

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PEQUENOS RNAs
DERIVADOS DE tRNAs (tRFs) EM PLANTAS**

Orientados: Prof. Fábio Tebaldi Silveira Nogueira PhD

Co-orientadora: Cristiane de Santis Alves

Aluno: Vitor Favaretto Pinoti

BOTUCATU

SÃO PAULO- BRASIL

2012

VITOR FAVARETTO PINOTI

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PEQUENOS RNAs
DERIVADOS DE tRNAs (tRFs) EM PLANTAS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de biociências da
Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”
Campus de Botucatu como parte das exigências
do curso de Ciências Biológicas, para obtenção
de título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientados: Prof. Fábio Tebaldi Silveira Nogueira PhD

Co-orientadora: Cristiane de Santis Alves

BOTUCATU

SÃO PAULO- BRASIL

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Pinoti, Vitor Favaretto.

Análise da expressão gênica de pequenos RNAs derivados de tRNAs (tRFs) em plantas / Vitor Favaretto Pinoti – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fábio Tebaldi Silveira Nogueira

Capes: 20303025

1. Genética – Expressão. 2. Ácido ribonucleico. 3. Enzimas. 4. Biologia molecular. 5. Genética molecular.

Palavras-chave: Dicer; Estresse; Expressão; sRNA; tRNA.

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de Iniciação científica.

Ao Laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal, pela realização do trabalho.

À minha família, meus pais Welington e Kristina e as minhas irmãs Débora e Carolina, pelo apoio incondicional durante todo o meu curso de graduação.

Ao meu avô Oswaldo (*in memoriam*) que sempre foi e será um exemplo de pessoa para mim.

Ao meu orientador, professor dr. Fábio Tebaldi Silveira Nogueira por todos os ensinamentos e ao tempo despendido na minha orientação.

Aos colegas de trabalho Cristiane, Èder e Gicela pelos conselhos e ajuda durante toda minha passagem pelo laboratório.

Ao meu amigo Edward Strini por me mostrar a biologia molecular e o quão incrível esta área da biologia pode ser.

Aos meus amigos Jordano, Marco Aurélio, Gustavo e Bruno pelo apoio durante todos esses anos, pela incrível amizade e momentos inesquecíveis.

À Deus por ter posto em minha vida todas essas pessoas e pelos momentos em que passei com elas.

MUITO OBRIGADO

“Não importa o quão estreito seja o portão,

Quão repleta de castigos seja a sentença,

Eu sou o dono do meu destino

Eu sou o capitão de minha alma.”

William Ernst Henley

RESUMO

Pequenos RNAs não codificadores emergiram como importantes personagens em diversos aspectos da biologia. Os mais estudados entre eles são os microRNAs (miRNAs) e short interfering RNAs (siRNAs), que regulam a expressão do gene alvo pós-transcricionalmente em plantas e animais e intermediários na via de RNAi, respectivamente. Ambas as classes possuem biogêneses semelhantes, sendo processadas pelas enzimas Dicer e subseqüente associação com as enzimas Argonautas. Em plantas, miRNAs e siRNAs possuem importantes funções no desenvolvimento, integridade do genoma e em respostas a estresses bióticos e abióticos.

Com os avanços nas tecnologias de seqüenciamento em larga escala e análises *in silico*, novas classes de pequenos RNAs não codificadores vem sendo descobertas, muitas delas ainda com biogênese e funções indefinidas.

Pequenos RNAs derivados de tRNA (tRFs) são uma classe de pequenos RNAs não codificadores, que tem como precursores um molécula de tRNA. Estes foram descobertos na década passada em vários organismos e, recentemente, em plantas. Estudos recentes detectaram tRFs de diferentes tamanhos, com origens em diferentes porções da molécula do tRNA maduro (terminação 5'; terminação 3'; anti-códon loop) e alguns originados do precursor do tRNA (pré-tRNA), sugerindo que esta pode ser uma nova classe de pequenos RNAs e não apenas produtos de degradações aleatórias.

Estudos em humanos mostraram que alguns tRFs são processados pelas enzimas Dicer, possuem associação com as enzimas Argonautas e funções relacionadas diferenciação celular, ao surgimento de tumores e ao silenciamento gênico. Estudos em *arabidopsis* e em abóbora (*Cucurbita maxima*) mostraram, respectivamente, que os tRFs possuem possível resposta à stress nutricional e função de sinal a longa distância entre tecidos fonte e dreno, podendo também afetarem a tradução.

A biogênese dos tRFs em plantas é, até o momento uma incógnita, não havendo nenhuma informação na literatura e sua(s) possível(is) função(ões) biológica(s) ainda foram pouco estudadas, tornando estes um interessante alvo de estudo dentre os pequenos RNAs não codificadores em plantas.

ABSTRACT

Small non coding RNAs emerged as important characters in several biology aspects. Among them, the most studied are microRNAs (miRNAs) and short interfering RNAs (siRNAs), that regulate their target gene post-transcriptionally in plants, animals and RNAi pathway intermediates, respectively. Both of classes have similar biogenesis being processed by Dicer enzymes and subsequent association with Argonaute enzymes. In plants, miRNAs and siRNAs have important functions in development, genome integrity and biotic and abiotic stress responses.

The advances in high-throughput sequencing and in silico analysis provide the uncover of new small non coding RNAs classes, many of them with unknown functions and biogenesis.

tRNA derived small RNAs (tRFs) are a small non coding RNA class, that have as precursor a tRNA molecule. These were uncovered in the last decade in many organisms and, recently, in plants. Recent works detected tRFs from different sizes, with different source portions of the mature tRNA molecule (5' end; 3' end, anti-codon loop) and some from the tRNA precursor (pre-tRNA), suggesting that may be a novel class of small RNA and not random degradation products.

Works in humans showed that some tRFs are processed by the Dicer enzymes, have association with the Argonaute enzymes and cell differentiation, tumor appearance and gene silencing related functions. Works in Arabidopsis and pumpkin (*Cucurbita maxima*) showed, respectively, that the tRFs have nutritional stress response possible functions and long distance signaling function between source and drain tissues, and may affect the translation.

The tRFs biogenesis in plants are, until now an unknown, absence information about it in the literature and its possible biological functions are few studied yet, making then interesting target for studies among the small non coding RNAs in plants.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. Biogênese miRNAs siRNAs em plantas e animais.....	12
2.2. O mecanismo de tradução.....	16
2.3. Biogênese, degradação, dinâmica e papel biológico de tRNAs.....	18
2.4. Pequenos RNAs derivados de tRNAs (tRFs).....	20
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Método de análise.....	27
4.2. Bibliotecas de sRNAs utilizadas.....	28
4.3. Banco de tRNAs utilizado.....	30
5. RESULTADOS.....	31
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÃO.....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

Pequenos RNAs não codantes emergiram como moléculas chave na regulação de vários processos biológicos. Em plantas, microRNAs (miRNAs) e *short-interfering* RNAs (siRNAs) representam a grande maioria da população de pequenos RNAs não codantes. Estes são processados pelas enzimas DICER-LIKE (DCL1) e interagem com as enzimas Argonautas (AGO), efetuando o silenciamento gênico (Bartel, 2004).

As DCLs são ribonucleases que clivam RNAs de fita-simples com estrutura do tipo hairpin ou RNAs de fita dupla, originando pequenos RNAs com tamanho variável de 18 a 25 nucleotídeos. Em *Arabidopsis thaliana* foram descritas quatro DCLs (DCL1-4), sendo que cada enzima, é capaz de gerar uma classe distinta de pequenos RNAs. No entanto, pode haver redundância na ação dessas enzimas (Ramachandran & Chen, 2008; Gascioli et al., 2005). A enzima DCL1 é requerida para biogênese de miRNAs (Kurihara & Watanabe, 2004). A enzima DCL2 gera siRNAs de origem viral e siRNAs anti-senso endógenos (nati-siRNAs) (Xie et al., 2004; Borsani et al., 2005). A enzima DCL3 forma siRNAs de 21 a 22 nucleotídeos, oriundos de elementos transponíveis, sequências repetitivas do genoma e regiões heterocromáticas (Xie et al., 2004). A biogênese dessa classe de siRNAs requer a enzima RNA polimerase 2 dependente de RNA (RdR2) (Ramachandran e Chen, 2008). A enzima DCL4 é necessária para a biogênese de trans-acting siRNAs (ta-siRNAs) e de alguns miRNAs (Gascioli et al., 2005).

As AGOs são enzimas, que clivam alvos de RNAs fita-simples na região complementar ao pequeno RNA nela incorporado. Em *Arabidopsis thaliana* foram descritas 10 AGOs (Vaucheret, 2008). A enzima AGO1 atua na via de RNAi, ligando-se a miRNAs e siRNAs (Vaucheret et al., 2004). A enzima AGO10 é a paróloga mais próxima da AGO1. Acredita-se que atue na mesma via de RNAi, em alguns tecidos (Vaucheret, 2008). A enzima AGO5 é a segunda paróloga mais próxima da AGO1 e até o momento, nenhuma relevância biológica foi atribuída a ela (Takeda et al., 2008). A enzima AGO7 se associa preferencialmente à miRNAs, que guiam a clivagem depre-

cursores dos pequenos RNAs do tipo ta-siRNAs. A enzima AGO6 interage com siRNAs de regiões heterocromáticas e sua atividade é parcialmente redundante à da enzima AGO4, que se associa a siRNAs oriundos de sequências repetitivas do genoma, elementos transponíveis e heterocromatina (Montgomery et al., 2008; Vaucheret, 2008). As enzimas AGO2, AGO3, AGO8 e AGO9 ainda não tiveram suas funções biológicas elucidadas (Lobbes et al., 2006; Takeda et al., 2008). As novas tecnologias de sequenciamento permitem a identificação de novas classes de pequenos RNAs (Hsieh et al., 2009).

Análises de bioinformática mais detalhadas começaram a revelar uma nova classes de pequenos RNAs, fragmentos de 19 nucleotídeos derivados de RNA transpostadores (tRNAs). Tais fragmentos foram denominados *tRNA-derived fragments* ou tRFs (Röther & Meinster, 2011). Os RNAs transportadores (tRNAs) possuem papel central na produção de proteínas, atuando como um adaptador entre o RNA mensageiro (mRNA) e os aminiácidos (Hopper & Phizichy, 2010). Interessantemente, a geração de pequenos RNAs derivados de tRNAs ou tRFs tem sido observada em diversos organismos em situação de estresse, ocorrendo também a níveis basais na ausência de qualquer estresse (Lee & Collins, 2005, Thompson et al., 2008). Trabalhos em mamíferos e plantas identificaram, através de sequenciamento em larga escala, populações de tRFs com tamanho variando entre 17 a 68 nucleotídeos, oriundos de diferentes regiões do tRNA maduro e do pre-tRNA com clivagem específica (Pederson, 2010, Hsieh et al, 2009, Zhang et al., 2009). Em células de carcinoma de próstata, por exemplo, foram identificados tRFs com tamanho que variam de 17 a 26 nucleotídeos (nt), derivados do loop D, loop T e da extremidade 3' do pre-tRNA e foi demonstrado que o tRF-1001, um fragmento derivado da extremidade 3' do precursor do tRNA Ser-TGA, é requerido para a proliferação celular e que seu processamento é dependente da enzima RNase Z (Lee et al., 2009). Estudo com linhagens de células humanas mostraram, que tRFs oriundos do loop T, loop D do tRNA maduro são processados pela enzima Dicer e que possuem interação com as enzimas Argonautas, sugerindo que estes tipos de tRFs possam atuar na via de RNAi. Surpreendentemente, também foi observado

que, os tRFs podem competir com miRNAs e siRNAs pelas enzimas Argonata, diminuindo significativamente a atividade de silenciamento destes pequenos RNAs (Haussecker et al., 2010; Cole et al., 2009).

