

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00009

小RNA分子与精子发生调控

孟雅楠^{1,3}, 孟丽军², 宋亚娟^{1,3}, 刘美玲³, 张秀军^{1,3}

1. 华北煤炭医学院生物科学系, 唐山 063000;
2. 唐山学院环境与化学工程系, 唐山 063000;
3. 国家人口计生委科学技术研究所生殖内分泌室, 北京 100081

摘要: 近来研究发现小 RNA(small RNAs)可作为转录后及翻译水平上基因表达调节的重要调节因子, 利用小 RNA 来阐明调节精子发生的分子机制取得了显著进展。这些小 RNA 主要分为 3 类, 即小干扰 RNA(siRNA)、微小 RNA(miRNA)以及与 piwi 蛋白相互作用的 RNA(piRNA)。在减数分裂和精子发生过程中, 小 RNA 具有多种生物学功能, 如利用 siRNA 体外转染或体内注射来敲低特定基因从而研究该基因在精子发生过程中的作用; miRNA 可能参与精子发生中有丝、减数及后减数分裂阶段的基因表达调节; piRNA 主要参与调节雄性生殖细胞减数及后减数分裂的过程, 在精子发生中起抑制反转录转座子(retrotransposons)的作用。文章对小 RNAs 合成、作用机制、功能及展望等最新进展进行了综述。

关键词: 精子发生; 小RNAs; 减数分裂; 基因表达调控

Small RNA molecules and regulation of spermatogenesis

MENG Ya-Nan^{1,3}, MENG Li-Jun², SONG Ya-Juan^{1,3}, LIU Mei-Ling³, ZHANG Xiu-Jun^{1,3}

1. Department of Biology, Northchina Coal Medical College, Tangshan 063000, China;
2. Department of Environment & Chemical Engineering, Tangshan College, Tangshan 063000, China;
3. Department of Reproductive Endocrinology, National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, China

Abstract: Small RNA molecules (small RNAs) have recently emerged as important regulators of gene expression at the post-transcriptional or translation level. Significant progress has recently been made in utilizing small RNAs to elucidate the molecular mechanisms regulating spermatogenesis. There are three major small RNAs: small interfering RNAs (siRNAs), microRNAs (miRNAs), and piwi-interacting RNAs (piRNAs). Small-RNAs have diverse biological functions in meiosis and spermatogenesis, *In vitro* or *in vivo*, use of siRNA to knockdown genes is a way to study the function of genes of interest in spermatogenesis. miRNA can be involved in the regulation of mitosis, meiosis, and postmeiosis in spermatogenesis. piRNAs are mainly involved in regulating the process of meiosis and postmeiosis, and repressing retrotransposon transposition in male germline cells. In this paper, we reviewed recent works on the synthesis, mechanism, function, and outlook of smallRNAs.

Keywords: spermatogenesis; small RNAs; meiosis; regulation of gene expression

精子发生过程始于精原干细胞(Spermatogonial stem cells, SSCs), SSCs一部分自我更新, 另一部分

首先分裂为 Apaired(Apr)型精原细胞, 进而形成 Aaligned(Aal)型精原细胞^[1]; Aal型精原细胞再发育

收稿日期: 2010-03-31; 修回日期: 2010-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30671092)和国家人口计生委科学技术研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(编号: 2009GJSSJKB03)资助。

作者简介: 孟雅楠(1986-), 女, 硕士研究生, 专业方向: 功能基因组学。E-mail: meng_ya_nan@yahoo.com.cn

通讯作者: 张秀军(1966-), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: zhangxiujun66@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2010-11-23 9:49:00

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.r.20101123.0949.000.html>

为A1-A4型精原细胞细胞、中间型以及B型精原细胞; B型精原细胞有丝分裂形成初级精母细胞, 经历前细线期、细线期、偶线期、粗线期, 再经过减数分裂形成次级精母细胞; 圆形精子细胞形成之后, 经细胞核浓缩等过程最终形成晚期的细长型成熟精子^[2]。

越来越多的研究表明, 小RNAs对于正常精子发生及雄性生育是必要的。如缺乏合成siRNA及miRNA所需的Dicer小鼠, 会产生异常伸长精子, 导致雄性不育^[3]; 果蝇Dicer1突变研究表明, 生殖干细胞的分裂及干细胞通过G₁/S关卡需要miRNAs的参与^[4]; 小RNAs异常表达会导致雄性不育及睾丸癌症。因此, 鉴定新的小RNAs、研究小RNA在精子发生中的作用及机制, 有助于深入理解雄性不育及睾丸癌等疾病的发生机制, 可成为雄性节育、雄性不育基因治疗新靶点, 并有望用于睾丸癌症的治疗, 也可能发现新的雄性避孕方法。

