

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk

**Rola piRNA oraz białek Piwi w gametogenezie
u *Sus scrofa***

Dorota Kowalczykiewicz

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii RNA
pod kierunkiem dr hab. Jana Wrzeńskiego, prof. IChB

Poznań 2014

Dziękuję mojemu promotorowi
dr hab. Janowi Wrześnińskiemu, prof. IChB
za opiekę naukową, cenne wskazówki oraz okazaną życzliwość.

Dziękuję kierownikowi Zakładu Biochemii RNA
prof. dr hab. Jerzemu Ciesiolce
za umożliwienie realizacji niniejszej pracy oraz opiekę.

Za dużą pomoc, życzliwość i dobrą atmosferę dziękuję

mgr inż. Aleksandrze Kasprowicz

mgr inż. Agnieszce Górskiej

oraz

dr Leszkowi Błaszczukowi

dr Marioli Dutkiewicz

dr Agacie Świątkowskiej

mgr Barbarze Smólskiej

za okazaną pomoc i możliwość współpracy.

Dziękuję moim bliskim za wiarę we mnie, wsparcie i motywację.

Pracę dedykuję moim bliskim

W trakcie realizacji pracy doktorskiej brałam udział w następujących projektach badawczych:

1. Projekt MNiSzW nr NN303 414237 – „Charakterystyka kompleksów niskocząsteczkowych germinalnych RNA z białkami oraz ich rola w gametogenezie u świni domowej”. Kierownik projektu: dr hab. Jan Wrześniński, prof. IChB.
2. Grant międzynarodowy niewspółfinansowany nr decyzji 552/N-COST/2009/0 – „Rola miRNA i gsRNA w rozwoju oocytów u *Sus scrofa*”. Kierownik grantu: dr hab. Jan Wrześniński, prof. IChB.

Część wyników otrzymanych przeze mnie w trakcie realizacji pracy doktorskiej została zawarta w następujących publikacjach i komunikatach:

Dorota Kowalczykiewicz, Jan Wrześniński „*Rola piRNA oraz białek Piwi w regulacji rozwoju komórek płciowych*” (2011), Postępy Biochemii 57, 249-256.

Dorota Kowalczykiewicz, Piotr Pawlak, Dorota Lechniak, Jan Wrzesinski „*Altered expression of porcine Piwi genes and piRNA during development*” (2012), PLoS ONE 7(8), e43816. Publikacja wyróżniona nagrodą Polskiego Towarzystwa Genetycznego w konkursie na najlepszą pracę oryginalną z zakresu genetyki, wykonaną w kraju i opublikowaną w 2012 roku.

Dorota Kowalczykiewicz, Aleksandra Świercz, Luiza Handschuh, Katarzyna Leśniak, Marek Figlerowicz, Jan Wrzesinski „*Characterization of Sus scrofa small RNA sequences present in both female and male gonads*”. Publikacja wysłana do redakcji.

Dorota Kowalczykiewicz, Piotr Pawlak, Dorota Lechniak, Jan Wrześniński „*Real-time PCR analysis of piwi family genes expression in the porcine oocytes*”. COST-GEMINI 3rd Annual Meeting, 1-3 X 2010, Soustons, Francja.

Dorota Kowalczykiewicz, Piotr Pawlak, Dorota Lechniak, Jan Wrzesiński „*Altered expression of porcine piwi genes during development*”. The 16th Annual Meeting of the RNA Society, 14-18 VI 2011, Kioto, Japonia.

Dorota Kowalczykiewicz, Piotr Pawlak, Dorota Lechniak, Jan Wrzesiński „*Analysis of porcine piwi genes and piRNA expression during gametogenesis*”. The 2nd Polish Congress of Biochemistry and Cell Biology, 5-9 IX 2011, Kraków, Polska.

Jan Wrzesiński, Dorota Kowalczykiewicz „*Characterization of porcine ovary expressed piRNA*”. The 4th General Meeting of GEMINI, 29 IX-02 X 2011, Gijon, Hiszpania.

Jan Wrzesiński, Dorota Kowalczykiewicz, Aleksandra Świercz, Katarzyna Leśniak „*Characterization of Sus scrofa piRNAs*”. The 72th Harden Conference, RNA regulators of gene expression, 22-25.06.2012, Cambridge, UK.

Dorota Kowalczykiewicz, Aleksandra Świercz, Luiza Handschuh, Katarzyna Leśniak, Marek Figlerowicz, Jan Wrzesiński „*Deep sequencing characterization of Sus scrofa piRNA fraction shared between females and male gonads*”. Structural Biology of Plants and Microbes, 22.05.2013, Poznań, Polska; BioTechnologia, 2013, vol. 94(1), p. 81.

Dorota Kowalczykiewicz “*Characterization of small RNA components present in Sus scrofa gonads*”. Towards a new RNA word, 12-14.11.2013, Poznań, Polska.

Spis treści

Spis stosowanych skrótów	11
Streszczenie	12
Abstract	14
1. Wstęp – struktura, biogeneza oraz funkcja niskocząsteczkowych RNA występujących w komórkach płciowych zwierząt	16
1.1. Pochodzenie komórek płciowych.....	16
1.1.1. Rozwój komórek płciowych u muszki owocowej i nicieni.....	17
1.1.2. Rozwój komórek płciowych u <i>D. rerio</i>	17
1.1.3. Rozwój komórek płciowych u myszy	18
1.1.4. Gametogeneza i zapłodnienie.....	20
1.1.5. Małe niekodujące RNA w rozwoju komórek płciowych	22
1.2. miRNA w rozwoju komórek płciowych	23
1.2.1. Biogeneza i funkcja miRNA	23
1.2.2. Rola miRNA podczas specyfikacji komórek prapłciowych.....	25
1.2.3. Rola miRNA w utrzymaniu i dojrzewaniu komórek macierzystych linii płciowej	28
1.2.4. Rola miRNA w różnicowaniu komórek płciowych – oogeneza	29
1.2.5. Rola miRNA w różnicowaniu komórek płciowych – spermatogeneza.....	29
1.2.6. Rola miRNA w różnicowaniu płci	30
1.2.7. Rola miRNA w komórkach somatycznych gonad	30
1.2.8. miRNA i hormonalna regulacja gametogenezy	32
1.3. piRNA w rozwoju komórek płciowych.....	32
1.3.1. Elementy ruchome w genomie	32
1.3.2. Biogeneza i funkcja piRNA	35
1.3.3. Udział piRNA w obronie genomu.....	41
1.3.4. Udział piRNA w spermatogenezie	42
1.3.5. Rola piRNA w specyfikacji i utrzymaniu komórek linii płciowej u <i>D. melanogaster</i>	44
1.3.6. Inne komponenty szlaku piRNA-Piwi	45
1.4. Endogenne siRNA w rozwoju komórek płciowych	49
1.4.1. Biogeneza i funkcja endogennych siRNA.....	49
1.4.1.1. Biogeneza endogennych siRNA u <i>D. melanogaster</i>	49
1.4.1.2. Biogeneza endogennych siRNA w mysich oocytach	52

1.4.2. Rola endogennych siRNA w różnicowaniu komórek płciowych – oogeneza.....	52
1.4.3. Rola endogennych siRNA w różnicowaniu komórek płciowych – spermatogeneza	53
1.5. miRNA, siRNA oraz piRNA w nowotworach zarodkowych.....	54
1.6. Fragmenty tRNA	57
1.6.1. Rodzaje fragmentów tRNA.....	57
1.6.2. Częsteczki tRF - produkty degradacji tRNA czy nowa klasa małych RNA?	58
1.6.3. Biologiczna rola oraz mechanizm działania cząsteczek tRF.....	59
1.6.3.1. tRF jako cząsteczki sygnałowe w odpowiedzi na czynniki stresowe.....	59
1.6.3.2. tRF jako regulatory ekspresji genów	60
2. Wprowadzenie i cel pracy	63
3. Wyniki i dyskusja	65
3.1. Zmiany ekspresji genów <i>Piwi</i> oraz piRNA na różnych etapach rozwoju <i>S. scrofa</i>	65
3.1.1. Identyfikacja genów <i>Piwi</i> w genomie <i>S. scrofa</i>	65
3.1.2. Zachowawczość ewolucyjna sekwencji aminokwasowej białek <i>Piwi</i> u ssaków	66
3.1.3. Tkankowo specyficzna ekspresja genów <i>Piwi</i> u świni domowej.....	70
3.1.4. Analiza względnej ilości transkryptów genów <i>Piwi</i> w jądrach świni domowej	71
3.1.5. Analiza względnej ilości transkryptów genów <i>Piwi</i> w jajnikach świni domowej	72
3.1.6. Analiza względnej ilości transkryptów genów <i>Piwi</i> w oocytach świni domowej.....	73
3.1.7. Wstępna analiza piRNA występujących w gonadach niedojrzałych i dojrzałych płciowo osobników	74
3.1.8. Dyskusja uzyskanych wyników	85
3.1.8.1. Nomenklatura białek <i>Piwi</i>	85
3.1.8.2. Ekspresja białek <i>Piwi</i> na różnych etapach rozwoju osobniczego.....	85
3.1.8.3. Czy białka <i>Piwi</i> regulują proces oogenezy u <i>S. scrofa</i> ?.....	87
3.2. Charakterystyka niskocząsteczkowych RNA występujących w gonadach <i>S. scrofa</i>	89
3.2.1. Dane z sekwencjonowania niskocząsteczkowych RNA	89
3.2.2. Długość piRNA obecnych w męskich i żeńskich gonadach <i>S. scrofa</i>	90
3.2.3. Rozkład sekwencji piRNA na chromosomach.....	92
3.2.4. Klastry piRNA	98
3.2.5. Mapowanie piRNA do różnych regionów genomu.....	100
3.2.6. Potranskrypcyjna modyfikacja piRNA występujących w gonadach <i>S. scrofa</i>	102
3.2.7. miRNA obecne w gonadach <i>S. scrofa</i>	104
3.2.8. tRF w komórkach płciowych	107

