

TESIS DE MAESTRÍA

PEDECIBA BIOLOGIA - ÁREA BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR

SECRECIÓN Y CAPTACIÓN DE MITADES 5' tRNA^{Gly} A TRAVÉS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Licenciada Fabiana Gámbaro

Orientador: Dr. Alfonso Cayota

Co-orientador: Dr. Juan Pablo Tosar

Tribunal de tesis:

Dra. María Ana Duhagon

Dr. Pablo Oppezzo

Dr. Flavio Zolessi

Montevideo, Julio 2018

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCION	6
1 Comunicación intercelular mediada por vesículas extracelulares	6
1.1 Función de las vesículas extracelulares	7
1.2 ARN asociado a EVs	9
1.2.1 Pequeños ARNs no codificantes	9
1.2.1.1 Los microARNs	10
1.2.1.2 Fragmentos derivados de ARN de transferencia	10
1.3 Incorporación de ARNs en EVs	13
1.4 Transferencia de EVs entre células.....	16
2 ARNs no asociado a EVs (extravesicular)	18
ANTECEDENTES.....	19
HIPÓTESIS DE TRABAJO	25
OBJETIVO GENERAL	25
Objetivos específicos.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Cultivo de células	26
Purificación de vesículas extracelulares.....	26
Extracción de ARN.....	26
Detección de ARNs pequeños mediante PCR en tiempo real	27
Cuantificación de ARNm de Angiogenina mediante PCR cuantitativa	29
Silenciamiento del gen de la Angiogenina mediante ARN interferencia	30
Transfección de oligonucleótidos sintéticos	30
Microscopía Confocal de fluorescencia.....	31
Ensayos de captación de vesículas.....	32
Detección de gránulos de estrés mediante hibridación de fluorescencia in situ	32
RESULTADOS.....	34
La estructura de mitades de tRNAs juega un rol importante en su estabilidad	34
Las mitades 5' de tRNAs se acumulan en el citoplasma.....	39
La transfección con mitades de tRNAs no induce la formación de gránulos de estrés	40
Las mitades 5' de tRNA ^{Gly} y tRNA ^{Glu} son secretadas al espacio extracelular mediante EVs	44
Las mitades de tRNAs son capaces de ser transferidas entre células MCF-7 mediante EVs...	49

No solo las mitades 5' de tRNA ^{Gly} pueden ser transferidas entre células MCF-7 mediante EVs	52
El empaquetamiento y secreción de mitades sintéticas 5' de tRNAs obedece un mecanismo no selectivo.....	56
Transferencia de mitades 5' tRNA ^{Gly} endógenas	58
Regulación de los niveles endógenos de mitades 5' tRNA ^{Gly} y tRNA ^{Glu}	61
DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIONES.....	70
PERSPECTIVAS.....	71
BIBLIOGRAFÍA	74
APÉNDICE	83

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mis Tutores, el Dr. Alfonso Cayota y el Dr. Juan Pablo Tosar.

Alfonso, gracias por haberme permitido realizar no solo mi tesis de grado sino también mi tesis de maestría en tu laboratorio. Gracias por las enseñanzas, las instancias de seminarios y las discusiones durante todos estos años. Pero por sobre todas las cosas gracias por haberme dado la oportunidad de hacer lo que más me gusta, la investigación.

Juan Pablo, gracias por las incontables horas de mesas compartidas en donde me enseñaste todo lo que se. Gracias por tu incansable disposición, por las interminables discusiones entre mates, por mostrarme nuevas formas de pensar y por enseñarme a ver más allá del resultado. Gracias por siempre saber qué hacer cuando las cosas no salen, por tus charlas motivantes y mayor aún, por transmitirme y contagiarme tu pasión por la ciencia.

Luego, quiero agradecer de forma general al Laboratorio de Genómica Funcional, a todos los integrantes, a los que están y a los que no. Por hacer del laboratorio un lugar a donde siempre quiero volver al otro día.

A la salita del IPmon, Natalia Olivero, Natalia Ibañez, Federico Carrión, Sergio Bianchi, Martin Flo, compañeros de mates y charlas.

Quisiera agradecer también al Laboratorio de Virología Molecular: Pilar Moreno, Natalia Echeverría, Álvaro Fajardo, Gabriela Bentancour, Martin Soñora, Fabian Aldunate, Gonzalo Moratorio y Juan Cristina. Desde mi inicio de mi maestría formo parte de este laboratorio. Gracias a todos ellos, por el trabajo compartido, el compañerismo, la calidez humana y por darme la oportunidad de conocer una parte de la biología que siempre me cautivó, que es la Virología.

También un fuerte agradecimiento al Instituto Pasteur. Durante mis años transcurridos como estudiante siempre encontré una gran disposición del personal técnico y científico.

Al tribunal de tesis, Dra. Maria Ana Duhagon, Dr. Pablo Oppezzo y Dr. Flavio Zolessi, por aceptar juzgar y corregir la presente tesis

Por último, quiero agradecer a mi familia, sobre todos a mis padres y mis hermanos; y a mis amigas. Sin ellos, nada de esto hubiese sido posible.

RESUMEN

El ARN extracelular, en particular el ARN asociado a vesículas extracelulares (EVs) ha despertado gran interés en los últimos tiempos ya que se ha demostrado que las EVs están fuertemente involucradas en la comunicación intercelular en diferentes contextos y patologías, en donde las vesículas actuarían como el vehículo y las moléculas, en particular el ARN, el mensaje. Es así que las EVs aparecen como un vehículo de transferencia de información genética entre células y una poderosa herramienta para la detección temprana de importantes enfermedades y como blanco terapéutico. Dentro del ARN extracelular, hoy en día la atención está puesta en los pequeños ARNs, tales como microARNs (miRNAs) y en mitades derivadas de ARNt (*tRNA halves*). A pesar el gran atractivo que presupone el campo del ARN extracelular, al momento se tiene poco conocimiento acerca del perfil de ARN vesicular, cómo ocurre la incorporación del ARN en las vesículas y mayor aún, el efecto del ARN vesicular sobre la célula aceptora.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el mecanismo de incorporación y secreción de mitades de 5' de tRNA^{Gly} a través de EVs y su eventual rol en la comunicación célula – célula. Para ello se elaboró un sistema el cual se basó en la transfección de células MCF-7 con ARNs biotinilados, en la secreción y posterior aislamiento de estos oligonucleótidos a través de EVs. Luego mediante fluorescencia *in situ* y PCR cuantitativa (*SL-RT-qPCR*) se detectó la presencia de estos oligonucleótidos en células MCF-7ceptoras capaces de internalizar estas EVs. Para ello, se precisaba una molécula la cual fuese estable dentro de la célula y además, que sea secretada al espacio extracelular mediante EVs. En este sentido, se pudo demostrar que las mitades 5' de tRNA^{Gly} las cuales eran moléculas capaces de auto ensamblarse para formar estructuras diméricas, eran estables dentro de la célula. Más aún, se vio que las mitades 5' de tRNA^{Gly} eran secretadas por las células a través de EVs, las cuales podían ser captadas e internalizadas por células MCF-7ceptoras. Fue así que con este sistema y utilizando a las mitades 5' de tRNA^{Gly} como moléculas modelo, se pudo demostrar que la secreción de ARNs pequeños en EVs respondía a un mecanismo de secreción no selectivo. Además, se demostró la transferencia *in vitro* de mitades 5' de tRNA^{Gly} bajo un modelo celular homotípico MCF-7: MCF-7. De esta forma, estos estudios ponen de manifiesto un rol de las mitades 5' de tRNA en el medio extracelular y se abren preguntas sobre el rol de estas especies como mediadores de la comunicación célula – célula.

INTRODUCCIÓN

1 Comunicación intercelular mediada por vesículas extracelulares

Las células de todos los organismos multicelulares necesitan comunicarse entre sí para coordinar su desarrollo y función. Las células pueden comunicarse con células vecinas o distantes mediante diversos mecanismos. Esta comunicación intercelular puede darse a través del contacto directo célula – célula, a través de la secreción de moléculas tales como proteínas o moléculas orgánicas o, como ha sido descrito más recientemente, a través de la secreción de vesículas extracelulares, EV (del inglés “*extracellular vesicles*”).

Las EVs son pequeñas vesículas secretadas a la circulación sanguínea y otros fluidos biológicos por la mayoría de los tipos celulares incluyendo células endoteliales, células epiteliales, neuronas, adipocitos, células dendríticas, mastocitos y linfocitos B (Théry et al., 2002). De hecho las EVs han sido detectadas en varios fluidos biológicos como la sangre, saliva, orina y leche materna (Théry et al., 2006).

Las EVs están compuestas por una bicapa lipídica en donde se insertan proteínas transmembranas que engloban un repertorio de moléculas de incluyendo ácidos nucleídos, lípidos, proteínas y carbohidratos. Las células pueden secretar diversos tipos de EV. La más extendida clasificación divide a las EV en tres subtipos: las EVs con un diámetro promedio entre 40-100 nm, con una densidad de flotación de 1,11 – 1,19 mg/ml y originadas por la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática se denominan exosomas (EXO). Luego, las EVs con diámetros hasta 1000 nm y originados por una protrusión hacia el exterior de la membrana plasmática se denominan microvesículas (MV) (Figura 1) (Raposo and Stoorvogel, 2013). Por último, se encuentran los cuerpos apoptóticos, los cuales son vesículas con tamaños mayores a 1 μ m en diámetro y que se originan a partir de las células en apoptosis.

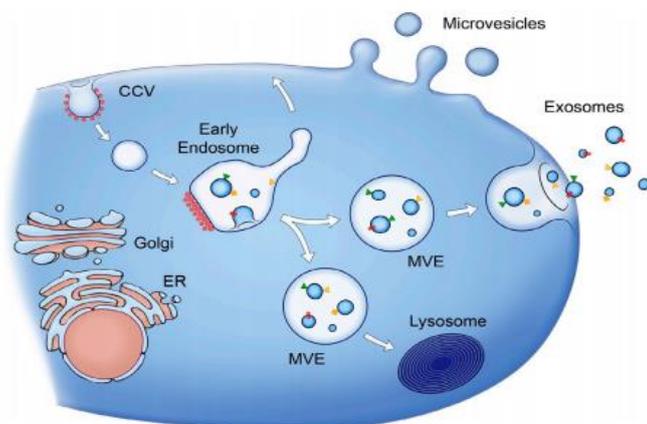


Figura 1: Liberación de vesículas extracelulares (EVs): microvesículas (MV) y exosomas (EXO). Extraído de Raposo and Stoorvogel 2013.

Sin embargo, si bien los cuerpos apoptóticos son fácilmente distinguibles a través de sus propiedades fisicoquímicas de los exosomas y microvesículas, la diferencia entre estas dos últimas poblaciones no es tan clara. De hecho, se ha visto que EVs formadas directamente a partir de la membrana pueden compartir varias propiedades biofísicas con EVs formadas a partir de los cuerpos multivesiculares como el tamaño, su densidad de flotación y su sedimentación a alta velocidad mediante ultra-centrifugación (Shen et al., 2011). Además, proteínas que clásicamente eran consideradas como marcadores exosomales, se han encontrado en diferentes tipos de EV. Más aún, también se ha visto que las células son capaces de liberar distintas subpoblaciones de exosomas de composición molecular y propiedades biológicas diferentes (Willms et al., 2016). Dado que el tamaño, densidad y composición de las diferentes EVs se solapan, la clasificación de EVs en cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas no refleja la realidad. Por otro lado, los protocolos de purificación de EVs mayormente utilizados hoy en día se basan en ultracentrifugación debido a su sencillez y rendimiento (Jeppesen et al., 2014). La sedimentación de las vesículas depende del tamaño, densidad y forma de las mismas. Los protocolos de centrifugación diferencial aprovechan los diferentes coeficientes de sedimentación para lograr el aislamiento de las diferentes poblaciones vesiculares. Es así que, de acuerdo al tamaño de las vesículas estas pueden separarse centrifugando a distintas velocidades. Se encuentra en la literatura que los cuerpos apoptóticos (mayores a 1000nm) sedimentan a una velocidad $\approx 2000g$, las microvesículas (100-1000nm) sedimentan a 10.000 – 20.000g y los exosomas más pequeños, sedimentan a 100.000g. No obstante, algunos trabajos sostienen que la purificación de las EVs por tamaño mediante centrifugación diferencial no logra un aislamiento absoluto (Witwer et al., 2013). Se ha demostrado la presencia de vesículas de 50 y 100 nm en pellets de 16.000g y viceversa. Esto sumado a la naturaleza heterogénea de las EVs planteada en el párrafo anterior provoca que sea muy difícil poder determinar el tipo de EV aislado a partir de los medios de cultivos y/o fluidos biológicos.

Como consecuencia, grupos con mucha experiencia en el área como el grupo de Clotilde They han preferido adoptar otro tipo de nomenclatura (Mateescu et al., 2017). En la misma, a las vesículas que sedimentan a alta velocidad (100.000g) en lugar de exosomas se las denomina “*small EVs*”(sEVs) y aquellas que sedimentan a velocidad intermedia, en torno a los 20.000g, en lugar de microvesículas se les llama “*medium EVs*” (mEVs). Por último, a aquellas vesículas que sedimentan a baja velocidad, cercano a los 2000g, se les nombra como “*large EVs*” (lEVs) e incluyen cuerpos apoptóticos. Si bien estas definiciones no tienen tanto sentido biológico, confieren mayor practicidad a nivel técnico y describen de forma más cercana el resultado de la purificación.

1.1 Función de las vesículas extracelulares

Si bien en primera instancia se creía que el rol principal de las vesículas extracelulares era remover desechos de la célula, hoy en día es bien aceptado el hecho que las EVs actúan como mediadores en la comunicación célula-célula y últimamente han sido implicados en la

progresión de diversas enfermedades incluyendo enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, infecciosas y cáncer (De Toro et al., 2015; Tkach and Théry, 2016). Además, las EVs contienen un repertorio de moléculas bio-activas entre ellas moléculas de ARN, por lo que las EVs también representan un vehículo a través del cual las células pueden transferir información genética a otras células. De hecho, varios estudios apoyan la transferencia entre células de ARN funcional mediado por vesículas. Uno de los primeros en hacerlo fue Valadi y colaboradores. En breve, ellos mostraron que exosomas derivados de líneas celulares de mastocitos humanos y de ratón, HMC-1 y MC/9 respectivamente, contienen ARNm y micro ARNs (*miRNAs*) los cuales pueden ser transferidos a otras células y ser funcionales en las mismas (Valadi et al., 2007). Luego, en otro reporte, se demostró la transferencia *in vitro* del miRNA miR-150 a través de EVs entre células sanguíneas humanas y endoteliales provocando la regulación del gen blanco de miR-150, c-Myb, en las células receptoras, favoreciendo la migración endotelial (Zhang et al., 2010). Se vio que los exosomas liberados por células del sistema inmune también contienen miRNAs los cuales pueden ser transferidos a células receptoras y en donde pueden llevar a cabo su función (Mittelbrunn et al., 2011; Montecalvo et al., 2012). Más tarde, también se demostró que virus tales como el virus de la Hepatitis C, de la Inmunodeficiencia Humana, del Dengue y Epstein Barr, utilizan a las EVs como mecanismo de dispersión viral. De hecho, se ha visto que exosomas liberados por células infectadas contienen tanto partículas virales (Ramakrishnaiah et al., 2013), miRNAs (Pegtel et al., 2010) o proteínas virales (Jaworski et al., 2014) las cuales pueden ser transferidas a células vecinas sanas ayudando a establecer la infección y modulando la respuestas celular (Chahar et al., 2015).

Recientemente, a través de experiencias *in vivo* utilizando modelos de ratón, se demostró que miRNAs exosomales liberados a partir del tejido adiposo, son capaces de llegar a tejidos distantes tales como el hígado y allí mediar la traducción de determinados genes blancos (Thomou et al., 2017)

Además, dado que se han encontrado EVs en varios fluidos corporales humanos, y que el contenido molecular de las vesículas parecería reflejar el tipo y el estado de la célula parental de la cual derivan, las EVs son también consideradas potentes biomarcadores (De Toro et al., 2015; Thompson et al., 2016). A pesar de la gran dificultad que conlleva el aislamiento de EVs a partir de los fluidos biológicos (Mateescu et al., 2017), las EVs ya se han mostrado como una poderosa herramienta para el diagnóstico de una variedad de enfermedades, en particular para diversos tipos de cáncer. Por ejemplo, en melanoma, un aumento en los niveles de EV en el suero está asociado a la progresión y diseminación de la enfermedad (Peinado et al., 2012). En pacientes con cancer de colon rectal se vio que los niveles de siete miRNAs (let-7a, miR-1229, miR-1246, miR-150, miR-21, miR-223, and miR-23a) presentes en exosomas eran sustancialmente mayores con respecto a los niveles presentes en individuos en estadios más tempranos de la enfermedad e individuos sanos (Peinado et al., 2012). Hay evidencia que indica que los niveles de EVs que expresan proteínas de superficie asociadas al tumor como moléculas de adhesión, tienen un potencial diagnóstico y pronóstico en el cáncer colon rectal (Silva et al., 2012). En línea con esto mismo, en 2010 fue aprobado por la FDA el primer ensayo clínico basado en la detección de un producto del gen de fusión EML4–ALK en EVs del plasma de pacientes con cáncer de pulmón. La detección de este gen sirvió para predecir la respuesta a ciertas quimioterapias en estos pacientes (Kwak et al., 2010). Más cercano en el tiempo aún,

se describe un método no-invasivo, el cual involucra la detección de un proteoglicano, Glypican-1, en vesículas que circulan por el torrente sanguíneo de pacientes. Esto permite identificar pacientes en estado avanzado con cáncer de páncreas con 100% de certeza y también distinguir entre pacientes con lesiones pancreáticas pre-cancerosas de aquellos con lesiones benignas (Sonia et al., 2015). Es así que se demuestra por primera vez que vesículas circulantes en sangre pueden ser una fuente específica de biomarcadores para enfermedades como el cáncer.

Gracias a toda esta evidencia las EVs aparecen como un vehículo de transferencia de información genética entre células y una poderosa herramienta para la detección temprana de importantes enfermedades como el cáncer y como blanco terapéutico. Por estos motivos, las EVs han despertado gran interés. Pero ante estas excitantes posibilidades se abren numerosas preguntas. ¿Cuál es el contenido molecular de las EVs? ¿Cuál es el contenido de ARN en EVs? ¿Cómo ocurre el cargado y empaquetamiento de estas moléculas? ¿Es el empaquetamiento de moléculas de ARN en EVs un proceso selectivo o no selectivo? Más aún, ¿cómo se da la transferencia de EVs entre las células? Estas son tan solo algunas de las innumerables cuestiones que afectan a este campo hoy en día.

1.2 ARN asociado a EVs

Como se mencionó anteriormente, las EVs contienen diversas moléculas como ácidos nucleicos (ADN y ARN), carbohidratos, lípidos y proteínas. En el marco de la presente tesis nos enfocaremos en el contenido de ARN de las mismas.

Al momento se han descrito diferentes tipos de ARNs en EVs: ARN mensajeros (ARNm), ARN de transferencia (tRNAs) y diversos ARNs pequeños y largos no codificantes, *sRNA* (de la sigla en inglés “small non-coding RNAs”) y *lncRNAs* (“long non-coding RNAs”) respectivamente (Kaur et al., 2018; Lunavat et al., 2015; Tosar et al., 2015; Vojtech et al., 2014).

1.2.1 Pequeños ARNs no codificantes

Los pequeños ARNs no codificantes (*sRNA*) son una familia de moléculas de ARN de 17 – 40 nucleótidos. Clásicamente, basados en su origen, el subtipo de proteína Argonauta asociada, su biogénesis y mecanismos de acción, los *sRNA* fueron inicialmente agrupados en 3 grupos principales: microARNs (miRNAs), pequeños ARN de interferencia (siRNAs) y ARNs asociados a proteínas Piwi (piRNAs) (Ghildiyal and Zamore, 2009). Sin embargo hoy en día se distinguen nuevas clases de ARNs. Los mismos consisten en fragmentos derivados de ARN parentales con función conocida como los fragmentos derivados de ARN de transferencia (tRNAs), de ARN pequeños nucleares (snRNAs), de ARN pequeños nucleolares (snoRNAs), Y RNAs y vault-RNAs (Fritz et al., 2016; Martens-Uzunova et al., 2013; Tuck and Tollervey, 2011) (Figura 2). Estos fragmentos de ARNs han despertado gran interés debido a que por un lado, son generados a partir del clivaje post-transcripcional de distintas clases de ARNs mediante diferentes

endonucleasas y por otro lado, debido a que algunos se encuentran asociados con proteínas de la familia Argonata y se asemejan en función a los miRNAs (Burroughs et al., 2011).

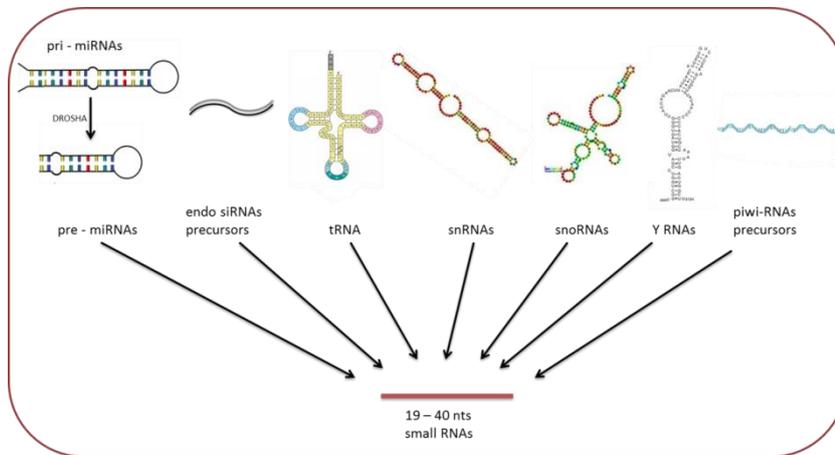


Figura 2: Familia de ARNs pequeños. A los clásicos miembros de esta familia de pequeños ARN, microARNs (miRNAs), pequeños ARN de interferencia (siRNAs) y ARNs asociados a proteínas Piwi (piRNAs), se suman a esta familia nuevos miembros que del procesamiento de ARN parentales con función conocida como son los fragmentos derivados de ARN de transferencia (tRNAs), de ARN nucleares (snRNAs), de ARN nucleolares (snoRNAs), Y RNAs y vault-RNAs. Modificado de Olvedy et al. 2013.

1.2.1.1 Los microARNs

Los microARNs (miRNAs) son por lejos los ARNs pequeños más estudiados en células de mamífero. Consisten en pequeñas moléculas endógenas de ARN de entre 19 y 22 nucleótidos. Son conocidos por ejecutar funciones claves en la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional mediante inhibición de la traducción y/o degradación de ARNm blancos, uniéndose mediante apareamiento de bases a secuencias nucleotídicas (Filipowicz et al., 2008). Para llevar a cabo esta función el miRNA es “cargado” en un complejo multiproteico denominado complejo RISC (del inglés, *RNA-induced silencing complex*) el cual está formado por varias proteínas entre las cuales se destacan proteínas de la familia Argonata (Ago 2 en humanos). El complejo ribonucleoproteico es guiado hacia el ARNm blanco, donde interaccionará por complementariedad de bases con el miRNA. Dependiendo del grado de complementariedad entre el mensajero y el miRNA, Ago podrá llevar a cabo la degradación del ARNm (Ha and Kim, 2014). Los miRNAs también participan en procesos de control epigenético a través de la regulación de la metilación del ADN, la modificación de histonas y el remodelado de la cromatina (Gagnon and Corey, 2012; Luteijn and Ketting, 2013; Zardo et al., 2012). Más aún, miRNAs específicos se han encontrado desregulados en distintas enfermedades. Dado que esta desregulación se ha visto reflejada en el contenido global de ARNs circulantes (Quinn et al., 2015), los mismos han sido propuestos como efectivos biomarcadores para un amplio espectro de enfermedades (Kosaka et al., 2010; Wang et al., 2015).

1.2.1.2 Fragmentos derivados de ARN de transferencia

A partir del procesamiento nucleotídico post-transcripcional de los tRNAs se da a lugar a diferentes fragmentos de tRNA. El clivaje de moléculas de tRNA maduras mediante

endoribonucleasas fue un fenómeno observado por *primera* vez en *E. coli* frente a la infección con el fago T4 hace ya unos cuantos años atrás (Levitz et al., 1990). Sin embargo esta observación no tuvo gran repercusión. Los fragmentos de tRNA no fueron considerados relevantes hasta que se comenzó a observar su presencia en diversos organismos, y varios estudios comenzaron a sugerir una posible actividad tipo ARN interferente para estas moléculas. Por este motivo en los últimos años se ha puesto especial interés en esta emergente familia de pequeños ARNs. De hecho, varios grupos incluido el nuestro, han llevado a cabo estudios de secuenciado profundo que resultó en la descripción de diferentes fragmentos derivados de tRNAs (Dhahbi et al., 2014; Haussecker et al., 2010; Nientiedt et al., 2016; Tosar et al., 2015)

El clivaje de los tRNAs maduros da lugar a dos clases principales de fragmentos: por un lado aquellos que resultan del clivaje al nivel del bucle (“*loop*”) del anticodón denominados mitades de tRNA de aproximadamente 30 – 35 nts de largo. Por otro lado, se encuentran aquellos que derivan del clivaje a nivel del *loop* D y T de los tRNAs y poseen 14 a 22 nts de largo. Estos se denominan fragmentos de tRNA o tRFs de (Lee et al., 2009) (Figura 3).

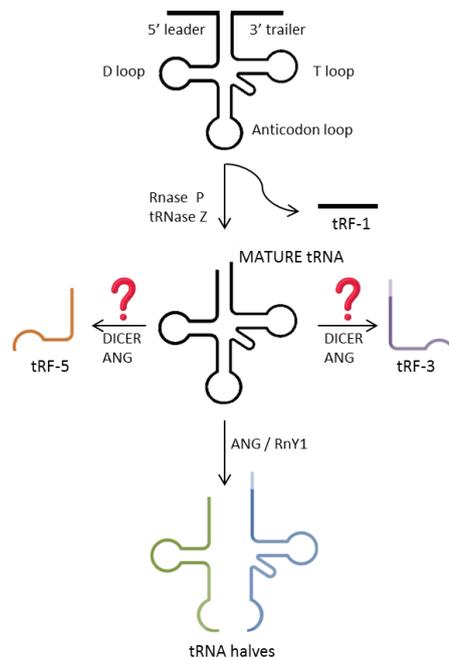


Figura 3: Esquema que resume el procesamiento de los tRNA. A partir del procesamiento de las colas 3' de los pre-tRNA mediante la acción de la *tRNasa Z* se da lugar a los tRF-1. Luego a partir del clivaje de los tRNA a nivel del *loop* D y *loop* T se obtienen los fragmentos tRF-5 y tRF-3 respectivamente. Por último, el procesamiento a nivel del *loop* del anticodón de los tRNA da lugar a las mitades de tRNA (tRNA halves). Modificado de Tuck et al. 2011.

Los tRFs

Los tRFs se clasificaron en tRF-1, tRF-3 y tRF-5 en función del segmento del transcrito de tRNA del cual derivan (Lee et al., 2009).

Los tRF-1, corresponden a las colas 3' de los tRNAs, los cuales tienen un repetido de Uridinas en el extremo 3', como consecuencia de la terminación de la polimerasa III en la transcripción. Los tRF-1 se generan por acción de la tRNasa Z como parte del procesamiento de maduración de los tRNAs. Estas especies son citoplasmáticas, pero dado que la maduración de los pre-tRNAs ocurre en el núcleo, esto sugiere que los tRF-1 son rápidamente exportados al citosol. Una vez en el citoplasma, los tRFs se asocian con proteínas argonauta. Pero en lugar de dirigir las mismas hacia blancos específicos, los tRFs parecerían actuar más bien como competidores de los miRNAs (Haussecker et al., 2010; Lee et al., 2009). Los tRF-3 y tRF-5 son fragmentos de 13-22 nt, generados por clivaje del tRNA maduro a nivel del *loop*-D y *loop*-T respectivamente. El procesamiento en gran proporción es dependiente de Dicer (Keam and Hutvagner, 2015), aunque se observan excepciones en la generación de los tRF-3, en donde también se postula a la Angiogenina como otra posible ribonucleasa responsable (Emara et al., 2010).

Se ha reportado en diferentes especies, desde plantas (Loss-Morais et al., 2013), gusanos de seda (Nie et al., 2013), mosca (Karaïskos et al., 2015) y humanos (Shigematsu and Kirino, 2015), la unión de los tRFs a proteínas Argonautas (AGO 1-4). Esto sugiere una alta conservación de estos ARNs a lo largo de la escala evolutiva con gran relevancia biológica. En línea con lo anterior, la asociación de los tRFs con la maquinaria de traducción también se ha observado en organismos evolutivamente muy distantes. Efectivamente, dos trabajos muestran que los tRFs se encuentran asociados con polisomas tanto en Archeas como *Haloferax volcanii* (Gebetsberger et al., 2012) y en células humanas (Sobala and Hutvagner, 2013). Además, el hecho de que los tRFs se encuentren presentes en organismos como bacteria y archa llama mucho la atención ya que estos organismos no poseen los sistemas clásicos de miRNAs y siRNAs. Por tanto, esto significa que si bien estos organismos no tienen la maquinaria de inferencia por miRNAs, si expresan diferentes endonucleasas de tRNA isotipo-específicas lo cual les permite la generación de diferentes fragmentos de tRNAs (Tomita et al., 2000). Esto propone a los tRFs como parte de un sistema de regulación altamente conservado y de gran relevancia biológica.

Mitades de tRNAs

Las mitades de tRNA (*tRNA halves*) son generadas a partir del clivaje del tRNA maduro a nivel del *loop* del anticodón en el citoplasma de las células. Este procesamiento es promovido por la ribonucleasa Angiogenina (ANG) en humanos (Haussecker et al., 2010) y RNY1 en levaduras (Cole et al., 2009). La Angiogenina es una ribonucleasa de la superfamilia A presente en el núcleo y el citoplasma de las células. A nivel citoplasmático, su actividad se encuentra regulada mediante la unión a la proteína inhibitoria RNH1 (del inglés Ribonuclease/angiogenin inhibitor).

La generación de las mitades de tRNA por parte de ANG se ve favorecida en condiciones de estrés nutricional, biológico o fisicoquímico. Este fenómeno se ha visto en diversos organismos desde *Trypanosoma cruzi* (Garcia-Silva et al., 2010), *Saccharomyces cerevisiae* (Thompson and Parker, 2009) hasta *Homo sapiens* (Gogakos et al., 2017; Thompson et al., 2008). Gracias a varios estudios se ha podido demostrar que frente a situaciones de estrés ocurren dos eventos que dan lugar a un aumento de ANG activa en el citoplasma y en consecuencia, un aumento en la producción de mitades de tRNA (Lyons et al., 2017a). Por un lado, la ANG que se encuentra

inactiva en el citosol mediante su unión al inhibidor RNH1 se disocia del mismo. Y por otro lado, la ANG nuclear se transloca al citosol.

Otro factor importante en la generación de mitades de tRNA es la presencia de determinadas modificaciones post transcripcionales de los tRNAs (Lyons et al., 2017a). Estudios recientes sugieren la metilación del carbono 5 de la citocina (m^5C) por parte de las enzimas Dnmt2 (del inglés, DNA methyltransferase 2) y NSun2 (del inglés, NOP2/Sun RNA methyltransferase 2) inhibe la capacidad de la Angiogenina en clivar a estas moléculas (Blanco et al., 2014; Schaefer et al., 2010). Por consiguiente, el perfil de mitades de tRNA dependerá: del grado de inhibición de la Angiogenina por parte de RNH1, la expresión de cada isoceptor de tRNA y el grado de expresión de metiltransferasas y por tanto el grado de modificaciones post transcripcionales de los tRNAs en cada tejido.

Similar a como sucedió con otros pequeños ARNs, inicialmente las mitades de tRNAs eran considerados productos de degradación. Sin embargo ahora, comienzan a publicarse cada vez más reportes donde se describen sus potenciales funciones. En este sentido, uno de los primeros trabajos en publicarse demostró que bajo condiciones de estrés celular, se promueve la generación de determinadas especies de mitades de tRNAs (Ivanov et al., 2011). Las mismas a través de la unión con la proteína YBX1, eran capaces de interferir con el mecanismo de traducción al promover el desplazamiento de los factores de inicio de la traducción eIF4E/G/A y eIF4G/A para los mensajeros con y sin cap5' respectivamente. Más aún, en este estudio los autores demuestran que esta inhibición global de la traducción conduce a una reprogramación de la síntesis proteica que estimula la reparación de los daños y la supervivencia de la célula, y se promueve la formación de los gránulos de estrés. Fue así que mediante este trabajo se demostró un nuevo mecanismo de inhibición de la traducción global como respuesta al estrés celular. Concomitante a esto se demuestra que ciertos tRNA halves son capaces de proteger a las células de la apoptosis mediante su unión al citocromo C (Saikia et al., 2014). En cambio, se describió que otras mitades, denominadas "SHOT-RNAs" (del inglés, *sex hormone-dependent tRNA derived RNAs*) se encontraban específicamente inducidas por hormonas sexuales y que tienen un rol central en las respuestas proliferativas de tumores de mama y próstata hormono-dependientes (Honda et al., 2015). Por otra parte, mitades de tRNA se describen como capaces de regular la biogénesis de los ribosomas mediante su unión a los ARNm de dos proteínas ribosomales y promoviendo su traducción. De esta forma se propone un nuevo mecanismo de regulación post traduccional (Kim et al., 2017). Más aún, recientemente se atribuye un rol en los mecanismos de herencia epigenéticos a las mitades de tRNAs. Los mismos fueron detectados en el plasma seminal y que los mismos pueden ser transferidos a ovocitos durante la fertilización (Chen et al., 2016; Sharma et al., 2015). Además se logró demostrar que las mitades 5' derivadas del tRNA de Glicina, una vez dentro del embrión son capaces de silenciar elementos transponibles (Sharma et al., 2015).

1.3 Incorporación de ARNs en EVs

Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, las EV contienen un amplio repertorio de proteínas, lípidos y moléculas de ARN. Es ampliamente aceptado que el contenido de ARN en

las EVs difiere de acuerdo al tipo de célula parental, al estado celular y a la localización subcelular de donde las EVs son generadas. Además, las EVs están fuertemente involucradas en la comunicación intercelular en diferentes contextos y patologías, en donde las vesículas actuarían como el vehículo y las moléculas, en particular el ARN, el mensaje. Si bien el mecanismo de empaquetamiento de estas moléculas en EV es un mecanismo complejo el cual no se comprende por completo, sí se tiene claro, que la composición de las EV determinará el mensaje final de la comunicación célula-célula. Por lo tanto, la importancia de entender los mecanismos subyacentes al empaquetamiento y cargado de moléculas en EVs.

Dentro de los ARNs presentes en EV más estudiados se encuentran los miRNAs. Se ha observado que las proteínas Ago, las proteínas de unión por excelencia a los miRNAs estarían involucradas en el proceso de empaquetamiento de miRNAs en vesículas. Pero, el hecho de que estas proteínas sean también cargadas en vesículas no se entiende bien: se ha observado tanto la ausencia (Van Deun et al., 2014) como la presencia de proteínas Ago en EV (McKenzie et al., 2016; Zhang et al., 2010); por lo que la asociación de Ago a vesículas permanece en discusión. Se han visto otras proteínas implicadas en el empaquetamiento de miRNAs tal como Dicer (Bernstein et al., 2001) o HuR (del inglés *human antigen R*) (Mukherjee et al., 2016; Poria et al., 2016). Por ejemplo, se observó que HuR es capaz de disociar miR-122 de Ago 2, unirse al mismo y promover su incorporación en EVs. Un mecanismo muy similar fue recientemente observado con otra proteína de unión al ARN denominada YBX-1 (del inglés *Y-box protein 1*). Los autores observan que YBX1 se une de forma específica a miRNAs como mir-233 por ejemplo, y promueve su empaquetamiento (Shurtleff et al., 2016). Más reciente aún, este mismo grupo logra demostrar que mediante el *knock-out* de YBX-1, la incorporación de miRNAs como la de otros ARNs como tRNAs, Y RNAs y vault- RNAs en EVs también se ve afectada (Shurtleff et al., 2017).

Otro aspecto sobre la incorporación de ARN dentro de EV que es ampliamente discutido al momento, es si este mecanismo se trata de un proceso selectivo o no. A grandes rasgos, el empaquetamiento y secreción de ARN en vesículas podría ocurrir a través de dos mecanismos posibles. O bien, los ARNs celulares son empaquetados al azar en las vesículas durante la biogénesis de las mismas, por lo que el perfil y la abundancia relativa de ARNs dentro de las EV es una representación del contenido del ARN intracelular. En este sentido hablaríamos de un mecanismo no selectivo. O de forma alternativa, los ARNs podrían portar consigo determinadas señales (ya sea estructurales o a nivel de secuencia) lo cual promueve su cargado específico dentro de las vesículas. De esta forma los ARNs serían empaquetados y secretados de forma diferencial. Si bien mucho esfuerzo se ha puesto en estudiar este fenómeno, estudios independientes llevados a cabo por diferentes grupos de investigación muestran claras diferencias al respecto. Como consecuencia, si uno recurre a la bibliografía en búsqueda de mecanismos incorporación y secreción de ARNs pequeños mediante EVs, podrá encontrar reportes que describen mecanismos no selectivos, y otros, describen mecanismos selectivos.

En este sentido, por un lado, trabajos recientes de nuestro grupo (Tosar et al., 2015) y otros laboratorios (Donker et al., 2012; Turchinovich et al., 2011), muestran una fuerte correlación entre el contenido de miRNAs a nivel intracelular y extracelular, sosteniendo así, un modelo de secreción no selectiva para la mayoría de los miRNAs. Por otro lado, otros trabajos observan

un enriquecimiento selectivo de miRNAs en EVs (Baglio et al., 2015; Fong et al., 2015; Guduric-Fuchs et al., 2012; Ji et al., 2014; Li et al., 2015; Mittelbrunn et al., 2011).

Cabe destacar que en todos estos estudios, la observación de un enriquecimiento selectivo de miRNAs en EVs es a través del secuenciado profundo de ARNs pequeños presentes en EVs provenientes de células crecidas en medio con suero depletado de vesículas, es decir, con suero al cual se le quitaron las vesículas. El suero desprovisto de EVs tiene como objetivo evitar el aporte de ARNs de vesículas presentes en el suero. La forma de depletar el suero de vesículas y ARNs se basa en protocolos de ultracentrifugación (Shelke et al., 2014). De forma reciente se publica un trabajo en donde se muestra que estos protocolos no logran remover por completo del suero las vesículas y el ARN extravesicular presente del mismo, el cual luego será utilizado en estudios de análisis de EVs y comunicación intercelular (Wei et al., 2016). De hecho, los autores demuestran que la mayor parte del ARN presente en el suero (aproximadamente el 70%) queda como remanente, el cual es luego co-purificado con el ARN extracelular derivado del cultivo celular en estudio pudiendo de esta forma interferir con el análisis del ARN extracelular. En la figura a continuación ilustramos las contaminaciones potenciales de ARN exógenos a partir del suero bovino fetal utilizado para suplementar medios de cultivo.

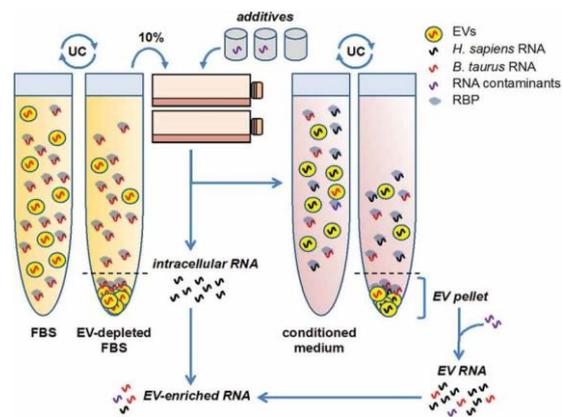


Figura 4: Los protocolos de ultracentrifugación del suero bovino fetal (SBF) no logran depletar el suero de vesículas ni ARN lo cual interfiere con el estudio del ARN extracelular. Este SBF parcialmente libre de EVs y ARN es luego utilizado como aditivo en los medios de cultivo. Al purificar vesículas extracelulares (EVs) a partir del medio condicionado de células crecidas con este SBF, se obtiene una fracción vesicular compuesta de EVs y ARNs provenientes de las células en estudio y del SBF. Como consecuencia, el análisis e interpretación de resultados del estudio de ARN extracelulares se ve entorpecido por este tipo de contaminación. Extraído de Tosar et al., 2017

Por el contrario, (Tosar et al., 2015), mediante el uso de medios de cultivo definidos sin SBF, nuestro equipo pudo demostrar que la secreción de miRNAs no es selectiva y se correlaciona directamente con las concentraciones intracelulares. Dada esta diferencia a nivel experimental, en nuestro laboratorio estudiamos si los miRNAs reportados en estos trabajos como selectivamente secretados en EVs podrían derivar por contaminación a partir del suero bovino (Tosar et al., 2017). Encontramos efectivamente que los miRNAs reportados como selectivamente secretados por las células como son miR-122 5p (Fong et al., 2015), miR-1246 (Pigati et al., 2010), miR320a (Guduric-Fuchs et al., 2012) o miR-486-5p (Guduric-Fuchs et al., 2012; Koppers-Lalic et al., 2014) son los miRNAs que Wei et al, reportan como los miRNAs más

abundantes en el suero fetal bovino. Más aún, como se explica en este trabajo (Tosar et al., 2017), muchos de los miRNAs que se reportan como enriquecidos a nivel extracelular, no son detectados dentro de la célula parental (Pigati et al., 2010; Shurtleff et al., 2016), el mapeo de la secuencia coincide en un 100% de identidad con otras moléculas de pequeños ARNs o incluso, su detección en ese contexto celular no tiene sentido biológico alguno. En relación a esto último, (Ouyang et al., 2014) reportan en EVs derivadas de células T un enriquecimiento del miR-513 y miR-520, dos miRNAs que se expresan de forma específica en las células del trofoblasto, por lo que la secreción a través de EVs de células T no tiene sentido. Por consiguiente, en este estudio llevado a cabo por nuestro laboratorio se pone en manifiesto varios trabajos en donde el ARN derivado del suero podría contribuir y explicar los hallazgos encontrados. De esta forma la secreción selectiva de miRNAs es un mecanismo aún no demostrado.

No obstante, como explican los autores en este trabajo, esto no significa que todos los reportes de enriquecimiento de pequeños ARN a nivel extracelular sean un artefacto. De hecho nuestro grupo de trabajo, así como otros laboratorios, observamos y reportamos un aumento en EV de la abundancia relativa de fragmentos derivados de tRNAs e Y-RNAs (Lunavat et al., 2015; Tosar et al., 2015; van Balkom et al., 2015). En particular, observamos que mitades 5' de derivadas de tRNA Glicina (tRNA^{Gly}) y Ácido Glutámico (tRNA^{Glu}), y fragmentos 5' de Y-RNA se encontraban significativamente enriquecidos en el espacio extracelular.

En definitiva, más allá de los esfuerzos realizados, cómo ocurre la secreción de ARNs pequeños al espacio extracelular continúa en disputa

1.4 Transferencia de EVs entre células

Las funciones de las EV al momento descritas, ya planteadas a lo largo de esta introducción, dependen de su capacidad de interactuar con células receptoras y eventualmente transferir su contenido.