1 小RNAs的分类

根据小RNAs表达、发生、作用机制和功能等特点, 可将小RNAs分3类, 分别是: 小干扰RNA (Small interfering RNA, siRNA), 微小RNA (microRNA, miRNA) 以及与piwi蛋白相互作用RNA (piwi-interacting RNA, piRNA)^[5](表1)。

siRNA是小双链RNA, 长度~21nt, 含一段短发夹结构, 发夹序列可抑制基因表达, 可以用来敲低(knockdown)特定基因的表达并分析该基因对细胞功能的影响。siRNA已作为一种制作基因敲除(knockout)小鼠的替代方法, knockdown比knockout省财省力, 而且不像knockout会常导致胚胎或新生胎儿死亡。miRNAs是小RNAs(长度~22nt)的另一种类型, 在物种间是高度保守的。目前已发现上千种miRNAs, <http://www.mirbase.org>网站2010年9月第

16版(Release 16: Sept 2010)数据库共收集了人1 048种、小鼠672种、大鼠408种miRNA。

另一种小RNAs称为piRNAs, 因其与piwi家族蛋白相互作用而得名。Piwi家族蛋白包括PIWI、HIWI、MIWI、MIWI2、MILI、PRG-1及PRG-2蛋白, 有相同的氨基酸序列。与siRNAs或miRNAs不同, piRNAs长26~333nt, 在精子发生过程中粗线期精母细胞及精子细胞中出现, 并为雄性及雌性胚系发育所需。<http://pirnabank.ibab.ac.in>网站数据库经过去除冗余序列后, 收集人、小鼠、大鼠的piRNA数量分别是23 439、39 986、38 549, 数量巨大。

近来又发现一种新的小RNAs, 据其序列及基因组图数据显示, 只在小鼠雄性生殖细胞中表达, 这种新的RNAs被命名为生殖系小RNAs(Germline small RNAs, gsRNAs)^[6]。与其他小RNAs相比, gsRNAs有以下不同: (1)平均长度长于miRNAs和siRNAs; (2)有链的偏差而不与茎环状结构相连。gsRNAs在粗线期精母细胞至圆形精子细胞期间出现^[6], 这种特异表达方式可能说明gsRNAs在减数分裂和后减数分裂期有特定作用。然而gsRNAs发生、作用机制及功能尚不清楚。

在果蝇中还发现一种重复相关siRNAs (rasiRNAs)^[7,8]。因rasiRNAs也与Piwi亚家族蛋白结合, 其产物形成也不依赖Dicer^[8-10], 可将其归为piRNAs的一个亚群。

2 miRNAs和piRNAs的生物发生及小RNAs作用机制

siRNAs属于外源性小RNA, 在体外用RNase内切酶Dicer降解长dsRNAs或用细胞内载体表达shRNAs再经Dicer作用生成siRNAs。siRNA转染后, 能结合一种称为RNA诱导沉默复合体(RNA

表1 3种小RNAs的特征比较

特征	siRNA	miRNA	piRNA
长度	~21nt	~22nt	~26—33nt
链	双链RNA	单链RNA	单链RNA
数量	不适用	几百	~500 000
起源	外源RNA	内源性RNA	内源性RNA
表达	不在组织或细胞内表达	各种组织和细胞内均表达	精母细胞和精子中表达
是否依赖Dicer	Dicer依赖	Dicer依赖	Dicer非依赖
功能	降解mRNA或转录后沉默	使mRNA不稳定及抑制转录	抑制反转录转座子和转录后调控

induced silencing complex, RISC) 的多酶复合体, RISC 识别并附着于互补的靶 mRNA, 最后造成 mRNA 被降解, 从而抑制蛋白质合成^[11]。

与之不同, miRNA 的发生和作用是在细胞内(图 1)。较长的 RNA 分子在 RNA 酶 Drosha 作用下产生 ~70nt shRNAs(pre-miRNA), pre-miRNAs 经由输出蛋白 5 依赖机制(exportin-5-dependent)转运至细胞质^[12,13]。在胞质中 pre-miRNAs 经 RNase (Dicer, DCR) 催化形成成熟 miRNAs^[14~16]。成熟 miRNA 与 miRNA 诱导沉默复合体(miRISC)结合, 在 miRNA 与 miRISC 形成的复合物作用下, miRNA 通过碱基互补配对原则与靶 mRNA 结合。如果 miRNA 与 mRNA 的 3'-UTR 对应序列完全互补, 则靶 mRNA