3.2.9. Dyskusja uzyskanych wyników – czy biogeneza piRNA zachodzi na drodze mechanizmu „ping-pong” ?	112
3.3. Oddziaływanie domeny PAZ białka Piwil4 z niskocząsteczkowymi RNA	115
3.3.1. Otrzymywanie rekombinowanych białek Piwi w systemie bakteryjnym	115
3.3.2. Otrzymanie domeny PAZ białka Piwil4 w systemie bakteryjnym	117
3.3.3. Badanie oddziaływań domeny PAZ białka Piwil4 z niskocząsteczkowymi RNA.....	119
3.3.4. Dyskusja uzyskanych wyników	121
4. Podsumowanie	122
5. Materiały i metody.....	124
5.1. Aparatura.....	124
5.2. Odczynniki i materiały	125
5.2.1. Związki promieniotwórcze.....	125
5.2.2. Enzymy	125
5.2.3. Zestawy odczynników	125
5.2.4. Oligonukleotydy.....	126
5.2.5. Plazmidy.....	126
5.2.6. Szczepy bakteryjne.....	126
5.2.7. Standardy do oznaczania wielkości makrocząsteczek	126
5.2.8. Bufory, roztwory i pożywki	126
5.2.9. Materiał biologiczny	130
5.3. Metody standardowe	131
5.3.1. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących	131
5.3.2. Elektroforeza cząsteczek DNA i RNA w żelu agarozowym.....	131
5.3.3. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących.....	132
5.3.4. Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego.....	132
5.3.5. Odzyskanie DNA z agarozy z wykorzystaniem ekstrakcji fenolowej	133
5.3.6. Ekstrakcja fenolem.....	133
5.3.7. Wytrącanie kwasów nukleinowych.....	133
5.3.8. Izolacja całkowitego RNA z tkanek i oocytów	134
5.3.9. Izolacja niskocząsteczkowych RNA z tkanek.....	135
5.4. Metody stosowane w badaniach własnych.....	135
5.4.1. Klonowanie genów <i>Piwi</i>	135

5.4.1.1. Odwrotna transkrypcja	135
5.4.1.2. Otrzymanie sekwencji kodujących białek Piwi.....	136
5.4.1.3. Klonowanie sekwencji kodujących do plazmidu	137
5.4.1.4. Transformacja <i>E. coli</i>	137
5.4.2. RT-PCR.....	138
5.4.3. Analiza względnego poziomu transkryptów metodą PCR w czasie rzeczywistym	138
5.4.3.1. Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja.....	139
5.4.3.2. PCR w czasie rzeczywistym.....	139
5.4.4. Konstruowanie biblioteki niskocząsteczkowych RNA	140
5.4.5. Głębokie sekwencjonowanie.....	142
5.4.6. Transkrypcja <i>in vitro</i>	143
5.4.7. Znakowanie RNA na końcu 5' izotopem ³² P	144
5.4.8. Reakcja β-eliminacji	145
5.4.9. Otrzymywanie rekombinowanych białek Piwi i domeny białkowej PAZ	145
5.4.9.1. Nadekspresja białek Piwi w różnych szczepach bakteryjnych.....	145
5.4.9.2. Otrzymanie plazmidu z sekwencją kodującą domeny PAZ białka Piwi4	146
5.4.9.3. Transformacja komórek bakteryjnych.....	146
5.4.9.4. Przygotowanie zawiesiny bakterii w glicerynie	147
5.4.9.5. Nadekspresja domeny białkowej PAZ	147
5.4.9.6. Analizowanie próbek po nadekspresji białek Piwi1, Piwi2, Piwi4 i domeny PAZ białka Piwi4.....	147
5.4.9.7. Liza komórek bakteryjnych.....	148
5.4.9.8. Oczyszczanie domeny białkowej PAZ.....	148
5.4.10. Analiza kompleksów domena białkowa PAZ-RNA za pomocą techniki opóźnionej migracji kompleksów w żelu poliakryloamidowym	149
Literatura	150

Spis stosowanych skrótów

3'UTR – region nieulegający translacji 3' (ang. *3' untranslated region*)

5'UTR – region nieulegający translacji 5' (ang. *5' untranslated region*)

A – adenina

aa – aminokwas

ATP – adenozyntrofosforan

c.p.m. – zliczenia rozpadów promieniotwórczych na minutę

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

dNTP – trifosforan dowolnego deoksyrybonukleotydu

dsDNA – dwuniciowa cząsteczka DNA (ang. *double stranded DNA*)

FSH – hormon folikulotropowy (ang. *follicle-stimulating hormone*)

GSC – komórki macierzyste linii płciowej (ang. *germline stem cell*)

Kd – stała dysocjacji

kDa – kilodaltony

LH – hormon luteinizujący (ang. *luteinizing hormone*)

LINE – długie rozproszone elementy jądrowe (ang. *long interspersed nuclear elements*)

LTR – długie końcowe powtórzone sekwencje nukleotydów (ang. *long terminal repeats*)

mRNA – RNA matrycowy (ang. *messenger RNA*)

nt – nukleotyd

PGC – komórki prapłciowe (ang. *primordial germ cell*)

RISC – indukowany przez RNA kompleks wyciszający (ang. *RNA-induced silencing complex*)

RNA – kwas rybonukleinowy

r.p.m. – obroty na minutę (ang. *rotations per minute*)

rRNA – rybosomalny RNA (ang. *ribosomal RNA*)

scRNA – małe cytoplazmatyczne RNA (ang. *small cytoplasmic RNA*)

SINE – krótkie rozproszone elementy jądrowe (ang. *short interspersed nuclear elements*)

snRNA – mały jądrowy RNA (ang. *small nuclear RNA*)

tRNA – transferowy RNA (ang. *transfer RNA*)

U – uracyl

Streszczenie

Niskocząsteczkowe RNA, takie jak miRNA, piRNA, czy endo-siRNA są ważnymi czynnikami regulującymi rozwój komórek płciowych. Cząsteczki miRNA, które wraz z białkami Ago tworzą kompleksy RISC, mogą kontrolować ekspresję genów poprzez regulowanie stabilności mRNA oraz procesu translacji. piRNA ulegają ekspresji głównie w komórkach płciowych i występują wyłącznie w formie kompleksów z białkami Piwi. Zakłada się, że powstają one z długich, jednoniciowych prekursorów RNA, kodowanych przez występujące w genomie sekwencje repetytywne. Znaczna część piRNA odpowiada sekwencjom retrotranspozonów, co wskazuje na ich udział w wyciszaniu ekspresji elementów ruchomych i utrzymaniu integralności genomu komórek płciowych. Zakłócenia szlaku piRNA-Piwi powodują aktywację transpozonów oraz liczne defekty podczas gametogenezy. Niedawno odkryto nową grupę małych RNA – tRF, które są fragmentami cząsteczek tRNA i prawdopodobnie uczestniczą w reakcjach odpowiedzi na stres komórkowy oraz hamują rozwój nowotworu.

W ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej sklonowano i zsekwencjonowano trzy geny *Piwi* *S. scrofa* (*Piwi1*, *Piwi2* i *Piwi4*). Porównanie sekwencji białek Piwi różnych organizmów wykazało duże podobieństwo pomiędzy świnią domową a człowiekiem. Analiza ekspresji genów *Piwi* w różnych tkankach świni przy pomocy RT-PCR wykazała tkankowo-specyficzną ekspresję, ograniczoną wyłącznie do gonad. Przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono analizę względnej ilości transkryptów genów *Piwi* w jądrach, jajnikach oraz oocytach osobników niedojrzałych i dojrzałych płciowo. W jądrach dorosłego samca najwyższy poziom ekspresji zaobserwowano dla genu *Piwi1*, natomiast w jądrach kilkudniowego osobnika poziom *Piwi1* był 2,5-krotnie niższy, a poziom *Piwi2* 3,5-krotnie wyższy w porównaniu do dorosłego osobnika. Ekspresja transkryptu *Piwi4* była 30-krotnie wyższa w jądrach młodego prosięcia. Względna ilość transkryptów genów *Piwi* w jajnikach była zdecydowanie niższa niż w jądrach, a najwyższą ekspresję obserwowano dla genu *Piwi2* w jajnikach kilkudniowego osobnika. Natomiast w przypadku oocytów względny poziom transkryptów był najwyższy dla genu *Piwi1*, podczas gdy ekspresja genu *Piwi4* była niewykrywalna. Przeanalizowano również frakcję niskocząsteczkowych RNA wyizolowaną z gonad niedojrzałych i dojrzałych płciowo osobników. Klonowanie i sekwencjonowanie puli małych RNA potwierdziło obecność cząsteczek piRNA w gonadach świni domowej.

