



## tsRNA研究进展与展望\*

谭冬梅<sup>1)</sup> 谭毅<sup>1)\*\*</sup> 段恩奎<sup>2)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup> 重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016; (<sup>2)</sup> 中国科学院动物研究所干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要** tRNA-derived small RNAs (tsRNA) 是近年来发现的、存在于多种生物体内的一类非编码小RNA, 来源于成熟tRNA或tRNA前体, 其表达和修饰具有组织和细胞特异性。tsRNA参与应激反应、蛋白质翻译调控、核糖体生物合成、肿瘤发生、细胞增殖与凋亡、表观遗传信息的跨代传递等多种生理和病理过程。本文主要对tsRNA的生成及分类、已知的生物学功能及作用机理、tsRNA及其修饰在疾病中的作用等进行了综述。

**关键词** tsRNA, RNA修饰, 蛋白质翻译, 转座子, 生物学标志物, RNA测序

**中图分类号** Q7, Q5

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2019.0163

tsRNA (tRNA-derived small RNAs) 是近年发现的一类非编码小RNA, 由成熟tRNA或tRNA前体经Angiogenin、Dicer、RNase Z和RNase P等酶切割产生, 在不同文献中也被称为tRF (tRNA-derived fragments)、tiRNA (tRNA-derived Stress-induced RNAs)、tRNA halves等。tsRNA存在于多种生物体的组织细胞, 其表达类型、丰度及修饰与性别、种族、组织细胞类型和疾病状态等相关。由于来源于tRNA, tsRNA含有丰富的RNA修饰, 一些tsRNA上的RNA修饰已被证明具有重要的生物学功能, 如转录后蛋白质翻译调控、核糖体生物合成、表观遗传信息的跨代传递、干细胞生物学、细胞增殖与凋亡调节等。本文主要对tsRNA的生成及分类、生物学功能及作用机理、tsRNA及其修饰在疾病中的作用等方面的最新进展进行了综述。

### 1 tsRNA的生成与分类

#### 1.1 tRNA的结构及功能

tRNA基因经RNA聚合酶III (RNA Pol III) 转录形成包含5' leader和3'多聚U的trailer序列的tRNA前体 (pre-tRNA), 随后核糖核酸酶P (RNase P) 去除5'端的leader序列, 核糖核酸酶Z (RNase Z) 去除3'端的trailer序列, 由核苷酸转移酶在3'末端加上“CCA”序列, 并经过转录后的修饰和折叠形成三叶草结构, 成为成熟的tRNA<sup>[1-2]</sup>。

在脊椎动物中, 成熟的tRNA由核输出受体 (在非洲爪蟾称为exportin-T) 转移到胞质<sup>[3]</sup>。三叶草样的tRNA由D环、反密码子环、TΨC环和一个氨基酸接受臂组成。此外, 反密码环与TΨC茎之间有一个可变臂。

tRNA作为一种古老的RNA广泛存在于整个生物王国, 是细胞内翻译机器的核心成分, 活化后的氨酰tRNA能够将所携带的氨基酸准确地转运到正在合成的肽链上, 在遗传信息的翻译过程中发挥着重要作用。除了识别mRNA上的密码子转运氨基酸外, 近年来发现tRNA能够在生理或病理条件下被切割产生一类新的小RNA, 即tsRNA (tRNA-derived small RNAs)<sup>[4-9]</sup>。目前, 对这类小RNA还没有统一的命名, 在不同文献中也被称为tRF (tRNA-derived fragments)、tiRNA (tRNA-derived Stress-induced RNAs)等。然而, 我们认为tiRNA名字只适用于应激条件, tRF的名字暗示这类小RNA为降解产物, 这与目前越来越多的tsRNA功能研究结果不符合, 而tsRNA的名称与这类小RNA迅速扩展的功能研究更加匹配, 故我们在文

\* 国家自然科学基金(31601206, 31671568, 31171436)资助项目。

\*\* 通讯联系人。

谭毅. Tel: 023-68485997, E-mail: tanyee66@126.com

段恩奎. Tel: 010-64807310, E-mail: duane@ioz.ac.cn

收稿日期: 2019-07-19, 接受日期: 2019-10-21

章中将其统称为“tsRNA”<sup>[10-13]</sup>. 近年来, 越来越多的文章开始选择应用“tsRNA”这个名称.

## 1.2 tsRNA的生成与分类

根据 tsRNA 在 tRNA 上的位置可分为如下三类:

### 1.2.1 5' tsRNA

5' tsRNA 来自成熟 tRNA 的 5' 末端. 包括在热休克、低氧、紫外辐照、氧化应激、氨基酸缺乏、病毒感染等应激状态下, 由 angiogenin、RNY1、RNase L 等<sup>[14-17]</sup> 切割 tRNA 反密码环产生的 5' tRNA halves, 以及在非应激条件下, 由 Dicer 或其他核酸酶切割 D 环或者 D 环与反密码环间的茎产生 5' tRF<sup>[5, 18]</sup>. 5' tsRNA 在非应激条件下也可检测到, 比如正常生理情况下, 脊椎动物的成熟精子<sup>[10]</sup>、血清<sup>[11, 19]</sup> 中富含大量 5' tsRNA.

### 1.2.2 3' tsRNA

3' tsRNA 来自成熟 tRNA 的 3' 末端, 其 3' 末端有成熟 tRNA 标志性的 CCA 序列. 包括应激状态下, 反密码环被切割产生的 3' tRNA halves 以及 Dicer 或其他核酸酶切割 T $\Psi$ C 环<sup>[5]</sup>、T $\Psi$ C 环与反密码环之间的茎<sup>[20]</sup> 产生的 3' tRF 两大类.

### 1.2.3 其他tsRNA

包含来自 pre-tRNA 的 tsRNA 以及来自非 5' 和 3' 末端的 internal tsRNA. 来自 pre-tRNA 的 tsRNA 由细胞质中的 RNase Z 剪切而来<sup>[5]</sup>, 通常包含有连续 U 的末端序列. Internal tsRNA 是一类仅含有 tRNA 的反密码茎和环的 tsRNA<sup>[21-25]</sup>, 参与其生成的核糖核酸酶尚不清楚.

## 2 tsRNA的生物学功能及作用机理

tsRNA 广泛存在于多种物种, 具有进化保守性<sup>[26]</sup>. 有趣的是, 在一些缺乏典型小 RNA 如 miRNA、siRNA 和 piRNA 等的单细胞生物 (例如原生动物) 中, 仍然发现了大量的 tsRNA<sup>[27-29]</sup>, 这些 tsRNA 可富集在单细胞生物的外泌体中参与细胞通讯<sup>[27]</sup>. 另外, 在细菌与古细菌等古老生物中也存在 tsRNA. 这些证据提示, tsRNA 也许是参与细胞内和细胞间通信的最古老的 sRNA 之一<sup>[30]</sup>.

tsRNA 具有广泛的生物学作用<sup>[26, 31]</sup>, 包括细胞和组织的应激反应<sup>[32]</sup>、蛋白质翻译调控<sup>[33]</sup>、肿瘤发生<sup>[34]</sup>、干细胞生物学<sup>[35-36]</sup>、核糖体生物合成<sup>[20]</sup>、转座子调控<sup>[37]</sup>、表观遗传调控<sup>[12-13, 38-39]</sup>、凋亡抑制<sup>[40]</sup>、免疫反应<sup>[11, 41]</sup> 等方面, 这些生物学功能的发挥具有组织和细胞特异性, 涉及的分子机

理多种多样, 现将近年来研究得比较清楚的分子机理总结如下.

