



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina
Centro de Investigaciones Biomédicas**

**“REGULACION DE LA EXPRESION
GENICA MEDIADA POR piRNA EN
GAMETOGENESIS MASCULINA DE
MAMIFEROS”**

**Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Médicas, mención
en Biología Celular y Molecular**

ENRIQUE ALONSO JOFRE LOPEZ

**Director de Tesis : Dr. Mario Párraga San Román
Fecha : Abril 2016**



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“REGULACION DE LA EXPRESION
GENICA MEDIADA POR piRNA EN
GAMETOGENESIS MASCULINA DE
MAMIFEROS”**

**Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Médicas, mención
en Biología Celular y Molecular**

ENRIQUE ALONSO JOFRE LOPEZ

Director de Tesis : Dr. Mario Párraga San Román

Fecha : Abril 2016



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magister en Ciencias Médicas Mención en Biología Celular y Molecular

**“REGULACION DE LA EXPRESION GENICA MEDIADA
POR piRNA EN GAMETOGENESIS MASCULINA DE
MAMIFEROS”**

ENRIQUE ALONSO JOFRE LOPEZ

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Mario Párraga San Román y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Ivan Moreno

Comisión Evaluación Tesis

Porfesor Patrocinante

Dra. Andrea Calixto

Comisión Evaluación Tesis

Profesor Informante

Dr. Juan Reyes

Comisión Evaluación Tesis

Profesor Informante

Valparaiso, Chile 2016

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
1. ABREVIATURAS	1
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCION	3
4. OBJETIVOS	5
5. METODOLOGIA DE LA BUSQUEDA BIBLIOGRAFICA	6
6. GENERALIDADES E HISTORIA DE LA INTERFERENCIA MEDIADA POR RNAs PEQUEÑOS	10
7. TIPOS DE RNA DE INTERFERENCIA	12
a. miRNA	14
b. siRNA	16
8. PROCESADORES DE RNAs PEQUEÑOS	17
9. DROSHA Y EL MICROPROCESADOR NUCLEAR	17
10. DICER, EL MICROPROCESADOR CITOPLASMATICO	20
11. EFECTORES EN LA RUTA DE BIOGENERACION DE RNAs PEQUEÑOS. PROTEINAS DE LA FAMILIA ARGONAUTAS	22

12. PROTEINAS COORPERADORAS EN EL SILENCIAMIENTO: EXPORTINA 5	25
13. piRNA	26
a. Pre Paquiteno	28
b. Paquiteno	28
14. PROTEINAS PIWI	29
15. PROTEINAS ASOCIADAS A PIWI EN LA BIOGENERACION DE piRNA	33
a. Proteinas que contienen dominios TUDOR	33
b. Factres adicionales a TUDOR en la Biogeneracion de piRNA	34
16. BIOGENERACION DE piRNA	35
a. Primaria	36
b. Secundaria "PING PONG"	36
17. UBICACIÓN DE LOS FACTORES INVOLUCRADOS EN LA VIA DE piRNA	37
18. piRNA EN LA LINEA GERMINAL DE MAMIFEROS	38
19. FUNCIONES SOMATICAS DE piRNAs	42
20. CONCLUSION	43
21. BIBLIOGRAFIA	45

1. ABREVIATURAS

RNA:	Acido ribo nucleico
RNAi:	Interferencia mediada por RNA
dsRNA:	RNA de doble cadena
mRNA:	RNA mensajero
piRNA :	RNA pequeño que se asocia a proteínas argonautas PIWI
PIWI:	proteínas argonautas que se asocian a RNAs pequeños (P-element-induced wimpy testes)
siRNA:	RNA interferente pequeño
miRNA:	micro RNA
RdRP:	polimerasa de RNA dependiente de RNA
RISC:	complejo inductor del silenciamiento mediado por RNA (RNA-induced Silencing Complex)
ncRNA:	RNA no codificante de proteínas
TDRD :	proteínas relacionadas a la familia de proteínas TUDOR
sDMAs:	argininas di-metiladas
Loci:	posición fija de un gen en el cromosoma.

2. RESUMEN

A un grupo de RNAs pequeños no codificantes de proteínas se les ha denominado RNA interferentes, debido a la capacidad que tienen éstas moléculas para suprimir o disminuir la expresión de genes específicos mediante mecanismos de ribo-interferencia post transcripcionales. Se clasifican 3 tipos de RNAs interferentes: RNA pequeño interferente (siRNA), micro RNA (miRNA) y el último descrito, RNA asociado a Piwi (piRNA). Si bien, los tres comparten características estructurales generales en sus procesos de biogeneración, principalmente en los efectores de sus mecanismos de acción se han generado algunas diferencias.

Los piRNAs se han descrito en un comienzo, como reguladores de la expresión de transposones (elementos móviles del genoma) en invertebrados. Debido a su asociación con las sub-familia de proteínas Piwi, expresadas principalmente en la línea germinal, se han establecido asociaciones en su potencial efecto regulador de la gametogénesis en mamíferos. Con los estudios realizados a la fecha, no se ha podido establecer de manera clara la naturaleza de los transcritos piRNA, ni tampoco en los mecanismos o vías que median en su efecto interferente, pero será de interés de éste estudio, recopilar la mayor cantidad de antecedentes para dilucidar el real efecto regulatorio de las moléculas que integran esta familia de RNAs pequeños.

Este trabajo se desarrolla bajo la metodología de búsqueda en base de datos científicos disponibles a través del acceso virtual para alumnos tesis de la Universidad de Valparaíso recopilando los artículos más relevantes de acuerdo a las palabras clave seleccionadas, aquellos artículos publicados en las revistas de mayor impacto científico y que han entregado la información mas actualizada en el desarrollo de este proyecto.

Palabras clave: piRNA, miRNA, siRNA, silenciamiento mediado por RNA, transposones, proteínas PIWI, regulación de genes, células germinales, espermatogénesis, gametogénesis

3. INTRODUCCION

El genoma humano codifica para miles de genes responsables de variadas funciones celulares y la regulación de la expresión de esos genes, es crucial en el desarrollo. Esta regulación es generada por una colección de eventos intra e intermoleculares. El silenciamiento de mRNAs mediado por RNAs pequeños no codificantes, también llamado interferencia mediada por RNA (RNAi), ha emergido como una vía clave en la regulación de eucariotas (1-3).

El descubrimiento de los RNA interferentes ha revolucionado el entendimiento de la regulación de genes, revelando una organización de vías relacionadas en las cuales pequeños RNA de 20 a 31 nucleótidos y sus proteínas asociadas, controlan la expresión de la información genética. En estos procesos, que están presentes en plantas y animales, cada RNA pequeño asociado con una proteína de la familia argonauta, forma un complejo inductor del silenciamiento mediado por RNA (RISC). Éste complejo reconoce su RNA blanco por complementariedad de bases y por medio de la actividad endonucleasa de las proteínas argonautas, se rompen los transcritos objetivos para generar el silenciamiento de genes de manera post transcripcional (4, 5).

Tres son las clases de RNA pequeños no codificantes (ncRNA) que participan en la interferencia y se han clasificado como: micro RNA (miRNA), RNA pequeño interferente (siRNA), y RNA que interactúa con PIWI (piRNA). Estas clases de RNA tienen similitudes y diferencias en su biogénesis y en su maquinaria de interacción proteica (6, 7).

Los efectores del proceso de silenciamiento en la expresión de genes transcritos mediados por RNA pequeños son las proteínas llamadas argonautas. Las proteínas argonautas se dividen en 2 subfamilias, la familia AGO y la familia PIWI. La subfamilia AGO es ubicuamente expresada, puede unir miRNA y siRNA. Estos RNA pequeños son procesados a partir de un precursor de RNA de doble cadena para generar un RNA pequeño maduro de 20 a 22 nucleótidos de largo, que dependen del procesamiento citoplasmático de una endonucleasa rebanadora (o silicer en inglés) llamada Dicer. La subfamilia PIWI es expresada en su mayoría en las células germinales de varias especies y forman complejos específicos con piRNAs (8).

Las proteínas PIWI son imprescindibles para la función y la biogénesis de piRNA, y además, juegan un rol central en el desarrollo de las células germinales ya que son requeridos durante múltiples etapas de la espermatogénesis.

La reprogramación del genoma ocurre en las células germinales primordiales y durante ésta reprogramación, todas las marcas de metilación del DNA son borradas, lo que asegura que todas las células sean epigenéticamente iguales antes de su diferenciación entre masculinas o femeninas. La pérdida de las marcas de metilación del DNA provoca la activación de muchos genes que están normalmente silenciados, incluyendo transposones, y por lo tanto el genoma queda muy susceptible al daño (9, 10). Los piRNA son requeridos para silenciar transposones durante el desarrollo (11) por lo cual éste trabajo, se concentra en describir los piRNAs tanto en su características, como en la importancia de sus componentes de biogeneración, y así, contribuir en un mejor entendimiento de ésta nueva clase de RNA pequeño no codificante descubierto en células reproductivas.

4. OBJETIVOS

Objetivo General:

Describir el fenómeno de interferencia mediado por RNA en células de la línea germinal de una manera resumida y ordenada.

Objetivos específicos:

- 1.** Describir los diferentes tipos de RNA pequeños, su biogénesis y principales funciones.
- 2.** Describir la vía de generación de piRNA con sus principales procesadores y efectores.
- 3.** Describir el rol regulador de piRNAs en espermatogénesis de mamíferos

5. METODOLOGIA DE LA BUSQUEDA BIBLIOGRAFICA

Para el desarrollo de esta tesis se ha trabajado en la búsqueda de artículos que entregaran la mayor información en relación a los RNA interferentes en los temas que involucraron su descubrimiento, su descripción molecular, el detalle molecular de la biogénesis con los procesadores y efectores involucrados, sus funciones in vivo y los próximos desafíos en el campo de los RNAs pequeños.

En un inicio se generó la búsqueda utilizando Web of Science como recurso, utilizando su base de datos mediante el acceso proxy entregado por la Universidad de Valparaíso de Chile con las siguientes palabras claves:

- Gene regulation
- RNA interference
- RNAi Biogenesis
- miRNA
- siRNA
- Drosha
- DGCR8
- Dicer
- Argonaute
- Exportin 5

Según los siguientes criterios, en una primera instancia, se han discriminado los artículos a utilizar en este trabajo:

La búsqueda se centralizó entre los años 1980 a 2014, y se consideraron revisiones o ensayos clínicos realizadas en animales, plantas e incluso humanos. El idioma de búsqueda fue inglés, sin criterios de filtros de edad ni sexo. Luego se han seleccionado los artículos más actuales que se relacionaran con: el descubrimiento de RNA pequeños, los tipos de RNA interferentes, artículos

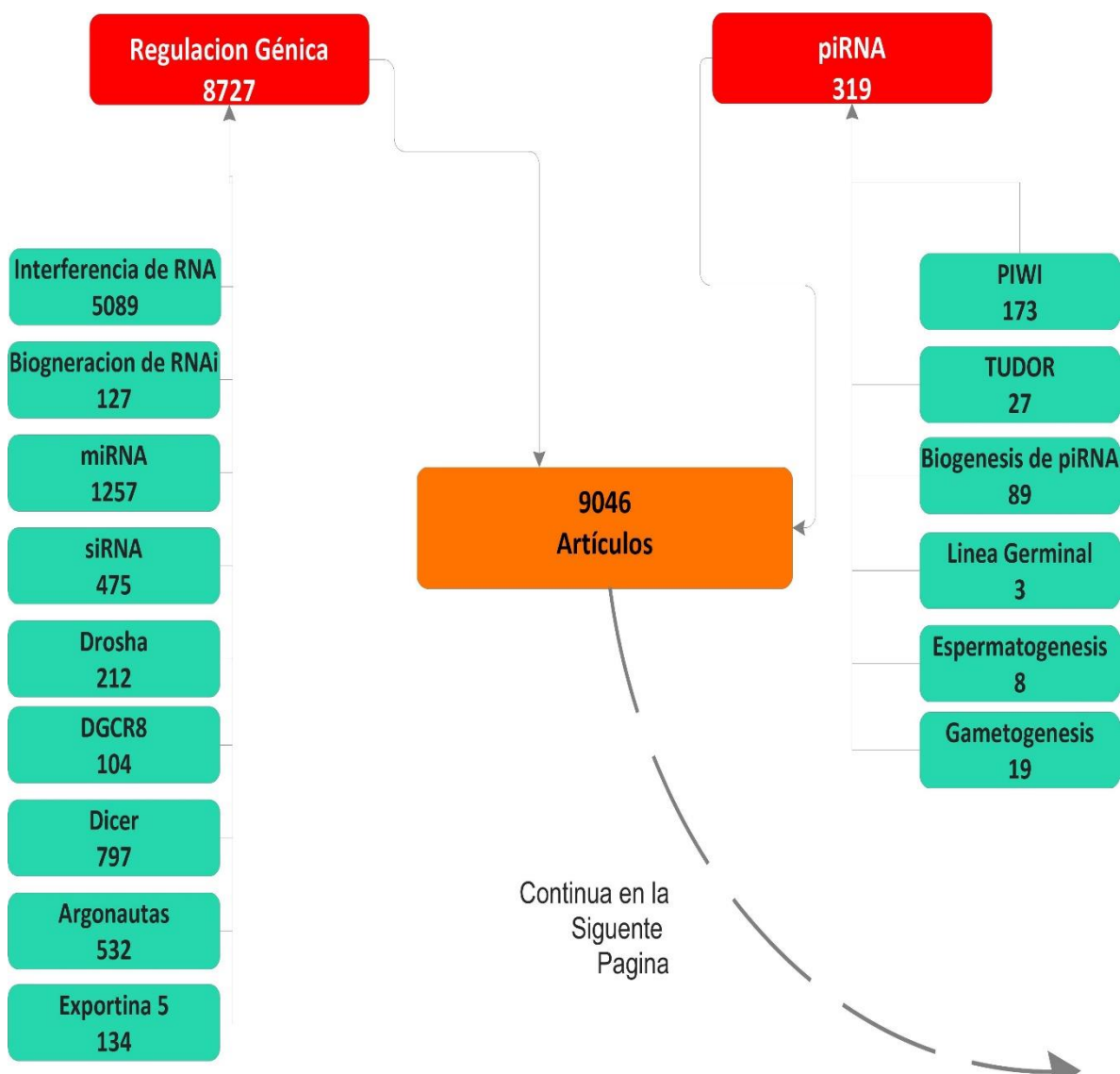
relacionados con su biogénesis y funciones en los diversos organismos. En segunda instancia y para profundizar en el desarrollo de los objetivos de este trabajo, se han buscado adicionalmente las siguientes palabras claves:

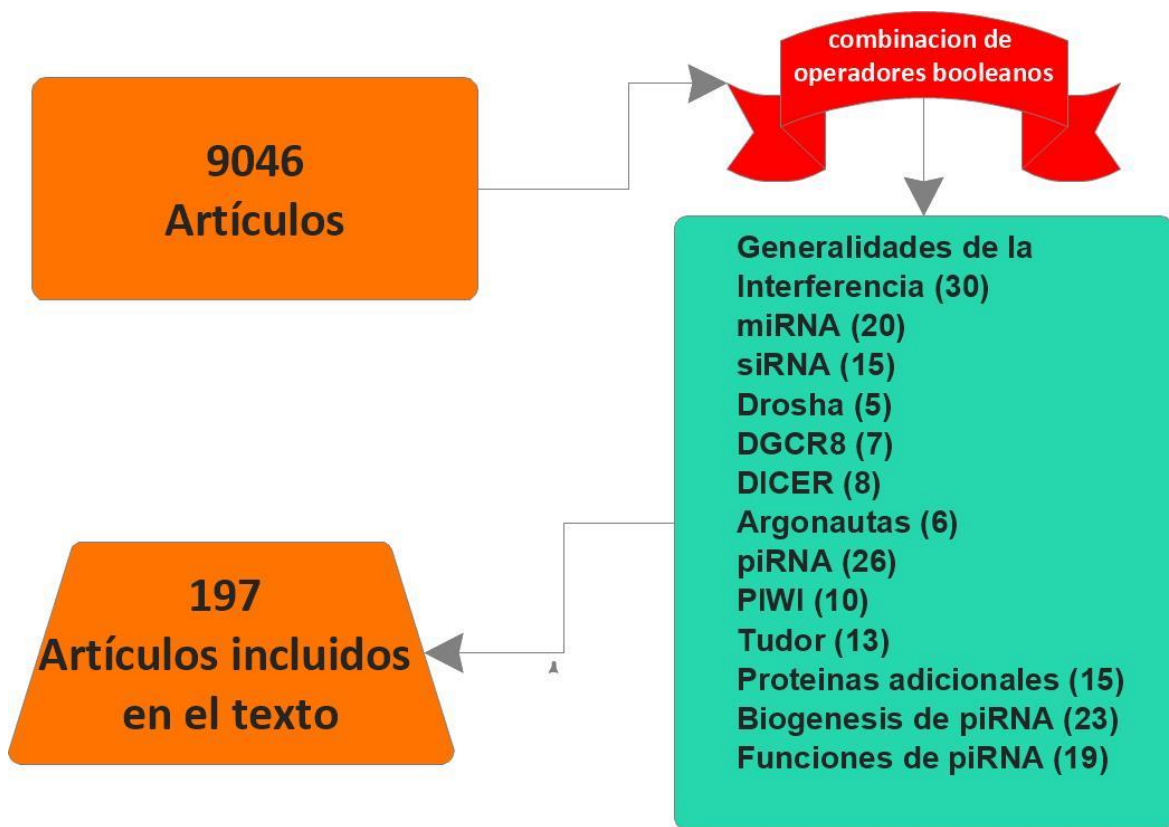
- piRNA
- PIWI
- Tudor
- piRNA Biogenesis
- Germ line
- Spermatogenesis
- Gametogenesis

Se seleccionaron los artículos más actuales que describieran a los piRNAs, su biogénesis, mecanismos de acción, su desarrollo y efectos en la regulación de la expresión genética en células germinales.