Przy użyciu metody głębokiego sekwencjonowania scharakteryzowano 3 grupy małych RNA (piRNA, miRNA oraz tRF) obecne w gonadach *S. scrofa* skupiając się na frakcjach występujących w obu gonadach. Mimo że uzyskano podobną liczbę odczytów dla obu gonad, to liczba unikalnych sekwencji RNA w jajnikach była kilkukrotnie niższa. Spośród sekwencji wykrytych w jądrach 2.6% sekwencji piRNA, 9% miRNA oraz 10% tRF było również obecnych w jajnikach. Większość sekwencji piRNA obecnych w obu gonadach mapowała do intronów rRNA i występowała w genomie w postaci klastrów. Nieoczekiwanie zidentyfikowano w gonadach cząsteczki tRF będące 30-36-nt fragmentami RNA pochodzącymi z cząsteczek tRNA. Uzyskane dane sugerują, że mechanizm biogenezy piRNA u *S. scrofa* jest inny niż mechanizm „ping-pong” zachodzący w komórkach *D. melanogaster*. Cząsteczki piRNA izolowane z jąder świni domowej zawierały resztę uracylu w pozycji pierwszej, ale nie wykazywały tendencji do posiadania reszty adeniny w pozycji dziesiątej. Natomiast piRNA izolowane z jajników nie posiadały w danych pozycjach ani reszty uracylu, ani reszty adeniny.

Podjęto także próbę nadekspresji białek Piwi w systemie bakteryjnym, jednakże ze względu na występowanie białek Piwi w formie nierozpuszczalnych ciał inkluzyjnych zmniejszono wielkość białka do domeny PAZ, którą dla białka Piwil4 udało się uzyskać w formie rozpuszczalnej. Test opóźnionej migracji kompleksów rybonukleoproteinowych w żelu poliakrylamidowym wykazał wiązanie niskocząsteczkowych RNA, piRNA oraz tRF, do domeny PAZ białka Piwil4.

Abstract

Non-coding small RNAs such as miRNAs, piRNAs and endo-siRNA are important factors that regulate the germ cell developmental processes. The miRNAs that associate with the Ago proteins to form RISC complex may control gene expression by modulating mRNA stability and translation. piRNAs are mainly expressed in germline cells and occur in the complexes with Piwi proteins. It is postulated that piRNAs are formed from long single-stranded RNA precursors coded by repetitive sequences occurring in the genome. A large part of piRNA corresponds to retrotransposon sequences, which suggests their participation in mobile elements silencing and maintaining of germ cells genome integrity. Disruption of the piRNA-Piwi pathway causes the activation of transposons and defects during gametogenesis. Recently, a new group of tRNA-derived small RNAs, tRFs, was discovered. The tRFs family has been suggested to be involved in the stress response and tumor suppression.

Three *Sus scrofa* *Piwi* genes (*Piwill*, *Piwil2* and *Piwl4*) were cloned and sequenced. Alignment of the Piwi proteins showed high identity between *S. scrofa* and *H. sapiens*. The analysis of several porcine tissues by reverse transcriptase PCR revealed tissue-specific expression of the porcine *Piwi* genes restricted exclusively to gonads. Relative transcript abundance of *Piwill*, *Piwil2* and *Piwl4* genes in the testes, ovaries and oocytes derived from sexually immature and mature animals were examined using Real-Time PCR. In the testes of adult pig the highest relative transcript abundance was observed for *Piwill* gene. In the testes of neonatal pig the *Piwill* transcript level was 2.5-fold reduced, while the level of *Piwil2* transcript was 3.5-fold higher. The expression of the *Piwl4* transcript was 30-fold elevated in the testes of neonatal pig when compared to adult male. In the ovaries transcript abundance of the three *Piwi* genes was significantly reduced in comparison with the testes and the highest was the *Piwil2* gene expression in the neonatal ovaries. In oocytes *Piwill* transcript was most abundant, whereas the expression of *Piwl4* was undetectable. Next, a fraction of small RNAs isolated from gonads of sexually immature and mature pigs was analyzed. Cloning and sequencing of the small RNA pool confirmed the presence of piRNA in porcine gonads.

In the thesis, deep sequencing method was used to characterize 3 families of small RNAs (piRNAs, miRNAs, and tRFs) present in *S. scrofa* gonads, focusing on the fraction present in both male and female gonads. Although similar numbers of reads were obtained

from both types of gonads, the number of unique RNA sequences in the ovaries was several times lower. Of the sequences detected in the testes, 2.6% of piRNAs, 9% of miRNAs, and 10% of tRFs were also present in the ovaries. The majority of the shared piRNAs mapped to the introns of ribosomal RNAs and were derived from clustered loci. Unexpectedly, a novel small RNA type, the tRFs, which are 30-36-nt RNA fragments derived from tRNA molecules were detected in gonads. The obtained data suggest that the mechanism of piRNA biogenesis in *S. scrofa* is different from the “ping-pong” mechanism postulated for piRNA biogenesis in *D. melanogaster*. The piRNA population isolated from porcine testes contained a 1U bias, but lacked a 10A bias. The piRNA population isolated from ovaries exhibited neither a 1U nor 10A bias.

Because overexpression of Piwi proteins in *E. coli* led to the formation of insoluble inclusion bodies, PAZ domain of Piwil4 protein responsible for interaction with small RNAs was obtained. The interaction of PAZ domain with small RNAs occurring in *S. scrofa* gonads such as piRNAs and tRFs was determined using the electrophoretic mobility shift assay.

1. Wstęp – struktura, biogeneza oraz funkcja niskocząsteczkowych RNA występujących w komórkach płciowych zwierząt

1.1. Pochodzenie komórek płciowych

Komórki linii płciowej przekazują informację genetyczną z pokolenia na pokolenie. Ciekawą cechą tych komórek jest to, że ulegają one specyfikacji na bardzo wczesnym etapie rozwoju, zanim jeszcze dojdzie do utworzenia gonad. Pierwsze komórki, które poprzez podziały mitotyczne dają początek wyłącznie komórkom rozrodczym, to komórki prapłciowe (PGC, ang. *primordial germ cell*). Komórki te, różniące się molekularnie od reszty komórek, muszą przemieścić się przez rozwijające się tkanki somatyczne do miejsca, w którym powstaną gonady. Osiedlają się tam i tworzą niszę komórek macierzystych linii płciowej (GSC, ang. *germline stem cell*), które dają początek zróżnicowanemu potomstwu. Cechą charakterystyczną komórek PGC i GSC jest posiadanie specyficznej, morfologicznie odmiennej cytoplazmy, tzw. plazmy płciowej, która zawiera charakterystyczne dla komórek płciowych mRNA i białka [1]. W trakcie rozwoju zarodkowego, to właśnie plazma płciowa ulega segregacji do blastomerów linii płciowej, a następnie do komórek prapłciowych. Wykazano, że w plazmie płciowej znajdują się małe niekodujące RNA [2], które pełnią kluczową rolę w regulacji różnych procesów życiowych komórek rozrodczych, takich jak specyfikacja prekursorów linii płciowej, utrzymanie populacji komórek macierzystych linii płciowej, ochrona genomu oraz prawidłowe różnicowanie do gamet.

Specyfikacja komórek linii płciowej dokonuje się na drodze dwóch różnych strategii. Pierwszą z nich jest dziedziczenie w linii żeńskiej specyficznych determinantów cytoplazmatycznych, które zlokalizowane są w plazmie płciowej. Druga związana jest z wysyłaniem przez otaczające tkanki sygnałów indukcyjnych. Wiele organizmów, takich jak *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* i *Danio rerio*, do determinacji komórek linii płciowej wykorzystuje obecność plazmy płciowej. Dziedziczona matczyne plazma płciowa zawiera specyficzne białka oraz RNA, które po włączeniu do komórek stymulują ich przekształcenie do komórek płciowych. Druga strategia, występująca m.in. u ssaków i płazów ogoniastych, polega na specyfikacji prekursorów komórek płciowych pod wpływem procesu indukcyjnego. Częsteczki sygnałowe, takie jak białka należące do rodziny białek morfogenetycznych kości (BMP, ang. *bone morphogenetic protein*), docierające z sąsiadujących tkanek, determinują powstanie linii komórek płciowych [3].

1.1.1. Rozwój komórek płciowych u muszki owocowej i nicieni

Komórki biegunowe (ang. *pool cells*), powstające w tylnym biegunie wczesnych zarodków muszki owocowej, posiadają odziedziczoną w linii żeńskiej plazmę biegunową, co jest dla nich sygnałem do przekształcenia w prekursorowe komórki płciowe [4]. Podczas rozwoju embrionalnego aktywny i pasywny ruch komórek prapłciowych powoduje ich przemieszczenie do regionu, w którym rozwijają się gonady i w którym oddziałują one z somatycznymi zawiązkami gonad [5]. Podczas dalszych etapów wytwarzania gonad, komórki macierzyste linii płciowej (GSC) zlokalizowane są w specjalnym mikrośrodowisku nazywanym niszą, gdzie za pomocą różnych sygnałów, kontrolujących samoodnawianie i różnicowanie komórek, utrzymywane są w stanie pluripotentnym [6]. Jednym z lepiej scharakteryzowanych związków sygnałowych, kontrolujących równowagę pomiędzy utrzymaniem pluripotencji a różnicowaniem, jest morfogen Decapentaplegic (Dpp), będący homologiem występującego u kręgowców białka BMP. Substancja ta stanowi kluczowy sygnał dla utrzymania populacji komórek GSC u samic [7, 8]. Początek gametogenezy w jajnikach i jądrach jest bardzo podobny. Komórki macierzyste linii płciowej dzielą się, wytwarzając dwie komórki potomne. Jedna z nich pozostaje w obrębie niszy w celu utrzymania populacji komórek macierzystych, a druga zostaje umiejscowiona z dala od niszy i rozpoczyna proces różnicowania [9, 10].

