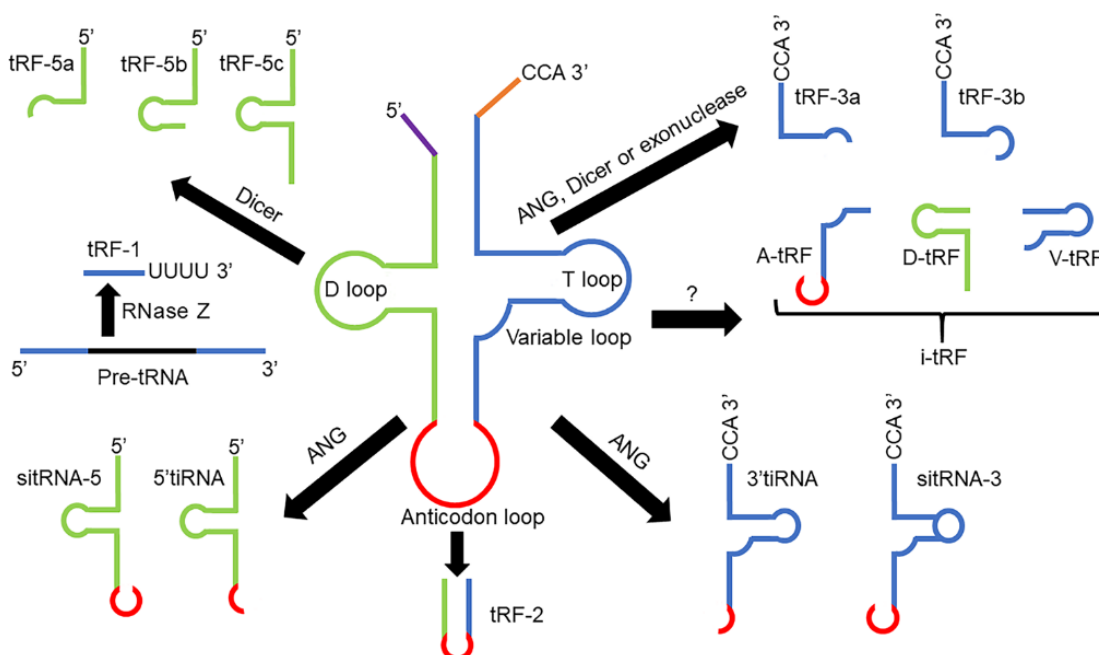
Molekulární mechanizmy odbourání tRNA zatím není tak dobře probádána jako její biogeneze a zrání. Hlavním modelem pro studium degradace tRNA je *Saccharomyces cerevisiae* a u tohoto organismu je demonstrováno několik degradačních drah, jak v cytoplazmě, tak i v jádře. Překvapivým faktem je, že přibližně polovina správně modifikovaných tRNA prekursorů jsou odbourány do té doby, než začnou splňovat svojí hlavní funkci adaptorové molekuly v translaci (Gudipati et al., 2012). Klíčovým hráčem tRNA biogeneze a odbourání v buňce je exozóm. Je to multiproteinový komplex RNA nukleáz, zprostředkovávající 3'→5' nukleázovou aktivitu.

U kvasinek mutovaných v genech pro podjednotku exozómu Rrp44 a poly(A) polymerázu Trf4p se zjistilo, že pre-tRNA pro iniciátorový metionin již v jádře může být polyadenylována komplexem TRAMP (Trf4p/Air2p/Mtr4p polyadenylation complex) a následně degradována s ním asociovaným exozómem (Kadaba et al., 2006). Odbourání iniciátorové tRNA, která postrádá m<sup>1</sup>A58 je také prováděno prostřednictvím exozómu (Kadaba et al., 2004).

Jiný popsány způsob degradace tRNA je RTD (rapid tRNA decay) dráha. Ta byla původně popsána jako dráha odbourání pro hypomodifikované maturované tRNA (Alexandrov et al., 2006). Jako funkční součásti této dráhy byly popsány dvě 3'→5' exonukleázy: Xrn1p a Rat1p. Předpokládá se, že jako substrát pro degradaci v této dráze jsou rozpoznány tRNA s málo stabilními akceptorovým a T stonky. Přičemž význam modifikací pro degradaci se nezdá být tak jednoznačný (Whipple et al., 2011). Dodatečným faktorem, který destabilizuje akceptorový stonek je přidání CCACCA sekvence na 3' konec tRNA. Panuje představa o tom, že Cca1p provádí závěrečnou kontrolu kvality tRNA a v případě, že tRNA danou kontrolu neprojde, tak Cca1p namísto CCA sekvenci, která je nepostradatelná pro nabití tRNA, přidá CCACCA a tato sekvence následně navede molekulu na degradaci (Wilusz et al., 2011). Nicméně vztah mezi odbouráním prostřednictvím exozómu a RTD doposud není znám.

## 2. Klasifikace tsRNA

Jednotný systém názvosloví tsRNA se zatím úplně neujal. Není totiž zatím jasné, podle jakých faktorů by se tyto molekuly nejlépe mohly roztrždit. Proto existuje několik variant názvů pro stejné molekuly. V této práci ve většině případů budu používat tu nejčastější klasifikaci podle toho, jaké úseky původní tRNA příslušný fragment nese.



**Obrázek 3:** Klasifikace tsRNA. Fragменты jsou označeny stejnou barvou, jako úsek na tRNA, ze které pochází. Nad černou šipkou je napsán název ribonukleázy, která štěpení provádí. V případě, že nukleáza není pro dané fragmenty známa, je nad šipkou otazník. Primárně, fragmenty dělíme na tiRNA a tRF. tiRNA mají jeden z konců tRNA molekuly a alespoň část antikodonové smyčky. tRF jsou všechny ostatní fragmenty. Převzato z Xie et al. 2020.

### 2.1 tRNA půlky/tiRNA – jejich strukturní klasifikace a vliv modifikací nukleotidů v tRNA na jejich vznik

tiRNA (tRNA-derived stress-induced RNAs) jsou 30-40 nukleotidů dlouhé molekuly, vznikající při štěpení tRNA v kodónové smyčce (viz obrázek 3). Jak vyplývá z jejich názvu, většina těchto nekódujících RNA vzniká v rámci stresové odpovědi. Jejich hromadění v buňce bylo například zaznamenáno v reakci na hypoxii (Fu et al., 2008; Thompson et al., 2008), tepelný šok (Fu et al., 2008), ultrafialové záření (Yamasaki et al., 2009), nedostatek živin (S Lee et al., 2005) a jiné stresory. Přičemž to jaké konkrétní fragmenty tRNA jsou obsaženy v buňce závisí na typu stresu, kterému byly buňky vystaveny (Rashad et al., 2020). U rostlin však tsRNA byly odhaleny i za fyziologických podmínek (Nowacka et al., 2013). Dle dosavadních zjištění, většina tiRNA vzniká z maturovaných tRNA molekul, o čemž svědčí přítomnost CCA úseků na 3'-koncích tiRNA, či absence tRNA intronů. V důsledku

štěpení tRNA v antikodónové smyčce vznikají dva typy odvozených molekul tiRNA, 3'-tiRNA a 5'-tiRNA, v závislosti na tom, zda výsledný fragment obsahuje 3' nebo 5' konec původní tRNA.

Za vznik 3'- a 5'-tiRNA u savců je zodpovědná nukleáza angiogenin, která patří do proteinové rodiny ribonukleáz A (Fu et al., 2008). Angiogenin štěpí většinu typů tRNA, ale ne všechny. To lze demonstrovat například na Tyr-tRNA, u které bylo zjištěno, že nepodléhá štěpení danou RNázou v hladovějících buňkách (inkubovaných v PBS) buněčné linie HepG2 na rozdíl od Gly-tRNA, Val-tRNA a Met-tRNA. Autoři se domnívají, že schopnost angiogeninu štěpit, či neštěpit tRNA může spočívat v jejich různé délce (Tyr-tRNA je dlouhá okolo 90 nukleotidů, zatímco Gly-, Val- a Met-tRNA jsou dlouhé okolo 70 nukleotidů), což může být ve spojení se změnou struktury molekul tRNA tak, že u neštěpených typů tRNA chybí některé strukturální determinanty rozeznávané dotyčnou RNázou. Dále, existují důkazy o angiogenin-nezávislém vzniku tiRNA (Su et al., 2019), což je v souladu se skutečností, že proteinová rodina ribonukleáz A je specifická pouze pro obratlovce, zatímco tsRNA byly detekovány u všech domén života (Prats-Ejarque et al., 2019). Další z identifikovaných nukleáz je RNáza L, která je aktivována 2'-5'oligoadenylátem v důsledku infekce savčích buněk některými viry a je součástí interferonové odpovědi. Tato RNáza je zodpovědná za štěpení rRNA (také mRNA a tRNA), ale v infikované buňce se ukázalo, že v časných stádiích infekce preferenčně štěpí pouze některé tRNA a to v antikodónové smyčce. Tvorba tiRNA, která je indukována RNázou L vede sama o sobě k inhibici celkové translace v buněčné linii HeLa (Donovan et al., 2017).

V buňkách *Saccharomyces cerevisiae* byla identifikována Rny1p jako RNáza, která provádí štěpení tRNA v antikodónové smyčce. Rny1p patří do skupiny ribonukleáz T2 (Debrah M. Thompson and Roy Parker, 2009).