Las bases celulares y moleculares subyacentes a la interacción EV – célula receptora han comenzado a emerger. La captación de EV por parte de las células es un mecanismo que depende del tipo celular y reconocimiento entre ligandos y receptores presentes alternativamente en la superficie vesicular y exosomal. Por ejemplo, se ha visto que moléculas presentes en la superficie celular tal como el Heparán sulfato (Atai et al., 2013; Christianson et al., 2013) proteínas de la familia tetraspaninas (Rana et al., 2012) y otras moléculas como Galectina – 5 (Barrès et al., 2010) o Galectina – 9 (Klibi et al., 2009) regulan eficientemente la captación de vesículas por parte de las células receptoras que las contienen. También se ha demostrado cómo integrinas presentes en exosomas derivados de células tumorales pueden dirigir e influenciar su captación (Hoshino et al., 2015). Notablemente, los autores muestran que exosomas derivados de células tumorales de diferentes tejidos poseen anclados en su membrana diferentes conjuntos de integrinas. Y que este el conjunto de integrinas determinará el tejido el cual captará estos exosomas. Además, dado que estos exosomas derivados de células tumorales son capaces de promover la metástasis en su tejido blanco, en este sentido, el perfil de integrinas presentes en los exosomas determina qué tejido será capaz de internalizar los exosomas y más aún, el tejido en donde ocurrirá la metástasis. También,

factores del entorno como temperatura, pH (Nakase and Futaki, 2015; Parolini et al., 2009) y la biodisponibilidad del ATP intracelular (Ronquist et al., 2016) han sido demostrados como factores que afectan la captación de EVs.

Existen tres mecanismos principales de interacción e influencia funcional entre EV y células receptoras. En primer lugar, existe una interacción entre EV y células receptoras mediante interacción ligando receptor que da a lugar a vías de transducción de señales sin necesidad de internalización de EV o contenido. Segundo, las EV pueden interaccionar con las células receptoras y liberar su contenido mediante fusión directa con la membrana celular. Y en tercer lugar, puede ocurrir la internalización de las EVs mediante endocitosis, endocitosis dependiente de clatrina o caveolina, macropinocitosis o fagocitosis (Bellingham et al., 2012; Mateescu et al., 2017; Patton et al., 2015). Más aún, hay evidencia que apoya la interacción de las EVs con balsas lipídicas, la cual resulta en la posterior entrada de las EVs a las células. Estas balsas lipídicas también estarían involucradas en la endocitosis mediada por clatrina y caveolina (Mulcahy et al., 2014)(Figura 5)

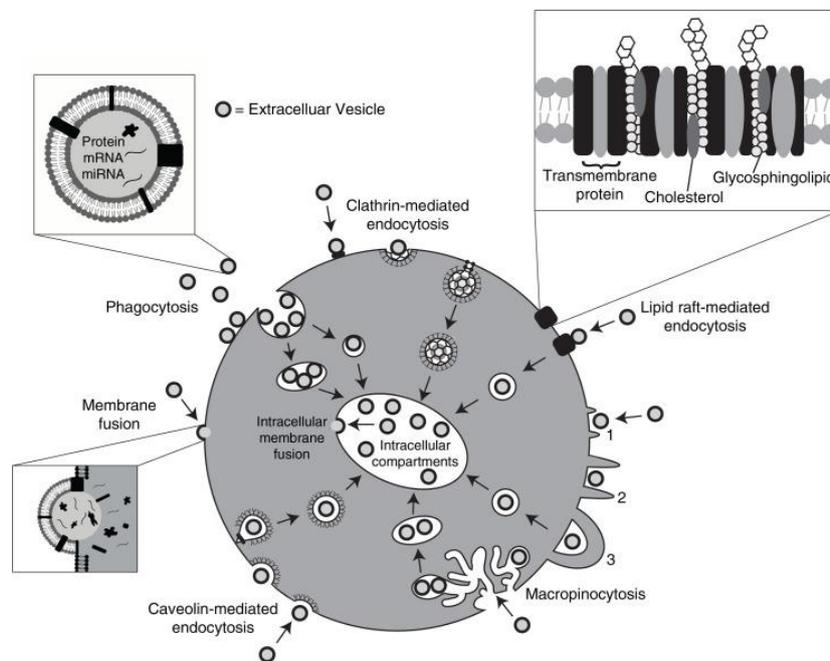


Figura 5: Diferentes mecanismos de entrada de EV a células dianas. Las vesículas pueden ingresar a las células receptoras mediante fusión directa con la membrana plasmática, endocitosis, endocitosis dependiente de clatrina, micropinocitosos o fagocitosis. También hay evidencia que apoya la interacción de las EVs con balsas lipídicas, la cual resulta en la posterior internalización de las EVs. Extraído de Mulcahy et al 2017

Como se mencionó anteriormente, la transferencia de ARN mediado por vesículas ha sido demostrada de forma *in vitro* en diversos modelos celulares. Más interesante aún, diferentes ensayos reporteros han sido desarrollados para estudiar este fenómeno de transferencia. Por ejemplo, Skog y colaboradores (Skog et al., 2008) llevan a cabo un estudio donde transfectan células donadoras con ARNm que codifica para una luciferasa (*Gaussialuciferase*). Este ARNm

es luego transferido a través de EVs a células receptoras en donde los autores fueron capaces de detectar señal bioluminiscente. De esta forma los autores demostraron que una vez dentro de la célula receptora, el ARNm es funcional y es capaz de ser traducido a proteína. De forma similar, Zhang y colaboradores (Zhang et al 2010), usando EVs provenientes de células que sobreexpresan un miRNA en particular, demuestran la represión de la traducción del ARNm blanco del miRNA en la célula receptora.

Estos y otros estudios han fortalecido la hipótesis que la transferencia funcional de ARNm y miRNAs asociados a EV pueden ocurrir *in vitro* entre células de mamíferos. Con respecto a la transferencia *in vivo* y si esta es relevante durante procesos fisiológicos o patológicos, hay muy pocos trabajos que lo avalan.

No obstante, en nuestro laboratorio se pudo demostrar en *Trypanosoma cruzi* la transferencia de EVs entre parásitos. Además, se demostró la transferencia de EV de *T. cruzi* a células de mamífero receptoras, lo cual promovió la infección de estas células por el parásito (Garcia-Silva et al., 2014) Se ha demostrado también que el parásito *Heligmosomoides polygrus* al infectar el tracto gastrointestinal de los ratones, es capaz de secretar vesículas conteniendo ARNs pequeños, mediante los cuales el parásito logra suprimir la respuesta inmune innata del ratón (Buck et al., 2014). De forma muy reciente, otro trabajo demuestra que frente a una infección con un hongo, la planta *Arabidopsis* es capaz de transferir mediante EVs ARNs pequeños al hongo, que ayudan a controlar la infección (Cai et al., 2018). En este sentido, estos tres trabajos no solo demuestran la transferencia *in vivo* y su rol fisiológico, sino que además demuestran que la transferencia de material genético a través de EVs puede entre seres vivos de reinos diferentes, y evolutivamente lejanos.

2 ARNs no asociado a EVs (extravesicular)

Más allá de las vesículas, el ARN extracelular puede encontrarse asociado a proteínas tal como AGO2 (Turchinovich et al 2011, Arroyo et al 2011) o lipoproteínas de alta densidad HDL (Vickers et al., 2011). A esta fracción soluble formada por ARN no vesicular se le denomina comúnmente fracción no vesicular. Además, se demostró que los pequeños ARNs circulantes reportados previamente en EVs representan una pequeña proporción del total circulante. La mayor parte del ARN extracelular se encuentra de hecho, no asociado a EVs. Más aún, en un principio únicamente se había descrito la presencia de miRNAs en esta fracción. Ahora es clara la presencia de otras especies de pequeños ARNs como tRFs, mitades de tRNAs eY-RNAs tanto en el sobrenadante de cultivo como en diversos fluidos corporales (El-Mogy et al., 2018; Max et al., 2018; Tosar et al., 2015)

A pesar del gran atractivo que genera el campo del ARN asociado a vesículas, mucho resta aún por saber y definir. Con respecto al ARN no asociado a vesículas, descrito de forma más reciente y menos estudiado, el escenario es más austero aún. A parte de estudios donde se describe el perfil de ARNs no vesicular en diferentes fluidos, actualmente no hay reportes que describan sus potenciales funciones.

ANTECEDENTES

En el siguiente apartado se comentará acerca de trabajos realizados en el laboratorio en los cuales participé de forma activa, y que constituyen la base que dio lugar al presente trabajo. Varios de estos resultados se obtuvieron durante el desarrollo de esta Tesis, por lo que estos no constituyen *per se* un “antecedente cronológico”.

La estructura y significado biológico del ARN extracelular constituye una de las principales líneas de investigación de nuestro laboratorio. Desde ya hace unos años que se pone especial atención al ARN extracelular, en particular a fragmentos derivados de tRNAs. De hecho nuestro laboratorio fue uno de los primeros en mostrar la presencia de mitades de tRNAs en organismos como *Trypanosoma cruzi* (Garcia-Silva et al., 2010) y proponer un posible rol para estos fragmentos de tRNAs como mediadores de la comunicación intercelular (Fernandez-Calero et al., 2015; Garcia-Silva et al., 2014).

Más cercano en el tiempo, se realizó un estudio, en el cual me vi personalmente involucrada durante el desarrollo de mi tesis de grado, con el objetivo de conocer y caracterizar el perfil y mecanismos de secreción de ARNs pequeños por líneas celulares mamarias benignas (MCF-10A) y malignas (MCF-7)(Tosar et al., 2015). Para ello se estudió el contenido de ARNs pequeños a nivel intracelular y en distintas fracciones extracelulares que incluyen: microvesículas, exosomas y una fracción soluble denominada no vesicular. Para el aislamiento de estas fracciones se utilizó un protocolo de ultracentrifugación diferencial. Durante el desarrollo de este trabajo se denominó como p16 y p100, al pellet obtenido luego de la centrifugación a 16.000 y 100.000g. Estos corresponden a las fracciones mayormente enriquecidas en microvesículas y exosomas respectivamente. Como s100 se denotó al sobrenadante obtenido luego de la centrifugación a 100.00g, el cual corresponde a la fracción soluble, no vesicular, mayormente enriquecida en complejos ribonucleoproteicos. Mediante técnicas de secuenciado profundo, se estudió el contenido de ARNs pequeños de estas fracciones y en la fracción intracelular, para ambas líneas celulares por triplicado. Entonces, a con el objetivo de conocer cómo era el mecanismo de secreción de miRNAs en estos modelos celulares, se estudió para cada miRNA la correlación entre la abundancia a nivel intracelular y a nivel de las fracciones extracelulares. Los resultados obtenidos se representan en la figura 6, en donde se graficó para cada miRNA individual, el valor en \log_2 de RPM a nivel intracelular en función del valor en \log_2 de RPM para cada fracción extracelular. La sigla RPM deriva del inglés “reads per million of mapped reads” y con este término se refiere a la cantidad de lecturas por millón de lecturas mapeadas. En otras palabras, se graficó para cada miRNA, su abundancia relativa intracelular en función de su abundancia relativa extracelular, para las tres fracciones diferentes (p16, p100 y s100). A partir de este análisis, se encontró que los miRNAs más abundantes a nivel intracelular eran los más abundantes también a nivel extracelular. Esto significó que el contenido extracelular de miRNAs, ya sea a nivel de microvesículas (p16), exosomas (p100) o fracción no vesicular (s100), era un reflejo del contenido intracelular. Para validar esto se construyó un modelo teórico a partir de la abundancia relativa de cada miRNA y asumiendo un mecanismo de secreción no selectivo (representado por el área gris de cada gráfico en la figura 6). Como se puede observar, los datos se ajustaron al modelo con $r^2 \approx 0,8$ para las tres fracciones. De esta forma, se observó para la mayoría de los miRNAs, que la

abundancia en las fracciones extracelulares era consistente con un modelo de secreción no selectivo.

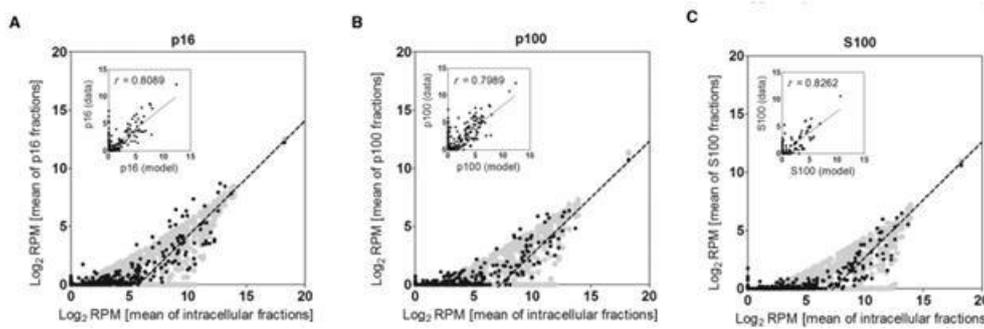


Figura 6: Existe una fuerte correlación entre el contenido de miRNAs a nivel intracelular y extracelular. Promedio de la abundancia de cada miRNA (\log_2 RPM) en cada fracción extracelular p16 o microvesículas (a), p100 o exosomas (b) y s100 o fracción no vesicular (c) en función de los niveles intracelulares. El área gris representa el modelo teórico que asume secreción no selectiva, construido a partir de la abundancia relativa de cada miRNA. Para aquellos miRNAs con un abundancia intracelular superior a 2^5 , muestran un relación lineal entre su abundancia intra y extracelular. Esto queda denotado mediante la línea punteada en negro que muestra una recta con pendiente =1.

Se observó también tanto para la línea MCF-7 como MCF-10 A, que si bien a nivel intracelular predominaban en abundancia los miRNAs, a nivel extracelular, y en particular a nivel de la fracción no vesicular, predominaban en abundancia las mitades 5' de tRNA (Figura 7a). Además de demostrar que la abundancia relativa de las mitades 5' de era sustancialmente mayor en las fracciones extracelulares que en la fracción intracelular, se observó que en la fracción extracelular existía una selección en la naturaleza y el tamaño de las mitades 5' de tRNA. Es decir, si bien varias mitades 5' de tRNA fueron detectadas a nivel intracelular, a nivel extracelular se detectó casi en su totalidad, únicamente las mitades 5' de tRNA^{Glu}_{CUC} y tRNA^{Gly}_{GCC} (Figura 7b).

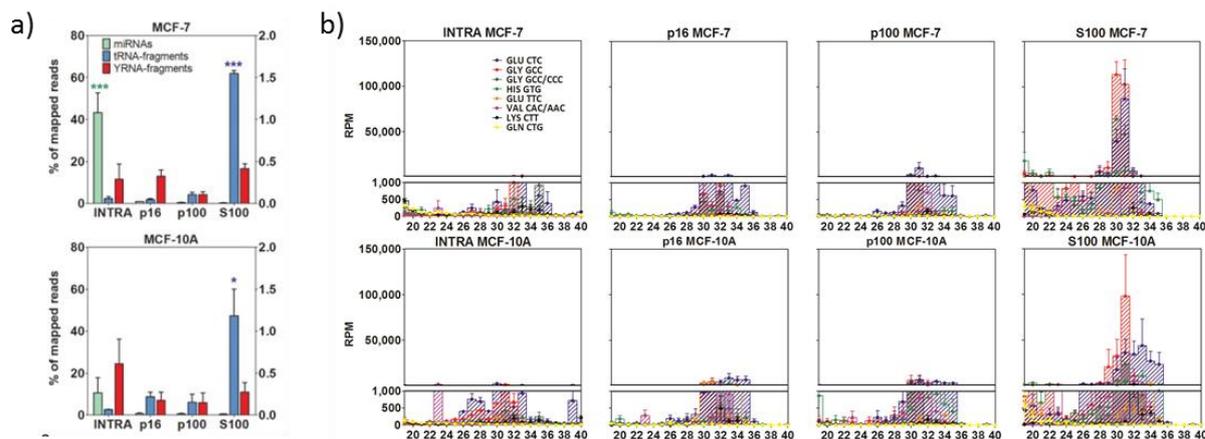


Figura 7: El medio extracelular se encuentra enriquecido de mitades 5' de de tRNA^{Glu}_{CUC} y tRNA^{Gly}_{GCC} En a) se muestra el porcentaje de lecturas mapeadas correspondientes a miRNAs (verde), mitades 5' de tRNAs (azul) y fragmentos derivados de Y-RNAs (rojo) a nivel intracelular y extracelular (p16, p100 y s100). En B) se muestra la abundancia relativa de diferentes mitades de tRNAs a nivel intracelular y extracelular para la línea MCF-7 (arriba) y MCF 10A (abajo). Extraído de Tosar et al 2015.

Todos estos resultados parecen indicar que diferentes familias de pequeños ARNs tienen mecanismos de secreción diferentes: los miRNAs parecerían ser secretados bajo un modelo de secreción no selectivo, mientras que mitades 5' de tRNA^{Glu}_{CUC} y tRNA^{Gly}_{GCC} bajo un modelo de secreción selectivo o diferencial. Alternativamente, su abundancia extracelular podría deberse a fenómenos de estabilidad diferencial en el medio extracelular. De repente, esta diferencia en el perfil y contenido de ARN a nivel extracelular no es el resultado de un proceso selectivo sino que se debe a una diferente estabilidad de estas moléculas a nivel extracelular. Es decir, tal vez diversas mitades 5' de tRNAs son secretadas en las distintas fracciones extracelulares pero únicamente se observan las mitades 5' de tRNA^{Glu}_{CUC} y tRNA^{Gly}_{GCC} ya que son las especies más estables a nivel extracelular, lo cual podrían interpretarse como un enriquecimiento diferencial de las mismas.

Este trabajo despertó nuevas inquietudes. Por un lado, nuestro trabajo es de los pocos en proponer que los miRNAs son secretados de forma no selectiva. Como se mencionó ya en la introducción, la mayoría de los estudios proponen una secreción diferencial de miRNAs. Conocer los mecanismos subyacentes a la incorporación y secreción de ARNs pequeños como miRNAs es importante ya que al momento hay mucho interés en el estudio de ARN circulantes como por ejemplo, por su potencial rol de biomarcadores. Es así que, se pretende encontrar ARNs circulantes que puedan utilizarse como biomarcadores para la detección temprana de diversas enfermedades como el cáncer. Esta búsqueda se basa en el supuesto de que el contenido de ARN en las EVs es particular del tipo y estado fisiológico de la célula parental, por lo que el perfil de ARN extracelular sería una representación del contenido intracelular de la célula de origen en un momento y estado específico. Sin embargo, la búsqueda de biomarcadores bajo la hipótesis de un modelo de secreción selectiva de ARNs pequeños, implica encontrar un ARN pequeño para el cual no haya correlación entre su contenido intracelular vs extracelular. Esto presupone un ARN pequeño cuyos niveles extracelulares sean altos y preferentemente, niveles intracelulares bajos. En cambio, bajo la hipótesis de un

modelo no selectivo, encontrar un ARN pequeño que pueda utilizarse como biomarcador implica encontrar un ARN pequeño abundante a nivel extracelular pero también a nivel intracelular. Esta diferencia en la hipótesis de base, puede traer consecuencias en el análisis, interpretación y por consiguiente, en la elección de un miRNA específico (por ejemplo), como biomarcador para una determinada enfermedad. Por lo tanto, consideramos de suma importancia entender y conocer este mecanismo, más allá del valor que aporta *per se*.

Por otro lado, el aumento observado en la abundancia extracelular de las 5' de tRNA^{Gly}_{GCC} y tRNA^{Glu}_{CUC}, captó mucho nuestra atención. Nos interesó responder a que se debía este enriquecimiento observado a nivel extracelular. Con el conocimiento acerca del ARN extracelular al momento, la secreción diferencial es la opción más intuitiva. Pero, la idea de que específicamente estas mitades de tRNA tuvieran una mayor estabilidad que les permitiera permanecer en el medio extracelular y por lo tanto ser las casi únicas mitades de tRNAs detectadas no podía ser, al momento, descartada. Entusiasmados con esta posibilidad, recientemente comenzamos a estudiar *in silico* la estructura de las mitades de tRNAs. Nuestros estudios sugirieron que las mitades 5' de tRNA^{Gly}_{GCC} y tRNA^{Glu}_{CUC} podían formar homo y heterodímeros respectivamente (Figura 8) (Tosar et al., 2018).

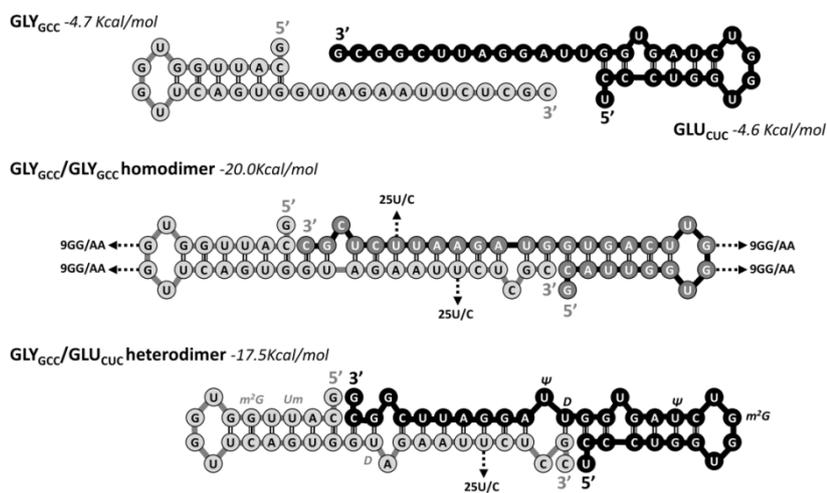


Figura 8: Estructura secundaria putativa de homodímeros tRNA^{Gly}_{GCC} y heterodímeros tRNA^{Glu}_{CUC} y tRNA^{Gly}_{GCC}. Estructura secundaria del monómero más estable predicha por el mFold (a). Estructura secundaria del homodímero de tRNA^{Gly}_{GCC}(b) y del heterodímero tRNA^{Gly}_{GCC} y tRNA^{Glu}_{CUC}(c) obtenidas a partir del software Bifold. Con las flechas se indican los mutantes 9GG/AA y 25U/C. Extraído de Tosar y Gámbaro et al 2018

A partir de este momento y a lo largo de la tesis cada vez que se nombre mitades 5' de tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} nos estaremos refiriendo específicamente a las mitades 5' de tRNA^{Gly}_{GCC} y tRNA^{Glu}_{CUC} respectivamente.

Mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos se pudo demostrar que efectivamente las mitades 5' de tRNA^{Gly} pueden dimerizar *in vitro*. Este estudio se hizo mediante cromatografía de exclusión molecular, un abordaje experimental muy utilizado en el laboratorio para el estudio y análisis de ARN (Tosar and Cayota, 2018). A través de esta técnica se observó que al inyectar en la columna oligonucleótidos sintéticos de tRNA^{Gly} se definían dos picos los cuales

correspondían a un ARN doble hebra en torno a los 60 nucleótidos definido como dímero (pico D en la figura 9a) y ARN simple hebra de aproximadamente 30 nucleótidos definido como monómero (pico M en la figura 9a). Más aún, el estado en forma de dímero se vio favorecido al inyectar el oligo en concentraciones crecientes del mismo lo cual va en línea con un equilibrio monómero – dímero (Figura 9b). Por otro lado, para el oligonucleótido sintético tRNA^{Gly}, para el cual se predijo que era solamente capaz de formar heterodímero con tRNA^{Gly}, al ser inyectado en ausencia de tRNA^{Gly} en la columna se comporta de forma monomérica (Figura 9a), lo cual valida en parte el modelado estructural.

Para validar este diseño estructural de dímeros de mitades se diseñaron dos mutantes. El primero, al cual llamamos mutante 25U/C, tenía una única mutación puntual en la putativa interfase de dimerización. Luego, un segundo mutante, el 9GG/AA en donde las guaninas 9 y 10 fueron intercambiadas por dos adeninas. Como se observa en la figura 9a, los oligonucleótidos sintéticos de tRNA^{Gly} Wt y 9GG/AA aparecen de forma dimérica, mientras que el mutante 25U/C de forma monomérica. Por consiguiente, tal como se esperaba, mutaciones puntuales en la fase de dimerización (25U/C) evitan la dimerización, mientras que mutaciones en el *tetraloop* de tRNA el cual no participa en la formación del dímero, no afectaron la capacidad de dimerizar. Esto dio un fuerte apoyo a las predicciones estructurales.

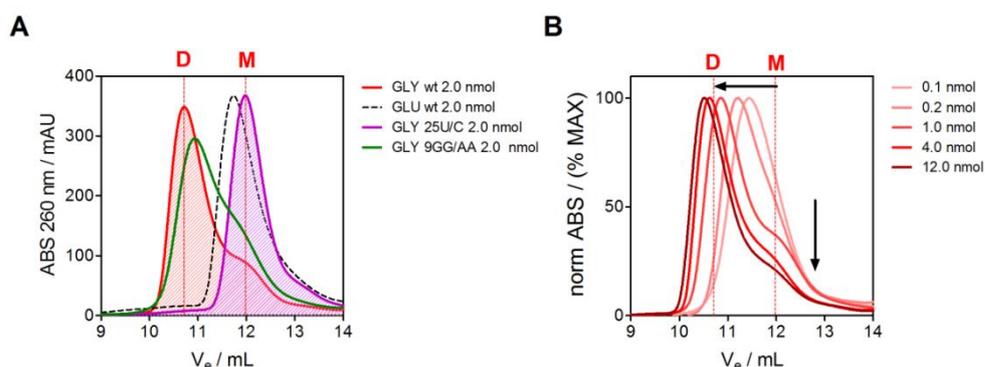


Figura 9: Las mitades 5' de tRNA^{Gly} forman homo-dímeros *in vitro*. Los cromatogramas muestran la absorbancia a 260 nm para los oligos correspondientes a las secuencias mitad 5' tRNA^{Gly} Wt (rojo) y mutantes 25U/C (violeta) y 9GG/AA (verde). En línea punteada negra se muestra el oligo5' tRNA^{Gly} el cual es incapaz de formar dímeros en ausencia de mitad 5' tRNA^{Gly} Wt. Extraído de de Tosar y Gámbaro et al 2018.

A modo de verificar si la capacidad de las mitades tRNA^{Gly} de formar dímeros se relacionaba con una mayor estabilidad, se comparó la sensibilidad *in vitro* de los oligonucleótidos tRNA^{Gly} versión WT, 9GG/AA y 25U/C frente al tratamiento con nucleasas. A partir de estos ensayos se vió que el tratamiento con nucleasas provocaba una rápida degradación del mutante incapaz de dimerizar, tRNA^{Gly} 25U/C, pero no así del mutante capaz de dimerizar tRNA^{Gly} 9GG/AA ni del tRNA^{Gly} Wt. Esto último proporciono una fuerte evidencia sobre la estructura de estos fragmentos y demostró que la capacidad de las mitades 5' de tRNA^{Gly} de dimerizar se correlaciona con su estabilidad *in vitro* (Figura 10) (Tosar y Gámbaro et al 2018)

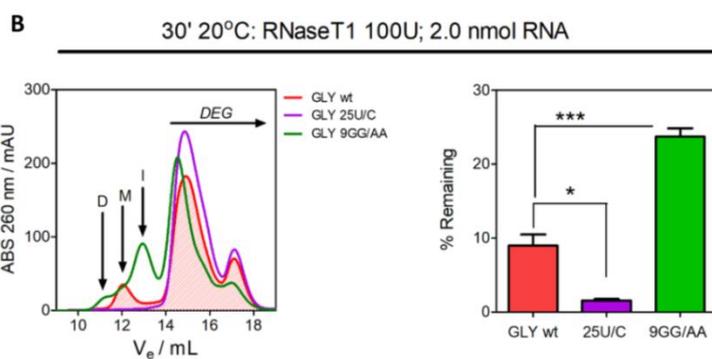


Figura 10: Digestión controlada con RNase T1 de cantidades equimolares de tRNA^{Gly} WT (rojo), 9GG/AA (verde) y 25U/C (violeta). Para cada oligo se calculó el porcentaje remanente luego del tratamiento con la nucleasa como la absorbancia a 260nm por debajo del volumen de elución 14ml (productos no degradados) sobre el total de la absorbancia a 260nm. Como test estadístico se utilizó One-way ANOVA con Turkey post-hoc test. Extraídode Tosar y Gámbaro et al 2018.

En conclusión, se demostró que las mitades 5' de tRNA^{Gly} debido a su capacidad de formar estructuras en forma de dímero, presentaban una mayor estabilidad *in vitro* con respecto a secuencias control. Esto nos hizo preguntarnos qué sucedería con la estabilidad de estas mitades dentro y fuera de la célula.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Como hipótesis de trabajo nos basamos que la capacidad de las mitades de tRNA^{Gly} de auto ensamblarse para formar dímeros, le confiere estabilidad intracelular. De esta forma, no son degradadas dentro de la célula, lo cual nos dio la posibilidad de poder trabajar con las mismas pero ahora de manera *in cellulo*. Pensamos que esto nos permitiría poner a prueba nuestra hipótesis de secreción no selectiva de pequeños ARNs, en donde la concentración intracelular determina la concentración extracelular. Más aún, hipotetizamos que las mitades 5' de tRNAs son secretadas en vesículas extracelulares y pueden así ser transferidas entre células mediante vesúclas que tengan por ejemplo, determinados receptores de superficie, que les permita captar estas vesículas. En este sentido, un modelo de transferencia homotípica, es decir, entre el mismo tipo celular fue nuestra primera elección. Para estudiar esto, nos propusimos utilizar mitades 5' de tRNAs marcadas. Con estas deberíamos ser capaces de estudiar y seguir qué pasa con las mismas una vez que las introducimos en las células, hasta su eventual secreción y transferencia entre células, distinguiéndolas de las mitades de tRNAs propias de las células receptoras. Consideramos que este modelo experimental debería ayudarnos a estudiar cómo es la secreción de ARNs pequeños y contestar si las mitades de tRNA^{Gly} pueden actuar como mediadores de la comunicación intercelular.

OBJETIVO GENERAL

Aportar evidencia sobre el mecanismo de secreción y transferencia de mitades 5' de tRNA^{Gly} como potencial mecanismo de comunicación intercelular.

Objetivos específicos

1. Evaluar si la capacidad de las mitades de tRNA^{Gly} de formar dímeros se correlaciona con una mayor estabilidad intracelular.
2. Definir el vehículo de secreción de mitades 5' de tRNA^{Gly}
3. Obtener evidencia sobre cómo es el mecanismo de secreción de ARNs pequeños por parte de la línea celular MCF-7
4. Demostrar la transferencia intercelular de mitades de tRNA *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de células

Los cultivos de la línea MCF-7 se realizaron en atmósfera controlada de CO₂ (5%) y a 37°C, en medio DMEM y 10% de suero bovino fetal (Gibco), hasta que se obtuvo el número de células deseado. Las células fueron disgregadas mediante una solución de Tripsina – EDTA (Gibco) y repicadas en frascos y/o placas de cultivos de acuerdo a lo necesario. Luego de 24h de cultivo en condiciones estándar, se cambió el medio de las células a medio libre de suero denominado MEGM (“Mammary Epithelial Growth Medium”, Lonza Clonetics) y se prosiguió a realizar los ensayos correspondientes. En todos los casos, el porcentaje de células muertas cuando éstas fueron eran crecidas en MEGM fue menor al 5%, según ensayos de viabilidad celular realizados mediante tinción con azul tripán.

Si bien la mayoría de las líneas celulares requieren de suero fetal bovino como fuente de nutrientes y factores de crecimiento, a efectos de nuestros estudios el suero implica un problema dado que dentro de los diversos componentes presentes podrían existir vesículas extracelulares y complejos ribonucleoproteicos conteniendo ARNs pequeños. Por este motivo, se trabaja con cultivo de células MCF-7 en ausencia de suero. Se ha comprobado que el uso de suero sometido a ultracentrifugación no remueve sus ARNs de forma eficiente, dando lugar a resultados artefactuales (Wei et al. 2016; Tosar et al. 2017).

Purificación de vesículas extracelulares

A partir de los medios definidos obtenidos de los cultivos de la línea celular MCF-7 se realizó mediante ultracentrifugación la purificación de la fracción vesicular y fracción no vesicular, tal como fue descrito y caracterizado por nuestro grupo anteriormente (Tosar et al., 2015). Dicho protocolo consiste en una centrifugación inicial a 300g para sedimentar células no adheridas y otra centrifugación a 2.000g para eliminar detritos celulares y cuerpos apoptóticos. El sobrenadante fue centrifugado a 100.000g durante dos horas y media a 4°C para sedimentar las vesículas. El pellet, al cual llamaremos fracción vesicular “EV” se lavó y resuspendió en medio MEGM. El sobrenadante consiste en la fracción no vesicular a la que denominaremos “non-EV”. Esta fue concentrada a un volumen final de 250 µL mediante ultrafiltración (Vivaspin 20; MWCO 10KDa).

Extracción de ARN

Se llevó a cabo la extracción de ARN intracelular utilizando Trizol (Invitrogen, Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se agregó ≈ 1000µl de Trizol a 1×10^5 – 1×10^7 células, se agitó la muestra de forma vigorosa y se incubó 15 minutos. A continuación se agregó 200µl de cloroformo y se centrifugaron las muestras 15 minutos a 4°C a 12.000g. Se alicuotó la fase acuosa en un tubo *Eppendorf* libre de nucleasas procurando no tomar de la interfase. A la fase acuosa se le agregó ≈ 800µl de isopropanol, se incubó durante

10 minutos. Luego las muestras se centrifugaron 15 minutos a 12.000g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet agregando 1 ml de etanol 80% y centrifugando 5 minutos a 7.500g a 4°C. Por último el pellet se resuspendió en 10µL de agua libre de RNAsas y se almacenaron las muestras a -80°C. La cuantificación del ARN extraído se realizó por Nanodrop 1000 (ThermoScientific).

Detección de ARNs pequeños mediante PCR en tiempo real

Para la detección de mitades de ARNt y microARNs se utilizó una modificación del protocolo *stem-loop RT real time PCR*, o simplemente *SL-RT-qPCR*. Este método implica un primer paso de retrotranscripción (RT) para el cual se utiliza un *stem-loop primer* o *SL primer* el cual se hibrida a las 6 bases del extremo 3' del ARN pequeño de interés y luego el mismo se retrotranscribe utilizando una transcriptasa reversa. Diversos autores sostienen el uso de *SL primers* para la detección de ARNs pequeños ya que el uso de los mismos aumenta la especificidad de la retrotranscripción por las secuencias de interés y no por sus precursores (Chen et al., 2005). Esto es así dado que la estructura bucle – horquilla del *SL primer* impide la unión del mismo al ADN o ARN doble hebra que podría estar presente en la muestra, lo cual permite en especial discriminar entre miRNAs maduros y los pre- miRNAs; sus precursores más largos y de doble hebra (Jung et al., 2013). Por otro lado, se cree que la corta secuencia de unión del *SL primer* al extremo 3' del ARN pequeño de interés es capaz de discriminar entre el extremo 3' blanco en cuestión y un extremo 3' mutado o parcialmente degradado. El segundo paso implica la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCR en tiempo real o qPCR) en donde el ADN copia resultante de la retrotranscripción es cuantificado utilizando sondas de hidrólisis o, en nuestro caso, el agente intercalante SYBR Green (Thermo Scientific). Para la PCR en tiempo real se utilizan dos *primers*, un *primer* reverso el cual es complementario a una región interna de la horquilla del *SL primer* y un *primer* directo, el cual es de secuencia idéntica a una región del ARN pequeño de interés. Nótese que durante la reacción de PCR el cDNA se somete a altas temperaturas (95°C), lo que provoca la desnaturalización térmica del *SL-primer* y la consecuente exposición del sitio complementario al primer reverso. El SYBR Green es un fluorocromo que se une al ADN doble hebra y forman un complejo el cual fluoresce a 522nm. Por lo tanto, a medida que se amplifica el ADN, el SYBR Green se va uniendo al ADN doble hebra y la fluorescencia va aumentando. La intensidad de fluorescencia se mide a final de cada ciclo y se registra el ciclo de PCR en el cual la misma supera un determinado umbral. Dicho ciclo es denominado “ciclo de cuantificación” (Cq) y es el parámetro que se compara entre muestras distintas para establecer concentraciones relativas.

Se evaluaron por *SL-RT-qPCR* la presencia del miRNA miR-21-5p, las mitades 5' de los tRNAs aceptores de ácido glutámico (anti-codón CUC) y glicina (anti-codón GCC), y otras mitades 5' de tRNA derivadas de este último: mutante 25U/C, mutante 9GG/AA y una versión donde las bases fueron permutadas de manera de alterar la secuencia lo más posible sin afectar la composición de bases, a la cual llamaremos “SCR” (por *scrambled*, en inglés).

Para el caso de la *SL-RT-qPCR* a partir de extractos intracelulares, las muestras de ARN fueron diluidas hasta alcanzar una concentración final de 20 ng/µL. En cambio, cuando se llevó a cabo

RT-qPCR a partir de fracciones extracelulares, se lo hizo de forma directa, es decir, sin previa extracción de ARN. Solamente se procuró de previamente tratar las muestras a 95°C (a los efectos de romper posibles interacciones proteína:ARN o ARN:ARN) durante 5 minutos y luego incubarlas en hielo inmediatamente. Para ambos casos, se agregaron 2 µL de muestra al mix de retrotranscripción (volumen final de 7µL) en el cual las condiciones de los reactivos fueron las siguientes: 1X Buffer Superscript II, dNTPs 10mM, DTT 10 mM, 1X Inhibidor de ARNasa recombinante (Sigma) y la transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen, Life Technologies). Por último se agregó el SL *primer* correspondiente a una concentración final de 10nM. La especificidad de cada reacción de retrotranscripción está dada por los nucleótidos protruyentes en el extremo 3' del SL *primer* cuya secuencia se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 1: SL- *primers* utilizados en la reacción de RT de la SL-RT-qPCR para la detección de los diferentes ARNs pequeños

Oligonucleótido	Secuencia
miR-21-5p [23nt] SL-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC GTCAAC
tRNA-GLU ctc [1-31] SL-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC CGCCGA
tRNA-GLYgcc [1-30] SL-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC GCGAGA
tRNA^{Gly}_{GCC} SCR [1-30] SL-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGC GAGG

Las condiciones de la reacción de la RT fueron las siguientes: 16°C 30min; 42°C 30min; 85°C 5 min (Veriti 96 well Thermal cycler, Applied Biosystems)

Luego, se agregó 10 µl de agua libre de nucleasas a cada tubo de reacción a efectos de diluir el ADNc y el SL *primer*. Para llevar a cabo la qPCR se utilizó 2µl del ADNc, un “master mix” conteniendo el fluoróforo SYBR-green (Applied Biosystems), *forward primer* a concentración 1.5 µM y *reverse primer* a concentración 0.7 µM. El volumen final de reacción fue de 10uL. En este caso, el *reverse primer* consiste en un oligonucleótido universal complementario a una región interna del SL *primer*, mientras que el *forward primer* es específico del extremo 5' de cada ARN pequeño a analizar. Sus secuencias se detallan a continuación:

Tabla 2: Forward y reverse primers utilizados en la SL-RT-qPCR para la detección de los diferentes ARNs pequeños

Oligonucleótido	Secuencia
Forward primer miR-21-5p [23nt]	5' gccccgTAGCTTATCAGACTGATGT
Forward primer tRNA-GLUctc [1-31]	5' TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGG
Forward primer tRNA-GLYgcc [1-30]	5' ccGCATTGGTGGTTCAGTGGTA
Forward primer tRNA-GLYgcc SCR[1-30]	5' ggGTATAGGTGTGTCGGTAGTA.

Forward primer tRNA-GLYgcc 25U/C [1-30]	5' ccGCATTGGTGGTTCAGTGGTA
Forward primer tRNA-GLYgcc 9GG/AA [1-30]	5' gctcgGCATTGGTAATTCAGTGGTA
Reverse primer	5' GTGCAGGGTCCGAGGT

El programa de ciclado utilizado para la PCR fue 95°C 10min; [95°C 15s; 60°C 1min] por 40 ciclos (Step- one plus 96 well, Applied Biosystems).

Cuantificación de ARNm de Angiogenina mediante PCR cuantitativa

La cuantificación de los niveles de ARNm de Angiogenina se realizó mediante PCR cuantitativa. Para normalizar se utilizó como gen de referencia GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa), por lo que a partir de cada muestra se midieron los niveles de ARNm de Angiogenina y GAPDH.

En un primer lugar se realizó la retrotranscripción (RT) de los ARN mensajeros totales presentes en la muestra. A partir de 1µg de ARN extraído de cada muestra se procede a la RT de los ARNm utilizando la transcriptasa reversa Superscript II (SSII) (Invitrogen, Life Technologies), y oligod(T) como *primer*, siguiendo las instrucciones del fabricante. En breve, en un volumen final de RT de 20µL, de las condiciones de los reactivos fueron las siguientes: 1X Buffer Superscript II, dNTPs 10mM, DTT 10 mM, 1X Inhibidor de ARNasa recombinante (Sigma), 1µL de *primer* oligo dT (1001 µM) y 1µL de SSII.

Previo al agregado al mix de RT, el ARN fue calentado a 65°C durante 5 minutos.

Las condiciones de la reacción de la RT fueron las siguientes: 42°C 50min; 70°C 15min; (Veriti 96 well Thermal cycler, Applied Biosystems).

Luego a partir del ADN copia resultante se prosiguió con la PCR cuantitativa (qPCR) para amplificar la Angiogenina y GAPDH. Para ello, se agregó 2µl del ADN copia a un “master mix” conteniendo el fluoróforo SYBR-green (Applied Biosystems) y *forward* y *reverse primer*, ambos a una concentración final de 0,4 µM. La secuencia de los *primers* utilizados se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 3: Forward y reverse primers utilizados en la qPCR para la cuantificación del ARNm de Angiogenina

Oligonucleótido	Secuencia
Forward primer Angiogenina	5' CACACTTCCTGACCCAGCACTA
Reverse primer Angiogenina	5' TTCTCTGTGAGGGTTTCCATTC
Forward primer GAPDH	5' ACACTCACTCTTCTACCTTC
Reverse primer GAPDH	5' TTGCTGTAGCCAAATTCATT

El programa de ciclado utilizado para la PCR fue 95°C 10min; [95°C 15s; 60°C 1min] por 40 ciclos (Step- one plus 96well, Applied Biosystems).

Silenciamiento del gen de la Angiogenina mediante ARN interferencia

En torno a 200.000 células MCF-7 fueron plaqueadas en placas de 6 pocillos. Al día siguiente se procedió con la transfección del siRNA que tenía como blanco el ARNm de la Angiogenina (siANG) y un siRNA Ctrl, cuya secuencia no tiene ningún gen blanco humano (siCtrl). Ambos siRNAs y el reactivo de transfección utilizados fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology. Para llevar a cabo la transfección de los siRNAs, se preparó el medio de transfección en medio MEGM libre de suero, al cual se le agregó siRNA a una concentración final de 50nM y el reactivo de transfección, tal como se detalla en las instrucciones del fabricante. Pevio a la transfección se lavaron las células con PBS para eliminar restos de suero y luego las células fueron incubadas con el mix de transfección durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, se quito el medio de transfección, se lavaron las células nuevamente y se agregó medio fresco. A las 24 horas post-transfección, se repitió sobre estas células el protocolo de transfección, tal como se realizó anteriormente. A las 48hrs y 72hrs las células fueron levantadas y sujetas a PCR cuantitativa.