被降解; 如果不完全互补, mRNA 则不能翻译, 导致翻译被抑制。miRNA 是后转录基因沉默的重要调节因子, 它与靶 mRNAs 的 3'-UTR 结合形成双链 RNA, 导致靶 mRNA 的降解^[17,18]。miRNAs 调节基因表达另一机制是: 一些 miRNAs 可直接抑制 mRNA 翻译^[19], 而其他一些 miRNAs 可通过对 m7G 帽子结构的识别来抑制翻译起始^[20]。

piRNA 的发生和作用机制更为复杂精细。piRNA 特异性表达于哺乳动物睾丸的粗线期精母细胞及圆形精子细胞^[22~25], 对 5' 尿嘧啶有强偏好性。piRNAs 可能来自于重复 DNA 序列或复杂 DNA 序列^[7,9,10]。Piwi 亚家族 Ago 蛋白 Argonaute3(Ago3) 与 piRNA 转录产物的正链结合, 形成 Ago3-piRNA 复合物, 引导沉默子介导的负链转录本在 A:U 处降解, 从而产生 5' 末端为 U 的长单链转录本—负链 piRNA 前体^[7,9,10], 即负链 piRNA 前体来自被降解的 DNA 负链。Aubergine、Piwi 与负链 piRNA 前体一起形成复合物, 在核酸酶 Squash 和 Zucchini 催化下, 产生成熟负链 piRNAs^[7,9,10]。相反, Aubergine(Aub) 与 piRNA 负链转录本结合形成 Aub-piRNA 复合物, 引导沉默子介导的靶标正链转录产本降解, 形成第 10 位核苷酸为腺嘌呤(A)的正链 piRNA 前体, 如图 2 所示。这种正链 piRNA 前体与 Argonaute3 作用形成成熟正链 piRNAs^[7,9,10]。哺乳动物中 piRNA 作用机制的一种假说: piRNAs 和 piwi 蛋白形成一种复合物,

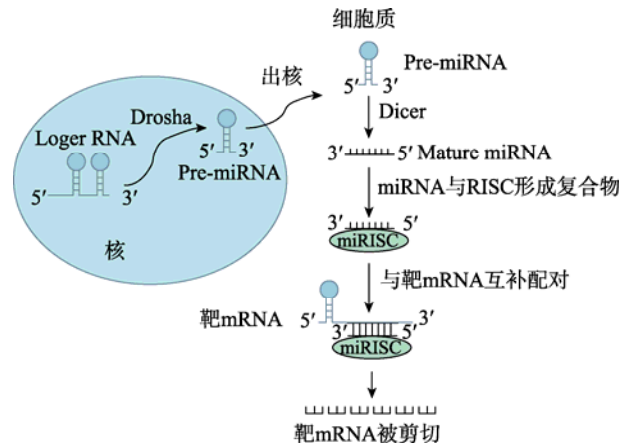


图 1 哺乳动物细胞中 miRNA 发生及作用机制^[21]

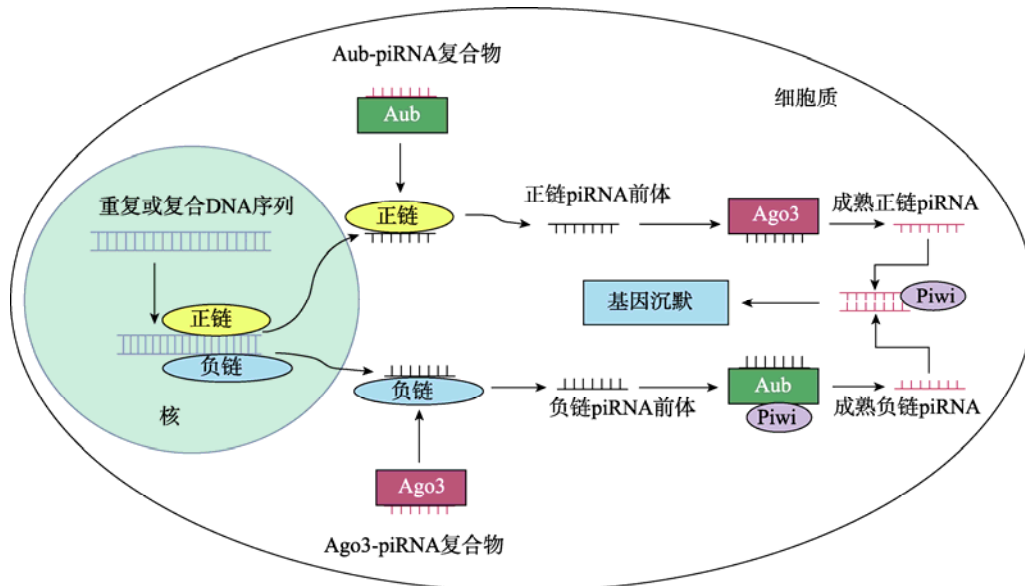


图 2 果蝇 piRNA 生物发生与作用机制^[21]