U nicienia *C. elegans* plazma płciowa jest zgromadzona w ziarnach P (determinantach linii płciowej), które są równomiernie rozmieszczone w całej cytoplazmie oocyty, przed i krótko po zapłodnieniu. Podczas pierwszego podziału ziarna zostają umieszczone w tylnym biegunie zygoty i są następnie asymetrycznie segregowane i stabilizowane podczas kolejnych podziałów, w taki sposób, że plazma płciowa jest dziedziczona przez komórkę P4. Komórka ta zawiera wszystkie ziarnistości P i daje początek komórkom płciowym zarodka [11].

1.1.2. Rozwój komórek płciowych u *D. rerio*

Mechanizm odpowiedzialny za specyfikację komórek prapłciowych u *D. rerio* odkryto po tym, jak zidentyfikowano RNA kodujące białko Vasa, będące pierwszym, wczesnym markerem molekularnym tych komórek [12]. mRNA genu *vasa* znajduje się w obrębie bogatej w elektrony plazmie płciowej, która odziedziczona w linii żeńskiej gromadzi się na obrzeżach pierwszych dwóch bruzd podziałowych i następnie jest włączana do czterech blastomerów. Z komórek, które otrzymują plazmę płciową podczas kolejnych podziałów

komórkowych, rozwijają się komórki prapłciowe [13]. Mimo różnic w umiejscowieniu plazmy płciowej, rozwój komórek płciowych u *D. rerio* przebiega według podobnego scenariusza, jak u opisanych wyżej bezkręgowców, jak również u *X. laevis*. Zidentyfikowanie w plazmie płciowej *D. rerio* dodatkowych składników, takich jak białka oddziałujące z RNA, bądź RNA kodujące te białka sugeruje, że podobnie jak u innych organizmów, plazma płciowa odgrywa rolę w kontrolowaniu stabilności RNA, jego lokalizacji i funkcji [14]. Wiele ze składników plazmy płciowej, takich jak *dal*, *nanos* i *vasa*, jest konserwatywnych i występuje zarówno u *D. rerio*, jak i u innych organizmów, w których determinacja komórek płciowych odbywa się przy udziale plazmy płciowej. Jednakże niektóre występują specyficznym tylko u kręgowców, szczególnie białko wiążące RNA, Dead end (Dnd) [15]. Po specyfikacji komórki prapłciowe dzielą się, a następnie migrują w kierunku rozwijających się gonad, gdzie oddziałują one z komórkami somatycznymi i różnicują się do gamet [5].

1.1.3. Rozwój komórek płciowych u myszy

Mysie komórki prapłciowe powstają w odpowiedzi na sygnały kodowane przez białka, należące do rodziny białek TGF β (ang. *transforming growth factor β*) oraz BMP, pochodzące z komórek pozazarodkowej ektodermy i komórek endodermy trzewnej [16]. Te pozazarodkowe tkanki odgrywają istotną rolę w powstawaniu komórek prapłciowych u myszy poprzez aktywację szlaku sygnałowego białka BMP [17], który ostatecznie prowadzi do zahamowania ekspresji genów somatycznych (np. genu *hox*), indukcji genów charakterystycznych dla komórek płciowych (*dnd1*, *tdrd1*, *nanos3*) oraz ekspresji *de novo* genów odpowiedzialnych za pluripotencję (*sox2*, *oct4*, *nanog*) [18]. Do wyciszenia genów somatycznych dochodzi poprzez działanie czynnika transkrypcyjnego BLIMP1 i oddziałujących z nim kompleksów modyfikujących chromatynę [19]. Podobnie jak u wielu innych organizmów, po procesie specyfikacji, komórki prapłciowe migrują do regionu, w którym rozwijają się gonady [5]. W tym czasie komórki te dzielą się co około 16 godzin [20] i wymagają specyficznych, utrzymujących je przy życiu czynników, które zapobiegają apoptozie i pobudzą podziały komórkowe. Do przetrwania komórek prapłciowych podczas ich migracji niezbędne są m.in. białka Nanos i Dnd1 (ang. *dead end homolog 1*), które oddziałują z RNA i występują w plazmie płciowej różnych organizmów [21]. Komórki prapłciowe, które migrują do niewłaściwych miejsc są eliminowane na drodze apoptozy zależnej od białka BAX [22]. Powstające gonady zostają zasiedlone przez tysiące komórek

prapłciowych. Następnie komórki prapłciowe tracą zdolność do migracji i rozpoczynają proces różnicowania. Komórki prapłciowe w jądrach różnicują się do prospermatogonii, z których z czasem powstają dojrzałe plemniki, natomiast komórki prapłciowe w jajnikach różnicują się do oogonii, z których powstają dojrzałe komórki jajowe. Proces różnicowania się komórek rozrodczych jest kontrolowany bezpośrednio przez somatyczne środowisko. Przetrwanie i powstanie męskich komórek płciowych zależy od ekspresji genu *fgf9* w komórkach somatycznych [23] oraz *nanos2* w komórkach rozrodczych [24]. Brak tych genów lub innych genów zaangażowanych w blokowanie aktywności kwasu retinowego, jak *cyp26b1* [25], prowadzi do zakłóceń rozwoju osobników męskich. Z kolei powstanie żeńskich komórek płciowych jest związane z natychmiastowym wejściem w podział mejotyczny oraz zwiększoną ekspresją genów uczestniczących w rekombinacji mejotycznej [26].

Podczas kolonizacji gonad pomiędzy żeńskimi i męskimi komórkami prapłciowymi pojawiają się znaczne różnice w ekspresji genów i przebiegu cyklu komórkowego. W trakcie gametogenezy w życiu płodowym dochodzi do wstrzymania podziałów mitotycznych męskich komórek płciowych w fazie G₀, krótko po tym jak dotrą one do gonad. Pozostają one w stadium spoczynkowymi, aż do czasu narodzenia osobnika [27]. Geny, które zaangażowane są w zatrzymanie podziałów, to regulatory cyklu komórkowego *p27*, *p21* i *p16* [27]. Po urodzeniu osobnika dochodzi do wznowienia podziałów mitotycznych i wytworzenia populacji męskich komórek macierzystych linii płciowej (spermatogonii), które zachowują zdolność do samoodnawiania się przez całe życie osobnika. W przeciwieństwie do męskich komórek płciowych, komórki żeńskie kontynuują swoje podziały, po czym dochodzi do ich zatrzymania w stadium diplotenu profazy pierwszego podziału mejotycznego. W celu rozpoczęcia przez żeńskie komórki rozrodcze podziału mejotyczny niezbędny jest szlak sygnałowy kwasu retinowego oraz ekspresja genu *dazl*, specyficznego dla komórek płciowych [28]. Oocyty oddziałując z komórkami warstwy ziarnistej wytwarzają pęcherzyki pierwotne, które utrzymywane są w profazie, aż do osiągnięcia dojrzałości płciowej osobnika, kiedy to dochodzi do wznowienia podziału mejotycznego podczas folikulogenezy [29]. Dojrzewanie oocytów następuje na skutek sygnału wysyłanego przez cyklicznie uwalniane hormony FSH (ang. *follicle-stimulating hormone*) i LH (ang. *luteinizing hormone*). Nie istnieje w jajniku żadna populacja komórek macierzystych linii płciowej, która uzupełniłaby pulę zdolnych do zapłodnienia oocytów w momencie, gdy dojdzie do zużycia wszystkich pęcherzyków jajnikowych. Jest to sytuacja zupełnie odwrotna w porównaniu

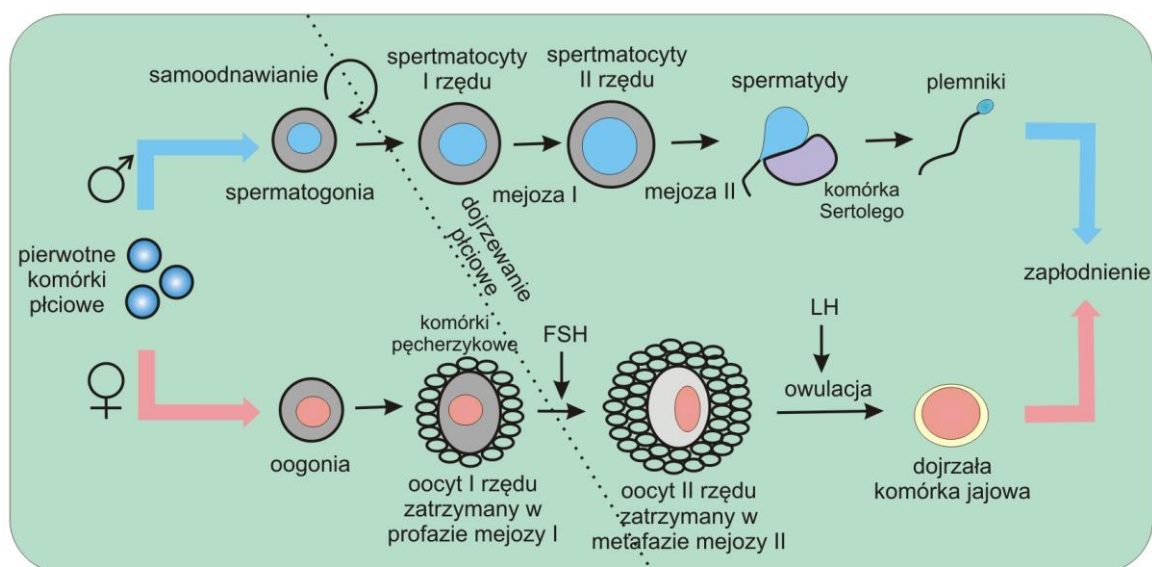
do wielu innych gatunków bezkręgowców i kręgowców, takich jak np. *D. melanogaster* i *D. rerio*, u których oocyty są produkowane przez większość życia samic.