### 2.1 调控蛋白质翻译启动

在应激条件下, angiogenin 在反密码环处切割 tRNA 产生 5' tsRNA 和 3' tsRNA, 其中 5' tsRNA, 而非 3' tsRNA 可抑制整体的蛋白质合成<sup>[32]</sup>. 最近研究发现, 有 TOG (a terminal oligo-G motif) 的 5' tsRNA<sup>Ala</sup> 和 5' tsRNA<sup>Cys</sup> (~30 nt) 能形成分子间的 RG4 (RNA G-quadruplexes), 替代 mRNA 帽子 (m<sup>7</sup>GTP) 结构上的翻译起始复合物 eIF4G/eIF4E, 从而抑制翻译<sup>[42]</sup>. 此外, TOG-5' tsRNA 结合到 YBX1 (Y-box binding protein 1), 促进应激颗粒的组装, 将翻译起始因子与蛋白质翻译的核糖体机器“隔离” (sequestration) 起来, 进一步增加了整体翻译的抑制效应<sup>[43]</sup>.

RNA 修饰在 5' tsRNA 介导的翻译调控中也具有重要作用<sup>[35]</sup>. 近期的研究发现, 假尿苷合成酶 PUS7 在人胚胎干细胞 (hESC) 和/或造血干细胞 (HSC) 表达丰富, 且可与不同的 tsRNA 结合, 将其第 8 位上的 U (U8) 转变为  $\Psi$  ( $\Psi$ 8), 并调控 tsRNA 的生成. PUS7 缺失可导致 ~18 nt 的  $\Psi$ -TOG-5' tsRNA 水平明显降低, 翻译启动被异常触发, 从而使得蛋白质整体合成增加. 用  $\Psi$ 8-TOG-5' tsRNA 转染 PUS7-KO hESC 能恢复其蛋白质的合成; 而用 U8-TOG-5' tsRNA 则不能恢复. 在分子机制层面,  $\Psi$ 8-TOG-5' tsRNA 能优先与翻译起始复合物中的另一种起始因子 PABPC1 (polyadenylate-binding protein 1, PABPC1) 结合, 替代 mRNA 帽子结构上的 PABPC1 和 eIF4A/G 复合物, 最终导致翻译的抑制. 而且, PABPC1 缺失能降低 PUS7-KO hESC 整体的蛋白质合成, 与  $\Psi$ 8-TOG-5' tsRNA 的表型类似. 以上结果揭示了  $\Psi$ 8 参与调控 5' tsRNA 对翻译调节的新作用.

值得注意的是, 18 nt U8-TOG-5' tsRNA 与 YBX1 有很强的亲和力, 但与能形成 RG4 的 30 nt TOG-5' tsRNA 不同的是, 18 nt U8-TOG-5' tsRNA 不能替代 eIF4A/G<sup>[35, 43]</sup>, 提示这些 tsRNA 可能因长度和修饰的不同, 形成了不同的二级结构以及蛋白质结合偏好. 另外, 低氧应激可诱导产生一类主要来自 tRNA internal 区域的 tsRNA, 这类 tsRNA 能与 YBX1 结合, 使得与 YBX1 结合的多种致癌基因转录本 RNA 脱落而失去稳定性 (YBX1 与这些 mRNA 的结合能够增加它们的稳定性并促进蛋白质表达), 从而抑制乳腺癌的转移<sup>[21]</sup>. 这些证据表

明, 不同的 tsRNA 以组织/细胞特异的方式介导翻译的调节机制.

## 2.2 依赖 AGO 的翻译抑制——通过靶向特异性 mRNA

研究报道, Dicer 切割生成的 21~22 nt 3' CCA-tsRNA 可以与 AGO 结合, 以序列特异性的方式抑制 mRNA 的翻译, 提示这类 tsRNA 有 miRNA 样的调节基因表达作用<sup>[44]</sup>. 最近在果蝇的研究中进一步发现, 很多 5' tsRNA 能够以 7-mer 与 mRNAs 保守靶点进行反义配对, 通过与 AGO 结合的方式抑制靶基因 mRNA 的翻译, 但不影响 mRNA 水平, 且 5' tsRNA 靶点不仅位于 mRNA 的 3' UTRs, 而且也在 5' UTRs 或者 CDSs. 有趣的是, tsRNA 能够优先靶向抑制翻译机器的关键成分, 如核糖体蛋白 (RPs) 和翻译启动或延伸因子 (IEFs) 的 mRNA, 从而抑制整体的蛋白质翻译<sup>[45]</sup>. 在血清饥饿时, 某些 5' tsRNA 明显增加, 这与 RPs 和 IEFs 的翻译降低相关, 且 tsRNA 介导的翻译抑制依赖于 AGO2, 但这些 tsRNA 和 miRNA 介导的基因靶点在很大程度上是相互独立的<sup>[45]</sup>. 以上结果显示, tsRNA 优先抑制核糖体生物合成 (如 RPs) 和翻译调节 (如 IEFs) 所必需的基因, 从而抑制整体的蛋白质合成. tsRNA 对 RPs 和 IEFs 靶向偏好的机制尚不清楚, 但可能是二者长期协同进化的结果.

最近研究表明, tsRNA 能通过 AGO 结合的方式影响靶基因 mRNA 的表达. 在酒精性脂肪性肝病发生中, 补体 C3 激活的产物通过 CYP2E1 促进 tsRNA<sup>Gly</sup> 的生成. tsRNA<sup>Gly</sup> 与 AGO3 相互作用, 通过与靶基因 mRNA 的 3' UTR 序列互补, 降低 sirtuin1 (Sirt1) 表达, 从而促进酒精诱导的肝损伤和脂肪变性<sup>[46]</sup>. 此外, tsRNA 还是原核生物与真核生物之间跨界传递的一种信号分子. 根瘤菌产生的 tsRNA 能够与宿主 (大豆) 的 AGO1 结合, 切割宿主细胞靶基因 mRNA, 从而调节大豆根瘤的形成<sup>[47]</sup>.