Em plantas de *arabidopsis* crescendo sob deprivação de fosfato foram encontrados tRFs em tecido radicular e parte aérea. Estudos mais detalhados mostraram um acúmulo diferencial entre os tecidos analisados (Hsieh et al., 2009). Em estudos com abóboras, foram identificados tRFs na seiva floemática, demonstrando que os mesmos podem, efetivamente, inibir a síntese protéica. Este trabalho sugere que os tRFs possam atuar como moléculas de sinalização a longa distância entre os tecidos fonte e dreno (Zhang et al., 2009). Todos estes dados indicam que os tRFs ocorrem a partir de um processo de clivagem específica e podem revelar a existência de uma nova classe de pequenos RNAs, com processamento e funções específicas (Hsieh et al., 2009). No entanto, a biogênese dessa nova classe de pequenos RNAs em plantas é ainda desconhecida. Nosso grupo também identificou vários tRFs expressos em tecidos foliares de cana-de-açúcar, via geração e sequenciamento de bibliotecas de pequenos RNAs (processo FAPESP no.2007/58289-5). Estamos gerando um banco de dados contendo todos os tRFs advindos de tRNAs conservados entre cana-de-açúcar e *arabidopsis*.

Elucidar a biogênese desta nova classe de pequenos RNAs em plantas, através da busca de enzimas responsáveis pelo seu processamento, proporcionará um maior entendimento sobre uma possível via de regulação gênica e metabólica de resposta a estresses bem como as funções específicas dos tRFs, gerando grandes contribuições científicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Biogênese de microRNAs (miRNAs) e short-interfering RNAs (siRNAs) em plantas e animais

MiRNAs são sRNAs endógenos de 20-24 nucleotídeos (nt), produzidos a partir de um RNA precursor longo fita-simples, com estrutura secundária de “hairpin” contendo um *stem-loop* imperfeito. Estes são processados pelas enzimas RNase III e incorporados a membros da família de proteínas Argonanauta (AGO), promovendo o mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (Bartel, 2004).

Descritos primeiramente como reguladores do desenvolvimento em *Caenorhabditis elegans* e depois encontrados universalmente em quase todos os eucariotos (Reinhart *et al.*, 2000; Llave *et al.*, 2002), os miRNAs apesar de serem conservados evolutivamente entre plantas e animais, apresentam diferenças substanciais entre as duas linhagens com relação aos mecanismos de biogênese e de regulação de seus alvos. Em animais, foram descritos três tipos de miRNAs, miRNAs canônicos, miRNAs intrônicos canônicos e miRNAs intrônicos não-canônicos, cada um possuindo um tipo específico de processamento.

MiRNAs canônicos possuem suas próprias unidades transcricionais, denominadas genes MIR, localizados em regiões intergênicas. Genes MIR são transcritos pela RNA polimerase II (PolII) gerando um transcrito primário (pri-miRNA). O passo inicial do processamento é mediado pelo complexo microprocessador, formado pelas proteínas Drosha e DGCR8, uma RNaseIII e uma proteína de ligação à RNA dupla-fita, respectivamente. O complexo irá clivar o pri-miRNA, removendo a cauda poliA e o cap 5', a molécula resultante é denominada pre-miRNA, que é transportada para o citoplasma pelo fator de exportação exportin 5 (EXP5). No citoplasma, a enzima Dicer, também uma RNase III, cliva o pre-miRNA, removendo

gerando um duplex imperfeito contendo as fitas de miRNA maduro e miRNA*, que possui dois nt ressaltados nas extremidades 3' de cada fita (Lim *et al.*, 2003). Por fim, a fita de miRNA* é degradada e a fita de miRNA maduro é incorporada as proteínas AGO (Liu *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009).

MiRNAs intronicos canônicos estão localizados em introns de genes codificadores de proteínas e seu processamento ocorre anteriormente ao *splicing* do mRNA. A maquinaria de *splicing* agrega os introns enquanto o complexo microprocessador cliva o precursor *hairpin*, gerando o pre-miRNA, que entra na via de miRNAs canônicos a partir deste ponto, enquanto que o resto do transcrito sofre o *splicing* típico de precursores de mRNA (pre-mRNA) originando o mRNA maduro para a síntese protéica. MiRNAs intronicos não-canônicos, denominados mirtrons, são originados diretamente do mecanismo de *splicing* e desramificação, não sendo dependentes da clivagem do complexo microprocessador, devido ao tamanho reduzido dos introns em que estão contidos, que se assemelham a pre-miRNAs. Alguns mirtrons possuem caudas em suas extremidades 3' ou 5' e necessitam ser aparados antes do transporte para o citoplasma e a entrada na via de miRNAs canônicos (Kim *et al.*, 2009).

Em animais, a maioria dos miRNAs realizam o PTGS prevenindo a tradução do mRNA alvo por um processo que não envolve clivagem, conduzindo a desestabilização do mRNA ou seu sequestro em corpos citoplasmáticos especializados. Este tipo de mecanismo ocorre devido a complementaridade reduzida entre o miRNA e a região de anelamento ao mRNA alvo, sendo que os miRNAs de animais que efetuam esse tipo de mecanismo possuem complementariedade restrita a região 3' UTR do mRNA alvo (Lewis *et al.*, 2003). Em contraste, os miRNAs de plantas se anelam, geralmente a região central do mRNA alvo e exibem elevada, se não total, complementariedade com seus alvos, regulando-os através de sua clivagem (Yekta *et al.*, 2004). Além de possuírem mecanismo de regulação de seus alvos diferencial, a maioria, se não todos os miRNAs de plantas localizam-se em regiões intergênicas e possuem suas próprias unidades transcricionais (Reinhart *et al.*, 2002). Porém, a grande diferença entre miRNAs dos dois reinos é vista em seus mecanismos de biogênese.

Em plantas, os genes MIR são transcritos pela Pol II gerando o pri-miRNA (Xie *et al.*, 2005), que em seguida é clivado pela enzima RNase III DICER-LIKE1 (DCL1), que possui a mesma atividade que a enzima Drosha (Kurihara *et al.*, 2004), originando o pre-miRNA. A seguir, ainda no núcleo, a DCL1 cliva o pre-miRNA liberando o duplex imperfeito contendo o miRNA maduro e miRNA* (Xie *et al.*, 2005). As enzimas HYNASTIC LEAVES1 (HYL1), também conhecida como DOUBLE-STRANDED RNA BINDING PROTEIN (DRB1) e SERRATE (SE), uma proteína de ligação a RNA dupla-fita e uma proteína zinc-finger C2H2, auxiliam a DCL1 no correto processamento do pri-miRNA até o duplex imperfeito. Estudos mostram que a DCL1 requer a presença da HYL1 e SE para assegurar a precisão de sua clivagem acima de 80% *in vitro* (Dong *et al.*, 2008). Após a série de clivagens, o duplex imperfeito tem suas extremidades 3' ressaltadas metiladas pela enzima HUA ENHANCER1 (HEN1) (Boute *et al.*, 2003), sendo transportado para o citoplasma pela HASTY (HST), um membro da família de transportadores nucleocitoplasmáticos importina β (Bollman *et al.*, 2003). No citoplasma, o miRNA maduro é incorporado as proteínas AGO1 ou AGO7, realizando a clivagem de seus respectivos alvos.

Quimicamente e funcionalmente similares a miRNAs, os siRNAs são sRNAs de 18-25 nt gerados a partir de um RNA precursor longo dupla-fita (dsRNA). Estes, assim como miRNAs, são processados pelas enzimas RNase III e também são incorporados as proteínas AGO, realizando o silenciamento gênico (Elbashir *et al.*, 2001). siRNAs foram descobertos primeiramente em plantas (Hamilton & Baulcombe 1999), e em *Arabidopsis*, representam a maioria da população de sRNAs (Llave *et al.*, 2002). Eles desempenham papel importante em vários processos biológicos, incluindo defesa contra vírus, estabelecimento da heterocromatina, silenciamento de elementos transponíveis e transgenes e PTGS (Baulcombe, 2004). Em plantas, uma grande diversidade de sRNAs foi descrita, cada uma com mecanismos de biogênese específicos.

Dentre as classes de siRNAs em plantas, os trans-acting siRNAs (ta-siRNAs), possuem, interessantemente, biogênese dependente da ação de miRNAs. ta-siRNAs são gerados a partir de precursores TAS, que codificam transcritos não-

codificadores de proteínas, que são alvos de miRNAs incorporados a AGO1 e AGO7 (Allen *et al.*, 2005). Os fragmentos gerados são estabilizados pela proteína SUPPRESSOR OF GENE SILENCING3 (SGS3) e convertidos em RNAs fita-dupla pela RNA polimerase dependente de RNA 6 (RDR6) (Peragine *et al.*, 2004). A enzima DCL4, em conjunto com a enzima DRB4, cliva o RNA fita-dupla gerando o duplex imperfeito, que é metilado pela HEN1 e transportado para o citoplasma pelo fator de exportação SDE5 (Gascioli *et al.*, 2005). No citoplasma o ta-siRNA, que possui 21 nt, é incorporado a AGO1 ou AGO7 e efetua a clivagem de seus alvos (Adenot *et al.*, 2006). Em contraste com outros siRNAs, que regulam o seu gene ou loci precursor, os ta-siRNAs atuam em trans, regulando outros genes (Hunter *et al.*, 2006).

No mecanismo de defesa contra vírus ou silenciamento de transgenes é observada uma biogênese de siRNAs parecida com a apresentada pelos ta-siRNAs. RNAs fita-dupla exógenos produzidos por RNAs virais ou transgenes é clivado pelas DCL4 ou DCL2, que são auxiliadas pela DRB4, dando início ao ciclo de silenciamento. Os siRNAs gerados são incorporados a AGO1, guiando a clivagem de mRNAs virais ou do transgene. Os fragmentos gerados são processados pelas proteínas SGS3 e RDR6, gerando novos dsRNAs, dando continuidade ao processo (Xie & Qi, 2009). Outra classe de siRNAs endógenos, que regula seus alvos pós-transcricionalmente são os natural cis-acting siRNAs (nat-siRNAs), diferentemente de ta-siRNAs, essa classe atua em cis, regulando seu gene precursor. Estes são gerados a partir de um loci com transcritos bidirecionais com regiões de sobreposição e sua biogênese é dependente das enzimas RNA Pol IV, RDR6, DCL1 e DCL2. Neste caso, apenas um dos transcritos que originaram o siRNA é clivado (Borsani *et al.*, 2005).

Além do mecanismo PTGS, algumas classes de siRNAs podem efetuar o silenciamento gênico transcricional (TGS), através da metilação de um loci alvo e a formação da heterocromatina. Essa classe de siRNAs é gerada a partir de regiões genômicas com sequências repetitivas e elementos transponíveis, que são inicialmente transcritos pela RNA Pol IV. Em seguida, a RDR2 converte o transcrito fita-simples em um dsRNA, que é processado pela DCL3. Os siRNAs gerados são incorporados a AGO4, AGO6 e AGO9, que direcionarão a metilação do loci precursor do siRNA

incorporado através da DNA metiltransferase DRM2 (Liu *et al.*, 2009). A metilação de alguns loci requer também a presença da Pol V e o fator remodelador de cromatina SWI2/SNF2-like DRD1. O padrão de metilação gerado por essa classe de siRNAs é mantida de forma independente através da metiltransferase MET1, a histona deacetilase HDA6 e o fator remodelador de cromatina SWI2/SNF2-like DDM1 (Malloty & Vaucheret., 2010).

2.2 O mecanismo de iniciação da tradução

A regulação gênica transcricional e pós-transcricional mediada por siRNAs e miRNAs, respectivamente, são exemplos dos múltiplos níveis em que a expressão de genes pode ser regulada. Outro exemplo é o processo de tradução, que é responsável pela síntese de proteínas na célula e se encontra dividido em quatro estágios: iniciação, alongação, terminação e reciclagem de ribossomos.

Em eucariotos, o estágio de iniciação do processo de tradução é composto por um conjunto de reações que ligam o códon iniciador AUG do mRNA no sítio de decodificador de peptídeo do ribossomo, via o pareamento de bases com o anti-códon do tRNA metionina iniciador (Met-tRNA_i). O processo é iniciado pela ativação do mRNA pela ligação do complexo eIF4F, formado pelos fatores de iniciação eucarióticos eIF4E, eIF4G e eIF4A, ao cap5' e a PABP (POLY(A) BINDING PROTEIN) a cauda poli(A), o que provoca a circularização do mRNA. Em seguida, o complexo de pré-iniciação (PIC) 43S, formado pela subunidade ribossomal 40S, eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5, e o complexo ternário, constituído pelo eIF2 α , GTP e o Met-tRNA_i, liga-se proximamente ao cap-5', este passo é facilitado pelas interações entre eIF3/eIF5 e eIF4G/eIF4B. Após sua ligação, o PIC 43S realiza uma busca na região 5'UTR pelo códon iniciador AUG em uma reação dependente de ATP, através da hidrólise parcial da molécula eIF2-GTP no complexo ternário para eIF2-GDP-Pi. O reconhecimento do códon AUG desencadeia a dissociação do eIF1 da subunidade 40S, que permite a

liberação do Pi e eIF2-GDP. O próximo passo consiste na junção da subunidade ribossomal 60S ao complexo, que com a liberação de outros eIFs, é catalizada pela hidrólise da molécula eIF5B-GTP, esta reação desencadeia a liberação do eIF5B-GDP e eIF1A, originando o complexo de iniciação 80S, que dará continuidade ao processo de tradução (Pestova *et al.*, 2007).

