

新型非编码小 RNA——piRNA 的生物学 功能研究进展

成佳 肖丙秀* 周辉 郭俊明*

(宁波大学医学院, 宁波 315211)

摘要 Piwi 相互作用 RNA (Piwi-interacting RNA, piRNA) 是一类新发现的非编码小 RNA, 其长度一般为 24~33 nt, 通过特异性地与 Piwi 蛋白结合而发挥生物学作用。编码 piRNA 的基因几乎遍布整个基因组, 说明 piRNA 在生命起源早期就已经存在并且在物种的自然选择进化中被保留。自从 piRNA 被发现以来, 对其研究进展迅速, 现已发现其在生殖干细胞分化、胚胎发育、维持 DNA 完整性、表观遗传学调控和物种的性别决定等方面起着重要作用。对 piRNA 的研究有望加深人们对与基因表达调控相关生命现象的认识。本文就有关 piRNA 生物学功能的最新研究做一简要的综述。

关键词 piRNA; Piwi; 基因表达; 生殖细胞; 表观遗传学

非编码小 RNA (non-coding small RNA, ncRNA) 在高等生物体内大量存在, 组成了十分复杂的生物调控网络。目前, 非编码小 RNA 研究已经成为生命科学研究的热门领域, 并取得了一系列振奋人心的研究成果。2006 年的诺贝尔生理和医学奖授予了在这一领域做出杰出贡献的科学家, 进一步肯定了非编码 RNA 研究在当前生物医学研究领域中的重要性。

至今为止, 共发现了三类非编码小 RNA: 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、微小 RNA (microRNA, miRNA) 和最近刚发现的 Piwi 相互作用 RNA (Piwi-interacting RNA, piRNA)。siRNA 和 miRNA 都是由双链 RNA 的前体经过 Dicer 核酸内切酶切割产生, 它们与阿格蛋白家族 (argonaute-family proteins) 的 Ago 亚家族相互作用而诱导靶基因的转录沉默^[1]。piRNA 与这两类小 RNA 的主要区别有: (1) 形成过程中不依赖 Dicer 酶; (2) 通过结合阿格蛋白的 Piwi 亚族发挥作用, 这一特点也是它被命名的依据^[1]。对果蝇、鼠类和斑马鱼等的研究显示, piRNA 在生殖干细胞分化、胚胎发育、维持 DNA 的完整性和表观遗传学调控等方面具有十分重要的生物学作用^[2-5]。本文对该领域已取得的最新研究进展综述如下。

1 piRNA 的结构特征

piRNA 的长度为 24~33 个核苷酸 (nucleotides, nt), 绝大多数在 29~30 nt, 稍长于 22 nt 的 miRNA 和 siRNA^[6]。与 miRNA 一样, 其 5' 端也具有强烈的尿嘧啶偏向性^[6]。现发现的 piRNA 主要存在于基因间隔区, 而很少存在

于基因区和重复序列区。piRNA 在小鼠染色体上的分布很不均匀, 主要分布在 2、4、5 和 17 号染色体上, 很少分布于 1、3、16、19 和 X 染色体上, 而基本不分布于 Y 染色体上^[7]。人类中, piRNA 的分布相对均匀, 但在 13、20、21 和性染色体上分布较少^[8]。

piRNA 的另一个特点是, 成熟 piRNA 3' 端的 2'-氧是被甲基化修饰的^[9,10]。在果蝇中, 这个反应是由 Hen1 RNA 甲基转移酶催化的, 并且甲基化发生在 piRNA 与阿格蛋白结合以后^[11]。甲基化修饰具有重要的生物学意义, 它增加了 piRNA 的稳定性^[12]。