En la búsqueda de literatura se sumaron diversas combinaciones de operadores booleanos con las palabras clave mencionadas anteriormente. La suma total de ellos fue 9046 y sobre estos se aplicaron los filtros y límites mencionados que permitieron descartar los que no cumplían con los criterios de selección para finalmente incluir en la revisión de este trabajo de tesis 197. Se incluirá a continuación, un diagrama del mapa conceptual que esquematiza lo indicado anteriormente.

Diagrama Mapa Conceptual Busqueda Bibliografica





6. GENERALIDADES E HISTORIA DE LA INTERFERENCIA MEDIADA POR RNAs PEQUEÑOS

El 2 de octubre del 2006 se anunciaba el nombre de los investigadores laureados con el premio nobel de Fisiología y Medicina de ese año. Los galardonados fueron los estadounidenses Andrew Fire, profesor de la escuela de Medicina de la Universidad de Stanford y Craig C. Mello, profesor de la escuela de Medicina de la Universidad de Massachusetts. Se les otorgó el nobel, por sus investigaciones en la interferencia de la expresión de genes mediada por moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA), un proceso fisiológico celular de regulación genética que está altamente conservado en los organismos multicelulares, llamado interferencia de RNA (RNAi)(12).

Los trabajos de Mello y Fire en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* abrieron el camino a nuevas investigaciones orientadas a identificar y dilucidar al RNAi como un mecanismo conservado que regula la expresión genética durante el desarrollo y la fisiología normal de los organismos, como también en algunas enfermedades.

Desde los años ochenta se comenzó a utilizar la introducción experimental de RNA anti sentido (un RNA de cadena sencilla, de una hebra, con secuencia complementaria a un RNA mensajero endógeno, llamado RNA sentido) para inhibir la expresión de un gen en específico. Por el mecanismo de inhibición observado, se planteó la hipótesis de que el RNA antisentido se unía al RNA sentido por complementariedad de bases, y esta hibridación interrumpía la expresión del RNA mensajero (13-15).

En posteriores investigaciones, se indujo la hebra sentido en los ensayos experimentales, e inesperadamente también se produjo interferencia genética específica de secuencia (16). Este hallazgo condujo al grupo de investigación dirigido por Mello y Fire a investigar el mecanismo molecular que subyace a la interferencia genética. Los resultados de sus primeras investigaciones, condujeron a proponer un modelo en el cual el RNA sentido o antisentido, serían convertidos a una molécula de doble cadena por una polimerasa de *Caenorhabditis elegans*. La molécula generada de doble cadena desencadenaba un proceso fisiológico

inhibitorio con alto grado de fidelidad que además se observó, era heredable en la descendencia de este gusano (17, 18).

Anteponiéndose a las ya mencionadas investigaciones de Mello y Fire, otras observaciones ya adelantaban al concepto de la interferencia genética mediada por RNA. El silencio génico post transcripcional y los cambios epigenéticos inducidos por RNA se comenzaron a estudiar en primera instancia en plantas en 1990. En ese año, un grupo de botánicos que se encontraban trabajando con petunias, intentaron sobre-expresar la enzima llamada chalcona sintetasa, que produce el color púrpura en esa flor (19). Para ello, introdujeron varias copias del gen que codifica la enzima, esperando encontrar que las plantas con mayor cantidad de chalcona sintasa fueran púrpuras. Sin embargo, descubrieron que se generaban flores sin color o hipo pigmentadas. Luego, al analizar los niveles de chalcona sintetasa, encontraron que estos eran 50 veces menores a los de las plantas originales (20). Esta observación implicaba que los genes introducidos no se estaban expresando, y además, que el gen natural de la planta dejaba de expresarse, por lo cual llamaron a éste fenómeno co-supresión. Una situación similar fue presentada luego en las plantas de tabaco (21), y también en un hongo llamado *Neurospora crassa*, pero en éste último caso, al nuevo fenómeno de regulación génica se le llamó represión (en inglés quelling) (22). Estas observaciones, y las evidencias de que el proceso de RNAi podía ser heredable en nemátodos, se constituyeron como elementos de confusión para investigadores y con ello se plantearon hipótesis referidas a que el agente interferente podía ser una molécula de DNA y no un RNA. Sin embargo, lo que condujo a identificar definitivamente que la molécula capaz de interferir en la expresión era una de RNA, fue el trabajo de Fire y Mello en 1998 (17). Ellos observaron, que para diferentes concentraciones de RNA, tanto la cadena sentido como la antisentido inducían efectos inhibitorios semejantes, produciendo como resultado la desaparición de la proteína endógena. Este efecto era más potente cuando se introducía una molécula de RNA de doble cadena en vez de las cadenas sencillas. También postularon que el silenciamiento se lograba si las secuencias de RNA eran dirigidas a exones, ya que si se dirigían contra secuencias del promotor o de los intrones estas no eran efectivas (17, 23).

Fire y colaboradores también confirmaron que la molécula blanco del RNAi era el mRNA, y en un esfuerzo por identificar el número más pequeño de bases nucleotídicas capaces de llevar a cabo la interferencia encontraron que se encontraban entre 25 a 50 nucleótidos de longitud por hebra de RNA (17, 23-26). Ellos también evidenciaron que dos genes relacionados con 80% de homología entre sí, presentaban una pérdida de la función diferente que no se superponía, lo cual demostraba que el requisito de la homología de secuencias entre el RNA blanco y el RNA pequeño interferente era indispensable para promover la interferencia específica. Sumado a lo anterior, Andrew Fire y Craig Mello describieron que en cantidad, sólo unas pocas moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA) se requerían para inducir el abatimiento del mRNA endógeno, y describieron además, que un mecanismo catalítico participaba en el proceso de reconocimiento y degradación del mRNA (17). Los resultados obtenidos en conjunto, evidenciaron que la introducción de un dsRNA causaba la pérdida de la expresión del mRNA de una manera específica a la secuencia, y que este proceso genético estaba conservado en vertebrados e invertebrados (27).

Las evidencias bioquímicas y genéticas obtenidas con posterioridad al trabajo seminal de Mello y Fire, han permitido entender con mayor detalle el mecanismo del abatimiento de genes por RNAi y serán de interés a describir en ésta revisión.

7. TIPOS DE RNA DE INTERFERENCIA

Hay tres grandes familias de RNAs pequeños no codificantes (ncRNAs) que participan en interferencia en células eucariotas: micro-RNAs (miRNAs), piRNAs (RNAs pequeños que se asocian a proteínas argonautas PIWI) y RNAs interferentes pequeños (siRNAs). Estas tres familias son diferentes en sus orígenes, pero comparten etapas específicas en su biosíntesis y en sus mecanismos regulatorios (Tabla 1). En general, los ncRNAs son reguladores de procesos genéticos en la etapa transcripcional y post transcripcional (28, 29) que requieren de 2 grupos principales de proteínas para generar su efecto silenciador; las procesadoras y las efectoras. Las procesadoras son enzimas con actividad nucleasa capaces de generar RNAs pequeños a partir de RNAs transcrito-específicos. Por otro lado, el grupo de efectoras está constituido por un diverso conjunto de proteínas que se unen a RNA y son responsables de la

estabilización, el transporte y la actividad reguladora de los ncRNAs sobre su objetivo o blanco (30).

Características	miRNA	siRNA	piRNA
Largo	aprox. 22 nt	aprox. 21nt	24 - 31 nt
Enzimas Procesadoras citoplasmáticas	Dicer	Dicer	Enzimas cortadoras
Argonautas que unen	AGO	AGO	PIWI
Hebra	doble o single	doble	single
Gen Loci	Disperso	Disperso	Clusters discretos
Procesamiento por Dicer	Requerida	Requerida	No requerida
Procesamiento por Drosha	Requerida	No Requerida	No Requerida
Expresión	Todos los tejidos	Todos los tejidos	Línea germinal principalmente
Precusores	Transcritos con horquillas	Doble hebra de RNA	Transcritos de hebra simple

Tabla 1. Características de RNA pequeños

a. Micro-RNA (miRNA)

De todos los ncRNAs la familia más estudiada es la de miRNAs. Estas moléculas fueron descubiertas en primera instancia en el gusano *Caenorhabditis elegans* y son pequeños RNAs de 21 a 23 nucleótidos generados por un complejo proceso celular (Figura 1), que comienza con la transcripción de un loci genómico específico, cuya transcripción fluye desde el núcleo al citoplasma, con la ayuda de nucleasas especializadas que cortan los RNAs transcritos para producir un miRNA maduro (31, 32). En el núcleo, las proteínas Drosha y DGCR8, reconocen y remueven las horquillas de estos RNAs formados durante la transcripción (33, 34). Drosha es una nucleasa mientras que DGCR8 es una proteína con afinidad a RNA, que reconoce la horquilla en los miRNA primarios (primiRNA). Las horquillas extirpadas generan pre-miRNA que son exportadas al citoplasma a través de poros nucleares con la ayuda de una proteína transportadora llamada Exportina 5 (35). En el citoplasma, los pre-miRNAs son reconocidos por una ribonucleasa tipo III llamada Dicer, que corta la horquilla para generar un pequeño fragmento de dsRNA de 19 a 23 pares de bases que permanecerá unido a la enzima (36, 37). En este punto, el complejo formado entre Dicer y el pequeño dsRNA reclutan varias proteínas de la familia de los argonautas que formarán el complejo RISC, éste complejo seleccionará una hebra del dsRNA para generar una molécula de miRNA maduro (38, 39). Los complejos RISC maduros serán dirigidos a secuencias complementarias en transcritos de RNA mensajeros, interfiriendo con el proceso de traducción y consecuentemente reduciendo la expresión de esa proteína (40-42). En células animales, la complementariedad entre miRNA y su blanco mRNA no es perfecta, mientras que en plantas la homología llega entre un 90 y un 100%. Se ha descrito una vía alternativa para la formación de miRNA a partir de transcritos intrónicos. En esta vía, el procesamiento de los RNA en horquilla por Drosha y DGCR8 es omitido y los pre-miRNA están completamente constituidos por pequeños intrones que son removidos por la maquinaria de procesamiento, la cual une los exones y elimina los intrones. Estos miRNAs, que omiten la etapa nuclear de biogeneración, son llamados Mirtrones (43, 44).

Los genes que codifican para miRNA están frecuentemente agrupados en clústeres unidos, y son muy abundantes en el genoma humano teniendo especial ubicación entre intrones mas que en exones (45, 46).

Por otra parte, se ha descrito que la actividad reguladora ejercida por miRNA es un proceso en el cual un solo transcrito de mRNA puede ser blanco de muchos miRNAs y al mismo tiempo por lo que un miRNA puede regular cientos de mRNAs diferentes (47-49).

R.P. Yadav, N. Kotaja / *Molecular and Cellular Endocrinology* 382 (2014) 498–508

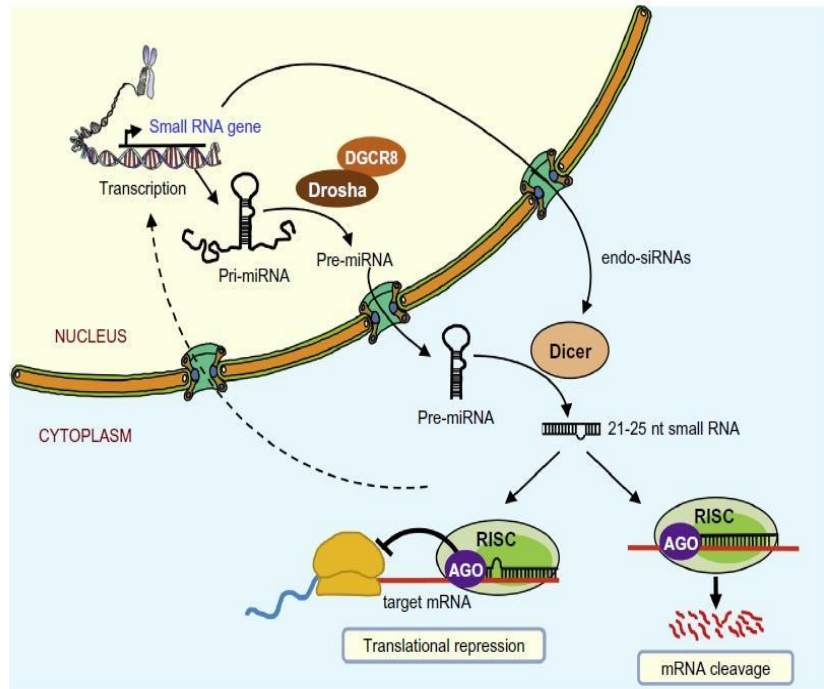


Figura 1. Biogeneración de miRNA y siRNA. El microprocesador nuclear comprendido por Drosha y DGCR8 procesa el miRNA primario con loop en horquilla en un pre miRNA que luego es trasladado al citoplasma. Los pre miRNA son procesados ahora por Dicer a un dsRNA de 21 a 25 nt que se asocia posteriormente a RISC. Los siRNA son procesados desde precursores de doble hebra que no requieren de procesamiento nuclear. Los pequeños RNA median una unión específica de secuencia entre RISC y mRNA lo que origina la interferencia. Se ha identificado también que los RNA pequeños tienen efectos en la expresión de genes a nivel transcripcional.

Fuente: Yadav RP, Kotaja N. Small RNAs in spermatogenesis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014; 382(1):498-508. Epub 2013/05/02.

b. RNAs Pequeños interferentes (siRNA)

Los RNAs pequeños interferentes (siRNAs) son dsRNA pequeños generados por la enzima Dicer a partir de precursores más largos (50). Fueron descritos y caracterizados por primera vez en gusanos y plantas como producto de la acción catalítica de polimerasas de RNA dependientes de RNA (RdRPs) (51-53). Estas polimerasas son capaces de generar largos dsRNAs que son exportados al citoplasma (Figura 1). Luego son procesados por Dicer y reclutados a su blanco específico por el complejo citoplasmático de silenciamiento (54-56). En plantas los siRNAs son producidos como respuesta al stress externo o como un mecanismo de defensa frente a elementos móviles o virus (57, 58).

