

DOI: 10.13376/j.cblls/2016091

文章编号: 1004-0374(2016)06-0712-06

· 评述与综述 ·

## piRNA通路中调控蛋白质研究进展

彭玲, 黄昊\*

(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, 国家蛋白质科学中心, 上海大科学中心, 上海 200031)

**摘要:** piRNA 是一类与 Argonaute 蛋白家族的 PIWI 亚家族蛋白结合的非编码小 RNA, 其在沉默转座子、维持基因组的稳定性和保证生物体生殖细胞的正常发育中起着重要作用。piRNA 通路包括 piRNA 的生成、piRISC 的形成, 以及由 piRISC 介导的转座子沉默。现总结了目前发现的参与调控果蝇和小鼠中 piRNA 通路的蛋白质因子。

**关键词:** piRNA; PIWI; 转座子沉默; piRNA 通路调控蛋白质

**中图分类号:** Q52; Q591.2 **文献标志码:** A

### Proteins involved in piRNA pathway

PENG Ling, HUANG Ying\*

(Shanghai Science Research Center, National Center for Protein Science Shanghai, 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:** piRNAs are a germline specific class of small non-coding RNAs. They associate with PIWI proteins which belong to a family of Argonaute proteins. piRNA and PIWI proteins form piRNA-induced silencing complexes (piRISC), and function in defending genome integrity by TE silencing. Recent studies have revealed a large number of factors that are essential for piRNA biogenesis, piRISC formation and piRNA-mediated transcriptional silencing. This review summarizes these key factors involved in piRNA pathways of *Drosophila melanogaster* and mouse.

**Key words:** piRNA; PIWI proteins; TE silencing; factors in piRNA pathway

piRNA 是一类存在于动物生殖细胞中, 长 25~32 nt 的非编码小 RNA, 能与 PIWI 家族蛋白结合形成 piRNA 沉默复合物 (piRNA-induced silencing complex, piRISC) 来调控转座子和重复序列等基因组自私性遗传元件的活性, 保证生殖系细胞基因组的稳定性和完整性<sup>[1]</sup>。转座子是一类由基因组自身编码的可移动遗传因子, 分为 DNA 转座子和 RNA 介导的反转录转座子, 可以通过移动或复制到新的位置影响基因组的信息和组织, 导致基因组完整性的缺失<sup>[2]</sup>, 而 piRNA 通路则是控制转座子移动的主要途径之一。

piRNA 前体由基因组上的 piRNA 簇或转座子转录而成, 之后被运输出核并在细胞质加工形成成

熟的 piRNA, 随后被加载到 PIWI 蛋白上形成 piRISC, 最终在转录或转录后水平上沉默转座子。piRNA 前体的加工以及 RISC 的形成主要位于胞质中的 nuage 上 (nuage 因为物种和细胞类型又被称为 Yb bodies、chromatoid bodies、pi-bodies 和 piP-bodies)。随着对 piRNA 通路的研究, 越来越多的蛋白质因子被发现参与 piRNA 通路的调控, 如图 1 所示。本文旨在对目前所发现的参与 piRNA 通路的主要蛋白因子作一简要的综述。

收稿日期: 2016-03-01; 修回日期: 2016-03-18

基金项目: 科技部蛋白质重大科学研究计划(2012CB-910502); 国家自然科学基金面上项目(31270774)