2 piRNA 的生物发生

目前, 对 piRNA 产生机制的认识主要来自于对它们在基因组上的位点和与其结合的阿格蛋白的研究。在果蝇的卵巢中, 大量的 piRNA 主要由富含逆转座子序列的染色体末端着丝粒和端粒位点编码产生^[13]。绝大多数的 piRNA 来自于逆转座子的反义链, 这一类反义 piRNA 优先结合阿格蛋白家族中的 Piwi 和 Aubergine (Aub); 相反, 正义 piRNA 则优先与 Argonaute 3 (Ago3) 结合^[14]。Piwi、Aub 和 Ago3 与 piRNA 组成的复合体可以在引导链的第 10 位和第 11

收稿日期: 2009-11-09 接受日期: 2010-05-31

国家自然科学基金 (No.30872420) 和浙江省自然科学基金 (No. Y207240) 资助项目

* 通讯作者。Tel: 0574-87600758, Fax: 0574-87608638, E-mail: junmingguo@yahoo.com

位之间对互补配对的靶 RNA 进行剪切^[14]。值得注意的是,果蝇 piRNA 的每一条链都与其互补链具有 10 nt 长度的互补序列。反义 piRNA 与 Piwi 和 Aub 相结合并且具有强烈的 5' 尿嘧啶偏向性;而正义 piRNA 则与 Ago3 结合并且在第 10 个碱基位点具有腺嘌呤残留^[14]。基于这些发现,有学者构建了一个乒乓球样循环扩增模型,解释了 piRNA 生物发生的机理^[14]。在这个模型中,与正义 piRNA 结合的 Ago3 在 A 和 U 结合配对的位点对反义链的 piRNA 进行催化切割,从而产生反义 piRNA 的 5' 端^[14]。此产物又与 Aub 或 Piwi 结合共同作用于 3' 端的互补区进而产生 23~33 nt 的成熟反义 piRNA。成熟的反义 piRNA-阿格蛋白复合体又结合并且切割与其互补的正义链 RNA,进而沉默基因的表达。在此过程中也相应地生成了与 Ago3 相结合的正义 piRNA 前体的 5' 端。在 3' 端重叠区域形成的同时,成熟的正义 piRNA 也随之产生,一个循环到此结束。此过程可根据文献^[1]做适当修改如下图所示(Fig.1A)。

上述过程不仅连续制造新的 piRNA,而且不断破坏靶 RNA。与转座子序列相对应的正义 piRNA 和反

义 piRNA 含量也相应增加,转座子的表达活性则被抑制^[15]。推测 piRNA 单链自身互补的碱基之间可以配对以形成局部双链的高级结构来发挥作用(Fig.1B)^[8]。尽管这个模型是基于对果蝇的研究提出的,但相似的机制在鼠类等哺乳动物中也可能存在^[16]。在这个模型中,虽然有一些关键蛋白(包括在多个环节中起调节作用的蛋白)还没有被鉴定出来,但是最近的一些研究结果或许有助于填补这些空白。例如,果蝇的 *zucchini* 和 *squash* 基因均编码 piRNA 形成过程中所必需的核酸酶,它们的突变阻断了 piRNA 的生成^[17]。因此, *Zucchini* 和 *Squash* 这两种蛋白可能有助于产生 piRNA 3' 端的延长部分和生成成熟的 piRNA。

3 piRNA 的生物学功能

piRNA 的生物学作用方式不同于人们较为熟知的其它二类非编码小 RNA (siRNA 和 miRNA)。后两者主要通过和 Ago 亚家族蛋白相互作用,而 piRNA 则是通过结合 Piwi 蛋白形成 piRNA 复合物(piRNA-Piwi-class-Argonaute complexes, piRC)来发挥基因沉默的作用。Ago3 蛋白活性的升高可以增加 piRNA 的含

