

文章编号: 1004-0374(2010)07-0623-05

piRNA 和 PIWI 蛋白的功能机制研究进展

赵爽, 刘默芳*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要: piRNA 是 2006 年 7 月在动物生殖细胞中发现的一类新小分子非编码 RNA。piRNA 特异地与 PIWI 家族蛋白相互作用, 因此, 被命名为 PIWI-interacting RNA, 简称 piRNA。这类长度在 26~32 核苷酸的小分子非编码 RNA 代表了一个生殖细胞转座子沉默的独特小 RNA 通路。它们可能通过与 PIWI 家族蛋白质相互作用, 在表观遗传学水平和转录后水平沉默转座子等基因组自私性遗传元件, 参与生殖干细胞自我维持和分化命运决定、减数分裂、精子形成等生殖相关事件。在 piRNA 发现后短短数年的时间, 对其生物发生、功能及作用机制的研究都取得了诸多重大突破。该文就 piRNA 研究的最新研究进展作一简述。

关键词: piRNA; PIWI; 生殖细胞; 表观遗传调控; 转录后水平调控

中图分类号: Q52 **文献标识码:** A

piRNA and PIWI in animal germ cells

ZHAO Shuang, LIU Mo-fang*

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: A novel class of small non-coding RNA termed as PIWI-interacting RNA (piRNA) was recently discovered in the mammalian and *Drosophila* germline. Through interacting with PIWI family of proteins, the 26-32 nt long piRNA may represent a distinct small RNA pathway that contributes to transposon silencing in germ cells via novel mechanisms of epigenetic and posttranscriptional regulation. piRNAs and PIWI proteins are predominantly present in the germ cells and crucial to germline stem cell (GSC) self-renewal and differentiation, meiosis, spermiogenesis, and other gametogenic events. Impressive progresses have been achieved in understanding the biogenesis, function and mechanism of piRNA in the past year. A few of the recent progresses were summarized here.

Key words piRNA; PIWI; germ cell; epigenetic regulation; posttranscriptional regulation

21 世纪以来, 科学家们在生物特别是高等生物中发现了多种内源的小分子非编码 RNA, 包括 miRNA、hsRNA、rasiRNA 和 piRNA 等。它们通过介导 mRNA 降解、翻译抑制、DNA 甲基化修饰和异染色质形成等在转录及转录后水平调节基因表达, 形成一个全新的遗传信息表达调控网络, 在细胞分裂和分化、个体生长发育和繁殖等生命活动过程中发挥重要作用。因此, 对小分子非编码 RNA 的发现、生物学功能及作用机制等的研究已经成为当前生命科学研究的重要热点和前沿。在 2006 年 7

月才在生殖细胞中发现的 piRNA, 已成为当前小分子非编码 RNA 研究领域的一个明星。

1 piRNA 的发现

2006 年 7 月, 四个独立的研究组几乎同时在果

收稿日期: 2010-04-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(30770474, 90919016, 30970621); 中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KSC2-YW-R-096, KSCX1-YW-R-64)

*通讯作者 E-mail: mfliu@sibs.ac.cn

蝇、小鼠、大鼠和人等物种的生殖系细胞中发现了一类新型小分子非编码RNA,因为它们特异性地与PIWI蛋白质相互作用,所以被命名为PIWI相互作用RNA(PIWI-interacting RNA),简称piRNA^[1-4]。PIWI是一类生殖系细胞专一性蛋白。