En animales, la aparente ausencia de RdRPs en sus genomas había descartado la búsqueda de siRNAs, hasta el descubrimiento de LINE-1, un retro-transposon detectado en cultivos celulares humanos capaces de producir una transcripción bidireccional del RNA utilizando un sistema doble de promotores en las orientaciones sentido y anti-sentido de la hebra de RNA lo que resulta en la formación de siRNA (59, 60). En *Drosophila melanogaster*, los siRNAs son de 21 nucleótidos, tienen modificaciones en su extremo 3' y son de doble hebra (61, 62). En muchos casos, los siRNAs están relacionados a regiones que contienen pseudo-genes, con repeticiones invertidas en tándem que permiten la formación de largas estructuras de dsRNA susceptibles a ser procesadas por Dicer (61).

En las ratas, siRNAs también son de 21 nucleótidos, generados por Dicer y sus blancos son genes codificantes para proteínas (54, 63). Todavía no está aclarada la acción reguladora de siRNAs, pero probablemente por su condición endógena, hayan evolucionado a partir del más primitivo sistema de defensa, y más aún, algunos autores consideran que los siRNAs continúan hasta la actualidad en constante evolución (64, 65).

8. PROCESADORES DE RNAS PEQUEÑOS

En plantas y animales la producción de RNA pequeños está compartimentalizada en primera instancia en el núcleo y en un segundo proceso, se ubica en el citoplasma. El modelo más estudiado de biogeneración de RNAi es el de miRNA y nos servirá de base para describir los aspectos generales de este proceso biológico se describirá a continuación (6, 7).

9. DROSHA Y EL MICROPROCESADOR NUCLEAR

El primer paso en la biosíntesis de miRNAs en animales e insectos es catalizada por un grupo de proteínas (Figura 2) que forman el complejo microprocesador: Drosha, una RNAasa tipo III (66) y DGCR8, una proteína que une dsRNA y es responsable del reconocimiento del RNA primario (32, 67). Estas dos proteínas representan los requerimientos esenciales para el inicio del procesamiento de los transcritos primarios de miRNA (33). En cultivos celulares humanos, Drosha se ha descrito como el corazón de los complejos microprocesadores nucleares, en los que podemos encontrar, un complejo binario compuesto de Drosha y DGCR8 con una gran actividad procesadora de transcritos primarios de miRNA, sumado a varias proteínas accesorias (68, 69). En plantas, el complejo microprocesador binario es reemplazado por una proteína nuclear llamada DCL1, una RNAasa tipo III que genera precursores de dsRNA a partir de transcritos de cadena larga (70).

Las células con mutaciones de Drosha y DGCR8 muestran una acumulación de miRNAs primarios en el núcleo, lo que nos sugiere su rol pivote en la biogeneración de miRNAs (71).

En humanos, se ha descrito que Drosha posee 1374 residuos aminoacídicos que pueden ser divididos claramente en dos regiones: un segmento N-terminal desde el aminoácido 1 al 550, muy desestructurado y flexible lo que permite la necesaria interacción proteína-proteína con otros elementos del complejo microprocesador nuclear. Por otra parte, está el segmento C-terminal, que va desde el aminoácido 550 al 1374 y el cual contiene dos dominios catalíticos RNAasa tipo III que terminan con un dominio de unión a dsRNAs (72).

Por otro lado DGCR8 es una proteína de unión a RNA, y en humanos posee 773 aminoácidos. En ella se han descrito dos regiones: dominio de dimerización WW localizado cercano a la región N-terminal, y una región de unión a dsRNA ubicada en el extremo C-terminal (73). El dominio de unión a RNA muestra estructuras tridimensionales compuestas por un corazón de alfa hélice, fusionado con pequeñas láminas de segmentos beta, que son posicionadas en tándem para asegurar una mayor superficie de contacto con la molécula de RNA blanco (73). DGCR8 ha sido caracterizada como una proteína de unión a grupo Hemo, estando éste cofactor directamente involucrado en la eficiencia del procesamiento de los miRNAs primarios del complejo nuclear (74).

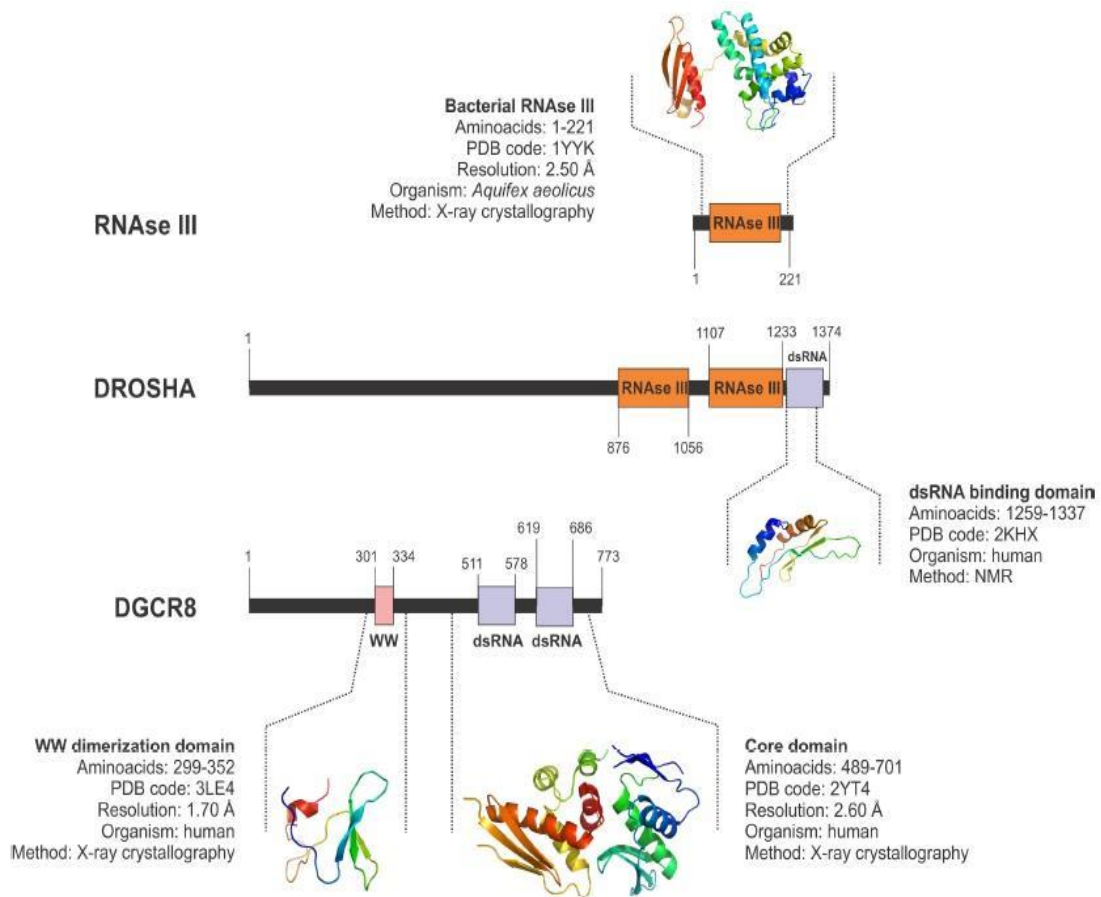


Figura 2. Microprocesador nuclear: Drosha y DGCR8. En el mapa de dominio se destaca con cajas coloreadas las secuencias que representan los dominios funcionales presentes en cada proteína. En Drosha los dominios catalíticos RNasa III y dominios de unión a dsRNA. En DGCR8 los dominios de unión a dsRNA de miRNA primarios.

Fuente: Costa MC, Leitao AL, Enguita FJ. Biogenesis and mechanism of action of small non-coding RNAs: insights from the point of view of structural biology. International journal of molecular sciences. 2012; 13(8):10268-95. Epub 2012/09/06.

10.DICER, EL MICROPROCESADOR CITOPLASMÁTICO

Dicer (Figura 3) es una enzima con variadas funciones: primero debe capturar los pre miRNA exportados desde el núcleo por medio del reconocimiento de dsRNA, luego romperlos para generar dsRNAs de 21 a 23 nucleótidos, y en tercer lugar, debe actuar como un punto de encuentro para las proteínas que generarán posteriormente el complejo RISC (75-77).

Las proteínas Dicer son muy conservadas en eucariotas, lo que ha sugerido un decisivo rol de estas enzimas en la fisiología celular. La más completa información disponible de Dicer proviene de *Giardia intestinalis*, en ella Dicer es de la mitad del tamaño que su homóloga humana, y contiene dos dominios catalíticos RNAasa tipo III más un dominio de unión a RNA llamado PAZ (78, 79). Dicer puede procesar dsRNAs de manera independiente a su secuencia, permitiendo tanto la disparidad de pares de bases, como la diferencia de estructura del RNA en su procesamiento. Según lo anterior, cualquier dsRNA es capaz de entrar en la ruta de silenciamiento de genes lo cual le entrega a esta enzima una gran relevancia fisiológica debido a su amplia tolerancia con las moléculas de doble hebra de RNA (80). La enzima Dicer humana conserva los dominios centrales de PAZ y RNAasa de Dicer primitiva, pero incluye además dos dominios de unión a dsRNA, organizados en tándem con configuración tipo hélice en su región N-terminal (81). Los residuos de lisina ubicados en el límite de los dominios RNAasa tipo III están involucrados en la función rebanadora de esta enzima, la cual es esencial en el procesamiento de RNAs pequeños y se han descrito en otras RNAasas relacionadas, como Drosha (82).

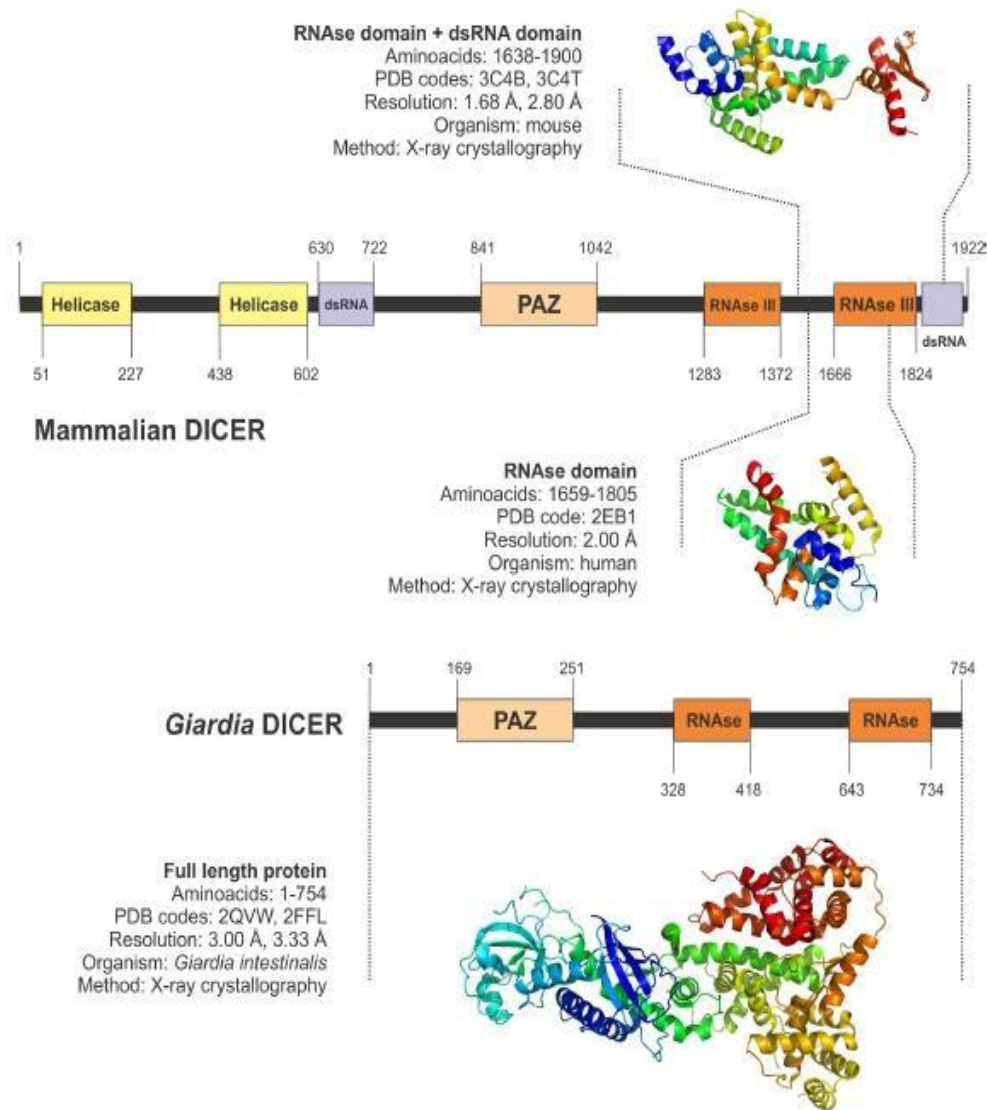


Figura 3. Procesador citoplasmático: Dicer. En el mapa de dominio se destaca con cajas coloreadas las secuencias que representan los dominios funcionales presentes en la proteína. El dominio de unión a RNA llamado PAZ y el dominio catalítico RNAasa se repite en la Dicer de Giardia y Mamíferos.

Fuente: Costa MC, Leitao AL, Enguita FJ. Biogenesis and mechanism of action of small non-coding RNAs: insights from the point of view of structural biology. International journal of molecular sciences. 2012;13(8):10268-95. Epub 2012/09/06.

11.EFFECTORES EN LA RUTA DE BIOGENERACIÓN DE RNAS PEQUEÑOS. PROTEÍNAS DE LA FAMILIA ARGONAUTA.

Las proteínas argonautas son una familia de proteínas que unen a RNA pequeños en el citoplasma, se encuentran muy conservadas en los organismos, desde bacterias a humanos (Tabla 2), y siempre están presentes en el corazón de los complejos silenciadores. Los miembros de la familia argonauta son capaces de unir los RNA pequeños cumpliendo la función de guías, dirigiéndolos a sus mRNAs blanco específicos para el silenciamiento o la degradación de la señal mensajera. Las proteínas argonautas son el mayor efector de la maquinaria de regulación dependiente de RNA, siendo un importante protagonista en la interferencia mediada por RNA en eucariotas. Algunas proteínas argonautas presentan actividad nucleasa, siendo capaces directamente de rebanar o degradar las moléculas de RNA, por lo que juegan un rol muy relevante en la defensa frente a factores genéticos externos, tales como bacteriófagos y elementos móviles transponibles (83).