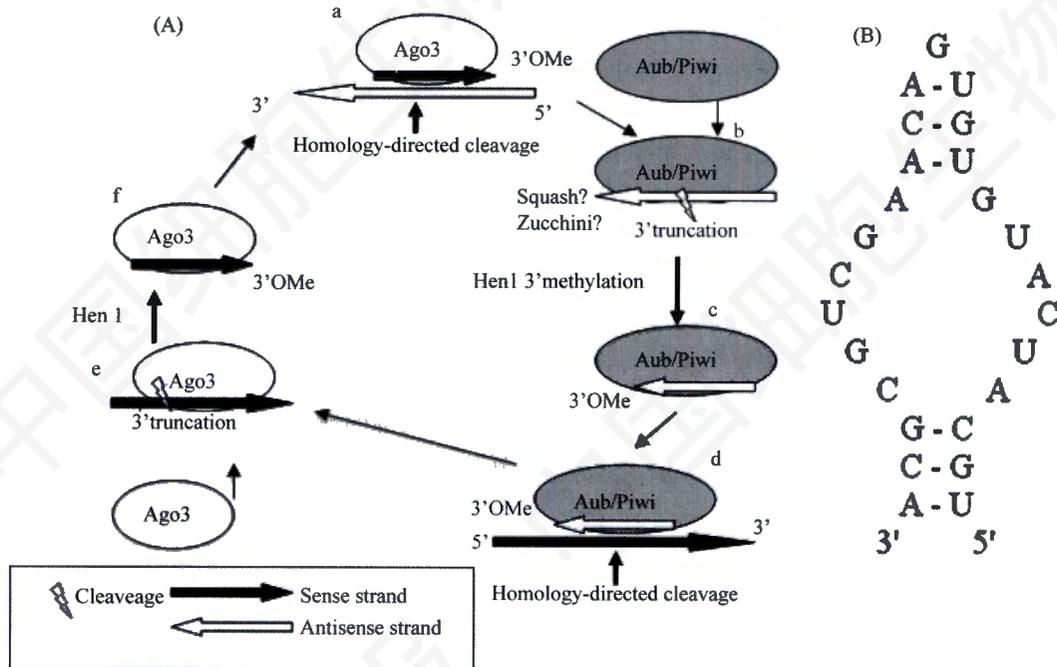


Fig. 1 Ping-pong model of piRNA biogenesis and its predicted secondary structure

A: Ping-pong model of piRNA biogenesis: (a) the Piwi-class Argonaute protein Argonaute 3 (Ago3) binds to sense-strand piRNAs (black) and directs the cleavage of target antisense-strand transcripts (white), producing the 5' end of antisense-strand piRNAs, (b) Aubergine (Aub) and Piwi bind to the resulting piRNA precursor, which is trimmed to its final length. This might be catalyzed by the putative nucleases Squash and Zucchini, (c) Hen1 methylates the 3' ends of piRNAs (3'OMe), (d) Aub-antisense-strand piRNA complexes catalyze the cleavage of sense transcripts (black), producing the 5' end of sense piRNAs, (e) Ago3 binds the resulting sense piRNA precursors, which are trimmed and (f) methylated, as described for antisense-strand piRNAs; B: predicted secondary structure of piRNA.

量,使它们产生了反义链偏向性,而 piRNA 含量的增加可以沉默逆转座子^[18]。在 piRC 介导的基因沉默途径中有多种尚未明确的蛋白质因子参与。因此,对于与 piRNA 相偶联的蛋白质功能的研究可以为揭示 piRNA 的生物学功能提供可靠的证据。例如,果蝇同源蛋白甲基转移酶 5 (*Drosophila* homologue of protein methyltransferase 5, dPRMT5) 已经被证明是修饰 Aub 甲基化的酶,其活性的缺失可以导致果蝇卵巢中 piRNA、Ago3 和 Aub 蛋白水平的下降,进而导致卵子发生的异常^[19]。这显示了 Piwi 蛋白的甲基化修饰在 piRNA 生物学功能发挥中的重要性。根据最新的研究结果,推测 piRNA 可能具有下列生物学功能。