与之前发现的miRNA/siRNA相比,piRNA有以下不同之处:(1)与不同的Argonaut家族蛋白质相互作用。Argonauete家族蛋白质是小分子RNA介导基因沉默作用的核心组分,该家族成员都有PAZ和PIWI结构域^[5-7]。miRNA/siRNA主要与Ago亚家族的Ago1和Ago2相互作用,而piRNA则与PIWI亚家族的Aub、Piwi和Ago3相互作用。此外,Ago蛋白主要参与miRNA/siRNA的功能执行,而PIWI成员则伴随着piRNA的生物发生和生物学功能行使等一系列过程^[8]。(2)生物发生的途径不同。miRNA由含发夹结构的原始miRNA(Primary miRNA)分别经过RNase III家族酶Drosha和Dicer两步切割,生成长度为19~25 nt的成熟miRNA;piRNA长度为26~32 nt,有很强的正义链或反义链专一性,通常由20~90 kb的单链RNA前体切割产生^[2]。piRNA的生成依赖PIWI亚家族蛋白而不依赖Dicer^[9]。另外,不同于miRNA和siRNA,piRNA的3'末端被甲基化修饰,推测可能对piRNA的稳定性及功能至关重要^[10-11]。(3)基因组分布不同。大多数miRNA基因位于基因的内含子或基因间隔区,piRNA基因簇则主要分布在转座子、重复序列等区域,并在染色体上的位置具有物种间保守性^[8]。(4)作用机制不同。miRNA主要在转录后水平通过抑制翻译或促进靶mRNA降解调控基因表达;而piRNA可能通过表观遗传调控及转录后调控等方式发挥基因沉默作用^[12-14]。此外,小鼠的Mili/piRNA可增加靶mRNA的稳定性,可能对靶基因的表达有正调控作用^[15]。

2 piRNA的分类及结构特点

piRNA特异地与PIWI亚家族蛋白偶联。同一物种通常有多种PIWI成员,如果蝇PIWI包括Piwi、Aub和Ago3;小鼠PIWI则有Miwi、Mili和Mili2。与不同PIWI蛋白质偶联的piRNA,其表达谱和长度有明显差别。在果蝇的卵巢中,Piwi主要存在于滋养层细胞,而Aub则主要存在于生殖干细胞,与之对应的是,Piwi偶联piRNA和Aub偶联piRNA也特异地在相应的细胞中表达,并且Piwi偶联的piRNA

丸中时序性地表达,*mili*在精子形成的早期表达(精母细胞到减数分裂粗线期),*miwi*的表达则相对较晚,在减数分裂的粗线期到圆形精子阶段表达。在这两个时段中出现的piRNA长度也有差异,Mili偶联RNA长度为26~28 nt,Miwi偶联piRNA则相对较长,为29~32 nt^[1-4]。因此,可以根据偶联的蛋白质,将piRNA进行分类,如果蝇piRNA分为Piwi-piRNA、Aub-piRNA和Ago3-piRNA;小鼠piRNA分为Miwi-piRNA、Mili-piRNA和Mili2-piRNA。

piRNA的长度集中在26~32 nt,不同PIWI蛋白质偶联的piRNA,都有以下的特征:5'端第一个核苷酸偏爱U(>87%),而第二个核苷酸则有非U倾向性;与miRNA相同,piRNA的5'端携带磷酸基。此外,piRNA 3'末端被甲基化修饰^[8,10-12],目前已知其修饰是由RNA甲基转移酶Hen1执行^[16-18]。

3 piRNA的生物合成

不同于miRNA,piRNA不是由含茎环结构的前体剪切产生。piRNA序列的基因组分布表明,piRNA通常成簇出现,并且有很强的正义链或反义链专一性,因此,推测piRNA可能是由长的单链RNA剪切产生。对于piRNA产生的机制,目前还没有直接的生物化学证据,但一个基于生物信息学分析提出的“乒乓模型”(ping pang model)假说,得到了许多研究者的认同^[19,20]。

通过对果蝇的三类piRNA——Piwi-piRNA、Aub-piRNA和Ago3-piRNA的序列分析,发现了以下现象:(1)Piwi-piRNA和Aub-piRNA主要来自反义链,而Ago3-piRNA几乎都来自正义链;(2)Piwi-piRNA和Aub-piRNA 5'端具有明显的U偏爱性,而Ago3-piRNA 5'端第10个核苷酸大多为A;(3)许多Ago3-piRNA 5'端的10 nt序列与Piwi-piRNA和Aub-piRNA 5'端的10 nt序列刚好互补配对。推测Piwi、Aub和Ago3与piRNA结合形成的piRNA复合物(piRC)具有剪切活性,可以切割与piRNA序列互补的RNA底物。基于这些发现,Hannon实验室提出了piRNA生物发生的“乒乓模型”假说^[19]。