称为piwi相互作用RNA复合物(piRC), 激发基因沉默^[25]。piRNAs可能有多种功能, 包括抑制反转录转座子转位及后转录调节(正性/负性调节)^[6,26,27], 但miRNAs对抑制生殖细胞中反转录转座子没有作用^[28]。

3 小RNAs在精子发生过程中的功能

近来常用siRNA的RNAi技术能有效抑制精子发生相关基因的表达, 从而研究该基因相关功能。RNAi研究的关键在于siRNA的高效转染以及转染试剂。研究发现, Lipofectamine 2000 可以有效地转染siRNA^[29]。体外实验利用Gfra1 siRNAs引起GFRA1沉默导致小鼠SSCs从自我更新到分化为A1-A4 精原细胞的转变, 这是小鼠精子发生的第一步^[30], 说明Gfra1 抑制精子的发生。*Nodal*基因siRNAs导致细胞凋亡的显著增加以及小鼠SSCs分裂的减少, 说明*Nodal*基因抑制细胞凋亡, 增加SSCs的增殖。利用拮抗Src家族激酶的siRNAs证明了GDNF信号途径在小鼠SSCs增殖中的作用^[31]。另外, siRNA可抑制Bcl6b、Ets相关分子(Erm)及LIM同源框 1(Lhx1)的转录, 通过siRNA已经明确了这些转录因子都是体外实验中SSCs自我更新所需的关键调节因子^[32,33]。在支持细胞中, 利用Pard6a或Part3 各自的siRNAs敲低基因表达, 引起血睾屏障(BTB)相关蛋白表达的减少, 表明基于Part3/Pard6a极性复合物在精子发生中对BTB有重建的作用^[34]。RNAi对beta1 整合素的抑制导致封闭蛋白(occludin)在支持细胞间的重分布和BTB的不稳定^[35]。体内实验siRNA靶向阻断小鼠雄激素受体导致FGF2 的表达下降, 证明睾丸酮对FGF2 有调节作用^[36]。应用siRNA技术进行功能研究的过程中也会出现一些问题, 比如用哺乳动物中较长的dsRNA来实现RNAi的主要障碍是它们会引起非特异mRNA降解以及宿主细胞蛋白合成的停止, 一种解决办法是利用 < 23nt的siRNA激活特定基因沉默而不引起干扰素反应^[37,38]。另一问题是序列特异脱靶效应(Sequence specific off-target effects), 如果获得可信的RNAi数据可通过转染 2 个或更多靶向不同基因siRNAs且每个RNAi都需要有适当对照。

虽然miRNAs在雄性生殖细胞发育过程中的功能尚未阐明, 但表达谱研究证实哺乳动物睾丸中有

多种miRNAs^[35,39~41]。研究表明, miRNAs有可能参与精子发生中有丝、减数及后减数分裂阶段的基因表达调节。Yan等^[42]利用芯片研究比较未成熟与成熟小鼠睾丸中miRNA的表达, 发现 19 种miRNA在这两种睾丸中的表达有显著不同, 表明这些miRNA可能对睾丸的发育产生影响。已有研究表明, Mirn122a主要在雄性生殖细胞晚期阶段表达, 抑制圆形精子标志物的转换蛋白 2(Transition protein 2, TP2)转录^[39], 作为圆形精子细胞的标记物, 在生殖细胞后减数分裂阶段起作用。最近证明, 转换蛋白(亦称睾丸、脑RNA结合蛋白, testis-brain RNA-binding protein)与Mirn122a结合从而增加Mirn122a在体内的稳定性^[43]。与青春期前睾丸相比, Mirn34b在成年睾丸中的表达高很多^[44], 表明Mirn34b在雄性生殖细胞分化中起潜在作用。miRNA-17-92 群和Mirn290-295 群在培养 3 天后的新生小鼠精原细胞中表达最丰富, 说明在精子发生过程中这两种miRNA群在调节SSCs增殖和早期分化起重要作用^[28]。Novotny等^[45]的研究发现, miRNA-17-92 群激活c-Myc的表达导致E2F1转录抑制, 从而阻止减数分裂重组中的凋亡。Marcon 等^[46]研究表明, miRNAs定位于精母细胞染色体的中心、终端以及XY染色体上, 也存在于支持细胞核中。另一项研究显示: 约 86%的X染色体相关miRNA并不参与精子发生过程中的减数分裂性染色体失活(Meiotic sex chromosome inactivation, MSCI), 虽然在X和Y染色体上的基因沉默出现在粗线期精母细胞, 但大多数位于X染色体的miRNA基因在这一时期重新转录, 这表明这些miRNA或者参与MSCI, 或者在晚期减数分裂和早期后减数分裂中调控常染色体mRNAs^[47]。