3.1 维持干细胞和生殖系的功能

通过对影响果蝇卵子发生和胚胎轴线发育的基因突变研究,Chen 等^[20]首次鉴定出一些 piRNA 作用途径中的相关基因。果蝇卵子的发生是从生殖干细胞的分化开始,最后分裂为 1 个卵母细胞和 15 个滋养细胞。在卵子发生过程中卵母细胞大部分时间处于转录沉默状态,滋养细胞为卵母细胞提供了所需的大部分 RNA 和蛋白质。在果蝇中,胚胎轴线特异性的发育依赖于与形态学发生相关的 piRNA 的不对称分布。*Cutoff* 和 *aubergine (aub)* 基因的突变不仅在果蝇轴线特异性发育中影响了这类 piRNA 在细胞中的分布,还破坏了生殖干细胞的稳定性和卵母细胞的产生^[20]。

piwi 基因编码阿格蛋白家族中的 Piwi 亚族,*piwi* 基因的突变导致了卵子发生中生殖干细胞的缺失。克隆研究显示,生殖干细胞的稳定和分化需要体细胞中 *piwi* 基因的有效表达以形成干细胞巢^[21]。相比之下,在 *piwi* 基因缺失的种系中,干细胞的分化率降低了,但是并没有导致干细胞的缺失和卵子发生的阻滞^[21]。其它 piRNA 作用途径所需蛋白的基因突变,包括 *zucchini* 和 *squash* 的突变也导致了生殖干细胞的缺失^[17,20]。现在仍然不清楚这些基因究竟仅仅是在体细胞中必需还是在生殖细胞或者两者中均必需。此外, Piwi 蛋白和 piRNA 在生殖干细胞分化和维持方面的分子功能也未被完全阐明。

小鼠基因组编码三种果蝇 Piwi 蛋白的同源蛋白——Miwi、Miwi2 和 Mili。这 3 种蛋白是雄性小鼠保持生育能力所必需的。Miwi 和 Mili 均可与 piRNA 相结合,而敲除 *miwi* 和 *mili* 基因将阻碍 piRNA 的产生,且它们中的任何一个基因发生突变均可造成雄性小鼠不育^[22]。对小鼠中 Piwi 蛋白(Miwi、Miwi2

和 Mili)复合体的纯化和分析发现, Piwi 蛋白在它们 N 末端保守位置的精氨酸是被甲基化的^[19]。经证实,在这些蛋白家族中均存在一种精氨酸甲基转移酶^[19]。具有 Tudor 结构域的蛋白家族可以特异地结合甲基化的组蛋白。由精氨酸甲基转移酶催化修饰的 Piwi 蛋白对引导含有 Tudor 蛋白家族成员复合物的形成是必需的。具有 Tudor 结构域的蛋白家族可以识别这些蛋白质,并且特异性地驱动 Piwi 蛋白在细胞质中的定位和特异位点的聚集^[23]。在精子发生的过程中, Tudor 家族成员呈现一种动态的表达,并且这种表达方式与在细胞质中生殖质区域的 Piwi 家族蛋白的表达方式具有一致性^[24]。

miwi、*miwi2* 和 *mili* 的突变实验显示,小鼠的精子发生在其出生后 2 周是正常的,大体上与减数分裂的第一阶段相协调,然而,在减数分裂以后精细胞却不能形成^[22]。*mili* 和 *miwi2* 的突变在粗线期阻滞了生殖细胞的进一步发育,而 *miwi* 突变的精母细胞可以发育成为圆形精细胞,但是却不能形成成熟的精子细胞^[22]。最新的研究发现,在精子发生过程中 piRNA 特异性地定位在小鼠精母细胞中的联会复合体上并且和转座子的表达密切相关^[25]。

3.2 调控胚胎的发育和保持种系 DNA 的完整性

大多数 piRNA 作用途径的异常都可以引起果蝇轴线发育特异性的缺陷。现已证实,这些缺陷是由 DNA 损伤信号所产生的^[17,20,26]。*mnk* 基因编码细胞周期监测点激酶 2(checkpoint kinase-2, Chk-2), 减数分裂过程中未被修复的 DNA 活化了 Chk-2, 然后由 Chk-2 诱发了可以观察到的轴线发育缺陷^[27]。piRNA 作用途径的异常引起的后果也像 DNA 修复机制相关基因发生的突变一样,是通过激活 Chk-2 作用通路而引起果蝇轴线发育的缺陷。在果蝇卵子发生中, piRNA 作用途径的异常可以导致由动力蛋白介导的微管动力复合体聚集^[27]。这一过程依赖 Chk-2 的激活。