这个模型认为,反义链的piRNA前体经过未知核酸酶的加工,生成了5'端具有U偏爱性的初级piRNA,这些piRNA与Aub或Piwi结合形成假设具有核酸酶活性的piRC。piRC在piRNA的引导下,通过碱基配对方式识别并结合正义链的piRNA前体,然后发挥剪切活性切割正义链piRNA前体,产

• • • 长 子 A U B 偶 联 P I W I 蛋 白 的 p i R N A ^[14]。*miwi*与*mili*在小鼠辜

生次级 piRNA 的 5' 端, 之后, 具有成熟 5' 端的正义链 piRNA 前体被某种核酸酶切割形成 3' 端, 产生成熟的正义链 piRNA。正义链 piRNA 与 Ago3 结合形成 piRC, 通过同样的方式识别并切割反义链的 piRNA 前体。这样就形成了一个 piRNA 生物发生循环, 正义链的 piRNA 和反义链的 piRNA 相互识别, 又通过 PIWI 成员的剪切, 循环生成(图 1)。并且, 在 piRC 切割 piRNA 前体扩增 piRNA 的同时, 也直接降解了从转座子等自私性遗传元件转录的 RNA, 这样就达到了转座子的转录后水平抑制, 该模型将 piRNA 的生物合成途径与 piRNA 功能发挥偶联在了一起。

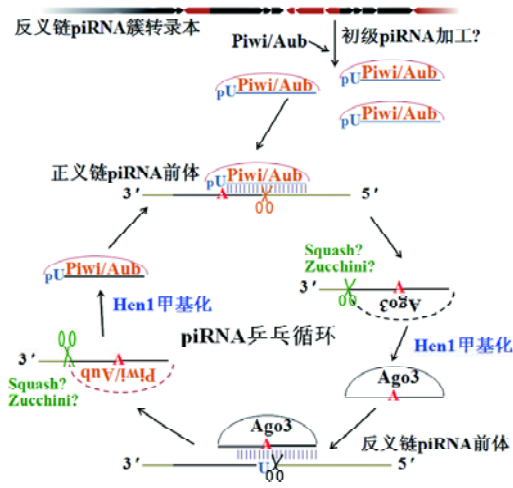


图1 乒乓模型^[19, 36]

注: 正义链的 piRNA 和反义链的 piRNA 分别偶连 Ago3 和 Piwi/Aub。通过 5' 端碱基互补配对相互识别, 又通过 PIWI 亚家族蛋白质的剪切, 循环生成。

虽然“乒乓模型”对 piRNA 的生成及其作用机制都进行了比较合理的解释, 但它还有不少漏洞需要完善。首先, 它不能解释“乒乓循环”的起始, 也不能说明 piRNA 的 3' 端是如何形成的; 如果成熟的 piRNA 仅通过 10 nt 配对识别前体链, 在拥有庞大基因组的高等生物中, 这不足以保证其作用的特异性; 最重要的是, 这个模型目前还没有生物化学的实验证据支持。

目前, 研究者们正在不断地完善和修正这个假说。Aravin 等^[13]发现这个模型可能同样适合小鼠的 piRNA 生物生成。Hartig 等^[21]提出了“PIWI 决定”假说来解释 piRNA 3' 端的形成。Argonaute 家族蛋白质都含有一个 PIWI 结构域和一个 PAZ 结构域, 分别与小 RNA 的 5' 磷酸和 3' 末端结合, 也就是 PIWI

和 PAZ 之间的距离决定了与之结合的小 RNA 长度。在 piRNA 生成过程中, 其前体的 5' 端可能与 PIWI 结合, 然后由某种内切酶或外切酶根据 PIWI 与 PAZ 之间的距离, 裁剪生成 3' 端, 得到长度适当的成熟 piRNA。“PIWI 决定”假说还提出了执行 3' 裁剪活性的两个候选者: 与 piRNA 有相互作用的核酸酶 Squash 和 Zucchini, 因为这两个基因的突变会破坏 piRNA 的产生并导致重复序列活性升高^[22]。此外, 最新的研究表明, 一些特定转座子的 piRNA 表达水平依赖于 Zucchini^[23]。