Vznik tsRNA je tedy úzce spjatý s aktivitou RNáz, jejichž schopnost rozeznávat určitý typ tRNA jako substrát pro štěpení může být závislá na konkrétní struktuře tRNA molekuly. Molekulární podstata interakce uvedených RNáz s tRNA není zatím objasněna. Vzhledem k tomu, že chemické modifikace bází v tRNA jsou důležité pro zaujetí správné konformace a celkově pro efektivní biogenezi a maturaci tRNA, jedním z témat, které se začalo v recentní literatuře studovat, je vliv modifikací nukleotidů v tRNA na vznik příslušejících tsRNA.

Schaefer a spolupracovníci zjistili, že štěpení Asp-tRNA, Val-tRNA a Gly-tRNA v antikodónové smyčce angiogeninem je inhibováno metylací cytosinu v pozici 38 tRNA (Schaefer et al., 2010). Danou modifikaci provádí metyltransferáza DNMT2. Delece genu Dnmt2 vede mimo jiné k absenci metylové skupiny na uvedené cytozinové bázi a k vyšší

hladině tiRNA vzniklých z výše uvedených tRNA v buňce (Y. Zhang et al., 2018). DNMT2 se tím pádem stává součástí odpovědi na stres skrze regulaci tvorby tiRNA.

Jedním z enzymů, které mohou metylovat cytozin v pozici 5 pyrimidinového kruhu ( $m^5C$ ), je savčí NSUN2. Mutace v uvedené metyláze způsobují mikrocefalii a další neurologické abnormality. Blanco a spolupracovníci zjistili, že nefunkčnost NSUN2 ovlivňuje dvojici cytozinů umístěných v pozicích 48 a 49 tRNA (tzn. v bázi pseudouracilového ramene tRNA) (Blanco et al., 2014). Snížení jejich metylace vedlo k akumulaci 5'-tsRNA fragmentů, které byly zodpovědné za snížení celkové translace a za aktivaci stresových signálních drah vedoucích k apoptóze buněk některých částí mozku. Tito autoři také ukázali, že angiogenin štěpí účinněji ty tRNA, které nemají metylované cytoziny v uvedených pozicích.

Dalším enzymem, ovlivňujícím intenzitu štěpení je ALKBH1 (ALKB homolog 1, nucleic acid dioxygenase ALKBH1). Je to enzym, který je schopen demetylovat jak DNA, tak i RNA. Hlavním identifikovaným templátem je tRNA, kde katalyzuje demetylaci adeninu v pozici 58 ( $m^1A58$ ). Metylace adeninu v této pozici je považována za významnou z hlediska strukturní stability tRNA a je zajištěna metylázou TRMT6/61A (Droogmans et al., 2003). Metylace a demetylace A58 jsou reverzibilní a mohou reagovat na změnu podmínek, např. v závislosti na dostatek živin a mají tak potenciál regulovat genovou expresi (Liu et al., 2016). Bylo zjištěno, že tRNA s  $m^1A58$  jsou méně štěpeny na tiRNA (Rashad et al., 2020). To bylo zjištěno i v další studii, kde metylační aktivita TRMT6/61A negativně ovlivnila tvorbu tRF-3b, které jsou důležité pro zvládnutí stresové odpovědi na zvýšené množství špatně sbalených proteinů (UPR, unfolded protein response) v buňkách rakoviny močového měchýře (Su et al., 2022). Z proteinové rodiny ALKBH stojí též za zmínku ALKBH3, což je 1-methyladenosin ( $m^1A$ ) a 3-methylcytidin ( $m^3C$ ) tRNA demetyláza, která má z velké části dost podobnou aktivitu jako ALKBH1 (Z Chen et al., 2019).

## **2.2 tRF – strukturní klasifikace a vliv modifikací nukleotidů na jejich vznik**

Skupina tRNA derivovaných fragmentů neboli tRF, je poněkud více různorodá ohledně délek molekul a strukturního uspořádání. Délka RNA tohoto typu je v rozsahu 14 až 32 nukleotidů (Kumar et al., 2014). tRF vznikají štěpením nejenom maturované tRNA, ale i pre-tRNA (viz obrázek 3), což je odlišuje od tiRNA.

Větší strukturní diverzita se odráží v komplexnější klasifikaci typů molekul. Existuje několik dedikovaných databází, kde lze nalézt uspořádání do strukturních skupin. Jako první byla založena tRFdb (<http://genome.bioch.virginia.edu/trfdb/index.php>). Tato databáze k tisícům identifikovaných tRF přiřazuje číselné identifikátory. U každé položky lze dohledat

typ tRF, genomové koordináty zdrojového genu tRNA, sekvenci a odkaz na experiment, který vedl k identifikaci daného tRF. Databáze zatím shromažďuje informace z modelových organismů jako jsou *S. pombe*, *C. elegans*, *H. sapiens* a dalších. Později vznikla další databáze, která sice zatím obsahuje informace získané pouze z lidských buněk, ale spravuje nejenom tRF, ale i tiRNA (MINTbase v2.0, <https://cm.jefferson.edu/MINTbase/>). Navíc umožňuje filtrovat vyhledávání dle míry exprese (RPM), celkově i v jednotlivých lidských tkáních.

Ohledně klasifikace tedy rozlišujeme tRF-1, tRF-2, tRF-3, tRF-5, a tRF-i dle toho, z jaké části molekuly tRNA konkrétní fragment pochází (viz obrázek 3).

tRF-1 představuje tzv. „trailer“ sekvenci pocházející z 3' konce pre-tRNA. Daný fragment vzniká při štěpení pre-tRNA RNázou Z, a tedy v maturované tRNA se nenachází (Dubrovsky et al., 2004). tRF-1 jsou charakteristické sekvencí polyU na 3' konci. Obdobné fragmenty derivované z 5' části pre-tRNA (tzv. „leader“ sekvence) nebyly zatím v buňkách nalezeny v dostatečném množství, pravděpodobně z důvodu jejich rychlé degradace.

tRF-5 a tRF-3 jsou odvozeny od 5' a 3' konců již maturované tRNA (Y. S. Lee et al., 2009). Většina prací se zaměřila právě na studium těchto fragmentů, protože mají zpravidla nejvyšší abundanci v buňkách a to v rámci různých podmínek (Kumar et al., 2014).

Zatím panuje čilá diskuse o tom, jaké všechny ribonukleázy jsou zodpovědné za vznik tRF. Nejvíce studií uvádí ribonukleázu Dicer jako enzym, který štěpí tRNA na tRF (Cole et al., 2009; Fazio et al., 2022; Martinez et al., 2017; Maute et al., 2013; Soares et al., 2015). Byla však publikována metaanalýza dat ohledně tsRNA u myši, kvasinky a octomilky, kde mutace v genu Dicer inaktivovali jeho funkci, což nevedlo k významnému poklesu koncentrace tRF (Kumar et al., 2014). Tato data naznačují, že by mohlo dojít k objevu ribonukleáz produkujících tRF.

tRF-5 vzniká při štěpení tRNA v D-smyčce nebo v místě mezi antikodonovou a D-smyčkou. Podle délky fragmentů rozlišujeme 3 podtypy tRF-5: tRF-5a (14 až 16 nt), tRF-5b (22 až 24 nt), a tRF-5c (28 až 30 nt). Skupinu tRF-3 (13 až 20 nt) také rozdělujeme na podtypy tRF-3a a tRF-3b. Podle toho, zda fragment zahrnuje celou T-smyčku nebo pouze její část. Štěpení provádí Dicer, angiogenin nebo jiná nukleáza z rodiny ribonukleáz A. Jelikož štěpení podléhá již maturovaná tRNA, na 3' konci dané fragmenty obsahují sekvenci CCA.

Existují ještě další typy tRF, ale ty jsou podle dosavadních studií málo abundantní, a proto se příliš nestudují. Například tRF-2 jsou fragmenty, které byly detekovány v rakovinných buňkách (Goodarzi et al., 2015). Jejich společnou charakteristikou je to, že obsahují antikodonovou smyčku. Nukleáza dávající vznik danému typu tRF zatím nebyla identifikována.

Výzkum buněčné lokalizace ukazuje, že tRF-1 a tRF-3 se vyskytují přednostně v cytoplazmě (Haussecker et al., 2010). Počet prací studujících lokalizaci tRF v rámci buňky je zatím malý, takže nelze zatím objasnit, jak lokalizace tRF souvisí s biologickou funkcí těchto fragmentů. Navíc je jejich lokalizace rozdílná v rámci různých druhů organismů.

Stejně jako v případě tiRNA je vznik tRF spojen s posttranskripčními modifikacemi původní tRNA. Například Guzzi a spolupracovníci zjistili, že PUS7 (pseudouridin syntáza 7) ovlivňuje vznik tRF-5 prostřednictvím přeměny uridinu na pseudouridin ( $\Psi$ ) v pozici 8 tRNA (Guzzi et al., 2018). Podrobněji o této studii ještě bude pojednáno v kapitole 3.1.2.