Table 1 Types of small RNA-associated Argonaute proteins, and the origin and mechanism of action of small RNAs					
Subfamily	Ago-family protein	Class of small RNA*	Length of small RNA	Origin of small RNA†	Mechanism of action
<i>Mammals</i>					
Ago	AGO1–4	miRNA	21–23 nt	miRNA genes	Translational repression, mRNA degradation, mRNA cleavage and heterochromatin formation?
		endo-siRNA [‡]	21–22 nt	Intergenic repetitive elements, pseudogenes and endo-siRNA clusters	mRNA cleavage?
Piwi	MILI (PIWIL2 in humans)	Pre-pachytene piRNA and pachytene piRNA	24–28 nt	Transposons and piRNA clusters	Heterochromatin formation (DNA methylation)
	MIWI (PIWIL1 in humans)	Pachytene piRNA	29–31 nt	piRNA clusters	?
	MIWI2 (PIWIL4 in humans)	Pre-pachytene piRNA	27–29 nt	Transposons and piRNA clusters	Heterochromatin formation (DNA methylation)
	(PIWIL3 in humans)	?	?	?	?
<i>Drosophila melanogaster</i>					
Ago	AGO1	miRNA	21–23 nt	miRNA genes	Translational repression and mRNA degradation
	AGO2	endo-siRNA	~21 nt	Transposons, mRNAs and repeats	RNA cleavage
		exo-siRNA	~21 nt	Viral genome	Viral RNA cleavage
Piwi	AUB	piRNA	23–27 nt	Transposons, repeats, piRNA clusters and <i>Su(Ste)</i> locus	RNA cleavage
	AGO3	piRNA	24–27 nt	Transposons and repeats (unknown in testis)	RNA cleavage
	PIWI	piRNA	24–29 nt	Transposons, repeats and piRNA clusters	Heterochromatin formation?
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>					
Ago	Ago1	endo-siRNA	~21 nt	Outer centromeric repeats, mating-type locus and subtelomeric regions	Heterochromatin formation
<i>Arabidopsis thaliana</i> [§]					
Ago	AGO1	miRNA	20–24 nt	miRNA genes	mRNA cleavage and translational repression
		endo-siRNA (tasiRNA including TAS3)	21 nt	TAS genes	mRNA cleavage
		exo-siRNA	20–22 nt	Viral genome	Viral RNA cleavage
	AGO4 and AGO6	rasiRNA	24 nt	Transposons and repetitive elements	Heterochromatin formation
	AGO7	miR-390	21 nt	miRNA gene	Cleavage of TAS3 RNA

Tabla 2. Proteínas Argonautas en diversas especies. Proteínas PIWI Y AGO en diversos organismos.

Fuente: Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(2):126-39. Epub 2009/01/24.

Estructuralmente todas las proteínas que pertenecen a la familia argonauta poseen un variable dominio N-terminal y tres dominios conservados: el dominio PAZ, el dominio MID o intermedio, y el dominio PIWI (Figura 4). PAZ y MID están involucrados en la correcta identificación e interacción con el RNA pequeño. El dominio PAZ interactúa con el extremo 3' del RNA pequeño y el dominio MID es el responsable del reconocimiento y la interacción con el grupo fosfato del extremo 5' del RNA interferente. Por último, la función del dominio PIWI es de guiar el complejo AGO-RNA al mRNA blanco y también de ejercer la función catalítica (84).

Las proteínas argonautas están divididas en 2 diferentes sub-familias: la sub-familia AGO, llamadas así luego del descubrimiento de la proteína argonauta 1 en *Arabidopsis thaliana*; y la sub-familia PIWI, por primera vez descrita en *Drosophila melanogaster* (P-element induced wimpy testis) (8).

Las proteínas AGO están presentes en la naturaleza desde levaduras a mamíferos (85), son consideradas como puentes moleculares, debido a que su función requiere una interacción simultánea entre los RNAs y las proteínas. En humanos y otros vertebrados hay cuatro proteínas de esta sub-familia (AGO1 a la AGO4). AGO2 es la única proteína de la sub-familia capaz de catalizar un selectivo silenciamiento de RNA in vivo y esta actividad silenciadora solo se ejerce cuando la complementariedad del RNA guía y su blanco es completa (86). Por otra parte AGO1, es un componente esencial en el núcleo de levaduras, regulando la estructura de la cromatina en respuesta a la presencia de RNAs pequeños complementarios a los nacientes mRNAs. Los otros miembros de la familia, AGO3 y AGO4, no están bien caracterizados en términos de función y especificidad de acción, pero a pesar de ello, se sabe que todos los argonautas de mamíferos cooperan en la ruta de biogeneración de RNAs pequeños de una forma redundante y continua (87, 88).

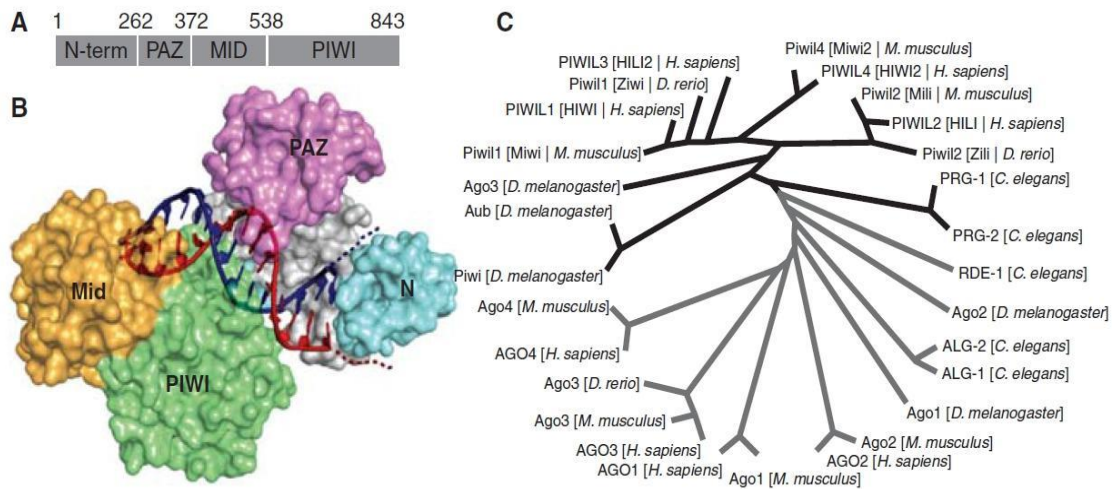


Figura 4. Proteínas Argonautas. A) Representación esquemática de los dominios de las proteínas PIWI/AGO en *Drosophila*. B) Estructura cristalográfica de AGO *Thermus thermophilus* unida a RNA guía (roja) y a su target (azul). C) Cladograma radial de PIWI y AGO.

Fuente: Saxe JP, Lin H. Small noncoding RNAs in the germline. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2011;3(9):a002717. Epub 2011/06/15.

12. PROTEÍNAS COOPERADORAS EN EL SILENCIAMIENTO: EXPORTINA 5

Los miRNA primarios son activamente exportados desde el núcleo al citoplasma para originar miRNAs maduros. Este transporte es asegurado por el sistema Exp-RanDTP, que fue por primera vez caracterizado en los oocitos de *Xenopus* (89). La Exportina 5 es una proteína que se une a dsRNAs y puede traslocar estas moléculas desde el núcleo al citoplasma. Los exportadores dependientes de RanGTP (exportinas), constituyen la clase más grande de ese tipo de acarreadores y son muy versátiles en su funcionamiento. Como otras exportinas, la Exportina 5 (Figura 5) carga su miRNA primario en respuesta a la unión de RanGTP en el núcleo y atraviesa el poro nuclear hacia el citoplasma como un complejo ternario formado por RanGTP-Exportina 5-miRNA, en donde la hidrólisis del GTP, lleva al desarme del complejo exportador (90). La interacción entre los involucrados en el complejo ternario antes mencionado, ocurre

a través del contacto iónico de sus moléculas. Un bolsillo estrecho dentro de la proteína Exportina 5, reconoce los nucleótidos del extremo 3' en el miRNA primario, permitiendo así una interacción con la proteína y le entrega protección al RNA transportado frente a nucleasas (91).

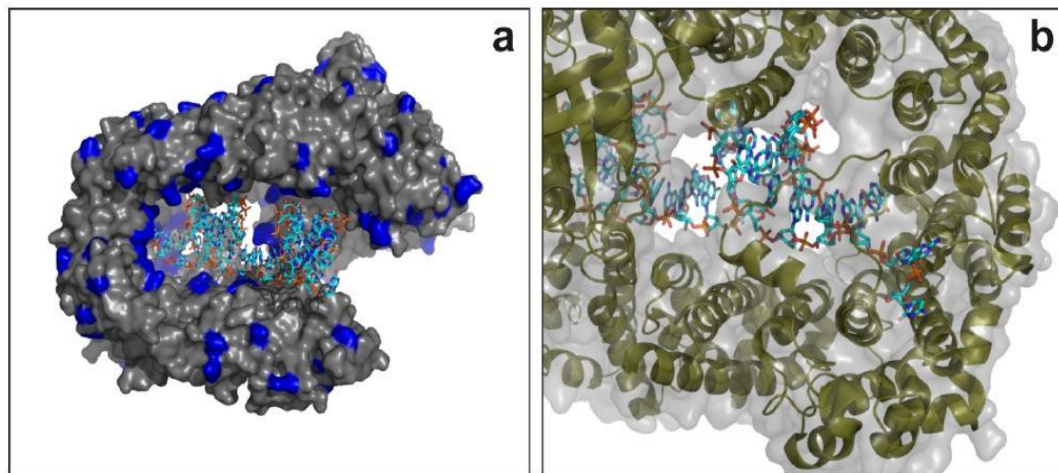


Figura 5. Exportina 5. Estructura cristalográfica de la proteína unida a un pre miRNA. Las dsRNA interactúan con los residuos de cargas positivas (lisina y arginina en azul).

Fuente: Costa MC, Leitao AL, Enguita FJ. Biogenesis and mechanism of action of small non-coding RNAs: insights from the point of view of structural biology. International journal of molecular sciences. 2012;13(8):10268-95. Epub 2012/09/06.

13.piRNA

Cuatro investigaciones independientes se sucedieron el 2006 para identificar los RNA pequeños que interactuaban con proteínas PIWI en células germinales de rata (92-95). En la extracción total del RNA de los testículos de rata, identificaron abundantes especies de RNA de hebra simple de alrededor de 30 nucleótidos de longitud que se asociaban a MIWI, una proteína PIWI de ratón. Los ratones mutantes

de MIWI presentaron una depleción casi total de estos RNAs de gran tamaño y fenotipo estéril, y a partir de ese momento, a estas largas especies de RNA pequeños les llamaron piRNA, debido a la asociación de estas moléculas en el citoplasma a las proteínas argonautas PIWI. Los investigadores describieron que los clúster para piRNA no se encontraban en todo el genoma del ratón, sino que más bien, en un determinado loci, además dieron a conocer que esta especie de RNA pequeño de gran longitud, estaba sólo presente en el RNA testicular extraído de los ratones estudiados (96, 97).

Por definición, los piRNAs se unen a las proteínas PIWI; son un poco más largos (25 – 31 nucleótidos) que miRNA y siRNA (21 – 24 nucleótidos), son de una hebra, y además poseen un sitio de modificación 2'-O- metil en su extremo 3' (98-101). Estos RNAs pequeños son procesados desde un transcrito precursor de una hebra que proviene de regiones intergénicas llamadas clústeres de piRNA (102), mediante un mecanismo que es independiente de la enzima Dicer (7, 103, 104). Algunos clústeres de piRNA son unidireccionales, en los cuales piRNA es codificado por una hebra de ADN, y hay otros clústeres que son bidireccionales, con una región central pobre en piRNA, flanqueada por brazos de piRNA codificantes por la hebra opositora (92, 93).

Los piRNAs son específicamente expresados en la línea germinal de diversas especies de Metazoos estudiados a la fecha y su función está conservada largamente entre las especies, desde esponjas a humanos (64, 105). La asociación entre PIWI y piRNA, tiene un rol fundamental en la fertilidad de diversas especies, y se ha evidenciado en diversas etapas de la espermatogénesis (106-109). Es sabido, que la reprogramación genética ocurre en las células primordiales germinales, durante este proceso, todas las marcas de metilación del DNA son borradas en las células, lo que asegura que todas las células germinales sean epigenéticamente iguales previo a la diferenciación entre macho/hembra. Posterior a la reprogramación, se establece la impronta parental durante la metilación de novo del DNA (110, 111). La pérdida de las marcas de metilación del DNA trae como resultado la activación de genes que están normalmente silenciados, llamados transposones, que dejan al genoma muy susceptible al daño (112). Los piRNA son esenciales en el silenciamiento de transposones en el periodo del desarrollo (113). Durante la espermatogénesis de ratón, se generan dos clases de piRNA; piRNA pre paquiteno y piRNA paquiteno.

a. piRNA pre paquitenos

El piRNA pre paquitenos (Figura 6) pertenece al 5% de los piRNAs conocidos y se dividen en 2 grupos: piRNA pre paquitenos fetales y piRNA pre paquitenos post natales (114). Los primeros, que constituyen la mayoría, son expresados en la etapa de pro espermatogonia y se asocian con las proteínas PIWIL2 (llamada MILI en ratas) y PIWIL4 (llamada MIWI2 en ratas). La mitad de ellos son derivados de elementos transponibles y un 3% del piRNA pre paquitenos es derivado de exones codificantes a proteínas. Los piRNA pre paquitenos post natales sólo se asocian a MILI, debido a que es la única proteína PIWI presente en dicha etapa. Los piRNA pre paquitenos post natales también son derivados de elementos transponibles, pero éste grupo de elementos transponibles son distintos a los mencionados en la etapa pre natal. Un gran porcentaje de los piRNA pre paquitenos post natales (20%) son también derivados de exones codificantes a proteínas (96).

b. piRNA paquitenos

En éste segundo grupo de piRNA (Figura 6) encontramos el 95% de los piRNA que se conocen (114, 115). Ellos están presentes post natalmente en espermatocitos en paquitenos y en las espermátidas redondas en donde se asocian con MILI y PIWIL1 (MIWI). A diferencia de los piRNA pre paquitenos, los piRNA paquitenos derivan en su mayoría de regiones intergénicas no repetitivas, llamadas clústeres de piRNA paquitenos. Estos piRNAs no tienen un blanco conocido y se ha hipotetizado que son productos de degradación de los procesos de biogeneración de piRNA. Sólo un 20% de los piRNA paquitenos son derivados de elementos transponibles (116). Los clústeres de los piRNA paquitenos son más largos que los de piRNA pre paquitenos, pero muestran una pequeña superposición entre ellos. Un factor de transcripción llamado A- MYB participa en el inicio de la transcripción de clústeres de piRNA paquitenos en rata(117).

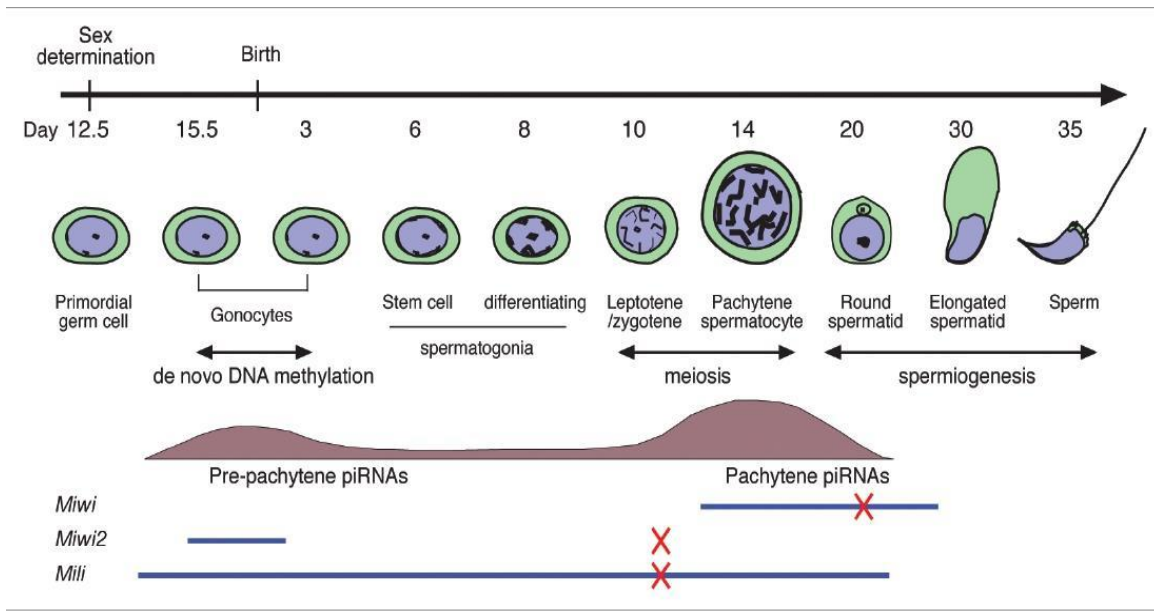


Figura 6. Expresión de piRNA y proteínas PIWI durante la espermatogénesis de rata.