Transfección de oligonucleótidos sintéticos

Aproximadamente 4×10^4 o 9×10^3 células MCF-7 fueron plaqueadas en placas de 24 o 96 pocillos. Pevio a la transfección, los ARNs sintéticos fueron pre-incubados en medio MEGM con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) durante 15 minutos, a una concentración final de 100, 400 o 1000 nM. Luego las células fueron incubadas durante 30 minutos con estos complejos lipofectamina – ARN. Una vez transcurrido el tiempo de transfección se retiró el medio de transfección, se lavaron las células tres veces con PBS 1X (Gibco) y se agregó medio nuevo.

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados fueron adquiridos de Integrated DNA Technologies (USA) y sus secuencias se detallan a continuación.

tRNA^{Glu}_{CUC} 5' halves: UCCUGGUGGUCUAGUGGUUAGGAUUCGGCG

tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves (WT): GCAUUGGUGGUUCAGUGGUAGAAUUCUCGC

tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves (9GG/AA): GCAUUGGUAAUUCAGUGGUAGAAUUCUCGC

tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves (25U/C): GCAUUGGUGGUUCAGUGGUAGAAUCCUCGC

tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves (SCR): GUAUAGGUGUGUCGGUAGUAGUAUCCUCGC

tDNA^{Gly}_{GCC} 5' halves: GCAUUGGUGGUUCAGUGGUAGAAUUCUCGC

16mer: 5' CCCTTTTGCTAAATCC 3'

Para los oligonucleótidos nombrados como 9GG/AA, 25U/C y SCR, las bases que se encuentran subrayadas especifican aquellas bases que difieren con respecto a la secuencia de la mitad 5' tRNA^{Gly} WT.

Se adquirieron también versiones biotiniladas de estos oligonucleótidos con el grupo biotina en el extremo 5'.

Microscopía Confocal

Las células MCF-7 (1x10⁴) fueron plaqueadas directamente sobre portaobjetos con pocillos individuales. 24h más tarde, las células fueron transfectadas con 100nM de versiones biotiniladas de ARNs sintéticos (WT, 9GG/AA, 25U/C y SCR) usando lipofectamina 2000, tal como fue descrito anteriormente. Una vez transcurrido el tiempo post-transfección deseado, se lavaron las células y la detección de los oligonucleótidos biotinilados se realizó mediante fluorescencia *in situ* utilizando streptavidina APC tal como se describe a continuación. En breve, las células fueron fijadas con para-formaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente y permeabilizadas utilizando PBS–Tween-20 al 0,3% durante 3 minutos. Luego, las células fueron incubadas con solución de bloqueo (5% BSA en PBS) durante una hora a 37°C y más tarde, se lavaron las células con PBS 1X. En seguida, las células fueron incubadas con solución de bloqueo conteniendo DAPI (Santa Cruz) y streptavidina-APC (1:500) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron lavados exhaustivos con PBS y por último se colocó el cubreobjetos usando Prolong Gold Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific). Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio confocal Zeiss (AxioObserver Z1, LSM 800) utilizando el objetivo 63X de inmersión en aceite. Los parámetros de adquisición fueron los mismos para todas las muestras: aquellas transfectadas con los cuatro ARNs biotinilados y sin transfectar (control negativo). Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el programa Fiji-ImageJ.

También se realizó microscopía confocal de fluorescencia sobre células MCF-7, las cuales fueron sujetas a incubación con EV cargados con oligonucleótidos biotinilados durante ensayos de captación de EVs (ver más abajo). En estas, una vez finalizada la incubación, se lavaron las células con PBS 1X y se procedió con el protocolo de fluorescencia *in situ* tal como se describe más arriba.

Ensayos de captación de vesículas

Las vesículas extracelulares, tanto derivadas de células MCF-7 transfectadas con oligonucleótidos biotinilados, como de células control, fueron purificadas como se describió en la sección “Purificación de vesículas extracelulares”. Luego las mismas fueron utilizadas para incubar células receptoras en una proporción 8:1 (célula donante: célula receptora). Luego de 4 hrs las células receptoras fueron analizadas mediante microscopía confocal de fluorescencia y SL-RT-qPCR.

Detección de gránulos de estrés mediante hibridación *in situ* fluorescente

Para la inducción de formación de gránulos de estrés (SG), las células MCF-7 fueron incubadas con Arsenito de sodio (Sigma Aldrich) a 0,5 y 0,8 mM o con DMEM libre de glucosa y libre de suero fetal bovino durante 1 hora. La detección de los SG se realizó mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sonda oligo-dT de 18 nucleótidos tal como fue anteriormente descrito por nuestro laboratorio (Garcia-Silva et al 2010), salvo por unas pequeñas modificaciones las cuales se detallan a continuación. Las células MCF-7 fueron plaqueadas en portaobjetos y 24 hrs más tardes las mismas fueron transfectadas con 100nM de mitades de ARNs sintéticos biotinilados, como fue anteriormente descrito y sometidas o no a estrés celular con arsenito de sodio 100 μ M (Sigma-Aldrich) durante 1 hr. Después de tres lavados con PBS, las células fueron fijadas con para-formaldehido 4% por 15 minutos a temperatura ambiente y permeabilizadas con PBS-Tween-20 al 0,3% durante 3 minutos. Luego, las células fueron lavadas dos veces con *buffer* de pre-hibridación 2X SSC (Thermo Fisher Scientific) y formamida al 10%. La hibridación fue realizada durante 16hrs a 37°C en cámara húmeda Thermobrite (Abott Molecular) en presencia de 1ng/ml de oligonucleótido-dT conjugado a Cy5. Luego de la hibridación las células fueron sometidas a los siguientes lavados: un *primer* lavado con 2X SSC y 50% formamida, un segundo lavado con 2X SSC y por último dos lavados con 1X SSC. Las células fueron luego incubadas con DAPI 300 μ M diluido 1:500 en PBS-BSA 5%. Se realizaron lavados con PBS y por último se colocó el cubreobjetos usando Prolong Gold Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific). Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio confocal Zeiss (AxioObserver Z1, LSM 800) utilizando el objetivo 63X de inmersión en aceite.

Para la detección simultanea de ARNs biotinilados y gránulos de poly(A) se acopló el protocolo de fluorescencia *in situ* y FISH anteriormente descritos. En breve, células MCF-7 (1×10^4) fueron plaqueadas directamente sobre portaobjetos con pocillos individuales. 24hrs más tarde, las células fueron transfectadas con 100nM de versiones biotiniladas de tRNA^{Gly} sintéticas usando lipofectamina 2000. Una vez transcurrido el periodo de transfección las células fueron lavadas, fijadas con para-formaldehido 4% durante 15 minutos y se continuó con el protocolo de FISH descrito más arriba. Luego de los lavados post hibridación, se continuó con el protocolo de fluorescencia *in situ* bloqueando las células utilizando solución de bloqueo (5% BSA en PBS) durante una hora a 37°C. Se lavaron las células con PBS 1X y luego

éstas fueron incubadas con streptavidina-FITC diluida 1:500 en solución de bloqueo conteniendo DAPI (Santa Cruz) 300 μ M diluido 1:500 durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron lavados exhaustivos con PBS y por último se colocó el cubreobjetos usando Prolong Gold Antifade Reagent. Nuevamente las imágenes fueron adquiridas con el microscopio Confocal Zeiss (AxioObserver Z1, LSM 800) utilizando el objetivo 63X de inmersión en aceite.

RESULTADOS

La estructura de mitades de tRNAs juega un rol importante en su estabilidad

A modo de poder responder si la secreción de ARNs pequeños se trataba de un proceso selectivo o no selectivo, teníamos la necesidad de poner a punto un sistema que nos lo permitiera. En primer lugar necesitábamos de una molécula, un ARN pequeño, que cumpliera dos condiciones: i) un ARN estable dentro de la célula lo cual no es menor ya que el ARN desnudo y sin modificaciones que eviten su degradación, es fácilmente degradable dentro de la célula y ii) un ARN que sea secretado por las células.

Mediante estudios *in silico* de la secuencia de mitades 5' de tRNA^{Gly} y mitades 5' de tRNA^{Glu} se predijo que las mismas eran capaces de formar homo y heterdímeros respectivamente. A su vez se demostró que efectivamente mitades sintéticas 5' de tRNA^{Gly} eran capaces de formar dímeros y esto se correlacionaba con su estabilidad *in vitro* (Tosar y Gámbaro, 2018). Esto posicionaba a las de mitades 5' de tRNA^{Gly} como candidatas favoritas para nuestros estudios de secreción y transferencia. Sin embargo, a efectos de nuestro objetivo necesitábamos determinar si las mitades sintéticas 5' de tRNA^{Gly} eran también estables a nivel intracelular en donde las mismas estarían expuestas a un mayor repertorio de nucleasas, por lo que suponía un entorno más desafiante. Por lo tanto, lo siguiente fue estudiar la estabilidad intracelular de estos fragmentos. Es decir, ¿lograríamos observar la misma correlación entre la capacidad de las mitades de tRNA^{Gly} de dimerizar y su estabilidad *in cellulo*?

Para responder esto iniciamos poniendo a punto la transfección de células MCF-7 con las mitades 5' de tRNA^{Glu} y tRNA^{Gly}. Para ello, utilizamos tres concentraciones diferentes de oligonucleótidos sintéticos (40nM, 100nM y 400nM) y medimos los niveles intracelulares de estos fragmentos mediante *SL-RT-qPCR* nueve horas post transfección. Como control se utilizaron células incubadas únicamente con lipofectamina (no RNA) e incubadas únicamente con el ARN (no L2K). Se incluyó este último control para descartar la posibilidad de que el aumento observado en los niveles intracelulares se deba al ARN que pudiera quedar adsorbido en la superficie celular una vez transcurrida la transfección, incluso después de sucesivos lavados con PBS. Los resultados de la *SL-RT-qPCR* mostraron que los niveles intracelulares de mitades 5' tRNA^{Glu} y tRNA^{Gly} aumentaron únicamente al transfectar con las mitades 5' tRNA^{Glu} y tRNA^{Gly} respectivamente, y este aumento ocurrió de forma concentración ARN dependiente. Esto se muestra en la Figura 11. Los valores allí graficados corresponden a la variación en el ciclo de cuantificación, delta Cq (ΔCq). Como Cq se define el ciclo en el cual la intensidad de fluorescencia (proveniente del Syber Green que se une al ADN doble hebra que se va amplificando durante cada ciclo de PCR), supera cierto umbral, y es el parámetro que se compara entre muestras distintas para establecer concentraciones relativas. Por lo tanto, que por ejemplo mir-21-5p, tenga un valor menor de Cq que miR16, significa que miR-21-5p amplifica antes y por consiguiente es más abundante. El ΔCq fue definido en esta figura y a lo largo de esta tesis, como el Cq de miR-21-5p menos el Cq de mitades 5' tRNA. Entonces, como se muestra en la Figura 11, en células sin transfectar, es decir, tratadas únicamente con lipofectamina (no RNA), el ΔCq (Cq miR-21-5p – Cq mitades 5' tRNA) es un valor negativo. Esto

es así, ya que como se vio a través del secuenciado profundo de la línea celular MCF-7 (Tosar et al., 2015), a nivel intracelular miR-21-5p es más abundante que las mitades 5' tRNA^{Glu} y tRNA^{Gly} por lo que el Cq de miR-21-5p es menor. Por consiguiente, esta diferencia es negativa. En células que fueron únicamente incubadas con el ARN (no L2K), el valor en el ΔCq es muy similar al obtenido en células tratadas únicamente con lipofectamina. Esto nos permitió decir que el ARN no puede ingresar *per se* a la célula y que si queda remanente de ARN absorbido, por ejemplo en la superficie de las células post incubación con el mismo e incluso después de los lavados, por lo menos a este nivel no lo estamos detectando. En cambio, al transfectar con mitades sintéticas de 5' tRNA^{Glu} y tRNA^{Gly} los valores intracelulares de estas aumentan. El aumento es tal, que se logra hasta revertir esta relación de abundancia entre miR-21-5p y las mitades de tRNA por lo que el delta Cq se torna positivo.

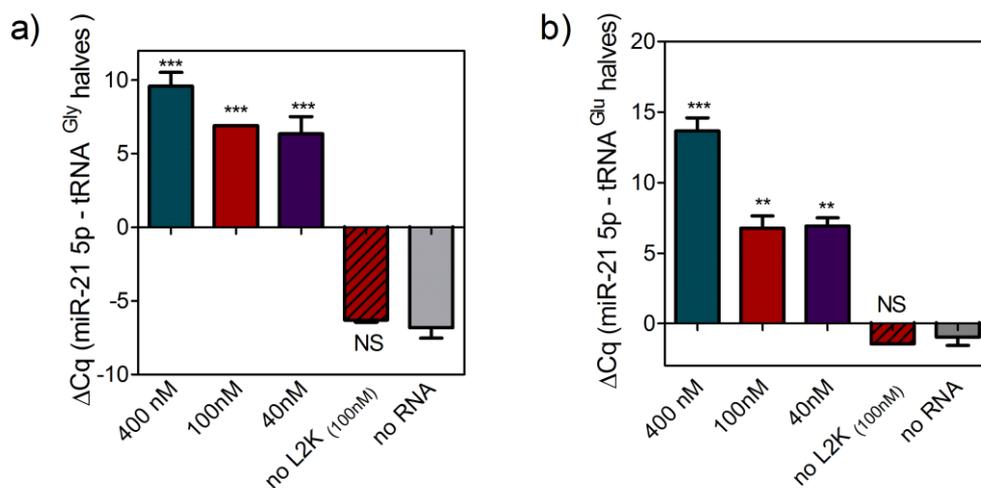


Figura 11: Niveles de mitades 5' de tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} al transfectar con concentraciones crecientes de mitades sintéticas tRNA^{Gly} (a) y tRNA^{Glu} (b). Se utilizó como test estadístico One – way ANOVA con post test Dunett con la condición no RNA como columna control.

En definitiva, estas experiencias demostraron que las mitades de tRNA no son capaces de ingresar espontáneamente a la célula y por tanto requiere de la presencia de un agente de transfección. Y que al transfectar células con concentraciones crecientes de mitades sintéticas de tRNA se observa un aumento de estas moléculas a nivel intracelular.

Dado los resultados anteriores, se decidió trabajar con una concentración de ARN sintético de 100 nM.

A modo de poder estudiar su estabilidad dentro de la célula se prosiguió a trabajar con ARN sintéticos marcados con biotina de mitades 5' tRNA^{Gly}. Esto fue así ya que al estar marcados con biotina podíamos estudiar de forma específica los ARN sintéticos que nosotros introdujéramos en la célula (mediante microscopía confocal de fluorescencia, por ejemplo) e independizarnos de esta forma de la contribución de las mitades 5' de tRNAs endógenas. Para llevar a cabo este estudio, utilizamos la secuencia de tRNA^{Gly} versión: wild-type (WT), la mutante capaz de dimerizar (9GG/AA), la mutante incapaz de dimerizar (25U/C) y una secuencia irrelevante (SCR, del inglés *scrambled*). Esta última versión consistía en la secuencia de tRNA^{Gly} desordenada pero de forma tal de evitar la formación de cualquier estructura

secundaria. Transfectamos células MCF-7 con mitades sintéticas de tRNA a una concentración de 100nM durante 30 minutos. Una vez ocurrida la transfección, se lavaron las células tres veces con PBS y se agregó medio fresco. A partir de aquí se definieron dos tiempos de análisis. El primero al cual se denominó t=0h, ya que el análisis de las células se efectuó inmediatamente luego de agregar el medio fresco y un segundo tiempo, denotado t=6h, en donde el análisis se realizó seis horas post-transfección. Entonces, a t=0h y t=6h, se realizó extracción de ARN, para cuantificar los niveles de las mitades transfectadas mediante *SL- RT qPCR*, o microscopía Confocal de fluorescencia mediante la cual las mitades de tRNA 5' biotiniladas fueron detectadas utilizando streptavidina conjugada al fluorocromo APC.

En la figura 12 se muestran imágenes representativas del resultado de la microscopía Confocal de fluorescencia. En azul se evidencia los núcleos marcados con DAPI y en rojo los ARNs sintéticos biotinilados que fueron detectados utilizando streptavidina – APC. Como control negativo se utilizaron células únicamente tratadas con lipofectamina (no RNA). En el panel de la izquierda, se muestra el resultado de la transfección con los ARNs biotinilados a t=0h en donde se puede observar que los cuatro ARN sintéticos pueden ser transfectados e ingresan a la célula de forma similar. En cambio, a tiempos mayores, como se muestra en el panel de la derecha, si bien se observa marcación roja para las células que fueron transfectadas con el WT y 9GG/AA, no sucede lo mismo para aquellas células transfectadas con el 25U/C ni SCR.

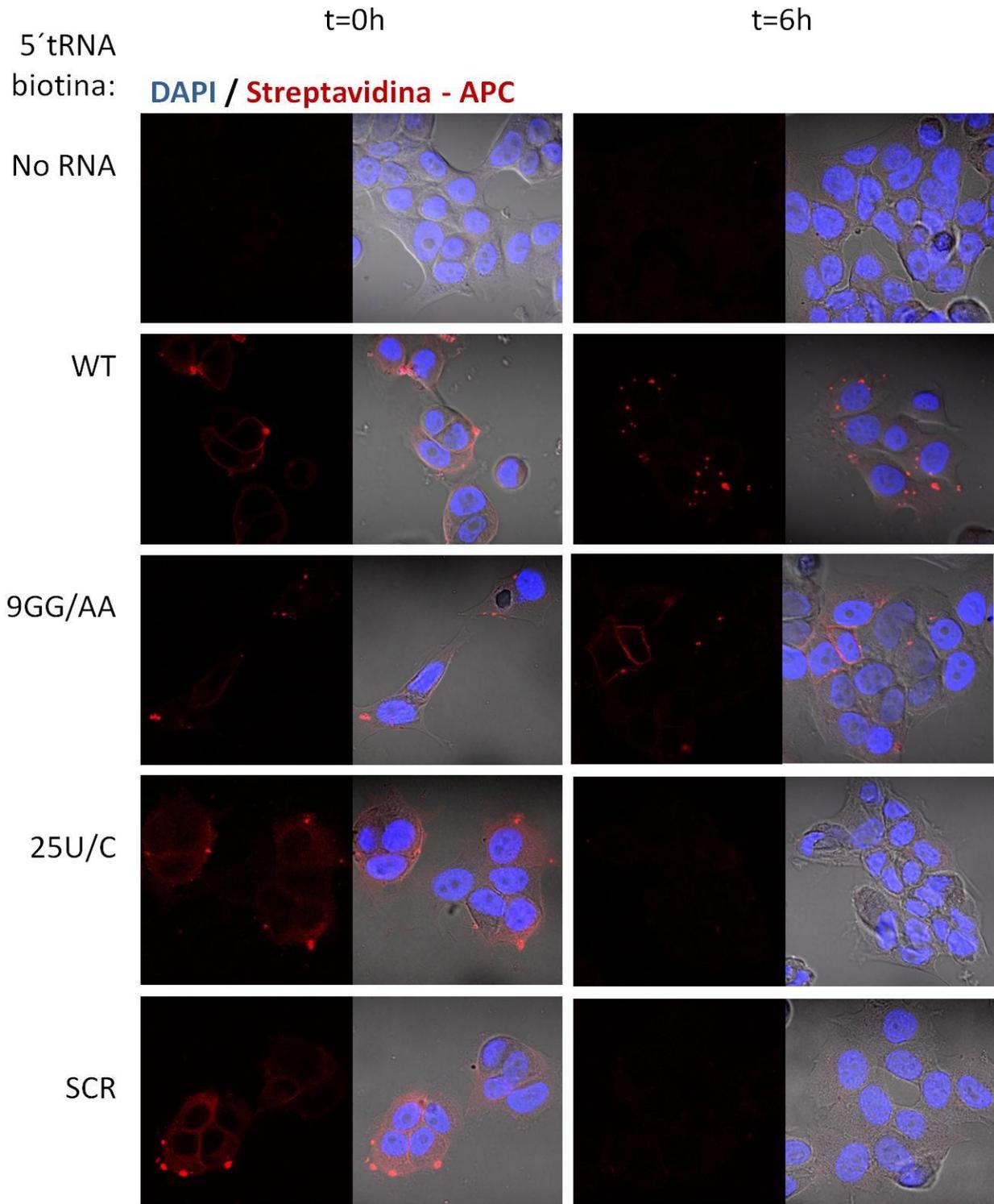


Figura 12: Fluorescencia *in situ* de células MCF-7 transfectadas con mitades biotiniladas de tRNA Gly con secuencia wild-type (Wt), secuencia mutada 25U/C y 9GG/AA y secuencia irrelevante (SCR) para tiempos post – transfección t=0h y t=6h. Como control negativo se utilizaron células sin transfectar. En azul se observan los núcleos marcados con DAPI y en rojo las mitades de ARN biotiniladas que fueron detectadas utilizando streptavidina – APC

Más aún, el recuento de la intensidad de fluorescencia normalizada por área a t=0h es similar para los cuatro oligonucleótidos. A tiempos mayores, la intensidad de fluorescencia no decrece para la versión WT y 9GG/AA, pero para el 25U/C y SCR la intensidad de fluorescencia disminuye drásticamente, incluso a nivel del control negativo sin transfectar (no RNA). Mismos resultados se evidencian al estudiar la relación de la intensidad de fluorescencia a t=0h y t=6h. Para el caso del Wt y 9GG/AA la relación es muy similar a uno, lo cual significa que la intensidad de fluorescencia medida a los dos tiempo no varía, en cambio para el 25U/C y SCR esta relación es significativamente mayor a uno ($p < 0,0001$), lo cual demuestra que a t=6h, la intensidad de la fluorescencia disminuyo.

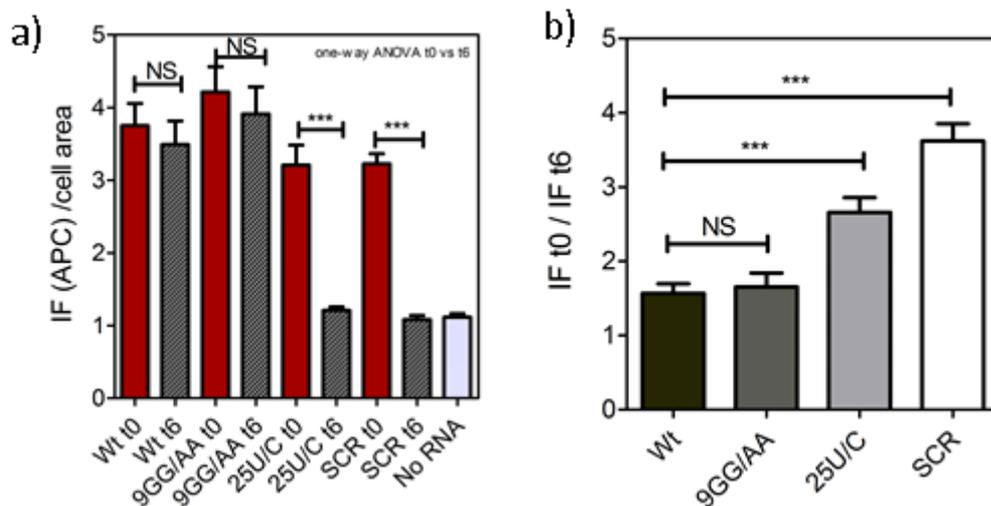


Figura 13: La transfección de mitades de tRNA^{Gly} WT y 9GG/AA es más estable a lo largo del tiempo que la transfección con las mitades 25U/C y SCR. a) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia (APC) de las mitades de tRNA^{Gly} biotiniladas a t=0h y t=6h. Como test estadístico se utilizó one-way ANOVA comparando para cada oligo los valor a t=0h y t=6h. b) Relación de la intensidad de fluorescencia a t=0h y t=6h para los cuatro oligo transfectados. El test estadístico utilizado fue one-way ANOVA con con Turkey post-hoc test. En ambos graficas se representa en resultado de la cuantificación de fluorescencia de dos ensayos independientes con n=3 cada uno.

Esto mismo fue observado al medir los niveles intracelulares a t=0h y t=6h post-transfección mediante *SL-RT-qPCR* (figura 14a). A t=6h los niveles intracelulares del WT no varían con respecto a los niveles iniciales (t=0h). En cambio para el SCR a t=6h los niveles disminuyen de forma significativa ($p < 0,0001$) con respecto a sus niveles iniciales. Para evaluar si esta disminución de la fluorescencia ocurría debido a un fenómeno de degradación o secreción, medimos por *SL-RT qPCR* los niveles extracelulares de WT y SCR. Como se observa en la figura 14b, los niveles extracelulares de SCR resultaron mucho menores que los niveles del WT. Con la línea punteada en la figura se enfatiza el valor del control negativo de *SL-RT-qPCR*, el cual no se agrega ARN de partida (NTC). Debido a la técnica de *SL-RT-qPCR* no es de extrañarse que los NTC amplifiquen con valores de Cq entre 34 y 35, como es este caso. Esto es así ya que el reducido tamaño de los ARNs pequeños no permite una optimización de los juegos de *primers*, por lo que es sabido que los controles NTC amplifiquen con valores de Cq altos, pero detectables. Por esa razón únicamente consideramos confiables aquellas medidas con valores de Cq al menos dos ciclos menores que el control negativo. Como se puede observar, el SCR

amplifica en ambas situaciones en valores muy cercanos al NTC. Más aún, hay apenas una diferencia de dos ciclos y medio de PCR entre el NTC y los niveles de SCR extracelular, por lo que se puede decir con seguridad, que el SCR es prácticamente indetectable a nivel extracelular. A través de esto pudimos concluir que efectivamente la disminución observada a t=6h se debía a un fenómeno de degradación y no secreción. Más interesante aún, los niveles extracelulares de 5' tRNA^{Gly} WT a t=6h no varían con respecto a los niveles de t=0h. Esto significó que a lo largo del tiempo la secuencia tRNA^{Gly} WT era estable dentro y fuera de la célula, corroborando lo descrito en la sección “antecedentes”.

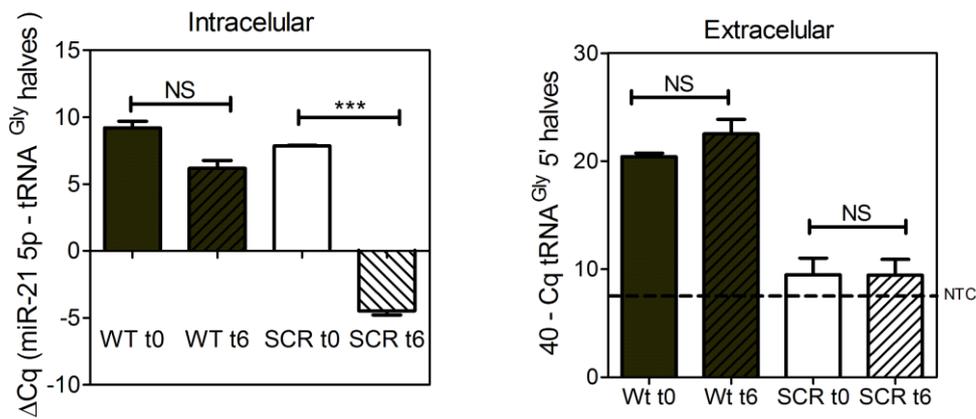


Figura 14: La secuencia tRNA^{Gly} WT es estable dentro y fuera de la célula a lo largo del tiempo, en cambio la secuencia tRNA^{Gly} SCR es degradada. En a) se muestran los niveles intracelulares y en b) extracelulares a t=0h y t=6h al transfectar con mitades 5' tRNA^{Gly} WT y SCR.

Estos resultados mostraron que si bien la eficiencia de transfección, es decir, la entrada de los cuatro oligonucleótidos a la célula es similar, a lo largo del tiempo, las mitades 25U/C y SCR parecerían ser degradadas por la célula. En cambio, la transfección con las mitades 5' WT y 9GG/AA resultaron mucho más estables que la transfección con la secuencia mutada 25U/C y SCR. Por consiguiente, logramos demostrar que también a nivel intracelular la capacidad de dimerización se correlaciona con la estabilidad de las mitades 5' de tRNA^{Gly}.

Estas experiencias revelaron que las mitades 5' de tRNA^{Gly} constituían moléculas muy estables dentro de la célula y que eran secretadas al medio extracelular donde también permanecían estables a lo largo del tiempo. Estas características nos permitieron elegir a las mitades 5' de tRNA^{Gly} como moléculas candidatas perfectas para nuestros estudios de secreción y transferencia entre células.

Las mitades 5' de tRNAs se acumulan en el citoplasma

Como se muestra en la figura 13, los niveles de la intensidad del tRNA^{Gly} versión WT no disminuyen en el tiempo. Pero más aún, se observó que las mitades 5' WT se acumulan en forma de gránulos en el citoplasma (Figura 12). Ante esto, nos propusimos hacer un recuento

de la cantidad de gránulos o *foci* por célula observados al transfectar con los oligonucleótidos sintéticos tRNA^{Gly} WT, 25U/C y SCR a t=0h y t=6h post transfección. A t=0h observamos que la mayoría de los gránulos contados se encuentran a nivel de membrana. Esto está representado en el gráfico de la Figura 15, en donde se puede observar que a t=0h, hay una mayor la cantidad de gránulos por célula a nivel de membrana, representados en la columna denotada como “M”. Además, se puede observar también, que la proporción de gránulos a nivel de membrana es para los tres oligonucleótidos por igual. Pensamos que los mismos corresponderían, probablemente, a sitios de entrada de los complejos ARN –lipofectamina a la célula. En cambio, a t=6h, hay una mayor cantidad de gránulos citoplasmáticos, representados ahora en la columna denotada como “C”, los cuales corresponden en su totalidad, a las mitades de tRNA^{Gly}WT. Esto apoya la idea de que la transfección con el tRNA^{Gly}WT resulta en una transfección mucho más estable que para las secuencias control y que estas mitades se acumulan a lo largo del tiempo en forma de gránulos en el interior celular.

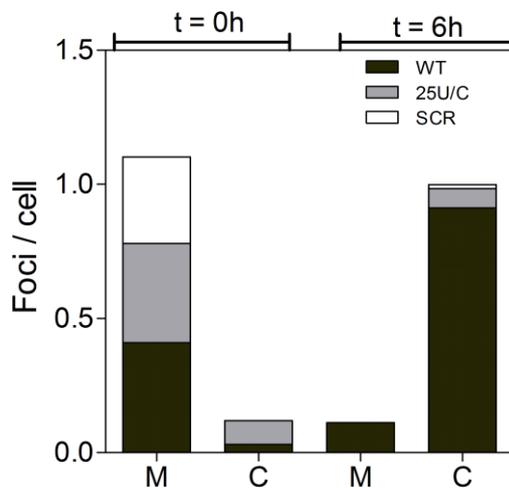


Figura 15: Con el transcurso del tiempo las mitades 5' de tRNA^{Gly} WT se acumulan en gránulos en el citoplasma. Recuento de la cantidad de *foci per cell* (gránulos por célula) en células transfectadas con mitades 5' de tRNA^{Gly} WT (gris oscuro), 25U/C (gris claro) y SCR (blanco) a t=0hrs y t=6hrs post transfección. Como columna M se representa la cantidad de gránulos contados a nivel de membrana y como C, la cantidad de gránulos citoplasmáticos.

La transfección con mitades de tRNAs no induce la formación de gránulos de estrés

Interesados en la formación de estos *foci* citoplasmáticos de tRNA^{Gly} notamos que la literatura sugería que los mismos podrían corresponder a gránulos de estrés (SG, del inglés “*stress granules*”)(Emara et al., 2010; Lyons et al., 2016). Uno de los primeros trabajos centrados en mitades de tRNAs a nivel intracelular proponen que la transfección con fragmentos de tRNA en particular con mitades derivadas de Alanina y Cisteína (mitades 5' de tRNA^{Ala} y tRNA^{Cys} respectivamente) inducen la formación de SG (Emara et al., 2010). Con esto en mente, nos adentramos a estudiar si sucedía lo mismo con nuestras mitades de tRNA^{Gly}

De forma breve los gránulos de estrés, son densos agregados citoplasmáticos compuestos de ARNm y proteínas de unión al ARN inducidos cuando la célula se encuentra bajo situaciones de estrés como calor, hipoxia, infección viral, radiación UV o condiciones oxidativas. De hecho, la formación de SG en respuesta al estrés oxidativo como el arsenito de sodio o estrés nutricional está ampliamente reportada (Kedersha and Anderson, 2007; Lian and Gallouzi, 2009). En una primera instancia pusimos a punto el protocolo para la detección de SG frente al estrés oxidativo para luego poder ir a observar la presencia o no de estos gránulos frente a la transfección con nuestras mitades 5' de tRNA^{Gly}. Para ello nos basamos en un protocolo ya utilizado por miembros anteriores del laboratorio (Garcia-Silva et al., 2010) el cual consiste en ensayos de hibridación *in situ* utilizando una sonda poly(T) marcada con un fluoróforo. El uso de sondas poly(T) como marcadores de SG es ampliamente utilizada (Garcia-Silva et al., 2010; Kedersha and Anderson, 2007; Pastro et al., 2017). Por consiguiente, células MCF-7 fueron sometidas a estrés oxidativo mediante el tratamiento con arsenito de sodio o estrés nutricional al ser incubadas con DMEM en ausencia de glucosa y suero fetal bovino (SBF) y luego fueron sujetas a hibridación *in situ* con la sonda poly(T) para la detección de los gránulos de estrés (para más detalles ver materiales y métodos).

En la Figura 16 se muestra el resultado de los ensayos de hibridación *in situ* utilizando una sonda poly(T) al tratar células con arsenito de sodio 0.8mM y al tratar células con DMEM sin glucosa y sin SBF durante 1h. Como control se utilizaron células MCF-7 sin tratar (no treated). En azul se marcan los núcleos con DAPI y en rojo la sonda poly(T) la cual se encuentra conjugada a Cy5. Frente a la inducción de estrés oxidativo o nutricional se nota la señal roja la cual se encontraba distribuida de forma uniforme a lo largo del citoplasma, se condensa en forma de gránulos citoplasmáticos (flechas naranjas), un fenotipo característicos de células bajo inducción de estrés (Emara et al., 2010; Kedersha and Anderson, 2007; Lian and Gallouzi, 2009).

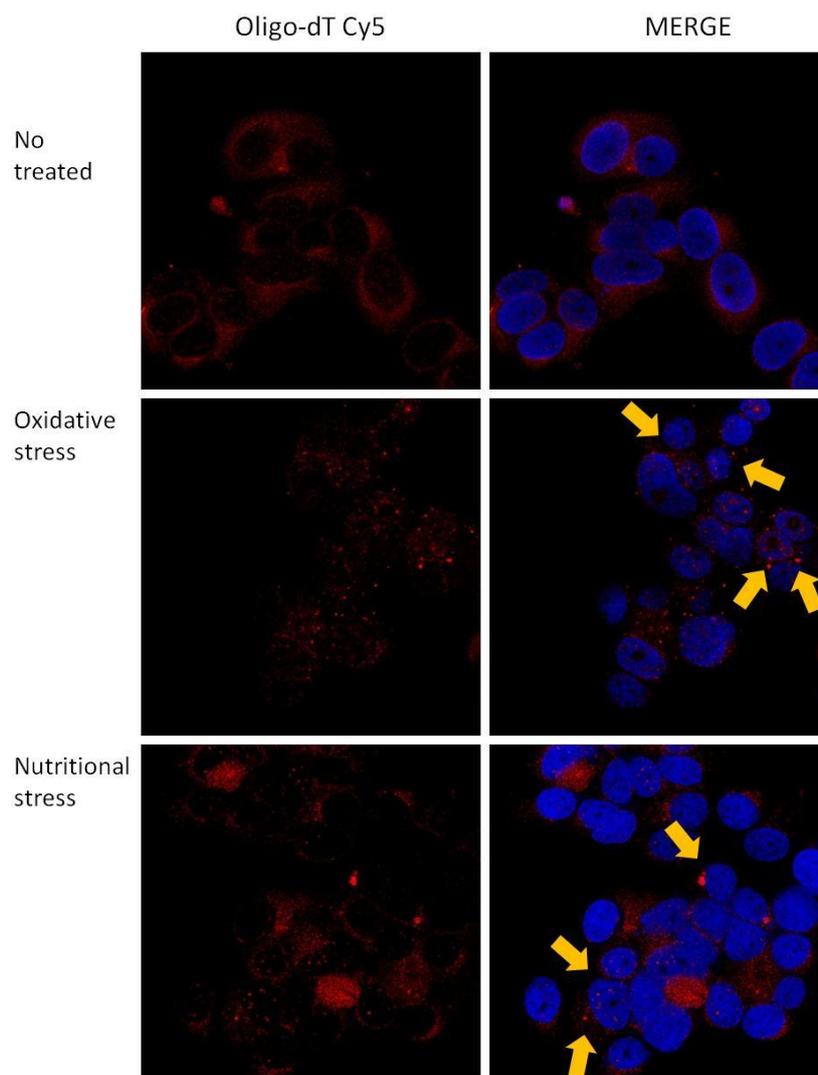


Figura 16: La formación de gránulos de estrés en células MCF-7 inducidos por estrés oxidativo y nutricional es detectada utilizando un oligo-dT conjugado a Cy5. En azul se marcan los núcleos marcados con DAPI.

Una vez establecido un protocolo que nos permitiera la detección de la formación de SG en células MCF-7, volvimos a transfectar las mismas con mitades 5' de tRNA^{Gly} biotiniladas y pasamos a evaluar la presencia de SG. Para ello una vez llevada la transfección con mitades 5' de tRNA^{Gly} biotiniladas a 100nM, tal como se venía realizando hasta el momento, se procedió a realizar los ensayos de hibridación *in situ* y luego de fluorescencia *in situ* para la detección de los SG y ARNs biotinilados respectivamente (para más detalles ir a la sección de Materiales y Métodos). A lo contrario encontrado en la bibliografía (Emara et al 2010), con nuestro modelos celular utilizado, se observó que la transfección con nuestras mitades 5' de tRNA^{Gly} no induce la formación de SG. Notar que para este ensayo, las mitades 5' de tRNA^{Gly} biotiniladas se muestran en verde dado que la streptavidina aquí utilizada estaba marcada con el fluorocromo FITC. Y tal como en la parte anterior, los gránulos de polyA se muestran en rojo dado que la sonda polyT se encuentra marcada con Cy5. Como se muestra en la figura 17, al transfectar con mitades de tRNAs, no se observa un fenotipo similar al aquel observado al inducir estrés nutricional o estrés oxidativo en células. Es decir, es clara la ausencia de un alto número de gránulos citoplasmáticos de polyA tal como se vió en el ensayo anterior al inducir estrés. Sin

embargo, sí se observó que en su mayoría los gránulos de 5' de tRNA^{Gly} “colocalizan” con los gránulos de polyA. Con el término “colocalizar”, a los efectos de esta tesis, nos referimos a que la señal roja y verde, (gránulos de polyA y mitades de tRNA biotiniladas respectivamente) poseen las mismas coordenadas en [x, y, z] y por tanto se encuentran a una distancia igual o menor a la resolución del microscopio confocal utilizado (500nm para el Confocal Zeiss). Con esto no nos referimos a que haya efectivamente una interacción entre las mitades de tRNA y los gránulos de polyA.

Específicamente, del total de gránulos de mitades 5' de tRNA contados en un total de 116 células, el 63 % de los mismos colocalizan con gránulos de polyA. Estos están indicados en la figura debajo (Figura 17) a través de flechas blancas. En cambio con flechas naranjas y amarillas se señalan los gránulos de polyA y mitades de tRNA respectivamente. Si bien esto no iba en línea con lo reportado en la bibliografía (Emara et al., 2010; Lyons et al., 2016)), hay varias diferencias experimentales que podrían explicar los resultados encontrados. En primer lugar, las mitades de tRNA que fueron utilizados para estos ensayos fueron diferentes, las líneas celulares fueron diferentes, nosotros trabajamos con MCF-7 y ellos con U20S. Y además, la concentración de ARN utilizada para este ensayo fue muy diferente. Los autores en su trabajo utilizan una concentración de 750nM mientras que nosotros una de 100nM.

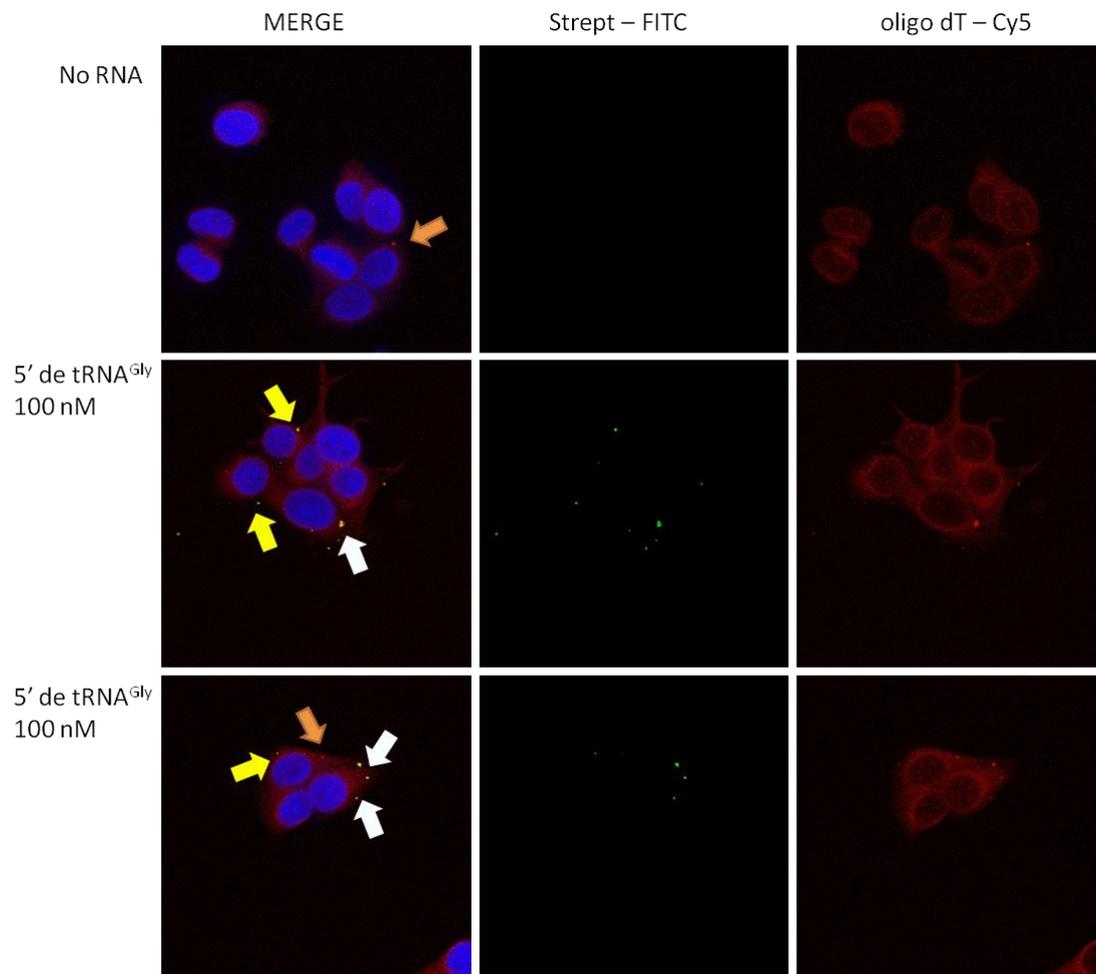


Figura 17: Gránulos de mitades 5' de tRNA^{Gly} coinciden con gránulos de polyA. En azul se marcan los núcleos con DAPI y en rojo y verde gránulos de polyA y de mitades 5' de tRNA respectivamente. Con las flechas se indican los

tres tipos de gránulos detectados: gránulos de polyA con flechas naranjas, gránulos de mitades de tRNA con flechas amarillas y con flechas blancas gránulos de mitades de tRNA y polyA.