## 3. Biologická funkce

### 3.1 Funkce tsRNA v regulaci genové exprese

Velká různorodost typů tsRNA nalezená v různých typech buněk u různých organismů, navíc za různých fyziologických a stresových situací může hypoteticky předznamenávat jejich regulační potenciál. Následující kapitoly shrnují doložené případy, kdy konkrétní tsRNA reguluje nebo alespoň se podílí na regulaci některé z úrovní genové exprese.

#### 3.1.1 Regulace stability mRNA

Goodarzi a spolupracovníci ukázali, že tRF-2, které jsou akumulovány v hypoxických podmínkách nádorů prsů, mají výrazný tumor supresorový potenciál. Autoři zjistili, že studované tRF-2 (pocházející z Glu-tRNA, Asp-tRNA, Gly-tRNA a Tyr-tRNA) jsou schopny vyvazovat RNA vazebný protein YBX1 z transkriptů některých protoonkogenů. Absence stabilizujícího proteinu YBX na daných transkriptech pak vede k jejich destabilizaci a následné degradaci. Dalším zajímavým zjištěním však bylo, že v buněčných liniích derivovaných z metastazujících nádorů, se nepodařilo detekovat dostatečnou hladinu tRF-2, což značí, že tento tumor-supresorový mechanismus se tam stává nefunkčním (Goodarzi et al., 2015).

Jiný způsob ovlivnění stability mRNA byl popsán na octomilce. V tomto případě tRF mají stejný mechanismus působení jako miRNA, tzn. na základě komplementarity nasedají na mRNA a indukují její degradaci AGO2-závislým způsobem (Luo et al., 2018). Je zajímavé, že terčem tsRNA se stávají mRNA kódující transkripční faktory, ribozomální proteiny a translační iniciační a elongační faktory. Primární podstatou pozorované inhibice celkové translace, např. při hladovění hmyzích buněk S2 na sérum, je snížení množství klíčových komponent translačního aparátu.

Řada studií, která se věnuje zkoumání tsRNA poukazuje na jejich funkční podobnost s microRNA (Cole et al., 2009; Haussecker et al., 2010; Y. S. Lee et al., 2009). Některé druhy tsRNA mají skutečně podobné vlastnosti s microRNA. Například CU1276 je tRF-3, který byl identifikován v maturovaných B lymfocytech. Tato tsRNA sdílí řadu shodných vlastností s microRNA, vzniká štěpením nukleázou Dicer, asociuje s proteiny Ago a reprimuje transkript typickým miRNA-závislým způsobem (Maute et al., 2013). V lidské buněčné linii HEK293 byly nalezeny tRF-3, které naopak nevznikají štěpením Dicerem, ale také asociují s proteiny AGO. Navíc se ukázalo, že v tRF-3 obsahujícím komplexu RISC dochází k interakci s proteinem GW182, který zprostředkovává spojení s deadenylačními komplexy. Snížení množství cílových mRNA, které nesou komplementární sekvence k danému tRF-3, tedy probíhá podobně jako v případě miRNA-zprostředkované destabilizace a degradace

transkriptů u savců, indukci deadenylace transkriptu, dále navozením translační represe a indukci jeho degradace (Kuscu et al., 2018).

### 3.1.2 Translace

Další významnou biologickou funkcí jak tRF, tak i tiRNA je regulace translace. Teoreticky nejjednodušší způsob, kterým tvorba tsRNA může ovlivnit translaci vyplývá z toho faktu, že tRNA představuje nezastupitelnou složku translačního aparátu, protože slouží jako substrát pro aktivaci aminokyselin. Při štěpení tRNA lze tedy předpokládat, že klesne její hladina v buňce, čímž dojde k ovlivnění celkové translace. Nicméně stanovení hladiny tRNA v buňce během indukce tvorby tsRNA ukázalo, že její hladina neklesá natolik, aby významně ovlivnila translaci (Thompson et al., 2008).

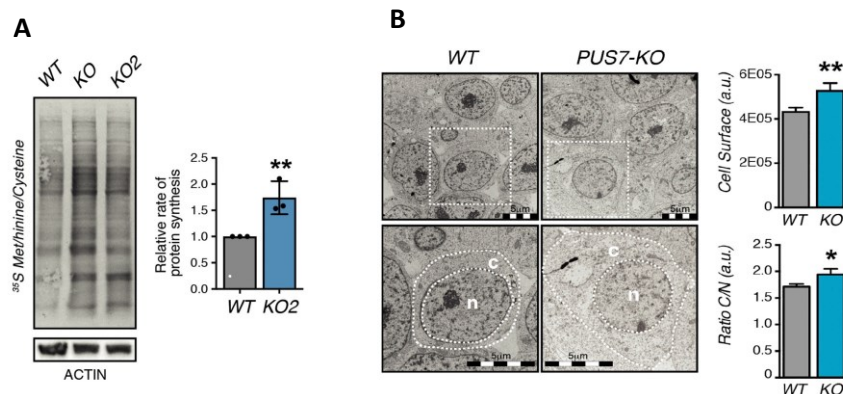
První důkazy o potenciálu tsRNA regulovat translaci byly získány na buňkách za stresových podmínek (Thompson et al., 2008; Yamasaki et al., 2009). Je zřejmé, že význam tohoto regulačního mechanismu spočívá v omezení energetických nákladů a přípravě buňky ke zvládnutí nepříznivých podmínek. Potlačení iniciace translace prostřednictvím tiRNA však překvapivě neprobíhá skrze fosforylaci eIF2 $\alpha$  jako hlavního regulačního mechanismu, který chrání buňky před stresovým působím na úrovni translace (Brostrom et al., 1997; Yamasaki et al., 2009). Jak již bylo řečeno, tiRNA, které vznikají po štěpení angiogeninem, jsou indukované zejména tepelným šokem, ultrafialovým zářením a působením arsenu (Yamasaki et al., 2009). Ukázalo se, že transfekce do buněk 5'-tiRNA, ale nikoliv 3'-tiRNA, způsobí významný pokles v proteosyntéze (Yamasaki et al., 2009). Následující zkoumání ukázaly, že 5'-tiRNA, které vznikly štěpením tRNA pro alanin a cystein jsou efektivnější v potlačení translace než ostatní druhy tiRNA (Ivanov et al., 2011). Autoři identifikovali terminální oligoguaninový motiv na 5' konci alaninové a cysteinové tRNA. Tento motiv je přítomný v daných tRNA u více organismů, což může znamenat, že inhibiční vliv těchto tiRNA na translaci může být univerzální. Autoři dále prokázali, že 5'-tiRNA inhibují translaci ve stádiu iniciace. Regulace probíhá prostřednictvím interakce 5'-tiRNA a eukaryotických iniciačních faktorů 4A a 4G. RNA bez čepičkové struktury (m<sup>7</sup>G) se překládaly v translačním lyzátu (RRL) významně hůře než jejich verze s čepičkou, což podporuje představu, že vytěsnění eIF4A/G z iniciačních komplexů obsahujících RNA bez čepičky je efektivnější. Potlačení translace transkriptů s čepičkou autoři vysvětlují tím, že 5'-tiRNA nějakým způsobem zvýhodňují tvorbu eIF4E-4E-BP komplexů nad translačně kompetentní interakcí proteinů eIF4E a eIF4G. Pro výše vysvětlenou tiRNA-zprostředkovanou translační represí je též zapotřebí YB-1, proteinu obsahujícího RNA vazebné „cold shock“ domény a současně proteinu, který váže 5'-tiRNA. Po transfekci 5'-tiRNA do buněk dochází k tvorbě stresových

granulí (SG; které samy o sobě vznikají v důsledku inhibice iniciace translace). Ačkoliv množství 5'-tiRNA-indukovaných SG není v buňkách vysoké, pro jejich tvorbu je zapotřebí proteinu YB-1. Podobně, pokud dojde k utlumení exprese YB-1, klesá i efekt 5'-tiRNA v potlačení iniciace translace. Tato data podporují představu, že YB-1 a 5'-tiRNA kooperují při inhibici iniciace translace.

Existují také dvě studie, které charakterizovaly inhibiční vliv tRF odvozené z 5' části valinové tRNA na translaci u halofilní archebakterie *Haloferax volcanii* (Gebetsberger et al., 2012). Tato tRF-5 vzniká za stresových podmínek a vykazuje podobnou afinitu k malé ribozomální podjednotce jako antibiotika tetracyklin nebo neomycin (Gebetsberger et al., 2017). Vzhledem k tomu, že tento tRF-5 interferuje s peptidyltransferázovou aktivitou ribozomu, utlumuje celkovou translaci, a to jak v *in vitro*, tak *in vivo* podmínkách. Kromě toho, při přenesení těchto fragmentů do *S. cerevisiae* a do komerčního translačního systému *E. coli*, úroveň proteosyntézy také poklesla. To naznačuje, že funkce tRF-5 je v tomto případě evolučně zachovaná, a to i mezi různými říšemi organizmů.

Práce Guzziho a jeho spolupracovníků poskytla cenné údaje roli tRNA fragmentů v ovlivnění translace. Pseudouridin syntáza 7 (PUS7) se exprimuje preferenčně v kmenových buňkách, jak zjistili autoři porovnáním její exprese v mESC (lidských kmenových buňkách) a buněčné linii HF (lidské fibroblasty).