Los pre paquitenos piRNA están presentes prenatalmente en pro espermatogonias y post natalmente en espermatogonias. Los paquitenos piRNA están presentes post natalmente en los espermatocitos del paquitenos y en espermátidas redondas. MIWI es expresada en espermatocitos del paquitenos y en espermátidas redondas. MIWI2 es expresada en pro espermatogonias. MILI es expresada entre pro espermatogonias a espermátidas redondas. Mutantes de MIWI exhiben un arresto en la espermiogénesis. Mutantes de MILI y MIWI2 exhiben un arresto en meiosis (marcados con x en rojo)

Fuente: Fu Q, Wang PJ. Mammalian piRNAs: Biogenesis, function, and mysteries. Spermatogenesis. 2014; 4:e27889. Epub 2014/08/01.

14. PROTEÍNAS PIWI

El descubrimiento de las proteínas PIWI en 1998 (118) y su asociación con piRNAs, ha revelado una nueva dimensión de la regulación de genes en diversos procesos del desarrollo (Tabla 3). Numerosos estudios han demostrado que el corazón central de todas las vías de biogeneración del silenciamiento mediado por RNAs pequeños, son las proteínas Argonautas (108). La subfamilia PIWI se encuentra casi exclusivamente en gónadas animales y se asocia a RNAs de aproximadamente 24-30 nucleótidos (piRNA) (119).

Name	Species	Localization	Mutant phenotype	small RNAs identified	Notes
AUB	<i>Drosophila melanogaster</i>	♂♀ Germline (cytoplasmic)	♂♀ Sterile	YES	Polar granule component
PIWI	<i>Drosophila melanogaster</i>	♂♀ Germline & soma (nuclear & cytoplasmic)	♂♀ Sterile	YES	Polar granule component & chromatin protein
AGO3	<i>Drosophila melanogaster</i>	♂♀ Germline (cytoplasmic)	No mutant	YES	Somatic localization detected by western blot
MILI	<i>Mus musculus</i>	♂ Germline (cytoplasmic)	♂ Sterile	YES	Chromatoid body component

MIWI	<i>Mus musculus</i>	♂ Germline (cytoplasmic)	♂ Sterile	YES	Chromatoid body component
MIWI2	<i>Mus musculus</i>	♂ Germline (nuclear and cytoplasmic)	♂ Sterile	YES	
ZILI	<i>Danio rerio</i>	♂♀ Germline	♂♀ Sterile	YES	Perinuclear granules
ZIWI	<i>Danio rerio</i>	♂♀ Germline	♂♀ Sterile	YES	Perinuclear granules
SMEDWI-2	<i>Schmidtea mediterranea</i>	Neoblasts	Regeneration defects	YES	
SMEDWI-3	<i>Schmidtea mediterranea</i>	Neoblasts	Regeneration defects	YES	
TWIIP	<i>Tetrabymena thermophila</i>	Cytoplasmic and nuclear	No progeny	YES (scnRNA)	Epigenetic regulator
HIWI	<i>Homo sapiens</i>	Testicular enrichment; somatic tissues	Over-expression in cancer lines	NO	
BOMBYX PIWI	<i>Bombyx mori</i>	♂♀ Germline enrichment	NO	YES	See text

Tabla 3. Proteínas PIWI. Son descritas en diversas especies

Fuente: Thomson T, Lin H. The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect. Annual review of cell and developmental biology. 2009; 25:355-76. Epub 2008/01/10.

El genoma de ratón codifica para tres proteínas PIWI: MIWI, MILI y MILI2 y cada una de ellas son expresadas en diferentes estados del desarrollo. La proteína MILI se encuentra en ambos sexos, mientras que las otras dos las encontramos sólo en líneas germinales de machos (106, 120, 121). MILI demuestra un gran perfil de expresión que comienza en las células embrionales masculinas a los 12.5 días, luego de su migración a las gónadas en desarrollo y se encuentran hasta la adultez en las espermátidas redondas. Por otra parte, MIWI2 está presente en un periodo más tardío, desde el día 14.5 post coito hasta los 3 días después del nacimiento. Esta

ventana de tiempo se correlaciona con el arresto del ciclo celular y la metilación de novo en células germinales. La expresión de la proteína MIWI sucede en los testículos adultos a partir de los 14 días después del nacimiento, lo que coincide con el comienzo de la meiosis en los espermatozoides del paquiteno y termina en la etapa de generación de las espermátidas redondas (96, 97).

Las proteínas argonautas se caracterizan por tres dominios proteicos altamente conservados; PAZ, MID y el PIWI (122). La mayoría de los RNA pequeños tienen un extremo 5' monofosfato y en el extremo 3' poseen un grupo hidroxilo, pero en todos los piRNA conocidos el extremo 3' se modifica por un extremo 2'-O- metilado (99). Esta modificación es de utilidad en la unión entre el RNA y la proteína, ya que entre ambas moléculas se forma un bolsillo hidrofóbico en el dominio PAZ (123). La guía de unión se genera a partir del ácido nucleico en posición 1, lo que provoca una base específica de contacto para la proteína argonauta (124). Queda por averiguar, si la fuerte preferencia a la Uridina como el primer nucleótido en la secuencia de piRNA es una consecuencia del reconocimiento específico del dominio MID de PIWI o una consecuencia del mecanismo de biogénesis de piRNA (92, 93). Algunos argonautas son pequeñas nucleasas guiadas por RNA, que pueden catalizar el corte de ácidos nucleicos blancos mediante el reconocimiento de interacciones entre pares de bases por complementariedad. En la sub familia PIWI, esta propiedad es llevada a cabo por el plegamiento RNAasa H del dominio PIWI, que es determinado por la triada catalítica Asp-Asp-His, cuya escisión usa como cofactores iones Magnesio para la función endonucleasa (slicer) (125-127) que es vital en el silenciamiento mediado por piRNA. La importancia in vivo de la actividad catalítica de PIWI se ha demostrado en los estudios que han realizado mutaciones a MILI o MIWI y han dado como resultado un patrón fenotípico infértil en ratas (128, 129). Se ha demostrado, que para la actividad catalítica del complejo piRNA-PIWI es requerida una amplia complementariedad de pares de bases entre piRNA y el RNA blanco, más aún, la complementariedad de bases en los residuos de las posiciones 2 a la 21, son absolutamente esenciales para la catálisis mediada en particular por MIWI (123). Lo anterior ha evidenciado una gran especificidad en el silenciamiento mediado por estas moléculas.

15. PROTEÍNAS ASOCIADAS A PIWI EN LA BIOGENERACIÓN DE PIWI

Las proteínas PIWI interactúan con numerosas proteínas para regular la biogeneración de piRNA. El estudio de estas proteínas adicionales, nos entregan información complementaria para entender mejor el mecanismo de silenciamiento mediado por piRNA.

a. Proteínas que contienen dominios TUDOR (TDRD)

Las proteínas que contienen dominios relacionados con tudor en sus estructuras (TDRD), ha sido de interés en el estudio debido a su función e interacción con las proteínas PIWI (130, 131). Las proteínas TDRD pertenecen a la gran familia de proteínas TUDOR que reciben su nombre gracias al gen del mismo nombre descubierto en *Drosophila melanogaster* durante la pesquisa de mutaciones que causaban letalidad y esterilidad a la progenie de éstas moscas (132). El dominio tudor ha sido reportado en una amplia gama de proteínas eucariotas. Este dominio, posee una estructura central de aproximadamente 60 aminoácidos compuesto de cuatro hebras beta anti-paralelas que forman una estructura similar a un la de un barril, con una unión aromática en su superficie, para recepcionar ligandos de arginina/lisina metilados (133, 134). La versatilidad conformacional del dominio proteico tudor, le confiere a las proteínas múltiples funciones en diversos procesos tales como el metabolismo de RNA, el espliceosoma de mRNA, la biogeneración de piRNA y la modificación de Histonas (135-137).

Se ha identificado que, la subfamilia de proteínas PIWI son metiladas en sus argininas por una proteína llamada metil Transferasa 5 (dPRMT5, también conocida como Capsuleen o Dart5) para formar argininas di metiladas (sDMAs) simétricamente en su extremo N terminal (138, 139). Las sDMAs de las proteínas PIWI sirven como motivos de unión para TDRDs y juegan un rol crucial en las funciones de piRNAs (140-142). Muchos TDRDs se han detectado en recientes estudios en rata, tales como: TDRKH, TDRD1, TDRD2, TDRD4, TDRD5, TDRD6, TDRD7, TDRD9 y TDRD12 (143-146). TDRKH es una proteína mitocondrial que se asocia a MIWI y MIWI2, y es

requerida para el procesamiento de piRNA inmaduros. También actúa como una especie de andamio para las proteínas PIWI de rata ya que recluta diversas proteínas fundamentales en el silenciamiento al núcleo germinal (nuage) en moscas (138, 147, 148).

b. Factores adicionales a Tudor en la biogeneración de piRNAs

Diversos estudios han identificado factores adicionales involucrados en la vía de piRNA que incluyen en su mayoría proteínas con dominios de helicasa. La helicasa de ratones MOV10L1 o su ortólogo ARMI en moscas, son requeridas en la biogénesis primaria de piRNA (149, 150). Se cree que son capaces de cargar el precursor primario de piRNA (25-70 nucleótidos) a las proteínas PIWI, como se describió en *Drosophila melanogaster*. Se pueden unir a los tres tipos de proteínas PIWI y es un gran regulador de la biogeneración de piRNA. Por otra parte, VASA en moscas y su homólogo MVH/DDX4 en ratas, se ha reportado como un cofactor importante en la etapa de biogeneración secundaria de piRNAs (140, 151). VASA junto a otra proteína llamada FKBP6, son actores importantes en la asociación de las proteínas MIWI2 a piRNA secundario apoyado por la proteína TDRD1 (152, 153). Las proteínas GASZ y GPAT2 se asocian con MILI y son requeridas para la biogénesis primaria de piRNA (154, 155). GASZ, GPAT2 y MITOPLD son proteínas de membranas mitocondriales, y tienen actividad endonucleasa frente a RNAs de hebra simple, tal como lo son piRNAs. El homólogo de MITPLD en moscas es Zucchini (ZUC), y en recientes investigaciones se ha descrito que esta proteína posee importantes efectos regulatorios en la vía primaria de piRNA, mientras que MITPLD en rata tiene efectos regulatorios a lo largo de toda la vía de generación de piRNA (156-158). La proteína MAEL co-localiza junto a MIWI2 y TDRD9 en proespermatogonias, se asocia con MILI y MIWI en espermátocitos y promueve la localización nuclear de MIWI junto con el inicio de la biogénesis de piRNA en gonocitos de rata (159, 160).

La gran cantidad de proteínas asociadas a la generación de piRNAs, ha demostrado la complejidad de dicha vía para el procesamiento y la generación de piRNA maduros.

16. BIOGENERACIÓN DE PI RNA

La biogénesis de piRNAs se ha abordado a través de 2 etapas: La de su procesamiento primario y luego a una segunda etapa de amplificación cíclica, llamada también etapa de ping pong (Figura 7).

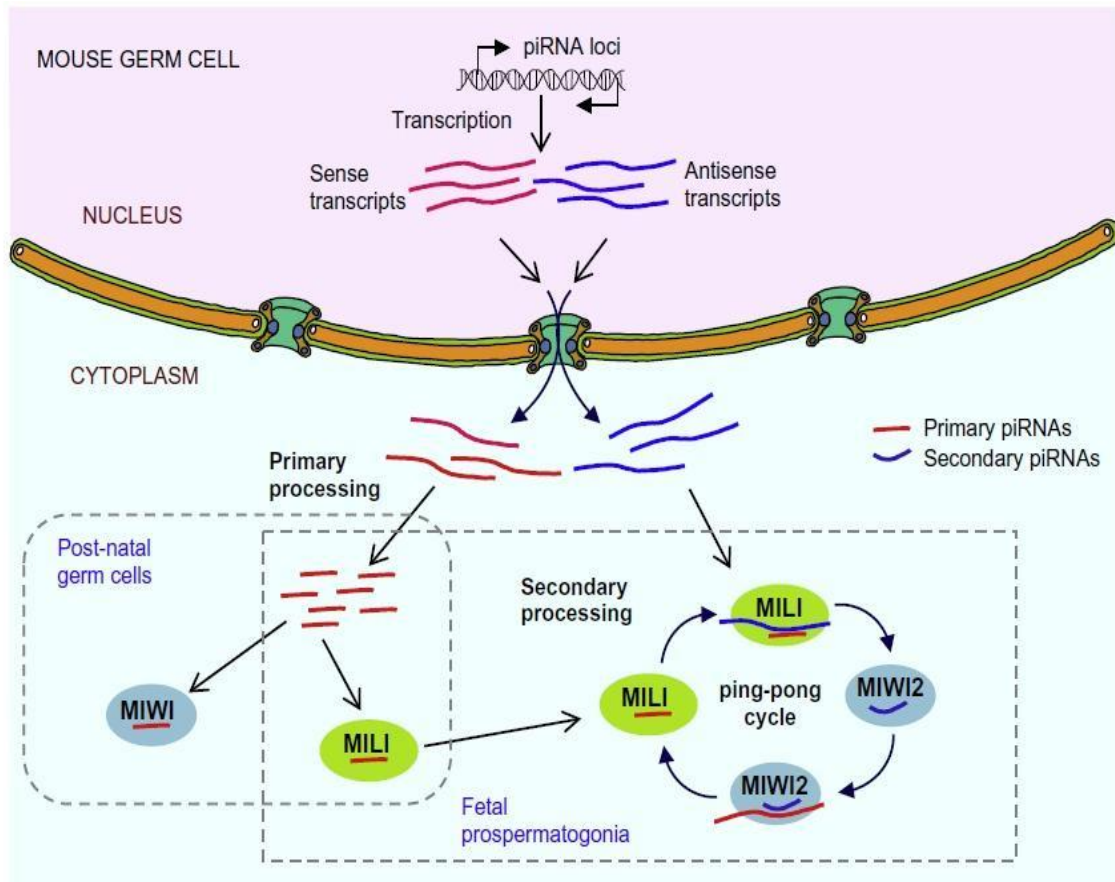


Figura 7. Biogeneración de piRNA en mamíferos. Los precursores de piRNA son transcritos desde piRNA clusters y transportados al citoplasma para su procesamiento. En las células fetales germinales, piRNA primarios producidos por el procesamiento primario son cargados a MILI. Esta unión se amplifica por el procesamiento secundario en ping pong al igual que la producción de MIWI2 unido a piRNA. Este proceso se genera en pro espermatogonia para silenciar la expresión de transposones.

Fuente: Yadav RP, Kotaja N. Small RNAs in spermatogenesis. Molecular and cellular endocrinology. 2014;382(1):498-508. Epub 2013/05/02.

a. Biogeneración primaria de piRNA

Durante el procesamiento primario, el loci que codifica para piRNA transcribe inicialmente un RNA largo, llamado piRNA precursor que posee cientos de kilo bases de largo (105). La transcripción de piRNA de paquitenos se inicia por el factor de transcripción llamado A-MYB (117). Esta proteína también regula otros genes de la vía de piRNA tales como TDRD1, MIWI, y MITOPLD. Los precursores de piRNA se generan cubiertos en su extremo 5', y poli-adenilados en su extremo 3' (117). Una de las mayores diferencias entre la vía de biogeneración de piRNA y las de miRNA/siRNA es que la biogeneración de piRNA es independiente de la enzima Dicer (103). Más aun, el análisis de las regiones estructurales de precursores piRNA muestran una falta de la forma de horquilla o bucle, característica inicial de siRNA y miRNA (92). Los precursores de piRNA son luego procesados en RNAs más pequeños, llamados piRNA intermediarios, por la endonucleasa MITOPLD en ratas (ZUC en moscas). Los piRNA intermediarios se asocian a proteínas MILI y MIWI, y su extremo 5' que termina con Uridinas, provoca una estrecha unión por afinidad al dominio MID de las proteínas PIWI. El tamaño de estos piRNA intermediarios es de entre 32-40 nucleótidos (116, 161, 162).