\*通信作者: E-mail: huangy@sibcb.ac.cn

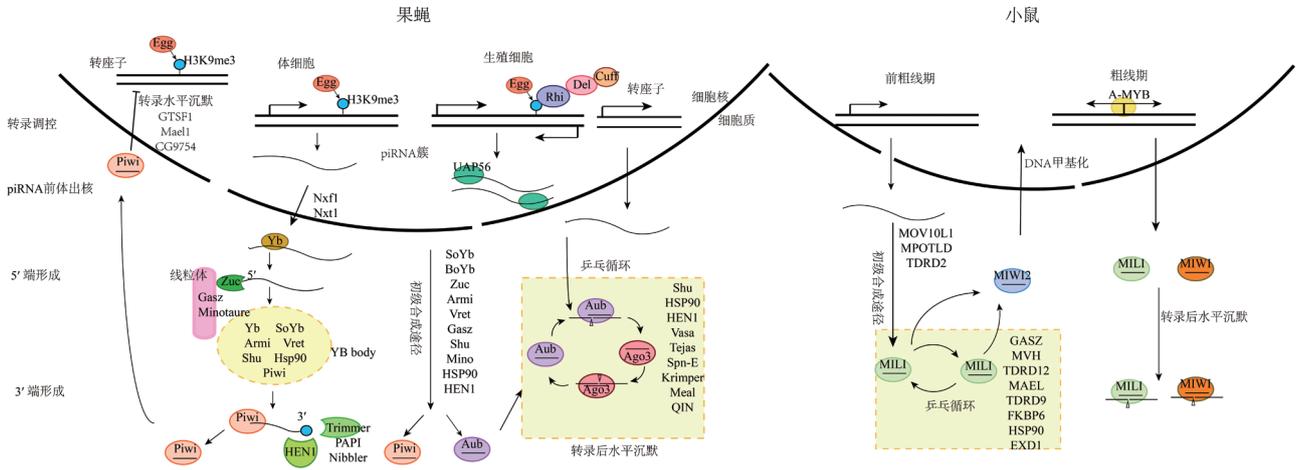


图1 果蝇和小鼠中piRNA通路模型

### 1 PIWI亚家族蛋白

PIWI (P-element induced wimpy testis) 蛋白最先发现于果蝇中, 与生殖干细胞的不对称分裂有关<sup>[3]</sup>。进一步的研究发现, PIWI 蛋白同样广泛存在于其他物种, 包括昆虫和哺乳动物。在果蝇中, PIWI 亚家族蛋白有 Piwi、Aubergin (Aub) 和 Ago3 三种, Piwi 和 Aub 与果蝇雌性和雄性生殖相关, 而 Ago3 则只在雌性生殖细胞中表达。小鼠中的 PIWI 包括 MIWI (PIWIL1)、MIWI2 (PIWIL4) 和 MILI (PIWI2)<sup>[4]</sup>, 且在精子发育过程中时序性表达: MILI 在出生前和成体睾丸中均有表达 (在雌性生殖细胞中有少量表达); MIWI2 只检测于小鼠出生前, 而 MIWI 则特异性表达在成体睾丸中<sup>[5]</sup>。

在结构上, PIWI 由 N 端结构域、PAZ 结构域、MID 结构域和 PIWI 结构域组成。其中, PAZ 结构域能与 piRNA 的 3' 端结合, MID 结构域则为 piRNA 的 5' 磷酸端提供结合位点, PIWI 结构域在三级结构上具有 RNaseH 样的折叠, 也同样具有剪切的功能, 能剪切与 piRISC 中 piRNA 碱基互补配对的底物 RNA。PIWI 蛋白 N 端并没有明确的结构域, 但存在可以被精氨酸甲基化酶 PRMT5 催化的对称双甲基精氨酸位点 (sDMA), 这些甲基化的位点为含有甲基化 reader 结构域蛋白质提供了结合的可能性, 某些含 TUDOR 结构域 (TDRD) 蛋白能通过识别 sDMA 与 PIWI 蛋白相互作用, 从而参与调控 piRNA 通路<sup>[6]</sup>。

### 2 piRNA生物合成

piRNA 生物合成主要有两种途径: 初级合成途

径和次级合成途径 (又被成为乒乓循环)。果蝇卵巢体细胞中 piRNA 主要通过初级合成途径生成, 产生的 piRNA 被加载到 Piwi 上形成 piRISC; 生殖细胞中由初级合成途径产生的 piRNA 分别被 Piwi 和 Aub 结合, 后通过乒乓循环产生次级 piRNA 与 Ago3 结合。在小鼠中胚胎雄性生殖细胞中, 初级合成途径产生的前粗线期 piRNA 被 MILI 结合, 然后通过乒乓循环产生次级 piRNA 与 MIWI2 结合; 而出生的小鼠体内, 由初级合成途径产生的粗线期 piRNA 则与 MILI 和 MIWI 分别结合形成 piRISC。