由于Dcr在miRNAs的发生中起重要作用, 因此研究Dcr可以更好的理解miRNAs的生物学功能。近来研究发现无论是在生殖细胞还是支持细胞中, 敲除Dcr都会导致不育^[27,48]。一些基因, 如*Gdnf*、*Kitl*、*Man2a2*、*andSerpina5* 是精子发生过程在中必需的基因, 在新生睾丸缺失Dcr的支持细胞中明显下调。

piRNAs在精子发生中也有重要的作用。piRNA与Piwi亚家族蛋白结合形成piRNA复合物(piRC), piRC通过对基因转录后的调节抑制与精子发生异常的相关基因表达, 实现对精子发生的调控。piwi亚家

族蛋白MIWI、MIWI2、MILI等是无脊椎动物干细胞自我更新及雄性生殖细胞发育所必需^[22, 49-51]。哺乳动物MIWI、MIWI2、MILI蛋白表达于生殖细胞中、后期,而且为小鼠精子发生所必需^[27, 52, 53]。MIWI蛋白存在于精母细胞胞质、圆形精子细胞拟染色质小体(chromatoid body)和胞质中,在翻译和维持mRNA的稳定性方面起作用^[54]。在敲除*Mili*小鼠中,精子发生停留在粗线期精母细胞阶段^[53];在*Miwi*缺失小鼠中,精子发生停留在圆形精子阶段,不能形成长形精子^[52],*Miwi2*缺失的小鼠则表现为减数分裂1期早期缺陷以及随年龄增长的生殖细胞进展性缺失^[27]。这些研究都表明了*Miwi*在精子形成过程中的重要作用,由于piRNA主要表达与粗线期精母细胞和圆形精子,因此piRNAs主要是参与调节雄性生殖细胞减数及后减数分裂的过程,在精子发生中起抑制反转座子(retrotransposons)的作用^[26, 27]。近来研究认为:*Nct1*及*Nct2*是piRNA前体,主要表达于粗线期精母细胞^[55, 56],表明piRNAs在精子发生减数分裂阶段的调节中起作用。然而,*Nct1/2*-缺失的小鼠表现为第2号染色体中一小部分piRNAs基因簇的减少(如反义LINE1-相关重复序列piRNA),并不影响小鼠精子发生或生育,说明这些在第2号染色体的piRNAs对维持转座子沉默是必须的^[56]。

4 小RNAs在雄性生殖领域中的应用前景

小RNAs在雄性避孕、治疗不育及睾丸癌中有潜在应用价值。用siRNAs进行RNAi方面主要应用有:1)基础研究—深入研究某一特定基因及信号途径在精子发生中的调节作用;2)雄性避孕—可利用RNAi作为开发雄性避孕方法的一种有效工具。体内研究表明, RNAi能有效作用于雄性生殖细胞有丝、减数分裂及单倍体细胞阶段^[57],故可通过直接向睾丸中注射人工合成的siRNAs来降低正常精子发生所需基因的表达来实现雄性避孕;3)体内RNAi治疗雄性不育,去除疾病基因表达。在雄性不育小鼠模型中,很多基因如簇集蛋白(clusterin)、*Aard*、*Akr1b3*、*Defb1*、*Itga6*、*Itgb1*、*Maged2*、*Rbm3*及*Vim*可被上调^[58]。因此,通过体内注射siRNAs或利用表达shRNAs的载体,可以抑制上调基因中那些病变相关基因表达。

因为miRNAs及piRNAs在精子发生中起重要的作用,所以与这些小RNAs起拮抗作用的抑制剂将来可能作为雄性避孕药。将miRNAs和piRNAs抑制剂用于雄性避孕的优势就是其副作用可能会更小,因为很多miRNAs及piRNAs只表达于睾丸中,而在其他组织中表达。更重要的是, piRNAs只在雄性生殖细胞的中、后期阶段表达^[22-24]。已证实miRNAs的强效抑制剂—与miRNAs互补的寡聚核苷酸(如antagomir)经特异性结合后能有效的抑制靶miRNAs的表达^[59, 60]。另外, miRNA加工过程中受损可能导致小鼠雄性不育,故阻断miRNAs的发生也可作为雄性避孕方法^[49, 61]。因为miRNAs在人类和小鼠之间有高度的保守性,所以对小鼠miRNAs在雄性不育的研究应该有望用于人类。