Podczas rozwoju komórek płciowych dochodzi do ich dynamicznego epigenetycznego przeprogramowania. Proces ten obejmuje globalną demetylację dinukleotydowych sekwencji CpG, nazywanych wyspami CpG, w pierwotnych komórkach rozrodczych [30], po której następuje nowe ustalenie wzoru metylacji DNA w płodowych prospermatogoniach u osobników męskich, natomiast u osobników żeńskich po urodzeniu podczas wzrostu oocytów [31]. Główną wadą przeprogramowywania epigenetycznego jest to, że proces ten ma wpływ również na aktywność sekwencji repetytywnych, a zwłaszcza transpozonów i retrotranspozonów. Podczas globalnej demetylacji CpG, zachodzącej w pierwotnych komórkach płciowych, transpozony zostają pozbawione modyfikacji, które odpowiedzialne były za ich wyciszenie [30] i dochodzi do ich aktywacji w prospermatogoniach oraz dojrzewających oocytach [32]. Jeśli system obrony osobnika przed aktywacją sekwencji repetytywnych zawiedzie, konsekwencje dla genomu są dramatyczne. Niewłaściwa informacja genetyczna będzie albo odziedziczona przez kolejne pokolenie, albo spowoduje śmierć komórek płciowych i tym samym bezpłodność osobnika. Jedną z klas małych niekodujących RNA, piRNA (ang. *piwi-interacting RNA*), przy udziale białek Piwi pełni rolę w wyciszaniu retrotranspozonów w płodowych prospermatogoniach, poprzez metylację DNA i zapewnia w ten sposób właściwy przebieg spermatogenezy.

1.1.4. Gametogeneza i zapłodnienie

U ssaków spermatogeneza rozpoczyna się w gonadach męskich w momencie utworzenia spermatogonialnych komórek macierzystych (SSC, ang. *spermatogonial stem cell*), które mają zdolność samoodnawiania się i wytwarzania komórek potomnych zdolnych do różnicowania. Komórki te po przeniesieniu do hodowli tkankowej *in vitro*, tworzą multipotentne komórki macierzyste linii płciowej [33]. *In vivo*, różnicujące się spermatogonia dają początek kilku pośrednim typom komórek przed utworzeniem spermatogonii typu B. Kolejno spermatogonia typu B rozwijają się do spermatocytów pierwszorzędowych, które podejmują podział mejotyczny. Po pierwszym podziale mejotycznym powstają spermatocyty drugiego rzędu, a następnie po drugim podziale mejotycznym okrągłe haploidalne komórki zwane spermatydami (Rys. 1).

Pomimo że zarówno w spermatogenezie, jak i oogenezie zachodzi podział mejotyczny, to procesy te znacznie różnią się w kilku aspektach. Podczas gdy mejoza u osobników męskich prowadzi do wytworzenia czterech gamet z pojedynczego podziału mejotycznego, to na skutek mejozy u osobników żeńskich powstaje tylko jedna komórka jajowa. Gdy samica osiągnie dojrzałość płciową, pewna niewielka liczba oocytów, zatrzymanych w profazie pierwszego podziału mejotycznego, jest stymulowana przez hormony (FSH i LH) do wytworzenia dojrzałych pęcherzyków. Dojrzewające pęcherzyki zawierają oocyty blisko związane z komórkami somatycznymi, które regulują ponowne wejście oocytu w podział mejotyczny, dokończenie mejozy I, zatrzymanie w stadium metafazy II oraz uwolnienie oocytu do jajowodu, gdzie dochodzi do zapłodnienia [34] (Rys. 1).



Rysunek 1. Rozwój komórek płciowych u myszy. Pierwotne komórki płciowe wchodzące do gonady męskiej określa się jako prospermatogonia. Po urodzeniu osobnika spermatogonia przechodzą podziały mitotyczne. Z każdej komórki powstają dwie potomne; jedna z nich staje się komórką macierzystą, a druga różnicuje się do spermatocyty I rzędu. Spermatocyty przechodzą mejozę, po której powstają spermatydy różnicujące się następnie do dojrzałych plemników. Pierwotne komórki płciowe wchodzące do gonady żeńskiej określa się jako oogonia. Przechodzą one kilka podziałów mejotycznych, po czym powstałe komórki wchodzą w mejozę i stają się oocytami pierwszego rzędu zatrzymanymi w profazie pierwszego podziału mejotycznego. Po osiągnięciu dojrzałości płciowej, pod wpływem FSH, oocyt kończy mejozę, w wyniku czego powstaje oocyt II rzędu zatrzymany w metafazie mejozy II, a następnie pod wpływem LH dochodzi do uwolnienia dojrzałej komórki jajowej.

Proces zapłodnienia, czyli połączenia dojrzałych gamet jest krytycznym momentem przeprogramowania, w którym to ostatecznie zróżnicowany oocyt zamienia się w totipotencjalną zygotę. Fuzji haploidalnych genomów oraz reorganizacji chromatyny w tym decydującym stadium rozwojowym towarzyszy całkowite zatrzymanie transkrypcji, co podkreśla ogromne znaczenie potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Zgromadzenie i umiejscowienie matczynych transkryptów w dojrzałym oocyte jest kluczowe dla procesu zapłodnienia i wczesnego rozwoju zarodkowego u wielu gatunków. Zatem małe niekodujące RNA oraz oddziałujące z nimi białka są niezbędne na tym etapie, by zapewnić prawidłowy przebieg translacji w trakcie przejścia ze stadium oocyty do stadium zygoty.

1.1.5. Małe niekodujące RNA w rozwoju komórek płciowych

Wśród wielu różnych klas małych regulatorowych niekodujących RNA w ostatnich latach szczególną uwagę zwrócono na cząsteczki miRNA, endo-siRNA oraz piRNA, które pełnią w komórkach szereg ważnych funkcji. Mają one długość od 18 do 32 nukleotydów i różnią się zarówno pod względem biogenezy, jak i funkcji. miRNA w dużej mierze funkcjonują poprzez hamowanie translacji docelowych transkryptów [35]. Podczas gdy niewiele wiadomo na temat funkcji występujących u ssaków endo-siRNA, ich egzogenicznie syntetyzowane odpowiedniki działają poprzez przecięcie i w związku z tym bezpośrednio destabilizację docelowego mRNA [36]. Z kolei wykazano, że piRNA funkcjonują, przynajmniej częściowo, na poziomie transkrypcyjnym poprzez epigenetyczne modyfikacje genomu [37].

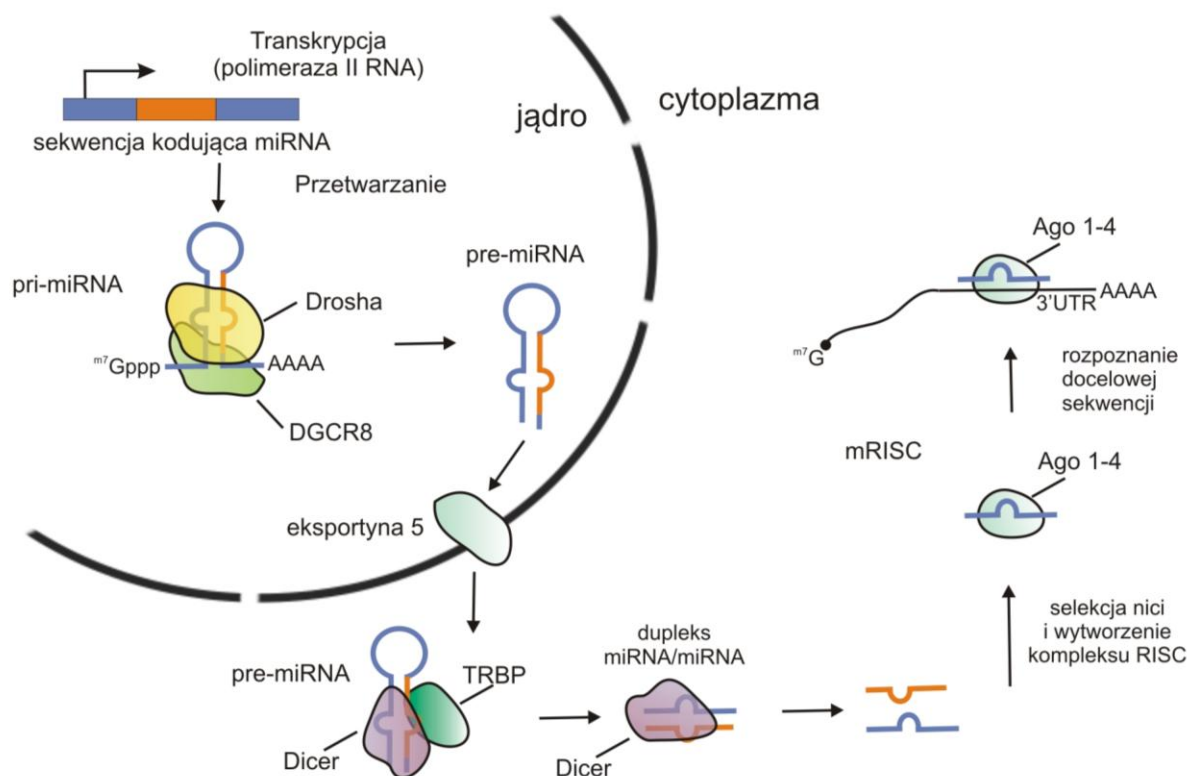
Zainteresowanie biologią małych RNA rozpoczęło się wraz z odkryciem mutacji w regionie genomu kodującym małe RNA komplementarne do transkryptu innego genu [38] oraz z późniejszym doniesieniem, że dwuniciowe RNA mogą zmieniać ekspresję genu poprzez proces zwany interferencją RNA (RNAi, ang. *RNA interference*) [39]. Kolejne badania wykazały, że te małe regulatorowe RNA licznie występują u różnych gatunków roślin i zwierząt.