#### 2.1 piRNA簇转录过程中的调控因子

piRNA 簇通过 Pol II 转录形成单链 piRNA 前体, piRNA 簇大部分位于中心粒附近的异染色质上<sup>[7]</sup>, 也有一部分来源于蛋白质编码基因的 3'UTR 区域和 TEs 的复制片段<sup>[8]</sup>。

果蝇中 piRNA 簇可以分为双向转录 (生殖细胞) 和单向转录 (生殖细胞和体细胞) piRNA 簇<sup>[9]</sup>。piRNA 簇的转录需要组蛋白甲基化酶 Egg (dSETDB1) 催化 piRNA 簇上的组蛋白 H3K9 的甲基化, 导致异源染色质的形成并激活 piRNA 通路<sup>[10]</sup>。果蝇生殖细胞双向 piRNA 簇的转录需要 Rhino (Rhi)、Cutoff (Cuff)、Deadlock (Del) 三个蛋白质结合形成的复合物的调控<sup>[11-12]</sup>。HP1 家族蛋白 Rhino 特异性地表达在生殖细胞中, 包含 Chromo 和 Chromo-shadow 结构域, 能结合 piRNA 簇上的 H3K9me3 并与 Del 相互作用; Cuff 是 5'-3' 核酸酶 Rail/DXO 的同源蛋白, 且并不含有核酸酶活性的关键氨基酸位点<sup>[13]</sup>; Del 与 Cuff 相互作用, 但其并没有明确的结构域。在这一过程中, Rhino 结合到某些 piRNA

簇上可能还需要 Piwi 蛋白以及 Egg 蛋白的参与<sup>[14]</sup>。UAP56 是一种含 DEAD-box 的 RNA 解旋酶, 其与 Rhino、Cuff 共定位于细胞核内, 可能起到帮助抑制双向 piRNA 簇转录产物剪切的作用<sup>[12]</sup>。而体细胞中单向 piRNA 簇的转录调控机制目前并不清楚, 转录因子 Ci 参与了果蝇体细胞单向 piRNA 簇 *flam* 的转录调控<sup>[15]</sup>。

小鼠精子中 piRNA 簇分为前粗线期和粗线期 piRNA 簇, 为单向转录 piRNA 簇和反向转录 piRNA 簇。大多数粗线期 piRNA 簇的转录需要 A-MYB 转录因子的调控, 同时 A-MYB 也能结合在 MIWI 以及其他 piRNA 通路因子的启动区, 如 TDRD1、TDRD3, 调控 piRNA 簇转录和其他因子的表达<sup>[16]</sup>。除 Del 外, Rhino 和 Cuff 在小鼠中均有同源蛋白 Cbx5 和 Dom3z, 但并没有明确证据显示小鼠中 piRNA 簇的转录调控。

## 2.2 piRNA前体出核的调控因子

piRNA 前体从细胞核运输到细胞质中进行加工成熟。研究发现, mRNA 出核调控因子 Nxf1 和 Nxt1 以及一些其他核孔复合物因子同样可以调控果蝇卵巢体细胞 piRNA 前体的出核<sup>[17-18]</sup>。而参与 piRNA 簇转录过程的 UAP56 也同样具有调控 piRNA 前体出核的功能, 果蝇生殖细胞中, UAP56 可以结合双向转录 piRNA 簇的转录产物, 推测其可以运输 piRNA 前体至核孔并传递给定位于细胞质的 DEAD-box 蛋白 VASA<sup>[19]</sup>。