En definitiva, mediante ensayos de fluorescencia *in situ* e hibridación *in situ* pudimos determinar que una vez dentro de la célula, las mitades sintéticas de tRNA^{Gly} son resistentes frente a la degradación y permanecen estables en el citoplasma de la célula en forma de gránulos citoplasmáticos en donde conjunto con ARNm y posiblemente otras especies de ARN y RBP para dar lugar a gránulos de ARN más complejos.

Las mitades 5' de tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} son secretadas al espacio extracelular mediante EVs

A partir de los resultados obtenidos de los ensayos de estabilidad intracelular encontramos que las mitades 5' de tRNA^{Gly} eran moléculas muy estables dentro de la célula. Además al transfectar células MCF-7 con estas mitades sintéticas no solo veíamos un aumento a nivel intracelular sino también a nivel extracelular y este aumento se mantenía lo largo del tiempo lo cual mostraba que estas especies eran capaces de permanecer estables también en el medio extracelular (Figura 14b y 18b).

Fue así que, identificamos una molécula la cual era estable a nivel intracelular, secretada por la célula y estable también a nivel extracelular. Más aún, como la misma se encontraba marcada con biotina, esto nos daba la oportunidad de poder seguirla y estudiarla. Esto convirtió a las mitades 5' de tRNA^{Gly} candidatas perfectas para nuestros estudios de secreción y transferencia de ARNs pequeños entre células.

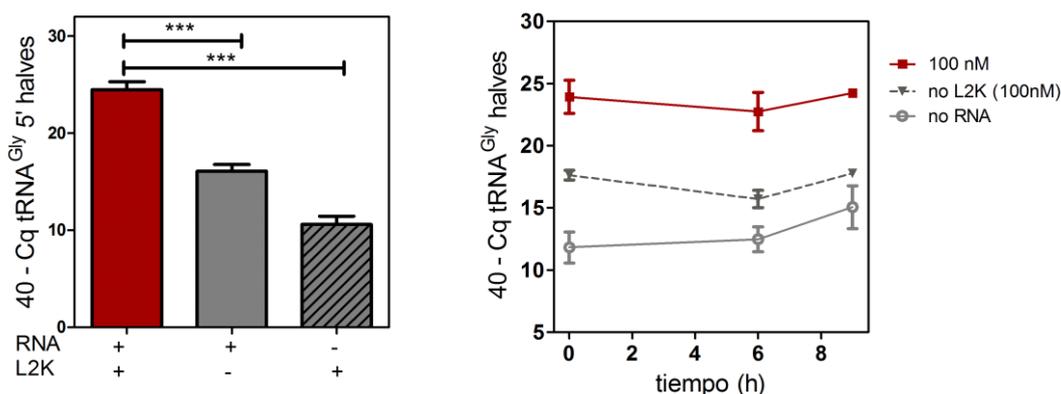


Figura 18: Niveles extracelulares de mitades 5' de tRNA^{Gly} al transfectar con 5' de tRNA^{Gly} 100nM, al incubar únicamente con el ARN, no L2K (gris claro) y al tratar únicamente con lipofectamina, no RNA (gris oscuro). Se utilizó como test estadístico. One – way ANOVA con Turkey post test.

Como se muestra en la figura 18, los niveles extracelulares de estas mitades fueron significativamente mayores en las células transfectadas con las mitades sintéticas que en las células tratadas con los oligos pero sin lipofectamina. Esto significa que el aumento observado se debe al ARN que entró (gracias al uso de la lipofectamina) y salió de la célula y no al ARN

remanente que podría haber quedado producto de la transfección. Sin embargo, como se puede ver en esta misma figura, los niveles extracelulares de mitades 5' de tRNA^{Gly} son superiores en células incubadas únicamente con el ARN (no L2K) en comparación con los niveles de células tratadas solo con lipofectamina (no RNA).

Interesados en poner a punto un sistema confiable que nos permitiera estudiar la secreción de tRNA^{Gly} marcados y dado el alto grado de sensibilidad de técnicas como la *SL-RT-qPCR*, nos propusimos incluir controles adicionales a modo de estar seguros que las mitades de tRNA^{Gly} detectadas fueran aquellas que realmente ingresaron a la célula y ahora estaban siendo secretadas por la misma. Para ello repetimos los ensayos de transfección. Retiramos el medio de transfección, realizamos tres lavados con PBS, agregamos medio fresco y luego tomamos una alícuota de este medio para medir las mitades de 5' de tRNA^{Gly} mediante *SL-RT-qPCR*. Trabajamos con células transfectadas con el tRNA^{Gly} Wt a 100nM e incluimos diversos controles: i) células tratadas con tRNA^{Gly} Wt sin lipofectamina– a modo de evaluar cuanto ARN queda remanente en la superficie de la células incluso después de lavar con PBS; ii) células tratadas con tRNA^{Gly} con lipofectamina e incubadas a 4°C post transfección – para evaluar la cantidad de complejo ARN - lipofectamina que podría haber quedado absorbida en la superficie de las células. Como las células fueron lavadas e incubadas con medio fresco a 4°C una vez transcurrida la transfección esperamos detectar el ARN que quedó adsorbido en la superficie y no aquel endógeno que es secretado por la célula; iii) control tRNA^{Gly} Wt con lipofectamina sin células- a modo de evaluar la cantidad de complejo que podría quedar adsorbido en el pocillo de plástico. Para realizar este control, se procedió a realizar la transfección y los lavados tal como se hizo para las otras muestras solo que en un pocillo sin células; iv) células tratadas únicamente con lipofectamina. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 19.

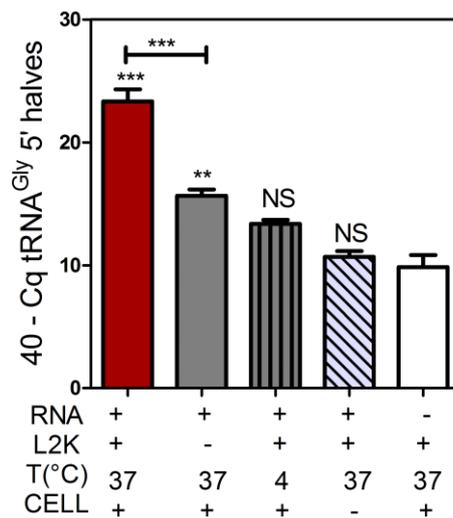


Figura 19: Los niveles extracelulares de mitades 5' de tRNA^{Gly} al transfectar con 5' de tRNA^{Gly} 100nM, incubar únicamente con el ARN, no L2K (gris oscuro), al transfectar con 5' de tRNA^{Gly} 100nM e incubar las células a 4°C (gris oscuro a rayas), al transfectar sobre el pocillo (gris claro a rayas) y al tratar únicamente con lipofectamina, no RNA (blanco). Se utilizó como test estadístico One – way ANOVA con Turkey post test.

A través de esta prueba se verificó que poco complejo ARN – lipofectamina queda adsorbido en la superficie del plástico o en la superficie celular. Los niveles extracelulares de estos dos controles son muy similares al control tratado únicamente con lipofectamina (no RNA), por lo que estos niveles corresponderían a los niveles endógenos. Sin embargo, los niveles extracelulares de mitades 5' de tRNA^{Gly} incubadas únicamente con las mismas fueron significativamente superiores a los niveles control no RNA. Esto implica que a pesar de los tres lavados con PBS existe un remanente de ARN que queda adsorbido en la superficie de las células y que es cuantificado al agregar medio fresco. Sin embargo, los niveles de este remanente son significativamente menores a los niveles de mitades de tRNA^{Gly} provenientes de células que fueron transfectadas ($p < 0.0001$). De hecho, entre ambas condiciones hay una diferencia de 9 ciclos de PCR lo cual se traduce en una diferencia de 512 veces más en la situación transfectada vs esta situación control. De esta forma verificamos que éramos capaces de detectar en el medio extracelular las mitades 5' de tRNA^{Gly} que pusimos dentro de las células y que fueron secretadas por las mismas. Lo anterior hizo que nos diéramos cuenta de la importancia de este de control último, y la necesidad de incluirlo en los próximos ensayos donde buscamos evaluar si existe transferencia de mitades 5' de tRNA^{Gly} entre células.

Debido a que la detección de ARNs pequeños mediante *SL-RT-qPCR* se realizó directamente a partir del medio condicionado de células MCF-7 con incubación a 95°C durante 5 minutos como único previo tratamiento, las mitades 5' de tRNA^{Gly} podrían estar siendo secretadas, o bien en la fracción vesicular (EV), o en la no vesicular (non-EV). Es decir, a 95°C tanto las membranas de las vesículas como los posibles complejos proteicos a los cuales podrían estar unidos estos fragmentos en la fracción no vesicular podrían ser degradados, lo cual permite la detección de los mismos. Por lo tanto, el primer paso fue determinar en qué fracción, EV o non-EV, estaban siendo secretadas las mitades sintéticas de tRNA^{Gly}.

Ya conociendo la estabilidad intracelular de las mitades de tRNA^{Gly} (Figuras 12, 13 y 14), proseguimos a transfectar células MCF-7 con tRNA^{Gly} versión Wt y 9GG/AA. El uso de los otros dos oligonucleótidos (25U/C y SCR) no tenía sentido dado su menor estabilidad y por ende su degradación. Además como control se incluyeron células tratadas únicamente con lipofectamina y células tratadas con el ARN pero sin lipofectamina. Para la purificación de la fracción EV y non-EV seguimos un protocolo de ultracentrifugación diferencial ampliamente utilizado en el laboratorio y en el cual colaboré en su puesta a punto durante el marco de mi tesis de grado (Tosar et al., 2015) pero con una pequeña modificación. En breve, el medio post- transfección fue centrifugado 300g para sedimentar posibles células y luego a 2000g para eliminar detritos celulares y cuerpos apoptóticos. El sobrenadante fue luego centrifugado a 100.000g durante dos horas y media a 4°C para sedimentar las vesículas. Al pellet lo llamaremos fracción vesicular (EV) y al sobrenadante, fracción no vesicular (non-EV). Por último el sobrenadante, es decir la fracción non-EV es concentrada mediante ultrafiltración. Es válido aclarar que en esta fracción vesicular estaríamos analizando de forma conjunta tanto exosomas como microvesículas lo cual, dado el gran solapamiento de estas dos poblaciones de vesículas y la gran dificultad en obtener dos fracciones absolutas, nos pareció lo más pertinente. Vale comentar también que las células a partir de las cuales se obtendrán estas vesículas se las llamará células donadoras.

Mediante *SL-RT-qPCR* procedimos a cuantificar los niveles de las mitades 5' tRNA^{Gly} versión WT y 9GG/AA en ambas fracciones provenientes de células transfectadas con estas mitades y de células control (no RNA y no L2K). En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos. A modo ilustrativo encima de cada gráfico se detalla de forma breve el oligo que fue transfectado y en qué fracción (intracelular, vesicular o no vesicular) es donde se está llevando a cabo el análisis. Por ejemplo, en la figura 20a se muestra que una célula donadora es transfectada con mitades 5' tRNA^{Gly} WT, tratada únicamente con ARN (no L2K) y tratada únicamente con L2K (no RNA) y que la observación, en este caso, la medición de los niveles de mitades 5' tRNA^{Gly} se llevará a cabo en la fracción EV y non-EV tal como está indicado con la flecha roja y el ojo. Este tipo de diagrama se utilizará en lo que resta de la tesis para lograr una mayor comprensión de los resultados.

En las células transfectadas con mitades 5' tRNA^{Gly} WT (figura 20a) y 9GG/AA (figura 20b), los niveles de estas mitades son significativamente mayores en la fracción EV que en la fracción non-EV. Por otro lado, estos niveles de las mitades 5' tRNA^{Gly} WT y 9GG/AA presentes en la fracción EV de células transfectadas son significativamente mayores que los niveles de la fracción EV de células que fueron incubadas únicamente con L2K o ARN. Más aún, los niveles de las mitades 5' tRNA^{Gly} WT y 9GG/AA son similares entre las mismas fracciones (EV y non-EV) derivadas de células incubadas con ARN y de células tratadas únicamente con L2K. Este último control es muy importante en este punto, ya que como se vio en la figura 19, al transfectar nos queda un remanente de ARN que no ingresa a las células y el cual no lo podemos eliminar con los lavados. Sin embargo, este remanente no pareciera estar afectando de forma significativa.

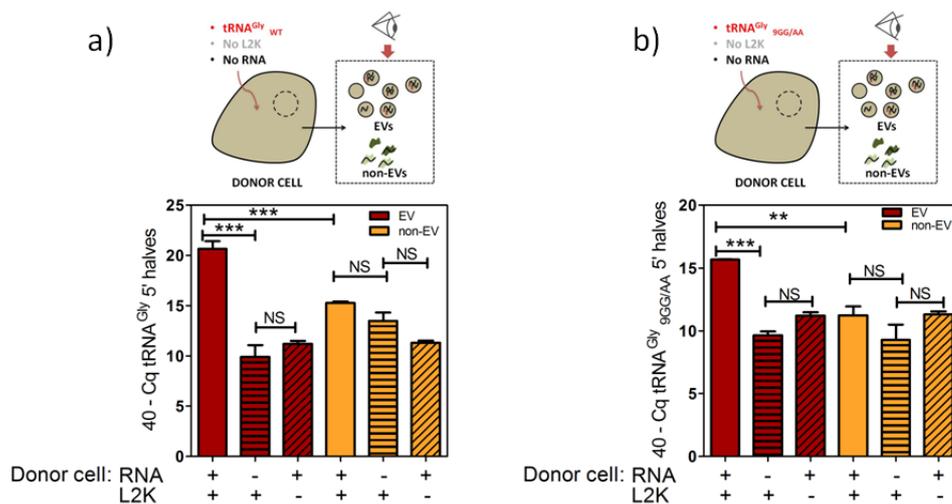


Figura 20: Las mitades sintéticas 5' de tRNA^{Gly} son secretadas por células MCF-7 mediante EVs. En a) se muestran los niveles de mitades de tRNA^{Gly} Wt en la fracción EV (en rojo) y non-EV (en naranja) al transfectar con mitades de tRNA^{Gly} Wt. Como control se utilizaron células incubadas únicamente con el ARN (no L2K) y únicamente con lipofectamina (no RNA). De forma análoga en b) se muestran los niveles de mitades de tRNA^{Gly} 9GG/AA en la fracción EV y non-EV al transfectar con estas mitades. Se incluyeron también los controles no L2K y no RNA. Como test estadístico se utilizó one – way ANOVA con Turkey como post test.

Notar que, si bien la secuencia de la mitades 5' tRNA^{Gly}9GG/AA no existe como tal en la célula, los *primers* diseñados para detectar el 9GG/AA mediante *SL-RT-qPCR* logran amplificar la secuencia de mitad de 5' tRNA^{Gly} Wt endógena, lo cual queda demostrado por los valores de Cq

para tRNA^{Gly}9GG/AA en las células control, es decir sin transfectar. Esto sin embargo era de esperarse. Como se explica en materiales y métodos, para realizar la *SL-RT-qPCR* de pequeños ARNs, en primer lugar se utiliza un *SL primer* el cual se hibrida a las 6 bases del extremo 3' del ARN pequeño de interés (en este caso mitad de tRNA) y luego el mismo se retrotranscribe. El ADN resultante es luego cuantificado mediante *real time PCR* para lo que se utilizan dos *primers*, un *reverse primer* el cual es el complementario a una región del *SL primer* y otro *forward primer* el cual se hibrida a una región del ARN pequeño de interés. Dado que la mitad 5' tRNA^{Gly} Wt y 9GG/AA difieren únicamente en los nucleótidos 9 y 10, (Figura 8), el *SL primer* utilizado para detectarlos es el mismo y los *forward primer* difieren en dos bases únicamente. Esto provoca que inevitablemente, con los *primers* diseñados para el 9GG/AA se amplifique la secuencia 5' tRNA^{Gly} endógena.

Estos mismos resultados se resumen en el siguiente gráfico. En la figura 21 se muestran los niveles de las mitades 5' tRNA^{Gly} Wt y 9GG/AA en la fracción EV y non-EV derivadas de células transfectadas normalizadas con los niveles endógenos de estas fracciones. Esto viene representado como el delta Cq de tRNA^{Gly} obtenido en la situación control (NT) menos el aquel obtenido en la situación donde hubo transfección (T). Un aumento en esta diferencia denota que el Cq en la situación donde hubo transfección disminuyó lo cual significa que los niveles de mitades de tRNA aumentaron.

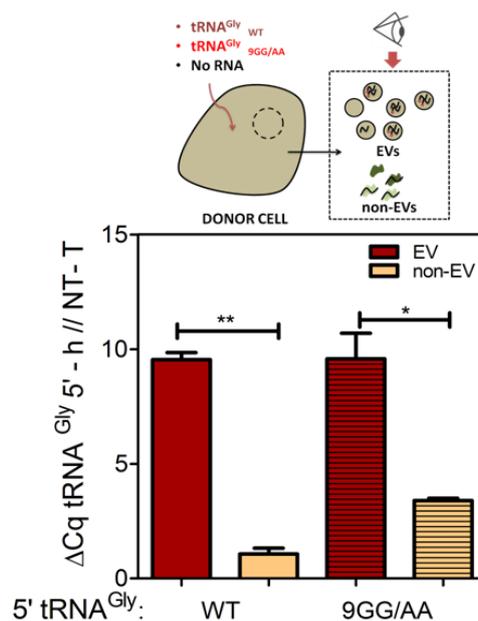


Figura 21: Niveles de las mitades 5' tRNA^{Gly} Wt (simple) y 9GG/AA (a rayas) en la fracción EV (rojo) y non-EV (naranja) derivadas de células transfectadas normalizadas con los niveles endógenos de estas fracciones. Como test estadístico se utilizó un test t.

En definitiva, pudimos demostrar que las mitades 5' tRNA^{Gly} están siendo secretadas por las células a través de la fracción EV, es decir a través de vesículas extracelulares.

Las mitades de tRNAs son capaces de ser transferidas entre células MCF-7 mediante EVs

Una vez determinado el vehículo de secreción de nuestras moléculas en estudio, analizamos la eventual fusión de las EVs con otras células, asociado a la transferencia de su contenido. Inicialmente analizamos la transferencia homotípica hacia células MCF-7 receptoras (“células aceptoras de EVs”) utilizando el siguiente protocolo ilustrado en la Figura 22.

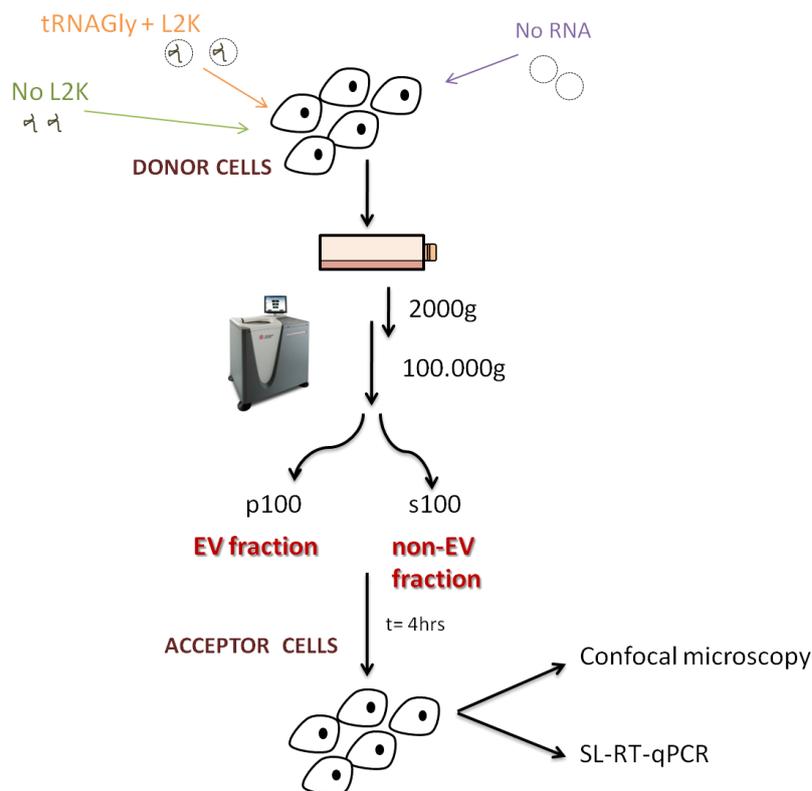


Figura 22: Protocolo utilizado a fin de evaluar la secreción y eventual captación de ARNs pequeños por parte de células MCF-7

Tal como se ilustra en la figura 22, a fin de evaluar la secreción y eventual captación de ARNs pequeños por parte de células MCF-7, se procedió a transfectar células MCF-7 donadoras (8×10^3 células) con mitades de tRNA^{Gly} biotiniladas a 100nM. De nuevo, como control se trataron células únicamente con el ARN o lipofectamina. A partir de los medios condicionados de células en estas tres condiciones, se purificó la fracción EV y la fracción non-EV, las cuales fueron utilizadas para incubar aproximadamente 2×10^3 células MCF-7, a las que llamaremos células receptoras o “*acceptor cells*”, durante 4hrs. Como queda evidenciado a través de estos números, en este ensayo de captación se utilizó una relación célula donadora: célula aceptora 4:1. Es de destacar que esta relación es considerablemente más baja que la de otros reportes similares presentes en la bibliografía (Mittelbrunn et al., 2011; Ramakrishnaiah et al., 2013).

Quisiéramos destacar esto como una fortaleza del estudio, pues poco puede concluirse de incubar células con una concentración masiva, nunca alcanzable en condiciones fisiológicas, de vesículas extracelulares. Luego se procedió a evaluar la presencia de las mitades de tRNA biotiniladas en las células receptoras mediante fluorescencia *in situ* y mediante *SL-RT-qPCR*. Si bien ya sabíamos que las mitades 5' de tRNA^{Gly} transfectadas eran secretadas por la célula en la fracción vesicular, decidimos incubar las células también con la fracción no vesicular a modo de control

A través de la fluorescencia *in situ* en las células receptoras una vez transcurrido el periodo de captación de 4hrs, las mitades de tRNA^{Gly} 5' biotiniladas fueron detectadas utilizando streptavidina conjugada al fluorocromo APC. En la figura 23 se muestran imágenes representativas. Nuevamente, en azul se observan los núcleos marcados con DAPI y en rojo las mitades de tRNA^{Gly} 5' las cuales aparecen indicadas con flechas blancas. Como se puede observar en la figura 23, las mitades tRNA 5' biotiniladas fueron únicamente detectadas en aquellas células que fueron incubadas con vesículas (EV) provenientes de células transfectadas con mitades 5' de tRNA^{Gly}, y no cuando las células fueron incubadas con la fracción no vesicular de células transfectadas.

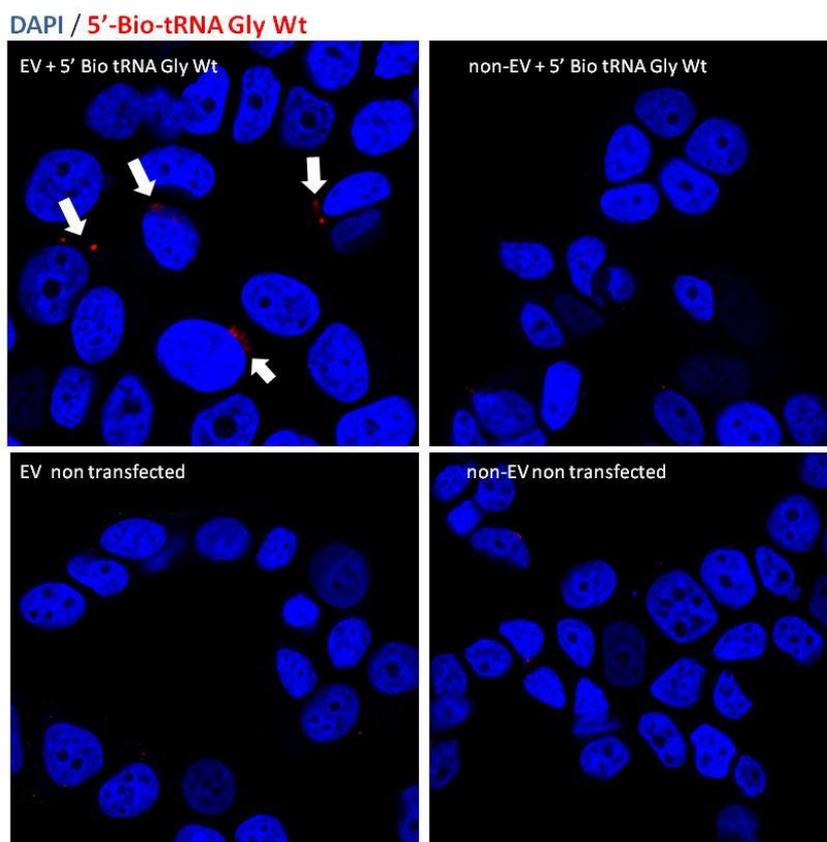


Figura 23: Las mitades 5' de tRNA^{Gly} se transfieren a través de EV. a) Fluorescencia *in situ* de células MCF-7 receptoras al ser incubadas con la fracción vesicular (EV) y no vesicular (non EV) proveniente de células transfectadas o no con mitades 5' de tRNA^{Gly}. Con las flechas blancas se marcan las mitades de tRNA^{Gly}

Se cuantificó la intensidad de fluorescencia en las células receptoras al incubar las mismas con la fracción EV y non-EV provenientes de células transfectadas con las mitades 5' de tRNA^{Gly} y de células control (incubadas únicamente con ARN o lipofectamina) (Figura 24a). La intensidad

de fluorescencia es mayor en las células receptoras incubadas con la fracción vesicular derivadas de células transfectadas con mitades 5' de tRNA^{Gly} biotiniladas. Una vez más se observa como el remanente de ARN que queda una vez transcurrida la transfección, no llega a las células receptoras, por lo que podemos afirmar que el aumento en la intensidad de fluorescencia observado en las células receptoras se debe únicamente a la incubación con vesículas cargados con estas mitades 5' de tRNA^{Gly} biotiniladas.

Se quiso validar esto mismo por *SL-RT-qPCR*. Para ello, incubamos células MCF-7 receptoras con las fracciones EV y non-EV de células transfectadas con mitades 5' de tRNA^{Gly} y de células control. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 24b en donde se graficó el ΔCq (miR-21-5p – tRNA^{Gly}). Nuevamente, los niveles de mitades 5' de tRNA^{Gly} aumentaron en células receptoras al incubar las mismas con EV de células donadoras transfectadas con estas mitades, y no así con EV provenientes de células tratadas únicamente con lipofectamina o ARN. Esto viene demostrado por una disminución en el valor negativo del ΔCq . Frente a la incubación con EVs provenientes de células transfectadas con mitades 5' de tRNA^{Gly}, los niveles intracelulares de las mitades 5' de tRNA^{Gly} en la célula aceptora aumentan, lo cual se traduce en una disminución en el Cq de mitades 5' de tRNA^{Gly}, lo cual provoca que el ΔCq sea menos negativo.

Esto significó que el aumento en los niveles intracelulares de mitades 5' de tRNA^{Gly} en células receptoras se debe al ARN que ingresó en la célula donadora, salió en forma de EV e ingresó a las células receptoras mediante la captación de estas EVs. Si bien los ensayos de fluorescencia permiten discriminar ARNs endógenos de exógenos (pues solo estos últimos contienen biotina), los ensayos basados en PCR nos permiten descartar que sea únicamente la biotina la que es transferida. En otras palabras, nos permiten afirmar que estamos evidenciando procesos de transferencia de ARN.

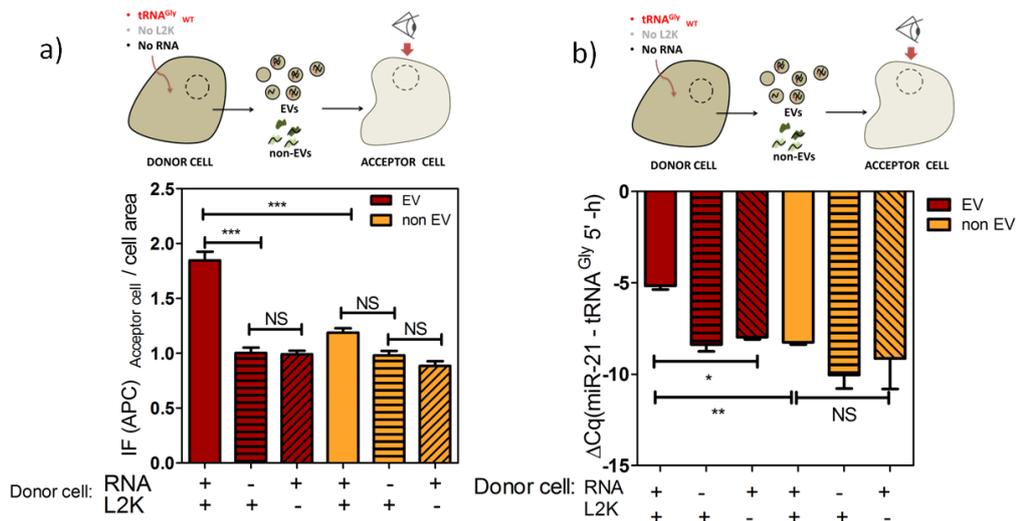


Figura 24: Las mitades 5' de tRNA^{Gly} se transfiere a través de EV. En a) se muestra la intensidad de fluorescencia (APC) en las células receptoras y en b) los niveles intracelulares en células receptoras de mitades de tRNA^{Gly} al incubar las mismas con la fracción EV (rojo) y non-EV (naranja) provenientes de células transfectadas con las mitades 5' de tRNA^{Gly} y de células control (no L2K; no RNA).

Con estos resultados observamos que la internalización de ARN sintéticos por células MCF-7 no ocurre de forma independiente. Pero como al transfectar células MCF-7 con mitades 5' de

tRNA^{Gly} aumentamos su concentración dentro de la célula, estas mitades son empaquetadas en vesículas, secretadas al espacio extracelular en forma de EVs, y las mismas pueden ser captadas e internalizadas por otras células.

No solo las mitades 5' de tRNA^{Gly} pueden ser transferidas entre células MCF-7 mediante EVs

Llegado a este punto, estamos en condiciones de contestar una de las preguntas centrales que motivaron esta tesis: ¿Pueden las mitades 5' de tRNA^{Gly} transferirse de una célula a otra? La respuesta es que sí: pueden empaquetarse en vesículas extracelulares, y transferirse a otras células. Al menos en el modelo homotípico MCF-7 a MCF-7. Dado lo anterior, nos interesó luego responder si este mecanismo es específico para las mitades 5' de tRNA^{Gly}, o si cualquier oligonucleótido lo suficientemente abundante a nivel intracelular es capaz de ser empaquetado y secretado mediante EVs.

Con este objetivo en mente, volvimos a repetir los ensayos de transferencia mediados por EVs, pero ahora utilizando nuevas moléculas que nos ayuden a responder lo anterior. Tal como se hizo anteriormente, como control se incluyeron células donadoras tratadas únicamente con lipofectamina (no RNA) y únicamente con el ARN (no L2K). Luego se transfectó células MCF-7 donadoras con mitades de tRNA^{Gly} versión WT y 9GG/AA, con un oligonucleótido con la misma secuencia que la mitad 5' tRNA^{Gly} (incluso con uracilos en vez de timinas) pero con *backbone* de ADN, por lo que lo llamaremos tDNA^{Gly}, y por último transfectamos con un oligo de ADN de secuencia arbitraria de 16 nucleótidos de largo al cual denominamos 16mer. Todos estos nuevos oligonucleótidos estaban marcados en su extremo 5' con una molécula de biotina a efectos de poder detectarlos en células receptoras mediante microscopía láser confocal usando streptavidina APC como agente de revelado. Decidimos agregar estas nuevas moléculas ya que las tres aportaban información independiente. Por un lado, el tRNA^{Gly} versión 9GG/AA, del cual ya sabíamos que tiene capacidad de dimerizar (Figura 8 y 9), una estabilidad intracelular comparable a la del de tRNA^{Gly} Wt (Figura 12 y 13) y que es empaquetado y secretado en forma de EVs (Figura 20 y 21). Por lo que, si es transferido o no a células receptoras, nos estaría dando información acerca de cuán importante es la estructura de los ARNs pequeños para ser empaquetados y transferidos a través de EVs. Es decir, de repente lo necesario para ser empaquetado y ser transferido mediante EVs se base en una estructura en forma de dímero como la forman las mitades 5' de tRNA^{Gly} Wt y 9GG/AA. Luego, el tDNA^{Gly} nos estaría aportando información sobre si este mecanismo se trata de un mecanismo dependiente de la secuencia o no. Por trabajos previos en el laboratorio sabemos que moléculas con la secuencia igual a las mitades 5' de tRNA^{Gly} pero con *backbone* de ADN no son capaces de formar dímeros (Tosar y Gámbaro et al 2018). Sin embargo, tal vez lo necesario para ser cargado en EV no sea una estructura dimérica, sino la secuencia. Por último, incluimos el 16mer: un oligonucleótido de ADN que no comparte ni secuencia, ni la estructura ni incluso el largo con las mitades 5' de tRNA^{Gly}, ya que puede ser que ni la estructura ni la secuencia sean determinantes para el empaquetamiento, secreción y transferencia en EV.

En definitiva, lo que buscábamos es tener un juego de oligonucleótidos resistentes a la degradación, que nos permitieran someter a prueba la hipótesis de secreción no selectiva. En tal sentido, el descubrimiento de secuencias de ARN intrínsecamente estables (por dimerización: tRNA-Gly y el mutante 9GG/AA) constituía el modelo perfecto para trabajar. Pero, dado que a esta altura ya sabíamos que estos ARNs podían ser empaquetados en vesículas y transferidos a otras células ¿Cómo descartar que no se tratara de un fenómeno selectivo, ya sea a nivel del reconocimiento de un patrón de estructura o de secuencia? La utilización de secuencias idénticas pero con un grupo “desoxi” en 2' (tDNA-Gly, que no dimeriza), o el uso de un oligonucleótido de secuencia irrelevante de ADN nos deberían permitir evaluar esto.

Se transfectó células MCF-7 donadoras con los cuatro oligonucleótido biotinilados y como control se trató células únicamente con lipofectamina (no RNA) o con ARN (no L2K). Recolectamos el medio condicionado y procedimos a purificar EVs mediante ultracentrifugación, tal como se realizó anteriormente. A este punto ya dejamos a un lado la fracción no vesicular y nos focalizamos en el estudio de las EVs. Se purificaron EVs de un total de 160.000 células donadoras y se incubaron con un total de 20.000 célulasceptoras durante 4 horas, aumentando así la relación célula donadora: célula aceptora a 8:1. Finalizado el período de incubación, se procedió a realizar la fluorescencia *in situ* para la detección de los oligonucleótidos biotinilados. A continuación se muestran imágenes representativas de la fluorescencia *in situ*.

DAPI / Streptavidin - APC

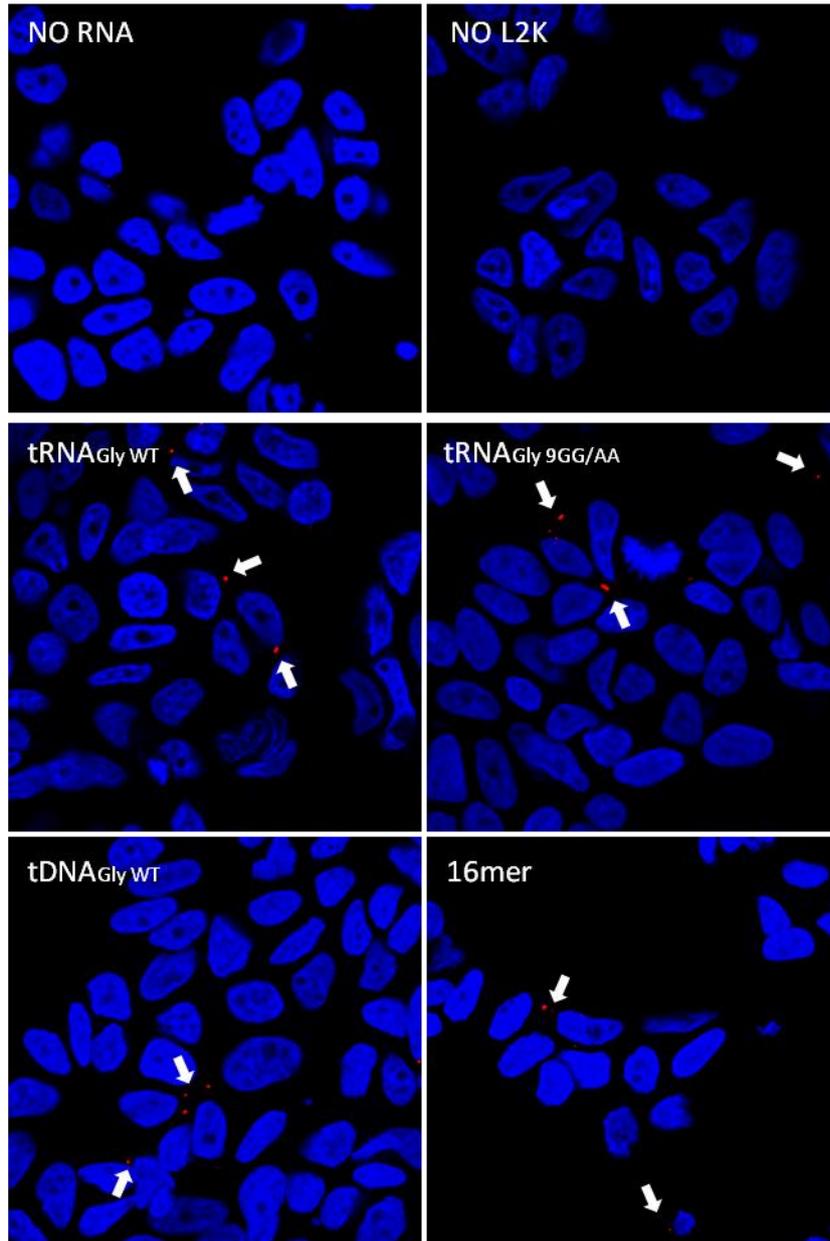


Figura 25: Transferencia de oligonucleótidos desnudos entre células MCF-7 mediante EVs. Fluorescencia *in situ* de células MCF-7 receptoras al ser incubadas con la fracción vesicular EV provenientes de células control (EV –no RNA y EV- no L2K) y con EV provenientes de células donadoras transfectadas con mitades 5' de tRNA^{Gly} Wt (EV - tRNA^{Gly} Wt), mitades 5' de tRNA^{Gly}9GG/AA (EV - tRNA^{Gly} 9GG/AA), con 5'tDNA^{Gly} (EV -tDNA^{Gly}) y por ultimo transfectadas con 16mer (EV-16mer). En azul se marcan lo núcleos con DAPI y en rojo se detectan los oligonucleótidos biotinilados con streptavidina – APC.

Como se puede notar de la figura 25, se observa señal roja, la cual corresponde a los oligos marcados con biotina revelados con streptavidina APC en células receptoras tratadas con EVs provenientes de células donadoras transfectadas con tRNA^{Gly} WT y 9GG/AA, tDNA^{Gly} y 16 mer. Esto no se observó al incubar células receptoras con EVs provenientes de células control (no

RNA; no L2K). Para obtener apoyo estadístico, cuantificamos el porcentaje de células APC positivas en cada condición de dos ensayos independientes y encontramos que el porcentaje de células receptoras APC positivas tratadas con EVs conteniendo tRNA^{Gly} WT y 9GG/AA, tDNA^{Gly} y 16 mer era superior (p – valor =0,0022) en comparación con células receptoras tratadas con EVs – no RNA. El porcentaje de células receptoras APC positivas de células tratadas con EV-no L2K respecto a EV no RNA fue mínimo, y estadísticamente no significativo. Tanto durante la adquisición de las fotos como para el análisis de las mismas, la condición de tratamiento con EV – no RNA fue establecida como cero. El porcentaje de células APC positivas para cada condición se muestra en el siguiente gráfico.

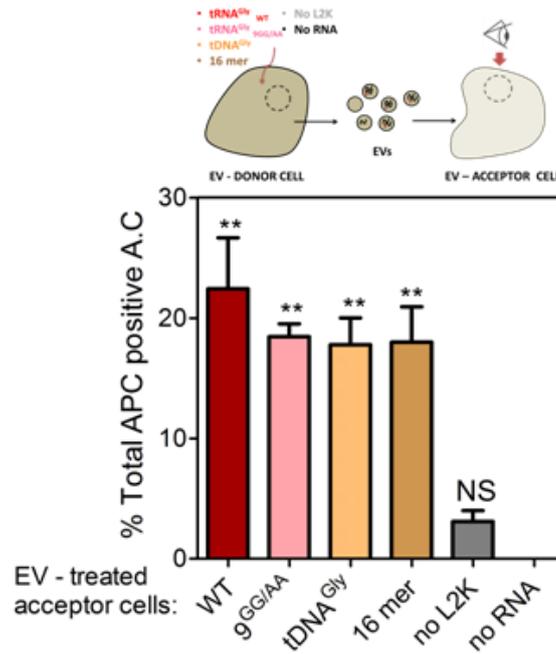


Figura 26: El porcentaje de células receptoras APC positivas tratadas con EVs conteniendo 5' tRNA^{Gly}WT , 5' tRNA^{Gly}9GG/AA, tDNA^{Gly} y 16 mer es superior a aquellas tratadas con EV derivadas de células control (no L2K y no RNA). Como test estadístico se utilizó one-way ANOVA y Dunetti post test con EV-no RNA como grupo control.

Por lo tanto, al transfectar células MCF-7 con mitades 5' de tRNA^{Gly} Wt y 5' de tRNA^{Gly} 9GG/AA, tDNA^{Gly} o 16mer, aumentamos su concentración dentro de la célula y los mismos son cargados en EVs. Estas vesículas son liberadas al espacio extracelular por estas células y luego son captados e internalizados por células MCF-7 receptoras.

Los resultados obtenidos sugieren entonces que cualquier oligonucleótido que se encuentre dentro de una célula a una determinada concentración podrá ser empaquetado y secretado en forma de EVs. Esto implica que las células secretaran en forma de EV un muestra de su contenido de ARN intracelular, por lo que el perfil de moléculas en las EVs es un reflejo del contenido intracelular en un momento y estado fisiológico dado. Por lo tanto, al transfectar células MCF-7 con mitades 5' de tRNA^{Gly} Wt y 5' de tRNA^{Gly} 9GG/AA, tDNA^{Gly} o 16mer, aumentamos su concentración dentro de la célula y observamos que los mismos son cargados en EVs. Estas vesículas son liberadas al espacio extracelular por estas células y luego son captadas e internalizadas por células MCF-7 receptoras.