1.2. miRNA w rozwoju komórek płciowych

1.2.1. Biogeneza i funkcja miRNA

miRNA stanowią dużą rodzinę 21-25-nukleotydowych RNA, biorących udział w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów na drodze interferencji RNA. Proces biogenezy miRNA (Rys. 2) obejmuje zarówno etap przebiegający w jądrze komórkowym, jak i etap przebiegający w cytoplazmie [40]. Cząsteczki te są transkrybowane z międzygenowych lub wewnątrzgenowych regionów chromosomalnego DNA przez polimerazę RNA II, w wyniku czego powstają pierwotne transkrypty o różnej długości (zazwyczaj 1-3 kb) nazywane pri-miRNA [41]. Posiadają one charakterystyczne struktury typu „spinki do włosów” i zawierają sekwencje dojrzałych cząsteczek miRNA. Pierwszym etapem dojrzewania miRNA jest endonukleolityczne cięcie pri-miRNA przez jądrowy kompleks składający się z endorybonukleazy Droscha i jej kofaktora DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome critical region gene 8*). Enzym ten wycina z pierwotnego transkryptu około 70-nt prekursorowy miRNA (pre-miRNA), posiadający resztę fosforanową na końcu 5' oraz dwa niesparowane nukleotydy i grupę hydroksylową na końcu 3' [42]. pre-miRNA posiada strukturę typu „spinki do włosów” i w kolejnym etapie biogenezy jest transportowany z jądra do cytoplazmy. W procesie tym bierze udział kompleks eksportyny 5 z białkiem Ran-GTP, który rozpoznaje niesparowanie na końcu 3' pre-miRNA oraz sąsiadujący z nim dwuniciowy fragment [43]. W cytoplazmie prekursorowy miRNA jest następnie przycinany do 21-25-nt dupleksów miRNA przy udziale endorybonukleazy Dicer, która do swojej aktywności wymaga obecności dwóch białek: TRBP (ang. *trans-activating region RNA-binding protein*) i PACT (ang. *interferon inducible double-stranded-RNA-dependent protein kinase activator*) [44]. Powstałe dupleksy posiadają na końcu 5' monofosforan, natomiast na końcu 3' dwunukleotydowe niesparowanie z wolną grupą hydroksylową. Jedna z nici dupleksu, tzw. nić wiodąca (ang. *guide strand*), zostaje włączona do kompleksu RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), podczas gdy druga nić, tzw. nić pasażerska (ang. *passenger strand*), ulega degradacji. Do niedawna sądzono, że nić pasażerska w większości przypadków jest degradowana, jednak badania wykazały, że obydwie nici mogą być funkcjonalne [45]. Kompleks RISC składa się z nici wiodącej miRNA oraz z jednego z czterech białek należących do rodziny Argonaute (Ago1-4). Wykazano, że spośród czterech białek Ago, tylko Ago2 posiada domenę PIWI o właściwościach enzymatycznych RNazy H, zdolną do przecinania cząsteczek mRNA [46]. Aktywność endonukleolityczna Ago2 jest również

wykorzystywana w przypadku niektórych ewolucyjnie konserwatywnych miRNA powstających bez udziału RNazy Dicer [47].



Rysunek 2. Biogeneza i funkcja miRNA u ssaków. Geny miRNA są transkrybowane przez polimerazę RNA II. Powstałe pri-miRNA są rozpoznawane i przycinane przez nukleazę Drosha, działającą z udziałem DGCR8, do pre-miRNA, które są następnie eksportowane z jądra do cytoplazmy. W cytoplazmie pre-miRNA są rozpoznawane przez enzym Dicer, który wycina z pre-miRNA ok. 22-nt duplety. Jedną z nici dupletu, tzw. nić wiodącą, staje się częścią kompleksu RISC, a druga nić, tzw. pasażerska ulega degradacji. Kompleks RISC składający się z nici miRNA oraz jednego z czterech białek Ago rozpoznaje region 3'UTR docelowej cząsteczki mRNA i inhibuje jej translację lub powoduje degradację.

Do prawidłowego rozpoznania i wyciszenia docelowej cząsteczki mRNA nie jest wymagana całkowita komplementarność pomiędzy miRNA, a docelowym mRNA. Kluczowym odcinkiem dla ich oddziaływania jest region obejmujący nukleotydy 2-7 zwany 5' seed oraz nukleotydy 13-16 zwany anchor nici wiodącej miRNA [48]. W przypadku, gdy między cząsteczką miRNA, a sekwencją mRNA istnieje całkowita komplementarność i gdy kompleks RISC zawiera białko Ago2, białko to może rozszcześcić cząsteczkę mRNA, co prowadzi do jej degradacji. Taki model rozpoznawania mRNA przez miRNA jest często

obserwowany u roślin. Natomiast u zwierząt niecałkowita komplementarność miRNA z mRNA prowadzi do hamowania procesu translacji [49]. Szacuje się, że 30% ludzkich genów kodujących białka pozostaje pod kontrolą pełniących funkcje regulatorowe cząsteczek miRNA, a typowa cząsteczka miRNA może regulować setki docelowych genów [50].

1.2.2. Rola miRNA podczas specyfikacji komórek prapłciowych

Różnicowanie się linii płciowej u bezkręgowców (*C. elegans*, *D. melanogaster*) oraz u niektórych kręgowców (*X. laevis*, *D. rerio*) związane jest z dziedziczeniem w linii żeńskiej specyficznych determinantów cytoplazmatycznych, asymetrycznie rozmieszczonych w jajach. Należą do nich cząsteczki RNA oraz białka, zlokalizowane w wyraźnie rozróżnialnym obszarze cytoplazmy, zwanym plazmą płciową. Odziedziczenie plazmy płciowej predestynuje komórki do przekształcenia w komórki linii płciowej. Usunięcie plazmy płciowej z jaj powoduje sterylność, a ponowne jej wstrzyknięcie przywraca zdolność różnicowania się linii płciowej u zarodków. Natomiast u ptaków i ssaków różnicowanie się linii płciowej nie wymaga determinantów cytoplazmatycznych, a komórki rozrodcze powstają w odpowiedzi na interakcje komórka-komórka.

Pierwsza oznaka, która wskazywałaby na możliwy udział miRNA w procesie specyfikacji komórek linii płciowej, została zaobserwowana u *D. melanogaster*. Zauważono, że komponenty szlaku miRNA, takie jak Dicer-1 oraz dFMRP (ang. *fragile X mental retardation protein*) mogą wpływać na ekspresję białek Oskar, Vasa oraz Nanos, które są kluczowymi składnikami plazmy biegunowej [51]. Późniejsza analiza defektów w wytwarzaniu komórek biegunowych wykazała, że miRNA, głównie miR-6 i miR-9, są kluczowymi regulatorami tego procesu [52].

Plazma płciowa u *D. rerio*, podobnie jak u muszki owocowej, występuje w ściśle określonym miejscu rozwijającego się zarodka. Co ważne, plazma płciowa i wchodzące w jej skład cząsteczki mRNA (np. *nanos*, *dead end*, *tdrd7*) są wysoce skoncentrowane w pewnych obszarach wczesnych zarodków, jednak znaczna ilość materiału nie jest tam umiejscowiona i występuje również w innych komórkach. Przykładem jest mRNA genu *nanos*, którego translacja jest mocno zahamowana w komórkach, które mają dać początek komórkom somatycznym [53]. Wraz z rozwojem zarodka, cząsteczki mRNA są preferencyjnie usuwane z niektórych miejsc, w wyniku czego dochodzi do ustanowienia profilu ekspresji charakterystycznego dla komórek prapłciowych.

Wykazano, że u podłoża mechanizmu odpowiedzialnego za somatyczne wyciszenie i degradację cząsteczek mRNA specyficznych dla komórek płciowych, leży cząsteczka miRNA 430 (miR-430), która kontroluje ekspresję genów *nanos* i *tdrd7* [54]. Cząsteczki miRNA kodowane przez klaster miR-430 bardzo licznie występują we wczesnych zarodkach *D. rerio* i są kluczowymi regulatorami przemian mRNA na etapie, gdy dochodzi do aktywacji genomu zygoty i degradacji matczynych transkryptów. Udział miRNA w degradacji matczynego mRNA wykazano w embrionach pozbawionych funkcjonalnego białka Dicer. Embriony te rozwijały się w sposób nieprawidłowy z powodu niewłaściwej ekspresji wielu mRNA [54]. Ponadto w embrionach tych mRNA, które normalnie są wyciszone i degradowane w komórkach somatycznych, a ulegają ekspresji w komórkach płciowych, zachowywały ekspresję w komórkach somatycznych. miRNA odpowiedzialne za somatyczne wyciszenie mRNA specyficznych dla komórek płciowych, są również obecne w komórkach rozrodczych [55], jednak ich funkcja w tych komórkach jest hamowana. Jednym z czynników, który inhibuje aktywność miRNA w komórkach płciowych *D. rerio* jest białko Dead end. Białko to wiąże się do regionów RNA bogatych w reszty urydyny występujących w regionach 3'UTR docelowych mRNA (m.in. *nanos*, *tdrd7* i *hub*), co hamuje wiązanie cząsteczek miRNA, jednakże dokładny mechanizm nie został jeszcze poznany [56]. Dodatkowo wykazano, że białko Dazl, poprzez stymulowanie wydłużania ogona poly(A), zwiększa efektywność translacji mRNA w komórkach linii płciowej i w ten sposób może przeciwdziałać deadenylacji, zachodzącej przy udziale miR-430 [57]. Dowiedziono również, że u *X. laevis* białka Hu mogą chronić mRNA komórek płciowych przed represją przebiegającą za pośrednictwem szlaku miRNA [58]. Powyższe obserwacje sugerują, że wiele białek współdziała, by zapewnić komórkom rozrodczym ekspresję kluczowych dla nich mRNA, pomimo jednoczesnej obecności miRNA w tych komórkach.