## 2.3 不依赖 AGO 的翻译调节——结构效应

研究发现, 一种长度为 22 nt 的 3' tsRNA<sup>Leu (CAG)</sup> 不与任何已知的 AGO 蛋白结合, 且不能抑制与之有完全互补靶点的荧光素酶的表达, 但 3' tsRNA<sup>Leu (CAG)</sup> 能增加体外快速分裂细胞 (HeLa 和 HCT-116) 和 PDX HCC 小鼠肿瘤模型的细胞活力, 抑制 3' tsRNA<sup>Leu (CAG)</sup> 能够诱导肿瘤细胞的凋亡<sup>[20]</sup>. 进一步发现, 3' tsRNA<sup>Leu (CAG)</sup> 通过碱基配对特异性地结合到核糖体蛋白 RPS28 和 RPS15 的 mRNA 上, 解开靶点的 duplexed 二级结构, 增加这些核糖体蛋

白的翻译, 从而增强 40 S 核糖体的合成. 对 3' tsRNA<sup>Leu (CAG)</sup> 进行抑制导致 RPS28 的蛋白质翻译减少, 阻断 18 S rRNAs 前体的加工, 导致 40 S 核糖体数量减少, 从而削弱 80 S 核糖体的组装. 更重要的是, 3' tsRNA<sup>Leu (CAG)</sup> 不能增加有相似靶序列但无二级结构的其他 RPS (如 RPS9、RPS14) mRNA 的翻译, 提示 tsRNA 介导的 RPS mRNA 二级结构改变是调控的关键<sup>[20]</sup>.

另一项研究发现, 在富盐菌中, 应激诱导的 5' tsRNA<sup>Val</sup> 在 mRNA 进入点附近与核糖体小亚基 16 S rRNA 结合, 通过干扰肽基转移酶的活性<sup>[18]</sup> 和替代翻译起始复合物中的 mRNA<sup>[48]</sup>, 导致翻译的整体抑制, 这种基于 tsRNA-rRNA 相互作用的翻译调控也可解释与 mRNA 靶点无互补配对的 tsRNA 介导的翻译抑制<sup>[49]</sup>. 在酵母, 3' tsRNA 和 5' tsRNA 在体外均能以应激依赖的方式直接与核糖体结合, 从而抑制蛋白质的合成, 但是结合位点不是经典 A-和 P-tRNA 结合点, 且 3' tsRNA 与 5' tsRNA 的结合位点不同, 表明存在一种 tsRNA 参与的古老而保守的翻译调控机制<sup>[50]</sup>. 进一步发现, 这些 3' tsRNA 和 5' tsRNA 可与核糖体小亚基和氨酰 tRNA 合成酶结合, 通过干扰 tRNA 的氨酰化以抑制翻译<sup>[51]</sup>. 在营养剥夺时, 布氏锥虫会生成丰富的 3' tsRNA<sup>Thr</sup>. 一旦终止饥饿状态 (即应激恢复时), 3' tsRNA<sup>Thr</sup> 能与核糖体和多聚核糖体结合, 通过促进 mRNA 的装载以增强蛋白质的翻译<sup>[52]</sup>.

总之, 不同 tsRNA 用不同的方式来调节翻译机器的多方面, 尤其是 RNA 的修饰和 RNA 的二级结构进一步放大了 tsRNA 的功能.

## 2.4 转座子的调控

转座子 (transposon elements, TE) 是基因组中一段可移动的 DNA 序列, 可以通过切割、重新整合等一系列过程从基因组的一个位置“跳跃”到另一个位置, 这种转座对宿主基因组有潜在的危害. 因此转座子的转录常常被 DNA 甲基化或者组蛋白修饰等表观遗传标记所抑制<sup>[53]</sup>. 最近发现<sup>[37]</sup>, 小鼠胚胎干细胞中存在大量的 tsRNA, 其中来源于成熟 tRNA 的 3' 末端、长度分别为 18 nt 和 22 nt 的 tsRNA (18-nt-3' tsRNA 和 22-nt-3' tsRNA) 的序列能与长末端重复序列的反转录转座子 (也称 endogenous retroviruses, ERV) 匹配, 进一步通过在 HeLa 细胞的反转录转座实验发现: 18-nt-3' tsRNA 与成熟 tRNA 竞争性地结合到 ERV 的引物结合位点 (primer binding sequence, PBS), 从而阻

断其逆转录,影响ERV的cDNA合成;而22-nt-3' tsRNA则通过诱导编码蛋白质的mRNA的转录后沉默来抑制ERV.这种机制的差异可能与22-nt-3' tsRNA的5'末端有m<sup>1</sup>A和Ψ的修饰有关<sup>[54]</sup>,这些修饰可能有助于改变RNA结构,影响与PBS或沉默复合物的识别.

另一项研究发现,植物雄配子(如拟南芥的花粉)富含一种由Dicer-like1(DCL1)加工形成的19-nt-5' tsRNA,它有miRNA样的生物起源、定位和功能,能与AGO1结合,特异性地靶向切割TE mRNA,从而调节基因组的稳定性<sup>[55]</sup>.

### 3 RNA修饰对tsRNA的生物学影响

#### 3.1 RNA修饰对tsRNA生成的影响

tRNA是体内修饰最丰富、最广泛的RNA,尤其是核编码的tRNA,每分子tRNA平均有13个修饰<sup>[56]</sup>.越来越多的证据表明,tRNA的修饰能改变核酸内切酶切割tRNA的效率,调节tsRNA的生成<sup>[57]</sup>.细菌和真菌的各种核酸内切酶活性依赖于其靶tRNA的反密码环上特定核苷酸修饰.如大肠杆菌tRNA<sup>Tyr/Asn/His/Asp</sup>反密码环摆动位置的queuosine(Q34)修饰能增加RNA酶ColicinE5的活性<sup>[58]</sup>,而且tRNA<sup>Lys</sup>第37位腺苷酸修饰(t<sup>6</sup>A37)或第34位5-甲基氨基-2-硫尿核苷修饰(mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U34)能增强细菌PrrC的活性,但第39位的假尿苷修饰(Ψ39)却抑制酶的活性<sup>[59]</sup>.在乳酸克鲁维酵母中,tRNA<sup>Glu(UUC)</sup>、tRNA<sup>Lys(UUU)</sup>和tRNA<sup>Gln(UUG)</sup>第34位的mcm<sup>2</sup>s<sup>2</sup>U修饰对zymocin(γ-toxin)在反密码环摆动位置的切割非常重要<sup>[60]</sup>.在人类细胞中,RNase L对tRNA<sup>His</sup>第36位特异性地切割是由反密码环第34位G到Q的修饰所介导<sup>[17]</sup>.

tRNA修饰在调节应激诱导的tRNA切割中起着重要作用.DNMT2(DNA methyltransferase 2)和NSUN2(NOP2/Sun RNA methyltransferase family member 2, Nsun2)介导的m<sup>5</sup>C修饰,能增加tRNA的稳定性,是维持果蝇<sup>[61]</sup>和小鼠<sup>[62]</sup>正常生长和发育所必需的.m<sup>5</sup>C的缺失增加细胞应激情况下ANG与tRNA的结合能力,使得tRNA容易在反密码环处被切割,产生更多的tsRNA<sup>[63-64]</sup>.有趣的是,来源于食物或者微生物的一种营养成分queuine是tRNA G34 queuosine修饰(Q-tRNA)的底物,且Q-tRNA的水平促进Dnmt2介导的tRNA m<sup>5</sup>C修饰<sup>[65-66]</sup>.在无菌小鼠和人类癌细胞系中,queuine的营养性剥夺导致异常的tRNA<sup>Asp</sup>甲基化

(m<sup>5</sup>C)和蛋白质合成.此外,queuine的缺失增加细胞应激时的tsRNA水平<sup>[67]</sup>,这可能与m<sup>5</sup>C缺乏所诱导的tsRNA累积有关.