而对小鼠中 Maelstrom (Mael) 结合的蛋白质复合物进行分析发现, Mael 能结合 MIWI 和其他一些含 Tudor 结构域蛋白, 如 TDRD6、TDRD1、TDRD4/RNF17; 另外, 通过对复合物中结合的 RNA 进行分析发现, Mael 结合粗线期 piRNA 前体而不是成熟 piRNA, Mael 蛋白 HMG 结构域能结合有结构的 RNA, 而且细胞定位显示其可同时定位于核内和胞质中, 故被推测能通过 HMG 结构域结合 piRNA 前体并运输出核<sup>[20-21]</sup>。

## 2.3 piRNA初级生成途径中的调控因子

果蝇体细胞中 piRNA 前体经初级生成途径加工, 这一过程主要发生于细胞质中的 Yb body, Yb body 包含一系列的蛋白质, 包括 Yb、SoYb、Vreteno 以及 Armitage (Armi)。其中, Yb 蛋白包含 DEAD-box 和一个 Tudor 结构域, 能结合体细胞中 *flam* piRNA 簇的转录中间产物, 定位于核周的 *flam* body 上, 进一步被运输到 YB body 上形成成熟的 piRNA, 因此被推测为体细胞胞质中 piRNA 通路的上游调控

因子。Armi 蛋白可以结合 Piwi 蛋白, 与 Yb 蛋白一样, 对 Piwi 蛋白定位于 Yb body 极其重要<sup>[22]</sup>。Vreteno 也包含 Tudor 结构域, 能与 Piwi 以及 Aub、Armi、Yb 蛋白相互作用, 在生成途径初期起作用<sup>[23]</sup>。piRNA 的成熟需要众多蛋白质因子的参与, 其中, 定位于线粒体外膜的 Zuc 蛋白作为一种潜在的 piRNA 5' 端的 RNA 酶, 可能在 piRNA 初级生成途径中剪切未成熟 piRNA 的 5' 末端<sup>[24-26]</sup>。线粒体蛋白 Gasz 和 Minotaure (CG5508) 也参与了体细胞初级 piRNA 合成途径<sup>[27]</sup>。被 Zuc 剪切后的 piRNA 产物随后加载到 Piwi 蛋白形成 piRISC。这一过程还需要 Shutdown 和 HSP90 的帮助。Shutdown 蛋白, 包括一个无活性的 PPIASE 结构域和一个 TPR 结构, 可以通过其 TPR 结构域结合 HSP90 帮助 Piwi 蛋白结合 piRNA<sup>[28]</sup>。

关于成熟 piRNA 3' 端的形成目前还没有发现明确的剪切因子, 但有实验证据发现, 昆虫细胞裂解液中存在依赖  $Mg^{2+}$ , 可以剪切 piRNA 前体至最终长度的剪切酶 (Trimmer)<sup>[29]</sup>。miRNA 3'-5' 核酸外切酶 Nibbler 能与 Piwi 相互作用, 可能也参与到 piRNA 3' 端的剪切过程中<sup>[30]</sup>。PAPI 蛋白含 Tudor 结构域, 家蚕中 PAPI 蛋白突变会导致成熟 piRNA 3' 的延长, 故可能也参与 piRNA 3' 端的剪切过程, 虽然其并没有明确的具有剪切功能的结构域<sup>[31]</sup>。piRNA 的 3' 端产生后随即被甲基化酶 HEN1 甲基化, 起到稳定 piRNA 的作用<sup>[32]</sup>。

在果蝇生殖细胞中, piRNA 初级生成过程同样需要 SoYb、BoYb (可能代替体细胞中 Yb 的作用)、Zuc、Armi、Vret、Gasz、Shu、Mino、HSP90 和 HEN1, 产生的 piRNA 可以被 Piwi 和 Aub 结合。