El piRNA intermediario es a continuación cortado nuevamente por la enzima y transformado en piRNAs maduros, bajo la actividad nucleasa mediada por TDRKH, una proteína de la familia tudor. Luego del corte, el piRNA maduro es di metilado e incorporado al dominio PAZ de la proteína MILI (148, 163).

b. Biogeneración secundaria de piRNA (ciclo de amplificación o ping pong)

Mientras que mediante la vía primaria se genera un pool inicial de piRNA maduro, en esta segunda etapa, el ciclo de amplificación en ping pong genera piRNA secundarios maduros procesados, amplificando el pool de piRNAs primarios. Durante esta etapa, las proteínas PIWI rompen los RNA entre el nucleótido 10° y el 11°, generando el extremo 5' de los piRNA secundarios. Esto provoca que la marca de los piRNAs secundarios sea la adenosina en el 10° nucleótido (164). Los piRNAs secundarios son cargados en otras proteínas PIWI y sus extremos 3' son procesados por la actividad rebanadora de otra nucleasas llamada Trimmer (165, 166). Por otra

parte, los piRNAs secundarios guían a las proteínas PIWI a los RNA blancos para cortarlos y al mismo tiempo estas moléculas se unen para producir piRNA primarios amplificando la producción de piRNAs y el silenciamiento de transcritos de RNA. La amplificación por ping pong solo ha sido observada durante la biogeneración de piRNA en pre paquitenos de ratas, en la cual los piRNAs primarios son cargados en MILI y posteriormente, los piRNA secundarios se cargan en MILI y MIWI2 de manera que, mientras que MIWI2 está involucrada en la generación de piRNAs secundarios, MILI forma un ciclo de intra amplificación con sí mismo para amplificar piRNA (128). Los piRNA pre paquitenos son hebras sentido de elementos transponibles, por lo que se cree que los transcritos de elementos transponibles alimentan la vía de biogeneración de piRNAs para generar el pool primario de estos RNA pequeños. Por otra parte, los piRNAs secundarios son hebras anti sentido de transposones y guían a MIWI2 para silenciar los transposones en el núcleo. Este mecanismo, permite a las células germinales generar una defensa adaptativa frente a transposones endógenos a través de la vía de piRNAs (7, 11, 105).

17. UBICACIÓN DE LOS FACTORES INVOLUCRADOS EN LA VÍA DE PIRNA

Durante la espermatogénesis, varios cuerpos sub celulares densos, llamados nuages o gránulos germinales, se forman en el citoplasma de las células germinales. Los nuages son centros de procesamiento de RNA siendo muy importantes en la vía de piRNA (167-169). Estas estructuras ricas en ribo-nucleoproteínas son conservadas evolutivamente en células de la línea germinal, a la que podemos sumar también el cemento inter mitocondrial (IMC) y los cuerpos pi. El IMC está presente en espermatoцитos de pro-espermatogonia, espermatogonia y paquitenos. Muchos componentes de la vía de piRNAs están ubicados en IMC tales como MILI, MOV10L1, TDRD1, TDRKH, GASZ, MVH, MAEL, MIWI2, TDRD9 y MIWI. Los cuerpos pi e IMC son centros de procesamiento de piRNAs primarios y secundarios (158, 170-172).

En *Drosophila melanogaster* para que ocurra la formación de células germinales, previamente se requiere de una especializada forma del citoplasma, conocida como el plasma germinal (173). Esta estructura se encuentra en el polo posterior del embrión y es morfológicamente distinto del resto de los elementos del citoplasma de los embriones debido a que contienen unas estructuras electro-densas

conocidas como gránulos polares, que se encuentran comúnmente asociados a mitocondria (174). Similares estructuras electrodensas se encontradas en diferentes puntos del desarrollo germinal de moscas llamadas "nuages" (nubes en francés) que son estructuras peri- nucleares de las células germinales. Estructuras análogas a las mencionadas también se observan en muchos metazoos como los cuerpos cromatoides en los testículos de mamíferos (175). El cuerpo cromatoide o CB (Chromatoid Body en ingles) es el nuage más estudiados de las líneas germinales en mamíferos y fue descubierto hace casi 50 años, pero todavía encierra varios misterios. En un comienzo se forma en los espermatoцитos en paquiteno y desaparece en la etapa de diploteno de la meiosis 1, pero reaparece en los espermatoцитos durante la meiosis 2, como largos cuerpos densos que se agregan como una sola nuage en las espermátidas redondas. Luego, el CB se mueve hacia el flagelo y es descartado junto a los cuerpos residuales y citoplasma(167, 176). Muchos factores de la vía de piRNA están presentes en ésta estructura como por ejemplo TDRD1, TDRD6, TDRD7 junto con MIWI y son requeridos para la formación y arquitectura del CB por lo que se sugiere una función reguladora post transcripcional de este centro de procesos (134, 167, 177, 178).

18. piRNA EN LA LÍNEA GERMINAL DE MAMÍFEROS

La línea germinal es el linaje celular que transmite la información genética a la próxima generación. Los cambios genéticos y epigenéticos que se generan en estas células afectan el desarrollo embrionario y a la descendencia, por lo tanto, la estabilidad de las células germinales es un requisito elemental para la preservación de los individuos y las especies. El daño al DNA genómico ocurre generalmente como consecuencia de factores físicos o químicos, pero existe otro factor que puede dañar el genoma y está codificado en sí mismo. Son los llamados elementos transponibles que se pueden mover, amplificar y transponer a nuevas posiciones en el genoma causando graves daños en la transcripción de genes (123). En mamíferos los transposones y sus secuencias ocupan la mitad del genoma, al contrario de las regiones exónicas codificantes de proteínas que comprenden 1-2% del DNA (179). Aunque la mayoría de esos elementos transponibles son silenciados por mutaciones, algunos de los transposones permanecen activos e incluso se heredan a la siguiente generación (180).

Para controlar los transposones, los genomas huéspedes han evolucionado múltiples mecanismos de defensa tales como la metilación del DNA, por lo que una mutación de la metil Transferasa que controla dicho proceso (llamada DNMT1), repercute en una activación de los transposones y produce la muerte de los embriones (181). Otro mecanismo de defensa esta dado por la modificación de las histonas, que también juegan un rol esencial en silenciamiento epigenético de los transposones (182). Por otra parte, las células germinales en particular, están equipadas con la vía de piRNAs para la defensa de su ADN, en las cuales las proteínas PIWI de la familia de las Argonautas son los efectores principales del silenciamiento de elementos móviles del genoma. Las funciones de las proteínas PIWI ha sido inferidas a través del análisis del fenotipo de mutantes con pérdida de su función que han sido llevados a cabo en diversas especies, tales como *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio* y planarias, los cuales han entregado importante información acerca de la función de las proteínas PIWI en la células de la línea germinal (64, 92-95).

En mamíferos, los piRNAs se expresan en su mayoría en células germinales masculinas. Cuando se produce una pérdida de función de los genes participantes en la vía de piRNA, diversos estudios han reportado esterilidad masculina (10, 123, 183).

En ratones, la determinación de la línea germinal ocurre entre una población de células epiblasticas pluripotenciales que dependen de las señales recepcionadas de las células somáticas que las rodean (184). Este proceso específico lleva a la formación de las células germinales primordiales (PGCs), que se destinan a la formación de futuros gametos en la etapa de gastrulación del desarrollo embrionario. Las PGCs están ubicadas en el tejido extra-embrionario y luego migran para alcanzar la gónada primordial donde comienza la diferenciación de las células masculinas. En el macho, las PGCs entran en arresto G1/G0 y se convierten en pro espermatogonia, que luego continúa con la proliferación mitótica justo después del nacimiento, para luego convertirse en una célula troncal pro espermatogonia post natal, que prosigue con la primera ola de diferenciación espermatogénica que inicia con el espermatocito meiótico. Posteriormente se genera la espermátida redonda haploide, y finalmente el espermatozoide maduro (185). A través de la continua proliferación de las espermatogonias y su subsecuente diferenciación, los espermatozoides funcionales son generados a través de toda la vida del macho. Durante esa diferenciación de células

germinales, se llevan a cabo dinámicas reprogramaciones epigenéticas que incluyen, metilación del DNA de PGCs, seguidas del establecimiento de la metilación de novo durante la diferenciación de las células germinales masculinas (186). Luego de la determinación de su destino, las PGCs exhiben una reducción de metilaciones de citosinas en su genoma, y cuando entran a las gónadas en desarrollo, los genes parentales así como la codificación de otros genes y algunos elementos transponibles se ven en gran medida dimetilados (187). Afortunadamente, luego de la extensa eliminación de las metilaciones en el DNA y para proteger la integridad del mismo, la metilación de novo es restablecida en pro espermatogonias fetales, lo cual incluye la impronta de patrones paternos en gonocitos masculinos. Es en estos importantes procesos, que la maquinaria de piRNAs se encarga como primera tarea del silenciamiento de retro transposones y esta tarea forma parte del rol central de la vía de piRNAs. En la línea germinal de embriones, MILI usa su actividad catalítica no solo para generar MIWI2 asociados a piRNAs en la vía secundaria de su generación, sino que también para destruir directamente transposones de mRNAs (128). Por otra parte, las proteínas MIWI2 que se encuentran en el núcleo, generan silenciamiento transcripcional promoviendo la metilación del DNA en las regiones promotoras de elementos transponibles. En paralelo a lo anterior, los piRNAs guiados por MIWI2 acceden a los promotores de transposones por apareamiento de bases con los transcritos nacientes para producir su silenciamiento. En etapas post natales, piRNAs de paquiteno actúan como guías frente a la actividad cortadora de MIWI, en un acto de vigilancia hacia los transposones de mRNAs que se escaparon al silenciamiento post transcripcional (129). Debido a todo lo anterior, podemos destacar la actividad cortadora de PIWI como promordial en el silenciamiento transcripcional inicial en embriones y también en el mantenimiento del silenciamiento luego de nacimiento (123).

Para la mantención de células troncales germinales, las proteínas PIWI son requeridas en diversas etapas de la gametogénesis y esto se ha demostrado en ratas mutantes carentes de PIWI. En mutantes de MILI y MIWI2 la espermatogénesis se bloquea en la etapa de paquiteno (189), pero su arresto se relaciona más a las etapas tempranas de gonocitos y espermatogonia debido a su perfil de expresión proteico. Por otra parte en mutantes de MIWI, la espermatogénesis es arrestada en las etapas tempranas de la espermiogénesis cuando las espermatidas redondas se convierten en espermios maduros. En ambos grupos de mutantes las células germinales son

severamente degeneradas y no producen espermios funcionales, resultando en una completa esterilidad masculina (108) debido a que la pérdida de las proteínas PIWI lleva a la línea germinal a una apoptosis específica, la cual es gatillada por el daño del DNA relacionado al gran número de transposones que se incorporan al DNA (97, 104). Otro estudio que da importancia a la función de piRNAs en el desarrollo de los espermios, indica que en los ratones mutantes de MIWI2, el nivel de la Histona fosforilada H2AX (una proteína que marca los sitios de quiebre de la doble hebra de ADN que ocurren naturalmente en la etapa de leptoteno de la meiosis) aumenta en la etapa del zigoteno, debido a la imposibilidad de reparar la doble hebra, lo cual no permite a las células germinales entrar a la etapa de paquiteno en la espermatogénesis y desencadena una apoptosis celular, evidenciando la función de piRNAs en la mantención de la integridad del genoma en las líneas germinales (106). Lo anterior es una función conservada en varias especies debido a que se ha observado también en pez cebra (120), moscas (190) y en planarias (104, 191, 192).

Por otra parte, se ha investigado que las proteínas PIWI tienen un rol importante en la regulación positiva de traducción en las células germinales. Esto se sustenta debido a la asociatividad encontrada entre MIWI y CREAM (cAMP responsive element upmodulator) en la línea germinal de ratas. CREAM es una proteína activadora de la expresión de genes necesarios para la espermiogénesis en ratas y en mutantes MIWI, la función de CREAM se ve severamente afectada, lo que nos indica que MIWI y CREAM actúan juntos en el inicio de la espermiogénesis, describiendo la importancia de la vía de piRNA en la regulación de los iniciadores de la espermatogénesis (121). Sumado a lo anterior, las proteínas PIWI actúan como regulador de la traducción en ratas

, ya que se asocian a los polisomas que interactúan con el factor de la traducción 3a (eIF3a). Un estudio indica que en mutantes de MILI el nivel de expresión de este factor de traducción se ve deprimido en un 60%, lo que nos sugiere una acción reguladora positiva de MILI (189).

19.FUNCIONES SOMÁTICAS DE piRNAS

A pesar de la presencia de las proteínas PIWI y piRNAs en la línea germinal, el rol de dichas moléculas en tejidos somáticos ha sido estudiado en variadas especies. En Planarias por ejemplo, la regeneración de tejidos depende de células troncales conocidas como neoblastos. En estas células, tres proteínas PIWI están presentes, pero dos de ellas, SMEDWI-2 y SMEDWI-3, son necesarias para la mantención de las células regeneradoras. Este rol de mantención de las células troncales se conserva también en otras especies tales como *Drosophila melanogaster*, pez cebra y rata (192, 193).

Por otra parte, en el desarrollo de ciliados tales como *Tetrahymena thermophila*, participa una proteína PIWI llamada TWI1P durante su reproducción sexual. El rol que cumple esta proteína es de eliminación específica de diversas regiones del DNA relevantes en su desarrollo (194).

Otro ejemplo de la función somática de piRNA, es una proteína ortóloga a PIWI llamada HIWI en humanos, ya que la sobreexpresión ectópica de HIWI se ha asociado a numerosos tipos de cáncer. Sin embargo otros estudios añaden, que la represión de la expresión de HIWI genera una detención en el crecimiento de células cancerosas analizadas en cultivos celulares por lo que estos análisis, nos entregan evidencia de un rol regulatorio de ésta proteína PIWI en procesos cancerígenos (195-197).

20.CONCLUSION

El silenciamiento génico mediado por RNA es parte de un complejo mecanismo de regulación genética, que se encuentra conservado en casi toda la escala biológica y hace casi dos décadas ha emergido como una pieza clave en el desarrollo de diversas especies. En acuerdo a su gran presencia en diversas especies y debido a la condición endógena de los RNAs pequeños, se ha concluido que esta vía molecular, podría ser un sistema primitivo de defensa heredado de precursores eucariotas, frente a elementos móviles que pudieran dañar el DNA. Por otro lado en procariontas, aún no se conoce la real función de las proteínas argonautas que se unen a los RNA pequeños, pero se ha evidenciado su efecto protector frente a bacteriófagos y elementos móviles externos.

Como parte importante del proceso de silenciamiento mediado por RNAi, se han destacado a las moléculas efectoras de las via de generacion de RNA pequeño, ya que son elementos conservados en variadas especies y están adaptados para generar una óptima función de silenciamiento de elementos transponibles dañinos para el DNA. Como ejemplo de lo anterior, se menciona la importante función del procesamiento citoplasmático de RNAs pequeños que es mediada por la enzima Dicer. Esta nucleasa no discrimina en moléculas de doble hebra por su complementariedad de bases, privilegiando el elemento protector y entregando una completa disponibilidad de procesamiento sobre todo en sistemas tan elementales como en el desarrollo de la línea germinal.

El hecho de que la mayoría de los piRNA caracterizados en la actualidad provengan de su descubrimiento en las células germinales, elevan a estas moléculas a un papel preponderante en el desarrollo de las especies. En la espermatogénesis por ejemplo, la línea germinal masculina tiene un organizado patrón de expresión de genes en su proceso de diferenciación y que es regulado de manera post transcripcional por piRNAs, lo que nos indica el papel clave que tiene este tipo de RNA pequeños en la mantencion de DNA y por consiguiente, en preservación de las especies, silenciando el daño que pueden ingresar los elementos transponibles en el traspaso de la información genética.