Em procariotos, o estágio de iniciação difere fundamentalmente com relação ao mecanismo de busca pelo códon iniciador AUG. O mecanismo é mediado pelo pareamento de bases das sequências Shine-Dalgarno (SD), localizadas a jusante do códon iniciador AUG, com a subunidade ribossomal 16S. Em seguida, a subunidade ribossomal 16S recruta a subunidade ribossomal 30S, que em conjunto com os fatores de iniciação IF-1, IF-2, e o tRNA iniciador N-formilmetionina (fMet-tRNA_i), forma o complexo de iniciação 30S. O passo seguinte consiste na ligação da subunidade ribossomal 50S, catalizada pela hidrólise da molécula de GTP ligada ao IF-2, desencadeando a liberação do IF-1, IF-2, GDP e Pi, resultando na formação do complexo de iniciação 70S, que dará continuidade ao processo de tradução (Antoum *et al.*, 2006).

Outra possível via de iniciação do processo de tradução é realizada por mRNAs eucarióticos desprovidos de cap-5', denominada via de iniciação interna. Nesta esse subconjunto de mRNAs procura por sequências especializadas, denominadas sítios de entrada internos do ribossomo (IRES), que recrutam o PIC para o códon iniciador de maneira parecida ao que as sequências SD. Esta via é comumente usada por RNAs virais, pois permite que o processo de tradução continue quando eIFs estão inibidos nas células infectadas (Schuler *et al.*, 2006).

Dentre os quatro estágios do processo de tradução, o estágio de iniciação é o que mais sofre regulações. Em situações de estresse por privação nutricional a montagem do PIC 43S é inibida pela proteína kinase Gen2, que fosforila o aminoácido Ser51 da subunidade α do eIF2, convertendo a molécula eIF2-GDP em um inibidor competitivo da subunidade 5 do fator de troca de guanina (GEF), o que reduz a formação do TC (Gomez *et al.*, 2002).

Outro mecanismo usado para controlar a iniciação da tradução envolve o processo de reconhecimento do cap-5' pelo eIF4F. A interação entre eIF4G e eIF4E presentes no complexo eIF4F é prejudicada pelo eIF4E homólogo, 4E-HP. Este homólogo é um membro da família de proteínas, denominadas proteínas de ligação a eIF4E (4E-BPs) que competem com eIF4G por sítios de ligação no eIF4E, o que não inibe a via de tradução dependente dos IRES, uma vez que esta não necessita do processo de reconhecimento a cap-5'. As 4E-BPs são forforiladas pela kinase mTOR, envolvida na via de sinalização PI3/Akt que integra estímulos extracelulares, disponibilidade de aminoácidos e nível de energia na célula (Sonenberg & Hinnebusch, 2002).

2.3 Biogênese, degradação, dinâmica e papel biológico de tRNAs

tRNAs possuem papel central na biologia como adaptadores entre mRNAs e proteínas, em que o anti-códon interage com o códon do mRNA em uma das extremidades do tRNA em sua estrutura terciária em forma de L, permitindo que um aminoácido anexado a outra extremidade se condense com a cadeia peptídica em um segundo tRNA através da ação do ribossomo (Hopper & Phizicky, 2003). Além desta função convencional, é bem estabelecido que tRNAs desempenham vários outros papéis tanto em procariotos e eucariotos.

Eucariotos e procariotos apresentam dois papéis não convencionais de tRNA similares entre os dois domínios. O primeiro consiste no uso de tRNAs aminoacilados como doadores de aminoácidos para a conjugação de aminoácidos a região N-terminal de proteínas, o que acarreta na degradação da proteína receptora (Mogk *et al.*, 2007). O Segundo consiste no papel de tRNAs em vias de transdução de sinal em resposta de privação nutricional. No caso de leveduras, o mecanismo de resposta da via de resposta a de privação de aminoácidos é efetuado através do uso de tRNAs não carregados que interagem com a Gcn2. Como descrito acima, a forforilação

do eIF2 resultado na diminuição dos níveis gerais de tradução, porém, paradoxalmente, eleva o nível de tradução do regulador de transcrição Gcn4, que promove a transcrição de vários genes envolvidos na biosíntese de aminoácidos e nucleotídeos (Dever & Hinnebusch, 2005). Eucariotos possuem papéis não convencionais de tRNA exclusivos do seu domínio, por exemplo na regulação da apoptose em mamíferos, em que tRNAs se ligam ao citocromo c, impedindo a interação com o fator caspase Apaf-1 e prevenindo sua ativação (Mei *et al.*, 2010). Outro papel não convencional importante de tRNAs eucarióticos é o seu emprego como primers para a transcrição reversa no ciclo de vida retroviral (Zaitseva *et al.*, 2006).

A biogênese de tRNAs é um processo complexo e que, apesar do número crescente de estudos relacionados, continua não compreendido totalmente, tendo sido melhor descrito, até o momento, em leveduras. O primeiro passo do processo consiste na transcrição do precursor do tRNA (pre-tRNA) pela Pol III, seguido pelo processamento da extremidade 5', catalizado pela endonuclease RNase P, sendo que ambos os passos ocorrem no nucleolo. Após isso, no nucleoplasma, é realizado o processamento da extremidade 3', catalizado por exonucleases (Rex1, em leveduras) e a endonuclease RNase Z (Trz1, em leveduras), por fim, processamento da extremidade 3' é finalizado com a adição da trinca de nucleotídeos CCA. Antes de ser transportado para o citoplasma via a exportina Los1, o tRNA sofre várias modificações, como metilações e pseudouridinizações, no nucleoplasma e na membrana interna do núcleo. Após o transporte para o citoplasma, tRNAs que possuem introns, são direcionados a superfície citoplasmática mitocondrial para a remoção dos introns, já em vertebrados o processo de splicing de tRNAs ocorre no núcleo. Outras modificações são realizadas no citoplasma e finalmente o tRNA é aminoacilado e habilitado a participar da síntese protéica (Phizicky & Hopper, 2010).

Após sua maturação, os tRNAs podem transitar entre o núcleo e o citoplasma e seu tráfego por entre esse locais é realizado em três passos separados. O primeiro, já descrito acima, consiste no transporte de tRNAs recém transcritos e parcialmente processados para o citoplasma, denominado exportação nuclear primária de tRNAs, via Los1 (em leveduras). O segundo passo, denominado importação nuclear

de tRNAs, consiste no retorno de tRNAs do citoplasma ao núcleo mediado pela importina Mtr10 (em leveduras). No terceiro e último passo, tRNAs nucleares, que já estiveram no citoplasma, podem retornar ao núcleo. Este transporte é mediado pela Los1 e pela importina Msn5 e é restrito a tRNAs estruturados apropriadamente e aminoacilados. Os dois últimos são regulados pelo estado nutricional do organismo (Whitney *et al.*, 2007).

A degradação de tRNAs é um processo relacionado ao mecanismo de controle de qualidade de sua biogênese e possui duas vias. Uma das vias ocorre no núcleo e é restrita a precursores do Met-tRNAⁱ que não foram metilados na adenina 58, os quais são poliadenilados pela poli(A) polimerase Trf4, presente no complexo TRAMP e em seguida degradados no sentido 3'-5' pela exoribonuclease Rrp6, presente no exosomo nuclear (Kabada *et al.*, 2006). A outra via ocorre tanto no núcleo como no citoplasma e degrada, de forma genérica, tRNAs hipometilados através das exonuclease nuclear Rat1 e a exonuclease citoplasmática Xrn1. Esta via requer a presença da enzima Met22 pois seu substrato, pAp, inibi a atividade da Rat1 e Xrn1. De maneira intrigante, esta via pode ter como substrato tRNAs aminoacilados (Chernyakov *et al.*, 2008).

2.4 Pequenos RNAs derivados de tRNAs (tRFs)

Com os recentes e exponenciais avanços nas tecnologias de sequenciamento em larga escala aliados a análises de bioinformática, uma nova classe de sRNAs derivados de tRNAs foi descoberta, apesar dos crescentes e intrigantes estudos relacionados a esses sRNAs, vários de seus aspectos biológicos, tal como biogênese e papel biológico, ainda não foram compreendidos.

A geração de tRFs tem sido observada em diversos organismos em situação de estresse, incluindo: a bactéria *Streptomyces coelicolor* (Haiser *et al.*, 2008); o fungo *Aspergillus fumigatus* (Jochl *et al.*, 2008) e *Saccharomyces cerevisiae* (Thompson *et al.*,

2008); os protozoários *Tetrahymena thermophila* (Lee & Collins, 2005), *Trypanosoma cruzi* (Garcia-Silva *et al.*, 2010) e *Giardia lamblia* (Li *et al.*, 2008); a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (kawamura *et al.*, 2008); a planta *Arabidopsis thaliana* (Hsieh *et al.*, 2010); e em linhagens celulares de mamíferos (Fu *et al.*, 2009). tRFs também foram detectados em células de mamíferos na ausência de qualquer estresse, sugerindo que a clivagem de tRNAs ocorre constitutivamente a níveis basais, havendo um aumento de sua atividade em situações de estresse. Porém, esse fenômeno não é observado em todas as condições, como no caso de leveduras sob privação de aminoácidos ou glicose e células de mamíferos irradiadas com raios γ ou cafeína [Thompson *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2009).

A clivagem de tRNAs durante estresse é realizada, geralmente, em posições variáveis no loop do anti-códon de tRNAs maduros, gerando sRNAs de 30-60 nt denominadas tRNA halves (5' ou 3') e correspondem ao conjunto de tRFs mais abundante. Em mamíferos, tRNA halves são gerados pela ribonuclease Angiogenina, que pertence a família de proteínas RNase A, em contraste com leveduras, em que esse processo é realizado pela ribonuclease Rny1, pertencente a família de proteínas RNase T2. Angiogenina e Rny1 se localizam no núcleo e no vacúolo, respectivamente, mas em situações de estresse se deslocam para o citoplasma, onde realizam a clivagem dos tRNAs (Nawrot *et al.*, 2011). De maneira intrigante, foi visto em *D. Melanogaster* que algumas espécies de tRNAs são protegidas durante estresse pela DNA metiltransferase 2 (Dnmt2), que promove a metilação da citosina 38, localizada próxima ao loop do anti-códon, indicando um possível papel desta proteína na regulação da clivagem de tRNAs (Schaefer *et al.*, 2010).

Estudos mostram que tRNA halves 5' dependentes de Angiogenina, mas não tRNA halves 3', reprimem o processo de tradução deslocando eIF4G/eIF4A de mRNAs com ou sem cap-5', impedindo a montagem do PIC. Além disso, a formação de grânulos de estresse (SGs) é desencadeada em células transfectadas com tRNA halves 5' sintéticos ou naturais (Ivanov *et al.*, 2011). SGs são componentes chave no programa de resposta estresse sendo o local onde ocorre a estocagem e degradação de mRNA, além de serem associados fisicamente aos corpos de processamento (P-bodies), outro

compartimento celular que possui elevada concentração de enzimas responsáveis pela degradação de RNA (Emara *et al.*, 2010). Interessantemente, foi observado o deslocamento da Dnmt2 para SGs em situações de estresse, sugerindo que este seja o possível local de clivagem dos tRNAs durante estresse (Shaefer *et al.*, 2010).

Através de ensaios de co-imunoprecipitação em humanos, foi identificada uma tRNA halve 5', proveniente do tRNA-Glu, associada a RNase Z, indicando que tRNA halves promover o silenciamento gênico, pois ,além de processar pre-tRNAs, a RNase Z é capaz de clivar RNAs em qualquer sítio desejado através de um mecanismo de silenciamento similar ao exercido pelo complexo RISC, porém para exercer essa atividade a RNase tem de estar com um RNA incorporado a ela, guiando-a ao RNA alvo (Elbarbary *et al.*, 2009).