因为新生果蝇 piRNA 的表达谱与成年果蝇有较大的区别, 且更接近于母本, 因此推测果蝇 piRNA 可以通过母本细胞质传递到子代, 而这些由母系遗传的 piRNA 可在发育早期沉默转座子的表达, 很可能是“乒乓循环”的初级 piRNA^[24]。

4 piRNA 的功能机制

piRNA 的生物学功能主要是牵涉生殖相关事件, 这不仅因为 piRNA 特异性地在生殖世系细胞中表达, 还因为 piRNA 途径中的重要蛋白质与配子形成事件或胚胎发育直接相关。PIWI 家族蛋白是 piRNA 途径的核心组份, 在生殖干细胞命运决定、减数分裂、精子发生等配子形成事件中具有重要作用。piwi 基因突变致使动物的生殖干细胞维持及分化异常, 导致雄性不育, 基因敲除小鼠 *Miwi*、*Miwi2* 和 *Mili* 都使精子形成受阻, 诱导精子凋亡和雄性不育^[25-29]。一些其他 piRNA 相关基因的突变也导致减数分裂和生殖细胞发育受阻, 进而发生个体不育或胚胎发育异常, 如小鼠的 *tdrd* 家族基因^[30-32], 果蝇的 *spindle E*、*rmitage maelstrom*、*krimper*、*zucchini* 和 *squash* 等的突变^[22, 23]。而斑马鱼 *ziwi* 的表达与性别决定有关, 成活的 *ziwi* 突变体均为雌性^[9]。推测这些 piRNA 相关基因的功能可能都牵涉到 piRNA。

生殖世系细胞担负着遗传信息的世代传递, 生殖细胞的发育分化过程包括表观遗传信息重建、个体发育的全能性信息保留及减数分裂重组产生遗传多样性。生殖世系细胞基因组的完整性对个体和物种维持至关重要, 而转座元件是引发基因组突变的主要因素。在人和小鼠的基因组中, 转座元件和它们的化石序列 (fossil sequences) 分别占了基因组的 46% 和 39%^[33, 34]。为控制这些诱发突变的移动元件, 宿主基因组进化了一些分子防御系统, 如哺乳动物的 DNA 甲基化修饰, 使这些自私性元件被表观

遗传沉默, 而通过小分子非编码 RNA 降解或抑制靶 RNA 的 RNAi 和相关系统则是宿主进化获得的另外一个重要机制。

动物的生殖细胞配备了一个独特的 piRNA 途径, 用于控制转座子和重复序列等基因组自私性遗传元件 (selfish genetic elements) 的活性, 以确保生殖系细胞基因组的稳定性和完整性。基因敲除 MILI、MIW2 等都会导致 DNA 甲基化水平的降低和 IAP 和 LINE1 等转座子的去抑制^[13, 30, 35-37]。如果蝇的 Flamenco 基因座 (locus) 控制三个转座子 (gypsy、Idefix 和 ZAM) 的活性, 是一个 piRNA 基因簇。与野生型相比, *flamenco* 突变体果蝇的 gypsy 的转录活性升高, Flamenco piRNA 的水平却明显下降; 此外, *piwi* 突变体果蝇的 gypsy 转录活性也升高。这些证据表明, PIWI-piRNA 可能负调控转座子的活性^[19]。另外, 破坏 piRNA 基因簇 *Nct1/2* 使其不能再产生 piRNA, 则导致 LINE-1 转座子的活性增加, 这直接证明了 piRNA 特异性地沉默自私性遗传元件^[35]。