Los resultados obtenidos sugieren entonces que cualquier oligonucleótido que se encuentre dentro de una célula a una determinada concentración podrá ser empaquetado y secretado en forma de EVs. Esto implica que las células secretaran en forma de EV una muestra de su contenido intracelular, por lo que el perfil de ARNs pequeños en las EVs es un reflejo del contenido intracelular en un momento y estado fisiológico, como había sido demostrado, para los miRNAs, en un trabajo previo (observacional) de nuestro grupo (Tosar et al. 2015).

El empaquetamiento y secreción de mitades sintéticas 5' de tRNAs obedece un mecanismo no selectivo

El resultado anterior indicaba que, independientemente de la secuencia, largo y estructura, un oligonucleótido presente en el interior de la célula podrá ser secretado dentro de EVs y ser transferido a células capaces de captar estas EVs. De ser esto cierto, si aumentamos aún más la concentración con la cual transfectamos estos oligonucleótidos (mitades 5' de tRNA^{Gly}, a efectos de minimizar a la gran destructora de toda correlación: la degradación), deberíamos ver un aumento a nivel intracelular de las mitades 5' de tRNA^{Gly} pero también a nivel de la fracción vesicular y un aumento en los niveles intracelulares de las células receptoras. En virtud de esto, volvimos a transfectar células MCF-7 con mitades 5' de tRNA^{Gly} en concentraciones crecientes: 100nM, 400nM y 1000nM. Luego se procedió a purificar la fracción vesicular derivadas de estas células y se incubaron las mismas con células MCF-7 receptoras tal como se realizó para los ensayos anteriores. De nuevo, como control se incluyó la fracción vesicular de células donadoras que fueron tratadas únicamente con lipofectamina (no RNA) y únicamente con ARN (no L2K), esta vez a la concentración máxima; 1000nM. Luego, pasamos a medir los niveles de las mitades 5' de tRNA^{Gly} mediante *SL-RT-qPCR* en EVs y en las células receptoras, luego de incubar las mismas con estas EVs. Los resultados obtenidos mostraron lo que habíamos postulado y se resumen en la figura 27.

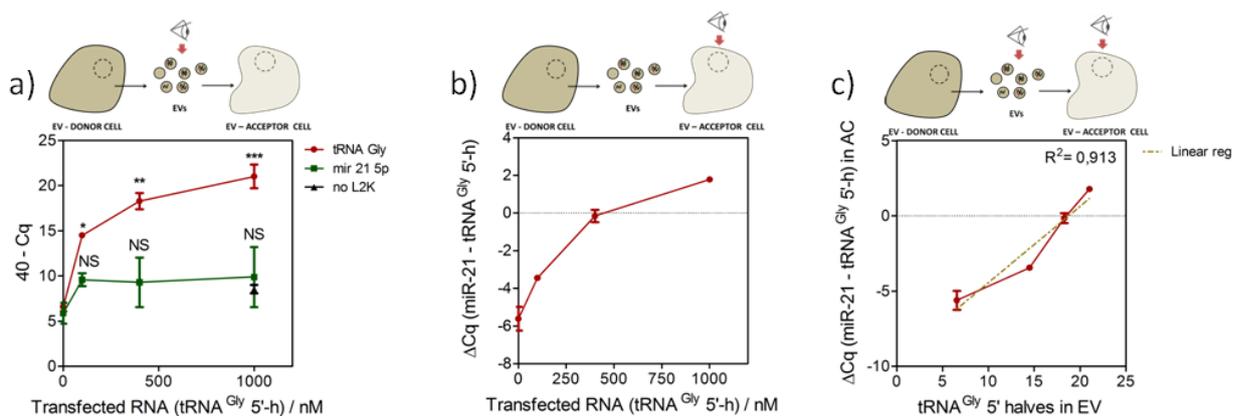


Figura 27: Cuanto mayor es la abundancia intracelular de de mitades 5' de tRNA^{Gly}, mayor es su abundancia a nivel de EVs y su transferencia mediante EVs es mayor. En la parte a) se muestran los niveles de miR-21 5p y mitades 5' de tRNA^{Gly} en EVs a medida que se transfectan células donadoras con concentraciones crecientes de mitades 5' de tRNA^{Gly}. En b) se muestra el aumento en los niveles intracelulares de mitades 5' de tRNA^{Gly} en células receptoras a medida que se incuban con EV provenientes de células donadoras transfectadas con crecientes de mitades 5' de tRNA^{Gly}. En c) se grafica los niveles de 5' tRNA^{Gly} en EVs en función de la abundancia relativa de mitades 5' de tRNA^{Gly} en células receptoras al incubar las mismas con estas EVs.

A medida que aumentamos la concentración de mitades 5' de tRNA^{Gly} con la cual transfectamos se observó un aumento en los niveles de mitades 5' de tRNA^{Gly} en la fracción vesicular (Figura 27a). Notar que en este punto también medimos los niveles de miR-21-5p a nivel de EVs, cuyo valor no varió de forma significativa en las distintas condiciones. Esto nos permitió validar que el aumento observado de los niveles de tRNA^{Gly} se debía efectivamente a que, al aumentar la concentración intracelular del mismo, aumenta su secreción a través de EVs, y que no es un efecto de haber obtenido más o menos EVs durante el proceso de purificación entre las distintas condiciones. Este control es importante ya que si bien la cantidad de células donadoras es la misma para cada una de las condiciones experimentales, al momento, no tenemos forma de cuantificar la cantidad de EVs que obtenemos luego de la purificación (el equipamiento necesario para esto no está actualmente disponible en el país, y aunque estamos trabajando en métodos cuantitativos alternativos, estos no se encuentran todavía validados). Por consiguiente, ver que los niveles de miR-21-5p no varían entre condiciones nos habla que la cantidad de EVs purificadas es similar.

También al incubar EVs con células MCF-7 observamos que los niveles intracelulares de mitades 5' tRNA^{Gly} en estas células receptoras aumentan conforme aumenta la concentración con la cual fueron transfectadas las células donadoras (Figura 27b). Tan es así que, al incubar células con EVs provenientes de células transfectadas con mitades 5' tRNA^{Gly} a 1000nM, se logra revertir la relación entre miR-21-5p y las mitades 5' de tRNA^{Gly} a nivel intracelular. En células sin transfectar, miR-21-5p es más abundante a nivel intracelular que las mitades 5' tRNA^{Gly} (validado por PCR digital en Tosar et al. 2015) por lo que el valor de ΔCq (definido como el Cq de miR-21-5p menos el valor de Cq de tRNA^{Gly}) es un valor negativo. Pero al incubar con EVs conteniendo niveles mayores de tRNA^{Gly}, las EVs son internalizadas por las células y aumentan los niveles intracelulares de mitad 5' tRNA^{Gly} al punto que su abundancia supera la de miR-21-5p y por consiguiente el valor de ΔCq se torna ahora positivo. Es por este motivo que en la gráfica representada en la figura 27b se observa que, a medida que se aumenta la concentración del ARN transfectado (de 0 a 1000 nM), el valor de delta Cq aumenta desde -5,6 a +1,8. No es menor destacar que mediante la internalización de EVs se logra aumentar los niveles de mitades 5' tRNA^{Gly} a casi 8 ciclos de PCR, lo cual significa que las células que captaron EVs derivadas de células transfectadas con 1000 nM tienen 256 veces más mitades 5' tRNA^{Gly} que células que captaron EVs derivadas de células sin transfectar.

Entonces, al aumentar la concentración de mitades 5' de tRNA^{Gly}, aumenta su abundancia en EVs y aumenta los niveles intracelulares de células que internalizan estas EVs. Más aún, este aumento parecería ser lineal. Como se muestra en la figura 27c, al graficar los niveles de 5' tRNA^{Gly} en EVs en función de la concentración intracelular de células receptoras se observa una relación lineal (con $r^2= 0,913$) entre ambas variables, siendo que ambos ejes están en escala exponencial (Cq). Si bien mediante este tipo de técnica no se logra tener una medida absoluta de la cantidad de ARN presentes en las EVs por ejemplo, podemos sí conocer su abundancia relativa. En este sentido, llama la atención que al transfectar con 5' tRNA^{Gly} a distintas concentraciones, se obtiene a nivel de EVs una diferencia de valores de Cq que coincide con la observada a nivel de las células receptoras (aprox. 3,5 ciclos de PCR para 100 vs 400nM y 2,5 ciclos de PCR para 400 vs 1000nM). Esto sugiere que la eficiencia en la captación de EVs por parte de células MCF-7 es independiente de la concentración de ARN en las EVs, lo cual cabría

esperarse dado que esta diferencia no debería manifestarse a nivel de la superficie de las vesículas, que es lo que determina su captación.

Con estos resultados observamos entonces que cuanto mayor es la concentración intracelular de un oligonucleótido, este será empaquetado y secretado en EVs en mayores cantidades. Esto valida, a nuestro entender, el modelo de secreción no selectiva de miRNAs que propusimos en Tosar et al. 2015.

Transferencia de mitades 5' tRNA^{Gly} endógenas

Interesados en este proceso de captación e internalización de EVs por parte de células MCF-7, pensamos que si aumentamos la cantidad de células donadoras con las cuales transfectamos las mitades sintéticas 5' tRNA^{Gly} y, por consiguiente, la cantidad de EVs con las cuales incubaremos luego a las células que llamamos receptoras, deberíamos ver un aumento en los niveles de mitades 5' tRNA^{Gly} en las mismas. La relación entre la cantidad de células a partir de las cuales vamos a purificar EVs y la cantidad de células que van a ser incubadas con estas EVs es un parámetro importante a definir en este tipo de estudio de captación y por lo general se lo conoce como relación célula donadora/célula receptora. Ahora, a modo de estudiar si un aumento en esta relación provoca un aumento en los niveles intracelulares de mitades 5' tRNA^{Gly}, nos propusimos aumentar esta relación de 4:1 a 8:1 y 20:1. Una vez definido este parámetro, purificamos EVs provenientes de 8x10³, 16x10³ y 40x10³ células, las cuales fueron transfectadas con mitades 5' tRNA^{Gly} a 100nM o tratadas únicamente con lipofectamina (no RNA) o únicamente con el ARN (no L2K), y procedimos a incubar estas EVs con 20x10³ células MCF-7 receptoras para cada condición. En otras palabras, en lugar de variar la concentración de ARNs en las EVs a cantidad de EVs constante, variamos ahora la cantidad de EVs a concentración de ARN (en las células donadoras, y por tanto, en las EVs) constante. Transcurrido el tiempo post-incubación proseguimos a medir por *SL-RT-qPCR* los niveles de mitades 5' tRNA^{Gly} y miR-21-5p en las células receptoras. Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 28.

En primer lugar, se observó que, al aumentar la cantidad de células donadoras, aumentan los niveles de mitades 5' tRNA^{Gly} y miR-21-5p en la fracción vesicular (Figura 28a y 28b). Esto nos habla que al aumentar la cantidad de células de partida, purificamos una mayor cantidad de vesículas, lo cual si bien es bastante intuitivo, es pertinente verificar a efectos de este ensayo. Como se explicó anteriormente al momento no tenemos la posibilidad de poder cuantificar la cantidad de vesículas obtenidas luego de cada purificación. Una forma indirecta de hacer esto es verificar que a medida que aumentamos la cantidad de células donadoras, los niveles de tRNA^{Gly} y miR-21-5p aumentan también (ya que no normalizamos los niveles de RNA en cada ensayo de qPCR, sino que trabajamos con la totalidad del RNA purificable de un volumen fijo de medio de cultivo). Como cabría esperar, en las tres condiciones (transfección con 5' tRNA^{Gly} y condiciones control, no L2K y no RNA), miR-21-5p aumenta de forma similar. Pero si miramos los niveles de 5' tRNA^{Gly} vemos que estos aumentan significativamente en las fracciones de células transfectadas con el mismo en comparación con las dos situaciones control, lo que de nuevo verifica los resultados del capítulo anterior. Luego, efectivamente, observamos que, conforme aumenta la cantidad de células donadoras transfectadas con mitades 5' de tRNA^{Gly} (y

por tanto, la relación célula donadora/aceptora), los niveles de mitades 5' de tRNA^{Gly} en células receptoras también aumentan, y de forma significativa en comparación con células receptoras incubadas con vesículas provenientes de células control (Figura 28c). Más interesante aún, al incubar células receptoras con cantidades crecientes de EVs provenientes de células control (no RNA y no L2K), los niveles de tRNA^{Gly} de células receptoras también aumentan. De esta forma no solo demostramos la transferencia de mitades 5' de tRNA^{Gly} sintéticas sino también endógenas, lo cual es biológicamente más importante dado que se evitan, en este caso, todas las críticas pertinentes a un sistema basado en sobre-expresión.

Si bien estos resultados sustentan nuestra anterior afirmación, la interpretación correcta de la Figura 28c es más compleja. Al aumentar la cantidad de EVs provenientes de células no transfectadas, las células receptoras no solo reciben mayores cantidades de mitades 5' de tRNA-Gly, sino también de miR-21-5p (que sabemos, según lo observado por secuenciación en Tosar et al. 2015, que también viaja en las vesículas, y lo probamos aquí en la Figura 28b). Entonces, ¿no cabría esperar que la variación (ΔCq) entre mitades 5' de tRNA^{Gly} y miR-21-5p permaneciera constante en las células receptoras? Eso sería lo esperable si no se recordara la razón principal por la cual utilizamos a las mitades 5' de tRNA^{Gly} para respaldar modelos de secreción no selectiva: son altamente resistentes a la degradación a nivel intracelular. Por tanto, si bien se transfieren cantidades mayores de mitades 5' de tRNA^{Gly} de tRNA y de miR-21-5p (y otros muchos ARNs, pero solo a estos dos estamos midiendo), solamente los primeros se acumulan pues los segundos se degradan. Claro que eso nos llevaría a asumir que las moléculas de miR-21-5p presentes en las EVs estarían libres, es decir, no unidas a proteínas Argonauta. Se ha visto que los miRNAs desnudos son sensibles frente a la degradación (Mitchell et al., 2008) mientras que su unión con proteínas argonautas protege a los mismos de la degradación (Arroyo et al. 2011, Turchinovich et al. 2011). Más aún, la cuestión si los miRNAs presentes en EVs están o no asociados a Argonauta continúa siendo ampliamente debatida en este campo de estudio (Van Deun et al., 2014), y nuestros resultados nos llevan a pensar que, en nuestro caso, no lo estarían. Al menos debemos decir que es desde ese lugar que estamos interpretando nuestros resultados. Como siempre, puede haber otras interpretaciones válidas.

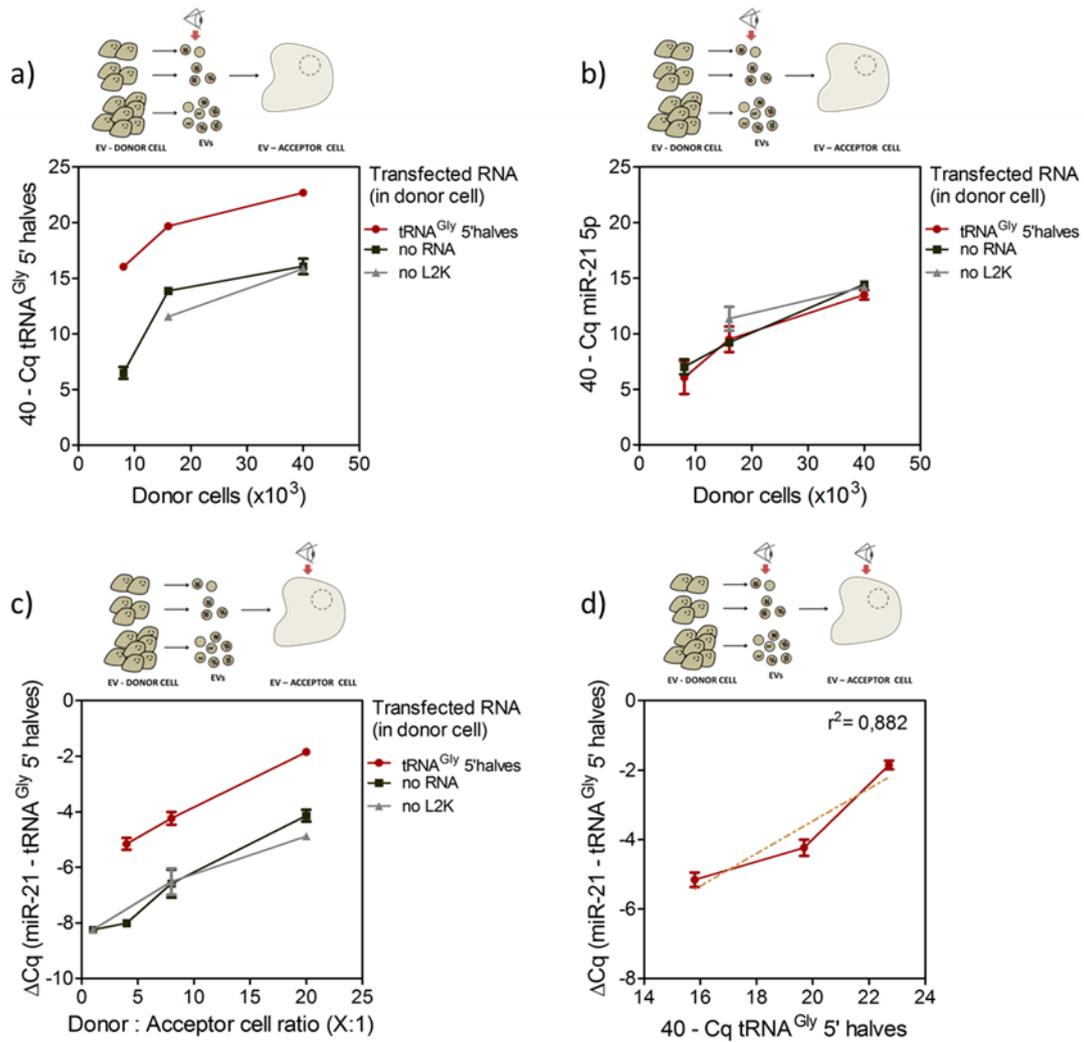


Figura 28: Cuanto mayor es el número de células donadoras, se obtienen mayores niveles de tRNA^{Gly} sintéticas y endógenas en las células receptoras. En a) y b) se muestran los niveles en EV de mitades 5' de tRNA^{Gly} y miR-21 respectivamente al aumentar la cantidad de células donadoras que son sujetas a la transfección con mitades 5' de tRNA^{Gly} y al tratamiento con lipofectamina (no RNA) o ARN (no L2K) únicamente. En c) se muestran como aumenta la abundancia relativa de mitades 5' de tRNA^{Gly} con respecto a miR-21-5p en células receptoras al tratar las mismas con EV proveniente de un mayor número de células donadoras transfectadas con mitades 5' de tRNA^{Gly} o utilizadas como células control. En d) se grafica los niveles de 5' tRNA^{Gly} en EVs en función de la abundancia relativa de mitades 5' de tRNA^{Gly} en células receptoras al incubar las mismas con estas EVs.

Más aún, como se observa en la figura 28d, en este estudio también se observa que los niveles de mitades 5' tRNA^{Gly} a nivel extracelular se relacionan de forma lineal (ya que ambos ejes están en escala exponencial, dado que representan valores de Cq) ($r^2 = 0,882$) con los niveles en las células receptoras luego de la incubación con EVs. Estos resultados son análogos a los representados en la figura 27c, con la única diferencia de que los niveles de mitades 5' de tRNA-Gly a nivel extracelular fueron variados de forma diferente (modulando su concentración en EVs a cantidad de EV constante, o la cantidad de EVs a concentración en EVs constante). Esto nos permite afirmar que no solo aquellos ARNs pequeños más abundantes a nivel intracelular serán mayormente empaquetados y secretados en EVs, sino que también su transferencia a células capaces de internalizar estas EVs será mayor. Y si bien necesitamos

recurrir a modelos de sobre-expresión (por transfección) para validar este postulado, lo interesante es que observamos el mismo patrón para las mitades de tRNA^{Gly} endógenas, al incubar células receptoras con mayores concentraciones de EVs.

Regulación de los niveles endógenos de mitades 5' tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu}

Atraídos por la transferencia endógena de mitades 5' de tRNAs, nos planteamos estudiar mecanismos que nos permitieran modular los niveles endógenos de mitades 5' de tRNAs. Está ampliamente reportado que la biosíntesis de mitades de tRNA está mediada por la ribonucleasa Angiogenina (ANG) y que al silenciar la expresión de ANG los niveles endógenos de las mitades también disminuyen (Fu et al., 2009; Li and Hu, 2012; Lyons et al., 2017a). Nos propusimos validar esto mismo en nuestro modelo celular MCF-7. En particular nos propusimos silenciar el gen de la Angiogenina mediante técnicas de interferencia de ARN (RNAi, sigla que deriva del inglés RNA interference) y estudiar qué sucedía con los niveles de mitades 5' de tRNA^{Gly} y mitades 5' de tRNA^{Glu}. De forma breve, esta técnica se basa en el uso de pequeños ARNs interferentes (siRNAs) los cuales consisten en dúplex de ARN de aproximadamente 21nts de largo. Luego, una de estas hebras se selecciona y se incorpora al complejo de silenciamiento inducido por ARN, denominado complejo RISC. Esta hebra, denominada hebra guía, será la responsable de identificar y guiar al complejo RISC hacia el ARNm complementario, el que será degradado. De esta forma se logra disminuir los niveles del ARNm en cuestión y por lo tanto de la proteína que dará a lugar ese ARNm.

Por consiguiente transfectamos células MCF-7 con un siRNA específico para la Angiogenina (siANG) y como control negativo, transfectamos células con un siRNA de secuencia irrelevante que no presenta complementariedad con ningún transcripto del genoma humano. Este control es esencial para determinar los efectos de la administración del siRNA y para proporcionar una línea base con la cual comparar las muestras tratadas con el siRNA específico. A este siRNA se le llamó siRNA control y lo denotamos como siCtrl. Luego, transcurridas 48hrs post transfección, se pasó a medir mediante PCR cuantitativa los niveles de ARNm de la Angiogenina y de GAPDH como referencia interna en células tratadas con siANG, siCtrl y en células sin transfectar. Se calculó el porcentaje de ARNm de Angiogenina en células tratadas con siANG y siCtrl en comparación a los niveles de ARNm de Angiogenina en células sin transfectar, el cual fue tomado como nuestro 100%. Como se observa en la Figura 29a, frente al tratamiento con el siANG se logró disminuir los niveles de ARNm en torno a un 40% mientras que al tratar células con siCtrl, los niveles de ARNm permanecieron en torno a un 98%. Según lo esperado, en células tratadas con siANG se vio mediante SL-RT qPCR una disminución en los niveles intracelulares de mitades 5' tRNA^{Gly} (Figura 29b) y tRNA^{Glu} (Figura 29c). Dicha disminución viene representada por una tendencia del valor del ΔCq hacia valores negativos: frente al tratamiento con siANG el Cq de 5' tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} aumenta, lo cual provoca que el ΔCq definido como (Cq miR-21-5p – Cq de 5' tRNA), se vuelva más negativo.

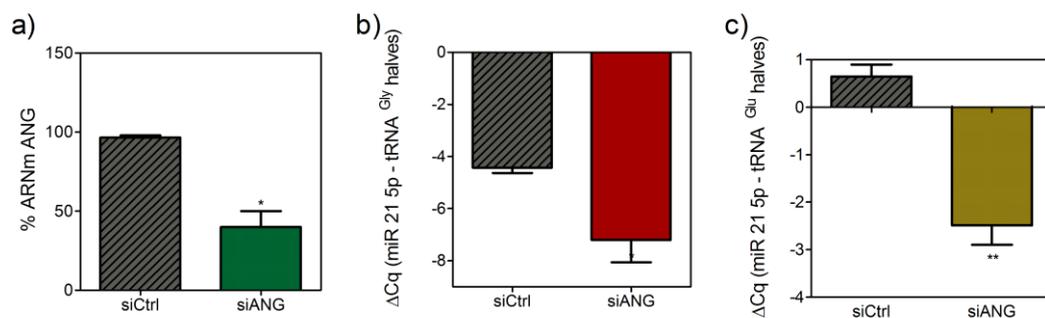


Figura 29: El silenciamiento de la Angiogenina disminuye los niveles endógenos de mitades 5' tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu}. Al transfectar células MCF-7 con siRNA contra la Angiogenina (siANG) se observa a las 48hrs que los niveles de ARNm disminuyen pero no así al transfectar con siRNA control (a). Esto está representado como el porcentaje de ARNm de Angiogenina el cual fue calculado como los niveles remanentes de ARNm de ANG de células tratadas con siANG y siCtrl en relación a los niveles de ARNm de Angiogenina en células sin transfectar. Más aún, los niveles de ARNm de Angiogenina en cada muestra fueron normalizados utilizando GADPH como referencia. Los niveles intracelulares de las mitades 5' tRNA^{Gly} (b) y tRNA^{Glu} (c) disminuyen frente al tratamiento con siANG en comparación con siCtrl.

Por lo tanto, pudimos validar que en nuestro modelo, la biogénesis de las mitades 5' tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} es mediada por ANG. Pero más relevante aún, obtuvimos un mecanismo que nos permitiría realizar una disminución experimental de los niveles de las mitades endógenas de tRNAs.

En línea con lo anterior, ahora nos entusiasmó la posibilidad de encontrar un mecanismo que nos permitiera aumentar la concentración de mitades 5' tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} endógenas. En este sentido, varios reportes demuestran que la inducción de estrés (estrés oxidativo, nutricional o fisiológico), provoca un aumento en la biosíntesis de mitades de tRNA (Ivanov et al., 2011; Thompson et al., 2008; Thompson and Parker, 2009). Por lo tanto, nos propusimos inducir estrés oxidativo a células MCF-7 y estudiar qué sucedía con los niveles intra y extracelulares de mitades 5' de tRNA^{Gly} y mitades 5' de tRNA^{Glu}. Para ello tratamos células MCF-7 con Arsenito de sodio (NaAs) a 70 μM durante 48hrs. Para la inducción del estrés, en lugar de realizar un pulso corto con una alta concentración de NaAs, tal como está reportado en varios trabajos (Emara et al 2010, Ivanov et al 2011), consideramos que era más adecuado tratar a las células una concentración de NaAs baja, la cual no fuera tóxica para la célula, durante un intervalo de tiempo considerado (en este caso 48hrs), y medir los niveles intra y extracelulares de mitades 5' de tRNAs en dicho intervalo. De esta forma lograríamos cuantificar los niveles de mitades 5' de tRNAs inducidos por el NaAs, descartando cualquier posible efecto de la recuperación por parte de la célula frente a la detención del pulso de estrés.

Se observó de forma cualitativa que el tratamiento de las células con NaAs 70 μM durante 48hrs no resultó tóxico para las células. Si bien el número de células despegadas aumentó con respecto a las células no tratadas con NaAs, este número no superó el 5%.

Dado lo anterior, se midió por *SL-RT-qPCR* los niveles de mitades 5' de tRNAs dentro y fuera de la célula. Tal como se puede observar en la figura 30a, al tratar células con NaAs a lo largo del tiempo, se vió un aumento en el valor 40 – Cq de mitades 5' de tRNA^{Gly} con respecto a los niveles en células no tratadas, pero no así en el valor 40 – Cq de mir-21-5p. Esto fue importante ya que significó que la inducción de estrés tenía un efecto en los niveles de mitades 5' tRNA^{Gly}

y no sobre mir-21-5p. Este resultado, nos permitió utilizar miR-21-5p como referencia para normalizar los valores de Cq de las mitades de tRNA y construir, de esta forma el gráfico representado en la figura 29b. Como se vio a través de diferentes ensayos a lo largo de esta tesis (Figura 11, 14, 27b, 28c, 29b), el ΔCq ($Cq \text{ miR-21-5p} - Cq \text{ tRNA}^{\text{Gly}}$) de células sin tratar es un valor negativo. Pero al tratar con NaAs, este ΔCq se torna menos negativo a lo largo del tiempo. Podemos decir entonces, que frente al tratamiento con NaAs, los niveles intracelulares de las mitades 5' tRNA^{Gly} aumentan. Pero este aumento es paulatino en el tiempo. De hecho, a las 12 horas del tratamiento con NaAs no hay una diferencia significativa en el ΔCq de células tratadas y sin tratar. Pero ya a partir de las 24hrs se observa una diferencia en el ΔCq que responde a un aumento en los niveles de mitades de tRNA^{Gly}. De forma similar, en el espacio extracelular (Figura 29c y 29d), los niveles de mitades 5' de tRNA^{Gly} y mitades 5' de tRNA^{Glu} aumentan en las células tratadas con NaAs a lo largo del tiempo en comparación con células no tratadas. En particular este aumento se hace mayor a las 48hrs.

De esta forma logramos encontrar otro mecanismo mediante el cual logramos aumentar las mitades endógenas de tRNAs, dentro y fuera de la célula.

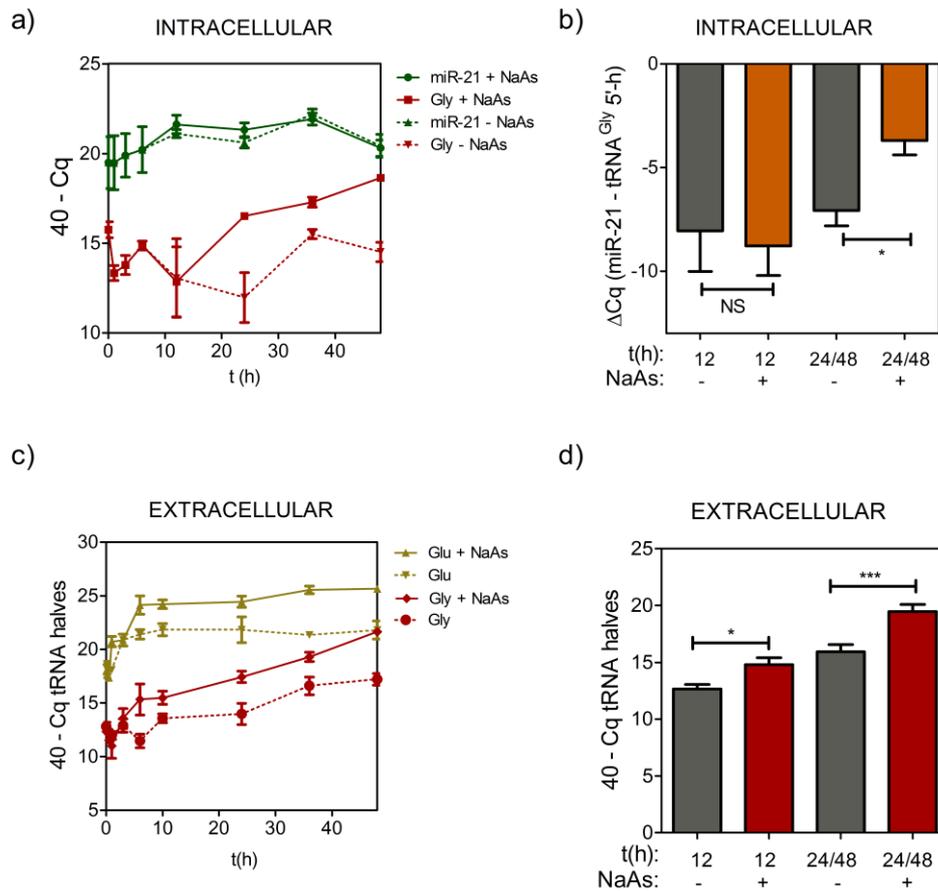


Figura 30: Los niveles intra y extracelulares de mitades 5' de tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} aumentan con el tiempo frente al tratamiento con arsenito de sodio. En a) se representa los niveles intracelulares de mitades 5' de tRNA^{Gly} y miR-21 5p al tratar células (línea continua) y sin tratar (línea punteada) con NaAs 70 μ M durante 48hrs. En b) se muestran los niveles intracelulares de mitades 5' de tRNA^{Gly} normalizados frente a miR-21 5p, los cuales viene representados como el ΔCq . A partir de las 24hrs, los niveles de las mitades 5' de tRNA^{Gly} aumentan lo cual se refleja en un aumento del ΔCq .

DISCUSIÓN

La secreción y transferencia de ARN entre células a través de vesículas extracelulares (EVs) ha sido demostrada en un amplio espectro de sistemas *in vitro* e *in vivo* (Garcia-Silva et al., 2014; Buck et al., 2014; Cai et al., 2018). Dado su capacidad de transferir información genética, su idoneidad como biomarcadores de diferentes enfermedades y su potencial uso como agentes terapéuticos, estos ARNs presentes en EVs (EV –RNA) han despertado el interés a nivel de ciencias básicas, medicina e incluso a nivel de la industria (Roy et al., 2018). Sin embargo, el campo de estudio de EVs enfrenta grandes desafíos técnicos y experimentales (Maetescu et al. 2017) como la existencia de una gran variedad de protocolos para la obtención y purificación de EVs, la naturaleza heterogénea de las supuestas diferentes poblaciones de vesículas, su tamaño pequeño o la poca cantidad de ARN que se puede obtener a partir de las mismas. Todo esto resultó en una gran discrepancia y falta de reproducibilidad en los resultados obtenidos a partir de los diferentes laboratorios, lo cual ha dificultado la racionalización del contenido y rol del ARN presente en EVs y su efecto en células diana. Por este motivo grandes esfuerzos se han puesto en tratar de conciliar técnicas y protocolos a fin de lograr procedimientos estandarizados que aumentaran la reproducibilidad y facilitarían la interpretación de los resultados. En este sentido, a principios del año pasado se desarrolla EV-TRACK, una base de datos con el objetivo de estandarizar protocolos y procedimientos involucrados en el campo de las vesículas extracelulares (Van Deun et al., 2017a; Van Deun et al., 2017b)

Más aún, a pesar de los grandes esfuerzos se tiene un limitado conocimiento sobre cuáles son los mecanismos que promueven y regulan la incorporación del ARN dentro de EVs y sobre cómo el ARN presente en estas EVs puede afectar células dianas capaces de internalizar estas EVs. Con el objetivo de aportar conocimiento sobre cómo es el mecanismo de secreción de ARNs pequeños, de forma reciente en nuestro laboratorio estudiamos el contenido de ARNs pequeños a nivel intracelular y en diferentes fracciones extracelulares de dos líneas celulares mediante secuenciado profundo (Tosar et al., 2015). A partir de este trabajo en un principio encontramos que las diferentes familias de ARNs pequeños tenían diferentes patrones y mecanismos de secreción. Por un lado, se observó que la abundancia relativa de los miRNAs correlacionaba fuertemente entre el medio intracelular y todas las fracciones extracelulares, proponiendo, por tanto, que los mismos eran secretados bajo un mecanismo no selectivo. Esto iba en contra con lo sostenido por una gran variedad de trabajos (Guduric-Fuchs et al., 2012; Ouyang et al., 2014; Pigati et al., 2010; Turchinovich et al., 2011). Más tarde se evidenció que muchos de estos trabajos proponían lo contrario debido a la observación de un gran enriquecimiento extracelular de miRNAs que, en realidad, provenían del suero fetal bovino adicionado a las células (Tosar et al. 2017). Por otro lado, se vio que otros ARNs pequeños como las mitades 5' de tRNA se encontraban enriquecidas a nivel extracelular. Esto último podría explicarse ya sea por un fenómeno de secreción o de estabilidad diferencial de estas moléculas en el medio extracelular. Estudios posteriores *in silico* de la secuencia de estas mitades proponían que las mismas tenían la capacidad de dimerizar, y más tarde demostramos *in vitro* la formación de dímeros de mitades 5' de tRNA^{Gly} y de mitades 5' de tRNA^{Glu}. Esta capacidad de dimerizar repercutía en una mayor estabilidad y resistencia frente a la

degradación mediada por nucleasas agregadas *in vitro*. Nos complace comentar que este estudio, importante y a la vez complementario a esta tesis, ha sido recientemente publicado en la revista *Nucleic Acids Research* (Tosar y Gámbaro et al. 2018). De modo análogo, un trabajo reciente muestra que las mitades 5' de tRNA^{Ala} y tRNA^{Cys} pueden formar un complejo tetramolecular de gran estabilidad térmica y resistente frente a la adición de agentes desnaturalizantes. En lugar de lo observado para los homodímeros de mitades de tRNA^{Gly} por nosotros, estos tetrámeros se forman mediante una estructura conocida como G – cuádruplex, gracias a que estas moléculas poseen en su extremo un *track* de cinco residuos de guanina (Lyons et al., 2017b). En su conjunto, esta evidencia propone a la formación de estructuras tridimensionales que estabilicen y eviten la degradación de los ARNs como nuevos mecanismos capaces de conferir estabilidad a las moléculas de ARN, más allá de su ampliamente aceptada unión a proteínas o protección a través de vesículas. Todo esto nos hizo pensar que el enriquecimiento de mitades de tRNA observado a nivel extracelular se debía probablemente a un fenómeno de estabilidad diferencial. Es decir, podría haber la posibilidad de que la secreción de las mitades 5' de tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} respondan a un mecanismo no selectivo pero que, debido a su estabilidad, las mismas se acumulen en el espacio extracelular, lo cual resulta en un enriquecimiento de las mismas. Es verdad que el secuenciado de tRNAs es muy desafiante a nivel técnico debido a la presencia de modificaciones post transcripcionales, lo cual podría evitar su retrotranscripción (Zheng et al., 2015). Sin embargo, la posibilidad de que el enriquecimiento a nivel extracelular observado se deba a que las mitades 5' derivadas de tRNA^{Glu}_{CUC} y tRNA^{Gly}_{GCC} sean los únicos fragmentos secuenciables queda descartada por el hecho que a nivel intracelular muchas otras mitades derivadas de diferentes tRNAs fueron detectadas (Tosar et al. 2015).

Dado que nuestra hipótesis de secreción no selectiva de pequeños ARNs se basaba en un estudio completamente observacional, nos propusimos intentar demostrar, ahora de forma mecánica, que los ARNs pequeños podrían ser secretados de forma no selectiva por las células. Para lograr esto nos propusimos poner a punto un sistema basado en el uso de oligonucleótidos sintéticos marcados con biotina, que nos permitiera estudiar los mecanismos de secreción y eventual captación de ARN extracelulares por células diana. Para ello, necesitábamos de una molécula, un ARN pequeño, que fuera estable *per se* dentro de la célula, que pudiera ser secretado al espacio extracelular y fuera estable también a nivel extracelular. En este sentido las mitades 5' tRNA^{Gly} surgieron como las principales candidatas. Además de que nos interesaba mucho estudiar, de por sí, la capacidad de estas mitades de tRNA para ser transferidas entre células, dado que ya sabíamos eran una de las moléculas de ARNs pequeños más abundantes en exosomas y microvesículas derivados de células MCF-7 (Tosar et al. 2015).

Mediante microscopía confocal de fluorescencia y *SL-RT-qPCR* fuimos capaces de demostrar que la transfección de mitades 5' de tRNA^{Gly} (o del mutante 9GG/AA, también capaz de dimerizar) resulta más estable que la transfección de secuencias control 5' tRNA^{Gly} 25U/C y SCR (Figuras 12, 13a, 13b y 14). Más aún, a lo largo del tiempo las mitades 5' tRNA^{Gly} Wt transfectadas se acumulan en forma de gránulos en el citoplasma de las células (Figura 12 y 15) los cuales, en conjunto con ARNm y posiblemente otras especies de ARN y proteínas de unión al ARN (RBPs), podrían estar formando complejos de ARN más complejos (Figura 17). No obstante, estos últimos resultados deben interpretarse con cautela por dos motivos. En primer

lugar, si bien las imágenes muestran para un [x, y z] dado, una superposición de las señales que corresponde a las mitades biotiniladas de tRNAs y los gránulos de polyA, no se puede hablar de colocalización y aún menos de interacción, ya que la resolución en el eje z del microscopio Confocal (Confocal Zeiss) utilizado es de 500nm. Por lo que si dos moléculas se encuentran en el mismo punto del eje z o a 500nm de distancia no lo podríamos distinguir. Para poder utilizar el término colocalización con propiedad deberíamos a ver recurrido a análisis de colocalización que están disponibles en software como Fiji-ImageJ y otros estudios más finos. Y en segundo lugar, estos ensayos se tratan de ensayos de sobre-expresión. Por lo que la presencia de estos agregados de ARN pueden ser artefactuales, producto de alterar el desbalance ARN/RBP dentro de la célula debido a la transfección (Polymenidou, 2018).

De todas formas, la implicancia de mitades de tRNAs en la formación de gránulos de ARN resulta muy interesante y no sorprende ya que hay varios reportes mostrando que fragmentos derivados de tRNA pueden asociarse o interaccionar con ARNm inhibiendo su traducción (Deng et al., 2015; Kim et al., 2017), compitiendo con los mismos por su unión a los ribosomas para regular así la traducción (Gebetsberger et al., 2017) o afectando la estructura y estabilidad de los ARNm (Schimmel, 2018). Asimismo, se ha demostrado la unión de mitades de tRNA a la proteína YBX-1 (Lyons et al., 2016; Lyons et al., 2017b; Shurtleff et al., 2016; Shurtleff et al., 2017), una proteína de unión al ARN la cual ha sido reportada como capaz de regular los niveles globales de síntesis proteica (Kwon et al., 2018). Y nótese que YBX-1 es una proteína capaz de agregar, y un miembro frecuente de los gránulos de estrés (Lyons et al 2016, Lyons et al 2017). En línea con esto mismo, existen artículos recientes, en donde se demostró la capacidad de ARN de autoensamblarse de forma *in vitro* para dar lugar a estructuras de ARN más complejas (Van Treeck et al., 2018). Estas estructuras parecen colaborar con la retención y reclutamiento de diversas RBP dando lugar a la formación de gránulos de ARN (Banani et al., 2017; Polymenidou, 2018). En este sentido, hay evidencia para pensar que no solo la interacción ARN –proteína es responsable de la formación de gránulos citoplasmáticos. Ahora, la interacción ARN – ARN y la capacidad del ARN de autoensablarse se propone como otro mecanismo de ensamblaje y formación de cuerpos ribonucleoproteicos. Reconocemos que hubiera sido deseable incluir el estudio de las mitades endógenas de tRNA^{Gly} por FISH, a efectos de conocer su distribución intracelular en situaciones de no-sobreexpresión.

Por otra parte, la transfección con las mitades 5' tRNA^{Gly} no indujo la formación de SG. Este resultado fue contrario a lo reportado en otro trabajo (Emara et al., 2010). En este trabajo se reporta que la transfección de mitades 5' tRNA^{Cys} y mitades 5' tRNA^{Ala} induce la formación de SG. Más allá de que las condiciones experimentales fueron diferentes (línea celular y concentración de ARN transfectados diferentes), luego estos mismos autores explican en trabajos posteriores que la formación de SG a través de mitades 5' tRNA^{Cys} y tRNA^{Ala} ocurre mediante un mecanismo dependiente de la unión a la proteína YBX1. Como ya se comentó, estas dos mitades de tRNA tienen en su extremo 5' un *track* de 5 guaninas. Mutaciones o la delección de este *track* evita su unión a YBX1 y la capacidad de los mismos de inhibir la síntesis proteica global y disparar la formación de SG (Lyons et al., 2016). Dado que las mitades de mitades 5' tRNA^{Gly} carecen de un *track* de 5 guaninas en su extremo 5', esto podría explicar las diferencias encontradas.