O conjunto de tRFs menos abundante é composto por sRNAs de tamanho menor, variando entre 17 e 26 nt, derivados de diferentes porções da molécula de tRNA e também de pre-tRNA. Além de possuírem tamanho similar, este conjunto de tRFs apresenta pontos em comum com miRNAs e siRNAs quanto a biogênese e papel biológico.

Sequenciamento em larga realizado em células de carcinoma de próstata identificou tRFs oriundos da extremidade 5' (tRFs 5') e 3' (tRFs 3'), com sítios de clivagem localizados nos loop D e T do tRNA maduro, respectivamente, e tRFs oriundos da extremidade 3' de pre-tRNAs (3' trailer). Surpreendentemente, esses tRFs representaram aproximadamente 40% das sequências que não correspondem a miRNAs. Foi demonstrado também que o tRF-1001, derivado do 3' trailer do tRNA Ser(UGA) é dependente da RNase Z e que é requerido para a proliferação celular , pois sua expressão reduzida via knockdown mediado por siRNA se correlaciona com a diminuição nos níveis de proliferação, sendo este nível restaurado quando se realiza a transfecção de um oligonucleotídeo de RNA sintético idêntico ao tRF-1001, mas que não interfere no tratamento por siRNA (Lee *et al.*, 2009).

Em células HeLa foram identificados tRFs 5' de 19 nt dependentes de Dicer, pois células com a expressão da enzima suprimida por siRNA mostraram um

acúmulo reduzido destes tRFs. No mesmo trabalho revelou-se, através de ensaios de co-precipitação de Ago2, uma fraca, porém existente interação destes tRFs com essa proteína. Uma análise bioquímica subsequente sugeriu que a ribose 3' terminal dos tRFs é modificada, o que pode explicar a fraca interação com o complexo Ago, uma vez que miRNAs de humanos não apresentam tal modificação (Cole *et al.*, 2009). Haussecker e colaboradores também identificaram tRFs 3' e trailers 3' em linhagens celulares humanas. Neste trabalho relatou-se a dependência da enzima Dicer na biogênese de tRFs 3', assim como a associação relativa de ambos os tipos de tRFs com Ago3 e Ago4 através de co-precipitação. Utilizando ensaios repórteres em que plasmídeos contendo genes repórteres Renilla luciferase, com sítios alvos complementares para um tRF 3' e a um trailer 3' inseridos na região 3' UTR, foram transfectados em células expressando os tRFs complementares e observou-se que o trailer 3' possui modesta atividade de silenciamento, que pode ser explicada devido a sua interação com Ago3 e Ago4, pois não são as Ago mais ativas em humanos. Por fim, a atividade de silenciamento de miRNAs e siRNAs se mostrou afetada devido ao nível elevado de tRFs, acarretado pela superexpressão do fator de transcrição da Pol III, Brf 1. Este dado sugere que tRFs podem competir com miRNAs e siRNAs pelas proteínas Ago (Haussecker *et al.*, 2010). Sequenciamento em larga escala realizado em linhagens de células tronco embrionárias de camundongos com a enzima Dicer ou DGCR8 nocauteadas, identificaram tRFs dependentes de Dicer e independentes de DGCR8 oriundos do pre-tRNA Ile. Diferentemente de outros genes de tRNAs, o transcrito primário deste locus tem potencial de uma estrutura secundária alternativa a tradicional de trevo, em forma de um longo *hairpin*. Tal estrutura alternativa pode explicar a dependência de tRFs pela enzima, pelo fato de que os pre-tRNAs apresentariam estrutura parecida a pre-miRNAs, tornando-se o substrato preferencial dessa enzima, indicando que os mesmos podem desempenhar papéis de miRNAs e siRNAs como nos trabalhos descritos acima (Babiarz *et al.*, 2008).

Análises de bioinformática em bibliotecas de pequenos RNAs de linhagens celulares humanas e camundongos, revalaram um possível padrão de processamento de tRFs 5' e 3' de 19-20 nt. Nela, dentre os 447 genes de tRNA que possuem tRFs

terminais (5' e 3') mapeados a eles, 75% possuem ambos os tipos de tRFs mapeados, dos quais 93% apresentaram diferença significativa (2 vezes) no acúmulo entre os dois tipos de tRFs, sendo que metade apresentaram um acúmulo de tRFs 3' dez vezes maior ao de tRFs 5'. Em seguida, foi realizada a mesma análise em bibliotecas de mutantes knockout para Dicer e DGCR8, notou-se um acúmulo consideravelmente menor (duas vezes ou mais) em células mutantes relação as selvagens. No mesmo trabalho, dois tRFs 3' foram avaliados em diferentes experimentos. Após isso, testou-se as possíveis funções destes tRFs e através de ensaios de co-imunoprecipitação e clivagem *in vitro*, sendo que os resultados mostraram a interação dos tRFs 3', oriundos dos tRNAs HisGTG e LeuCAG, com Ago2 e que os mesmos puderam clivar alvos sintéticos complementares. Curiosamente estes tRFs possuem complementaridade com lócus responsáveis pela replicação retroviral, sugerindo que estes tRFs possam ter papel repressor da atividade retroviral (Li *et al.*, 2012).

Ensaio de co-imunoprecipitação realizados em *Tetrahymena thermophila* revelou a interação da Twi12, membro do clado Piwi, que pertence a família das proteínas Argonautas, com tRFs 3'. O mesmo estudo mostrou que Twi12 forma um complexo protéico com outras duas proteínas não identificadas anteriormente, as quais foram nomeadas Tan1 (Twi-associated novel) e Xrn2. A estrutura da proteína Xrn2 possui um domínio de exonuclease 5'-3' monofosfato dependente e apresentou similaridade com as enzimas Rat1 de leveduras e XRN2 de humanos. Este complexo protéico se desloca para o núcleo, quando a proteína Twi12 apresenta um tRF 3' incorporado a ela, e efetua o processamento de RNAs ribossômicos (rRNAs), através da clivagem da Xrn2 (Couvillion *et al.*, 2012)

Estudos em diferentes espécies de plantas também identificaram populações de tRFs. Em *Arabidopsis* crescendo sob deprivação de fosfato, foram detectados tRFs 5' de 19 nt e tRNA halves, em tecido radicular e parte aérea. Estudos mais detalhados mostraram um acúmulo diferencial de tRFs entre os tecidos analisados, sendo que o tRF oriundo do tRNA Gly-TCC representou mais de 80% do pool de tRFs no tecido radicular, além de ter representado 18,44% e 27,70% nas bibliotecas de raízes crescendo na presença e ausência de fosfato, respectivamente (Hsieh *et al.*, 2009). Além de

estresse por deprivação de fosfato, tRFs também foram encontrados em plantas sob estresse hídrico e de calor. No primeiro estudo, foram realizados sequenciamento em larga escala em plantas de cavada selvagem e de uma linhagem trãns genica superexpressando o fator de transcrição DREB3 de trigo, ambas sob estresse hídrico. Na biblioteca do exemplar selvagem foram identificados 55 tRFs, dos 54 também foram anotados na biblioteca do exemplar trãns genico. Destes o tRF oriundo do tRNA Gly-TCC foi o mais abundante correspondendo a 83,1% e 57,9% do pool de tRFs nas bibliotecas do exemplar selvagem e trãns genico, respectivamente. Muitos dos tRFs identificados apresentaram expressão significativamente diferencial ($\log_2 \geq 1$) entre as bibliotecas, sendo que o tRF Gly-TCC apresentou acúmulo quatro vezes maior no exemplar selvagem. No mesmo estudo foram detectados tRFs de 19-20 nt derivados de tRNAs do genoma de cloroplasto, sendo que o tRF 5' derivado do tRNA His-GTG foi o sRNA mais abundante dentro da população de sRNA derivados do genoma de cloroplasto (Hackenberg *et al.*, 2012). Em bibliotecas de sRNAs de cloroplasto de nabo chinês (*Brassica rapa*) submetidos a a estresse de calor, também identificou-se tRFs 5' e 3', sendo que 95% dos tRFs identificados na biblioteca são tRF 5' (Wang *et al.*, 2011). Estes estudos mostram o forte impacto que diferentes tipos de estresse provocam na expressão destes tipos de tRFs, o que indica que os mesmos apresentem alguma função da resposta a estresse.

Bibliotecas de pequenos RNAs de calos embrionários indiferenciados e diferenciados, identificaram tRFs 5' e 3' de 18-22 nt. O tRF mais expresso das bibliotecas possui 22 nt e é derivado da extremidade 5' do tRNA Ala-AGC, correspondendo a aproximadamente 82% dos tRFs das bibliotecas, interessantemente o tRF 3' mais expresso da biblioteca possui 18 nt e também é derivado desse mesmo tRNA. No mesmo trabalho, avaliou-se a expressão através de RT-qPCR dos tRFs 5' derivados dos tRNAs Ala-AGC e Pro-CGG em calos embrionários indiferenciados, diferenciados e em folhas. Ambos os tRFs mostraram um aumento de expressão correlacionado com o nível de diferenciação das células, indicando que estes possam ter função relacionada a esse processo (Chen *et al.*, 2011). Além de tRFs 5' e 3', tRNA halves 5' e 3' e tRFs 5' também foram identificadas em seiva floemática de abóboras

(*Cucurbita maxima*). No mesmo trabalho, mostrou-se que pequenos RNAs presentes na seiva floemática (incluindo tRNA halves) inibiram a síntese protéica *in vitro*, o que levou os autores a hipótese de que as tRNAs halves sejam as possíveis responsáveis por esse fenômeno, assim como foi descrito em mamíferos. Além disso, o fato de tRFs e tRNA halves estarem presentes na seiva floemática e ter sido relatado um acúmulo diferencial de tRFs 5' entre parte aérea e tecido radicular, indica que esta nova classe de sRNAs possa atuar como moléculas de sinalização a longa distância, entre tecidos fonte e dreno (Hsieh *et al.*, 2009). Nosso grupo também identificou tRFs 5' de 19 nt derivados de tRNAs nucleares e de cloroplasto, em bibliotecas de sRNAs de tecido foliar e gemas dormentes e ativas de cana-de-açúcar. Esta descoberta impulsionou o início do estudo dessa nova classe de sRNAs pelo nosso grupo.

Em plantas a biogênese de tRFs ainda não foi estudada, sendo até o momento uma incógnita, porém os estudos acerca da biogênese de tRFs em mamíferos e leveduras podem contribuir para estudo do mesmo tema em plantas, sugerindo e auxiliando na escolha de possíveis enzimas candidatas a essa via.

Como já dito acima, em mamíferos tRNA halves são gerados através da clivagem mediada pela ribonuclease Angiogenina no loop do anti-códon. O mesmo processo de clivagem é realizado pela Rny1 em leveduras, uma ribonuclease da família de proteínas RNase T2, a qual é amplamente conservada, tendo sido descrita em vírus, bactérias, fungos, plantas e animais, sugerindo que estas tenham uma origem ancestral e funções cruciais (Taylor & Green, 1991). Esta mesma família abriga as enzimas S-like, que são ubiquamente conservadas em plantas, sendo representadas em *Arabidopsis* por cinco genes, RNS1 a RNS5, sendo que três deles demonstram atividade de RNase e, intrigantemente, dois deles (RNS1; RNS2) apresentam expressão elevada em plantas sob deprivação de fosfato. Adicionalmente, estudos indicam que a RNS1 pode ser expressa em resposta a desidratação e a estresse frio, sendo essa indução de expressão regulada pela produção e sinalização de ABA (Melissa *et al.*, 2008) e a RNS2 é requerida para o decaimento de rRNA em plantas (Melissa *et al.*, 2011).

3. Objetivo

Este trabalho possui como principal objetivo elucidar a biogênese e a(s) possível (eis) função(ões) biológica(s) de tRFs em plantas, através de análises de bioinformática em bibliotecas de sRNAs, disponíveis em bancos de dados públicos.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o acúmulo de tRFs em diferentes tecidos vegetais.
- Avaliar o acúmulo de tRFs em plantas mutantes, deficientes para enzimas responsáveis pelo processamento de RNA.
- Avaliar o acúmulo de tRFs em plantas mutantes, deficientes para enzimas envolvidas na via de RNAi.
- Avaliar o acúmulo de tRFs em diferentes membros de proteínas AGO.
- Avaliar o acúmulo de tRFs em plantas sob diferentes situações de estresse.