已有的证据表明, PIWI-piRNA 可能介导表观遗传调控。piRNA 途径可能调控异染色质形成。果蝇 Piwi 与异染色质蛋白 HP1a (heterochromatin protein 1a) 直接相互作用, Piwi 与染色质结合依赖于 RNA, 并且与 Piwi 结合的染色体和与 HP1a 结合的染色体有重叠^[8, 12]。Klattenhoff 等^[38]的工作也表明, 果蝇 HP1 同源蛋白 Rhino 对双链 piRNA (dual strand piRNAs) 的生成, 及其沉默转座子功能的发挥是必需的。此外, 有证据表明, piRNA 途径介导了基因组 DNA 甲基化修饰。piRNA 途径参与了小鼠生殖细胞的转座子等 DNA 甲基化^[36, 37]。Aravin 等^[36]进而提出了 piRNA 途径与原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 的 DNA 去甲基化和生殖细胞的 DNA 从头甲基化偶联的模型, 认为 piRNA 指导 DNA 甲基化酶 Dnmt3A 和 Dnmt3L 的作用, 进而调控了对遗传发育的控制。

此外, 转录后水平调控可能也是 piRNA 途径的沉默作用机制之一。PIWI-piRNA 可直接切割 RNA 调节基因表达^[14, 39]。*aub* 突变体果蝇的睾丸中星蛋白 (Stellate protein) 大量积累, 而果蝇睾丸中与 Aub 结合的 piRNA 大多为 *Su(Ste)* 的反义链, *Su(Ste)* 是星蛋白的抑制基因 (suppressor of Stellate), 两者的序列有很高的同源性, 同时 *Su(Ste)* 也是一个 piRNA 基因座。此外, 分离的 Aub-piRC 具有剪切与其序列

互补的靶 RNA 的活性。因此, 推测 Aub 与 *Su(Ste)* 来源的 piRNA 结合形成 Aub-piRC, 经碱基互补配对识别并剪切星蛋白 mRNA, 在转录后水平负调控其表达^[39]。

5 结语与展望

尽管目前对 piRNA 的生物生成和功能已有一些假设和认识, 但尚处于一个初步阶段, 还有许多关键性问题需要回答。就目前的发展趋势来看在以下几个方面势必将取得突破: (1) piRNA 生物生成: PIWI 家族蛋白在 piRNA 生物生成中究竟起了什么作用; piRNA 加工成熟过程中的其他必需蛋白因子, 如参与 piRNA 3' 端形成的核酸内切酶等; (2) piRNA/PIWI 生物学功能及机制: piRNA/PIWI 功能复合物的蛋白质组成及作用模式; piRNA/PIWI 执行表观遗传调控和转录后水平调控的分子机制; piRNA/PIWI 介导的表观遗传调控和转录后水平调控如何与其生物学功能相联系, 如转座子沉默、生殖系细胞发育命运决定、生殖干细胞维持、减数分裂及其他配子形成事件; (3) 其他: piRNA 如何参与或调控 PIWI 蛋白的功能; piRNA 是否有独立于 PIWI 外的其他功能。这些问题的回答将解析由 piRNA 介导的新层面的基因表达调控网络, 同时也将有助于我们解答一些生殖细胞发生过程中的重要生物学问题, 如哺乳动物原始生殖细胞的全基因组 DNA 去甲基化问题、生殖细胞的基因组 DNA 从头甲基化和出生前细胞周期阻滞 (cell cycle arrest) 问题等, 同时可能为研究人类疾病 (如男性不育), 发展新型 RNA 治疗等提供新的理论基础和技术思路。

[参 考 文 献]

- [1] Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, et al. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 2006, 442(7099): 199-202
- [2] Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testis. *Nature*, 2006, 442(7099): 203-7
- [3] Grivna ST, Beyret E, Wang Z, et al. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev*, 2006, 20(13): 1709-14
- [4] Lau NC, Seto AG, Kim J, et al. Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science*, 2006, 313(5785): 363-7
- [5] Tolia NH, Joshua-Tor L. Slicer and the Argonautes. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(1): 36-43
- [6] Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell*, 2007, 26(5): 611-23