En la última sección de ésta revisión, se ha mencionado la participación de los RNAs pequeños en células somáticas, por lo que es importante destacar las posibles aplicaciones de estas moléculas como herramienta terapéutica en diversas patologías, tales como el cáncer, el Alzheimer u otras enfermedades neurodegenerativas que cursen como consecuencia de la sobreexpresión de un gen o de la expresión de un alelo defectuoso el cual pueda ser silenciado por RNA de interferencia.

A pesar del gran avance en el conocimiento de estas moléculas que actúan en la regulación de la expresión de genes, es importante continuar con el seguimiento a los últimos estudios que se relacionan a los RNAs pequeños para poder dilucidar y ampliar las funciones y procesos en los cuales participan en los diversos organismos.

21. BIBLIOGRAFIA

1. Dykxhoorn DM, Lieberman J. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annual review of medicine*. 2005;56:401-23. Epub 2005/01/22.
2. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*. 2009;10(2):94-108. Epub 2009/01/17.
3. Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*. 2009;457(7228):396-404. Epub 2009/01/23.
4. Sen GL, Blau HM. A brief history of RNAi: the silence of the genes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(9):1293-9. Epub 2006/07/04.
5. Tuschl T. RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem*. 2001;2(4):239-45. Epub 2002/02/06.
6. Babiarz JE, Belloch R. Small RNAs - their biogenesis, regulation and function in embryonic stem cells. *StemBook*. Cambridge (MA)2008.
7. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(2):126-39. Epub 2009/01/24.
8. Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):22-32. Epub 2007/12/13.
9. Beyret E, Lin H. Pinpointing the expression of piRNAs and function of the PIWI protein subfamily during spermatogenesis in the mouse. *Developmental biology*. 2011;355(2):215-26. Epub 2011/05/05.
10. Fu Q, Wang PJ. Mammalian piRNAs: Biogenesis, function, and mysteries. *Spermatogenesis*. 2014;4:e27889. Epub 2014/08/01.
11. Castaneda J, Genzor P, Bortvin A. piRNAs, transposon silencing, and germline genome integrity. *Mutation research*. 2011;714(1-2):95-104. Epub 2011/05/24.
12. Mello CC. Return to the RNAi world: rethinking gene expression and evolution. *Cell death and differentiation*. 2007;14(12):2013-20. Epub 2007/11/17.

13. Izant JG, Weintraub H. Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell*. 1984;36(4):1007-15. Epub 1984/04/01.
14. Harland R, Weintraub H. Translation of mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA. *The Journal of cell biology*. 1985;101(3):1094-9. Epub 1985/09/01.
15. Rosenberg UB, Preiss A, Seifert E, Jackle H, Knipple DC. Production of phenocopies by Kruppel antisense RNA injection into *Drosophila* embryos. *Nature*. 1985;313(6004):703-6. Epub 1985/02/21.
16. Guo S, Kemphues KJ. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*. 1995;81(4):611-20. Epub 1995/05/19.
17. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11. Epub 1998/03/05.
18. Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*. 1998;395(6705):854. Epub 1998/11/06.
19. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 1990;2(4):279-89. Epub 1990/04/01.
20. Metzloff M, O'Dell M, Cluster PD, Flavell RB. RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in *petunia*. *Cell*. 1997;88(6):845-54. Epub 1997/03/21.
21. Ingelbrecht I, Van Houdt H, Van Montagu M, Depicker A. Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(22):10502-6. Epub 1994/10/25.
22. Cogoni C, Macino G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*. 1999;399(6732):166-9. Epub 1999/05/21.
23. Montgomery MK, Xu S, Fire A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(26):15502-7. Epub 1998/12/23.

24. Tabara H, Grishok A, Mello CC. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science*. 1998;282(5388):430-1. Epub 1998/12/05.
25. Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(17):9742-7. Epub 2001/08/02.
26. Mello CC, Conte D, Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature*. 2004;431(7006):338-42. Epub 2004/09/17.
27. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*. 2001;15(2):188-200. Epub 2001/02/07.
28. Murchison EP, Hannon GJ. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Current opinion in cell biology*. 2004;16(3):223-9. Epub 2004/05/18.
29. Faehle CR, Joshua-Tor L. Argonautes confront new small RNAs. *Current opinion in chemical biology*. 2007;11(5):569-77. Epub 2007/10/12.
30. Perron MP, Provost P. Protein components of the microRNA pathway and human diseases. *Methods in molecular biology*. 2009;487:369-85. Epub 2009/03/24.
31. Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *Journal of biochemistry*. 2010;148(4):381-92. Epub 2010/09/14.
32. Newman MA, Hammond SM. Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *Genes Dev*. 2010;24(11):1086-92. Epub 2010/06/03.
33. Lee Y, Han J, Yeom KH, Jin H, Kim VN. Drosha in primary microRNA processing. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2006;71:51-7. Epub 2007/03/27.
34. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004;18(24):3016-27. Epub 2004/12/03.
35. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*. 2004;10(2):185-91. Epub 2004/01/20.
36. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97. Epub 2004/01/28.
37. Di Leva G, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs: fundamental facts and involvement in human diseases. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2006;78(2):180-9. Epub 2006/07/19.

38. De N, Macrae IJ. Purification and assembly of human Argonaute, Dicer, and TRBP complexes. *Methods in molecular biology*. 2011;725:107-19. Epub 2011/04/30.
39. Ye X, Huang N, Liu Y, Paroo Z, Huerta C, Li P, et al. Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. *Nature structural & molecular biology*. 2011;18(6):650-7. Epub 2011/05/10.
40. Krutzfeldt J, Stoffel M. MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell metabolism*. 2006;4(1):9-12. Epub 2006/07/04.
41. Maroney PA, Yu Y, Nilsen TW. MicroRNAs, mRNAs, and translation. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2006;71:531-5. Epub 2007/03/27.
42. Osada H, Takahashi T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2007;28(1):2-12. Epub 2006/10/10.
43. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007;448(7149):83-6. Epub 2007/06/26.
44. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*. 2007;130(1):89-100. Epub 2007/06/30.
45. Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *The EMBO journal*. 2007;26(3):775-83. Epub 2007/01/27.
46. Lin SL, Miller JD, Ying SY. Intronic microRNA (miRNA). *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2006;2006(4):26818. Epub 2006/10/24.
47. de Yebenes VG, Belver L, Pisano DG, Gonzalez S, Villasante A, Croce C, et al. miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(10):2199-206. Epub 2008/09/03.
48. Di Leva G, Gasparini P, Piovan C, Ngankeu A, Garofalo M, Taccioli C, et al. MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(10):706-21. Epub 2010/04/15.
49. Georges SA, Biery MC, Kim SY, Schelter JM, Guo J, Chang AN, et al. Coordinated regulation of cell cycle transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215. *Cancer research*. 2008;68(24):10105-12. Epub 2008/12/17.
50. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 1999;286(5441):950-2. Epub 1999/11/05.

51. Sijen T, Steiner FA, Thijssen KL, Plasterk RH. Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science*. 2007;315(5809):244-7. Epub 2006/12/13.
52. Samaha H, Delorme V, Pontvianne F, Cooke R, Delalande F, Van Dorselaer A, et al. Identification of protein factors and U3 snoRNAs from a Brassica oleracea RNP complex involved in the processing of pre-rRNA. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2010;61(3):383-98. Epub 2009/11/07.
53. Maniar JM, Fire AZ. EGO-1, a *C. elegans* RdRP, modulates gene expression via production of mRNA-templated short antisense RNAs. *Curr Biol*. 2011;21(6):449-59. Epub 2011/03/15.
54. Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, et al. Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature*. 2008;453(7194):534-8. Epub 2008/04/12.
55. Correa RL, Steiner FA, Berezikov E, Ketting RF. MicroRNA-directed siRNA biogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*. 2010;6(4):e1000903. Epub 2010/04/14.
56. Wang H, Zhang X, Liu J, Kiba T, Woo J, Ojo T, et al. Deep sequencing of small RNAs specifically associated with Arabidopsis AGO1 and AGO4 uncovers new AGO functions. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2011;67(2):292-304. Epub 2011/04/05.
57. Chellappan P, Xia J, Zhou X, Gao S, Zhang X, Coutino G, et al. siRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. *Nucleic acids research*. 2010;38(20):6883-94. Epub 2010/07/14.
58. Chen X. Small RNAs in development - insights from plants. *Curr Opin Genet Dev*. 2012;22(4):361-7. Epub 2012/05/15.
59. Soifer HS, Zaragoza A, Peyvan M, Behlke MA, Rossi JJ. A potential role for RNA interference in controlling the activity of the human LINE-1 retrotransposon. *Nucleic acids research*. 2005;33(3):846-56. Epub 2005/02/11.
60. Apornthewan C, Phokaew C, Piriyaongsa J, Ngamphiw C, Ittiwut C, Tongsimas S, et al. Hypomethylation of intragenic LINE-1 represses transcription in cancer cells through AGO2. *PloS one*. 2011;6(3):e17934. Epub 2011/03/23.
61. Lau NC, Robine N, Martin R, Chung WJ, Niki Y, Berezikov E, et al. Abundant primary piRNAs, endo-siRNAs, and microRNAs in a *Drosophila* ovary cell line. *Genome research*. 2009;19(10):1776-85. Epub 2009/06/23.

62. Qi H, Watanabe T, Ku HY, Liu N, Zhong M, Lin H. The Yb body, a major site for Piwi-associated RNA biogenesis and a gateway for Piwi expression and transport to the nucleus in somatic cells. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(5):3789-97. Epub 2010/11/26.
63. Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, et al. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*. 2008;453(7194):539-43. Epub 2008/04/12.
64. Grimson A, Srivastava M, Fahey B, Woodcroft BJ, Chiang HR, King N, et al. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*. 2008;455(7217):1193-7. Epub 2008/10/03.
65. Costa FF. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene*. 2008;410(1):9-17. Epub 2008/01/30.
66. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-9. Epub 2003/09/26.
67. Perron MP, Provost P. Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:2537-47. Epub 2007/11/06.
68. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004;432(7014):235-40. Epub 2004/11/09.
69. Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods in molecular biology*. 2006;342:33-47. Epub 2006/09/08.
70. Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol*. 2003;13(9):784-9. Epub 2003/05/03.
71. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014):231-5. Epub 2004/11/09.
72. Mueller GA, Miller MT, Derose EF, Ghosh M, London RE, Hall TM. Solution structure of the Drosha double-stranded RNA-binding domain. *Silence*. 2010;1(1):2. Epub 2010/03/17.

73. Sohn SY, Bae WJ, Kim JJ, Yeom KH, Kim VN, Cho Y. Crystal structure of human DGCR8 core. *Nature structural & molecular biology*. 2007;14(9):847-53. Epub 2007/08/21.
74. Senturia R, Faller M, Yin S, Loo JA, Cascio D, Sawaya MR, et al. Structure of the dimerization domain of DiGeorge critical region 8. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2010;19(7):1354-65. Epub 2010/05/28.
75. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *The EMBO journal*. 2002;21(21):5875-85. Epub 2002/11/02.
76. Pellino JL, Jaskiewicz L, Filipowicz W, Sontheimer EJ. ATP modulates siRNA interactions with an endogenous human Dicer complex. *Rna*. 2005;11(11):1719-24. Epub 2005/09/24.
77. Hammond SM. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS letters*. 2005;579(26):5822-9. Epub 2005/10/11.
78. Macrae IJ, Li F, Zhou K, Cande WZ, Doudna JA. Structure of Dicer and mechanistic implications for RNAi. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2006;71:73-80. Epub 2007/03/27.
79. Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*. 2006;311(5758):195-8. Epub 2006/01/18.
80. MacRae IJ, Zhou K, Doudna JA. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nature structural & molecular biology*. 2007;14(10):934-40. Epub 2007/09/18.
81. Lau PW, Guiley KZ, De N, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ. The molecular architecture of human Dicer. *Nature structural & molecular biology*. 2012;19(4):436-40. Epub 2012/03/20.
82. Du Z, Lee JK, Tjhen R, Stroud RM, James TL. Structural and biochemical insights into the dicing mechanism of mouse Dicer: a conserved lysine is critical for dsRNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(7):2391-6. Epub 2008/02/13.
83. Makarova KS, Wolf YI, van der Oost J, Koonin EV. Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biology direct*. 2009;4:29. Epub 2009/08/27.

84. Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. Annual review of biophysics. 2013;42:217-39. Epub 2013/05/10.
85. Verdel A, Vavasseur A, Le Gorrec M, Touat-Todeschini L. Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. The International journal of developmental biology. 2009;53(2-3):245-57. Epub 2009/05/05.
86. Miyoshi K, Tsukumo H, Nagami T, Siomi H, Siomi MC. Slicer function of Drosophila Argonautes and its involvement in RISC formation. Genes Dev. 2005;19(23):2837-48. Epub 2005/11/17.
87. Mescalchin A, Detzer A, Weirauch U, Hahnel MJ, Engel C, Sczakiel G. Antisense tools for functional studies of human Argonaute proteins. Rna. 2010;16(12):2529-36. Epub 2010/10/12.
88. Azuma-Mukai A, Oguri H, Mituyama T, Qian ZR, Asai K, Siomi H, et al. Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(23):7964-9. Epub 2008/06/06.
89. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev. 2003;17(24):3011-6. Epub 2003/12/19.
90. Lund E, Dahlberg JE. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. 2006;71:59-66. Epub 2007/03/27.
91. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, et al. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. Science. 2009;326(5957):1275-9. Epub 2009/12/08.
92. 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. Epub 2006/06/06.
93. Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. Nature. 2006;442(7099):199-202. Epub 2006/06/06.
94. 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. Epub 2006/06/13.
95. Watanabe T, Takeda A, Tsukiyama T, Mise K, Okuno T, Sasaki H, et al. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse

germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev.* 2006;20(13):1732-43. Epub 2006/06/13.

96. Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Molecular cell.* 2008;31(6):785-99. Epub 2008/10/17.

97. 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. Epub 2008/04/03.

98. Kirino Y, Mourelatos Z. 2'-O-methyl modification in mouse piRNAs and its methylase. *Nucleic acids symposium series.* 2007(51):417-8. Epub 2007/11/22.

99. Kirino Y, Mourelatos Z. Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini. *Nature structural & molecular biology.* 2007;14(4):347-8. Epub 2007/03/27.

100. 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. Epub 2007/07/04.

101. Lau NC, Seto AG, Kim J, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Bartel DP, et al. Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science.* 2006;313(5785):363-7. Epub 2006/06/17.

102. Klattenhoff C, Theurkauf W. Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development.* 2008;135(1):3-9. Epub 2007/11/23.

103. Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science.* 2006;313(5785):320-4. Epub 2006/07/01.

104. 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. Epub 2007/04/10.

105. Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(4):246-58. Epub 2011/03/24.

106. Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, et al. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Developmental cell.* 2007;12(4):503-14. Epub 2007/03/31.