在果蝇中,所有 piRNA 作用途径的异常都明显地导致了逆转座子的过量表达。逆转座子的活化可以引发 DNA 的损伤,而当 piRNA 作用途径发生异常后,转座子的高插入率就可以压制 DNA 的修复机制,进而激活 Chk-2。目前仍然未知监测点的激活如何导致细胞骨架网络的改变。有一种可能是,监测点的激活直接活化了 RNA 的转运机制。Navarro 等^[27]发现,核蛋白聚集体形成是 DNA 损伤的特异性细胞反应, piRNA 生物发生的缺陷可以导致逆转座子 RNA 水平的上调。在 piRNA 缺失时,马达动力蛋白机制

可以将逆转座子RNA转运到逆转座子降解位点并且在此处发生聚集^[27]。此外, piRNA在DNA的修复过程和维持染色质结构对抗DNA损伤方面或许还应该具有更直接的作用。果蝇的端粒是由逆转座子重复序列构成的, piRNA作用途径的异常增加了这种重复性^[28]。这预示, piRNA作用途径中相关基因的突变可以导致端粒保护机制的缺失, 进而在DNA断裂时发生染色体识别机制的终止, 这不利于维持DNA的完整性。

3.3 诱导蛋白质翻译过程的沉默

奥斯卡(Oskar)蛋白在细胞质极质的组装和胚胎模式发育过程中是必不可少的。piRNA作用途径的异常可以影响Osk mRNA和Oskar蛋白在细胞中的定位^[29], 并导致了Oskar蛋白在卵子发生过程中的提前表达^[17]。HeT-A是果蝇中一个非长末端重复序列逆转座子家族, 与转座作用密切相关。在造成piRNA缺失的*spindle-E (spn-E)*和*aubergine (aub)*的突变研究中, piRNA作用途径中的蛋白不再与mRNA降解蛋白相关联; 与之相伴随的是, 在卵巢中*spn-E*和*aub*的突变引起了逆转座子全长转录产物与HeT-A mRNA的积聚, 影响到转座作用^[30]。这些观察说明, piRNA介导的作用是转录后水平的逆转座子沉默。

在果蝇中, piRNA作用途径的异常降低了雄性果蝇的生育能力, 这与星状蛋白(Stellate protein)的过度表达相关^[1]。Stellate是由X染色体上的重复基因编码产生并且受到Y染色体上双向重复序列*Suppressor of Stellate [Su(Ste)]*基因座的抑制。*Su(Ste)*基因座编码25~27 nt的piRNA, 它的突变可以导致Stellate的结晶, 而影响其正常功能的发挥^[17]。最近, Kotelnikov等^[31]研究发现, 敲除*Su(Ste)*所致的piRNA缺失可以引起Stellate蛋白水平的明显升高, 其升高幅度远远超过Stellate mRNA的水平。*Su(Ste)*重复序列的缺失、piRNA的产生和*aub*的突变并不导致初级Stellate转录物的积累, 这说明Stellate mRNA主要是通过转录后的降解途径而被沉默的。在对半乳糖(*lacZ*)标记的*stellate*基因的研究中发现, 敲除*Su(Ste)*重复序列并没有对*Ste-lacZ* mRNA的水平产生明显的影响, 却大大增加了 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)的活性^[31]。Kotelnikov等^[31]推测, *Ste-lacZ* mRNA的含量与一种未知的蛋白相关。已知这种蛋白与Stellate mRNA序列特异性的模体相互作用并且抑制了siRNA介导的降解。这暗示, piRNA在基因沉默方面的功能类似于siRNA, 与抑制翻译过程相比, 更容易使转录物在