参与果蝇的初级合成途径的调控因子在小鼠中均有同源蛋白, 所以, 推测小鼠中的 piRNA 初级合成可能拥有同样的调控方式, 其中 Zuc 的同源蛋白 MitoPLD 同样定位于线粒体, 并作用于 piRNA 的生成<sup>[24]</sup>。而 Armi 的同源蛋白 MOV10L1 是一种 RNA 解旋酶, 与 PIWI 蛋白相互作用, 对 MILI 和 MIWI2 结合的 piRNA 的生成很重要<sup>[33]</sup>。Fkbp6 是 Shutdown 蛋白在小鼠体内的同源蛋白, 也同样被发现参与 MIWI2 结合 piRNA 过程<sup>[34]</sup>。

## 2.4 piRNA次级生成途径中的调控因子

果蝇生殖细胞中, 由初级生成途径产生的 piRNA 被运输至核周的 nuage 中, 分别与 Aub 及 Piwi 蛋白结合形成 piRISC。其中, Aub-piRISC 通过碱基互补配对识别底物 RNA, 并利用 Aub 的剪

切活性剪切底物 RNA 形成次级 piRNA, 并被 Ago3 识别结合; 反之, Ago3 形成的 piRISC 则切割含转座子序列的底物 RNA, 形成新的反义链的 piRNA 与 Aub 结合, 如此反复则形成一个正向扩增放大循环, 因此, 也被称为乒乓扩增循环。而小鼠中的乒乓扩增循环发生在精子前粗线期, 与果蝇类似, 由 MILI 和 MIWI2 蛋白介导, 其中 MILI-piRISC 剪切底物 RNA 产生反义链的 piRNA 被 MIWI2 识别结合, 并被运输至核内通过 DNA 甲基化开启转座子的转录沉默。

除 PIWI 外, 目前发现一系列蛋白质因子参与了乒乓循环的调控, 在果蝇中这些蛋白包括 Vasa、Tejas、Spn-E、Krimper 和 QIN/KUMO。Vasa 蛋白是一类在生殖细胞特异性表达的 DEAD-box RNA 解旋酶, 同 PIWI 蛋白一样, 其 N 端同样存在 sDMA, 能和 QIN、反义链 piRNA 形成扩增体, 通过其 ATP 水解功能形成两种状态, 在果蝇乒乓扩增循环中起作用<sup>[35]</sup>。Vasa 在小鼠中的同源蛋白 MVH 同样作用于乒乓循环, 其缺失则导致不能生成前粗线期 MIWI2 结合的次级 piRNA<sup>[36]</sup>。果蝇的 QIN/KUMO 蛋白包含一个 E3 泛素连接酶结构域和 5 个 Tudor 结构域, 在 Aub 和 Ago3 形成的乒乓循环中起着正向调控的作用<sup>[37]</sup>; 与之不同的是, 其在小鼠中的同源蛋白 RNF17, 在小鼠精子发育粗线期精子细胞中通过抑制次级 piRNA 的产生来促进初级 piRNA 的生成<sup>[38]</sup>; 而家蚕中的 BmQIN 可与 BmSpn-E 及 PIWI 蛋白 Siwi 形成复合物, 作用于 piRNA 的初级生成途径, 说明 QIN 在不同物种有着不同的功能。

果蝇中 Spn-E, 包含 DexH/Tudor 结构域, 其 DexH box 结构域在 piRNA 初级生成途径和乒乓扩增循环中具有重要作用<sup>[39]</sup>。Tejas 蛋白包括 tejas 和 Tudor 结构域, 其 N 端的 tejas 结构域可与 nuage 中 Vasa 和 Spn-E 相互作用, 而其 C 端的 Tudor 结构域则可与 Aub 相互作用来参与 piRNA 的生成<sup>[40]</sup>。Krimper 也包含 Tudor 结构域, 能结合甲基化的 Aub 和未甲基化的 Ago3 蛋白, 它可以促进甲基化酶 PRDM3 对 Ago3 的精氨酸甲基化并结合正义链 piRNA<sup>[41-42]</sup>。