Zważywszy, że proces ten jest kontrolowany przy udziale podobnych mechanizmów u *C. elegans*, *D. melanogaster* i *X. laevis*, rola miRNA w usuwaniu transkryptów występujących w komórkach somatycznych i odziedziczonych matczyńnie wydaje się być konserwatywna. Co ciekawe, degradacja RNA na etapie aktywacji genomu zygoty i usuwania transkryptów matczynych, może być również kierowana przez inną grupę małych RNA, a mianowicie piRNA, jak wykazano dla mRNA genu *nanos* [59].

W przeciwieństwie do procesu specyfikacji komórek linii płciowej poprzez matczyńnie dziedziczną plazmę płciową u innych organizmów, takich jak płazy ogoniaste czy myszy, linia komórek płciowych różnicuje się w odpowiedzi na sygnały produkowane przez sam

zarodek [60]. Dwoma kluczowymi czynnikami zaangażowanymi w specyfikację komórek prądciniowych u myszy są regulatory transkrypcyjne PRDM1 i PRDM14, ulegające ekspresji w regionie, w którym powstają komórki prądciniowe. Ich ekspresja jest indukowana przez białko BMP, a eksperymenty wykazały, że pełnią one kluczową rolę w różnicowaniu komórek prądciniowych [61]. Stała ekspresja obydwu białek w komórkach linii płciowej pozwala na rozwój komórek prądciniowych poprzez zahamowanie genów charakterystycznych dla komórek somatycznych (np. genu *hox*). Dodatkowo, białko PRDM14 funkcjonuje, jako kluczowy regulator w ponownym nabywaniu pluripotencji i przeprogramowywaniu epigenetycznym genomu [18]. Podczas gdy PRDM1 pełni istotne funkcje w innych procesach, zachodzących w trakcie embriogenezy, embriony nieposiadające funkcjonalnego białka PRDM14 są nieplodne, ale zdolne do życia, co wskazuje na ich ściśle określoną rolę w rozwoju komórek płciowych [18].

Ekspresja PRDM14 jest indukowana przez BMP, a następnie podtrzymywana przez PRDM1 [61]. Co ciekawe, jak pierwotnie zidentyfikowano w przypadku ziarnicy złośliwej, ekspresja PRDM1 jest wygaszana przez miRNA *let-7*, który wiąże się w regionie 3'UTR mRNA genu *prdm1* [62]. Regulacja ta wymaga mechanizmu, który przeciwdziałałby inhibicji genu *prdm1* przy udziale *let-7* w rozwijających się komórkach płciowych. W mechanizm ten okazał się być zaangażowany regulator translacyjny LIN-28, po raz pierwszy zidentyfikowany u *C. elegans*. Moduluje on aktywność *let-7* poprzez bezpośrednie wiązanie do prekursora miRNA *let-7* (*pre-let-7*) [63]. W tym przypadku LIN-28 indukuje urydlację na końcu 3' pre-miRNA przy udziale poly(A) polimerazy, co inhibuje dalsze przetwarzanie *pre-let-7* przez enzym Dicer [64]. W związku z tym, białko LIN-28 zostało uznane za kluczowy element w rozwoju mysich komórek prądciniowych. Inhibicja jego aktywności w komórkach prądciniowych spowodowała utratę ekspresji PRDM1 i defekty w specyfikacji linii komórek płciowych. Podsumowując, LIN-28 uniemożliwia powstawanie dojrzałych cząsteczek *let-7*, dzięki czemu translacja mRNA genu *prdm1* nie jest blokowana na drodze zależnej od miRNA. Skutkiem tego jest trwała ekspresja genu i właściwe wytwarzanie komórek płciowych. Przedstawione wyżej wyniki badań pokazują, że kontrola nad procesem biogenezy miRNA może pełnić istotne funkcje w regulacji rozwoju komórek płciowych.

1.2.3. Rola miRNA w utrzymaniu i dojrzewaniu komórek macierzystych linii płciowej

Komórki prapłciowe często powstają w pewnej odległości od przyszłych gonad i muszą do nich migrować, aby tam zróżnicować się i utworzyć gamety. Po przybyciu do gonad, komórki linii płciowej oddziałują z komórkami somatycznymi, które wspomagają utrzymanie puli komórek GSC i regulują ich różnicowanie się do gamet. Jako że cząsteczki miRNA są niezbędne do prawidłowego rozwoju embrionalnego, do badań nad ich rolą w komórkach macierzystych linii płciowej wymagane są osobniki, u których aktywność enzymu Dicer wyeliminowano wyłącznie w tych komórkach. Takie eksperymenty przeprowadzone u muszki owocowej ujawniły rolę miRNA w kontrolowaniu podziałów komórek GSC. Wykazano, że miRNA poprzez hamowanie inhibitora cyklu komórkowego Dacapo (Dap), umożliwiają komórkom macierzystym przejście przez punkt kontrolny cyklu komórkowego G1/S, w którym podejmowana jest decyzja, czy komórki mają kontynuować podziały. Osobniki męskie i żeńskie posiadające zmutowany gen *dicer-1*, który jest kluczowy dla biogenezy miRNA, wykazywały wadliwą kontrolę cyklu komórkowego i dochodziło u nich do opóźnionego przechodzenia z fazy G1 do fazy S [65]. Późniejsze badania sugerują, że hamowanie aktywności Dap przy udziale miRNA takich jak miR-7, miR-278 i miR-309 zależy od insulinowego szlaku przekazywania sygnału, co stanowi przykład współpracy pomiędzy wewnętrznymi i zewnętrznymi szlakami sygnałowymi, w celu regulowania podziałów komórek GSC [66].

Poza udziałem w kontrolowaniu podziałów komórek macierzystych, aktywność Dicer-1 jest niezbędna do utrzymania populacji samoodnawiających się, niezróżnicowanych komórek macierzystych. Podobne defekty w utrzymaniu populacji komórek GSC zostały zaobserwowane u muszek owocowych posiadających mutacje w genach kodujących różne elementy szlaku miRNA, takie jak białka Ago1, Loquacious i dFMRP. Na przykład, białko wiążące RNA, dFMRP, będące składnikiem kompleksu miRISC i specyficznie oddziałujące z miRNA *bantam*, jest ważne w procesie samoodnawiania komórek macierzystych linii płciowej, wspomaganym przez komórki macierzyste linii somatycznej jajnika [67]. Przeciwnie, różnicowanie GSC może odbywać się poprzez hamowanie funkcji miRNA, tak jak jest w przypadku białka Maelstrom (Mael), które pierwotnie zostało zidentyfikowane u myszy, jako białko oddziałujące z Piwi i będące składnikiem ziaren komórek płciowych. Białko Mael hamuje transkrypcję miR-7, dzięki czemu możliwa jest prawidłowa translacja białka Bag-of-Marbles (Bam) będącego kluczowym inicjatorem gametogenezy [68].

Podobnie białko Vasa, które jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju komórek płciowych, inhibuje funkcjonowanie miRNA poprzez wiązanie do mRNA *mei-P26* i aktywowanie translacji białka Mei-P26. Białko to oddziałuje z Ago1 w sposób negatywny regulując jego aktywność, co prowadzi do zahamowania szlaku miRNA [69]. Podsumowując, miRNA są ważne dla pobudzania podziałów komórek macierzystych linii płciowej i utrzymania ich pluripotentnego stanu oraz hamowania ich przedwczesnego różnicowania do gamet. Zatem prawidłowe różnicowanie komórek płciowych zależy od mechanizmów, które hamują aktywność miRNA.

1.2.4. Rola miRNA w różnicowaniu komórek płciowych – oogeneza

Cząsteczki miRNA biorą udział w hamowaniu różnicowania komórek macierzystych linii płciowej. Jednakże badania przeprowadzone u muszki owocowej wykazały, że wysoce konserwatywny miR-184 ulega ekspresji w żeńskich komórkach płciowych i pobudza różne etapy różnicowania podczas oogenezy oraz wczesnej embriogenezy. miR-184 kontroluje różnicowanie komórek GSC poprzez regulowanie poziomu receptora Saxophone (Sax). Receptor ten za pośrednictwem białka Dpp odbiera sygnały pochodzące z komórek niszowych, co prowadzi do supresji białka Bam [7, 70]. Zatem represja receptora Sax przy udziale miR-184 prowadzi do stłumienia sygnałów przekazywanych przez Dpp, co powoduje zwiększenie poziomu Bam i aktywację różnicowania GSC. Dodatkowo miR-184 ma wpływ na wyznaczenie osi grzbietowo-brzuszej i przednio-tylnej oocytu oraz embrionu poprzez regulowanie, odpowiednio, transportu białka Gurken oraz represora transkrypcyjnego Tramtrack69 [70].

Podczas gdy aktywność Dicer wydaje się być kluczowa dla rozwoju komórek płciowych u niektórych gatunków, nie jest ona konieczna w przypadku *D. rerio*, u którego komórki rozrodcze pozbawione genu *dicer* przekształcają się w dojrzałe komórki płciowe – plemniki i oocyty [71]. Zjawisko to jednak wciąż wymaga dokładnego wyjaśnienia.