#### 3.2 tsRNA修饰对tsRNA功能的影响

tsRNA上的修饰增加了RNA结构和功能的多样性.某些RNA的修饰,如m<sup>1</sup>A能阻断Watson-Crick的碱基配对,在折叠过程中产生一些意想不到的RNA二级结构<sup>[68]</sup>.最近研究发现,添加或者去除tsRNA特异位点的m<sup>5</sup>C能改变tsRNA的二级结构,从而改变tsRNA对RNA酶消化的抵抗力.RNA结构的改变还影响细胞的转录组谱,改变其生物学功能<sup>[11]</sup>.血清tsRNA除了与蛋白质结合外,tsRNA修饰也增加了其稳定性<sup>[11]</sup>.有研究报道,tsRNA上的假尿嘧啶核苷(Ψ)有助于tsRNA与翻译起始复合物中的特定蛋白质结合,从而影响蛋白质的整体翻译效率<sup>[35]</sup>.

小鼠成熟精子中含有大量的tsRNA,其含量远高于miRNA和piRNA<sup>[10]</sup>.在高脂饮食诱导的父代肥胖小鼠模型,成熟精子中的tsRNA表达谱发生改变,通过给正常受精卵注射富含tsRNA的30~40 nt区段的精子RNA可将高脂诱导的父代代代谢紊乱表型(如糖耐量异常)传递给子代<sup>[12]</sup>.不仅如此,在高脂饮食诱导的母代肥胖小鼠模型中,其F1代精子tsRNA表达增加,且能介导母代异常代谢表型(如肥胖、葡萄糖代谢异常)和享乐表型(如对美味食物的过度消耗、对酒精的偏好)的跨代传递<sup>[39]</sup>,提示精子中的tsRNA是一种可携带父源和母源环境信息的表观遗传信息的载体.另外,富含tsRNA的精子30~40 nt区段RNA中含有m<sup>5</sup>C、m<sup>2</sup>G、m<sup>1</sup>A和Ψ等多种RNA修饰<sup>[12-13]</sup>,高脂饮食能够导致该区段RNA中m<sup>5</sup>C、m<sup>2</sup>G修饰的增加,精子tsRNA等小RNA组分也发生变化.在DNMT2敲除小鼠,同样是高脂饮食诱导,精子30~40 nt区段的m<sup>5</sup>C、m<sup>2</sup>G修饰则恢复到正常水平,并且DNMT2敲除鼠的精子RNA不能将高脂饮食诱导的父代代代谢表型传递给子代<sup>[13]</sup>.这些结果提示,DNMT2介导的精子tsRNA修饰以及tsRNA表达谱变化对跨代传递高脂环境导致的代谢表型具有重要作用.

总之,tsRNA携带了从tRNA继承而来的多种RNA修饰,这些RNA修饰一方面赋予tsRNA丰富的二级结构,改变RNA-RNA、RNA与DNA和蛋白质的结合能力,另一方面也使得tsRNA更加稳定,能够耐受核酸酶的降解.然而,也正由于

tsRNA 上的 RNA 修饰和二级结构的复杂性, 使得研究 tsRNA 的功能和分子机制成为目前该领域的难点.

### 3.3 tsRNA 修饰对 RNA 测序的影响

目前使用的高通量 RNA 测序 (high-throughput RNA sequencing, RNA-seq) 已被广泛应用到基因表达测定等多方面. 在测序建库过程中, 需将 adaptor 连接到 RNA 两端, 随后用与 3' adaptor 互补的引物进行逆转录反应, 并通过 PCR 反应建立 cDNA 文库<sup>[69]</sup>. 对大多数的转录本来说, 这是一种非常有效的检测方法, 但此方法对有高度修饰和/或广泛折叠的 tRNA 检测则有难度, 因为其紧凑的三级结构限制了 adaptor 的连接效率, 同时, 一些 RNA 碱基的修饰, 例如 m<sup>1</sup>A、m<sup>1</sup>G、m<sup>3</sup>C 和 m<sup>2</sup>G, 会阻断 RNA 的逆转录过程. 近几年, 两个研究团队建立了基于去 RNA 修饰的测序方法<sup>[70]</sup>. 该方法涉及使用野生型或改造后的 ALKB 酶去除 RNA 上的 m<sup>1</sup>A、m<sup>1</sup>G 和 m<sup>3</sup>C 修饰, 然后再使用常规的 adaptor 连接和 cDNA 建库<sup>[71]</sup>, 或使用 TGIRT (thermostable group II intron reverse transcriptase) 代替常规的逆转录过程, 通过模板转换合成 cDNA<sup>[72]</sup>. 除此之外, 还有选择性扩增和测序 3' 末端含 cP (cyclic phosphate, cP) 的 cP-RNA-seq<sup>[73]</sup>、5' 末端含 OH 的 5'-OH-seq<sup>[74]</sup> 以及通过 T4 RNA 连接酶 2, 用 Y-型 adaptor 提高连接效率的 YAMAT-seq<sup>[75]</sup> 等多种针对不同 RNA 修饰的测序方法.

尽管有改进的二代 RNA 测序方法和全新的 sRNA 注释定量工具<sup>[76]</sup>, 但仍有部分 RNA 修饰干扰 cDNA 文库的构建, 从而使测序结果出现偏倚. 同时, RNA 二级结构如 RNA G4、RNA-RNA 相互作用可能进一步阻碍 sRNA 谱的获得. 因此, 还需要建立 tsRNA 新型检测技术.

## 4 tsRNA 及其修饰作为疾病生物学标志物的应用前景

早在 19 世纪 70 年代就从癌症病人的尿液和血清中鉴定出 tRNA 分解产物, 推测其可以作为癌症潜在的生物学标志物<sup>[77]</sup>. 随着基因组测序技术的发展, 已在多种人类疾病, 包括癌症、感染、神经退行性病变和其他病理状态下, 检测到 tsRNA 的改变. 最近, Godoy 等<sup>[78]</sup> 对正常人的 12 种体液进行了 sRNA 的分析, 发现每种体液含有多种生物学类型的 sRNA, 这些 sRNA 的丰度在各体液间差异很大, 如尿液中 tsRNA 极为丰富, 占 sRNA 的 90%

以上, 这为将特定的 tsRNA 开发成生物标志物提供了可能. 外周循环中的 tsRNA 对急性炎症、衰老、能量限制、急性肾脏疾病和组织损伤等具有敏感性, 可能是一类有用的非侵入性生物性标志物<sup>[11, 19, 79]</sup>.