另外, 小鼠中同源二聚体 EXD1 蛋白, 一种含核酸外切酶结构域的蛋白, 可以结合 RNA 与 MIWI2 和 Tdrd12 形成复合物, 被推测其可能在 MILI 与 MIWI2 之间起到传递 RNA 的作用, 而它在果蝇中的同源蛋白则没有这种功能<sup>[43]</sup>。

### 3 piRNA介导的RNA沉默

piRISCs 能在转录水平或转录后水平上沉默转座子, 其中位于细胞质中的 PIWI 蛋白, 包括果蝇中的 Aub 和 Ago3 以及小鼠中的 MIWI 和 MILI 都具有剪切功能, 可以通过乒乓扩增循环来剪切 TE 转录产物<sup>[9,29]</sup>; 而 Piwi 蛋白和 MIWI2 蛋白则能通过诱导异源染色质的形成, 抑制转座子的转录<sup>[44-45]</sup>。Piwi-piRISC 介导的转座子沉默伴随着转座子位点上组蛋白 H3K9 的甲基化和异源染色质形成等一系列变化, 这一过程可能需要 H3K9 甲基化酶 Su(var)3-9 和 Eggless/SetDB1 的参与<sup>[46]</sup>。同时, Mael 蛋白也可能参与到了 Piwi 蛋白引起 H3K9me3 之后的转座子沉默过程中, 但其并不影响组蛋白 H3K9 的甲基化<sup>[47]</sup>。锌指蛋白 GTSF1 被证明参与到了 Piwi 蛋白介导的转座子沉默过程中, GTSF1 蛋白与一部分核内的 Piwi 蛋白有直接相互作用, 其突变会导致转座子位点 Pol II 聚合酶的增加以及 H3K9me3 标记的丢失<sup>[48]</sup>。CG9754 (Silencio/Panoramix) 作用在 GTSF1 和 Piwi 下游, 可以在果蝇生殖细胞中与 Piwi-piRNA 以及底物 RNA 形成的复合物作用, 参与 Piwi-piRNA 介导的转录沉默<sup>[49-50]</sup>。

### 4 小结与展望

生物体内 piRNA 通路拥有着复杂的调控网络, 通过各种生化和分子生物学的方式, 不断有更多参与 piRNA 通路的因子被发现<sup>[18,51-52]</sup>, 其中一些蛋白质参与调控 piRNA 通路的机制尚不明确。关于这些蛋白质的研究, 包括其在 piRNA 通路中的具体作用、细胞定位、蛋白质与蛋白质之间的相互作用等等, 使得我们对 piRNA 的生成以及参与基因表达调控的作用机制有了更深入的了解。同时, 也出现了更多的问题需要进一步探索, 如 piRNA 簇转录产物如何剪切加工形成 piRNA 前体; 如何区别 piRNA 前体和生物体内其他 RNA; 不同物种的 piRNA 前体的剪切酶, 特别是 piRNA 介导的基因转录调控, 是如何影响生殖细胞的发育等等, 目前均不明确。

#### [参 考 文 献]

- [1] Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 2006, 442: 203-7
- [2] Kazazian HH Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*, 2004, 303: 1626-32