4. Material e métodos

4.1 Método de análise

As sequências de sRNAs presentes nas bibliotecas utilizadas em nossas análises, foram blastadas com o banco de tRNAs maduros de arabidopsis. Tal processo foi automatizado através de um script de comando, montado pelo professor Renato

Vicentini, no qual sequências que não possuíam 19 ou 20 nt, com um ou mais mismatches e contagem de reads menor ou igual a 10 foram descartadas no processo. Após a identificação dos tRFs, foi eliminada a redundância dos mesmos nas bibliotecas de cada tratamento (exemplo: controle; estresse hídrico; estresse salino) de cada respectivo de experimentos. Essa redundância ocorreu devido o alinhamento de uma mesmo tRF em várias cópias do seu tRNA de origem. Em seguida, para cada experimento, foram selecionados apenas os tRFs, que mapeiam exatamente nas extremidades 5' e 3' dos tRNAs e que foram anotados no controle e em um ou mais tratamentos. Por fim, foi calculada a expressão normalizada dos tRFs em cada tratamento (número de reads no tratamento/ número de reads totais da biblioteca x 1.000.000).

4.2 Bibliotecas utilizados

Foram utilizadas as seguinte bibliotecas de sRNAs em nossas análises:

1. Biblioteca de sRNAs de botões florais fechados de *A. thaliana* ecótipo *columbia*:
 - Mutantes: CBP80 (*abh1-1*) simples; XRN4 (*ein5-6*) simples; XRN4/CBP80 (*ein5-6/abh1-1*) duplo
 - Plataforma: Illumina
 - Referência: **Gregory BD, O'Malley RC, Lister R, Urich MA, Tonti-Filippini J, Chen H, Millar AH, Ecker JR. (2008)** A link between RNA metabolism and silencing affecting Arabidopsis development. **Dev. Cell. 2008 Jun;14(6):854-66. Epub 2008 May 22**

2. Biblioteca de sRNAs de folhas de roseta de *A. thaliana* ecótipo *columbia*:

- Mutantes: *hyl1-2* simples; *hyl1-2/dcl1-20* duplo; *hyl1-2;dcl1-21* duplo
- Plataforma: sistema AB SOLiD 4
- Referência: Liu C, Axtell MJ, Fedoroff NV. **The helicase and RNaseIIIa domains of Arabidopsis Dicer-Like1 modulate catalytic parameters during microRNA biogenesis.** *Plant Physiol*, 2012 Jun;159(2):748-58.

3. Bibliotecas de sRNAs de parte aérea de *A.thaliana*, ecótipo *Columbia* com 4 semanas de idade sob diferentes tipos de estresse abióticos:

- Estresses: -> Hídrico (40-50% volume de água normal)
-> Frio (5°C por 24 horas)
-> Salino (200mM NaCl por 5 horas)
- Plataforma: Illumina
- Referência:

4. Bibliotecas de sRNAs de diferentes tecidos de *A. thaliana* ecótipo *Columbia*:

- Tecidos: ->Plântulas inteira
->Folhas de roseta

->Flores

->Síliquas

- Plataforma: 454
- Referência: Axtell, M.J., Jan, C., Rajagopalan, R., and Bartel, D.P. (2006) **A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants.** Cell 127:565-577

4.3 Banco de dados de tRNAs maduros utilizados

O banco de dados com sequencias de tRNAs maduros de arabidopsis foi obtido do banco de dados de tRNAs genômicos, composto por genes de tRNAs preditos pelo programa tRNAscan-SE (referência: Lowe TM, Eddy SR **tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence.** Nucleic Acids Res. 1997 Mar 1;25(5):955-64).

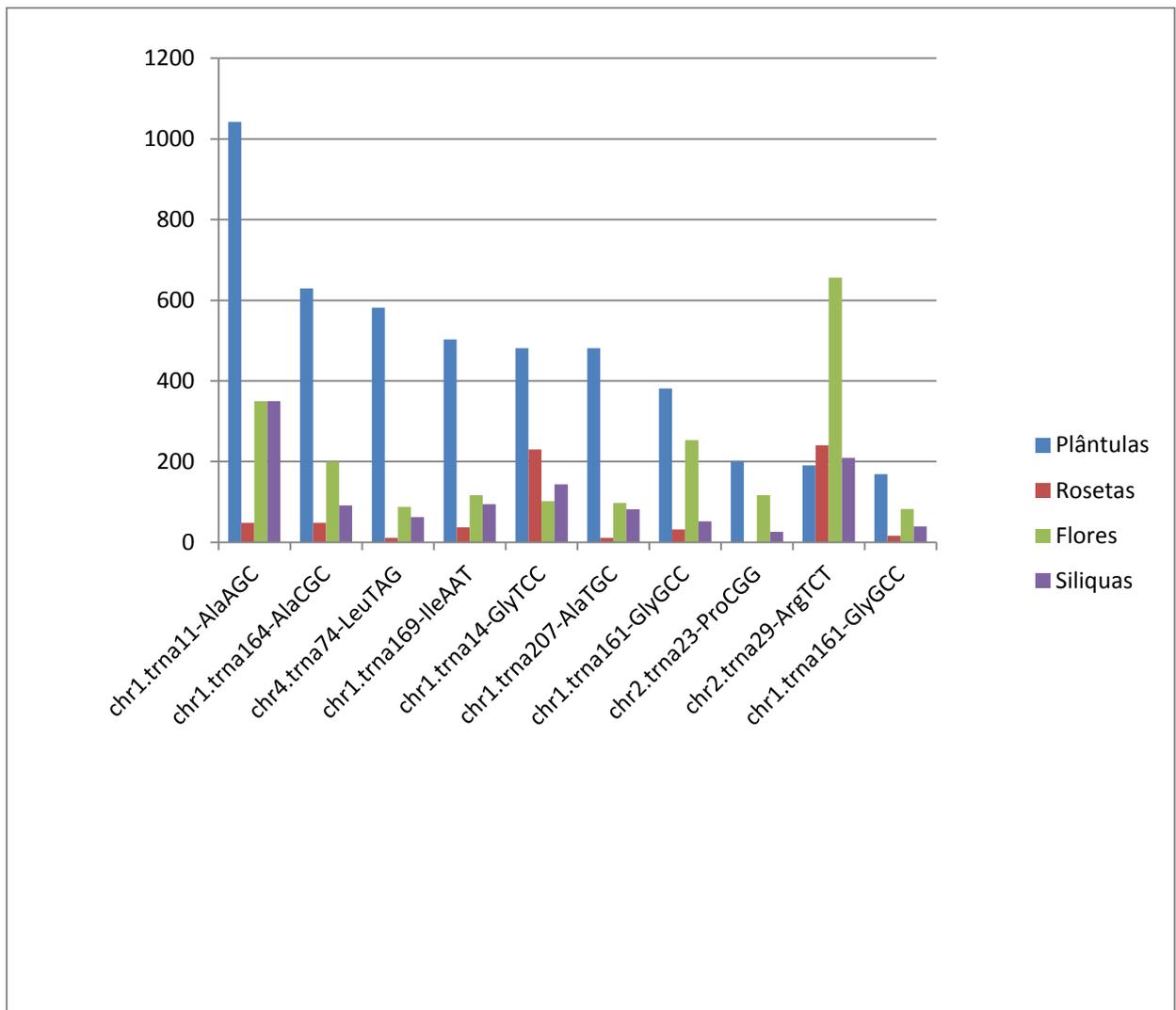
5. Resultados

5.1 Acúmulo de tRFs em diferentes tecidos.

Tabela 01: Os 10 tRFs mais expressos em plântulas e seu padrão de expressão em flores, rosetas, siliquis. Na primeira coluna, é reside identidade do tRF, mostrando o número que seu tRNA precursor representa no banco de dados de tRNAs genômico, o cromossomo que o gene codificador do tRNA se encontra, qual aminoácido este codifica e qual seu anti-códon. Na tabela está indicado também em qual extremidade do tRNA o tRF é mapeado (Ext.) e o seu tamanho (Nts.)

Identidade	Plântulas	Rosetas	Flores	Siliquis	Sequência	Ext.	Nt.
chr1.tna11 AlaAGC	1042,58179	48,154351	350,111112	349,94309	GGGGATGTAGCTCAGATGGT	5'	20
chr1.tna164 AlaCGC	629,78291	48,154351	199,368828	91,573894	GGGGGTGTAGCTCATATGGT	5'	20
chr4.tna74 LeuTAG	582,15227	10,700967	87,527779	62,139428	GCCGCTATGGTGAAATTGG	5'	19
chr1.tna169 IleAAT	502,767869	37,453384	116,703704	94,84439	GGCCTATTAGCTCAGTTGGT	5'	20
chr1.tna14 GlyTCC	481,598696	230,07079	102,115741	143,90183	GCGTCTGTAGTCCAACGGT	5'	19
chr1.tna207 AlaTGC	481,598696	10,700967	97,2530866	81,762405	GGGGATGTAGCTCAAATGGT	5'	20
chr1.tna161 GlyGCC	381,045122	32,102901	252,858025	52,327939	GCACCAGTGGTCTAGTGGTA	5'	20
chr2.tna23 ProCGG	201,107148	0	116,703704	26,16397	GGGTGTTTGGTCTAGTGGTA	5'	20
chr2.tna29 ArgTCT	190,522561	240,77175	656,458334	209,31176	GCACCCATGGCCTAATGGA	5'	19
chr1.tna161 GlyGCC	169,353388	16,05145	82,6651236	39,245954	GCACCAGTGGTCTAGTGGT	5'	19

Gráfico 01: Os 10 tRFs mais expressos em plântulas e suas respectivas expressões em órgãos vegetais.

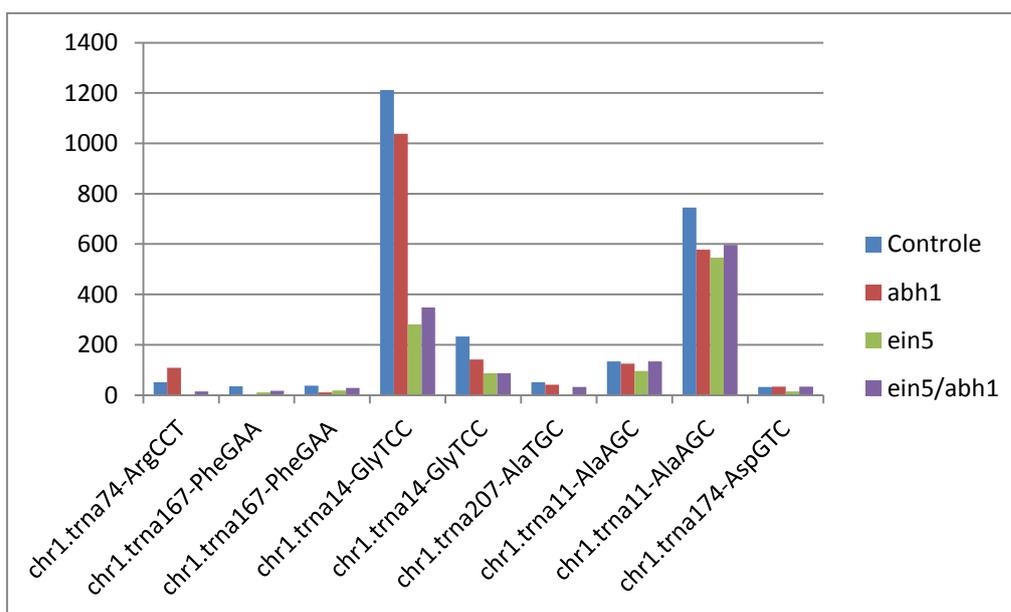


5.2: Acúmulo de tRFs em mutantes de enzimas responsáveis pelo processamento de RNA:

Tabela 02: Expressão de tRFs anotados nas bibliotecas de diferentes mutante da via de processamento de RNA. Na primeira coluna, é reside identidade do tRF, mostrando o número que seu tRNA precursor representa no banco de dados de tRNAs genômico, o cromossomo que o gene codificador do tRNA se encontra, qual aminoácido este codifica e qual seu anti-códon. Na tabela está indicado também em qual extremidade do tRNA o tRF é mapeado (Ext.) e o seu tamanho (Nts).