Luego, conociendo la estabilidad intracelular de estos ARNs, diseñamos un sistema para transfectar células con mitades de tRNA marcadas, a los efectos de estudiar su secreción y eventual captación por células diana. Una gran ventaja de este protocolo es que la marcación se encuentra en los ARNs en estudio. En la mayoría de los estudios de captación de EVs, las EVs una vez que son purificadas son marcadas con colorantes lipofílicos tal como PKH67 o Cell Mask, entre otros (Krause et al., 2018; Wiklander et al., 2015; Xiao et al., 2014). En relación a esto, un trabajo reciente demuestra que a través de este tipo de ensayo es casi imposible distinguir entre captación de EVs marcadas con este tipo de colorantes por células receptoras o situaciones artefactuales en donde, por ejemplo proteínas y lipoproteínas libres presentes en la muestra, sean también marcadas y contribuyan así con la transferencia de la fluorescencia (Takov et al., 2017). Por lo tanto, el uso de colorantes lipofílicos para la marcación de EVs no resulta tan adecuado si se quiere realizar ensayos de captación. En cambio, nosotros, al tener marcados los ARNs previo a su empaquetamiento en EVs, no tenemos este tipo de inconveniente por lo que nuestro sistema resulta más adecuado para el estudio de transferencia de EVs. Más importante aún, este sistema nos permite modular la concentración de ARNs marcados que se introducirán en las EVs, mediante la sencilla manipulación de sus niveles intracelulares (una ventaja operativa luego de haber demostrado la secreción no selectiva de los mismos).

Con este sistema demostramos que las mitades 5' tRNA^{Gly} eran secretadas por las células MCF-7 a través de vesículas extracelulares (Figura 20 y 21) y que estas podían ser captadas e internalizadas por células MCF-7 receptoras. Pero se observó también que este fenómeno no era algo específico de las mitades 5' tRNA^{Gly}. De hecho se vio que la transferencia de pequeños oligonucleótidos desnudos a través de EV entre células MCF-7 podría ocurrir independientemente de la secuencia o estructura del mismo (Figura 25 y 26). Asimismo, un aumento en los niveles intracelulares de las mitades 5' tRNA^{Gly} provocó un aumento en su abundancia en EVs y en los niveles intracelulares de células receptoras que internalizan estas EVs. Esto significó que cuanto mayor sea la abundancia intracelular de un ARN pequeño, mayor será su abundancia a nivel de EVs y por consiguiente, su transferencia a células EV – receptoras será también mayor.

De esta forma, a través de estos resultados pudimos demostrar de forma mecanística que la secreción de ARNs pequeños a través de vesículas responde a un proceso no selectivo.

No obstante, si bien esto valida de forma mecanística lo anteriormente visto por nuestro grupo de trabajo (Tosar et al 2015), un trabajo muy reciente demuestran de forma *in vivo*, cómo la planta *Arabidopsis* frente a la infección con el patógeno *Botrytis cinérea* secreta EVs conteniendo ARNs pequeños específicos (Cai et al., 2018). Estos, luego son captados e internalizados por el hongo *B. cinérea* lo cual induce un silenciamiento de genes cruciales para la patogenicidad del mismo. En este trabajo también queda claro que, dentro de los pequeños ARNs igualmente abundantes dentro de la planta, no todos son empaquetados y transferidos a la célula del hongo, por lo que parecería tratarse de un proceso selectivo. Sin embargo al final del trabajo muestran que mediante la expresión en la planta de dos transgenes diferentes, los mismos son también transferidos a las células del hongo mediante EVs. Esto último nos hace pensar que es posible exista la secreción y transferencia de determinados ARNs pequeños, que como en este caso, hayan sido favorecidos por mecanismos de selección positiva. Es decir, en

casos como estos donde existe una co-evolución, hospedero – patógeno, la evolución haya favorecido la transferencia de determinados ARNs pequeños de la planta, los cuales le confiera a esta misma, cierta ventaja a la infección con *B. cinérea*. Sin embargo, esto no pareciera ser la regla general. Es decir, sin lugar a duda, en estas situaciones de co –evolución hospedero – patógeno exista la secreción selectiva de determinados ARNs pequeños, pero esto no excluye la posibilidad de secreción no selectiva para el resto de las moléculas presentes en el interior celular. Efectivamente, el hecho de que la planta pueda empaquetar y secretar mediante EVs un determinado transgen, el cual es algo totalmente artificial para la misma, por lo que la existencia de mecanismos que promuevan su secreción específica es altamente improbable, así lo demuestra. Este último ensayo es análogo al realizado por nosotros en nuestro modelo celular MCF-7. Al incubar células receptoras con EVs provenientes de células MCF-7 donadoras transfectadas con el oligo 16mer (oligonucleótido de ADN se secuencia y tamaño arbitrario), somos capaces de detectarlo en las primeras (Figura 25).

En definitiva, si bien nosotros proponemos un mecanismo de secreción no selectiva en donde una célula secreta y por consiguiente transfiere, sobre todo aquellos ARNs que más expresa, esto no excluye la posibilidad de que hayan ciertos ARNs selectivamente secretados. De todas formas, el modelo de secreción (selectivo vs no selectivo) no es relevante a la hora de pensar un rol de los ARNs secretados en la comunicación intercelular. La única diferencia es que, mientras que los modelos de secreción selectivos ponen el énfasis en ARNs de baja concentración intracelular como mediadores de comunicación intercelular (pues son los que suelen presentar mayor “enriquecimiento” extracelular, aunque muchas veces por simple azar), nuestro modelo no selectivo apunta a los ARNs de mayor concentración en el citoplasma. En otras palabras: la célula transfiere más aquello que más tiene.

Con lo que respecta al tema de la transferencia de estos ARNs, la situación es más compleja. Es verdad que, al incubar células con EV cargadas con ARNs biotinilados, observamos su captación y por ende pudimos detectar mediante microscopía confocal y *SL-RT-qPCR* la presencia de estos ARN en células receptoras. Si bien este sistema nos valió para estudiar *in vitro* el mecanismo de secreción de ARNs pequeños, lo cual no es menor, la funcionalidad de esta transferencia es cuestionable. Para estos ensayos de captación, utilizamos una relación célula donadora: célula receptora 8:1, lo cual es baja con lo que respecta a la bibliografía reportada. No obstante a través de este sistema probablemente no estemos reflejando el contexto fisiológico en el cual ocurre realmente la liberación y secreción de estas EVs. Por consiguiente, es válido resaltar que si bien este sistema nos permitió estudiar a nivel mecanístico qué sucedían con la secreción de ARNs pequeños, no podemos ni concluir que exista una transferencia funcional de mitades 5' de tRNAs pero tampoco descartarla. Para determinar la transferencia funcional de mitades 5' de tRNAs se debería recurrir a modelos *in vivo* que reflejen de forma más cercana el contexto biológico. De forma reciente, se han desarrollado nuevas aproximaciones experimentales para determinar de forma más directa si la transferencia de EV ocurre de forma *in vivo*. Uno de estas aproximaciones experimentales es el sistema Cre –loxP (Zomer et al., 2016) que está comenzando a ser utilizado por varios autores.

No obstante, sabemos que EVs derivadas de células MCF-7 poseen elevados niveles de mitades de tRNA y además, nuestros resultados también parecen sugerir la transferencia de mitades de

tRNA^{Gly} endógenas entre células MCF-7 (Figura 28) las cuales, por su capacidad de dimerizar y ser estables, es de esperar que estas mitades no sean rápidamente degradadas una vez que las EVs sean internalizadas por células diana. También fuimos capaces de medir un aumento en los niveles extracelulares de las mitades de tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} frente a la exposición de células MCF-7 con el agente oxidante arsenito de sodio. Dado que nuestros resultados apuntan a que estas mitades pueden ser transferidas por EVs entre células MCF-7, es extremadamente atractiva la hipótesis de que las mismas puedan officiar como “mensajeros de estrés” entre células. En otras palabras, si las células están liberando EVs conteniendo un muestreo de sus propios ARNs pero también captando continuamente EVs de sus células vecinas, puede que, en algún momento (bajo una situación de estrés, por ejemplo), reciban una concentración anormalmente alta de mitades 5' de tRNA^{Gly}. Y eso tal vez, pueda ser interpretado como una señal de alarma. En este sentido nuestros resultados podrían abrir la puerta a una vía de señalización autócrina o parácrina mediada por mitades de tRNA transferibles por EVs. Este modelo de señalización entre células vecinas de un mismo tipo celular adquiere relevancia si pensamos que sucede a nivel de un tumor. Allí, tenemos una masa de células, las cuales están liberando y captando EVs y, dado que no opera el factor de dilución que ocurre cuando las EVs son liberadas a la circulación sanguínea, la concentración de EVs podría tornarse muy alta en dicho microambiente. Por consiguiente, esto nos permitiría plantearnos a la transferencia de mitades de tRNA mediada por EVs, como un mecanismo mediante el cual las células dentro de un mismo entorno (ejemplo, un tumor) se comunican entre sí. Claro que para esto necesitamos entender qué hacen las mitades de tRNA^{Gly} una vez dentro de las células. En línea con esto, de forma reciente se ha demostrado que estas mismas mitades de tRNA^{Gly} pueden regular la expresión génica de un conjunto de 50 genes claves para el desarrollo al ser transferidas de vesículas seminales a óvulos durante la fecundación en ratón (Sharma et al. 2016). Este trabajo por lo tanto apoya el rol de mitades de tRNA^{Gly} en la comunicación intercelular.

Con las evidencias obtenidas en la presente tesis, más resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo podemos aportar con nuevo conocimiento sobre la biología de mitades 5' de tRNA^{Gly}. Las mitades 5' de tRNA^{Gly} son sintetizadas a partir del corte de tRNA maduros por parte de la Angiogenina (Thompson et al., 2008; Yamasaki et al., 2009). Este clivaje se maximiza en situaciones de estrés, cuando la Angiogenina se libera de su inhibidor o se transloca desde el núcleo (Lyons et al., 2017a; Yamasaki et al., 2009), provocando un aumento en los niveles intracelulares de mitades 5' de tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu}, tal como lo pudimos demostrar. Una vez ocurrido el clivaje de los tRNAs, las mitades 5' derivadas de tRNA^{Gly}_{GCC} y tRNA^{Glu}_{CUC} forman homo y heterodímeros (Tosar y Gámbaro et al., 2018), lo cual evita su degradación y provoca, con el tiempo, un aumento en su concentración intracelular. Debido a que la secreción de ARNs pequeños a través de vesículas responde a un proceso no selectivo, esto se refleja en un mayor empaquetamiento y secreción de estas mitades en EVs, lo cual resulta en un enriquecimiento a nivel extracelular de mitades 5' de tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu}. Y una vez en el espacio extracelular, estas pueden ser transferidas entre células capaces de captar estas EVs.

Por tanto, los niveles globales de mitades 5' de tRNA^{Gly} a nivel intracelular, estarán determinados por fenómenos de síntesis, secreción y también captación.

CONCLUSIONES

Logramos construir un sistema que nos permitiera estudiar el mecanismo de secreción de ARNs pequeños por parte de células MCF-7. Este sistema se basó en la transfección de oligonucleótidos marcados con biotina en células MCF-7, la secreción y posterior aislamiento de estos oligonucleótidos a través de vesículas extracelulares y posterior incubación en células MCF-7, las cuales fueron capaces de captar e internalizar estas vesículas. Fue fundamental para poder realizar estos estudios el haber trabajado con secuencias de ARN intrínsecamente estables (por su capacidad de formar homodímeros) tales como las mitades 5' de tRNA^{Gly}. La gran estabilidad de estos ARNs se demostró en un trabajo realizado en paralelo (Tosar y Gámbaro et al. 2018). Al minimizarse los efectos de la degradación, nuestro sistema permitió abordar la relación entre concentración intracelular y secreción. Con este sistema se demostró que los ARNs pequeños son secretados de forma no selectiva a través de EVs. Esto no excluye que determinados ARN pequeños puedan ser secretado de forma selectiva. Sino que demostramos que en un principio cualquier ARN pequeño lo suficientemente abundante dentro de la célula podrá ser incorporado en EVs y transferido a cualquier célula que sea capaz de internalizar estas vesículas.

Más aún, se puso a punto diversas herramientas mediante las cuales se logró modular los niveles intra y extracelulares de las mitades 5' tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu}. Estos mecanismos implicaron técnicas de ARN interferentes, sobre-expresión mediante transfección e inducción de estrés celular. Esto no solo fue relevante para el desarrollo de esta Tesis, sino que ahora se tiene una importante herramienta para futuros estudios tal como se plantea en las perspectivas.

De forma más específica, pudimos contribuir al conocimiento sobre la biología de las mitades 5' tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu}. Validamos que la síntesis de estas mitades de tRNA está mediada por la Angiogenina, la cual corta los tRNAs maduros a nivel del anticodón. Demostramos también que la capacidad de estas mitades de tRNA de auto ensamblarse en forma de dímeros se corresponde con su mayor estabilidad intracelular. Esto determina su abundancia dentro de la célula lo cual luego se refleja en su abundancia extracelular. Más aún, fuimos capaces de demostrar que frente a la inducción de estrés oxidativo, los niveles intracelulares y extracelulares de las mitades 5' tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} aumentan.

Aunque esta tesis no ahondó lo suficiente como para afirmarlo, dado que estas mitades se transfieren en EVs capaces de ser internalizadas por otras células, es posible que las mismas puedan actuar como mensajes que permitan transmitir situaciones de estrés entre células presentes en un mismo ambiente, siendo esto particularmente atractivo si se diera en el microambiente tumoral, donde las situaciones de estrés oxidativo, hipóxico y nutricional son frecuentes.

PERSPECTIVAS

Los resultados de esta Tesis funcionan como gatillo para nuevas interrogantes. A continuación se plantean algunas de estas preguntas, que dan lugar a perspectivas para este trabajo:

1. ¿Cuál es el efecto de las EVs sobre las células EV – receptoras?

Para determinar el efecto y la función de estas vesículas en células MCF-7 receptoras podríamos recurrir a análisis de expresión génica, como *microarrays* o *RNA-seq* por ejemplo, posterior a la incubación con EVs. Y de esta forma evaluar que genes podrían estar diferencialmente expresados frente al tratamiento con EVs. Más interesante aún, sería evaluar esto mismo pero con EVs provenientes de células bajo estrés oxidativo. Vimos que frente al estrés oxidativo, los niveles dentro y fuera de la célula de mitades 5' de tRNAs son mayores. De repente, este aumento de mitades 5' de tRNA^{Gly} en EVs dispare algún mecanismo de señalización en la célula receptora que sea interpretado como una señal de alerta. Para validar que los efectos provocados por EVs derivados de células en estrés se deben efectivamente a las mitades de tRNA^{Gly}, se podrían realizar ensayos en paralelo con EVs obtenidas a partir de células transfectadas con cantidades crecientes de mitades sintéticas de este tRNA, pues ya sabemos que dichas EVs quedarán cargadas con concentraciones crecientes de las mismas.

Esto nos permitiría postular, a las mitades de tRNA como el mensaje responsable de propagar un estado de alerta frente a la inducción de estrés.

2. Dentro de una misma población de células, por ejemplo, un tumor, ¿son todas las células capaces de internalizar EVs?

Nuestros estudios de captación de EVs fueron realizados utilizando la línea tumoral MCF-7. A nivel de cultivo se puede observar claras diferencias a nivel fenotípico entre las células, lo cual no llama la atención dado que se trata de una línea tumoral de fuerte inestabilidad cromosómica. Frente a esto, nos preguntamos si todas las células de la población son capaces de internalizar EVs o tal vez, solo aquellas que presenten determinados receptores en la superficie celular. Cuando realizamos los ensayos de transferencia de las mitades biotiniladas 5' de tRNA^{Gly}, observamos por microscopía confocal de fluorescencia que no todas las células fueron capaces de internalizar EVs. De hecho, alrededor de un 20% de las células resultaron APC positivas, lo cual significó que un 20% de las células fueron capaces de internalizar EVs conteniendo las mitades biotiniladas 5' de tRNA^{Gly} (Figura 25). Por lo tanto, nos preguntamos qué sucedería si incrementamos los niveles de mitades biotiniladas 5' de tRNA^{Gly} en EVs. ¿Aumentará la cantidad de células APC positivas? ¿O acaso aumentará la intensidad de fluorescencia del APC en células marcadas, pero no el porcentaje de células APC positivas? De ser lo primero cierto, significaría que todas las células son capaces de internalizar EVs y que el resultado obtenido se debe a la concentración de EV y ARN utilizados. De forma contraria, si el porcentaje de células APC positivas se mantiene (en torno al 20%), pero aumenta la intensidad de fluorescencia de estas células, esto nos hablaría que efectivamente, dentro de un cultivo de células, no todas son capaces de internalizar EVs.

3. ¿Las EVs provenientes de células MCF-7 pueden ser captados por células derivadas de otras líneas celulares?

Sería muy interesante poder responder si las EVs provenientes de células MCF-7 pueden ser captadas por otras líneas celulares como MCF10A, una línea celular derivada de tejido mamario no tumoral. Para ello, volveríamos a realizar los ensayos de captación de EVs solo que ahora, en lugar de utilizar células MCF-7 como célulasceptoras, utilizaríamos células MCF10A. De demostrar la transferencia *in vitro* de EVs entre líneas celulares tumoral y no tumoral, esto nos permitiría plantearnos ensayos *in vivo* a modo de poder estudiar la comunicación intercelular mediada por EVs, no solo dentro del propio tumor, sino que también entre tejido tumoral y no tumoral. Ya hay estudios *in vitro* que proponen a las EVs como un mecanismo mediante el cual la célula tumoral logra modular el microambiente tumoral a su favor (Hoshino et al., 2015; Xu et al., 2018; Yu et al., 2015), por lo que la proyección hacia este tipo de estudios es clara.

4. La transferencia de EVs entre células derivadas de tejido mamario tumoral, (tal como se vio para MCF-7), ¿es fisiológicamente relevante?

Esta es una de las grandes preguntas y perspectivas que se desprenden de esta tesis. A nivel *in vitro* fuimos capaces de demostrar la transferencia de mitades de tRNA entre células MCF-7 a través de EVs. Pero esto no significa que esto ocurra también a nivel fisiológico. De hecho, la relevancia fisiológica de la transferencia mediante EVs es una de las mayores dudas que afectan al campo de las vesículas extracelulares. Pues, si bien a nivel *in vitro* hay muchos estudios que demuestran la transferencia mediada por EVs, a nivel *in vivo* solamente unos pocos. Esto último nos motiva aún más a llevar estos estudios a nivel *in vivo* lo cual también requiere técnicas y los diseños experimentales más exigentes

5. Frente al silenciamiento de la Angiogenina, ¿los niveles extracelulares de mitades 5' de tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} se ven también afectados?

El silenciamiento de la Angiogenina, la enzima responsable de la síntesis de mitades de tRNAs, produjo una disminución en los niveles intracelulares de las mitades 5' de tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} (Figura 29). En este contexto, nos preguntamos qué sucede con los niveles extracelulares. En un principio uno esperaría que, al disminuir los niveles intracelulares de mitades de tRNAs, disminuyan los niveles extracelulares. Es decir si la célula tiene menos, debería secretar menos. En el marco de nuestros resultados, pensamos que este comportamiento lo observaríamos a nivel de la fracción vesicular, es decir a nivel de las vesículas extracelulares, en donde observamos que la secreción respondía a un mecanismo no selectivo. Sin embargo, lo que cabría esperar con los niveles de mitades 5' de tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} a nivel de la fracción no vesicular es más complejo. Hay fuertes evidencias para pensar que la generación de mitades 5' de tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} a nivel de la fracción no vesicular, ocurra a nivel extracelular. En este sentido, es reconocido que la Angiogenina es secretada por las células al espacio extracelular (Bárcena et al., 2015; He et al., 2015). Incluso se han encontrado en el suero de pacientes con cáncer de páncreas altos niveles de Angiogenina por lo cual se plantea su uso como biomarcador para esta enfermedad (Wang et al., 2018). Por otra parte, la presencia de moléculas enteras de tRNAs también ha sido reportada (Yuan et al., 2016). En particular en nuestro laboratorio se demostró mediante el secuenciado profundo de la fracción no vesicular

proveniente del medio condicionado de células MCF-7, la presencia de moléculas enteras de tRNAs. Por consiguiente la posibilidad de que la síntesis de mitades de tRNAs ocurriera también a nivel extracelular remane como una interesante y atractiva posibilidad. Por consiguiente, encontramos muy pertinente poder responder si efectivamente las mitades 5' de tRNA^{Gly} y tRNA^{Glu} intracelulares son secretadas mediante EVs, y aquellas que observamos a nivel de la fracción no vesicular son generadas a partir de los tRNA maduros y de la Angiogenina que son secretados al espacio extracelular. No obstante, para lograr esto, el diseño experimental no es menor. Frente al silenciamiento de la Angiogenina, la expresión de la misma debería disminuir a nivel intracelular pero también a nivel extracelular. Por consiguiente, si al silenciar la Angiogenina se observa disminución de los niveles extracelulares de mitades de tRNA, no podríamos determinar si esta disminución es consecuencia de una disminución en los niveles intracelulares y por ende una menor secreción de mitades de tRNA. O alternativamente, consecuencia de una disminución en la expresión de la Angiogenina extracelular. Por lo tanto, además de estudiar esto bajo un modelo de silenciamiento de Angiogenina, podríamos valernos del uso de inhibidores de ARNsas (inhibidores naturales de la Angiogenina) u otros métodos para modular su actividad extracelular a nuestro favor.

BIBLIOGRAFIA

- Atai, N.A., Balaj, L., van Veen, H., Breakefield, X.O., Jarzyna, P.A., Van Noorden, C.J., Skog, J., and Maguire, C.A. (2013). Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells. *Journal of neuro-oncology* *115*, 343-351.
- Baglio, S.R., Rooijers, K., Koppers-Lalic, D., Verweij, F.J., Lanzón, M.P., Zini, N., Naaijken, B., Perut, F., Niessen, H.W., and Baldini, N. (2015). Human bone marrow and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem cell research & therapy* *6*, 127.
- Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., and Rosen, M.K. (2017). Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nature reviews Molecular cell biology* *18*, 285.
- Bárcena, C., Stefanovic, M., Tutusaus, A., Martinez-Nieto, G.A., Martinez, L., García-Ruiz, C., De Mingo, A., Caballeria, J., Fernandez-Checa, J.C., and Marí, M. (2015). Angiogenin secretion from hepatoma cells activates hepatic stellate cells to amplify a self-sustained cycle promoting liver cancer. *Scientific reports* *5*, 7916.
- Barrès, C., Blanc, L., Bette-Bobillo, P., André, S., Mamoun, R., Gabius, H.-J., and Vidal, M. (2010). Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood* *115*, 696-705.
- Bellingham, S.A., Guo, B., Coleman, B., and Hill, A.F. (2012). Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Frontiers in physiology* *3*, 124.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363.
- Blanco, S., Dietmann, S., Flores, J.V., Hussain, S., Kutter, C., Humphreys, P., Lukk, M., Lombard, P., Treps, L., and Popis, M. (2014). Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neuro-developmental disorders. *The EMBO journal* *33*, 2020-2039.
- Buck, A.H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H.J., Quintana, J.F., Le Bihan, T., Kumar, S., Abreu-Goodger, C., Lear, M., and Harcus, Y. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature communications* *5*, 5488.
- Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.L., Tomaru, Y., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., and Daub, C.O. (2011). Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin. *RNA biology* *8*, 158-177.
- Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F.-M., Palmquist, J., Huang, H.-D., and Jin, H. (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, eaar4142.
- Cole, C., Sobala, A., Lu, C., Thatcher, S.R., Bowman, A., Brown, J.W., Green, P.J., Barton, G.J., and Hutvagner, G. (2009). Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *Rna* *15*, 2147-2160.
- Chahar, H.S., Bao, X., and Casola, A. (2015). Exosomes and their role in the life cycle and pathogenesis of RNA viruses. *Viruses* *7*, 3204-3225.
- Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T., Barbisin, M., Xu, N.L., Mahuvakar, V.R., and Andersen, M.R. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research* *33*, e179-e179.

- Chen, Q., Yan, M., Cao, Z., Li, X., Zhang, Y., Shi, J., Feng, G.-h., Peng, H., Zhang, X., and Zhang, Y. (2016). Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science* 351, 397-400.
- Christianson, H.C., Svensson, K.J., van Kuppevelt, T.H., Li, J.-P., and Belting, M. (2013). Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 17380-17385.
- De Toro, J., Herschlik, L., Waldner, C., and Mongini, C. (2015). Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Frontiers in immunology* 6, 203.
- Deng, J., Ptashkin, R.N., Chen, Y., Cheng, Z., Liu, G., Phan, T., Deng, X., Zhou, J., Lee, I., and Lee, Y.S. (2015). Respiratory syncytial virus utilizes a tRNA fragment to suppress antiviral responses through a novel targeting mechanism. *Molecular Therapy* 23, 1622-1629.
- Dhahbi, J.M., Spindler, S.R., Atamna, H., Boffelli, D., and Martin, D.I. (2014). Deep sequencing of serum small RNAs identifies patterns of 5' tRNA half and YRNA fragment expression associated with breast cancer. *Biomarkers in cancer* 6, BIC. S20764.
- Donker, R., Mouillet, J., Chu, T., Hubel, C., Stolz, D., Morelli, A., and Sadovsky, Y. (2012). The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Molecular human reproduction* 18, 417-424.
- El-Mogy, M., Lam, B., Haj-Ahmad, T.A., McGowan, S., Yu, D., Nosal, L., Rghei, N., Roberts, P., and Haj-Ahmad, Y. (2018). Diversity and signature of small RNA in different bodily fluids using next generation sequencing. *BMC genomics* 19, 408.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 285, 10959-10968.
- Fernandez-Calero, T., Garcia-Silva, R., Pena, A., Robello, C., Persson, H., Rovira, C., Naya, H., and Cayota, A. (2015). Profiling of small RNA cargo of extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* reveals a specific extracellular signature. *Molecular and biochemical parasitology* 199, 19-28.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews genetics* 9, 102.
- Fong, M.Y., Zhou, W., Liu, L., Alontaga, A.Y., Chandra, M., Ashby, J., Chow, A., O'Connor, S.T.F., Li, S., and Chin, A.R. (2015). Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nature cell biology* 17, 183.
- Fritz, J.V., Heintz-Buschart, A., Ghosal, A., Wampach, L., Etheridge, A., Galas, D., and Wilmes, P. (2016). Sources and functions of extracellular small RNAs in human circulation. *Annual review of nutrition* 36, 301-336.
- 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 letters* 583, 437-442.
- Gagnon, K.T., and Corey, D.R. (2012). Argonaute and the nuclear RNAs: new pathways for RNA-mediated control of gene expression. *Nucleic acid therapeutics* 22, 3-16.
- Garcia-Silva, M.R., Cabrera-Cabrera, F., Cura das Neves, R.F., Souto-Padrón, T., de Souza, W., and Cayota, A. (2014). Gene expression changes induced by *Trypanosoma cruzi* shed microvesicles in mammalian host cells: relevance of tRNA-derived halves. *BioMed research international* 2014.

- 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. *Molecular and biochemical parasitology* *171*, 64-73.
- Gebetsberger, J., Wyss, L., Mleczko, A.M., Reuther, J., and Polacek, N. (2017). A tRNA-derived fragment competes with mRNA for ribosome binding and regulates translation during stress. *RNA biology* *14*, 1364-1373.
- Gebetsberger, J., Zywicki, M., Künzi, A., and Polacek, N. (2012). tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii*. *Archaea* *2012*.
- Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics* *10*, 94.
- Gogakos, T., Brown, M., Garzia, A., Meyer, C., Hafner, M., and Tuschl, T. (2017). Characterizing expression and processing of precursor and mature human tRNAs by hydro-tRNAseq and PAR-CLIP. *Cell reports* *20*, 1463-1475.
- Guduric-Fuchs, J., O'Connor, A., Camp, B., O'Neill, C.L., Medina, R.J., and Simpson, D.A. (2012). Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC genomics* *13*, 357.
- Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* *15*, 509.
- Haussecker, D., Huang, Y., Lau, A., Parameswaran, P., Fire, A.Z., and Kay, M.A. (2010). Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *Rna* *16*, 673-695.
- He, T., Qi, F., Jia, L., Wang, S., Wang, C., Song, N., Fu, Y., Li, L., and Luo, Y. (2015). Tumor cell-secreted angiogenin induces angiogenic activity of endothelial cells by suppressing miR-542-3p. *Cancer letters* *368*, 115-125.
- Honda, S., Loher, P., Shigematsu, M., Palazzo, J.P., Suzuki, R., Imoto, I., Rigoutsos, I., and Kirino, Y. (2015). Sex hormone-dependent tRNA halves enhance cell proliferation in breast and prostate cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *112*, E3816-E3825.
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Mark, M.T., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., and Ceder, S. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* *527*, 329.
- Ivanov, P., Emara, M.M., Villen, J., Gygi, S.P., and Anderson, P. (2011). Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Molecular cell* *43*, 613-623.
- Jaworski, E., Narayanan, A., Van Duyne, R., Shabbeer-Meyering, S., Iordanskiy, S., Saifuddin, M., Das, R., Afonso, P.V., Sampey, G.C., and Chung, M. (2014). Human T-lymphotropic virus type 1-infected cells secrete exosomes that contain Tax protein. *Journal of Biological Chemistry* *289*, 22284-22305.
- Jeppesen, D.K., Hvam, M.L., Primdahl-Bengtson, B., Boysen, A.T., Whitehead, B., Dyrskjöt, L., Ørntoft, T.F., Howard, K.A., and Ostensfeld, M.S. (2014). Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. *Journal of extracellular vesicles* *3*, 25011.
- Ji, H., Chen, M., Greening, D.W., He, W., Rai, A., Zhang, W., and Simpson, R.J. (2014). Deep sequencing of RNA from three different extracellular vesicle (EV) subtypes released from the human LIM1863 colon cancer cell line uncovers distinct miRNA-enrichment signatures. *PloS one* *9*, e110314.
- Jung, U., Jiang, X., Kaufmann, S.H., and Patzel, V. (2013). A universal TaqMan-based RT-PCR protocol for cost-efficient detection of small noncoding RNA. *Rna* *19*, 1864-1873.

- Karaiskos, S., Naqvi, A.S., Swanson, K.E., and Grigoriev, A. (2015). Age-driven modulation of tRNA-derived fragments in *Drosophila* and their potential targets. *Biology direct* 10, 51.
- Kaur, S., Elkahloun, A.G., Arakelyan, A., Young, L., Myers, T.G., Otaizo-Carrasquero, F., Wu, W., Margolis, L., and Roberts, D.D. (2018). CD63, MHC class 1, and CD47 identify subsets of extracellular vesicles containing distinct populations of noncoding RNAs. *Scientific reports* 8, 2577.
- Keam, S.P., and Hutvagner, G. (2015). tRNA-derived fragments (tRFs): emerging new roles for an ancient RNA in the regulation of gene expression. *Life* 5, 1638-1651.
- Kedersha, N., and Anderson, P. (2007). Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods in enzymology* 431, 61-81.
- Kim, H.K., Fuchs, G., Wang, S., Wei, W., Zhang, Y., Park, H., Roy-Chaudhuri, B., Li, P., Xu, J., and Chu, K. (2017). A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis. *Nature* 552, 57.
- Klibi, J., Niki, T., Riedel, A., Pioche-Durieu, C., Souquere, S., Rubinstein, E., Le Moulec, S., Guigay, J., Hirashima, M., and Guemira, F. (2009). Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood* 113, 1957-1966.
- Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I.V., van Eijndhoven, M.A., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J.M., Ylstra, B., and de Menezes, R.X. (2014). Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell reports* 8, 1649-1658.
- Kosaka, N., Iguchi, H., and Ochiya, T. (2010). Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer science* 101, 2087-2092.
- Krause, M., Rak-Raszewska, A., Naillat, F., Saarela, U., Schmidt, C., Ronkainen, V.-P., Bart, G., Ylä-Herttua, S., and Vainio, S.J. (2018). Exosomes as secondary inductive signals involved in kidney organogenesis. *Journal of extracellular vesicles* 7, 1422675.
- Kwak, E.L., Bang, Y.-J., Camidge, D.R., Shaw, A.T., Solomon, B., Maki, R.G., Ou, S.-H.I., Dezube, B.J., Jänne, P.A., and Costa, D.B. (2010). Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine* 363, 1693-1703.
- Kwon, E., Todorova, K., Wang, J., Horos, R., Lee, K.K., Neel, V.A., Negri, G.L., Sorensen, P.H., Lee, S.W., and Hentze, M.W. (2018). The RNA-binding protein YBX1 regulates epidermal progenitors at a posttranscriptional level. *Nature communications* 9, 1734.
- Lee, Y.S., Shibata, Y., Malhotra, A., and Dutta, A. (2009). A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes & development* 23, 2639-2649.
- Li, S., and Hu, G.F. (2012). Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. *Journal of cellular physiology* 227, 2822-2826.
- Li, Y., Zheng, Q., Bao, C., Li, S., Guo, W., Zhao, J., Chen, D., Gu, J., He, X., and Huang, S. (2015). Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell research* 25, 981.
- Lian, X.J., and Gallouzi, I.-E. (2009). Oxidative stress increases the number of stress granules in senescent cells and triggers a rapid decrease in p21waf1/cip1 translation. *Journal of Biological Chemistry* 284, 8877-8887.
- Loss-Morais, G., Waterhouse, P.M., and Margis, R. (2013). Description of plant tRNA-derived RNA fragments (tRFs) associated with argonaute and identification of their putative targets. *Biology direct* 8, 6.
- Lunavat, T.R., Cheng, L., Kim, D.-K., Bhadury, J., Jang, S.C., Lässer, C., Sharples, R.A., López, M.D., Nilsson, J., and Gho, Y.S. (2015). Small RNA deep sequencing

- discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells—Evidence of unique microRNA cargos. *RNA biology* *12*, 810-823.
- Luteijn, M.J., and Ketting, R.F. (2013). PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. *Nature Reviews Genetics* *14*, 523.
 - Lyons, S.M., Achorn, C., Kedersha, N.L., Anderson, P.J., and Ivanov, P. (2016). YB-1 regulates tiRNA-induced Stress Granule formation but not translational repression. *Nucleic acids research* *44*, 6949-6960.
 - Lyons, S.M., Fay, M.M., Akiyama, Y., Anderson, P.J., and Ivanov, P. (2017a). RNA biology of angiogenin: Current state and perspectives. *RNA biology* *14*, 171-178.
 - Lyons, S.M., Gudanis, D., Coyne, S.M., Gdaniec, Z., and Ivanov, P. (2017b). Identification of functional tetramolecular RNA G-quadruplexes derived from transfer RNAs. *Nature communications* *8*, 1127.
 - Martens-Uzunova, E.S., Olvedy, M., and Jenster, G. (2013). Beyond microRNA—novel RNAs derived from small non-coding RNA and their implication in cancer. *Cancer letters* *340*, 201-211.
 - Mateescu, B., Kowal, E.J., van Balkom, B.W., Bartel, S., Bhattacharyya, S.N., Buzás, E.I., Buck, A.H., de Candia, P., Chow, F.W., and Das, S. (2017). Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA—an ISEV position paper. *Journal of extracellular vesicles* *6*, 1286095.
 - Max, K.E., Bertram, K., Akat, K.M., Bogardus, K.A., Li, J., Morozov, P., Ben-Dov, I.Z., Li, X., Weiss, Z.R., and Azizian, A. (2018). Human plasma and serum extracellular small RNA reference profiles and their clinical utility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201714397.
 - McKenzie, A.J., Hoshino, D., Hong, N.H., Cha, D.J., Franklin, J.L., Coffey, R.J., Patton, J.G., and Weaver, A.M. (2016). KRAS-MEK signaling controls Ago2 sorting into exosomes. *Cell reports* *15*, 978-987.
 - Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., and Allen, A. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 10513-10518.
 - Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M.Á., Bernad, A., and Sánchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications* *2*, 282.
 - Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Stolz, D.B., Sullivan, M.L., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., and Wang, Z. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* *119*, 756-766.
 - Mukherjee, K., Ghoshal, B., Ghosh, S., Chakrabarty, Y., Shwetha, S., Das, S., and Bhattacharyya, S.N. (2016). Reversible HuR-microRNA binding controls extracellular export of miR-122 and augments stress response. *EMBO reports*, e201541930.
 - Mulcahy, L.A., Pink, R.C., and Carter, D.R.F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of extracellular vesicles* *3*, 24641.
 - Nakase, I., and Futaki, S. (2015). Combined treatment with a pH-sensitive fusogenic peptide and cationic lipids achieves enhanced cytosolic delivery of exosomes. *Scientific reports* *5*, 10112.
 - Nie, Z., Zhou, F., Li, D., Lv, Z., Chen, J., Liu, Y., Shu, J., Sheng, Q., Yu, W., and Zhang, W. (2013). RIP-seq of BmAgo2-associated small RNAs reveal various types of small non-coding RNAs in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC genomics* *14*, 661.

- Nientiedt, M., Deng, M., Schmidt, D., Perner, S., Müller, S.C., and Ellinger, J. (2016). Identification of aberrant tRNA-halves expression patterns in clear cell renal cell carcinoma. *Scientific reports* 6, 37158.
- Ouyang, Y., Mouillet, J.-F., Coyne, C.B., and Sadovsky, Y. (2014). Placenta-specific microRNAs in exosomes—good things come in nano-packages. *Placenta* 35, S69-S73.
- Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., and Molinari, A. (2009). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* 284, 34211-34222.
- Pastro, L., Smircich, P., Di Paolo, A., Becco, L., Duhagon, M.A., Sotelo-Silveira, J., and Garat, B. (2017). Nuclear Compartmentalization Contributes to Stage-Specific Gene Expression Control in *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in cell and developmental biology* 5, 8.
- Patton, J.G., Franklin, J.L., Weaver, A.M., Vickers, K., Zhang, B., Coffey, R.J., Mark Ansel, K., Blelloch, R., Goga, A., and Huang, B. (2015). Biogenesis, delivery, and function of extracellular RNA. *Journal of extracellular vesicles* 4, 27494.
- Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., de Gruijl, T.D., Würdinger, T., and Middeldorp, J.M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 6328-6333.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., and Ghajar, C.M. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine* 18, 883.
- Pigati, L., Yaddanapudi, S.C., Iyengar, R., Kim, D.-J., Hearn, S.A., Danforth, D., Hastings, M.L., and Duelli, D.M. (2010). Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PloS one* 5, e13515.
- Polymenidou, M. (2018). The RNA face of phase separation. *Science* 360, 859-860.
- Poria, D., Guha, A., Nandi, I., and Ray, P. (2016). RNA-binding protein HuR sequesters microRNA-21 to prevent translation repression of proinflammatory tumor suppressor gene programmed cell death 4. *Oncogene* 35, 1703.
- Quinn, J.F., Patel, T., Wong, D., Das, S., Freedman, J.E., Laurent, L.C., Carter, B.S., Hochberg, F., Keuren-Jensen, K.V., and Huentelman, M. (2015). Extracellular RNAs: development as biomarkers of human disease. *Journal of extracellular vesicles* 4, 27495.
- Ramakrishnaiah, V., Thumann, C., Fofana, I., Habersetzer, F., Pan, Q., de Ruiter, P.E., Willemsen, R., Demmers, J.A., Raj, V.S., and Jenster, G. (2013). Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7. 5 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 13109-13113.
- Rana, S., Yue, S., Stadel, D., and Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44, 1574-1584.
- Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200, 373-383.
- Ronquist, K.G., Sanchez, C., Dubois, L., Chioureas, D., Fonseca, P., Larsson, A., Ullén, A., Yachnin, J., Ronquist, G., and Panaretakis, T. (2016). Energy-requiring uptake of prostasomes and PC3 cell-derived exosomes into non-malignant and malignant cells. *Journal of extracellular vesicles* 5, 29877.
- Roy, S., Hochberg, F.H., and Jones, P.S. (2018). Extracellular vesicles: the growth as diagnostics and therapeutics; a survey. *Journal of extracellular vesicles* 7, 1438720.
- Saikia, M., Jobava, R., Parisien, M., Putnam, A., Krokowski, D., Gao, X.-H., Guan, B.-J., Yuan, Y., Jankowsky, E., and Feng, Z. (2014). Angiogenin-cleaved tRNA halves interact

- with cytochrome c, protecting cells from apoptosis during osmotic stress. *Molecular and cellular biology* 34, 2450-2463.
- Schaefer, M., Pollex, T., Hanna, K., Tuorto, F., Meusburger, M., Helm, M., and Lyko, F. (2010). RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes & development* 24, 1590-1595.
 - Schimmel, P. (2018). The emerging complexity of the tRNA world: Mammalian tRNAs beyond protein synthesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 45.
 - Sharma, U., Conine, C.C., Shea, J.M., Boskovic, A., Derr, A.G., Bing, X.Y., Belleannee, C., Kucukural, A., Serra, R.W., and Sun, F. (2015). Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science*, aad6780.
 - Shelke, G.V., Lässer, C., Gho, Y.S., and Lötvall, J. (2014). Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *Journal of extracellular vesicles* 3, 24783.
 - Shen, B., Wu, N., Yang, J.-M., and Gould, S.J. (2011). Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. *Journal of Biological Chemistry* 286, 14383-14395.
 - Shigematsu, M., and Kirino, Y. (2015). tRNA-derived short non-coding RNA as interacting partners of argonaute proteins. *Gene regulation and systems biology* 9, GRSB. S29411.
 - Shurtleff, M.J., Temoche-Diaz, M.M., Karfilis, K.V., Ri, S., and Schekman, R. (2016). Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife* 5.
 - Shurtleff, M.J., Yao, J., Qin, Y., Nottingham, R.M., Temoche-Diaz, M.M., Schekman, R., and Lambowitz, A.M. (2017). Broad role for YBX1 in defining the small noncoding RNA composition of exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E8987-E8995.
 - Silva, J., Garcia, V., Rodriguez, M., Compte, M., Cisneros, E., Veguillas, P., Garcia, J., Dominguez, G., Campos-Martin, Y., and Cuevas, J. (2012). Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* 51, 409-418.
 - Skog, J., Würdinger, T., Van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Curry Jr, W.T., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology* 10, 1470.
 - Sobala, A., and Hutvagner, G. (2013). Small RNAs derived from the 5' end of tRNA can inhibit protein translation in human cells. *RNA biology* 10, 553-563.
 - Sonia, A., Linda, B., and Christoph, K. (2015). Glypican1 identifies cancer exosomes and facilitates early detection of cancer. *Nature* 523, 82.
 - Takov, K., Yellon, D.M., and Davidson, S.M. (2017). Confounding factors in vesicle uptake studies using fluorescent lipophilic membrane dyes. *Journal of extracellular vesicles* 6, 1388731.
 - Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology*, 3.22. 21-23.22. 29.
 - Théry, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology* 2, 569.
 - Thomou, T., Mori, M.A., Dreyfuss, J.M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., Rao, T.N., Winnay, J.N., Garcia-Martin, R., and Grinspoon, S.K. (2017). Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature* 542, 450.