- [3] Lin H, Spradling AC. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*, 1997, 124: 2463-76
- [4] Samji T. PIWI, piRNAs, and germline stem cells: what's the link? *Yale J Biol Med*, 2009, 82: 121-4
- [5] Luteijn MJ, Ketting RF. PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. *Nat Rev Genet*, 2013, 14: 523-34
- [6] Nishida KM, Okada TN, Kawamura T, et al. Functional involvement of Tudor and dPRMT5 in the piRNA processing pathway in *Drosophila* germlines. *EMBO J*, 2009, 28: 3820-31
- [7] Siomi MC, Sato K, Pezic D, et al. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12: 246-58
- [8] Robine N, Lau NC, Balla S, et al. A broadly conserved pathway generates 3'UTR-directed primary piRNAs. *Curr Biol*, 2009, 19: 2066-76
- [9] Brennecke J, Aravin AA, Stark A, et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 2007, 128: 1089-103
- [10] Rangan P, Malone CD, Navarro C, et al. piRNA production requires heterochromatin formation in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2011, 21: 1373-9
- [11] Mohn F, Sienski G, Handler D, et al. The rhino-deadlock-cutoff complex licenses noncanonical transcription of dual-strand piRNA clusters in *Drosophila*. *Cell*, 2014, 157: 1364-79
- [12] Zhang Z, Wang J, Schultz N, et al. The HP1 homolog phino anchors a nuclear complex that suppresses piRNA precursor splicing. *Cell*, 2014, 157: 1353-63
- [13] Pane A, Jiang P, Zhao DY, et al. The cutoff protein regulates piRNA cluster expression and piRNA production in the *Drosophila* germline. *EMBO J*, 2011, 30: 4601-15
- [14] Sapetschnig A, Miska EA. Getting a grip on piRNA cluster transcription. *Cell*, 2014, 157: 1253-4
- [15] Goriaux C, Desset S, Renaud Y, et al. Transcriptional properties and splicing of the flamenco piRNA cluster. *EMBO Rep*, 2014, 15: 411-8
- [16] Li XZ, Roy CK, Dong X, et al. An ancient transcription factor initiates the burst of piRNA production during early meiosis in mouse testes. *Mol Cell*, 2013, 50: 67-81
- [17] Muerdter F, Guzzardo Paloma M, Gillis J, et al. A genome-wide RNAi screen draws a genetic framework for transposon control and primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Mol Cell*, 2013, 50: 736-48
- [18] Handler D, Meixner K, Pizka M, et al. The genetic makeup of the *Drosophila* piRNA pathway. *Mol Cell*, 2013, 50: 762-77
- [19] Zhang F, Wang J, Xu J, et al. UAP56 couples piRNA clusters to the perinuclear transposon silencing machinery. *Cell*, 2012, 151: 871-84
- [20] Castaneda J, Genzor P, van der Heijden GW, et al. Reduced pachytene piRNAs and translation underlie spermiogenic arrest in Maelstrom mutant mice. *EMBO J*, 2014, 33: 1999-2019
- [21] Sato K, Siomi MC. Functional and structural insights into the piRNA factor Maelstrom. *FEBS Lett*, 2015, 589: 1688-93
- [22] Saito K, Ishizu H, Komai M, et al. Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev*, 2010, 24: 2493-8
- [23] Zamparini AL, Davis MY, Malone CD, et al. Vreteno, a gonad-specific protein, is essential for germline development and primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Development*, 2011, 138: 4039-50
- [24] Watanabe T, Chuma S, Yamamoto Y, et al. MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. *Dev Cell*, 2011, 20: 364-75
- [25] Voigt F, Reuter M, Kasaruho A, et al. Crystal structure of the primary piRNA biogenesis factor Zucchini reveals similarity to the bacterial PLD endonuclease. *Nuc. RNA*, 2012, 18: 2128-34
- [26] Huang H, Gao Q, Peng X, et al. piRNA-associated germline nuage formation and spermatogenesis require MitoPLD profusogenic mitochondrial-surface lipid signaling. *Dev Cell*, 2011, 20: 376-87
- [27] Vagin VV, Yu Y, Jankowska A, et al. Minotaur is critical for primary piRNA biogenesis. *RNA*, 2013, 19: 1064-77
- [28] Olivieri D, Senti KA, Subramanian S, et al. The cochaperone shutdown defines a group of biogenesis factors essential for all piRNA populations in *Drosophila*. *Mol Cell*, 2012, 47: 954-69
- [29] Gunawardane LS, Saito K, Nishida KM, et al. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science*, 2007, 315: 1587-90
- [30] Feltzin VL, Khaladkar M, Abe M, et al. The exonuclease Nibbler regulates age-associated traits and modulates piRNA length in *Drosophila*. *Aging Cell*, 2015, 14: 443-52
- [31] Honda S, Kirino Y, Maragkakis M, et al. Mitochondrial protein BmpPAPI modulates the length of mature piRNAs. *RNA*, 2013, 19: 1405-18
- [32] Yang Z, Ebright YW, Yu B, et al. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 667-75
- [33] Zheng K, Xiol J, Reuter M, et al. Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 11841-6
- [34] Xiol J, Cora E, Kogelgruber R, et al. A role for Fkbp6 and the chaperone machinery in piRNA amplification and transposon silencing. *Mol Cell*, 2012, 47: 970-9
- [35] Xiol J, Spinelli P, Laussmann MA, et al. RNA clamping by vasa assembles a piRNA amplifier complex on transposon transcripts. *Cell*, 2014, 157: 1698-711
- [36] Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, et al. MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes Dev*, 2010, 24: 887-92
- [37] Zhang Z, Koppetsch BS, Wang J, et al. Antisense piRNA amplification, but not piRNA production or nuage assembly, requires the Tudor-domain protein Qin. *EMBO*