Delece genu pro PUS7 v mESC neměla viditelný dopad na viabilitu ani růst buněk dotčené linie, avšak došlo k viditelnému zmenšení velikosti buněk a změněné schopnosti diferenciaci (viz obrázek 4). Autoři došli k závěru, že by mohla být ovlivněna celková míra

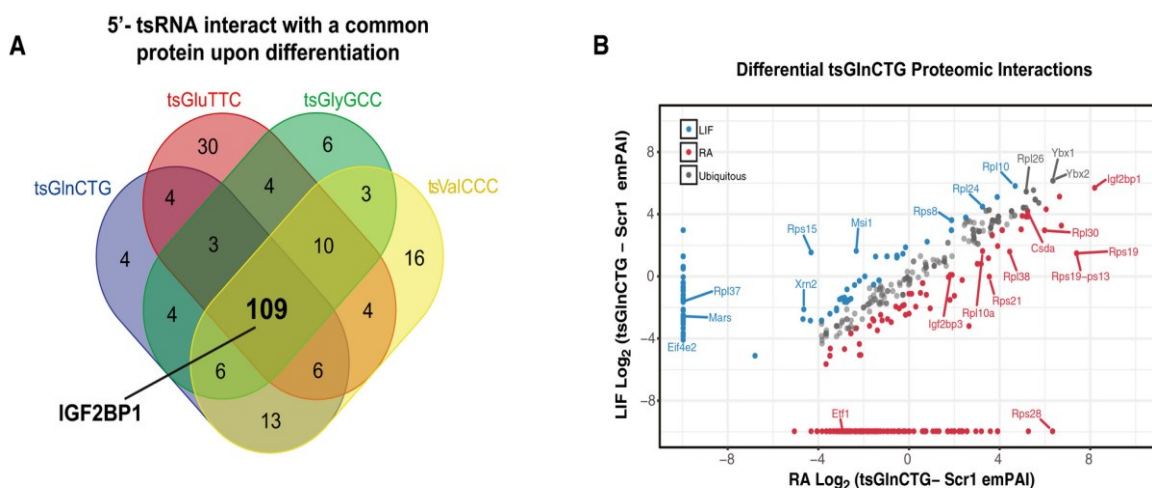


**Obrázek 4:** Porovnání buněk divokého typu a buněk s odstraněným genem pro PUS7. **(A)** Měření míry translace pulzním značením pomocí radioaktivně značené síry v aminokyselinách metioninu a cysteinu. Vyhodnocení denzitometrického měření je uvedeno v grafu vpravo **(B)** Fotografie z transmisního elektronového mikroskopu, které slouží k porovnávání velikosti buněk. Napravo jsou grafy pro velikost buněčného povrchu (nahore) a poměr velikosti povrchu cytoplazmy a jádra c – cytoplazma, n – jádro, WT – buňky divokého typu, PUS7-KO a KO2 – buňky s odstraněným genem pro PUS7. Odstranění PUS7 vedlo k deregulaci translace a zvětšení buněk včetně jader.

translace. Další zkoumání skutečně potvrdilo pokles na čepičce závislé iniciace translace. Ostatní komponenty translačního aparátu ani signální dráhy regulující translaci ovlivněny nebyly. iCLIP analýza pomohla identifikovat okruh RNA na které se PUS7 váže včetně vazebného motivu, na který se váže. Podařilo se identifikovat nabohacených nekódujících RNA, kde dominantní složku tvořila skupina tRNA (PUS7 se však váže i na určitý okruh mRNA). Filtrování dat sekvenční analýzy pomohlo identifikovat skupinu tRF-5, která byla specificky depletovaná v PUS7 KO buňkách. Šlo zejména o fragmenty těch tRNA, které na svém 5'-konci nesou terminální oligoguaninový motiv (Ala-tRNA, Cys-tRNA, a Val-tRNA) a mají délku 18 nukleotidů (autoři tuto skupinu nazvali mTOG). Při absenci pseudouridylace zprostředkované PUS7 v lidských kmenových buňkách se tedy množství mTOG sníží, což vede ke zvýšení proteosyntézy (Guzzi et al., 2018). Reprimující role mTOG je specifická, protože jejich dodání zvnějšku je schopno snížit translaci v PUS KO linii, navíc tento efekt nastává pouze v případě, že mTOG obsahuje pseudouracil (v pozici 8 původní tRNA) (Guzzi et al., 2018).

Další studie provedená na myších embryonálních kmenových buňkách odhalila zapojení tsRNA ve schopnosti buněk diferenciovat (Krishna et al., 2019). Po ošetření buněčné kultury kyselinou retinovou, která spouští diferenciaci, se ukázalo, že lze detekovat zvýšenou hladinu specifického okruhu tsRNA. Analýza vazebných proteinů prokázala, že každá ze

studovaných tsRNA disponuje unikátním spektrem interakčních partnerů, ale mnoho z nich interaguje s dvěma a více tsRNA (viz obrázek 5A). 109 proteinů pak bylo nalezeno u všech studovaných tsRNA. Autoři se zaměřili na 5'-tiRNA, která pochází z Gln-tRNA, s níž provedli další funkční pokusy jako hmotnostní spektrometrii asociovaných proteinů, kontrolní western blot analýzy a RNA sekvenování asociovaných mRNA. Souhrnně tyto pokusy ukázali, že tato tiRNA asociuje s RNA vazebnými proteiny, např. IGF2BP1 a YBX1, mnohými ribozomálními proteiny a z izolovaných komplexů tsRNA lze izolovat mnohé mRNA, které kódují transkripční faktory důležité pro udržení pluripotentního stavu buněk. U dané tiRNA také jasně prokázali, že se váže na IGF2BP1 (viz obrázek 5B), kterého se pak nedostává pro vazbu s mRNA kódující C-MYC. Tento transkripční faktor pomáhá udržovat nediferenciovaný stav buněk; vazba IGF2BP1 na destabilizující element jeho mRNA vede ke spuštění její degradace. Následné snížení hladiny C-MYC v buňce je pak součástí nastartování diferenciačních pochodů (Krishna et al., 2019).



**Obrázek 5:** Identifikace vazebných proteinů tsRNA. **(A)** Diagram popisující počet proteinů, které interagují s danými typy tsRNA. Přikrývající se pole ukazují množství společných vazebných partnerů. **(B)** Bodový graf znázorňující míru nabohacení vazebných proteinů 5'-tiRNA ve dvou porovnávaných podmínkách. Modrými tečkami jsou označeny proteiny, které se výrazně vázaly k tsRNA v buňkách, které byly ošetřeny LIF (Leukemia inhibitory factor), faktorem inhibujícím buněčnou diferenciaci. Červeně jsou označeny proteiny preferenčně se vážající k 5'-tiRNA v buňkách ošetřených kyselinou retinovou, faktorem indukujícím buněčnou diferenciaci. Šedými tečkami jsou označeny vazebné

Na druhou stranu byl publikován článek, který naopak odhalil prospěšný vliv tRF na translaci. tRF-3 pro leucin o délce 22 nukleotidů se komplementárně váže na mRNA kódující ribozomální protein RPS28. Předpokládá se, že tato vazba způsobuje změnu konformace transkriptu tak, že se účinněji překládá (Kim et al., 2017).

### 3.2 Fyziologické funkce tsRNA

tsRNA hrají regulační roli v různých buněčných pochodech. Studium rostlin v tomto ohledu přineslo zjištění, že tsRNA se mohou spolupodílet na komunikaci mezi jednotlivými pletivy, orgány, a dokonce mezi různými organizmy. tsRNA, odvozené od všech typů tRNA kromě tRNA pro izoleucin a treonin byly detekovány ve floému dýně *Cucurbita maxima* (S Zhang et al., 2009). Tyto RNA fragmenty nevznikají štěpením až ve floémové šťávě, ale v pletivech nebo až v buňkách sítkovic (S. Zhang et al., 2009). Analýza druhů fragmentů tRNA ve floému ukázala, že většinu tvoří tsRNA vzniklé štěpením tRNA v antikodónové vlásence. tsRNA izolované z floémové šťávy inhibovaly translaci reportérových RNA v translačním lyzátu WGE. Inhibující vliv na translaci byl zjištěn pouze v případě, pokud při izolaci tsRNA nebyla použita silná denaturující činidla, což autoři vysvětlují minimálním požadavkem na zachování sekundární struktury tsRNA. Uvedená pozorování vedly ke stanovení pracovních hypotéz ohledně možných funkcí tsRNA ve zprostředkování komunikace na dlouhé vzdálenosti mezi různými částmi rostlinného těla; tedy od zdroje (pletiva listů) do místa spotřeby (sink, kořen a apikální části rostliny). Transport tsRNA floémem může informovat „sinková“ pletiva o metabolickém stavu listů. V uvedené signalizaci také může hrát úlohu aktuální poměr tRNA v „sinku“ a dopravené tsRNA, což může například vymezovat růstové zóny. Další možností je, že tsRNA transportované do kořenů mohou sloužit jako zdroj pro syntézu cytokininů.

Sekvenční profilování malých RNA v kořenech a výhoncích *Arabidopsis thaliana* ukázalo, že v kořenech rostlin hladovějících na fosfor dochází k výraznému zvýšení hladiny devatenácti-nukleotidových fragmentů tRNA odvozených od 5' konce tRNA (tRF-5), což podtrhuje fakt, že v různých částech huseníčku se vyskytují různé druhy tRF, které se liší svojí variabilitou, tak množstvím, a to jak za normálních podmínek, tak za nedostatku zdroje fosforu v půdě (Hsieh et al., 2009).