Identidade	Controle	<i>abh1-1</i>	<i>ein5-6</i>	<i>ein5-6/abh1-1</i>	Sequência	Ext.	Nts.
chr1.tna74-ArgCCT	51,356816	108,73006	0	14,627257	GCGCCTGTAGCTCAGTGG	5'	19
chr1.tna167-PheGAA	34,493384	0	10,896467	16,967618	GCGGGGATAGCTCAGTTGG	5'	19
chr1.tna167-PheGAA	37,559463	11,045593	18,476617	28,669423	GCGGGGATAGCTCAGTTGGG	5'	20
chr1.tna14-GlyTCC	1211,101	1038,2858	280,93933	348,12871	GCGTCTGTAGTCCAACGGT	5'	19
chr1.tna14-GlyTCC	233,02197	141,86684	86,697973	86,593359	GCGTCTGTAGTCCAACGGTT	5'	20
chr1.tna207-AlaTGC	51,718079	41,420974	0	32,765055	GGGGATGTAGCTCAAATGGT	5'	20
chr1.tna11-AlaAGC	133,37442	125,29845	96,173161	134,57076	GGGGATGTAGCTCAGATGG	5'	19
chr1.tna11-AlaAGC	745,29446	577,82259	545,77084	597,37716	GGGGATGTAGCTCAGATGGT	5'	20
chr1.tna174-AspGTC	32,193825	33,481954	15,160301	33,350145	GTCGTTGTAGTATAGTGGTA	5'	20

Gráfico 02: Gráfico ilustrando a expressão de tRFs nas bibliotecas de diferentes mutantes da via de processamento de RNAs.

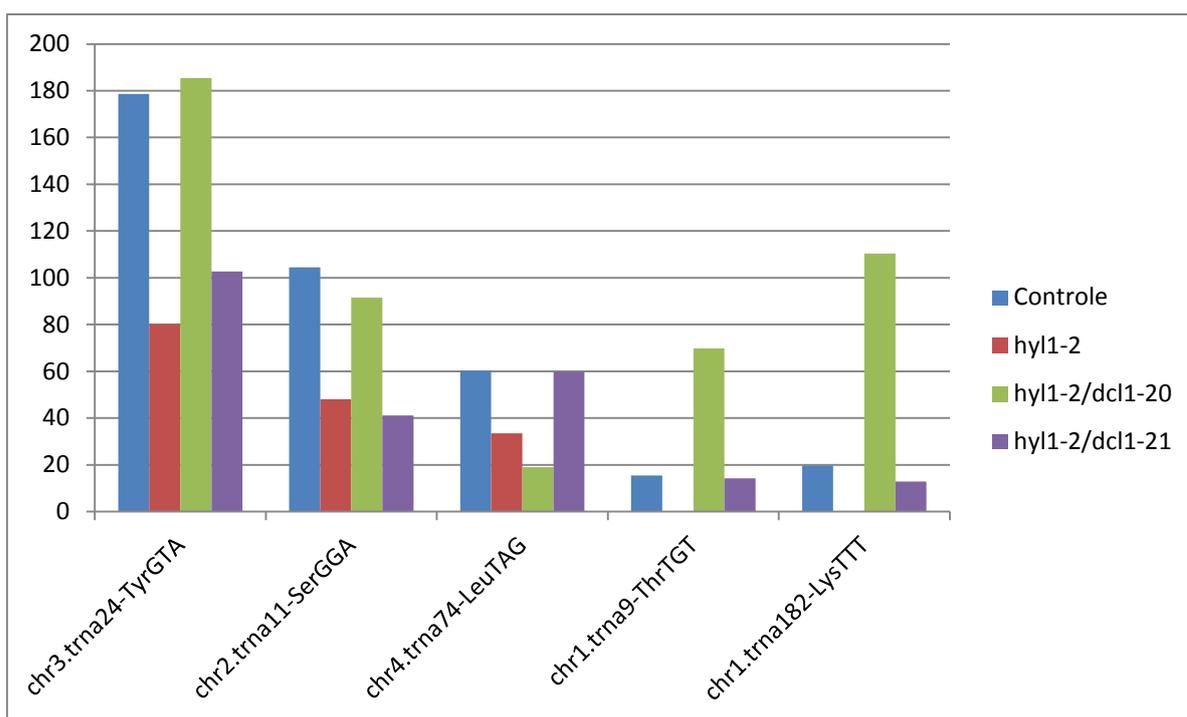


5.3 Acúmulo de tRFs em plantas mutantes deficientes em enzimas envolvidas na via de RNAi:

Tabela 03: Expressão de tRFs anotados em bibliotecas de diferentes mutantes da via de RNAi. Na primeira coluna, é reside identidade do tRF, mostrando o número que seu tRNA precursor representa no banco de dados de tRNAs genômico, o cromossomo que o gene codificador do tRNA se encontra, qual aminoácido este codifica e qual seu anti-códon. Na tabela está indicado também em qual extremidade do tRNA o tRF é mapeado (Ext.) e o seu tamanho (Nts.).

Identidade	Controle	hyl1-2	hyl1-2/dcl1-20	hyl1-2/dcl1-21	Sequência	Ext.	Nts.
chr3.tna24-TyrGTA	178,58833	80,221446	185,52441	102,67566	AAATCCAGCTCGGCCACCA	3'	20
chr2.tna11-SerGGA	104,4697	48,09031	91,502621	41,073789	GAATCCCTCTCTTCCCCCA	3'	20
chr4.tna74-LeuTAG	60,225114	33,4788	19,015642	59,786944	GAGTCCGAGTAGCGGCACCA	3'	20
chr1.tna9-ThrTGT	15,443866	0	69,805285	14,184642	GCCCGTATAGCTCAGTGGTA	5'	20
chr1.tna182-LysTTT	19,617884	0	110,39637	12,863091	GCCGTCTTAGCTCAGTGGTA	5'	20

Gráfico 03: Gráfico ilustrando a expressão de tRFs 5' e 3' nas bibliotecas de diferentes mutantes da via de processamento de RNA.

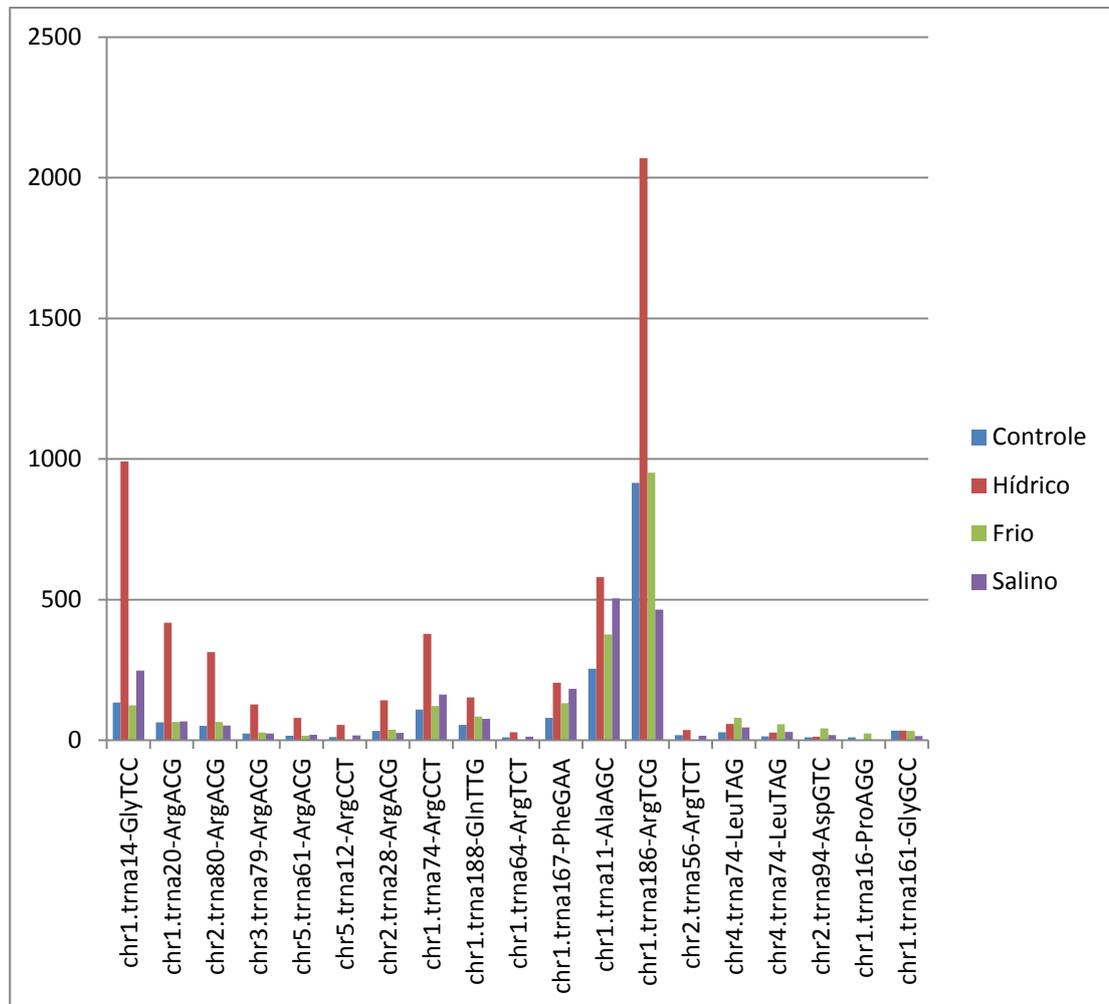


5.4: Acúmulo de tRFs em plantas em diferentes situações de estresse

Tabela 04: Expressão de tRFs 5' em diferentes tipos de estresse. Este resultado mostra todos os tRFs que apresentaram, em qualquer tipo de estresse, um acúmulo 2 vezes maior ou menos em relação ao controle. Na primeira coluna, é reside identidade do tRF, mostrando o número que seu tRNA precursor representa no banco de dados de tRNAs genômico, o cromossomo que gene codificador do tRNA se encontra, qual aminoácido este codifica e qual seu anti-códon. Na tabela está indicado também em qual extremidade do tRNA o tRF é mapeado (Ext.) e o seu tamanho (Nts.).

Identidade	Controle	Hídrico	Frio	Salino	Sequência	Ext	Nts
chr1.tna14-GlyTCC	134,37327	991,30711	124,0957	247,32499	GCGTCTGTAGTCCAACGGT	5'	19
chr1.tna20-ArgACG	63,247356	418,15487	64,76708	67,321657	GACTTCATGGCCCAATGGA	5'	19
chr2.tna80-ArgACG	50,991813	313,1333	64,76708	51,927986	GACTCCATGGCCCAATGGA	5'	19
chr3.tna79-ArgACG	23,416841	127,23304	27,68669	24,424626	GGTCCATGGCCCAATGGA	5'	19
chr5.tna61-ArgACG	16,413674	79,91297	16,315371	19,909149	GACTCCGTGGCCCAATGGA	5'	19
chr5.tna12-ArgCCT	11,380147	54,321505	0	17,65141	GCGTCTGTAGCTCAGTGA	5'	19
chr2.tna28-ArgACG	32,608498	141,71877	37,821997	26,477115	GACTCTGTGGCCCAATGGA	5'	19
chr1.tna74-ArgCCT	108,98679	378,3191	122,11808	161,94143	GCGCCTGTAGCTCAGTGA	5'	19
chr1.tna188-GlnTTG	54,712245	152,34164	84,048882	76,352611	GGTTCATGGTGTAGTGGT	5'	19
chr1.tna64-ArgTCT	10,504751	28,971469	0	12,314937	GCGCCCGTGGCCTAATGGA	5'	19
chr1.tna167-PheGAA	79,661029	204,24886	132,25339	183,08207	GCGGGGATAGCTCAGTTGGG	5'	20
chr1.tna11-AlaAGC	254,30252	580,15367	376,24235	503,68093	GGGGATGTAGCTCAGATGGT	5'	20
chr1.tna186-ArgTCG	915,44529	2069,7701	950,74118	463,86264	GACCGCATAGCGCAGTGA	5'	19
chr2.tna56-ArgTCT	17,945616	36,938623	0	15,80417	GCACCCGTGGCCTAATGGA	5'	19
chr4.tna74-LeuTAG	28,888066	58,184368	79,846438	45,15477	GCCGCTATGGTGAAATTGG	5'	19
chr4.tna74-LeuTAG	13,787486	27,281467	57,103799	29,145352	GCCGCTATGGTGAAATTGGA	5'	20
chr2.tna94-AspGTC	10,285902	13,037161	41,777238	18,472406	GGGATTGTAGTTCAATTGGA	5'	20
chr1.tna161-GlyGCC	34,35929	33,800048	32,877945	14,367427	GCACCAGTGGTCTAGTGGT	5'	19

Gráfico 04: Gráfico ilustrando a expressão de tRFs 5' em diferentes tipos de estresse.