miRNAs有致人类生殖细胞肿瘤(Human germ cell tumors, hGCTs)的作用,尤其是Mirn322和Mirn323被认为是参与人类睾丸生殖细胞肿瘤新的原癌基因^[62]。研究表明,*MIRNA372*和*MIRNA373*可能是参与hGCTs进展的原癌基因^[62]。利用定量PCR发现156个miRNAs在型、型GCTs中有不同表达方式^[63],为区分型和型GCTs提供依据。因此,揭示人类睾丸癌患者和正常人之间所有miRNAs的不同表达谱,可能会对人类睾丸癌有预测价值,并可提供诊断、预防以及最终基因治疗新的分子标记。此外,小鼠睾丸生殖细胞瘤(Testicular germ cell tumour, TGCT)易感基因*Dnd1*对于维持雄性生殖细胞活力是必需的^[64],缺失后小鼠表现为雄性生殖细胞缺失,*Dnd1*编码蛋白DND1与APOBEC3相互作用并与mRNA相结合来阻止miRNA介导的mRNA抑制作用,提示这可能是阻止GCTs进展的机制之一^[65]。

5 展望

小分子RNA在精子发生过程中的作用机制研究很有趣且十分重要,有助于深入理解雄性不育及睾丸癌等的发生机制,也可能发现新的雄性避孕方法,以及提供治疗雄性不育和睾丸癌的基因疗法。将来比较有意义的研究方向包括:(1)利用miRNA芯片、实时RT-PCR或第二代测序技术,建立miRNAs在哺乳动物精子发生中细胞及阶段特异表达谱。如用基于实时PCR的220-plex miRNA表达谱法,可以分析

miRNA在单个细胞(如干细胞)中的表达方式^[28]; (2)探索miRNA对精子发生过程中雄性生殖干细胞的更新与分化的作用; (3)鉴定雄性生殖细胞与体细胞中miRNAs调节的靶基因; (4)揭示miRNAs在睾丸癌变中的潜在作用。

piRNAs 在雄性生殖领域的研究有诸多问题有待揭示, 首先是其对基因表达沉默作用的机制有待阐明, 其次是弄清在哺乳动物精子发生中 piRNAs 的细胞特异表达谱, 以便阐明 piRNA 及 PIWI 蛋白在人类睾丸组织中的表达情况, 在基因组中的作用, 以及 piRNA 与 Piwi 蛋白结合形成基因转录沉默复合体对基因转录后的调节的信号传导途径等。

参考文献(References):

- [1] de Rooij DG, Grootegoed JA. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10(6): 694–701. [\[DOI\]](#)
- [2] Bellvé AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse: Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol*, 1977, 74(1): 68–85. [\[DOI\]](#)
- [3] Maatouk DM, Loveland KL, McManus MT, Moore K, Harfe BD. *Dicer1* is required for differentiation of the mouse male germline. *Biol Reprod*, 2008, 79(4): 696–703. [\[DOI\]](#)
- [4] Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Nakahara K, Carthew RW, Ruohola-Baker H. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature*, 2005, 435(7044): 974–978. [\[DOI\]](#)
- [5] Tolia NH, Joshua-Tor L. Slicer and the Argonautes. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(1): 36–43. [\[DOI\]](#)
- [6] Watanabe T, Takeda A, Tsukiyama T, Mise K, Okuno T, Sasaki H, Minami N, Imai H. 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): 1732–1743. [\[DOI\]](#)
- [7] Gunawardane LS, Saito K, Nishida KM, Miyoshi K, Kawamura Y, Nagami T, Siomi H, Siomi MC. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science*, 2007, 315(5818): 1587–1590. [\[DOI\]](#)
- [8] Vagin VV, Sigova A, Li CJ, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*, 2006, 313(5785): 320–324. [\[DOI\]](#)
- [9] Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 2007, 128(6): 1089–1103. [\[DOI\]](#)
- [10] Lin HF. piRNAs in the germ line. *Science*, 2007, 316(5823): 397. [\[DOI\]](#)
- [11] Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science*, 2002, 296(5571): 1263–1265. [\[DOI\]](#)
- [12] 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): 3011–3016. [\[DOI\]](#)
- [13] Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004, 303(5654): 95–98. [\[DOI\]](#)
- [14] Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science*, 2001, 293(5531): 834–838. [\[DOI\]](#)
- [15] Carmell MA, Hannon GJ. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(3): 214–218. [\[DOI\]](#)
- [16] Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(5): 376–385. [\[DOI\]](#)
- [17] Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet*, 2002, 30(4): 363–364. [\[DOI\]](#)
- [18] Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 2003, 301(5631): 336–338. [\[DOI\]](#)
- [19] Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(5): 396–400. [\[DOI\]](#)
- [20] Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. MicroRNA inhibition of translation initiation *in vitro* by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, 2007, 317(5845): 1764–1767. [\[DOI\]](#)
- [21] He ZP, Kokkinaki M, Pant D, Gallicano GI, Dym M. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction*, 2009, 137(6): 901–911. [\[DOI\]](#)
- [22] Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chien M, Russo JJ, Ju JY, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. A novel class