Dalším zajímavým příkladem funkce tsRNA v regulaci vývoje rostlinného těla je regulace tvorby kořenových hlízek u sóji (Ren et al., 2019). Kořenové hlízky jsou specializované rostlinné orgány pro fixaci vzdušného dusíku, u sóji vznikají na základě symbiózy výhradně s bakterií *Bradyrhizobium japonicum*. Autoři ukázali, že tRF produkované touto bakterií mohou pozitivně regulovat tvorbu hlízek a identifikovali konkrétní druhy tRF, které umlčovaly geny pro vývojové transkripční faktory a faktory spojené s tvorbou kořenových vlásků u sóji, čímž dochází k pozitivnímu ovlivnění tvorby hlízek. Umlčování probíhá stejným mechanismem, jako u rostlinných miRNA. Obdobná funkce tRF při regulaci tvorby hlízek u jiných rostlin nebo v regulaci symbiózy s jiným druhem bakterie nebyla zatím

zjištěna, ani to jak probíhá transport RNA fragmentů z bakterie do rostlinných buněk. Na druhou stranu se jedná o doložený případ, kdy tsRNA je součástí mezidruhové komunikace.

Podobným popsaným příkladem je interakce lidských buněk s *Fusobacterium nucleatum*, bakteriálním komenzálem a fakultativním parazitem, který se vyskytuje v ústní dutině člověka. Autoři provedli analýzu malých RNA ve slinách člověka a zaměřili se na lidské tRF-5, u kterých zjistili vysokou sekvenční podobnost s tRNA *Fusobacterium nucleatum* (He et al., 2018). Pro studium možné interakce lidských tsRNA s *Fusobacterium nucleatum* použili autoři bakteriální kmen bez úseků genomu homologního s vybranými fragmenty. Pokus, kde přidali studované tsRNA k bakteriální kultuře, potvrdil předpoklad, protože tsRNA snížily celkovou proteosyntézu bakterie. Dále zjistili, že obě studované tsRNA jsou obsažené ve váčcích produkovaných keratinocyty a že jejich vylučování z buněk je indukováno přítomností bakterie v ústní dutině. Zatím neznáme molekulární mechanismus ovlivnění bakteriální proteosyntézy v tomto případě mezidruhové komunikace.

### 3.3 Funkce tsRNA jako epigenetického faktoru

Přenos dědičné informace z generace na generaci je nejenom závislý na konkrétních alelách genů, ale i na dalších epigenetických faktorech jako je např. metylace DNA nebo posttranslační modifikace histonových proteinů. Jedním ze stěžejních témat epigenetiky je způsob, jakým se tyto takzvané „epigeny“ přenáší z jedné generace na druhou. Z hlediska role definovaných fragmentů tRNA, bylo proto důležité zjištění, že tRF mohou hrát roli pro přenos epigenetické informace prostřednictvím samčích gamet. Studie biogeneze a funkce tRF během spermatogeneze a ranných stádií vývoje embrya poukázala na význam tRNA fragmentů v regulaci exprese genů, které jsou závislé na endogenních retroelementech (Sharma et al., 2016). Při sekvenování malých RNA z oblasti ocasu nadvarlete tura domácího, zastoupení tsRNA činilo kolem osmdesáti procent všech malých RNA (sRNA). Při provedení stejné analýzy v nezralém spermatu z oblasti varlat, autoři téměř žádné sRNA nenašli. Většina detekovaných tsRNA z nadvarlete byly 28 až 34 nukleotidů dlouhé fragmenty odvozené z 5' konce příslušejících tRNA. Dále v této studii bylo zjištěno, že úroveň tRF-5 odvozených z glycinové tRNA byla vyšší u myši, které dostávaly potravu s nižším obsahem bílkovin na rozdíl od těch myši, které dostávaly normální potravu. Přičemž celková úroveň tRNA izolovaných ze spermatu obou experimentálních skupin se nelišila.

Během průchodu nadvarletem se z jeho epitelu do spermatu uvolňují malé extracelulární váčky, zvané epididymozómy. Purifikace váčků a následné hluboké sekvenování sRNA prokázalo velkou podobnost s tsRNA profilem spermatu z ocasu nadvarlete. To by mohlo

vypovídá o tom, že vznik tRF neprobíhá ve varlatech, ale přidává se do spermatu prostřednictvím transportních váčků později během spermatogeneze.

Aktivita endogenních retroelementů je spojována se schopností diferenciací kmenových buněk (Macfarlan et al., 2012). Větší koncentrace tRF-5 v dvoubuněčném embryu způsobuje snížení exprese genů, jejichž transkripce je iniciována z LTR některých endogenních retroelementů (Sharma et al., 2016). Autoři předpokládají, že funkcí tRF-5 by mohla být regulace velikosti placenty nebo jiných jejích vlastností.

Částečné vysvětlení molekulárního mechanismu působení tRF na geny, jejichž exprese je závislá na retroelementech, bylo představeno později Boskovicem a spolupracovníky. tRF vzniklé štěpením glycinových tRNA mají totiž pozitivní vliv na produkci dalších malých nekódujících RNA, mezi nimi například U7 snRNA. Jak je známo, tato malá jaderná RNA je esenciální složkou 3' procesujícího a polyadenylačního komplexu mRNA kódujících replikačně dependentní histony. Pozitivní ovlivnění produkce histonových proteinů má pak za následek intenzivnější tvorbu heterochromatinu. Heterochromatin pak zpětnovazebně umlčuje retroelementy a tím pádem i snižuje expresi genů s nimi spojených (Boskovic et al., 2020).

S dalším důkazem epigenetického působení tsRNA přišel kolektiv autorů Chen Q et al. (2016). Tato studie se věnovala zkoumání vlivu vysokotučné stravy na potomstvo u samců myši. U potomků první generace byla pozorována změna ve dvou faktorech a to v glukózové toleranci a inzulínové rezistenci. Potomci druhé generace vykazovali první příznaky stejných poruch už sedmý týden života. Aby autoři zjistili, zda tsRNA mají vliv na dědičnost daných metabolických poruch, izolovali ze spermatu myši na vysokotučné stravě frakci RNA o délce třiceti až čtyřiceti nukleotidů a mikroinjekčně ji přenesli do normálních zygot. Stejně jako v předchozím pokusu vyvinutí jedinci měli glukózovou toleranci, ale inzulínovou rezistenci nevykazovali. Dále byly identifikovány druhy tsRNA nejvíce zastoupené v spermatu myši, které dostávali stravu s vysokým obsahem tuků. Těmito typy byly 5'-tiRNA, které pocházeli z tRNA pro kyselinu glutamovou, glycin a valin. Zajímavé je, že při injekčním vnesení analogických, umělou syntézou získaných 5'-tiRNA, fenotyp potomků se nijak nelišil od těch vzniklých z kontrolních zygot. Autoři tento výsledek vysvětlují tím, že syntetické tsRNA neobsahovaly přirozené modifikace nukleotidů, čímž mohlo dojít k ovlivnění některých vlastností tsRNA včetně ovlivnění jejich stability (Q Chen et al., 2016).

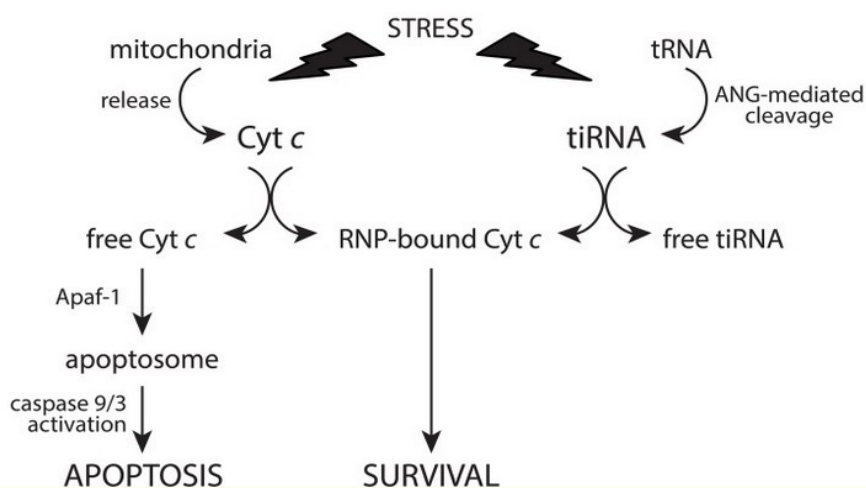
Všechny tyto studie dávají nahlédnout k dosud málo prozkoumaným způsobům epigenetické dědičnosti. Ovlivnění fenotypu potomků v závislosti na vnějších faktorech prostředí, ve kterém žijí jejich rodiče, může představovat důležitý adaptační mechanismus,

který je ovšem potřeba dále studovat včetně role tsRNA v přenosu epigenetické informace mezi generacemi.