- [7] 刘默芳, 蒋帅, 王恩多. RNAi 机器. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(10): 1012-7
- [8] Yin H, Lin H. An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster*. Nature, 2007, 10(1038): 1-5
- [9] Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish. Cell, 2007, 129(1): 69-82
- [10] Kirino Y, Mourelatos Z. Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14(4): 347-8
- [11] Ohara T, Sakaguchi Y, Suzuki T, et al. The 3' termini of mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14(4): 349-50
- [12] Brower-Toland B, Findley SD, Jiang L, et al. *Drosophila* PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. Genes Dev, 2007, 21(18): 2300-11
- [13] Aravin AA, Sachidanandam R, Girard A, et al. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. Science, 2007, 316(5825): 744-7
- [14] Nishida KM, Saito K, Mori T, et al. Gene silencing mechanisms mediated by Aubergine-piRNA complexes in *Drosophila* male gonad. RNA, 2007, 13(11): 1911-22
- [15] Unhavaithaya Y, Hao Y, Beyret E, et al. MILI, a PIWI-interacting RNA-binding protein, is required for germline stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation. J Biol Chem, 2009, 284(10): 6507-19
- [16] Kirino Y, Mourelatos Z. The mouse homolog of HEN1 is a potential methylase for Piwi-interacting RNAs. RNA, 2007, 13(9): 1397-401
- [17] Horwich MD, Li C, Matranga C, et al. The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. Curr Biol, 2007, 17(14): 1265-72
- [18] Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, et al. 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
- [19] Brennecke J, Aravin AA, Stark A, et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. Cell, 2007, 128(6): 1089-103
- [20] Thomson T, Lin H. The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009, 25: 355-76
- [21] Hartig JV, Tomari Y, Förstemann K. piRNAs - the ancient hunters of genome invaders. Genes Dev, 2007, 21(14): 1707-13
- [22] Pane A, Wehr K, Schüpbach T. Zucchini and squash encode two putative nucleases required for rasiRNA production in the *Drosophila* germline. Dev Cell, 2007, 12(6): 851-62
- [23] Saito K, Inagaki S, Mi tuyaama T, et al. A regulatory circuit for *piwi* by the large Maf gene *traffic jam* in *Drosophila*. Nature, 2009, 461(7268): 1296-9
- [24] Brennecke J, Malone CD, Aravin AA, et al. An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. Science, 2008, 322(5906): 1387-92
- [25] Cox DN, Chao A, Baker J, et al. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by *piwi* is essential for stem cell self-renewal. Genes Dev, 1998, 12(23): 3715-27
- [26] Houwing S, Berezikov E, Ketting RF. Zili is required for gene cell differentiation and meiosis in zebrafish. EMBO J, 2008, 27(20): 2702-11
- [27] Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, et al. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. Dev Cell, 2007, 12(4): 503-14
- [28] Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, et al. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. Development, 2004, 131(4): 839-49
- [29] Deng W, Lin H. miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. Dev Cell, 2002, 2(6): 819-30
- [30] Reuter M, Chuma S, Tanaka T, et al. Loss of the Mili-interacting tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile. Nat Struct Mol Biol, 2009, 16(6): 639-46
- [31] Wang J, Saxe JP, Tanaka T, et al. Mili interacts with tudor domain-containing protein 1 in regulating spermatogenesis. Curr Biol, 2009, 19(8): 640-4
- [32] Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, et al. The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. Dev Cell, 2009, 17(6): 775-87
- [33] Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 2001, 409(6822): 860-921
- [34] Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature, 2002, 420(6915): 520-62
- [35] Xu M, You Y, Hunsicker P, et al. Mice deficient for a small cluster of Piwi-interacting RNAs implicate Piwi-interacting RNAs in transposon control. Biol Reprod, 2008, 79(1): 51-7
- [36] Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to *de novo* DNA methylation in mice. Mol Cell, 2008, 31(6): 785-99
- [37] Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, et al. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. Genes Dev, 2008, 22(8): 970-5
- [38] Klattenhoff C, Xi H, Li C, et al. The *Drosophila* HP1 homolog Rhino is required for transposon silencing and piRNA production by dual-strand clusters. Cell, 2009, 138(6): 1137-49
- [39] Gunawardane LS, Saito K, Nishida KM, et al. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. Science, 2007, 315(5818): 1587-90