### 4.1 应激和感染

在许多应激暴露或者病毒感染的组织细胞中, tsRNA 的丰度发生明显改变. 慢性乙型或丙型肝炎患者肝组织的 30~35 nt 的 5' tsRNA<sup>Gly</sup> 和 5' tsRNA<sup>Val</sup> 表达呈显著增加, 且其丰度高于 microRNA<sup>[80]</sup>. 在 LPS 诱导的小鼠和猴的急性炎症模型中以及人 HBV 感染的活动期, 血清 tsRNA 尤其是 tsRNA<sup>Gly</sup>、tsRNA<sup>Glu</sup> 明显升高<sup>[11]</sup>. 人类细胞感染呼吸道合胞病毒后可产生较丰富的 5' tsRNA, 这些 tsRNA 能以 miRNA 样的方式发挥作用, 尤其是 tsRNA<sup>Glu</sup> (CTC) 能与载脂蛋白 E 受体 2 (APOER2) mRNA 的 3' UTR 互补配对结合, 降低有抗病毒作用的 APOER2 的表达, 从而有利于病毒的复制<sup>[81]</sup>. 宿主细胞的 3' tsRNA<sup>Pro</sup> 能结合到人类 T 细胞白血病病毒 1 型 (human T-cell leukaemia virus type 1, HTLV-1) 的 PBS, 以诱发逆转录, 促进病毒的增殖<sup>[82]</sup>. 3' tsRNA<sup>Lys</sup> 结合到 HIV 基因组 RNA 的 PBS, 作为病毒的逆转录引物, 此 3' tsRNA 在细胞中的水平与 HIV 的增殖成正相关<sup>[83]</sup>. 以上结果提示, tsRNA 具有作为诊断和控制病毒感染的潜在价值.

### 4.2 肿瘤

在多种癌症中, tsRNA 出现异常表达, 且在癌症的进展中, tsRNA 的表达也发生改变. 3' tsRNA<sup>Ser</sup> (TGA) 是由 ELAC2/RNaseZ 切割 pre-tRNA<sup>Ser</sup> (TGA) 产生, 其表达与前列腺癌细胞系的增殖呈正相关, 促进癌细胞从 G2 期到 M 期的转变<sup>[5]</sup>. 同时, tsRNA 的表达与前列腺癌 (PCa) 的组织病理分级明显相关. 在复发的 PCa 中, tsRNA<sup>Phe</sup> (GAA) 较邻近正常组织出现明显下降, 而 tsRNA<sup>Lys</sup> (CTT) 却出现上调趋势, 在分级更高的 PCa 中表达更高, tsRNA<sup>Lys</sup> (CTT) /tsRNA<sup>Phe</sup> (GAA) 比率高的患者的生存期和复发期更短<sup>[84]</sup>. 因此, tsRNA<sup>Lys</sup> (CTT) /tsRNA<sup>Phe</sup> (GAA) 的表达比例可能是一个有价值的 PCa 进程标志物. 在肾透明细胞癌中, 5' tsRNA<sup>Val</sup> (AAC) 的表达也与肿瘤的分期和分级相关<sup>[85]</sup>. 5' tsRNA<sup>Leu</sup> (CAG) 在非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者组织中呈高丰度表达, 血清 5' tsRNA<sup>Leu</sup> (CAG) 水平与癌症分期具有明显的相关性, 抑制 5'

tsRNA<sup>Leu (CAG)</sup>能抑制细胞增殖、阻止细胞周期的进程<sup>[86]</sup>,而且能诱导PDX HCC小鼠肿瘤模型的细胞凋亡<sup>[20]</sup>.最近通过基因芯片技术,鉴定了包括慢性淋巴细胞白血病、肺癌、结肠癌、乳腺癌和卵巢癌等癌症的tsRNA指纹特征(tsRNA signature),发现tsRNA在多种癌症中被异常调节,而癌基因激活、肿瘤抑制因子的失活导致某些特异性tsRNA的异常调节<sup>[34]</sup>.此外,一类性激素依赖的tRNA来源的tsRNA特异性地高表达于雌激素受体阳性的乳腺癌细胞和雄激素受体阳性的前列腺癌细胞<sup>[87]</sup>,这类tsRNA由ANG切割氨酰化的成熟tRNA反密码环产生,其产生的5' tsRNA能增强细胞的增殖.小RNA深度测序和生物信息分析显示,血清5'-tsRNA有可能成为乳腺癌的生物学标志物<sup>[88]</sup>.以上结果提示,在癌症发生过程中,发生异常调节的tsRNA可能是疾病诊断、靶向治疗和预后等的生物学标志物.

### 4.3 衰老

果蝇中存在不同亚型的tsRNA,且与miRNA有很多结构和功能的相似性,包括末端含短“种子”序列、tsRNA的表达和与AGO1、AGO2的结合随着年龄变化而发生明显改变.值得注意的是,这些tsRNA的靶基因可能与神经元发育和功能密切相关,表明tsRNA在随年龄发生的大脑改变中发挥作用<sup>[89]</sup>.在线虫的衰老过程中,除了miRNA外,某些特定的tsRNA,如tsRNA<sup>Ala</sup>、tsRNA<sup>Leu</sup>,也出现增加,提示这些tsRNA涉及衰老和寿命的调节<sup>[90]</sup>.小鼠血清中存在丰富的5' tsRNA,其生成有tRNA类型的特异性,此类5' tsRNA以大分子复合物的形式存在.5' tsRNA主要集中于血细胞和造血组织,其他组织缺乏,表明它可能由血细胞产生.血清中特定亚型的5' tsRNA水平随着年龄的增长而发生明显改变,能量限制可在很大程度上减轻因衰老引起的改变,提示血清中5' tsRNA水平受年龄和能量限制的调节<sup>[19]</sup>.进一步数据分析发现,tsRNA<sup>Cys (GCA)</sup>和tsRNA<sup>Lys (CTT)</sup>在小鼠、果蝇和线虫的衰老过程中均发生明显改变.

### 4.4 tsRNA修饰与疾病

tRNA修饰的异常在细胞糖代谢中具有重要作用,与癌症、二型糖尿病、神经系统疾病和线粒体相关疾病等有关<sup>[91]</sup>.尽管tsRNA的修饰及其变化的潜在功能尚需进一步探索,但有研究显示,在急性细胞应激反应时,m<sup>1</sup>A抗体检测到的tRNA构象改变和循环中tsRNA的增加,可能是比细胞凋亡和

DNA损伤等其他标志物出现得更早的组织损伤迹象<sup>[79]</sup>.因此,利用特异性抗体检测修饰sRNA有望成为鉴定疾病早期生物学标志物的敏感方法.高通量的液相色谱串联质谱(high-throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)方法揭示了肝脏sRNA修饰的多样性.在糖尿病小鼠模型中,多种sRNA修饰(Gm、m<sup>5</sup>Cm、Cm、Am、Um)发生动态改变<sup>[92]</sup>.高脂饮食小鼠精子tsRNA修饰谱的改变伴随m<sup>5</sup>C和m<sup>2</sup>G水平升高,表明这些修饰可能传递父代代谢紊乱信息<sup>[13]</sup>.癌症病人尿液中核苷修饰谱的改变,可能成为临床诊断的生物学标志物<sup>[93]</sup>.因此,抗体和LC-MS/MS等RNA修饰检测方法的联合应用,可作为一种很有潜力的非侵入性检查方法,以帮助疾病的临床诊断和治疗.