### 3.4 Regulace stresové odpovědi

Jelikož výrazná variabilita druhů tsRNA byla zaznamenána za stresových podmínek, prvotní studie zaměřené na odhalení biologické funkce těchto fragmentů v adaptaci na stres pocházejí právě z těchto publikací. Jedním ze způsobů tsRNA zprostředkované adaptace translace na stresové podmínky (viz kapitola 4.1.2) je vytěsnění iniciačních faktorů z mRNA (Ivanov et al., 2011). Odlišný způsob adaptace, ve kterém hrají roli tiRNA, byl odhalen v souvislosti s cytochromem C.

Mitochondrie hrají klíčovou roli pro spuštění apoptózy. Autoři zkoumali, zda cytochrom C jako klíčová molekula v kaskádě proapoptotických dějů neinteraguje s fragmenty tRNA, které vznikají angiogeninovým štěpením. Tato pracovní hypotéza se jim potvrdila, protože identifikovali ribonukleoproteiny složené z cytochromu C a tiRNA. V tomto komplexu se cytochrom C stává nefunkčním vzhledem k jeho schopnosti aktivovat apoptózu (viz obrázek 6).



**Obrázek 6:** Schéma angiogenin-zprostředkované buněčné reakce na stres. Během osmotického šoku se biochemické a strukturální charakteristiky vnější mitochondriální membrány mění, což vede k vylučování cytochromu C do cytozolu. Cytochrom C pak spouští dobře známou kaskádu proapoptotických reakcí: váže se na APAF-1, způsobuje jeho konformační změnu, která umožní jeho následné navázání na prokaspázu 9 a její následné štěpení. Bylo zjištěno, že ošetření myších embryonálních fibroblastů angiogeninem během prvních dvou hodin hyperosmotického stresu vede k potlačení štěpení prokaspázy 9 a 3 a vzniku ribonukleoproteinů složených z cytochromu C a tiRNA. Převzato z Saikia et al. 2014.

V jiné studii, ve které byl zkoumán význam tRF pro citlivost buněk k cisplatině (účinné látce používané pro léčení různých druhů rakovin), bylo ukázáno, že transfekce inhibitorů pro daný tRF do buněk ošetřených cisplatinou způsobuje zvýšení exprese cytochromu C a P53, pak snížení exprese antiapoptotického proteinu BCL-2 v buňkách rakoviny prostaty (Yang et al., 2021). Také tyto inhibitory indukují fosforylaci eIF2 $\alpha$ . Zkoumány tRF je fragment, který

odvozený od 5' konce tRNA pro lysin. Tato malá RNA je typem tsRNA která má rozdílnou koncentraci ve zdravých buňkách a ve zkoumaných buňkách rakoviny prostaty. To je dalším příkladem studie, ve které tRNA hraje roli inhibitoru apoptózy.

V jednobuněčném parazitickém prvokovi *Trypanosoma brucei* byla objevena nová funkce tiRNA odvozené z tRNA pro threonin při analýze malých RNA asociovaných s ribozomy. Tento prvok je specifický svou omezenou možností regulovat transkripci za stresových podmínek. Reakce na stres tedy probíhá preferenčně na posttranskripční a translační úrovni. Ukázalo se, že množství 3'-tiRNA je větší, pokud je trypanozoma vystavena hladovění. Po odeznění stresu tato 3'-tiRNA interaguje s ribozómy a polyzómy a usnadňuje translaci mRNA kódujících proteiny, které jsou důležité pro zotavení buňky. Konkrétní mechanismus účinku těchto tiRNA na ribozóm zatím není znám, stejně jako jeho přítomnost u jiných druhů trypanozom (Fricker et al., 2019). Tato studie tedy ukazuje aktivační účinek tsRNA na translaci na rozdíl od většiny publikovaných prací.

## **4 Význam tsRNA v patogenezi lidských onemocnění a jejich diagnostický potenciál**

Současná literatura se často věnuje profilování tsRNA v biologickém materiálu, který byl získán se zdravých a nemocných jedinců (Dhahbi et al., 2013; Y. S. Lee et al., 2009; Maute et al., 2013; Rounge et al., 2015). Obecně lze říci, že profily tsRNA vykazují jistou specifitu dle konkrétních studovaných nemocí, či patologických metabolických stavů, nicméně molekulární podstata tohoto fenoménu není zatím příliš studována.

Jeden z nejdůležitějších důvodů nárustu zájmu o tRNA fragmenty je jejich poměrně vysoký potenciál v diagnostice velkého počtu nejrůznějších nemocí. Existuje totiž několik faktorů, které dělají tsRNA dobrými diagnostickými markery. Vyskytují se v séru, moči a jiných tělních tekutinách (Godoy et al., 2018), což znamená možnost snadného neinvazivního odběru vzorků. Dále profily fragmentů tRNA reflektují fyziologické podmínky a jsou tkáňově specifické (Torres et al., 2019).

Nádorová onemocnění tvoří prominentní skupinu, kde byly použity analýzy profilu tsRNA pro porovnání zdravých a nemocných jedinců. Autoři se však často nepouštějí do hledání role fragmentů pro vznik a průběh nemocí. Výzkum je zaměřen na samotné hledání biologických markerů patologických stavů. Jedna z mála studií, která se pokusila o vysvětlení mechanismu působení tsRNA se věnovala funkci tRF-2 v regulaci stability onkogenních transkriptů a byla již zmíněna v kapitole 3.1.1.

Více informací ohledně výzkumu tsRNA v rakovinných buňkách viz například přehledový článek Yu et al., 2020.

## Závěr

V této práci jsem se snažila shromáždit aktuální informace o tsRNA. Tento souhrn není zajisté vyčerpávající a nepojímá všechny publikované práce na toto téma, snažila jsem se soustředit na studie zabývající se molekulárním mechanismem působení tsRNA a zkoumáním jejich role na buněčné úrovni. Vztah tsRNA k lidským onemocněním včetně diagnostického potenciálu není podrobně zpracován.

Současná literatura nepovažuje tsRNA za stabilní produkty degradace tRNA, což je založeno na pozorování, že stresová působení, které indukují vznik tsRNA, nevedou k výraznému snížení hladiny tRNA v buňce (Thompson et al., 2008). Zatím identifikované nukleázy, AGO a Dicer, nejsou zapojeny do běžných degradačních drah tRNA. Na tomto místě je také vhodné znovu zdůraznit, že v některých případech zatím nebyla příslušná nukleáza identifikována. Podobně není vyjasněn ani vztah biogeneze tsRNA s drahou si/miRNA a společné fungování nukleázy Dicer. Nedostatečná znalost se také týká mechanismu rozpoznávání cílových tRNA danými nukleázami.

Z této práce vyplývá, že tsRNA ovlivňují posttranskripční úroveň regulace genové exprese, zejména stabilitu a translaci cílových mRNA (Krishna et al., 2019), avšak jejich úloha byla zaznamenána i v dalších biologických procesech, čehož je výsledkem, že mají celou řadu biologických rolí. Z tohoto hlediska je tedy zřejmé, že nelze nalézt žádný jednotný mechanismus jejich působení. Z dosavadních studií také vyplývá úzký vztah mezi stavem modifikace určitých bází tRNA pro vznik příslušejících fragmentů. V některých případech se ukazuje, že absence modifikace báze je podmínkou pro štěpení (Rashad et al., 2020). V jiných případech je naopak příslušná modifikace potřeba nejen pro štěpení, ale také pro biologickou funkci dané tsRNA (Guzzi et al., 2018).

Zásadní posun ve studiu tsRNA, kde jejich regulační a biologická role byla dle mého soudu jasně prokázána, lze nalézt v několika prestižních publikacích. Jedná se například o práci Guzziho a spolupracovníků, kde byl odhalen význam tRF-5 pro buněčnou diferenciaci a důležitost pseudouridylace ve zprostředkování biologické funkce daného fragmentu (Guzzi et al., 2018), nebo první proteomická analýza, která vedla k identifikaci vazebných proteinů a opět k definování biologické funkce studované tsRNA (Krishna et al., 2019).

Vzhledem k tomu, že stabilní fragmenty tRNA byly nalezeny napříč všemi doménami života, dedikovaná literatura nepoužívá úplně sjednocenou nomenklaturu pro jejich pojmenování. Tento nedostatek jsem se snažila v práci omezit, avšak myslím, že právě další intenzivní výzkum včetně pomoci bioinformatických databází povede k zavedení jednotného dělení a pojmenování.