- of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 2006, 442(7099): 203–207. [\[DOI\]](#)
- [23] 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. [\[DOI\]](#)
- [24] Grivna ST, Beyret E, Wang Z, Lin HF. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev*, 2006, 20(13): 1709–1714. [\[DOI\]](#)
- [25] Lau NC, Seto AG, Kim J, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Bartel DP, Kingston RE. Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science*, 2006, 313(5785): 363–367. [\[DOI\]](#)
- [26] Aravin AA, Sachidanandam R, Girard A, Fejes-Toth K, Hannon GJ. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science*, 2007, 316(5825): 744–747. [\[DOI\]](#)
- [27] Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, Hannon GJ. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell*, 2007, 12(4): 503–514. [\[DOI\]](#)
- [28] Hayashi K, Chuva de Sousa Lopes SM, Kaneda M, Tang FC, Hajkova P, Lao KQ, O'Carroll D, Das PP, Tarakhovsky A, Miska EA, Surani MA. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1738. [\[DOI\]](#)
- [29] Bonetta L. The inside scoop-evaluating gene delivery methods. *Nat Methods*, 2005, 2(11): 875–883. [\[DOI\]](#)
- [30] He ZP, Jiang JJ, Hofmann MC, Dym M. *Gfra1* silencing in mouse spermatogonial stem cells results in their differentiation via the inactivation of RET tyrosine kinase. *Biol Reprod*, 2007, 77(4): 723–733. [\[DOI\]](#)
- [31] Braydich-Stolle L, Kostereva N, Dym M, Hofmann MC. Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation. *Dev Biol*, 2007, 304(1): 34–45. [\[DOI\]](#)
- [32] Oatley JM, Avarbock MR, Telaranta AI, Fearon DT, Brinster RL. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(25): 9524–9529. [\[DOI\]](#)
- [33] Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *J Biol Chem*, 2007, 282(35): 25842–25851. [\[DOI\]](#)
- [34] Wong EW, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Par3/Par6 polarity complex coordinates apical ectoplasmic specialization and blood–testis barrier restructuring during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(28): 9657–9662. [\[DOI\]](#)
- [35] Yan HH, Mruk DD, Wong EW, Lee WM, Cheng CY. An autocrine axis in the testis that coordinates spermiogenesis and blood–testis barrier restructuring during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(26): 8950–8955. [\[DOI\]](#)
- [36] Gonzalez-Herrera IG, Prado-Lourenco L, Pileur F, Conte C, Morin A, Cabon F, Prats H, Vagner S, Bayard F, Audigier S, Prats AC. Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism. *FASEB J*, 2006, 20(3): 476–478. [\[DOI\]](#)
- [37] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 2002, 26(2): 199–213. [\[DOI\]](#)
- [38] Heidel JD, Hu SW, Liu XF, Triche TJ, Davis ME. Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(12): 1579–1582. [\[DOI\]](#)
- [39] Yu ZR, Raabe T, Hecht NB. MicroRNA *Mirn122a* reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (*Tnp2*) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biol Reprod*, 2005, 73(3): 427–433. [\[DOI\]](#)
- [40] Ro S, Park C, Sanders KM, McCarrey JR, Yan W. Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Dev Biol*, 2007, 311(2): 592–602. [\[DOI\]](#)
- [41] Ostermeier GC, Goodrich RJ, Moldenhauer JS, Diamond MP, Krawetz SA. A suite of novel human spermatozoal RNAs. *J Androl*, 2005, 26(1): 70–74. [\[DOI\]](#)
- [42] Yan NH, Lu YL, Sun HQ, Tao DC, Zhang SZ, Liu WY, Ma YX. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction*, 2007, 134(1): 73–79. [\[DOI\]](#)
- [43] Yu ZR, Hecht NB. The DNA/RNA-binding protein, translin, binds microRNA122a and increases its *in vivo* stability. *J Androl*, 2008, 29(5): 572–579. [\[DOI\]](#)
- [44] Barad O, Meiri E, Avniel A, Aharonov R, Barzilai A, Bentwich I, Einav U, Gilad S, Hurban P, Karov Y, Lobenhofer EK, Sharon E, Shibolet Y, Shtutman M, Bentwich Z, Einat P. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res*, 2004, 14(12): 2486–2494. [\[DOI\]](#)
- [45] Novotny GW, Sonne SB, Nielsen JE, Jonstrup SP, Hansen MA, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Kjems J, Lefers H. Translational repression of *E2F1* mRNA in carci-