- Thompson, A.G., Gray, E., Heman-Ackah, S.M., Mäger, I., Talbot, K., El Andaloussi, S., Wood, M.J., and Turner, M.R. (2016). Extracellular vesicles in neurodegenerative disease—pathogenesis to biomarkers. *Nature Reviews Neurology* 12, 346.
- 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.
- Thompson, D.M., and Parker, R. (2009). The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* 185, 43-50.
- Tkach, M., and Théry, C. (2016). Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell* 164, 1226-1232.
- Tomita, K., Ogawa, T., Uozumi, T., Watanabe, K., and Masaki, H. (2000). A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 8278-8283.
- Tosar, J.P., and Cayota, A. (2018). Detection and Analysis of Non-vesicular Extracellular RNA. In *Extracellular RNA* (Springer), pp. 125-137.
- Tosar, J.P., Cayota, A., Eitan, E., Halushka, M.K., and Witwer, K.W. (2017). Ribonucleic artefacts: are some extracellular RNA discoveries driven by cell culture medium components? *Journal of extracellular vesicles* 6, 1272832.
- Tosar, J.P., Gámbaro, F., Darré, L., Pantano, S., Westhof, E., and Cayota, A. (2018). Dimerization confers increased stability to nucleases in 5' halves from glycine and glutamic acid tRNAs. *Nucleic acids research*.
- Tosar, J.P., Gámbaro, F., Sanguinetti, J., Bonilla, B., Witwer, K.W., and Cayota, A. (2015). Assessment of small RNA sorting into different extracellular fractions revealed by high-throughput sequencing of breast cell lines. *Nucleic acids research* 43, 5601-5616.
- Tuck, A.C., and Tollervey, D. (2011). RNA in pieces. *Trends in genetics* 27, 422-432.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., and Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research* 39, 7223-7233.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* 9, 654.
- van Balkom, B.W., Eisele, A.S., Pegtel, D.M., Bervoets, S., and Verhaar, M.C. (2015). Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *Journal of extracellular vesicles* 4, 26760.
- Van Deun, J., Hendrix, A., and consortium, E.-T. (2017a). Is your article EV-TRACKed? *Journal of extracellular vesicles* 6, 1379835.
- Van Deun, J., Mestdagh, P., Agostinis, P., Akay, Ö., Anand, S., Anckaert, J., Martinez, Z.A., Baetens, T., Beghein, E., and Bertier, L. (2017b). EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nature methods* 14, 228.
- Van Deun, J., Mestdagh, P., Sormunen, R., Cocquyt, V., Vermaelen, K., Vandesompele, J., Bracke, M., De Wever, O., and Hendrix, A. (2014). The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *Journal of extracellular vesicles* 3, 24858.
- Van Treeck, B., Protter, D.S., Matheny, T., Khong, A., Link, C.D., and Parker, R. (2018). RNA self-assembly contributes to stress granule formation and defining the stress granule transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201800038.
- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., and Remaley, A.T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology* 13, 423.

- Vojtech, L., Woo, S., Hughes, S., Levy, C., Ballweber, L., Sauteraud, R.P., Strobl, J., Westerberg, K., Gottardo, R., and Tewari, M. (2014). Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic acids research* 42, 7290-7304.
- Wang, W., Shi, Q., Mattes, W.B., Mendrick, D.L., and Yang, X. (2015). Translating extracellular microRNA into clinical biomarkers for drug-induced toxicity: from high-throughput profiling to validation. *Biomarkers in medicine* 9, 1177-1188.
- Wang, Y.-N., Lee, H.-H., Chou, C.-K., Yang, W.-H., Wei, Y., Chen, C.-T., Yao, J., Hsu, J.L., Zhu, C., and Ying, H. (2018). Angiogenin/Ribonuclease 5 is an EGFR ligand and a serum biomarker for erlotinib sensitivity in pancreatic cancer. *Cancer cell* 33, 752-769. e758.
- Wei, Z., Batagov, A.O., Carter, D.R., and Krichevsky, A.M. (2016). Fetal bovine serum RNA interferes with the cell culture derived extracellular RNA. *Scientific reports* 6, 31175.
- Wiklander, O.P., Nordin, J.Z., O'Loughlin, A., Gustafsson, Y., Corso, G., Mäger, I., Vader, P., Lee, Y., Sork, H., and Seow, Y. (2015). Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *Journal of extracellular vesicles* 4, 26316.
- Willms, E., Johansson, H.J., Mäger, I., Lee, Y., Blomberg, K.E.M., Sadik, M., Alaarg, A., Smith, C.E., Lehtiö, J., and Andaloussi, S.E. (2016). Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific reports* 6, 22519.
- Witwer, K.W., Buzas, E.I., Bemis, L.T., Bora, A., Lässer, C., Lötvald, J., Nolte-'t Hoen, E.N., Piper, M.G., Sivaraman, S., and Skog, J. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of extracellular vesicles* 2, 20360.
- Xiao, H., Lässer, C., Shelke, G.V., Wang, J., Rådinger, M., Lunavat, T.R., Malmhäll, C., Lin, L.H., Li, J., and Li, L. (2014). Mast cell exosomes promote lung adenocarcinoma cell proliferation—role of KIT-stem cell factor signaling. *Cell Communication and Signaling* 12, 64.
- Xu, R., Rai, A., Chen, M., Suwakulsiri, W., Greening, D.W., and Simpson, R.J. (2018). Extracellular vesicles in cancer—implications for future improvements in cancer care. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 1.
- Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G.-f., and Anderson, P. (2009). Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *The Journal of cell biology* 185, 35-42.
- Yu, D.d., Wu, Y., Shen, H.y., Lv, M.m., Chen, W.x., Zhang, X.h., Zhong, S.l., Tang, J.h., and Zhao, J.h. (2015). Exosomes in development, metastasis and drug resistance of breast cancer. *Cancer science* 106, 959-964.
- Yuan, T., Huang, X., Woodcock, M., Du, M., Dittmar, R., Wang, Y., Tsai, S., Kohli, M., Boardman, L., and Patel, T. (2016). Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients. *Scientific reports* 6, 19413.
- Zardo, G., Ciolfi, A., Vian, L., Billi, M., Racanicchi, S., Grignani, F., and Nervi, C. (2012). Transcriptional targeting by microRNA-polycomb complexes: a novel route in cell fate determination. *Cell Cycle* 11, 3543-3549.
- Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., and Cai, X. (2010). Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Molecular cell* 39, 133-144.
- Zheng, G., Qin, Y., Clark, W.C., Dai, Q., Yi, C., He, C., Lambowitz, A.M., and Pan, T. (2015). Efficient and quantitative high-throughput tRNA sequencing. *Nature methods* 12, 835.
- Zomer, A., Steenbeek, S.C., Maynard, C., and Van Rheeën, J. (2016). Studying extracellular vesicle transfer by a Cre-loxP method. *Nature protocols* 11, 87.

APENDICE

La presente tesis de maestría fue llevada a cabo en el Laboratorio de Genómica Funcional del Insitut Pasteur de Montevideo baja la orientación del Dr. Alfonso Cayota y la co – orientación del Dr. Juan Pablo Tosar.

Parte de los resultados de esta tesis contribuyeron a una reciente publicación científica original en una de las revistas de referencia en la temática:

- ❖ Juan Pablo Tosar*, Fabiana Gámbaro*, Leonardo Darré, Sergio Pantano, Eric Westhof and Alfonso Cayota: Dimerization confers increased stability to nucleases in extracellular 5' halves from glycine and glutamic acid tRNAs. Nucleic Acids Research, 2018

* Ambos autores contribuyeron equitativamente a este trabajo

Dicho trabajo se encuentra adjunto al final de la tesis.

No relacionado con el desarrollo de esta tesis pero durante mi periodo formal como estudiante de maestría por PEDECIBA – biología, y en el marco de mi cargo como grado 1 en el Laboratorio de Virología Molecular, CIN, Facultad de Ciencias, se publicaron los siguientes trabajos:

- ❖ Natalia Echeverría; Gabriela Betancour; F.Gámbaro; Nelia Hernández; Pablo López; Daniela chiodi; Fajardo A.; Soñora M; Moratorio G; Cristina J., Moreo P. “Naturally occurring ns3 resistance-associated variants in hepatitis c virus genotype 1: their relevance for developing countries”. Virus Research, 2016
- ❖ Aldunate F; F. Gámbaro; Fajardo A.; Soñora M; Cristina J. Evidence of increasing diversification of Zika virus strains isolated in the American continent. Journal of Medical Virology, 2017

Dimerization confers increased stability to nucleases in 5' halves from glycine and glutamic acid tRNAs

Juan Pablo Tosar^{1,2,*}, Fabiana Gámbaro^{1,2,†}, Leonardo Darré^{1,3}, Sergio Pantano³, Eric Westhof⁴ and Alfonso Cayota^{1,5,*}

¹Functional Genomics Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo 11400, Uruguay, ²Nuclear Research Center, Faculty of Science, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay, ³Group of Biomolecular Simulations, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo 11400, Uruguay, ⁴Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, Institut de biologie moléculaire et cellulaire du CNRS, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France and ⁵Department of Medicine, Faculty of Medicine, Universidad de la República, Montevideo 11600, Uruguay

Received February 06, 2018; Revised May 16, 2018; Editorial Decision May 18, 2018; Accepted May 22, 2018

ABSTRACT

We have previously shown that 5' halves from tRNA^{Gly}_{GCC} and tRNA^{Glu}_{CUC} are the most enriched small RNAs in the extracellular space of human cell lines, and especially in the non-vesicular fraction. Extracellular RNAs are believed to require protection by either encapsulation in vesicles or ribonucleoprotein complex formation. However, deproteinization of non-vesicular tRNA halves does not affect their retention in size-exclusion chromatography. Thus, we considered alternative explanations for their extracellular stability. In-silico analysis of the sequence of these tRNA-derived fragments showed that tRNA^{Gly} 5' halves can form homodimers or heterodimers with tRNA^{Glu} 5' halves. This capacity is virtually unique to glycine tRNAs. By analyzing synthetic oligonucleotides by size exclusion chromatography, we provide evidence that dimerization is possible *in vitro*. tRNA halves with single point substitutions preventing dimerization are degraded faster both in controlled nuclease digestion assays and after transfection in cells, showing that dimerization can stabilize tRNA halves against the action of cellular nucleases. Finally, we give evidence supporting dimerization of endogenous tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves inside cells. Considering recent reports have shown that 5' tRNA halves from Ala and Cys can form tetramers, our results highlight RNA intermolecular structures as a new layer of complexity in the biology of tRNA-derived fragments.

INTRODUCTION

Since the discoveries that small regulatory RNAs can be secreted, transported in the extracellular space, and still regulate gene expression in recipient mammalian cells (1), the interest in the study of extracellular or circulating RNAs has grown evenly. This interest is mostly based on the diagnostic potential of circulating small RNAs (2) and on their biological role in RNA-mediated intercellular communication between distant cells (3).

The RNA backbone is susceptible to hydrolysis and enzymatic cleavages, especially in the extracellular space characterized by a rather high RNase activity (4). Thus, extracellular RNAs need protection from degradation in order to be transported between non-adjacent cells, and this is typically achieved by either encapsulation in lipid membrane vesicles (i.e. extracellular vesicles, EVs) (1), lipoprotein particles (5), or by their association with RNA-binding proteins (6,7). These different mechanisms confer not only alternative possibilities for RNA secretion and extracellular dynamics, but might also impact directly in the signaling potential of extracellular RNAs.

For these reasons, we have previously used high-throughput sequencing to study the small RNA content present in different types of EVs (exosomes and microvesicles) or in the extracellular non-vesicular fraction obtained from malignant and non-malignant breast cell lines (8). Interestingly, we found that the most abundant extracellular small RNAs (as confirmed by ligation-independent RT-digital PCR) were tRNA-derived fragments. Moreover, these extracellular small RNAs were mostly not associated with EVs, as their highest relative abundances were observed in the 100 000 × g supernatants of the cell-conditioned medium. In that fraction, 90% of the tRNA-derived reads corresponded to 5' halves from tRNA^{Gly}_{GCC} and tRNA^{Glu}_{CUC}.

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +598 25220910; Fax: +598 25224185; Email: cayota@pasteur.edu.uy
Correspondence may also be addressed to Juan Pablo Tosar. Tel: +598 25220910; Fax: +598 25224185; Email: jptosar@cin.edu.uy

†The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as Joint First Authors.

Although initially regarded as non-specific degradation products, tRNA-derived fragments are ubiquitous and highly abundant. This large population of small RNAs has been shown to elicit gene regulation functions acting at multiple levels in different organisms. In mammals, the RNaseA family member Angiogenin was shown to be enzyme responsible for stress-induced tRNA cleavage in the anticodon loop (9,10), and the resulting tRNA halves were shown to inhibit translation initiation by interfering with 5' cap recognition (11). They also protect cells from apoptosis by binding to cytochrome *c* (12), induce a neuroprotective stress granule-dependent response (13), or regulate cell proliferation (14) and mRNA turnover (15). Short tRNA-derived sequences can regulate ribosome biogenesis by affecting the structure and translation efficiency of ribosomal protein mRNAs in an Argonaute-independent manner (16). A similar mechanism was previously reported for the regulation of aspartyl-tRNA synthetase mRNA processing by a misfolded tRNA^{ASP} isodecoder (17), suggesting that tRNAs and their fragments also regulate mRNA structure and stability (18). Recently, 5' halves from tRNA^{Gly}_{GCC} were described in seminal plasma and shown to be transferred to mouse oocytes during fertilization (19). In the embryos, these tRNA halves were capable of silencing genes controlled by retroactive transposable elements, thus playing a role in epigenetic inheritance. Strikingly, the same tRNA halves are the ones enriched in the non-EV fraction of cancer-cell conditioned medium (8). With at least one function already known for these specific tRNA halves, their enrichment in the non-EV fraction of cell-conditioned medium implies the existence of an unknown mechanism conferring stability against nuclease degradation.

In this work, we aim to understand how certain tRNA halves achieve unusual stability, enabling them to exist as functionally relevant extracellular (and also intracellular) entities. The first option in extracellular RNA biology is to think in extracellular vesicles as carriers that protect encapsulated RNAs from degradation by extracellular nucleases. However, this does not explain the presence of tRNA halves in the 100 000 × g supernatants of the conditioned medium of different cell lines (8) or in vesicle-depleted serum (20). Formation of ribonucleoprotein complexes can also explain extracellular RNA stability, as shown for miRNAs (7,21). The possibility that RNAs themselves form particular 3D structures rendering them more resistant to degradation is less studied, though there are very elegant examples in viruses (22). In this regard, terminal oligoguanine motif-containing tRNA halves were recently shown to form stable G quadruplex-mediated intermolecular tetramers (23). Here we show that 5' halves from tRNA^{Gly}_{GCC} and tRNA^{Glu}_{CUC} can homo- or heterodimerize in solution, widening the structure/function dependency of this small RNA family.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Ribonuclease A was obtained from Sigma, and RNase T1 (100 000 U/ml) was from Roche. Exonuclease T and Murine RNase inhibitor (40 U/μl) were from New England Biolabs. *N*-Methylmesoporphyrin IX (NMM) was obtained

from Frontier Scientific. Sterile Phosphate buffered saline, PBS (purchased as 10X DPBS), DMEM, trypsin–EDTA solution, fetal bovine serum and nuclease-free distilled water were obtained from Gibco.

Cell culture

MCF-7 cells were purchased from ATCC and used at low passage (<10). Cells were routinely incubated in a humidified chamber at 37°C with 5% CO₂ without antibiotics. The cells were cultured in DMEM + 10% FBS until the desired cell number was obtained. After media removal and rinsing with phosphate buffered saline (PBS), cells were changed to defined media: Mammary Epithelial Growth Medium (MEGM, Lonza Clonetics) without the addition of the bovine pituitary extract included in the kit. After an adaptation period of 48 h, the media was completely removed, cells were rinsed with PBS and new defined media was added. After further incubation for 48 h, the cell conditioned medium was collected and centrifuged at 800 × g before storing the supernatants at –20°C.

Purification of extracellular tRNA halves and SEC analysis

Except for the results shown in Figure 1A and B, the cell conditioned medium was always centrifuged at 2000 × g (30 min, 4°C) and then at 100 000 × g (2.5 h, 4°C) in order to obtain the extracellular EV-depleted (non-EV) fraction, as previously reported and characterized (8). The supernatants were concentrated by ultrafiltration (Vivaspin 20, MWCO 5 kDa, Sartorius Stedim Biotech.) by successive dilutions with PBS to remove phenol red and small molecules. Concentrated non-EV fractions (500 μl) were injected in a Superdex S75 10/300 column (Amersham) and size exclusion chromatography (SEC) was performed at 0.5 ml/min in 0.22 μm-filtered PBS with an Äkta Pure (GE healthcare) FPLC system. The same protocol was used for the analysis of synthetic RNAs. All samples were centrifuged at 16 000 × g for 10 min at 4°C before injection in the columns.

Controlled ribonuclease digestion assays

A 10 μl mixture containing 100 pmol of the desired RNAs in 1 × PBS was heated at 95°C for 1 min and cooled at room temperature for 30 min in order to perform unfolding/refolding of the RNAs. For RNase T1 digestion assays, 1 μl of different enzyme dilutions (in PBS, spanning 0.01–10 enzymatic units) were added, and digestion was performed at 20°C for 30 min. For exonuclease T treatment, 10 μl of different enzyme dilutions in 1 × NEB Buffer 4 were added to the refolded RNAs, and the reactions were carried out for 2 h at 20°C. A 4 μl aliquot was mixed with 2 × denaturing gel loading dye (Thermo Scientific) and ran in a 20% (RNase T1) or 15% (Exonuclease T) polyacrylamide gel containing 7 M urea in 90 mM Tris-borate (TB) buffer, pH 8.3. Gels were run at 100 V for 2–3 h, and stained with 1 × SYBR gold (Thermo Scientific).

RNA extraction and Stem-loop RT quantitative PCR

RNA purification was performed with Trizol LS (Invitrogen, Life Technologies) according to manufacturer's in-

structions. RNA was quantified using a Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies) and a Qubit RNA high sensitivity kit, according to manufacturer's instructions. Spectrophotometric quantification of extracellular RNAs was considered not reliable due to traces of phenol absorbing at 270 nm. Stem-loop RT-qPCR was performed directly in the conditioned medium (no RNA purification) or in purified RNA extracted from cells. The detailed protocol and primers used in this study are presented in the supplementary materials section.

Small RNA sequencing

RNA was purified from fractions corresponding to the 'H' ($V_e = 10.2$ ml) or 'L' peak ($V_e = 11.5$ ml) obtained after SEC purification of the MCF-7 cell conditioned medium following EV depletion. The 'H' peaks from samples treated with 40 U murine RNase inhibitor immediately upon conditioned medium collection were also analyzed. The obtained RNA was diluted in 8 μ l of ultra-pure RNase-free water, and 7 μ l were used as input for NGS library preparation using the NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed in a MiSeq benchtop sequencer for 200 cycles, though small RNAs analyzed in this study were all in the 15–100 nt range. The analysis was performed as previously described (8) and stated in the supplementary materials section.

Fluorescence microscopy

MCF-7 cells (1×10^4) were seeded onto 96-well plates and 24 h later were washed with PBS and transfected with 100 nM biotinylated RNAs (WT, 9GG/AA, 25U/C and SCR) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following manufacturer's recommendations. Briefly, 0.5 μ l of RNA (100 μ M) was mixed with 2 μ l of Lipofectamine 2000, and the RNA was diluted to 100 nM in MEGM medium. After 30 min incubation with the lipid/RNA mixture, cells were rinsed three times with PBS to remove non-transfected RNA. This was defined as our zero time point ($t = 0$). After the desired experiment duration, cells were fixed using 4% paraformaldehyde for 15 min at RT and permeabilized with PBS plus 0.3% Tween-20 for 3 min. Then, cells were incubated with blocking buffer (5% BSA in PBS) for 1 h at 37°C. The cells were washed three times with PBS and incubated with streptavidin-APC diluted 1:500 in blocking buffer containing DAPI (Santa Cruz Biotechnology) for 30 min at room temperature in dark. After washing with PBS, coverslips were mounted using Prolong Gold Antifade Reagent (ThermoFisher Scientific). Cells were photographed with a Zeiss confocal microscope (Axio Observer Z1, LSM 800) using a 63 \times oil immersion objective and analyzed using Fiji-ImageJ software. Acquisition parameters were the same for non-transfected cells (negative control) and transfection with the four biotinylated RNAs.

Synthetic RNA oligonucleotides

Synthetic oligonucleotides were purchased from Integrated DNA Technologies (USA). The sequences of the RNAs (all

bases as 2'-OH) used in this study are the following (5'-3', mismatches underlined):

tRNA^{Glu}_{CUC} 5' halves: UCCCUGGUGGUCUAGUGG
 UUAGGAUUCGGCG
 tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves (WT): GCAUUGGUGGUUCA
 GUGGUAGAAUUCUCGC
 tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves (9GG/AA): GCAUUGGUAAU
 CAGUGGUAGAAUUCUCGC
 tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves (25U/C): GCAUUGGUGGUUCA
 GUGGUAGAAUUCUCGC
 tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves (SCR): GAUAGG
 UGUCGGUAGAGAUCCCGC

Biotinylated versions of WT, 9GG/AA, 25U/C and SCR included a 5' biotin group. The WT sequence was also purchased with a DNA instead of a RNA backbone (2'-deoxy). WT and 25U/C oligonucleotides bearing a 5' phosphate group were also included in specified assays. Sequences for Ala and Cys 5' tRNA halves are the same used in Ivanov *et al.* (13).

RESULTS

Non-vesicular extracellular tRNA halves show increased nuclease stability

Previous work from our group has shown that 5' tRNA halves are the most abundant small RNAs present in the conditioned medium of breast cell lines (MCF-7 and MCF-10A) grown in serum-free conditions (8). Furthermore, these tRNA-derived fragments were mostly enriched in the non-vesicular fraction. Strikingly, ~90% of tRNA fragments in this fraction were derived from tRNA^{Glu}_{CUC} and tRNA^{Gly}_{GCC}. This was not merely a technical bias, since a heterogeneous population of tRNA-derived fragments could be sequenced in the intracellular space.

We then asked whether cells were selectively secreting specific tRNA halves or whether these represented the most stable species in the extracellular space. The latter was supported by the observation that 5' halves from tRNA^{Gly} and tRNA^{Glu} were not significantly degraded after overnight incubation at 37°C of collected (cell-free) MCF-7 cell conditioned medium (Figure 1A). There was a small increase in the Cq value of tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves, which could be reverted by addition of RNase inhibitor (Figure 1B), but such extent of degradation was considered negligible in both cases. The 5' halves from tRNA^{Glu}_{CUC} were also very stable. The small, non-significant decrease in their Cq value might be indicative of an extracellular biogenesis for these tRNA-derived fragments, but such a mechanism extends beyond the scope of this study.

To address whether the high stability of tRNA^{Gly} and tRNA^{Glu} 5' halves was a consequence of a low extracellular RNase activity in MCF-7 cell conditioned medium, we purified the fraction containing the tRNA halves by size-exclusion chromatography (SEC). As we had previously reported (8), SEC analysis of the non-EV fraction of MCF-7 cell conditioned medium defined two peaks where OD260 > OD280, corresponding to high molecular weight ('H' peak, $V_e = 10.2$ ml, apparent MW ≈ 40 kDa) and low molecular weight ('L' peak, $V_e = 11.5$ ml, apparent MW

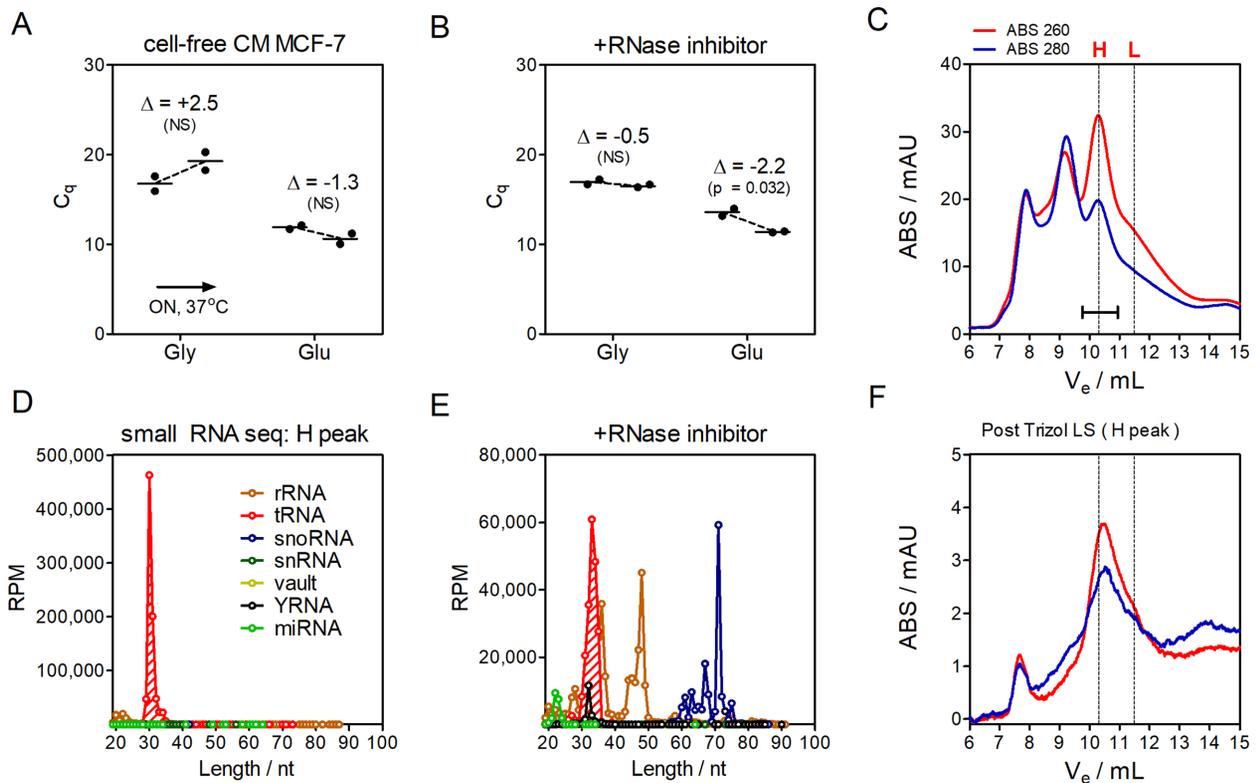


Figure 1. 5' Halves from tRNA^{Gly} and tRNA^{Glu} are highly stable in the non-EV fraction from MCF-7 cell conditioned medium. (A) MCF-7 cells were grown under defined serum-free conditions, and cell conditioned medium was collected after 48 h. The medium was split in two aliquots, one of which was immediately stored at -20°C while the other was left at 37°C overnight (ON) and then frozen. After thawing, 600 μl aliquots were concentrated 10 \times by ultrafiltration (using membranes with a cut-off of 5 kDa). The tRNA halves were assayed by stem-loop RT-qPCR and their quantification cycle (Cq) values are shown. Significant or not-significant (NS) changes are indicated based on two-tailed Student t test. In a parallel experiment (B), 40 U of murine RNase inhibitor was added to the cell conditioned medium upon collection. (C) The cell conditioned medium, either with or without addition of RNase inhibitor, was centrifuged at 100 000 \times g for 2.5 h and the supernatant was concentrated and injected in a Superdex S75 column. Absorbance at 260 nm and 280 nm are shown in red and blue, respectively. The peak termed 'H' was collected, RNA was extracted and the purified RNA was either used for small RNA sequencing (D and E) or reinjected in the same column (F). Sequencing reads were collapsed to unique sequences, classified based on their origins (mature miRNAs or fragments of rRNAs, tRNAs, snoRNA, snRNAm vault RNAs or YRNAs) and relative abundances (expressed in reads per million mapped reads, RPM) were plotted against sequence length (D and E).

≈ 20 kDa) RNase-sensitive complexes (Figure 1C). Small RNA sequencing of both peaks showed that 89.5% (H) and 82.2% (L) of mapped reads were derived from tRNAs (Figure 1D). Of these, 88.2% (in the H peak) corresponded to 5' fragments of 28–33 nt from tRNA^{Gly}_{GCC} and tRNA^{Glu}_{CUC} (Supplementary Table S1). Hence, confirming our previous finding regarding the total (before SEC) non-EV extracellular fraction (8). The amplification of these tRNA halves in the 'H' and 'L' peaks was confirmed by stem-loop RT-qPCR (SL-RT-qPCR), which is independent of RNA 3'-end modifications and does not amplify intact precursors (i.e. full-length tRNAs), as explained in the Supplementary Methods section. However, when adding RNase inhibitor to the medium, a plethora of small RNAs derived from varied ncRNAs was evident, with tRNA-derived fragments representing only 30% of mapped reads (Figure 1E, note the decrease in RPM values). In particular, fragments of 28S rRNA (starting at position 1 in sequences of 36 nt, and at position 4439 in sequences defining the peak at 48 nt) and complete small nucleolar RNAs (with the C/D box U49A snoRNA being the most abundant) were almost as

frequent as tRNA halves under these experimental conditions. Given that all these species are not detected in the absence of RNase inhibitor, we conclude that tRNA halves are more stable than other RNAs of similar lengths in the extracellular compartment.

We could envision two mechanisms that would explain the high extracellular stability observed for the aforementioned tRNA halves: (a) selective binding to specific proteins to form extracellular ribonucleoprotein (RNP) complexes, or (b) adoption of particular three-dimensional structures less prone to RNase-mediated degradation. Because the elution volume of the 'L' peak (Figure 1C) is very close to that of synthetic 30 nt oligonucleotides (see below), only the 'H' peak could correspond to a RNP complex containing the tRNA halves under study. To our surprise, purification of the RNA from this peak by Trizol LS and re-injection of the purified (i.e. deproteinized) RNA did not shift its elution volume (Figure 1E). From this we concluded that tRNA halves present in the non-EV fraction do not elute as RNP complexes.

***In-silico* analysis predicts that 5' halves from tRNA^{Gly} and tRNA^{Glu} form homo- and heterodimers**

Although we cannot rule out the existence of low affinity RNP complexes that dissociate before or during SEC, the previous results encouraged us to consider alternative explanations to the remarkable stability of extracellular non-vesicular tRNA halves. In the absence of protective protein partners, we envisioned RNAs could gain stability against degradation by folding into specific structures governed by intra- or intermolecular RNA-RNA interactions. The former case was shown for ncRNAs derived from flavivirus, where the adoption of specific folds protects the RNAs from the action of intracellular nucleases (22). To study this, we first performed *in silico* predictions of the most stable secondary structures these tRNA halves could adopt.

Analysis of 5' halves from tRNA^{Gly}_{GCC} and tRNA^{Glu}_{CUC} with *mFold* (24) predicted stable stem-loop structures comprising, respectively, nucleotides 2–17 and 2–18 with the same UGGU tetraloop in both cases (Figure 2A). The rest of the molecule did not show any predictable stable secondary structures. However, the unstructured segment showed near perfect self-complementarity, with an uninterrupted 8 nucleotide-long stretch of Watson and Crick or G:U pairing in the tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves (Figure 2B), as predicted by the *bifold* algorithm from the RNAstructure web server (<http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/>). This suggest that tRNA halves from certain glycine acceptors have a sequence that is amenable to homodimerization, while heterodimerization is attainable in the case of Gly/Glu tRNA halves (Figure 2, C). An inspection of the Modomics database (<http://modomics.genesilico.pl/>) of mature tRNA post-transcriptional modifications did not show reported modified bases in the tRNA precursors that could interfere with base pairing interactions in the dimerization interface (Figure 2C).

To provide further insight into the ability of these 5' tRNA halves to form dimers, unrestrained *ab initio* three-dimensional folding simulations using *simRNA* (25) were performed as described in Supplementary Methods. Such calculations provide 3D structural models that can be further used to explore dimer dynamics and interactions with other macromolecules or ligands. The main folded state predicted by this method corresponded to *bifold* predictions for tRNA^{Gly} homodimers (Figure 2D and Supplementary Figure S1). The main folded state for Gly/Glu heterodimers also resembled *bifold* predictions, with equivalent population as for Gly/Gly homodimers (Figure 2E). Noteworthy, the ability of these structures to hide their 3' ends could render them less prone to degradation by cellular 3'–5' exonucleases. In agreement with *bifold*, tRNA^{Glu} homodimers were less favored by *simRNA*, with a 2-fold reduction in the population associated to the main folded state (Supplementary Figure S1).

To address whether tRNA 5' halves dimerization ability is a consequence of the high G/C/U content of tRNAs instead of a specific feature of tRNA^{Gly}_{GCC} and tRNA^{Glu}_{CUC}, *bifold* calculations were applied to all predicted human tRNA genes from the genomic tRNA database (GtRNAdb, comprising 610 predicted tRNA genes in the human genome version hg19), to assess the capacity of their 5'

halves to form homodimers. For ranking this in a genome-wide scale, mature tRNA sequences were truncated to thirty nucleotides from their 5' end and then the percentage of bases forming intra- or inter-molecular base pairing interactions was computed. From the starting 346 non-redundant 30 nt sequences, only 9 showed a percentage of dsRNA content $\geq 80\%$, and three of these sequences were 5' fragments from different tRNA^{Gly}_{GCC} sequences (Supplementary Figure S2). This means that 5' tRNA halves are not, in general, capable of forming the kind of homodimers that we predicted for tRNA^{Gly}_{GCC}.

To rule out a possible bias in restricting only to 30 nt 5' tRNA fragments, we studied the most abundant tRNA-derived sequences present in the intracellular compartment of MCF-7 cells, irrespectively of their length and start position. In this case, only tRNA^{Gly}-derived sequences of 30 nucleotides reached an 80% of dsRNA bases, while tRNAs accepting amino acids other than glycine scored much lower (Figure 3). Moreover, the tRNA^{Gly}-derived sequences that maximized their homodimer forming potential corresponded to those being more abundant in the extracellular (but not the intracellular) space. Thus, the bias towards 5' halves from tRNA^{Gly} in the extracellular milieu could be a consequence of their specific capacity to form homodimers, what could render them less sensitive to single-stranded endonucleases (e.g. RNaseA family members).

5' halves from tRNA^{Gly} dimerize spontaneously *in vitro*

To verify the *in-silico* predictions, we first determined the expected elution volume for labelled single-stranded and double-stranded short (<30 nt) oligonucleotides by SEC, and defined dimer (D) and monomer (M) elution volumes by analyzing the shift in the 260 and 495 nm (6-FAM) absorbance (Supplementary Figure S3).

Mimics of tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves (of either 30 or 31 nucleotides) defined a bimodal profile with maximums close to the D and M peaks (Figure 4A). As expected for monomer-dimer equilibrium, the D/M ratio increased as a function of the concentration of injected RNA (Figure 4B). This behavior was not dependent on the presence or absence of a 5' phosphate group (Supplementary Figure S4A). Importantly, the absorbance of the D peak grew linearly with the square of the absorbance of the M peak (Supplementary Figure S4B), which is characteristic and expected in a monomer-dimer equilibrium (Supplementary Figure S4D). With the empirically calculated molar extinction coefficient of the RNA, we determined a dissociation constant of approx. $3\mu\text{M}$ for these dimers in PBS. Of note, the RNAs aggregated under conditions typically used for native gel electrophoresis, as evidenced by SEC analysis in 90 mM Tris-borate buffer pH 8.3 (data not shown). Thus, SEC was considered as the most suitable technique to study these tRNA-derived fragments under pH and osmolarity conditions representative of the extracellular space (PBS).

To validate our predictions, we designed a mutant in the dimerization interface by substituting a uracil for a cytosine (25U/C mutant). As expected, the behavior of this mutant was exclusively monomeric (Figure 4A). However, this mutant was designed in order to keep complementarity with tRNA^{Glu}_{CUC} 5' halves, which do not form homod-

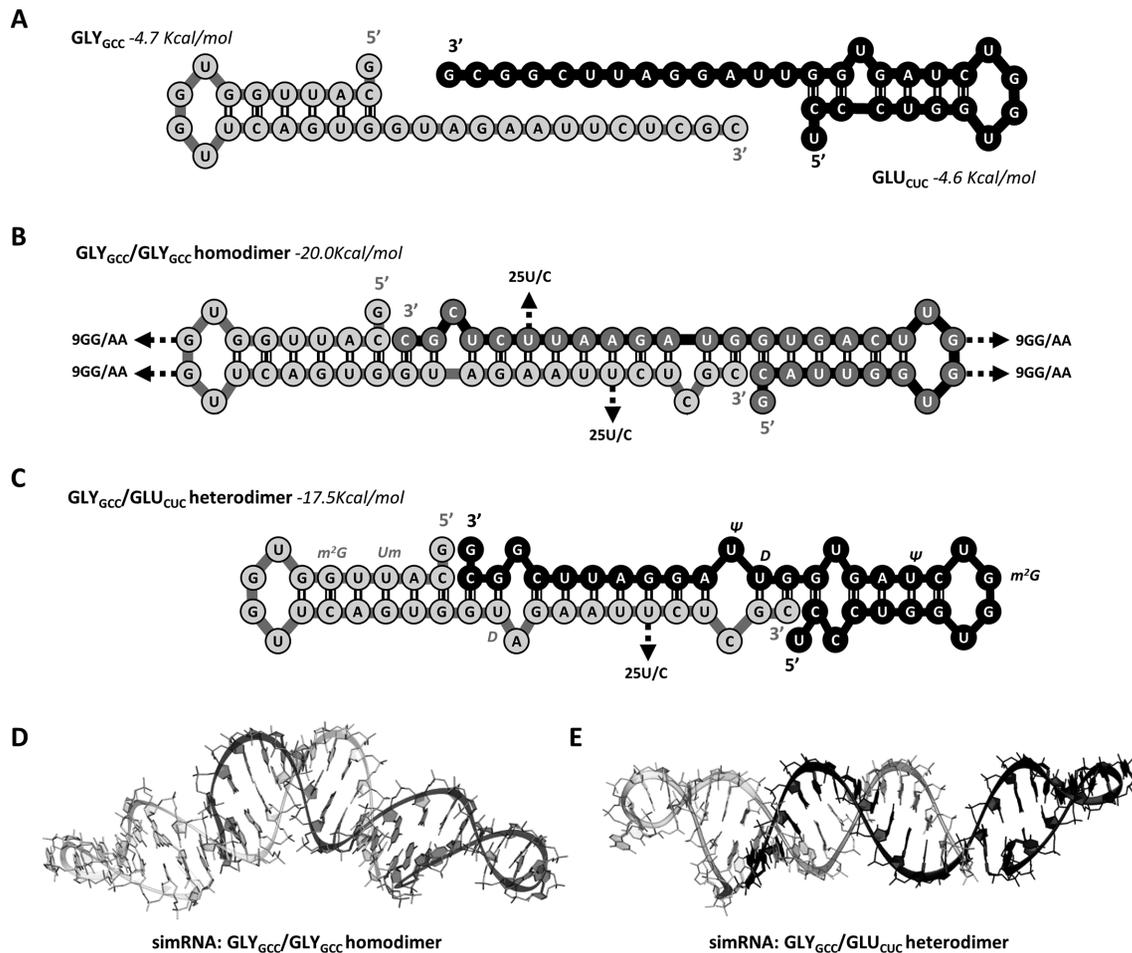


Figure 2. Predicted secondary structures and putative dimers of the most abundant 5' halves from tRNA^{Gly} and tRNA^{Glu} found in the conditioned medium of MCF-7 cells. (A) Most stable secondary structures of the monomers, as predicted by *mFold*. (B) Homodimers of tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves, as predicted by *Bifold*. Arrows show the substituted bases in the mutants (25U/C and 9GG/AA) used in this study. (C) Heterodimers of tRNA^{Gly}_{GCC} and tRNA^{Glu}_{CUC} 5' halves. Modified bases in the tRNA precursors (according to the *Modomics* database) are superimposed. The arrow shows the 25U/C mutant, which cannot homodimerize but can still form heterodimers with 5' halves from tRNA^{Glu}_{CUC}. (D, E) Representative structures of the main folded state of Gly/Gly homodimers (D) and Gly/Glu heterodimers (E) as predicted by *ab initio* bi-molecular simulations using *simRNA*.

imers. Consequently, an equimolar mixture of tRNA^{Glu}_{CUC} 5' halves and the 25U/C mutant still retained absorbance in the dimer elution volume (Supplementary Figure S5). Finally, a second mutant (9GG/AA) where both guanines are swapped for adenines in the UGGU tetraloop (which does not participate in putative dsRNA interactions) showed a dimerization capacity that was comparable to the wild-type sequence (Figure 4A), strongly supporting *in-silico* structural predictions (Figure 2 and Supplementary Figure S1).

UV-melting experiments defined a melting temperature of 46.4°C for Gly/Gly homodimers, which was consistent with the melting temperature (47.8°C) measured by differential scanning calorimetry (Supplementary Figure S6). Both assays were performed at micromolar RNA concentrations to ensure the majority of molecules were initially present as dimers.

Dimerization of 5' halves from tRNA^{Gly} is dependent on the RNA 2'-OH hydroxyl group

It was reported that tRNA halves of Ala and Cys are capable of forming G-quadruplex-containing structures that promote stress granule formation and protect motor neurons. Interestingly, synthetic oligonucleotides with DNA instead of RNA backbone (but with uracil instead of thymine) were shown to retain these structural and functional properties (13). We tested whether mimics of 5' halves from tRNA^{Gly}_{GCC} were able to dimerize when they bear a DNA (2'-deoxy) backbone but negligible absorbance at the dimer peak was obtained in that case (Supplementary Figure S7). This observation suggested the involvement of the ribose hydroxyl group in specific local RNA folds besides the expected base pairs and the additional stabilization of the dimers.