107. Das PP, Bagijn MP, Goldstein LD, Woolford JR, Lehrbach NJ, Sapetschnig A, et al. Piwi and piRNAs act upstream of an endogenous siRNA pathway to suppress Tc3 transposon mobility in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Molecular cell*. 2008;31(1):79-90. Epub 2008/06/24.
108. Juliano C, Wang J, Lin H. Uniting germline and stem cells: the function of Piwi proteins and the piRNA pathway in diverse organisms. *Annual review of genetics*. 2011;45:447-69. Epub 2011/09/29.
109. Chuma S, Nakano T. piRNA and spermatogenesis in mice. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2013;368(1609):20110338. Epub 2012/11/21.
110. Schaefer CB, Ooi SK, Bestor TH, Bourc'his D. Epigenetic decisions in mammalian germ cells. *Science*. 2007;316(5823):398-9. Epub 2007/04/21.
111. Trasler JM. Epigenetics in spermatogenesis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;306(1-2):33-6. Epub 2009/06/02.
112. Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*. 2004;431(7004):96-9. Epub 2004/08/20.
113. Huang XA, Yin H, Sweeney S, Raha D, Snyder M, Lin H. A major epigenetic programming mechanism guided by piRNAs. *Developmental cell*. 2013;24(5):502-16. Epub 2013/02/26.
114. Gan H, Lin X, Zhang Z, Zhang W, Liao S, Wang L, et al. piRNA profiling during specific stages of mouse spermatogenesis. *Rna*. 2011;17(7):1191-203. Epub 2011/05/24.
115. Grivna ST, Pyhtila B, Lin H. MIWI associates with translational machinery and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in regulating spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(36):13415-20. Epub 2006/08/30.
116. Vourekas A, Zheng Q, Alexiou P, Maragkakis M, Kirino Y, Gregory BD, et al. Mili and Miwi target RNA repertoire reveals piRNA biogenesis and function of Miwi in spermiogenesis. *Nature structural & molecular biology*. 2012;19(8):773-81. Epub 2012/07/31.
117. Li XZ, Roy CK, Dong X, Bolcun-Filas E, Wang J, Han BW, et al. An ancient transcription factor initiates the burst of piRNA production during early meiosis in mouse testes. *Molecular cell*. 2013;50(1):67-81. Epub 2013/03/26.

118. Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 1998;12(23):3715-27. Epub 1998/12/16.
119. 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. Epub 2000/01/13.
120. Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, et al. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development.* 2004;131(4):839-49. Epub 2004/01/23.
121. Deng W, Lin H. miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Developmental cell.* 2002;2(6):819-30. Epub 2002/06/14.
122. Parker JS, Barford D. Argonaute: A scaffold for the function of short regulatory RNAs. *Trends in biochemical sciences.* 2006;31(11):622-30. Epub 2006/10/13.
123. Pillai RS, Chuma S. piRNAs and their involvement in male germline development in mice. *Development, growth & differentiation.* 2012;54(1):78-92. Epub 2012/01/10.
124. Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Wardle GS, Tuschl T, et al. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature.* 2009;461(7265):754-61. Epub 2009/10/09.
125. Martinez J, Tuschl T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* 2004;18(9):975-80. Epub 2004/04/24.
126. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 2004;431(7006):343-9. Epub 2004/09/17.
127. Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science.* 2004;305(5689):1434-7. Epub 2004/07/31.
128. De Fazio S, Bartonicek N, Di Giacomo M, Abreu-Goodger C, Sankar A, Funaya C, et al. The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature.* 2011;480(7376):259-63. Epub 2011/10/25.
129. Reuter M, Berninger P, Chuma S, Shah H, Hosokawa M, Funaya C, et al. Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature.* 2011;480(7376):264-7. Epub 2011/11/29.

130. Heo I, Kim VN. Regulating the regulators: posttranslational modifications of RNA silencing factors. *Cell*. 2009;139(1):28-31. Epub 2009/10/07.
131. Handler D, Olivieri D, Novatchkova M, Gruber FS, Meixner K, Mechtler K, et al. A systematic analysis of *Drosophila* TUDOR domain-containing proteins identifies Vreteno and the Tdrd12 family as essential primary piRNA pathway factors. *The EMBO journal*. 2011;30(19):3977-93. Epub 2011/08/25.
132. Boswell RE, Mahowald AP. tudor, a gene required for assembly of the germ plasm in *Drosophila melanogaster*. *Cell*. 1985;43(1):97-104. Epub 1985/11/01.
133. Maurer-Stroh S, Dickens NJ, Hughes-Davies L, Kouzarides T, Eisenhaber F, Ponting CP. The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends in biochemical sciences*. 2003;28(2):69-74. Epub 2003/02/11.
134. Hosokawa M, Shoji M, Kitamura K, Tanaka T, Noce T, Chuma S, et al. Tudor-related proteins TDRD1/MTR-1, TDRD6 and TDRD7/TRAP: domain composition, intracellular localization, and function in male germ cells in mice. *Developmental biology*. 2007;301(1):38-52. Epub 2006/12/05.
135. Pek JW, Anand A, Kai T. Tudor domain proteins in development. *Development*. 2012;139(13):2255-66. Epub 2012/06/07.
136. Siomi MC, Mannen T, Siomi H. How does the royal family of Tudor rule the PIWI-interacting RNA pathway? *Genes Dev*. 2010;24(7):636-46. Epub 2010/04/03.
137. Nishida KM, Okada TN, Kawamura T, Mituyama T, Kawamura Y, Inagaki S, et al. Functional involvement of Tudor and dPRMT5 in the piRNA processing pathway in *Drosophila* germlines. *The EMBO journal*. 2009;28(24):3820-31. Epub 2009/12/05.
138. Chen C, Jin J, James DA, Adams-Cioaba MA, Park JG, Guo Y, et al. Mouse Piwi interactome identifies binding mechanism of Tdrkh Tudor domain to arginine methylated Miwi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(48):20336-41. Epub 2009/11/18.
139. 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. Epub 2009/04/28.
140. Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, et al. The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Developmental cell*. 2009;17(6):775-87. Epub 2010/01/12.

141. Kirino Y, Vourekas A, Sayed N, de Lima Alves F, Thomson T, Lasko P, et al. Arginine methylation of Aubergine mediates Tudor binding and germ plasm localization. *Rna*. 2010;16(1):70-8. Epub 2009/11/21.
142. Wang J, Saxe JP, Tanaka T, Chuma S, Lin H. Mili interacts with tudor domain-containing protein 1 in regulating spermatogenesis. *Curr Biol*. 2009;19(8):640-4. Epub 2009/04/07.
143. Patil VS, Kai T. Repression of retroelements in *Drosophila* germline via piRNA pathway by the Tudor domain protein Tejas. *Curr Biol*. 2010;20(8):724-30. Epub 2010/04/07.
144. 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. Epub 2009/07/09.
145. Pandey RR, Tokuzawa Y, Yang Z, Hayashi E, Ichisaka T, Kajita S, et al. Tudor domain containing 12 (TDRD12) is essential for secondary PIWI interacting RNA biogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(41):16492-7. Epub 2013/09/27.
146. Yabuta Y, Ohta H, Abe T, Kurimoto K, Chuma S, Saitou M. TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly, and spermiogenesis in mice. *The Journal of cell biology*. 2011;192(5):781-95. Epub 2011/03/09.
147. Lamb FS, BRNAa TJ, Goud C, Marenholz I, Mischke D, Schutte BC. Complex RNA processing of TDRKH, a novel gene encoding the putative RNA-binding tudor and KH domains. *Gene*. 2000;246(1-2):209-18. Epub 2000/04/18.
148. Saxe JP, Chen M, Zhao H, Lin H. Tdrkh is essential for spermatogenesis and participates in primary piRNA biogenesis in the germline. *The EMBO journal*. 2013;32(13):1869-85. Epub 2013/05/30.
149. Frost RJ, Hamra FK, Richardson JA, Qi X, Bassel-Duby R, Olson EN. MOV10L1 is necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(26):11847-52. Epub 2010/06/16.
150. Olivieri D, Sykora MM, Sachidanandam R, Mechtler K, Brennecke J. An in vivo RNAi assay identifies major genetic and cellular requirements for primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *The EMBO journal*. 2010;29(19):3301-17. Epub 2010/09/08.

151. Malone CD, Brennecke J, Dus M, Stark A, McCombie WR, Sachidanandam R, et al. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell*. 2009;137(3):522-35. Epub 2009/04/28.
152. Noguchi J, Ozawa M, Nakai M, Somfai T, Kikuchi K, Kaneko H, et al. Affected homologous chromosome pairing and phosphorylation of testis specific histone, H2AX, in male meiosis under FKBP6 deficiency. *The Journal of reproduction and development*. 2008;54(3):203-7. Epub 2008/04/15.
153. Zhang W, Zhang S, Xiao C, Yang Y, Zhoucun A. Mutation screening of the FKBP6 gene and its association study with spermatogenic impairment in idiopathic infertile men. *Reproduction*. 2007;133(2):511-6. Epub 2007/02/20.
154. Ma L, Buchold GM, Greenbaum MP, Roy A, Burns KH, Zhu H, et al. GASZ is essential for male meiosis and suppression of retrotransposon expression in the male germline. *PLoS genetics*. 2009;5(9):e1000635. Epub 2009/09/05.
155. Shiromoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Daiba A, Chuma S, Katanaya A, Katsumata A, et al. GPAT2, a mitochondrial outer membrane protein, in piRNA biogenesis in germline stem cells. *Rna*. 2013;19(6):803-10. Epub 2013/04/25.
156. Gao Q, Frohman MA. Roles for the lipid-signaling enzyme MitoPLD in mitochondrial dynamics, piRNA biogenesis, and spermatogenesis. *BMB reports*. 2012;45(1):7-13. Epub 2012/01/28.
157. Aravin AA, Chan DC. piRNAs meet mitochondria. *Developmental cell*. 2011;20(3):287-8. Epub 2011/03/15.
158. Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, et al. Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus. *Science*. 2011;332(6031):848-52. Epub 2011/05/14.
159. Takebe M, Onohara Y, Yokota S. Expression of MAEL in nuage and non-nuage compartments of rat spermatogenic cells and colocalization with DDX4, DDX25 and MIWI. *Histochemistry and cell biology*. 2013;140(2):169-81. Epub 2013/02/16.
160. Bahena I, Xu E, Betancourt M, Casas E, Ducolomb Y, Gonzalez C, et al. Role of Mael in early oogenesis and during germ-cell differentiation from embryonic stem cells in mice in vitro. *Zygote*. 2014;22(4):513-20. Epub 2013/02/16.
161. Ipsaro JJ, Haase AD, Knott SR, Joshua-Tor L, Hannon GJ. The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature*. 2012;491(7423):279-83. Epub 2012/10/16.

162. Nishimasu H, Ishizu H, Saito K, Fukuhara S, Kamatani MK, Bonnefond L, et al. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature*. 2012;491(7423):284-7. Epub 2012/10/16.
163. Kawaoka S, Izumi N, Katsuma S, Tomari Y. 3' end formation of PIWI-interacting RNAs in vitro. *Molecular cell*. 2011;43(6):1015-22. Epub 2011/09/20.
164. 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. Epub 2007/02/27.
165. Simon B, Kirkpatrick JP, Eckhardt S, Reuter M, Rocha EA, Andrade-Navarro MA, et al. Recognition of 2'-O-methylated 3'-end of piRNA by the PAZ domain of a Piwi protein. *Structure*. 2011;19(2):172-80. Epub 2011/01/18.
166. Tian Y, Simanshu DK, Ma JB, Patel DJ. Structural basis for piRNA 2'-O-methylated 3'-end recognition by Piwi PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(3):903-10. Epub 2011/01/05.
167. Meikar O, Da Ros M, Korhonen H, Kotaja N. Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. *Reproduction*. 2011;142(2):195-209. Epub 2011/06/10.
168. Nagamori I, Sassone-Corsi P. The chromatoid body of male germ cells: epigenetic control and miRNA pathway. *Cell cycle*. 2008;7(22):3503-8. Epub 2008/11/13.
169. Kotaja N, Bhattacharyya SN, Jaskiewicz L, Kimmins S, Parvinen M, Filipowicz W, et al. The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(8):2647-52. Epub 2006/02/16.
170. Zheng K, Xiol J, Reuter M, Eckardt S, Leu NA, McLaughlin KJ, et al. Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(26):11841-6. Epub 2010/06/11.
171. Aravin AA, van der Heijden GW, Castaneda J, Vagin VV, Hannon GJ, Bortvin A. Cytoplasmic compartmentalization of the fetal piRNA pathway in mice. *PLoS genetics*. 2009;5(12):e1000764. Epub 2009/12/17.

172. van der Heijden GW, Castaneda J, Bortvin A. Bodies of evidence - compartmentalization of the piRNA pathway in mouse fetal prospermatogonia. *Current opinion in cell biology*. 2010;22(6):752-7. Epub 2010/09/09.
173. Illmensee K, Mahowald AP. Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974;71(4):1016-20. Epub 1974/04/01.
174. Mahowald AP. Assembly of the *Drosophila* germ plasm. *International review of cytology*. 2001;203:187-213. Epub 2000/12/29.
175. Saffman EE, Lasko P. Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 1999;55(8-9):1141-63. Epub 1999/08/12.
176. Eddy EM. Cytochemical observations on the chromatoid body of the male germ cells. *Biology of reproduction*. 1970;2(1):114-28. Epub 1970/02/01.
177. Vasileva A, Tiedau D, Firooznia A, Muller-Reichert T, Jessberger R. Tdrd6 is required for spermiogenesis, chromatoid body architecture, and regulation of miRNA expression. *Curr Biol*. 2009;19(8):630-9. Epub 2009/04/07.
178. Tanaka T, Hosokawa M, Vagin VV, Reuter M, Hayashi E, Mochizuki AL, et al. Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid bodies during spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(26):10579-84. Epub 2011/06/15.
179. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921. Epub 2001/03/10.
180. Fedorov AV. [Regulation of mammalian LINE1 retrotransposones transcription]. *Tsitologiya*. 2008;50(12):1011-22. Epub 2009/02/10.
181. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992;69(6):915-26. Epub 1992/06/12.
182. Combes AN, Whitelaw E. Epigenetic reprogramming: enforcer or enabler of developmental fate? *Development, growth & differentiation*. 2010;52(6):483-91. Epub 2010/07/09.
183. Hale BJ, Yang CX, Ross JW. Small RNA regulation of reproductive function. *Molecular reproduction and development*. 2014;81(2):148-59. Epub 2013/10/30.

184. McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. *Developmental biology*. 2003;262(1):1-15. Epub 2003/09/27.
185. Yoshida S. Stem cells in mammalian spermatogenesis. *Development, growth & differentiation*. 2010;52(3):311-7. Epub 2010/04/15.
186. Mochizuki K, Matsui Y. Epigenetic profiles in primordial germ cells: global modulation and fine tuning of the epigenome for acquisition of totipotency. *Development, growth & differentiation*. 2010;52(6):517-25. Epub 2010/07/22.
187. Saitou M, Kagiwada S, Kurimoto K. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development*. 2012;139(1):15-31. Epub 2011/12/08.
188. Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Yomogida K, Kuroiwa A, Tadokoro Y, Fujita Y, et al. Two mouse piwi-related genes: miwi and mili. *Mechanisms of development*. 2001;108(1-2):121-33. Epub 2001/10/02.
189. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(10):6507-19. Epub 2008/12/31.
190. 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. *Developmental cell*. 2007;12(1):45-55. Epub 2007/01/03.
191. Friedlander MR, Adamidi C, Han T, Lebedeva S, Isenbarger TA, Hirst M, et al. High-resolution profiling and discovery of planarian small RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(28):11546-51. Epub 2009/07/01.
192. Palakodeti D, Smielewska M, Lu YC, Yeo GW, Graveley BR. The PIWI proteins SMEDWI-2 and SMEDWI-3 are required for stem cell function and piRNA expression in planarians. *Rna*. 2008;14(6):1174-86. Epub 2008/05/06.
193. Reddien PW, Oviedo NJ, Jennings JR, Jenkin JC, Sanchez Alvarado A. SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science*. 2005;310(5752):1327-30. Epub 2005/11/29.
194. Mochizuki K, Gorovsky MA. Small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*. *Curr Opin Genet Dev*. 2004;14(2):181-7. Epub 2004/06/16.

195. Liu X, Sun Y, Guo J, Ma H, Li J, Dong B, et al. Expression of hiwi gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006;118(8):1922-9. Epub 2005/11/16.
196. Qiao D, Zeeman AM, Deng W, Looijenga LH, Lin H. Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene*. 2002;21(25):3988-99. Epub 2002/05/31.
197. Siddiqi S, Terry M, Matushansky I. Hiwi mediated tumorigenesis is associated with DNA hypermethylation. *PloS one*. 2012;7(3):e33711. Epub 2012/03/23.