翻译过程中降解。piRNA介导的*stellate*基因转录后的沉默机制在细胞核和细胞质中均存在。*Su(Ste)* piRNA或许优先对细胞质中的转录模板进行引导切割, 因为在此处更加容易发生翻译过程。由此可见, piRNA的这种生物特性类似于先前发现的siRNA。

现有的研究说明, piRNA调控体系在基因表达调控中的主要作用在于消除mRNA的翻译模板功能, 遏制逆转录酶和转座酶等的活性^[31]。此外, 除了基因沉默的负调控效应外, 部分piRNA可能还有正调控效应, 如增加mRNA的稳定性和翻译功能。在小鼠中发现的一类与多核糖体相关的piRNA就有正调控的作用^[32]。

3.4 piRNA参与表观遗传学调控

Piwi和Aub均参与异染色质的形成, 是表观遗传学中的调控因子^[33]。Piwi可以防止逆转座子转位^[34]; Miwi可增加靶mRNA的稳定性, 对翻译具有促进作用^[32]。piRC具有序列识别机制, 可以产生一系列后生效应, 比如引导异染色体蛋白1a(heterochromatin protein1a, HP1a)在基因组中特异性的定位从而进行表观遗传学的调控^[35,36]。Piwi家族在小鼠中的两个成员Mili和Mili2在胚胎生殖细胞中特异性地催化转座子DNA的甲基化, 从而引起它们在转录水平的抑制^[3]。在雄性胎鼠的精原细胞中, 存在一种由DNA甲基化和转座因子靶向piRNA构成的精密而复杂的抑制机制, 这一机制也被证实参与了转座因子的沉默过程^[25]。

遗传学分析显示, 生殖细胞和体细胞中与转座子靶向介导的piRNA簇在果蝇科中是保守的。这说明piRNA簇的结构与转座子是协同进化的^[37]。在哺乳动物中发现, piRNA基因簇的展开率高于已知的任何一个基因家族; 与其它大的基因家族相比, piRNA基因簇没有单个基因簇的缺失^[38]。这些现象均提示, piRNA基因簇的展开是在进化中主动选择的结果^[38]。

3.5 piRNA在性别决定中的作用

斑马鱼的基因组编码Ziwi和Zili两种Piwi蛋白的同源蛋白。Ziwi蛋白是小鼠Miwi蛋白同源基因编码的产物, Zili蛋白则与小鼠的Mili蛋白更加近似。只有Ziwi蛋白可以在雄性和雌性的种系中特异性地表达^[5]。Ziwi蛋白类似于果蝇中的Ago3和Aub蛋白, 它首先在细胞质中出现, 然后定位于细胞核周围的生殖质。实验显示, ziwi基因的突变也可以导致生殖细胞凋亡的缺失^[5]。降低ziwi基因的表达水平并不影响雄性生殖细胞存活到成熟阶段, 但是却导致成熟生殖细胞凋亡水平的显著增加和多种层次上的不育症^[5]。

从斑马鱼的卵巢中提取出的 piRNA 与其它器官中提取的 piRNA 具有相同的分子功能, 并且很多都是源自基因组的重复序列。ziwi 的突变也可以影响斑马鱼的性别决定, 在实验中所有存活的突变动物都是雄性^[5]。其它可以降低生殖细胞分裂能力的基因突变也可以影响性别决定。这说明, 与生殖细胞的缺失相比, 性别决定的表型是次要的。然而, 也不能排除 piRNA 在性别决定方面具有更加直接的作用。

4 问题与展望

piRNA 的研究尽管已经在几种模式生物中取得了很大进展, 预示着这一新发现的非编码小 RNA 具有十分广阔的生物医学研究前景。但目前仍然处于起步阶段, 还有一些问题需要进一步地探讨, 比如 piRNA 的乒乓球样扩增循环过程是如何调节的; 在 piRNA 的作用途径中究竟还有哪些蛋白质因子参与了对基因的调控等等。