## 5 小结与展望

tsRNA是近年发现的一类非编码小RNA,由不同的酶精确切割不同的tRNA或者tRNA前体产生.tsRNA表达和修饰具有组织和细胞特异性,通过调控蛋白质翻译和转座子等机制参与机体的多种生物学功能.要进一步认清tsRNA的生成和功能,还有诸多工作亟待开展.例如:a.须建立tsRNA上多种RNA修饰的定位检测技术;b.结合RNA修饰相关酶的研究,明确RNA修饰对tsRNA结构和功能的影响;c.开发tsRNA/RNA修饰的新型检测技术,如以单分子测序为特征的第三代RNA测序平台(如PacBio或Oxford Nanopore),同时获得RNA分子的序列和修饰信息;d.在生物体和分子层面进一步发掘tsRNA的生物学功能,例如精子tsRNA如何影响早期胚胎从而介导父代获得性表型的跨代遗传;e.tsRNA及其修饰作为疾病诊断、治疗和预后的生物学标志物的开发.

## 参 考 文 献

- [1] Phizicky E M, Hopper A K. tRNA biology charges to the front. *Genes & Development*, 2010, **24**(17): 1832-1860
- [2] Maraia R J, Lamichhane T N. 3' processing of eukaryotic precursor tRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 2011, **2**(3): 362-375
- [3] Xiong Y, Steitz T A. A story with a good ending: tRNA 3'-end maturation by CCA-adding enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 2006, **16**(1): 12-17
- [4] Li Y, Luo J, Zhou H, *et al.* Stress-induced tRNA-derived RNAs: a novel class of small RNAs in the primitive eukaryote *Giardia*

- lamblia. *Nucleic Acids Research*, 2008, **36**(19): 6048-6055
- [5] Lee Y S, Shibata Y, Malhotra A, *et al.* A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes & Development*, 2009, **23**(22): 2639-2649
- [6] Cole C, Sobala A, Lu C, *et al.* Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *RNA (New York, NY)*, 2009, **15**(12): 2147-2160
- [7] Couvillion M T, Sachidanandam R, Collins K. A growth-essential *Tetrahymena* Piwi protein carries tRNA fragment cargo. *Genes & Development*, 2010, **24**(24): 2742-2747
- [8] Liao J Y, Ma L M, Guo Y H, *et al.* Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers. *Plos One*, 2010, **5**(5): e10563
- [9] Li Z, Ender C, Meister G, *et al.* Extensive terminal and asymmetric processing of small RNAs from rRNAs, snoRNAs, snRNAs, and tRNAs. *Nucleic Acids Research*, 2012, **40**(14): 6787-6799
- [10] Peng H, Shi J, Zhang Y, *et al.* A novel class of tRNA-derived small RNAs extremely enriched in mature mouse sperm. *Cell Research*, 2012, **22**(11): 1609-1612
- [11] Zhang Y, Zhang Y, Shi J, *et al.* Identification and characterization of an ancient class of small RNAs enriched in serum associating with active infection. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2014, **6**(2): 172-174
- [12] Chen Q, Yan M, Cao Z, *et al.* Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science (New York, NY)*, 2016, **351**(6271): 397-400
- [13] Zhang Y, Zhang X, Shi J, *et al.* Dnmt2 mediates intergenerational transmission of paternally acquired metabolic disorders through sperm small non-coding RNAs. *Nature Cell Biology*, 2018, **20**(5): 535-540
- [14] Fu H, Feng J, Liu Q, *et al.* Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Letters*, 2009, **583**(2): 437-442
- [15] Yamasaki S, Ivanov P, Hu G F, *et al.* Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *The Journal of Cell Biology*, 2009, **185**(1): 35-42
- [16] Thompson D M, Parker R. Stressing out over tRNA cleavage. *Cell*, 2009, **138**(2): 215-219
- [17] Donovan J, Rath S, Kolet-Mandrikov D, *et al.* Rapid RNase L-driven arrest of protein synthesis in the dsRNA response without degradation of translation machinery. *RNA (New York, NY)*, 2017, **23**(11): 1660-1671
- [18] Gebetsberger J, Zywicki M, Kunzi A, *et al.* tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloflex volcanii*. *Archaea (Vancouver, BC)*, 2012, **2012**: 260909
- [19] Dhahbi J M, Spindler S R, Atamna H, *et al.* 5' tRNA halves are present as abundant complexes in serum, concentrated in blood cells, and modulated by aging and calorie restriction. *BMC Genomics*, 2013, **14**: 298
- [20] Kim H K, Fuchs G, Wang S, *et al.* A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis. *Nature*, 2017, **552**(7683): 57-62
- [21] Goodarzi H, Liu X, Nguyen H C, *et al.* Endogenous tRNA-derived fragments suppress breast cancer progression via YBX1 displacement. *Cell*, 2015, **161**(4): 790-802
- [22] Schaffer A E, Eggens V R, Caglayan A O, *et al.* CLP1 founder mutation links tRNA splicing and maturation to cerebellar development and neurodegeneration. *Cell*, 2014, **157**(3): 651-663
- [23] Karaca E, Weitzer S, Pehlivan D, *et al.* Human CLP1 mutations alter tRNA biogenesis, affecting both peripheral and central nervous system function. *Cell*, 2014, **157**(3): 636-650
- [24] Zheng L L, Xu W L, Liu S, *et al.* tRF2Cancer: A web server to detect tRNA-derived small RNA fragments (tRFs) and their expression in multiple cancers. *Nucleic Acids Research*, 2016, **44**(W1): W185-193
- [25] Telonis A G, Loher P, Honda S, *et al.* Dissecting tRNA-derived fragment complexities using personalized transcriptomes reveals novel fragment classes and unexpected dependencies. *Oncotarget*, 2015, **6**(28): 24797-24822
- [26] Kumar P, Kusc C, Dutta A. Biogenesis and function of transfer RNA-related fragments (tRFs). *Trends in Biochemical Sciences*, 2016, **41**(8): 679-689
- [27] Lambertz U, Oviedo Ovando M E, Vasconcelos E J, *et al.* Small RNAs derived from tRNAs and rRNAs are highly enriched in exosomes from both old and new world *Leishmania* providing evidence for conserved exosomal RNA Packaging. *BMC Genomics*, 2015, **16**: 151
- [28] Garcia-Silva M R, Das Neves R F, Cabrera-Cabrera F, *et al.* Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitology Research*, 2014, **113**(1): 285-304
- [29] Liao J Y, Guo Y H, Zheng L L, *et al.* Both endo-siRNAs and tRNA-derived small RNAs are involved in the differentiation of primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(39): 14159-14164
- [30] Szempruch A J, Dennison L, Kieft R, *et al.* Sending a message: extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, **14**(11): 669-675
- [31] Oberbauer V, Schaefer M R. tRNA-derived small RNAs: biogenesis, modification, function and potential impact on human disease development. *Genes (Basel)*, 2018, **9**(12): pii: E607
- [32] Schimmel P. The emerging complexity of the tRNA world: mammalian tRNAs beyond protein synthesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, **19**(1): 45-58
- [33] Shi J, Zhang Y, Zhou T, *et al.* tsRNAs: the Swiss army knife for translational regulation. *Trends in Biochemical Sciences*, 2019, **44**(3): 185-189
- [34] Balatti V, Nigita G, Veneziano D, *et al.* tsRNA signatures in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(30): 8071-8076
- [35] Guzzi N, Ciesla M, Ngoc P C T, *et al.* Pseudouridylation of tRNA-