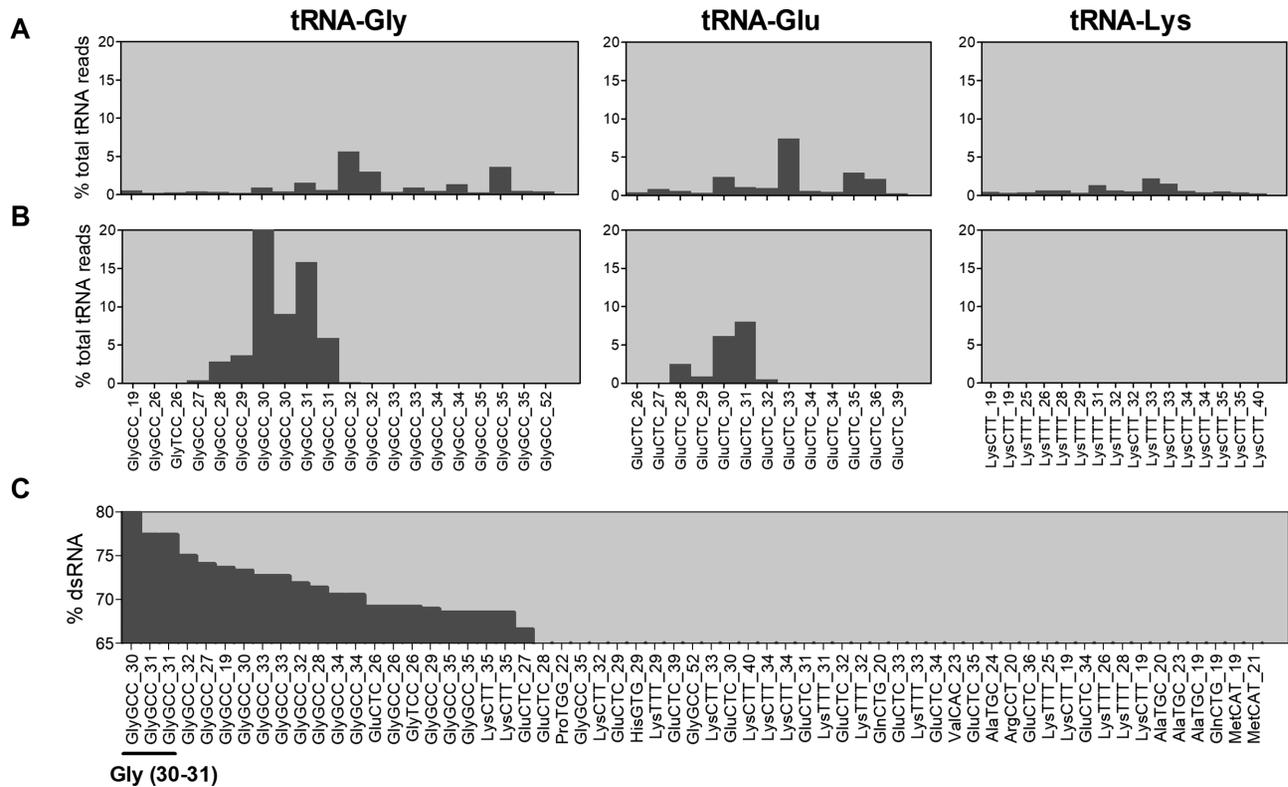


Figure 3. The tRNA fragments enriched in the extracellular space (non-EV fraction) are those with a higher dimerization potential. Histograms represent the percentage of total tRNA-derived reads in the intracellular (A) or the extracellular non-vesicular fraction (B) of MCF-7 cells. For all tRNA-derived sequences detected in the intracellular fraction, a prediction of their dimerization potential was performed by forcing the formation of homodimers using *bifold* (C) and ranking each unique sequence by the percentage of intra- or inter-molecular paired bases (%dsRNA). Unique sequences were labelled based on the tRNA they were presumably derived from and based on their size (i.e., tRNA_size). Sequences with the same size but corresponding to different tRNA isodecoders were treated separately but given the same name.

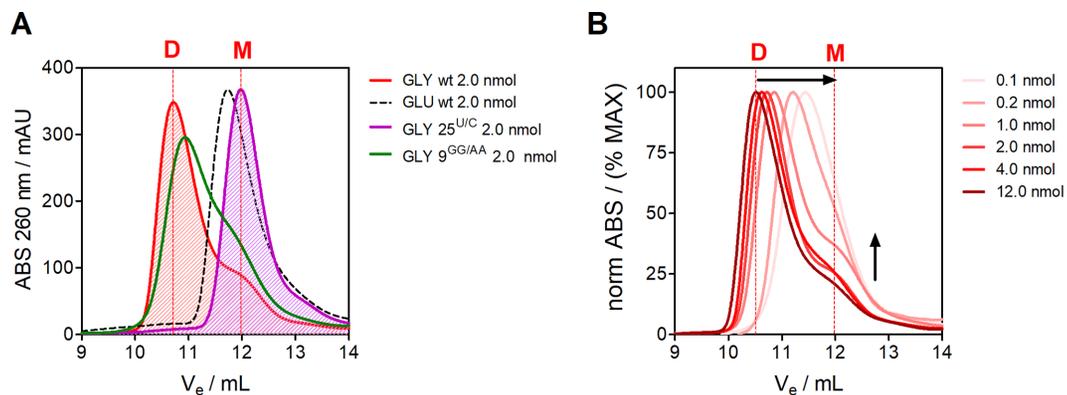


Figure 4. Synthetic unmodified tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves form homodimers *in vitro*. (A) Chromatograms show OD260 curves for sequences corresponding to wild-type tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves (red) and the 25U/C and 9GG/AA mutants (violet and green, respectively). A RNA oligonucleotide bearing the sequence of tRNA^{Glu}_{CUC} 5' halves is shown in black (dashed line). (B) Normalized chromatograms (maximum absorbance = 100%) of successive injections of synthetic tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves, spanning 0.1–12.0 nmol (light red – dark red). Arrows show how dilution provokes an increase of the monomer (M)/dimer (D) ratio, with the maximum absorbance shifting to higher elution volumes as a consequence of decreasing absorbance at the dimer peak.

5'-Halves from tRNA^{Ala} and tRNA^{Cys} form tetramers but not 5' halves of tRNA^{Gly}

A recent report has provided further insights on the G-quadruplex containing structures formed by tRNA^{Ala} and tRNA^{Cys} 5'-halves (23). It was shown that the terminal oligoguanine motif present in these sequences enabled the for-

mation of denaturation-resistant intermolecular tetramers stabilized by five consecutive G tetrads. We thought to use SEC to reproduce these findings, which were mostly based on electrophoretic mobility. DNA backbone (2'-deoxy)-containing oligonucleotides corresponding to 5' halves of tRNA^{Ala} and tRNA^{Cys} showed again two peaks, but no absorbance in the dimer region. In contrast, elution vol-

umes were consistent with monomer-tetramer equilibrium in this case (Supplementary Figure S8A). Moreover, incubation with the G-quadruplex labeling compound N-methylmesoporphyrin IX (NMM) showed the label exclusively associated with the oligomer peak, thus confirming the main findings of Lyons *et al.* (23). Oligonucleotides mimicking 5' halves of tRNA^{Ala} and tRNA^{Cys} were able to shift the absorbance maximum of NMM in solution from 378 (free) to 499 (bound) nm, while 5' halves of tRNA^{Gly} did not (Supplementary Figure S8B), indicating the lack of tetramerization of the latter.

Dimers of tRNA^{Gly} 5' halves are more resistant to RNase T1 digestion

To address whether dimer formation contributes to the stability of tRNA halves, we compared the *in vitro* sensitivity to RNase T1 digestion of synthetic 5' tRNA^{Gly}_{GCC} halves, the 25U/C and the 9GG/AA mutants. Since RNase T1 performs endonucleolytic cleavage adjacent to guanine bases in single-stranded RNAs, we hypothesized that the 9GG/AA mutants should be the most resistant, since these oligonucleotides are able to form dimers that do not carry single-stranded guanines. In contrast, we expected the 25U/C mutants to be degraded the fastest, as their inability to form dimers exposes a higher number of single-stranded guanines. However, since the putative dimers are present in dynamic equilibrium with their respective monomers, all RNAs should be degraded in prolonged digestions. Thus, we first optimized reaction conditions in order to obtain only partial, controlled degradation of the oligonucleotides.

The appearance of a transient degradation product (termed 'I', showing an elution volume of \approx 13 ml) was evident for both the 25U/C and 9GG/AA mutants, but non-detectable in the wild-type tRNA^{Gly} 5' halves (Figure 5A). When increasing the amount of RNase T1 10-fold, this intermediate was lost, and all absorbance at 260 nm shifted to elution volumes \geq 14.0 ml, corresponding to fully degraded products. Considering this intermediate could correspond to the stem-loop structure predicted in position 2–17 of tRNA^{Gly} 5' halves, their lack of detection in the wild-type sequences is consistent with the UGGU tetraloop being the unique RNase T1 target site in the dimers.

For controlled RNase T1 digestion experiments, we decreased the temperature to 20°C to reduce the fraction of molecules in monomeric state, and increased the amount of RNase T1 in order to assure detection of the 'I' peak in 9GG/AA mutants. Under such conditions, \sim 25% of the absorbance of 9GG/AA mutants remained below an elution volume of 14.0 ml (i.e. not forming fully-degraded products). This was significantly higher ($P < 0.001$) than the number of remaining oligonucleotides after digestion of wild-type sequences in parallel experiments (Figure 5B). This supports our prediction that the UGGU tetraloop spanning positions 8–11 is the only guanine-containing single-stranded sequence in the dimers under study. In contrast, 25U/C mutants were almost entirely degraded under the same conditions, confirming our predictions.

Enzymatic digestions conditions were scaled for the analysis of digested products by denaturing gel electrophoresis, as explained in methods. At 1U RNase T1, the 25U/C mu-

nants were completely digested, while digestion intermediates (lost at higher enzyme concentrations) were still evident in the wild-type sequence (Figure 5C). In agreement with SEC results, the 9GG/AA mutant was the most stable, with intact oligonucleotides still present at 1 U RNase T1.

Analysis of endonuclease/exonuclease digestion products supports structural models.

Besides confirming differential stabilities against RNase T1 (with 9GG/AA > WT > 25U/C), we asked whether the digestion intermediates identified in Figure 5C were consistent with our structural models and the rationale summarized in Figure 5D. If, according to our previous claim, the UGGU tetraloop is the only RNase T1 target site within the WT tRNA^{Gly} dimers, this would result in a transient product of 20 or 21 nucleotides (depending on which of the two guanines is cleaved). This is evident from Figure 5C, and also appears as a major intermediate at very low (0.01 U) enzyme concentrations (Supplementary Figure S9A). This intermediate was never observed in the 9GG/AA mutant. In contrast, the band of approximately 18 nt (Figure 5C, and Supplementary Figure S9, A) possibly corresponds to the stem-loop structure of the monomer, which we previously termed 'I' by SEC (Figure 5A), and is mutually exclusive with the 20–21 nt product observed in the WT sequence.

To gain further insights, we treated RNAs with the 3'-5' single stranded Exonuclease T. This enzyme is used to generate blunt ends in dsRNAs containing 3' overhangs, meaning it stops when reaching the first double-stranded RNA interaction starting from the 3' end. As a control for this activity, we tested a scrambled version of tRNA^{Gly} (SCR), which does not dimerize but contains three predicted dsRNA interactions at its 3' end. As expected, no cleavage was observed (Supplementary Figure S9B), demonstrating lack of residual endonuclease activity in the enzyme. In contrast, WT oligonucleotides were degraded to a product of approximately 17 nt (i.e. lost 13 nt from their 3' end), which corresponds to the stem loop structure of the monomer, which is the predicted substrate of the enzyme (Supplementary Figure S9B and C). Presumably as a consequence of an internal folding in the monomer 3' tail, only two nucleotides were cleaved in the 25U/C mutants. Although this interaction is also possible in the WT sequence, its formation competes with enzymatic digestion, as dissociation of the dimer and degradation of the monomer are in dynamic equilibrium. In any case, it should be noted that the 3' end of the WT sequence is less exposed than in the 25U/C mutant, as 2.5 enzymatic units preserve most of the former while completely transforming the latter to a mixture of -1 and -2 nt products (Supplementary Figure S9C).

Dimerization capacity dictates the intracellular turnover of tRNA^{Gly} 5' halves

The previous results do not only provide strong support to the structures shown in Figure 2, but also demonstrate that dimerization contributes to the resistance of these tRNA halves towards single-stranded endonucleases. To study this in a more biologically-relevant scenario (which

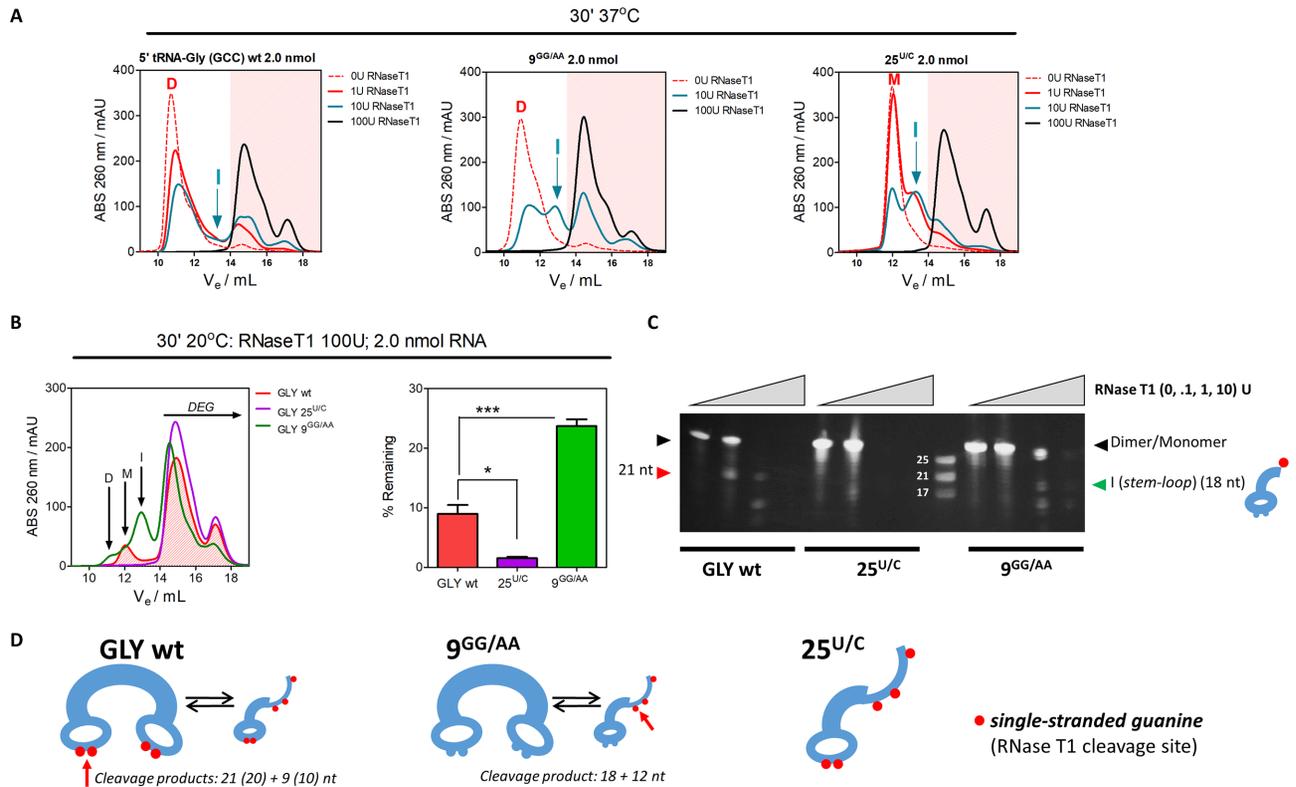


Figure 5. Controlled RNase T1 digestion of tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves and selected mutants show dimerization capacity correlates with resistance to endonuclease cleavage. (A) Increasing amounts of RNase T1 (30 min, 37°C) show transient appearance of a partial digestion product (termed 'I') in the 25U/C and 9GG/AA mutants, and full-degradation products with elution volumes higher than 14.0 ml (shaded in red). D, M, I: dimer, monomer, and intermediate, respectively. (B) Controlled digestion with 100U RNase T1 at 20°C of equimolar quantities of wild-type tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves (red), the 25U/C mutant (violet), and the 9GG/AA mutant (green). The absorbance at elution volumes below 14.0 ml (not fully-degraded products) was quantified and expressed as the percentage of total absorbance at 260 nm. One-way ANOVA with Tukey post-hoc test was performed to address statistical significance in three replicates of each experiment (**P* < 0.05, ****P* < 0.0001). (C) Digestion of heat-denatured and room temperature refolded 100 pmol RNA oligonucleotides diluted in 1 × PBS with varying amounts (0, 0.1, 1 and 10 enzymatic units) of RNase T1 for 30 min at 20°C. Digested products were analyzed in a 20% denaturing (7 M urea) polyacrylamide gel. The mutually exclusive 21 and 18 nt intermediates are shown with red and green arrows, respectively. (D) Schematic representation of predicted RNase T1 cleavage sites in dimers and monomers of the oligonucleotides used in this study, indicating the sizes of the expected primary products after cleavage at the indicated positions. The red dots indicate the presence of single-stranded guanines.

includes a cocktail of endo and exonucleases), we transfected MCF-7 cells with 5' biotinylated versions of wild-type 5' halves of tRNA^{Gly} (WT), the 25U/C and 9GG/AA mutants, and a scrambled (SCR) version of tRNA^{Gly} 5' halves, where different bases were shuffled in order to prevent any stable secondary structures and alter the dimerization interface. A lipofectamine-RNA (100 nM) mixture was incubated with the cells for 30 min, fresh medium was added (*t* = 0), and immunofluorescence microscopy was performed at different time points, using a Streptavidin-APC conjugate to detect and quantify transfected RNA. As evidenced by the cell area-normalized total APC fluorescence at *t* = 0, transfection efficiencies were comparable for the four tested RNAs. At 6 h post transfection, SCR and 25U/C mutants (dimerization incompetent) were decreased to basal (i.e. non-transfected) levels. In contrast, WT and 9GG/AA oligonucleotides (dimerization competent) were not degraded to any significant level (Figure 6A, B, D). Similar results were obtained by performing relative quantization of WT and SCR sequences by SL-RT-qPCR (Figure 6C). The fast turnover of dimerization incompetent RNAs was due to intracellular degradation and not a consequence

of preferential secretion, as extracellular levels of SCR were also much lower than WT (Figure 6E).

tRNA^{Gly} 5' halves elute as dimers in MCF-7 cell lysates

To assess whether endogenous tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves exist as monomers or dimers inside a cell, we lysed MCF-7 cells under conditions which would denature proteins while preserving RNA intermolecular interactions (PBS + 0.1% SDS). Cell pellets were resuspended in cold lysis buffer, passed successively through a syringe needle and filtered by 0.22 μm. The lysates were analyzed by SEC under non-denaturing conditions (PBS) and a representative chromatogram is shown in Figure 7A. We hypothesized that the OD260 peak at *V*_e = 10.0 ml corresponds to full-length mature tRNAs, and confirmed this by injecting a gel-purified commercial yeast tRNA^{Phe} standard (Figure 7A, inset).

Given that synthetic 5' halves from tRNA^{Gly}_{GCC} bearing a 5' phosphate defined a dimer peak at *V*_e = 10.3 ml in the same column (Supplementary Figure S4), we had a narrow but still useful margin to discriminate between dimers of tRNA halves and the highly abundant full-length mature

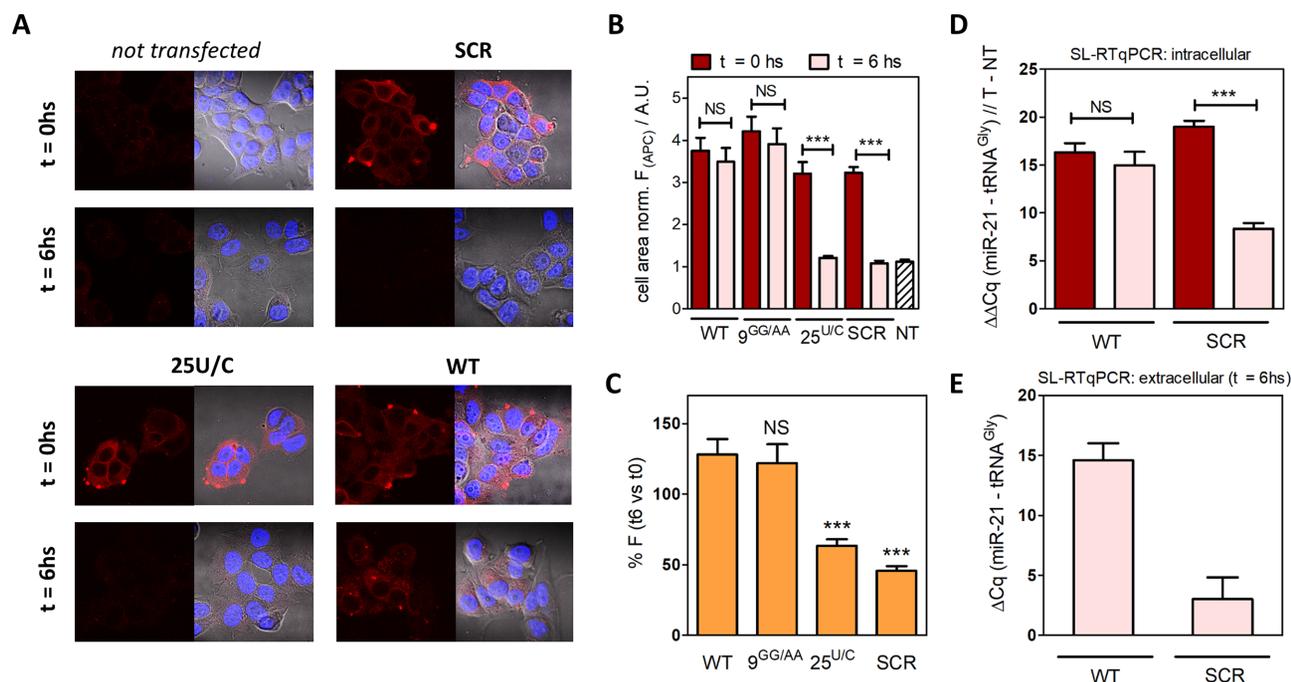


Figure 6. The dimerization capacity of tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves correlates with their intracellular stability. Biotinylated RNA oligonucleotides (100 nM) with the sequence of tRNA^{Gly} 5' halves (WT), the 9GG/AA and 25U/C mutants, or a scrambled version of WT where different bases were shuffled in order to disrupt folding and dimer interactions (SCR) were transfected in MCF-7 cells with cationic lipids. After incubation for 30 min at 37°C, cells were washed, and immediately fixed (*t*0) or incubated for further 6 h (*t*6) before fixing. Cells were then incubated with streptavidin conjugated to APC, and subjected to fluorescence microscopy (A). A minimum of 45 random fields was analyzed and the total APC fluorescence was normalized to the cell area covered in each field (B). This experiment was repeated three times, in order to obtain the percentage of APC fluorescence per cell area between *t* = 6 h and *t* = 0 (C). Intracellular levels of the transfected RNAs were also analyzed by SL-RT-qPCR, using miR-21-5p as a reference, and subtracting the ΔCq values between transfected and non-transfected cells (D). Measurements of transfected RNAs in the extracellular space after successive washing of the cells were also performed in order to address whether the decreased levels of SCR were due to degradation or preferential secretion (E). In all cases, statistical analysis corresponds to one-way ANOVA with Tukey post-hoc test. Significance was studied between specified conditions (A, B) or versus WT (C). ****P* < 0.0001. NS: not significant (*P* > 0.05). NT: non-transfected cells.

tRNA population. Interestingly, analysis of collected fractions by SL-RT-qPCR showed that tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves peaked closer to the predicted dimer elution volume than to the tRNA peak, Figure 7B), with negligible detection at the elution volume corresponding to the monomers (~12 ml). As a control, miR-21-5p (which amplifies similarly to tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves in MCF-7 intracellular extracts) (8) was only detected as a monomer. To exclude the possibility that our SL-RT-qPCR system was cross-reacting with mature tRNAs, we repeated the assay without heat-denaturing the RNA before reverse transcription (Figure 7C and D), confirming an amplification maximum in the expected dimer fractions and inconsistent with the elution profile of full-length tRNAs. Furthermore, bands of ~30 nt appeared when the same fractions were analyzed by gel electrophoresis under denaturing conditions (Figure 7E and F) including those where full-length tRNAs were virtually undetectable (*V_e* = 10.7 ml). Overall, these results strongly suggest that endogenous tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves are present in the intracellular compartment as dimers.

DISCUSSION

While certain specific small RNA families are present in some organisms and absent in others (indicative of their first appearance in evolution and later lineage-specific losses)

(26), tRNA-derived fragments have been reported in virtually any organism in which they were looked for. Abundant cellular non-coding RNAs can be cleaved to produce fragments in a regulated fashion (9,10,27) or constitute relatively stable degradation intermediates easily detectable by high throughput sequencing or Northern blot. In any case, evidence is accumulating that at least some of these fragments can play various roles inside or between cells that are not necessarily related to the molecular function of their precursors (18).

tRNA-derived fragments (including the shorter tRFs and the larger tRNA halves) have long been recognized as a new family of small regulatory RNAs present in all kingdoms of life (28–33). In mammals, some of their documented roles are related to translation inhibition and stress-response (11,13) and the silencing of transposable elements, which has been shown both for short 18–22 nt tRFs (34) and longer 30–31 nt tRNA halves (19).

The involvement of tRNA-derived fragments in gene silencing is sequence-based. We speculated that structural constraints might also be functionally relevant. Structure may specify interactions in an aptamer-like fashion or increase the half-life of the RNAs by rendering them less prone to degradation. In support of the former, it has been shown that the oligo-guanine motif present in the extreme of tRNA^{Ala} and tRNA^{Cys} 5' halves is necessary for their in-

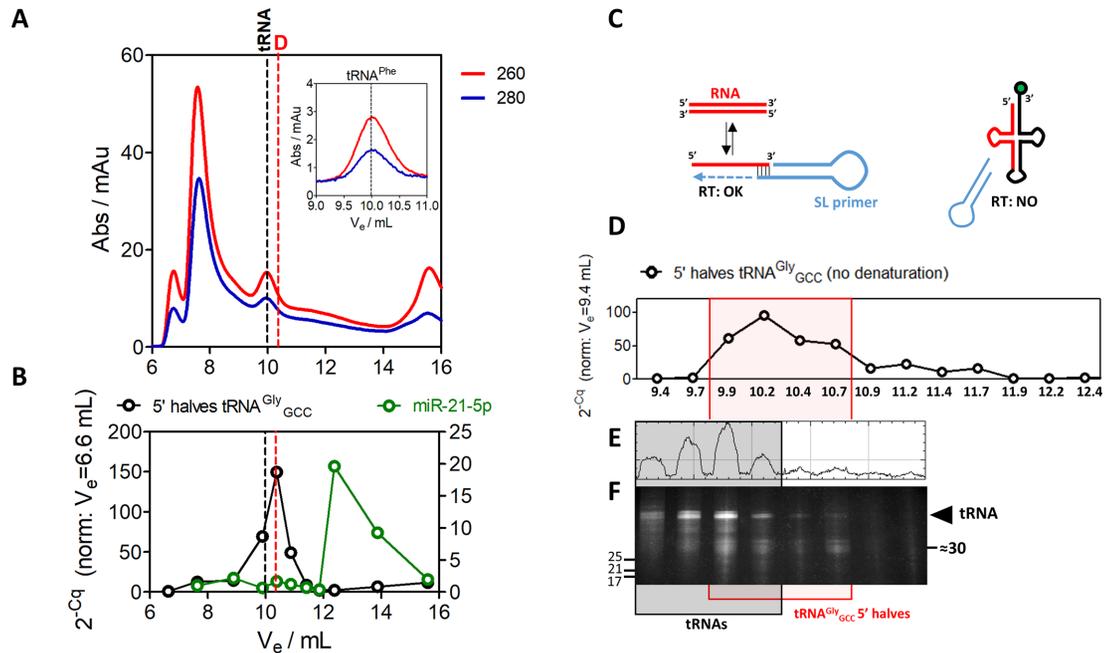


Figure 7. Endogenous tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves elute as dimers in MCF-7 cell lysates. MCF-7 cells were lysed in PBS + 0.1% sodium dodecyl sulfate. Filtered and centrifuged lysates were injected in a Superdex S75 10/300 column (A). In parallel, a gel-purified commercial yeast tRNA^{Phe} standard was run, confirming the OD260 peak at $V_e = 10.0$ ml corresponds to full-length mature tRNAs (inset). Analysis of tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves by SL-RT-qPCR (B) showed maximum amplification in fractions closer to the dimer peak ($V_e = 10.3$ ml) than to the tRNA peak (black, left axis). As a control, miR-21-5p was only amplified in fractions corresponding to monomeric forms (green, right axis). Quantification cycles (Cq) were converted to linear scale (expressed as 2^{-Cq}), and normalized to the value at the exclusion volume ($V_e = 6.6$ ml). We repeated SL-RT-qPCR of collected fractions (in the 9.4–12.4 ml range, normalizing to $V_e = 9.4$ ml) but avoided heating the samples before reverse transcription (C). The amplification profile (D) was shifted two fractions (0.50 ml) to the right respect to the elution profile of full length mature tRNAs. This was assessed by running each fraction (after concentration by ethanol precipitation) in a 15% denaturing (7 M urea) polyacrylamide gel, and staining with SYBR gold (E and F). Densitometry analysis (E) was performed with the ImageJ software by plotting the gray value across a line spanning all lanes of the gel, at the migration line corresponding to full-length tRNAs.

teraction with the translation regulator YB-1 (11) and for their G quadruplex-mediated tetramerization (13,23). This strongly suggests that it is the structure that mediates the interaction with the protein, although the role of these tRNA halves in inhibiting translation initiation goes beyond their interaction with YB-1 (35). In support of the latter, we have demonstrated here that the capacity of tRNA^{Gly} 5' halves to form homodimers correlates with their intracellular and *in vitro* stability, and may explain the remarkable extracellular stability observed for these small RNAs.

The mechanism underlying the release of tRNA-derived fragments from cells leading to the non-EV extracellular fraction is still a matter of investigation. The 5' tRNA halves studied herein can be secreted from cells as such or, alternatively, be a consequence of extracellular tRNA cleavage. This idea is particularly attractive because Angiogenin, the endonuclease responsible for the biogenesis of tRNA halves, is secreted (9,10). Furthermore, the recombinant RNase inhibitor we used in Figure 1 actually corresponds to the natural Angiogenin inhibitor in the cytoplasm, though it has a broad spectrum for RNase A, B, and C family members in general. Specific sequencing techniques different from those used in this study are needed to retrieve full-length tRNAs (36–39), which can outnumber tRNA-derived fragments in the extracellular space (40). Nevertheless, we have shown that a variety of small RNAs (including rRNA and snoRNA-derived sequences) can be sequenced in the 'H' peak of cell-conditioned medium when

inhibiting RNase activity, while tRNA^{Gly} and tRNA^{Glu} 5' halves were essentially the only detectable species when the same techniques were applied in RNase-active medium. This strongly supports differential stability as a key aspect for the accumulation of specific tRNA halves in the extracellular space, though this does not exclude that differential secretion of tRNA halves or full-length tRNAs might contribute as well. In summary, four non-mutually exclusive scenarios can be envisioned to explain non-EV extracellular enrichment of tRNA^{Gly}_{GCC} and tRNA^{Glu}_{CUC} 5' halves: (a) selective secretion of these fragments, (b) non-selective secretion of tRNA halves, and enrichment of these fragments because of their high extracellular stability, (c) selective secretion of full-length tRNA^{Gly} and tRNA^{Glu}, and extracellular processing (e.g. by extracellular Angiogenin), (d) non-selective secretion of tRNAs, extracellular processing, and enrichment of the 5' halves under study because of their differential extracellular stability.

Although we focused in tRNA^{Gly} and tRNA^{Glu} 5' halves because of their abundance in the extracellular space of human cancer cell lines (8), their ability to form homo- or heterodimers might be also important for defining their intracellular concentration and function. Surprisingly, SL-RT-qPCR analysis of tRNA^{Gly}_{GCC} 5' halves in MCF-7 cell lysates showed maximum amplification in the fractions corresponding to the expected elution volume of the dimers, not the monomers. Furthermore, fractions which corre-

sponded to dimers or full-length tRNAs under native separation (i.e. SEC) revealed substantial amounts of RNAs ~ 30 nt under denaturing conditions (Figure 7). Although this could be explained by either nicked tRNAs or dimers of 5' halves, the shift towards slightly higher elution volumes (i.e. more compact) of the fragments, and the amplification of tRNA halves by SL-RT-qPCR in the absence of heat denaturation strongly suggest the latter. Moreover, the dissociation constant for endogenous dimers seems to be much lower than measured for synthetic oligonucleotides, as the monomer/dimer ratio was greatly reduced in this experiment.

It will be worth studying whether single-point substitutions in tRNA^{Gly} 5' halves that are not capable of forming dimeric hybrids still retain the capacity to silence genes controlled by the endogenous retroelement MERVL in mouse embryos (19). Recent reports have also connected tRNA-derived fragments with LTR-retrotransposon control (34). Since these transposable elements use a tRNA molecule to prime reverse transcription, the idea that dimers of tRNA-halves could interfere (for example by competition) with these mechanisms is very attractive. Alternatively, dimerization can be dispensable for target recognition, but necessary to protect the RNAs from degradation, thereby increasing their extracellular half-life and/or intracellular steady-state levels. Since monomers and dimers are in dynamic equilibrium, the dimer might serve as a reservoir of functional monomer, or might be the functional entity by itself.

CONCLUSION

Our results demonstrate that it is the capacity of tRNA^{Gly} 5' halves to form homodimers, rather than their specific primary sequence, that dictates their intracellular stability. Although others have shown that aggregation of certain tRNA halves into tetrameric structures resistant to thermal and denaturing agent-mediated unfolding is functionally important (23), we provide the first evidence that intermolecular association of small RNAs can strongly impact their steady-state levels inside (and possibly also outside) live cells.

Is the tendency of tRNA-derived fragments to aggregate into supramolecular dsRNA-containing structures evolutionary ancient? It is well known that several tRNA genes in mammals contain introns with the two exonic sequences actually corresponding to 5' and 3' halves. Moreover, it has been shown that several Archaea combine separate genes coding for 5' and 3' halves (or even smaller fragments) in order to create functional tRNAs by trans-splicing (41–43). Some authors have proposed that modern cloverleaf tRNAs may have evolved by asymmetric association of genes coding for their 5' and 3' halves (18,44,45). Such a process would lead to high tRNA diversity from a smaller initial gene set. If this were the case, we speculate that afterwards, with 5'-3' fusions present at the genomic level, tRNA fragmentation would be necessary to reconstitute 5'-5' hybrids.

Besides evolutionary considerations, it is noteworthy that different human tRNA genes can produce 5' halves with the capacity of forming homodimers or homotetramers. Although we have not provided a specific function for the dimers of tRNA^{Gly} 5' halves, we have shown dimerization renders the tRNAs less prone to degradation and increases

the half-life of transfected synthetic RNAs in comparison with single-point mutants or shuffled sequences incapable of self-association. Overall, we would like to highlight that tRNA-derived fragments (and ncRNA fragments in general) are able to adopt specific secondary, tertiary and quaternary (i.e., intermolecular) structures that might also dictate function. Besides RNA/target RNA base-pairing interactions, our biochemical results point to a new layer of complexity at the three-dimensional level.

DATA AVAILABILITY

Sequencing data is available from the NCBI's small read archive (SRA) under the BioProject ID: PRJNA454316

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank Ricardo Ehrlich, Mónica Marín and Tamara Fernández for fruitful discussions and for supplying yeast tRNA^{Phe}. Agustín Correa, Federico Carrión, Gonzalo Greif and Carlos Robello assisted with SEC, DSC and sequencing, respectively. The authors want to thank members of the following facilities at IPMon: UPR, UBP and UBM. Members of the Enzymology Lab (Faculty of Science, Universidad de la República) assisted with UV-melting experiments.

FUNDING

Comisión Sectorial de Investigación Científica (Universidad de la República, Uruguay); Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay); FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund) [COF 03/11]. E.W. acknowledges the support of the LABEX 'ANR-10-LABX-0036.NETRNA'; French Embassy in Uruguay for travel expenses. J.P.T., S.P., L.D. and A.C. are researchers and received funding from PEDECIBA (Uruguay) and/or the Sistema Nacional de Investigadores (ANII, Uruguay). L.D. acknowledges ANII and IPMon for funding his postdoctoral fellowship. Funding for open access charge: IPMon intramural funds.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J. and Lötval, J.O. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.*, **9**, 654–659.
- Witwer, K.W. (2015) Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions. *Clin. Chem.*, **61**, 56–63.
- Thomou, T., Mori, M.A., Dreyfuss, J.M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., Rao, T.N., Winnay, J.N., Garcia-Martin, R., Grinspoon, S.K. *et al.* (2017) Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*, **542**, 450–455.
- Sorrentino, S. (2010) The eight human "canonical" ribonucleases: molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Lett.*, **584**, 2194–2200.

5. Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D. and Remaley, A.T. (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.*, **13**, 423–433.
6. Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D. and Galas, D.J. (2010) Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7248–7259.
7. Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L. *et al.* (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 5003–5008.
8. Tosar, J.P., Gámbaro, F., Sanguinetti, J., Bonilla, B., Witwer, K.W. and Cayota, A. (2015) Assessment of small RNA sorting into different extracellular fractions revealed by high-throughput sequencing of breast cell lines. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 5601–5616.
9. 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.
10. Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G.F. and Anderson, P. (2009) Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J. Cell Biol.*, **185**, 35–42.
11. Ivanov, P., Emará, M.M., Villen, J., Gygi, S.P. and Anderson, P. (2011) Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol. Cell.*, **43**, 613–623.
12. Saikia, M., Jobava, R., Parisien, M., Putnam, A., Krokowski, D., Gao, X.H., Guan, B.J., Yuan, Y., Jankowsky, E., Feng, Z. *et al.* (2014) Angiogenin-cleaved tRNA halves interact with cytochrome c, protecting cells from apoptosis during osmotic stress. *Mol. Cell Biol.*, **34**, 2450–2463.
13. Ivanov, P., O'Day, E., Emará, M.M., Wagner, G., Lieberman, J. and Anderson, P. (2014) G-quadruplex structures contribute to the neuroprotective effects of angiogenin-induced tRNA fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111**, 18201–18206.
14. Honda, S., Loher, P., Shigematsu, M., Palazzo, J.P., Suzuki, R., Imoto, I., Rigoutsos, I. and Kirino, Y. (2015) Sex hormone-dependent tRNA halves enhance cell proliferation in breast and prostate cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **112**, E3816–E3825.
15. Goodarzi, H., Liu, X., Nguyen, H.C., Zhang, S., Fish, L. and Tavazoie, S.F. (2015) Endogenous tRNA-Derived fragments suppress breast cancer progression via YBX1 displacement. *Cell*, **161**, 790–802.
16. Kim, H.K., Fuchs, G., Wang, S., Wei, W., Zhang, Y., Park, H., Roy-Chaudhuri, B., Li, P., Xu, J., Chu, K. *et al.* (2017) A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis. *Nature*, **552**, 57–62.
17. Rudinger-Thirion, J., Lescure, A., Paulus, C. and Frugier, M. (2011) Misfolded human tRNA isodecoder binds and neutralizes a 3' UTR-embedded Alu element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, E794–E802.
18. Schimmel, P. (2017) The emerging complexity of the tRNA world: mammalian tRNAs beyond protein synthesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 45–58.
19. Sharma, U., Conine, C.C., Shea, J.M., Boskovic, A., Derr, A.G., Bing, X.Y., Belleanne, C., Kucukural, A., Serra, R.W., Sun, F. *et al.* (2016) Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science*, **351**, 391–396.
20. Dhahbi, J.M., Spindler, S.R., Atamna, H., Yamakawa, A., Boffelli, D., Mote, P. and Martin, D.I. (2013) 5' tRNA halves are present as abundant complexes in serum, concentrated in blood cells, and modulated by aging and calorie restriction. *BMC Genomics*, **14**, 298.
21. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. and Burwinkel, B. (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7223–7233.
22. Akiyama, B.M., Laurence, H.M., Massey, A.R., Costantino, D.A., Xie, X., Yang, Y., Shi, P.Y., Nix, J.C., Beckham, J.D. and Kieft, J.S. (2016) Zika virus produces noncoding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease. *Science*, **354**, 1148–1152.
23. Lyons, S.M., Gudanis, D., Coyne, S.M., Gdaniec, Z. and Ivanov, P. (2017) Identification of functional tetramolecular RNA G-quadruplexes derived from transfer RNAs. *Nat. Commun.*, **8**, 1127.
24. Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3406–3415.
25. Boniecki, M.J., Lach, G., Dawson, W.K., Tomala, K., Lukasz, P., Soltysinski, T., Rother, K.M. and Bujnicki, J.M. (2016) SimRNA: a coarse-grained method for RNA folding simulations and 3D structure prediction. *Nucleic Acids Res.*, **44**, e63.
26. Fromm, B., Billipp, T., Peck, L.E., Johansen, M., Tarver, J.E., King, B.L., Newcomb, J.M., Sempere, L.F., Flatmark, K., Hovig, E. *et al.* (2015) A uniform system for the annotation of vertebrate microRNA genes and the evolution of the human microRNAome. *Annu. Rev. Genet.*, **49**, 213–242.
27. Emará, 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.
28. Martínez, G., Choudhury, S.G. and Slotkin, R.K. (2017) tRNA-derived small RNAs target transposable element transcripts. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 5142–5152.
29. Kumar, P., Mudunuri, S.B., Anaya, J. and Dutta, A. (2015) tRFdb: a database for transfer RNA fragments. *Nucleic Acids Res.*, **43**, D141–D145.
30. Gebetsberger, J., Zywicki, M., Künzi, A. and Polacek, N. (2012) tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii*. *Archaea*, **2012**, 260909.
31. 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.
32. Lee, Y.S., Shibata, Y., Malhotra, A. and Dutta, A. (2009) A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev.*, **23**, 2639–2649.
33. 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.
34. Schorn, A.J., Gutbrod, M.J., LeBlanc, C. and Martienssen, R. (2017) LTR-Retrotransposon Control by tRNA-Derived Small RNAs. *Cell*, **170**, 61–71.
35. Lyons, S.M., Achorn, C., Kedersha, N.L., Anderson, P.J. and Ivanov, P. (2016) YB-1 regulates tRNA-induced Stress Granule formation but not translational repression. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 6949–6960.
36. Gogakos, T., Brown, M., Garzia, A., Meyer, C., Hafner, M. and Tuschl, T. (2017) Characterizing expression and processing of precursor and mature human tRNAs by Hydro-tRNAseq and PAR-CLIP. *Cell Rep.*, **20**, 1463–1475.
37. Shigematsu, M., Honda, S., Loher, P., Telonis, A.G., Rigoutsos, I. and Kirino, Y. (2017) YAMAT-seq: an efficient method for high-throughput sequencing of mature transfer RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **45**, e70.
38. Zheng, G., Qin, Y., Clark, W.C., Dai, Q., Yi, C., He, C., Lambowitz, A.M. and Pan, T. (2015) Efficient and quantitative high-throughput tRNA sequencing. *Nat. Methods*, **12**, 835–837.
39. Cozen, A.E., Quartley, E., Holmes, A.D., Hrabeta-Robinson, E., Phizicky, E.M. and Lowe, T.M. (2015) ARM-seq: AlkB-facilitated RNA methylation sequencing reveals a complex landscape of modified tRNA fragments. *Nat. Methods*, **12**, 879–884.
40. Shurtleff, M.J., Yao, J., Qin, Y., Nottingham, R.M., Temoche-Diaz, M.M., Schekman, R. and Lambowitz, A.M. (2017) Broad role for YBX1 in defining the small noncoding RNA composition of exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **114**, E8987–E8995.
41. Chan, P.P., Cozen, A.E. and Lowe, T.M. (2011) Discovery of permuted and recently split transfer RNAs in Archaea. *Genome Biol.*, **12**, R38.
42. Fujishima, K., Sugahara, J., Kikuta, K., Hirano, R., Sato, A., Tomita, M. and Kanai, A. (2009) Tri-split tRNA is a transfer RNA made from 3 transcripts that provides insight into the evolution of fragmented tRNAs in archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 2683–2687.
43. Randau, L., Münch, R., Hohn, M.J., Jahn, D. and Söll, D. (2005) Nanoarchaeum equitans creates functional tRNAs from separate genes for their 5'- and 3'-halves. *Nature*, **433**, 537–541.
44. Kanai, A. (2015) Disrupted tRNA genes and tRNA fragments: a perspective on tRNA gene evolution. *Life (Basel)*, **5**, 321–331.
45. Di Giulio, M. (2012) The origin of the tRNA molecule: independent data favor a specific model of its evolution. *Biochimie*, **94**, 1464–1466.