相信随着研究的深入, piRNA 越来越多的生物学功能将被揭示。非编码小 RNA 具有很强的灵活性, 既能以碱基互补的方式与 DNA 结合, 又可通过自身的高级结构(如形成发夹结构)与蛋白质结合, 在基因和蛋白质之间起到一个桥梁作用^[39]。

总之, 对 piRNA 等非编码小分子 RNA 的研究可以使人们更深刻地认识机体复杂的生命调节现象, 将对未来生物医学的发展产生较大的推动作用。

参考文献(References)

- Klattenhoff C, Theurkauf W. Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development* 2008; 135(1): 3-9.
- Chambeyron S, Popkova A, Payen-Groschene G, Brun C, Laouini D, Pelisson A, *et al.* piRNA-mediated nuclear accumulation of retrotransposon transcripts in the *Drosophila* female germline. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(39): 14964-9.
- Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, *et al.* DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev* 2008; 22(7): 908-17.
- Unhavaithaya Y, Hao Y, Beyret E, Yin H, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, *et al.* MILI, a PIWI-interacting RNA-binding protein, is required for germ line stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation. *J Biol Chem* 2009; 284(10): 6507-19.
- Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, van den Elst H, *et al.* A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in *Zebrafish*. *Cell* 2007; 129(1): 69-82.
- Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, *et al.* A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* 2006; 442(7099): 203-7.
- Grivna ST, Beyret E, Wang Z, Lin H. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev* 2006; 20(13): 1709-14.
- Sai LS, Agrawal S. piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs. *Nucleic Acids Res* 2008; 36 (Database issue): D173-7.
- Ohara T, Sakaguchi Y, Suzuki T, Ueda H, Miyauchi K, Suzuki T. The 3' termini of mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14(4): 349-50.
- Kirino Y, Mourelatos Z. Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14(4): 347-8.
- Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Siomi H, Siomi MC. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev* 2007; 21(13): 1603-8.
- Horwich MD, Li C, Matranga C, Vagin V, Farley G, Wang P, *et al.* The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol* 2007; 17(14): 1265-72.
- Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, *et al.* Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 2007; 128(6): 1089-103.
- Gunawardane LS, Saito K, Nishida KM, Miyoshi K, Kawamura Y, Nagami T, *et al.* A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* 2007; 315(5818): 1587-90.
- Brennecke J, Malone CD, Aravin AA, Sachidanandam R, Stark A, Hannon GJ. An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. *Science* 2008; 322(5906): 1387-92.
- Aravin AA, Sachidanandam R, Girard A, Fejes-Toth K, Hannon GJ. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science* 2007; 316(5825): 744-7.
- Pane A, Wehr K, Schupbach T. Zucchini and squash encode two putative nucleases required for rasiRNA production in the *Drosophila* germline. *Dev Cell* 2007; 12(6): 851-62.
- Li C, Vagin VV, Lee S, Xu J, Ma S, Xi H, *et al.* Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. *Cell* 2009; 137(3): 509-21.
- Kirino Y, Kim N, de Planell-Sauger M, Khandros E, Chiorean S, Klein PS, *et al.* Arginine methylation of Piwi proteins catalysed by dPRMT5 is required for Ago3 and Aub stability. *Nat Cell Biol* 2009; 11(5): 652-8.
- Chen Y, Pane A, Schupbach T. Cutoff and aubergine mutations result in retrotransposon upregulation and checkpoint activation in *Drosophila*. *Curr Biol* 2007; 17(7): 637-42.
- Cox DN, Chao A, Lin H. Piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development* 2000; 127(3): 503-14.
- Carmell MA, Girard A, de Kant HJ v, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, *et al.* MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell* 2007; 12(4): 503-14.
- Wilczynska A, Minshall N, Armisen J, Miska EA, Standart N.