## Seznam použité literatury

### \* označuje sekundární citaci

- Alexandrov, A., Chernyakov, I., Gu, W., Hiley, S. L., Hughes, T. R., Grayhack, E. J., & Phizicky, E. M. (2006). Rapid tRNA Decay Can Result from Lack of Nonessential Modifications. *Molecular Cell*, 21(1), 87–96. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2005.10.036
- Blanco, S., Dietmann, S., Flores, J. v, Hussain, S., Kutter, C., Humphreys, P., Lukk, M., Lombard, P., Treps, L., Popis, M., Kellner, S., Hölter, S. M., Garrett, L., Wurst, W., Becker, L., Klopstock, T., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Angelis, M. H. de, ... Frye, M. (2014). Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neuro-developmental disorders. *The EMBO Journal*, 33(18), 2020–2039. doi: 10.15252/EMBJ.201489282
- Boskovic, A., Bing, X. Y., Kaymak, E., & Rando, O. J. (2020). Control of noncoding RNA production and histone levels by a 5' tRNA fragment. *Genes & Development*, 34(1–2), 118–131. doi: 10.1101/GAD.332783.119/-/DC1
- Brostrom, C. O., & Brostrom, M. A. (1997). Regulation of Translational Initiation during Cellular Responses to Stress. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 58(C), 79–125. doi: 10.1016/S0079-6603(08)60034-3
- Chen, Q., Yan, M., Cao, Z., Li, X., Zhang, Y., Shi, J., Feng, G. H., Peng, H., Zhang, X., Zhang, Y., Qian, J., Duan, E., Zhai, Q., & Zhou, Q. (2016). Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6271), 397–400. doi: 10.1126/SCIENCE.AAD7977
- Chen, Z., Qi, M., Shen, B., Luo, G., Wu, Y., Li, J., Lu, Z., Zheng, Z., Dai, Q., & Wang, H. (2019). Transfer RNA demethylase ALKBH3 promotes cancer progression via induction of tRNA-derived small RNAs. *Nucleic Acids Research*, 47(5), 2533–2545. doi: 10.1093/NAR/GKY1250
- Cole, C., Sobala, A., Lu, C., Thatcher, S. R., Bowman, A., Brown, J. W. S., Green, P. J., Barton, G. J., & Hutvagner, G. (2009). Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *RNA*, 15(12), 2147–2160. doi: 10.1261/RNA.1738409
- Debrah M. Thompson and Roy Parker. (2009). Report The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200811119
- Dhahbi, J. M., Spindler, S. R., Atamna, H., Yamakawa, A., Boffelli, D., Mote, P., & Martin, D. I. K. (2013). 5' tRNA halves are present as abundant complexes in serum, concentrated in blood cells, and modulated by aging and calorie restriction. *BMC Genomics*, 14(1), 1–14. doi: 10.1186/1471-2164-14-298/TABLES/3
- Donovan, J., Rath, S., Kolet-Mandrikov, D., & Korennykh, A. (2017). Rapid RNase L-driven arrest of protein synthesis in the dsRNA response without degradation of translation machinery. *RNA*. doi: 10.1261/rna
- Droogmans, L., Roovers, M., Bujnicki, J. M., Tricot, C., Hartsch, T., Stalon, V., & Grosjean, H. (2003). Cloning and characterization of tRNA (m<sup>1</sup>A58) methyltransferase (Trm1) from *Thermus thermophilus* HB27, a protein required for cell growth at extreme temperatures. *Nucleic Acids Research*, 31(8), 2148–2156. doi: 10.1093/nar/gkg314

- Dubrovsky, E. B., Dubrovskaya, V. A., Levinger, L., Schiffer, S., & Marchfelder, A. (2004). Drosophila Rnase Z processes mitochondrial and nuclear pre-tRNA 3' ends in vivo. *Nucleic Acids Research*, 32(1), 255–262. doi: 10.1093/nar/gkh182
- Ernest Borek;, B. S. Baliga;, Charles W. Gehrke;, C. W. Kuo;, Sidney Belman;, Walter Troll;, & T. Phillip Waalkes. (1977). High Turnover Rate of Transfer RNA in Tumor Tissue Cancer Research | American Association for Cancer Research. *Cancer Res*, 37(9). Retrieved from <https://aacrjournals.org/cancerres/article/37/9/3362/482466/High-Turnover-Rate-of-Transfer-RNA-in-Tumor>
- Fazio, A. di, Schlackow, M., Pong, S. K., Alagia, A., & Gullerova, M. (2022). Dicer dependent tRNA derived small RNAs promote nascent RNA silencing. *Nucleic Acids Research*, 50(3), 1734–1752. doi: 10.1093/nar/gkac022
- Fricker, R., Brogli, R., Luidalepp, H., Wyss, L., Fasnacht, M., Joss, O., Zywicki, M., Helm, M., Schneider, A., Cristodero, M., & Polacek, N. (2019). A tRNA half modulates translation as stress response in *Trypanosoma brucei*. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–12. doi: 10.1038/s41467-018-07949-6
- Fu, H., Feng, J., Liu, Q., Sun, F., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z., Zheng, X., & Kutay, U. (2008). Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. doi: 10.1016/j.febslet.2008.12.043
- Gebetsberger, J., Wyss, L., Mleczko, A. M., Reuther, J., & Polacek, N. (2017). A tRNA-derived fragment competes with mRNA for ribosome binding and regulates translation during stress. *RNA Biology*, 14(10), 1364–1373. doi: 10.1080/15476286.2016.1257470/SUPPL\_FILE/KRNB\_A\_1257470\_SM2847.DOCX
- Gebetsberger, J., Zywicki, M., Künzi, A., & Polacek, N. (2012). tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii*. *Archaea*, 2012. doi: 10.1155/2012/260909
- Godoy, P. M., Bhakta, N. R., Barczak, A. J., Cakmak, H., Fisher, S., MacKenzie, T. C., Patel, T., Price, R. W., Smith, J. F., Woodruff, P. G., & Erle, D. J. (2018). Large Differences in Small RNA Composition Between Human Biofluids. *Cell Reports*, 25(5), 1346–1358. doi: 10.1016/J.CELREP.2018.10.014
- Goodarzi, H., Liu, X., Nguyen, H. C. B., Zhang, S., Fish, L., & Tavazoie, S. F. (2015). Endogenous tRNA-derived fragments suppress breast cancer progression via YBX1 displacement. *Cell*, 161(4), 790–802. doi: 10.1016/J.CELL.2015.02.053
- Gudipati, R. K., Xu, Z., Lebreton, A., Séraphin, B., Steinmetz, L. M., Jacquier, A., & Libri, D. (2012). Extensive Degradation of RNA Precursors by the Exosome in Wild-Type Cells. *Molecular Cell*, 48(3), 409–421. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2012.08.018
- Guzzi, N., Cieśła, M., Ngoc, P. C. T., Lang, S., Arora, S., Dimitriou, M., Pimková, K., Sommarin, M. N. E., Munita, R., Lubas, M., Lim, Y., Okuyama, K., Soneji, S., Karlsson, G., Hansson, J., Jönsson, G., Lund, A. H., Sigvardsson, M., Hellström-Lindberg, E., ... Bellodi, C. (2018). Pseudouridylation of tRNA-Derived Fragments Steers Translational Control in Stem Cells. *Cell*, 173(5), 1204–1216.e26. doi: 10.1016/J.CELL.2018.03.008
- H C Crick. (1958). On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol*, 12, 138–163.
- \*Haussecker, D., Huang, Y., Lau, A., Parameswaran, P., Fire, A. Z., & Kay, M. A. (2010). Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA*, 16(4), 673–695. doi: 10.1261/RNA.2000810

- He, X., Li, F., Bor, B., Koyano, K., Cen, L., Xiao, X., Shi, W., & Wong, D. T. W. (2018). Human tRNA-Derived Small RNAs Modulate Host–Oral Microbial Interactions. *Journal of Dental Research*, *97*(11), 1236–1243. doi: 10.1177/0022034518770605
- Hsieh, L. C., Lin, S. I., Shih, A. C. C., Chen, J. W., Lin, W. Y., Tseng, C. Y., Li, W. H., & Chiou, T. J. (2009). Uncovering Small RNA-Mediated Responses to Phosphate Deficiency in Arabidopsis by Deep Sequencing. *Plant Physiology*, *151*(4), 2120–2132. doi: 10.1104/PP.109.147280
- Ivanov, P., Emara, M. M., Villen, J., Gygi, S. P., & Anderson, P. (2011). Angiogenin-Induced tRNA Fragments Inhibit Translation Initiation. *Molecular Cell*, *43*(4), 613–623. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2011.06.022
- Kadaba, S., Krueger, A., Trice, T., Krecic, A. M., Hinnebusch, A. G., & Anderson, J. (2004). Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNAMet in *S. cerevisiae*. *Genes & Development*, *18*(11), 1227–1240. doi: 10.1101/GAD.1183804
- Kadaba, S., Wang, X., & Anderson, J. T. (2006). Nuclear RNA surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*: Trf4p-dependent polyadenylation of nascent hypomethylated tRNA and an aberrant form of 5S rRNA. *RNA*, *12*(3), 508–521. doi: 10.1261/RNA.2305406
- Kim, H. K., Fuchs, G., Wang, S., Wei, W., Zhang, Y., Park, H., Roy-Chaudhuri, B., Li, P., Xu, J., Chu, K., Zhang, F., Chua, M. S., So, S., Zhang, Q. C., Sarnow, P., & Kay, M. A. (2017). A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis. *Nature*, *552*(7683), 57–62. doi: 10.1038/nature25005
- Krishna, S., Yim, D. G., Lakshmanan, V., Tirumalai, V., Koh, J. L., Park, J. E., Cheong, J. K., Low, J. L., Lim, M. J., Sze, S. K., Shivaprasad, P., Gulyani, A., Raghavan, S., Palakodeti, D., & DasGupta, R. (2019). Dynamic expression of tRNA-derived small RNAs define cellular states. *EMBO Reports*, *20*(7). doi: 10.15252/EMBR.201947789
- Kumar, P., Anaya, J., Mudunuri, S. B., & Dutta, A. (2014). Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets. *BMC Medicine*, *12*(1). doi: 10.1186/s12915-014-0078-0
- Kuscu, C., Kumar, P., Kiran, M., Su, Z., Malik, A., & Dutta, A. (2018). tRNA fragments (tRFs) guide Ago to regulate gene expression post-transcriptionally in a Dicer-independent manner. *RNA*, *24*(8), 1093–1105. doi: 10.1261/RNA.066126.118
- Lee, S. R., & Collins, K. (2005). Starvation-induced cleavage of the tRNA anticodon loop in *Tetrahymena thermophila*. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(52), 42744–42749. doi: 10.1074/JBC.M510356200
- Lee, Y. S., Shibata, Y., Malhotra, A., & Dutta, A. (2009). A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes & Development*, *23*(22), 2639–2649. doi: 10.1101/GAD.1837609
- Levitz, R., Chapman, D., Amitsur, M., Green, R., Snyder, L., & Kaufmann, G. (1990). The optional *E. coli* prr locus encodes a latent form of phage T4-induced anticodon nuclease. *The EMBO Journal*, *9*(5), 1383–1389. doi: 10.1002/J.1460-2075.1990.TB08253.X
- Liu, F., Clark, W., Luo, G., Wang, X., Fu, Y., Wei, J., Wang, X., Hao, Z., Dai, Q., Zheng, G., Ma, H., Han, D., Evans, M., Klungland, A., Pan, T., & He, C. (2016). ALKBH1-Mediated tRNA Demethylation Regulates Translation. *Cell*, *167*(3), 816–828.e16. doi: 10.1016/J.CELL.2016.09.038