- J, 2014, 33: 536-9
- [38] Wasik KA, Tam OH, Knott SR, et al. RNF17 blocks promiscuous activity of PIWI proteins in mouse testes. *Genes Dev*, 2015, 29: 1403-15
- [39] Ott KM, Nguyen T, Navarro C. The DExH box helicase domain of spindle-E is necessary for retrotransposon silencing and axial patterning during *Drosophila* oogenesis. *G3: Bethesda*, 2014, 4: 2247-57
- [40] Patil VS, Kai T. Repression of retroelements in *Drosophila* germline via piRNA pathway by the Tudor domain protein Tejas. *Curr Biol*, 2010, 20: 724-30
- [41] Webster A, Li S, Hur JK, et al. Aub and Ago3 are recruited to nuage through two mechanisms to form a ping-pong complex assembled by krimper. *Mol Cell*, 2015, 59: 564-75
- [42] Sato K, Iwasaki YW, Shibuya A, et al. Krimper enforces an antisense bias on piRNA pools by binding AGO3 in the *Drosophila* germline. *Mol Cell*, 2015, 59: 553-63
- [43] Yang Z, Chen KM, Pandey RR, et al. PIWI slicing and EXD1 drive biogenesis of nuclear piRNAs from cytosolic targets of the mouse piRNA pathway. *Mol Cell*, 2016, 61: 138-52
- [44] Saito K, Inagaki S, Mituyama T, et al. A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in *Drosophila*. *Nature*, 2009, 461: 1296-9
- [45] Klenov MS, Sokolova OA, Yakushev EY, et al. Separation of stem cell maintenance and transposon silencing functions of Piwi protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 18760-5
- [46] Shpiz S, Olovnikov I, Sergeeva A, et al. Mechanism of the piRNA-mediated silencing of *Drosophila* telomeric retrotransposons. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 8703-11
- [47] Sienski G, Donertas D, Brennecke J. Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell*, 2012, 151: 964-80
- [48] Donertas D, Sienski G, Brennecke J. *Drosophila* Gtsf1 is an essential component of the Piwi-mediated transcriptional silencing complex. *Genes Dev*, 2013, 27: 1693-705
- [49] Yu Y, Gu J, Jin Y, et al. Panoramix enforces piRNA-dependent cotranscriptional silencing. *Science*, 2015, 350: 4
- [50] Sienski G, Batki J, Senti KA, et al. Silencio/CG9754 connects the Piwi-piRNA complex to the cellular heterochromatin machinery. *Genes Dev*, 2015, 29: 2258-71
- [51] Muerdter F, Guzzardo PM, Gillis J, et al. A genome-wide RNAi screen draws a genetic framework for transposon control and primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Mol Cell*, 2013, 50: 736-48
- [52] Czech B, Preall JB, McGinn J, et al. A transcriptome-wide RNAi screen in the *Drosophila* ovary reveals factors of the germline piRNA pathway. *Mol Cell*, 2013, 50: 749-61