- derived fragments steers translational control in stem cells. *Cell*, 2018, **173**(5): 1204-1216.e1226
- [36] Krishna S, Yim D G, Lakshmanan V, *et al.* Dynamic expression of tRNA-derived small RNAs define cellular states. *EMBO Reports*, 2019, **20**(7): e47789
- [37] Schorn A J, Gutbrod M J, Leblanc C, *et al.* LTR-retrotransposon control by tRNA-derived small RNAs. *Cell*, 2017, **170**(1): 61-71. e11
- [38] Zhang Y, Shi J, Rassoulzadegan M, *et al.* Sperm RNA code programmes the metabolic health of offspring. *Nature Reviews Endocrinology*, 2019, **15**(8): 489-498
- [39] Sarker G, Sun W, Rosenkranz D, *et al.* Maternal overnutrition programs hedonic and metabolic phenotypes across generations through sperm tsRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(21): 10547-10556
- [40] Saikia M, Jobava R, Parisien M, *et al.* Angiogenin-cleaved tRNA halves interact with cytochrome c, protecting cells from apoptosis during osmotic stress. *Molecular and Cellular Biology*, 2014, **34**(13): 2450-2463
- [41] Jockel S, Nees G, Sommer R, *et al.* The 2'-O-methylation status of a single guanosine controls transfer RNA-mediated Toll-like receptor 7 activation or inhibition. *The Journal of Experimental Medicine*, 2012, **209**(2): 235-241
- [42] Lyons S M, Gudanis D, Coyne S M, *et al.* Identification of functional tetramolecular RNA G-quadruplexes derived from transfer RNAs. *Nature Communications*, 2017, **8**(1): 1127
- [43] Lyons S M, Achorn C, Kedersha N L, *et al.* YB-1 regulates tiRNA-induced stress granule formation but not translational repression. *Nucleic Acids Research*, 2016, **44**(14): 6949-6960
- [44] Maute R L, Schneider C, Sumazin P, *et al.* tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(4): 1404-1409
- [45] Luo S, He F, Luo J, *et al.* *Drosophila* tsRNAs preferentially suppress general translation machinery via antisense pairing and participate in cellular starvation response. *Nucleic Acids Research*, 2018, **46**(10): 5250-5268
- [46] Zhong F, Hu Z, Jiang K, *et al.* Complement C3 activation regulates the production of tRNA-derived fragments Gly-tRFs and promotes alcohol-induced liver injury and steatosis. *Cell Research*, 2019, **29**(7): 548-561
- [47] Ren B, Wang X, Duan J, *et al.* Rhizobial tRNA-derived small RNAs are signal molecules regulating plant nodulation. *Science (New York, NY)*, 2019, **365**(6456): 919-922
- [48] Gebetsberger J, Wyss L, Mleczko A M, *et al.* A tRNA-derived fragment competes with mRNA for ribosome binding and regulates translation during stress. *RNA Biology*, 2017, **14**(10): 1364-1373
- [49] Sobala A, Hutvagner G. Small RNAs derived from the 5' end of tRNA can inhibit protein translation in human cells. *RNA Biology*, 2013, **10**(4): 553-563
- [50] Bakowska-Zywicka K, Kasprzyk M, Twardowski T. tRNA-derived short RNAs bind to *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes in a stress-dependent manner and inhibit protein synthesis *in vitro*. *FEMS Yeast Research*, 2016, **16**(6). pii: fow077
- [51] Mleczko A M, Celichowski P, Bakowska-Zywicka K. Transfer RNA-derived fragments target and regulate ribosome-associated aminoacyl-transfer RNA synthetases. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms*, 2018, pii: S1874-9399(17) 30380-2
- [52] Fricker R, Brogli R, Luidalepp H, *et al.* A tRNA half modulates translation as stress response in *Trypanosoma brucei*. *Nature Communications*, 2019, **10**(1): 118
- [53] Slotkin R K, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*, 2007, **8**(4): 272-285
- [54] Zhang Y, Shi J, Chen Q. tsRNAs: new players in mammalian retrotransposon control. *Cell Research*, 2017, **27**(11): 1307-1308
- [55] Martinez G, Choudury S G, Slotkin R K. tRNA-derived small RNAs target transposable element transcripts. *Nucleic Acids Research*, 2017, **45**(9): 5142-5152
- [56] Pan T. Modifications and functional genomics of human transfer RNA. *Cell Research*, 2018, **28**(4): 395-404
- [57] Lyons S M, Fay M M, Ivanov P. The role of RNA modifications in the regulation of tRNA cleavage. *FEBS Letters*, 2018, **592**(17): 2828-2844
- [58] Ogawa T, Tomita K, Ueda T, *et al.* A cytotoxic ribonuclease targeting specific transfer RNA anticodons. *Science (New York, NY)*, 1999, **283**(5410): 2097-2100
- [59] Jiang Y, Blanga S, Amitsur M, *et al.* Structural features of tRNA<sup>Lys</sup> favored by anticodon nuclease as inferred from reactivities of anticodon stem and loop substrate analogs. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**(6): 3836-3841
- [60] Lu J, Esberg A, Huang B, *et al.* *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin, a ribonuclease that recognizes the anticodon stem loop of tRNA. *Nucleic Acids Research*, 2008, **36**(4): 1072-1080
- [61] Schaefer M, Pollex T, Hanna K, *et al.* RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes & Development*, 2010, **24**(15): 1590-1595
- [62] Tuorto F, Liebers R, Musch T, *et al.* RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2012, **19**(9): 900-905
- [63] Blanco S, Dietmann S, Flores J V, *et al.* Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neuro-developmental disorders. *The EMBO Journal*, 2014, **33**(18): 2020-2039
- [64] Blanco S, Bandiera R, Popis M, *et al.* Stem cell function and stress response are controlled by protein synthesis. *Nature*, 2016, **534**(7607): 335-340
- [65] Muller M, Hartmann M, Schuster I, *et al.* Dynamic modulation of Dnmt2-dependent tRNA methylation by the micronutrient queuine. *Nucleic Acids Research*, 2015, **43**(22): 10952-10962
- [66] Tuorto F, Legrand C, Cirzi C, *et al.* Queuosine-modified tRNAs confer nutritional control of protein translation. *The EMBO Journal*, 2018, **37**(18): pii: e99777