- Luo, S., He, F., Luo, J., Dou, S., Wang, Y., Guo, A., & Lu, J. (2018). Drosophila tsRNAs preferentially suppress general translation machinery via antisense pairing and participate in cellular starvation response. *Nucleic Acids Research*, *46*(10), 5250–5268. doi: 10.1093/NAR/GKY189
- Macfarlan, T. S., Gifford, W. D., Driscoll, S., Lettieri, K., Rowe, H. M., Bonanomi, D., Firth, A., Singer, O., Trono, D., & Pfaff, S. L. (2012). Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature* *2012 487:7405*, *487*(7405), 57–63. doi: 10.1038/nature11244
- Martinez, G., Choudury, S. G., & Slotkin, R. K. (2017). tRNA-derived small RNAs target transposable element transcripts. *Nucleic Acids Research*, *45*(9), 5142–5152. doi: 10.1093/nar/gkx103
- Maute, R. L., Schneider, C., Sumazin, P., Holmes, A., Califano, A., Basso, K., & Dalla-Favera, R. (2013). tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(4), 1404–1409. doi: 10.1073/PNAS.1206761110
- Nowacka, M., Strozycycki, P. M., Jackowiak, P., Hojka-Osinska, A., Szymanski, M., & Figlerowicz, M. (2013). Identification of stable, high copy number, medium-sized RNA degradation intermediates that accumulate in plants under non-stress conditions. *Plant Molecular Biology*, *83*(3), 191–204. doi: 10.1007/S11103-013-0079-3
- \*Pereira, M., Francisco, S., Varanda, A. S., Santos, M., Santos, M. A. S., & Soares, A. R. (2018). Impact of tRNA Modifications and tRNA-Modifying Enzymes on Proteostasis and Human Disease. *International Journal of Molecular Sciences* *2018, Vol. 19, Page 3738*, *19*(12), 3738. doi: 10.3390/IJMS19123738
- \*Prats-Ejarque, G., Lu, L., Salazar, V. A., Moussaoui, M., Boix, E., Ilinskaya, O. N., Malhotra, A., Alexandrovich Mitkevich, V., & Boix EsterBoix, E. (2019). *Evolutionary Trends in RNA Base Selectivity Within the RNase A Superfamily*. *10*. doi: 10.3389/fphar.2019.01170
- Rashad, S., Han, X., Sato, K., Mishima, E., Abe, T., Tominaga, T., & Niizuma, K. (2020). The stress specific impact of ALKBH1 on tRNA cleavage and tiRNA generation. *RNA Biology*, *17*(8), 1092–1103. doi: 10.1080/15476286.2020.1779492
- Ren, B., Wang, X., Duan, J., & Ma, J. (2019). Rhizobial tRNA-derived small RNAs are signal molecules regulating plant nodulation. *Science*, *365*(6456), 919–922. doi: 10.1126/SCIENCE.AAV8907
- Rouge, T. B., Furu, K., Skotheim, R. I., Haugen, T. B., Grotmol, T., & Enerly, E. (2015). Profiling of the small RNA populations in human testicular germ cell tumors shows global loss of piRNAs. *Molecular Cancer*, *14*(1), 1–13. doi: 10.1186/S12943-015-0411-4/FIGURES/5
- Schaefer, M., Pollex, T., Hanna, K., Tuorto, F., Meusburger, M., Helm, M., & Lyko, F. (2010). RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes & Development*, *24*(15), 1590–1595. doi: 10.1101/GAD.586710
- Sharma, U., Conine, C. C., Shea, J. M., Boskovic, A., Derr, A. G., Bing, X. Y., Belleannee, C., Kucukural, A., Serra, R. W., Sun, F., Song, L., Carone, B. R., Ricci, E. P., Li, X. Z., Fauquier, L., Moore, M. J., Sullivan, R., Mello, C. C., Garber, M., & Rando, O. J. (2016). Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science*, *351*(6271), 391–396. doi: 10.1126/SCIENCE.AAD6780/SUPPL\_FILE/SHARMA.SM.PDF
- Soares, A. R., Fernandes, N., Reverendo, M., Araújo, H. R., Oliveira, J. L., Moura, G. M. R., & Santos, M. A. S. (2015). Conserved and highly expressed tRNA derived fragments in zebrafish. *BMC Molecular Biology*, *16*(1), 1–16. doi: 10.1186/S12867-015-0050-8/FIGURES/7

- Su, Z., Kuscus, C., Malik, A., Shibata, E., & Dutta, A. (2019). Angiogenin generates specific stress-induced tRNA halves and is not involved in tRF-3-mediated gene silencing. *Journal of Biological Chemistry*, 294(45), 16930–16941. doi: 10.1074/JBC.RA119.009272
- Su, Z., Monshaugen, I., Wilson, B., Wang, F., Klungland, A., Ougland, R., & Dutta, A. (2022). TRMT6/61A-dependent base methylation of tRNA-derived fragments regulates gene-silencing activity and the unfolded protein response in bladder cancer. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–17. doi: 10.1038/s41467-022-29790-8
- Thompson, D. M., Lu, C., Green, P. J., & Parker, R. (2008). tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *RNA*, 14(10), 2095–2103. doi: 10.1261/RNA.1232808
- Torres, A. G., Reina, O., Attolini, C. S. O., & de Pouplana, L. R. (2019). Differential expression of human tRNA genes drives the abundance of tRNA-derived fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(17), 8451–8456. doi: 10.1073/PNAS.1821120116/SUPPL\_FILE/PNAS.1821120116.SD03.XLSX
- Waldron, C., & Lacroute, F. (1975). Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. *Journal of Bacteriology*, 122(3), 855. doi: 10.1128/JB.122.3.855-865.1975
- Whipple, J. M., Lane, E. A., Chernyakov, I., D’Silva, S., & Phizicky, E. M. (2011). The yeast rapid tRNA decay pathway primarily monitors the structural integrity of the acceptor and T-stems of mature tRNA. *Genes & Development*, 25(11), 1173–1184. doi: 10.1101/GAD.2050711
- Wilusz, J. E., Whipple, J. M., Phizicky, E. M., & Sharp, P. A. (2011). tRNAs marked with CCACCA are targeted for degradation. *Science*, 334(6057), 817–821. doi: 10.1126/SCIENCE.1213671
- Yamasaki, S., & Ivanov, P. (2009). Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J. Cell Biol*, 185(1), 35–42. doi: 10.1083/jcb.200811106
- Yang, C., Lee, M., Song, G., & Lim, W. (2021). tRNALys-derived fragment alleviates cisplatin-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Pharmaceutics*, 13(1), 1–16. doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13010055
- \*Yu, X., Xie, Y., Zhang, S., Song, X., Xiao, B., & Yan, Z. (2020). tRNA-derived fragments: Mechanisms underlying their regulation of gene expression and potential applications as therapeutic targets in cancers and virus infections. *Theranostics*, 11(1), 461–469. doi: 10.7150/THNO.51963
- Zhang, S., Sun, L., & Kragler, F. (2009). The Phloem-Delivered RNA Pool Contains Small Noncoding RNAs and Interferes with Translation. *Plant Physiology*, 150(1), 378–387. doi: 10.1104/PP.108.134767
- Zhang, Y., Zhang, X., Shi, J., Tuorto, F., Li, X., Liu, Y., Liebers, R., Zhang, L., Qu, Y., Qian, J., Pahima, M., Liu, Y., Yan, M., Cao, Z., Lei, X., Cao, Y., Peng, H., Liu, S., Wang, Y., ... Chen, Q. (2018). Dnmt2 mediates intergenerational transmission of paternally acquired metabolic disorders through sperm small non-coding RNAs. *Nature Cell Biology* 2018 20:5, 20(5), 535–540. doi: 10.1038/s41556-018-0087-2