6. Discussão

Os resultados mostraram um acúmulo predominante de tRFs 5' em todos os experimentos. Este resultado se mostra diferente do observado em mamíferos, em que ocorre um acúmulo predominante de tRFs 3' (Li *et al.*, 2012), o que pode implicar em biogêneses diferentes entre os tipos de tRFs e/ ou diferentes funções que os tRFs podem exercer entre os reinos.

A análise em bibliotecas de *Arabidopsis* em diferentes situações de estresse mostrou que vários tRFs 5' apresentam resposta a esse tipo de estímulo em plantas, fato já observado em outros estudos (Hsieh *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Hackenberg *et al.*, 2012). Ao contrário de mamíferos, em que tRNA halves são as mais representadas nessas situações, sendo processadas pela Angiogenina e, no caso de leveduras, pela Rny1 (Emara *et al.*, 2010). Isto aliado aos fatos de que a RNS1 é superexpressa em plantas sob deprivação de fosfato e que tRNA halves foram detectadas nas mesmas condições, confere suporte a hipótese de que a RNS1 seja a responsável por clivar os tRNAs maduros no loop anti-códon. Além disso, o fato de que tRNA halves, presente no conteúdo ribonucleotídico da seiva floemática de abóboras, podem estar envolvidas com a inibição da síntese protéica, nos leva acreditar que plantas possam apresentar o mesmo mecanismo de resposta a estresse que mamíferos, sugerindo um mecanismo conservado entre os reinos. Porém, seguindo este modelo a RNS1, não seria a responsável por gerar tRFs de tamanho menor, como os tRFs 5' amplamente descritos. Entretanto, os resultados obtidos nas bibliotecas de mutantes da via de processamento de RNAs, fornecem possíveis resposta para essa questão.

Nossos resultados mostraram que tRFs 5' apresentaram um acúmulo menor no mutante *ein5-6*, que é nulo para a exoribonuclease XRN4, homóloga a Xrn1 de leveduras, que por sinal atua na via de degradação de tRNAs, e apresenta atividade 5'-3' exoribonuclease. Esta enzima também participa da via de decaimento de mRNAs e tem maior preferência por RNAs com extremidade 5' monofosfatadas, as quais são encontradas também em tRNAs (Linda *et al.*, 2011), sugerindo que tRFs 5' de 19-20 sejam

dependentes dessa enzima, que pode ter como substrato tRNA halves 5' geradas pela clivagem da RNS1. Além disso, em mamíferos tRNA halves 5' induzem a formação de grânulos de estresse, os quais são fisicamente ligados aos P-bodies, compartimento celular que abriga várias enzimas de degradação de RNA (Emara *et al.*, 2010), sugerindo uma co-localização entre as tRNA halves e a XRN4, apoiando a hipótese de que tRFs 5' sejam dependentes dessa enzima.

O mutante *abh1-1*, nulo para a proteína de ligação de cap (CAP BINDING PROTEIN (CBP80) e estudo mostrou que essa proteína em é um modulador negativo da sinalização de ABA. Nossos resultados mostraram que tRFs 5' não apresentam um acúmulo diferencial nesse mutante, isso reforça a idéia de que a biogênese de tRFs 5' dependente da RNS1 e XRN4, seja induzido em situações de estresse, pois a indução da atividade da RNS1 é controlada por ABA, hormônio que produzido pela planta em diferentes tipos de estresse, incluindo estresses hídrico e de frio (Melissa *et al.*, 2008).

Dentre os tRFs 5' identificados nas bibliotecas de sRNAs de plântulas (Tabela 01; Gráfico 01), o mais expresso é o tRF 5' Ala-AGC, o qual também foi identificado em outros trabalhos realizados plantas sendo também o tRF 5' mais expresso (Chen *et al.*, 2011). Entretanto, uma característica extremamente conservada e restrita dos tRNAs Ala de vários organismo, é apresentar um motivo de oligoguanina terminal (TOG), que consiste em quatro ou cinco resíduos de guanina em suas extremidades 5'. Estudos em mamíferos, mostraram que esse motivo é necessário para a inibição da síntese protéica e formação de SGs, pela tRNA halve 5' derivada do tRNA Ala [Emara *et al.*, 2010; Ivanov *et al.*, 2011), mostrando o forte envolvimento desta tRNA halve na resposta a estresse, sugerindo também que o tRF 5' Ala-AGC de plantas também possua papel de regulação importante. Porém, em nossas análises sobre o acúmulo de tRFs em diferentes situações de estresse (Tabela 04), o tRF 5' Ala-AGC não apresenta variações drásticas de expressão se comparado a outros tRFs nas mesmas bibliotecas (exemplo: tRFs 5' Gly-TTC e Arg-CCT). Caso a via de produção de tRNA halves em resposta a estresse seja conservada em plantas, os fatos acima sugerem que, em plantas, a resposta a estresse é mediada predominantemente por tRFs 5', gerados a partir de tRNA halves 5', e que diferentes tRNAs geram preferencialmente tRFs 5' ou

tRNA halves 5'. Esta hipótese é sustentada pelo fato de que, em plantas, ainda não foram realizados estudos com o intuito de identificar de maneira ampla, através de sequenciamento em larga escala de sRNAs na faixa de 30-50 nt por exemplo, tRNA halves em situações de estresse. Fato que se aplica também, no caso dos tRFs 5' de humanos, sendo estes apenas descritos em células de carcinoma.

Em humanos, estudos indicam que tRFs 5' e 3' são dependentes da enzima Dicer, o que indica que os mesmos possam ter biogênese parecida a de miRNAs e siRNAs. Até o momento não foi realizado nenhum trabalho avaliando a possibilidade desses dois tipos de tRFs serem dependentes de DCLs em plantas e o fato de que a maioria de tRFs 5' apresentam o mesmo tamanho dos descritos em humanos, sugere que estes também estejam envolvidos nessa via de biogênese em plantas. Em prol disso analisamos o acúmulo de tRFs no mutante simples *hyl1-2* e nos mutantes duplos *hyl1-2/dcl1-20* e *hyl1-2/dcl1-21*. A DCL1 é a principal enzima na produção de miRNAs e as mutações nos alelos 20 e 21 geram a perda dos domínios helicase de RNA e RNase IIIa, respectivamente, que provoca uma diminuição na atividade catalítica da enzima DCL1 (Chenggang *et al.*, 2012). Nossas análises identificaram tRFs 3' e 5' nessas bibliotecas (Tabela03; gráfico 03), sendo que a maioria dos tRFs 3' mostraram ligeira diminuição de expressão em um dos mutantes duplos, o que sugere que este tipo de tRF possa ser dependente de DCL1. No entanto, tRFs 5' apresentaram maior acúmulo no mutante *hyl1-2/dcl1-20*, isto poderia indicar uma correlação com a biogênese de tRNA halves 5' e tRFs 5', em que um mesmo tRNA poderia ser capaz de gerar tRNA halves 5', tRFs 5' e/ou tRFs 3'. Esta hipótese é sustentada pelo fato de nossos resultados identificarem em bibliotecas de mutantes da via de RNAi e em bibliotecas de diferentes situações de estresse os tRFs 3' e 5' derivados do mesmo tRNA Leu-TAG, respectivamente, o que sugere um direcionamento da molécula de tRNA para uma das vias de biogênese, em resposta a diferentes estímulos.

Entretanto, nossos experimentos detectaram tRFs 3' com a presença da trinca de nucleotídeos CCA em suas extremidades 3', significando que o tRF 3' é derivado de um tRNA maduro, ao contrário de células tronco embrionárias de camundongo em que tRF 3', dependente de Dicer, é derivado do transcrito primário do

tRNA Ile , com capacidade de formar uma estrutura secundária de *hairpin*, gerando a dúvida se moléculas de tRNAs maduros tem capacidade de formarem estruturas secundárias de *hairpin* (Babiarz *et al.*, 2008). Entretanto, dentre os tRFs 3' identificados em nossas análises, esta presente o tRF 3' derivado do tRNA Tyr-GTA, o qual apresenta *introns* em seu lócus, o que adicionado ao fato de que durante a biogênese de tRNAs, a adição da trinca CCA ocorre anteriormente ao processo de *splicing*, indicando que o tRF 3' Tyr-GTA detectado em nossas análises pode ser derivado de um pre-tRNA parcialmente processado e que pode possuir maior capacidade a formar a estrutura de *hairpin*, o que é correlacionado ao mostrado em camundongos em que o lócus do tRNA Ile também apresenta um *intron* (Babiarz *et al.*, 2008). Interessantemente, o tRF 3' Tyr-GTA é o mais expresso na biblioteca da amostra controle e apresenta um acúmulo relativamente menor no mutante *hyl1-2/dcl1-20*, o que pode ser uma consequência do mesmo possuir *introns*. Porém o tRNA Leu-TAG não apresenta *introns* em seu precursor, sugerindo que a enzima DCL possa ter mais de um tipo de substrato nesse via.

7. Conclusão

As análises realizadas nesse trabalho em bibliotecas de sRNAs de diferentes mutantes, situações de estresse e diferentes tipos de tecido fornecem uma visão ampla sobre a o acúmulo de tRFs, que aliadas aos estudos realizados em outros organismos, geram hipóteses a respeito da biogênese e função biológica de tRFs em plantas, o que contribui para a eficácia de estudos em laboratório.

Nossas análises estão baseadas em bibliotecas de sRNAs confeccionadas para outros fins o que pode dificultar a identificação de tRFs. Infelizmente foi mostrado que tRFs tem apresentado mudanças de expressão entre diferentes métodos de sequenciamento e montagem de bibliotecas (Chen *et al.*, 2011). O que torna necessário

a revisão e elaboração de métodos para a detecção desta nova classe de sRNAs, para a obtenção de maior quantidade de informações a seu respeito.

Este trabalho indica a atuação das enzimas RNS1 e XRN4 na via de produção de tRNA halves e tRFs 5', sugerindo que ambas as vias estejam interligadas. No entanto, outras análises e experimentos ainda são necessários para o completo entendimento desta via. Além disso, fornece evidências para o processamento de tRNAs pela enzima dicer, evidenciando a necessidade de análise da estrutura de seus transcritos primários.

Neste trabalho foram identificados tRFs com alta variação de expressão em situações de estresse, alguns já haviam sido identificados em outros trabalhos, o que indica que os mesmos tenham papel importante durante tais situações. Isto também mostra que nossos métodos de análise e identificação de tRFs estão sendo realizados da maneira correta. Por fim, muitos dos tRFs identificados necessitam ser validados em laboratório, bem como experimentos com mutantes das para as enzimas RNS1 e XRN4.