- [67] Wang X, Matuszek Z, Huang Y, *et al.* Queuosine modification protects cognate tRNAs against ribonuclease cleavage. *RNA* (New York, NY), 2018, **24**(10): 1305-1313
- [68] Safra M, Sas-Chen A, Nir R, *et al.* The m<sup>1</sup>A landscape on cytosolic and mitochondrial mRNA at single-base resolution. *Nature*, 2017, **551**(7679): 251-255
- [69] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 2009, **10**(1): 57-63
- [70] Wilusz J E. Removing roadblocks to deep sequencing of modified RNAs. *Nature Methods*, 2015, **12**(9): 821-822
- [71] Cozen A E, Quartley E, Holmes A D, *et al.* ARM-seq: AlkB-facilitated RNA methylation sequencing reveals a complex landscape of modified tRNA fragments. *Nature Methods*, 2015, **12**(9): 879-884
- [72] Zheng G, Qin Y, Clark W C, *et al.* Efficient and quantitative high-throughput tRNA sequencing. *Nature Methods*, 2015, **12**(9): 835-837
- [73] Honda S, Morichika K, Kirino Y. Selective amplification and sequencing of cyclic phosphate-containing RNAs by the cP-RNA-seq method. *Nature Protocols*, 2016, **11**(3): 476-489
- [74] Peach S E, York K, Hesselberth J R. Global analysis of RNA cleavage by 5'-hydroxyl RNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, 2015, **43**(17): e108
- [75] Shigematsu M, Honda S, Loher P, *et al.* YAMAT-seq: an efficient method for high-throughput sequencing of mature transfer RNAs. *Nucleic Acids Research*, 2017, **45**(9): e70
- [76] Shi J, Ko E A, Sanders K M, *et al.* SPORTS1.0: a tool for annotating and profiling non-coding RNAs optimized for rRNA- and tRNA-derived small RNAs. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2018, **16**(2): 144-151
- [77] Speer J, Gehrke C W, Kuo K C, *et al.* tRNA breakdown products as markers for cancer. *Cancer*, 1979, **44**(6): 2120-2123
- [78] Godoy P M, Bhakta N R, Barczak A J, *et al.* Large differences in small RNA composition between human biofluids. *Cell Reports*, 2018, **25**(5): 1346-1358
- [79] Mishima E, Inoue C, Saigusa D, *et al.* Conformational change in transfer RNA is an early indicator of acute cellular damage. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 2014, **25**(10): 2316-2326
- [80] Selitsky S R, Baran-Gale J, Honda M, *et al.* Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 7675
- [81] Wang Q, Lee I, Ren J, *et al.* Identification and functional characterization of tRNA-derived RNA fragments (tRFs) in respiratory syncytial virus infection. *Molecular Therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2013, **21**(2): 368-379
- [82] Ruggero K, Guffanti A, Corradin A, *et al.* Small noncoding RNAs in cells transformed by human T-cell leukemia virus type 1: a role for a tRNA fragment as a primer for reverse transcriptase. *Journal of Virology*, 2014, **88**(7): 3612-3622
- [83] Yeung M L, Bennasser Y, Watashi K, *et al.* Pyrosequencing of small non-coding RNAs in HIV-1 infected cells: evidence for the processing of a viral-cellular double-stranded RNA hybrid. *Nucleic Acids Research*, 2009, **37**(19): 6575-6586
- [84] Olvedy M, Scaravilli M, Hoogstrate Y, *et al.* A comprehensive repertoire of tRNA-derived fragments in prostate cancer. *Oncotarget*, 2016, **7**(17): 24766-24777
- [85] Nientiedt M, Deng M, Schmidt D, *et al.* Identification of aberrant tRNA-halves expression patterns in clear cell renal cell carcinoma. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 37158
- [86] Shao Y, Sun Q, Liu X, *et al.* tRF-Leu-CAG promotes cell proliferation and cell cycle in non-small cell lung cancer. *Chemical Biology & Drug Design*, 2017, **90**(5): 730-738
- [87] Honda S, Loher P, Shigematsu M, *et al.* Sex hormone-dependent tRNA halves enhance cell proliferation in breast and prostate cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, **112**(29): E3816-3825
- [88] Dhahbi J M, Spindler S R, Atamna H, *et al.* Deep sequencing of serum small RNAs identifies patterns of 5' tRNA half and YRNA fragment expression associated with breast cancer. *Biomarkers in Cancer*, 2014, **6**: 37-47
- [89] Karaiskos S, Naqvi A S, Swanson K E, *et al.* Age-driven modulation of tRNA-derived fragments in *Drosophila* and their potential targets. *Biology Direct*, 2015, **10**: 51
- [90] Kato M, Chen X, Inukai S, *et al.* Age-associated changes in expression of small, noncoding RNAs, including microRNAs, in *C. elegans*. *RNA* (New York, NY), 2011, **17**(10): 1804-1820
- [91] Torres A G, Batlle E, Ribas De Pouplana L. Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 2014, **20**(6): 306-314
- [92] Yan M, Wang Y, Hu Y, *et al.* A high-throughput quantitative approach reveals more small RNA modifications in mouse liver and their correlation with diabetes. *Analytical Chemistry*, 2013, **85**(24): 12173-12181
- [93] Seidel A, Brunner S, Seidel P, *et al.* Modified nucleosides: an accurate tumour marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control. *British Journal of Cancer*, 2006, **94**(11): 1726-1733

## Progress and Prospect in tsRNA Research \*

TAN Dong-Mei<sup>1)</sup>, TAN Yi<sup>1)\*\*</sup>, DUAN En-Kui<sup>2)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

<sup>2)</sup>State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** tRNA-derived small RNAs (tsRNAs) is a type of newly discovered non-coding small RNA, which is derived from mature tRNA or tRNA precursor and exists in various organisms. tsRNAs exhibit tissue- and cell-specific expression and are involved in various biological functions such as stress response, protein translation regulation, ribosomes biogenesis, intergenerational transmission of acquired epigenetic information, tumorigenesis, cell proliferation and apoptosis. This review briefly discussed the biogenesis, classification, biological functions and molecular mechanisms of tsRNAs, as well as the roles of tsRNA modifications in tsRNA regulation and in diseases diagnosis.

**Key words** tsRNA, RNA modification, protein translation, transposon, biomarker, RNA-sequencing

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2019.0163

---

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31601206, 31671568, 31171436).

\*\* Corresponding author.

TAN Yi. Tel: 86-23-68485997, E-mail: tanyee66@126.com

DUAN En-Kui. Tel: 86-10-64807310, E-mail: duane@ioz.ac.cn

Received: July 19, 2019 Accepted: October 21, 2019