- Two Piwi proteins, Xiwi and Xili, are expressed in the *Xenopus* female germline. *RNA* 2009; 15(2): 337-45.
- 24 Vagin VV, Wohlschlegel J, Qu J, Jonsson Z, Huang X, Chuma S, et al. Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes Dev* 2009; 23(15): 1749-62.
- 25 der Heijden GW v, Bortvin A. Transient relaxation of transposon silencing at the onset of mammalian meiosis. *Epigenetics* 2009; 4(2): 76-9.
- 26 Klattenhoff C, Bratu DP, McGinnis-Schultz N, Koppetsch BS, Cook HA, Theurkauf WE. *Drosophila* rasiRNA pathway mutations disrupt embryonic axis specification through activation of an ATR/Chk2 DNA damage response. *Dev Cell* 2007; 12(1): 45-55.
- 27 Navarro C, Bullock S, Lehmann R. Altered dynein-dependent transport in piRNA pathway mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(24): 9691-6.
- 28 Savitsky M, Kwon D, Georgiev P, Kalmykova A, Gvozdev V. Telomere elongation is under the control of the RNAi-based mechanism in the *Drosophila* germline. *Genes Dev* 2006; 20(3): 345-54.
- 29 Cook HA, Koppetsch BS, Wu J, Theurkauf WE. The *Drosophila* SDE3 homolog armitage is required for oskar mRNA silencing and embryonic axis specification. *Cell* 2004; 116(6): 817-29.
- 30 Lim AK, Tao L, Kai T. piRNAs mediate posttranscriptional retroelement silencing and localization to pi-bodies in the *Drosophila* germline. *J Cell Biol* 2009; 186(3): 333-42.
- 31 Kotelnikov RN, Klenov MS, Rozovsky YM, Olenina LV, Kibanov MV, Gvozdev VA. Peculiarities of piRNA-mediated post-transcriptional silencing of Stellate repeats in testes of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(10): 3254-63.
- 32 Grivna ST, Pyhtila B, Lin H. MIWI associates with translational machinery and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in regulating spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(36): 13415-20.
- 33 Pal-Bhadra M, Leibovitch BA, Gandhi SG, Rao M, Bhadra U, Birchler JA. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science* 2004; 303(5658): 669-72.
- 34 Kalmykova AI, Klenov MS, Gvozdev VA. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(6): 2052-9.
- 35 Lin H, Yin H. A novel epigenetic mechanism in *Drosophila* somatic cells mediated by Piwi and piRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008; 73: 273-81.
- 36 Halic M, Moazed D. Transposon silencing by piRNAs. *Cell* 2009; 138(6): 1058-60.
- 37 Malone CD, Brennecke J, Dus M, Stark A, McCombie WR, Sachidanandam R. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell* 2009; 137(3): 522-35.
- 38 Assis R, Kondrashov AS. Rapid repetitive element-mediated expansion of piRNA clusters in mammalian evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(17): 7079-82.
- 39 Kurth HM, Mochizuki K. Non-coding RNA: A bridge between small RNA and DNA. *RNA Biol* 2009; 6(2): 138-40.

The Research Progress of Biological Function of piRNA, the New Found Non-coding Small RNA

Jia Cheng, Bing-Xiu Xiao*, Hui Zhou, Jun-Ming Guo*
(Ningbo University School of Medicine, Ningbo 315211, China)

Abstract Piwi-interacting RNA, piRNA, is a type of new found non-coding small RNA with the length of 24~33 nt. They play biological roles through the specific combination with the Piwi protein. The genes encoding piRNA are almost located throughout the whole genome, indicating that piRNA has been present in the early stage of origin of life and been preserved by natural selection in species evolution. Great achievements have been obtained since piRNA was discovered. The crucial roles of piRNA were revealed in the differentiation of germline stem cells, embryonic development, maintaining DNA integrity, regulation of epigenetic and sex determination. The research on piRNA may lead to improve our understanding of the life phenomena associated with regulation of gene expression. In this review, we introduce the latest developments related to biological function of piRNA.

Key words piRNA; Piwi; gene expression; germ cell; epigenetic

Received: November 9, 2009 Accepted: May 31, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30872420) and Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (No.Y207140)

*Corresponding author. Tel:86-574-87600758, Fax: 86-574-87608638, E-mail: junmingguo@yahoo.com