8. Referências bibliográficas

- Reinhart, B.J. et al. (2000) **The 21-nucleotide let-7 RNA regulates development al timing in Caenorh abditis elegans.** Nature 403, 901–906
- Llave, C. et al. (2002) Endogenous s and silencing-associated small RNAs in plants. Plant Cell 14, 1605–1619
- Bartel, D.P. (2004) **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** Cell 116, 281–297

- Baskerville S, Bartel DP.(2005). **Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes.** *RNA* 11:241-47
- V. Narry Kim, Jinju Han & Mikiko C. Siomi (2009) **Biogenesis of small RNAs in animals.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 126-139 doi:10.1038/nrm2632
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). **Prediction of mammalian microRNA targets.** *Cell* 115: 787–798
- Yekta, S., Shih, I.H., and Bartel, D.P. (2004). **MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA.** *Science* 304: 594–596
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP.(2002). **MicroRNAs in plants.** *Genes Dev.* 16:1616–26
- Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC. (2005). **Expression of Arabidopsis MIRNA genes.** *Plant Physiol.* 138:2145–54
- Kurihara Y, Watanabe Y. (2004). **Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:12753–58
- Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS. (2005). **Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:3691–96
- Dong, Z., Han, M.H. and Fedoroff, N. (2008) **The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 105 , 9970–9975
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G.J. (2004) **Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi.** *Science* , 305 , 1437–1441
- Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, et al. (2003). **The microRNAs of Caenorhabditis elegans.** *Genes Dev.* 17:991–1008

- Boute t S, Vazquez F , L iu J, Beclin C, Fagard M, et al. (2003) **Arabidopsis HEN1: A genetic link b etween endogenous m iRNA contro lling d evelopmen t and siRNA controllin g tran sgene silencing and virus resistance.** *Curr B io l* 13: 843–848
- Bollman KM, Aukerman MJ, Park MY, Hunter C, Berardini TZ, Poethig RS. (2003). **HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and mor-phogenesis.** *Development* 130:1493–504
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. (2001). **RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs.** *Genes Dev.* 15:188–200
- Hamilton AJ, Baulcombe, DC. (1999). **A novel species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing.** *Science* 286:950–52
- Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC. (2002). **Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants.** *Plant Cell* 14:1605–19
- Baulcombe D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431:356–63
- Allen, E. et al. (2005) **microRNA-directedphasing during trans-actingsiRNA biogenes is in plants.** *Cel l* 121, 207–221
- Peragine, A. et al. (2004) **SGS3 and SGS2 / SDE1 / RDR6 are required for juvenil e develop ment and the production of trans -ac ting siRNAs in Arabidopsis.** *Gen es Dev.* 18, 2368–2379
- Gascioli, V. et al. (2005) **Partially redund ant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-actingsiRNAs.** *Curr. Biol.* 15, 1494–1500
- Adenot, X. et al. (2006) **DRB4-depen dent TAS 3 trans -acting siRNAs control leaf morp hology through AGO7.** *Curr. Biol.* 16, 927–932
- Hunter, C. et al. (2006) **Trans -acting siRNA-med iated repressi on of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in Arabidopsis.***Development* 133, 2973–2981
- Xie, Z., and Qi, X. (2008). **Diverse small RNA-directed silencing path-ways in plants.** *Biochim.Biophys.Acta* 1779: 720–7 24

- Borsani, O. et al. (2005) **Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis.** *Cell* 123, 1279– 1291
- Liu, Q., Feng, Y., and Zhu, Z. (2009). **Dicer-like (DCL) proteins in plants.** *Funct. Integr. Genomics* 9: 277–286
- Hopper AK, Phizicky EM. (2003) **tRNA transfers to the limelight.** *Genes Dev.* Jan 15; 17(2):162-80. Review
- Pestova, T.V., Lorsch, J.R., and Hellen, C.U.T. (2007). **The mechanism of translation initiation in eukaryotes.** In *Translational Control in Biology and Medicine*, M. Mathews, N. Sonenberg, and J.W.B. Hershey, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 87–128
- Antoun, A., Pavlov, M.Y., Lovmar, M., and Ehrenberg, M. (2006). **How initiation factors maximize the accuracy of tRNA selection in initiation of bacterial protein synthesis.** *Mol. Cell* 23 , 183–193
- Schuler, M., Connell, S.R., Lescoute, A., Giesebrecht, J., Dabrowski, M., Schroeder, B., Mielke, T., Penczek, P.A., Westhof, E., and Spahn, C.M. (2006). **Structure of the ribosome-bound cricket paralysis virus IRES RNA.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13 , 1092–1096
- Gomez, E., Mohammad, S.S., and Pavitt, G.D. (2002). **Characterization of the minimal catalytic domain within eIF2B: the guanine-nucleotide exchange factor for translation initiation.** *EMBO J.* 21 , 5292–5301
- Sonenberg N, Hinnebusch AG (2009) **Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets.** *Cell.* 2009 Feb 20; 136(4):731-45.
- Mogk A, Schmidt R, Bukau B. (2007). **The N-end rule pathway for regulated proteolysis: Prokaryotic and eukaryotic strategies.** *Trends Cell Biol* 17: 165–172
- Dever TE, Hinnebusch AG. (2005). **GCN2 whets the appetite for amino acids.** *Mol Cell* 18: 141–142

- Mei Y, Yong J, Liu H, Shi Y, Meinkoth J, Dreyfuss G, Yang X. (2010). **tRNA binds to cytochrome c and inhibits caspase activation.** *Mol Cell* 37: 668–678
- Zaitseva L, Myers R, Fassati A. (2006). **tRNAs promote nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes.** *PLoS Biol* 4: e332. doi: 10.1371/journal.pbio.0040332
- Eric M. Phizicky and Anita K. Hopper (2010) **tRNA biology charges to the front** 24: 1832-1860 *Genes Dev*
- Whitney ML, Hurto RL, Shaheen HH, Hopper AK. (2007). **Rapid and reversible nuclear accumulation of cytoplasmic tRNA in response to nutrient availability.** *Mol Biol Cell* 18: 2678–2686
- Kadaba S, Wang X, Anderson JT. (2006) **Nuclear RNA surveillance in *Saccharomyces cerevisiae* : Trf4p-dependent poly-adenylation of nascent hypomethylated tRNA and an aberrant form of 5S rRNA.** *RNA* 12: 508–521
- Chernyakov I, Whipple JM, Kotelawala L, Grayhack EJ, Phizicky EM. (2008) **Degradation of several hypomodified mature tRNA species in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by Met22 and the 5'-3' exonucleases Rat1 and Xrn1.** *Genes Dev* 22: 1369–1380
- Haiser, H.J., Karginov, F.V., Hannon, G.J. and Elliot, M.A. (2008) **Developmentally regulated cleavage of tRNAs in the bacterium *Streptomyces coelicolor*.** *Nucleic Acids Res.* , 36 , 732–741
- Jochl, C., Rederstorff, M., Hertel, J., Stadler, P.F., Hofacker, I.L., Schrettl, M., Haas, H. and Huttenhofer, A. (2008) **Small ncRNA transcriptome analysis from *Aspergillus fumigatus* suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis.** *Nucleic Acids Res*
- Thompson, D.M., Lu, C., Green, P.J. and Parker, R. (2008) **tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes.** *RNA* , 14, 2095–2103
- Lee, S.R. and Collins, K. (2005) **Starvation-induced cleavage of the tRNA anticodon loop in *Tetrahymena thermophila*.** *J. Biol. Chem.* , 280 , 42744–42749

- Garcia-Silva,M.R., Frugier,M., Tosar,J.P., Correa-Dominguez,A., Ronalte-Alves,L., Parodi-Talice,A., Rovira,C., Robello,C., Goldenberg,S. and Cayota,A. (2010) **A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in Trypanosoma cruzi and recruited to specific cytoplasmic granules.** Mol. Biochem. Parasitol. , 171 , 64–73
- Li,Y., Luo,J., Zhou,H., Liao,J.Y., Ma,L.M., Chen,Y.Q. and Qu,L.H. (2008) **Stress-induced tRNA-derived RNAs: a novel class of small RNAs in the primitive eukaryote Giardia lamblia.** Nucleic Acids Res. , 36, 6048–6055
- Kawamura,Y., Saito,K., Kin,T., Ono,Y., Asai,K., Sunohara,T., Okada,T.N., Siomi,M.C. and Siomi,H. (2008) **Drosophila endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells.** Nature , 453 , 793–797
- Hsieh,L.C., Lin,S.I., Kuo,H.F. and Chiou,T.J. (2010) **Abundance of tRNA-derived small RNAs in phosphate-starved Arabidopsis roots.** Plant Signal Behav, 5, 537–539
- Fu,H., Feng,J., Liu,Q., Sun,F., Tie,Y., Zhu,J., Xing,R., Sun,Z. and Zheng,X. (2009) **Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells.** FEBS Lett. , 583 , 437–442
- Ivanov P, Emara MM, Villen J, Gygi SP, Anderson P. (2011) **Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation.** Mol Cell. Aug 19;43(4):613-23.
- Barbara Nawrot , Elzbieta Sochacka, Markus Duchlert (2011) **RNA structural and functional changes induced by oxidative stress** Cell. Mol. Life Sci. 68:4023–4032
- Elbarbary RA, Takaku H, Uchiumi N, Tamiya H, Abe M, Takahashi M, Nishida H, Nashimoto M (2009) **Modulation of gene expression by human cytosolic tRNase Z(L) through 5'-half-tRNA.** PLoS One 4:e5908
- Emara, M.M., Ivanov, P., Hickman, T., Dawra, N., Tisdale, S., Kedersha, N., Hu, G.F., and Anderson, P. (2010) **Angiogenin-**

- **induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly.** *J Biol Chem.* 285, 10959-10968
- 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 Dev* 24:1590–1595
- Lee YS, Shibata Y, Malhotra A, Dutta A. (2009) **A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs).** *Genes Dev* 23: 2639–2649
- Cole C, Sobala A, Lu C, Thatcher SR, Bowman A, Brown JW, Green PJ, Barton GJ, Hutvagner G. (2009), **Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs.** *RNA.* Dec;15(12):2147-60
- Haussecker D, Huang Y, Lau A, Parameswaran P, Fire AZ, Kay MA. (2010), **Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing.** *RNA.* Apr;16(4):673-95
- Joshua E. Babiarz,^{1,3} J. Graham Ruby,^{2,3} Yangming Wang,¹ David P. Bartel,^{2,5} and Robert Blelloch¹ (2008) **Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs**
- Zhihua Li ^{1,2}, Christine Ender ³, Gunter Meister ³, Patrick S. Moore ², Yuan Chang ² and Bino John ^{1,2} (2012) **Extensive terminal and asymmetric processing of small RNAs from rRNAs, snoRNAs, snRNAs, and tRNAs** *Nucleic Acids Research*, , 1–13
- Couvillion et al., (2012) **A Tetrahymena Piwi Bound to Mature tRNA 3' Fragments Activates the Exonuclease Xrn2 for RNA Processing in the Nucleus.** *Molecular Cell* <http://dx.doi.org/10.1016/j.mol.cel.2012.09.010>
- Hsieh LC, Lin SI, Shih AC, Chen JW, Lin WY, Tseng CY, Li WH, Chiou TJ (2009), **Uncovering small RNA-mediated responses to**

phosphate deficiency in Arabidopsis by deep sequencing. Plant Physiol. Dec;151(4):2120-32

- Hackenberg M , Shi B-J, Gustafson P , Langridge P (2012) **A Transgenic Transcription Factor (TaDREB3) in Barley Affects the Expression of MicroRNAs and Other Small Non-Coding RNAs.** PLoS ONE 7(8): e42030. doi:10.1371/journal.pone.0042030
- Wang et al., (2011): **A novel class of heat-responsive smallRNAs derived from the chloroplast genome of Chinese cabbage (Brassica rapa).** BMC Genomics 12 :289
- Melissa S. Hillwig · Nicole D. LeBrasseur · Pamela J. Green · Gustavo C. MacIntosh (2008) **Impact of transcriptional, ABA-dependent, and ABA-independent pathways on wounding regulation of RNS1 expression.** Mol Genet Genomics 280:249–261
- Taylor CB, Green PJ (1991) **Genes with homology to fungal and S-gene RNases are expressed in Arabidopsis thaliana.** Plant Physiol 96:980–984
- Melissa S. Hillwig, Anthony L. Contento, Alexander Meyer, Danielle Ebany Diane C. Bassham and Gustavo C. MacIntosh (2011) **RNS2, a conserved member of the RNase T2 family, is necessary for ribosomal RNA decay in plants.** Proc Natl Acad Sci U S A. January 18; 108(3): 1093–1098
- Linda A. Ryamarquis, Frederic F. Souret, and Pamela J. Green (2011), **Evidence that XRN4, an Arabidopsis homolog of exoribonuclease XRN1, preferentially impacts transcripts with certain sequences or in particular functional categories** RNA 17:501–511
- Chen CJ, Liu Q, Zhang YC, Qu LH, Chen YQ, Gautheret D (2011) **Genome-**

- **wide discovery and analysis of microRNAs and other small RNAs from rice embryogenic callus RNA biology** 8(3):538-47
- Chenggang Liu, Michael J. Axtell, and Nina V. Fedor (2012) **The Helicase and RNaseIIIa Domains of Arabidopsis Dicer-Like1 Modulate Catalytic Parameters during MicroRNA Biogenesis** Plant Physiol. Jun;159(2):748-58
- Allison Mallory and Herve Vaucheret (2011) **Form, Function, and Regulation of ARGONAUTE Proteins** The Plant Cell, Vol. 22: 3879–3889