- noma in situ and normal testis correlates with expression of the *miR-17-92* cluster. *Cell Death Differ*, 2007, 14(4): 879–882. [\[DOI\]](#)
- [46] Marcon E, Babak T, Chua G, Hughes T, Moens PB. miRNA and piRNA localization in the male mammalian meiotic nucleus. *Chromosome Res*, 2008, 16(2): 243–260. [\[DOI\]](#)
- [47] Song R, Ro S, Michaels JD, Park C, McCarrey JR, Yan W. Many X-linked microRNAs escape meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet*, 2009, 41(4): 488–493. [\[DOI\]](#)
- [48] Papaioannou MD, Pitetti JL, Ro S, Park C, Aubry F, Schaad O, Vejnar CE, Kuhne F, Descombes P, Zdobnov EM, McManus MT, Guillou F, Harfe BD, Yan W, Jégou B, Nef S. Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev Biol*, 2009, 326(1): 250–259. [\[DOI\]](#)
- [49] Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin HF. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by *piwi* are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev*, 1998, 12(23): 3715–3727. [\[DOI\]](#)
- [50] Reddien PW, Oviedo NJ, Jennings JR, Jenkin JC, Sánchez Alvarado A. SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science*, 2005, 310(5752): 1327–1330. [\[DOI\]](#)
- [51] Klattenhoff C, Theurkauf W. Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development*, 2008, 135(1): 3–9. [\[DOI\]](#)
- [52] Deng W, Lin HF. *miwi*, a murine homolog of *piwi*, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell*, 2002, 2(6): 819–830. [\[DOI\]](#)
- [53] Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, Ikawa M, Iwai N, Okabe M, Deng W, Lin HF, Matsuda Y, Nakano T. *Mili*, a mammalian member of *piwi* family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*, 2004, 131(4): 839–849. [\[DOI\]](#)
- [54] Grivna ST, Pyhtila B, Lin HF. MIWI associates with translational machinery and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in regulating spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(36): 13415–13420. [\[DOI\]](#)
- [55] Iguchi N, Xu MG, Hori T, Hecht NB. Noncoding RNAs of the mammalian testis: the meiotic transcripts *Nct1* and *Nct2* encode piRNAs. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1120: 84–94. [\[DOI\]](#)
- [56] Xu MG, You Y, Hunsicker P, Hori T, Small C, Griswold MD, Hecht NB. Mice deficient for a small cluster of Piwi-interacting RNAs implicate Piwi-interacting RNAs in transposon control. *Biol Reprod*, 2008, 79(1): 51–57. [\[DOI\]](#)
- [57] Shoji M, Chuma S, Yoshida K, Morita T, Nakatsuji N. RNA interference during spermatogenesis in mice. *Dev Biol*, 2005, 282(2): 524–534. [\[DOI\]](#)
- [58] He ZP, Chan WY, Dym M. Microarray technology offers a novel tool for the diagnosis and identification of therapeutic targets for male infertility. *Reproduction*, 2006, 132(1): 11–19. [\[DOI\]](#)
- [59] Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs *in vivo* with ‘antagomirs’. *Nature*, 2005, 438(7068): 685–689. [\[DOI\]](#)
- [60] Krützfeldt J, Kuwajima S, Braich R, Rajeev KG, Pena J, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(9): 2885–2892. [\[DOI\]](#)
- [61] Otsuka M, Zheng M, Hayashi M, Lee JD, Yoshino O, Lin SC, Han JH. Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. *J Clin Invest*, 2008, 118(5): 1944–1954. [\[DOI\]](#)
- [62] Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, Liu YP, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, Nojima H, Looijenga LH, Agami R. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, 2006, 124(6): 1169–1181. [\[DOI\]](#)
- [63] Gillis AJ, Stoop HJ, Hersmus R, Oosterhuis JW, Sun Y, Chen C, Guenther S, Sherlock J, Veltman I, Baeten J, van der Spek PJ, de Alarcon P, Looijenga LH. High-throughput microRNAome analysis in human germ cell tumours. *J Pathol*, 2007, 213(3): 319–328. [\[DOI\]](#)
- [64] Youngren KK, Coveney D, Peng XN, Bhattacharya C, Schmidt LS, Nickerson ML, Lamb BT, Deng JM, Behringer RR, Capel B, Rubin EM, Nadeau JH, Matin A. The *Ter* mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. *Nature*, 2005, 435(7040): 360–364. [\[DOI\]](#)
- [65] Bhattacharya C, Aggarwal S, Kumar M, Ali A, Matin A. Mouse apolipoprotein B editing complex 3 (APOBEC3) is expressed in germ cells and interacts with dead-end (DND1). *PLoS One*, 2008, 3(5): e2315. [\[DOI\]](#)