1.2.5. Rola miRNA w różnicowaniu komórek płciowych – spermatogeneza

Badania ekspresji miRNA wykazały, że cząsteczki te są obecne w jądrach myszy oraz, że ich liczba w trakcie trwania spermatogenezy zmienia się. Kluczowe składniki szlaku miRNA, takie jak Dicer, Ago1, Drosha oraz występujące w jądrach miRNA są zlokalizowane w ciele chromatoidalnym (ang. *chromatoid body*). Jest to struktura specyficzna dla komórek

płciowych, w której odbywa się przetwarzanie RNA [72]. Obniżenie aktywności Dicer w mysich komórkach prapłciowych powoduje niewłaściwą proliferację komórek rozrodczych i anormalne różnicowanie spermatogonii, co skutkuje nieprawidłową morfologią spermatyd oraz powstaniem plemników z osłabioną ruchliwością [48]. Fenotypy te mogłyby również wskazywać na rolę endo-siRNA w spermatogenezie, gdyż ich biogeneza również zależy od enzymu Dicer, jednakże w tym przypadku wykazano działanie miRNA. Co ciekawe, pomimo globalnego mejotycznego transkrypcyjnego wyciszania genów zlokalizowanych na chromosomie X, wiele genów miRNA znajdujących się na tym chromosomie jest transkrybowanych w spermatocytach podczas mejozy [73]. Przykładem miRNA, które pełni specyficzną funkcję podczas spermatogenezy jest np. klaster miR-17-92. Wykazano, że hamuje on translację czynnika transkrypcyjnego E2F1, przez co chroni komórki, będące w trakcie mejozy, przed apoptozą [74]. Podobnie sugeruje się, że miRNA 122a ulega ekspresji głównie w komórkach płciowych będących na późnym etapie rozwoju, w których to hamuje specyficzne RNA pojawiające się podczas spermatogenezy [75].

1.2.6. Rola miRNA w różnicowaniu płci

Na podstawie analizy ekspresji miRNA w mysich komórkach prapłciowych zasugerowano, że cząsteczki te zaangażowane są w różnicowanie komórek płciowych w zależności od płci. Badania wykazały odmienną ekspresję miRNA w męskich i żeńskich komórkach prapłciowych. Zróżnicowana ekspresja została wykryta dla *let-7*, miR-125a, miR-9 oraz miR-29b [48]. Jednakże funkcjonalne znaczenie różnic w ekspresji poszczególnych cząsteczek miRNA wymaga dalszych wyjaśnień. Represja genów *dnmt3a* i *dnmt3b* (ang. *de novo methyl transferase 3a* i *b*) przez miR-29b u osobników żeńskich powoduje, że w komórkach macierzystych linii płciowej nie dochodzi do metylacji genomu, w przeciwieństwie do komórek męskich, w których proces ten jest obserwowany w 15. dniu embriogenezy [76]. Obserwacje te dostarczają wstępnych sugestii na temat możliwej roli, jaką odgrywają cząsteczki miRNA w determinacji i różnicowaniu płci.

1.2.7. Rola miRNA w komórkach somatycznych gonad

Właściwy rozwój komórek macierzystych linii płciowej zależy od sygnałów dostarczanych przez otaczające je komórki somatyczne gonad, które regulują podziały komórkowe, samoodnawianie i różnicowanie komórek. Zatem regulacja ekspresji genów

w komórkach somatycznych poprzez miRNA, wpływa na utrzymanie populacji komórek macierzystych linii płciowej oraz ich różnicowanie.

Jak wspomniano wcześniej, brak genu *dicer-1* w komórkach macierzystych linii płciowej u muszki owocowej, powoduje zaburzenia w utrzymaniu ich populacji, na skutek błędów w cyklu komórkowym i procesie samoodnawiania [65, 77]. Ponadto brak enzymu Dicer-1 w somatycznych komórkach macierzystych jajnika wskazuje na jego funkcję również w tej populacji komórek. Podobnie jak w przypadku komórek macierzystych linii płciowej, również somatyczne komórki macierzyste nieposiadające Dicer-1 nie wykazują zdolności do samoodnawiania się, co prowadzi do zmniejszenia ich liczby oraz przedwczesnego różnicowania, co z kolei powoduje defekty w proliferacji i wzroście komórek pęcherzykowych [77]. Osobniki posiadające zmutowane geny *loqs* i *ago1*, których produkty białkowe biorą udział w szlaku miRNA, wykazują niewłaściwie rozwinięte gonady żeńskie [78]. Przykładem genu regulowanego przez miRNA w komórkach somatycznych jajnika jest *notch*. Wykazano, że białko Belle, będące komponentem szlaku miRNA reguluje moment aktywności białka Notch w komórkach pęcherzykowych. Utrata białka Belle opóźnia aktywację Notch, przez co następuje opóźnienie procesu różnicowania pęcherzyka jajnikowego, co z kolei wpływa na cykl komórkowy i dojrzewanie komórek macierzystych linii płciowej [79].

Funkcja miRNA w komórkach somatycznych gonad została wykazana u samców myszy, u których rozwój komórek Sertoliego ściśle kontrolujących proces spermatogenezy, zależy od regulacji na poziomie miRNA. Selektywne usunięcie genu *dicer* w tych komórkach uszkadza ich dojrzewanie, co prowadzi do całkowitego braku plemników i stopniowej degeneracji jąder. Podobnie rozwój komórek somatycznych u samic myszy również zależy od regulacji na drodze miRNA. W tym przypadku to somatyczne komórki warstwy ziarnistej, które otaczają rozwijający się oocyt i podtrzymują jego rozwój, wymagają aktywności Dicer. Usunięcie genu *dicer* z komórek warstwy ziarnistej prowadzi do degeneracji pęcherzyków jajnikowych. Efekt ten wynika z przedwczesnego rozpoczęcia folikulogenezy spowodowanego brakiem miR-503, który zazwyczaj precyzyjnie reguluje poziom cykliny D2, będącej ważnym regulatorem proliferacji komórek podczas folikulogenezy [80]. Co więcej, brak genu *dicer* w komórkach somatycznych gonad również wpływa na rozwój somatycznych tkanek rozrodczych, co skutkuje błędami w owulacji, migracji oocytów z jajowodów do macicy oraz ich implantacji [81]. Badania te sugerują, że aktywność Dicer jest kluczowa dla prawidłowego przebiegu spermatogenezy oraz właściwego rozwoju

jajników i macicy, a także odgrywa rolę w regulacji folikulogenezy poprzez utrzymywanie komunikacji między komórkami rozrodczymi, a somatycznymi w gonadach.

1.2.8. miRNA i hormonalna regulacja gametogenezy

Podczas oogenezy i spermatogenezy kluczowymi regulatorami są czynniki, takie jak hormony gonadotropowe FSH i LH oraz hormony steroidowe (estrogen, progesteron i androgeny). Wykazano, że miR-132 i miR-212 pełnią ważną rolę w odpowiedzi na sygnały przekazywane przez te hormony [82]. Na przykład hormon LH pobudza szlak sygnałowy cAMP, który z kolei aktywuje białko CREB (ang. *cAMP response element binding*) będące represorem transkrypcji miR-132 i miR-212 w komórkach warstwy ziarnistej [82]. Co ciekawe, poziom ekspresji miRNA może z kolei wpływać na sekrecję hormonów steroidowych w pierwotnych komórkach warstwy ziarnistej u człowieka [83]. Podobnie spermatogeneza pozostaje pod ścisłą kontrolą FSH i androgenów, które regulują poziom transkrypcji miRNA w komórkach Sertoliego [84]. Zatem hormony, takie jak LH i FSH mogą kontrolować transkrypcję specyficznych miRNA, które z kolei mogą modulować produkcję hormonów steroidowych w ten sposób kontrolując gametogenezę.

1.3. piRNA w rozwoju komórek płciowych

1.3.1. Elementy ruchome w genomie

Genomowy DNA stale podlega różnym zmianom i modyfikacjom. Fizyczne i chemiczne czynniki takie jak: stres oksydacyjny, naturalne promieniowanie jonizujące czy reagenty genotoksyczne prowadzą do oksydacji, hydrolizy oraz alkilacji DNA. Szacuje się, że u ssaków liczba uszkodzeń cząsteczek DNA w jednej komórce w ciągu dnia jest większa niż tysiące [85]. Organizmy, aby przeciwdziałać tym uszkodzeniom, wykształciły wiele systemów naprawy DNA takich jak: naprawa przez wycinanie zasady i nukleotydu, naprawa rekombinacyjna oraz łączenie niehomologicznych zakończeń, które współdziałają, by uniknąć komórkowej katastrofy.

Jednakże poza czynnikami fizyko-chemicznymi atakującymi DNA, genom jest narażony na inne poważne biologiczne zagrożenia występujące w samym genomie, a mianowicie elementy ruchome, głównie transpozony. Transpozony są sekwencjami genetycznymi, które samodzielnie amplifikują i poruszają się w obrębie genomu, przez

co mogą zmieniać informację genetyczną [86]. W przeciwieństwie do strukturalnych uszkodzeń fizyko-chemicznych, transpozony nie pozostawiają wyraźnych chemicznych znaczników uszkodzenia, które mogą być rozpoznane przez białka systemu naprawy DNA. Zatem genom gospodarza musi rozróżnić sekwencje transpozonów, by kontrolować ich pasożytniczą aktywność. Powszechnym sposobem rozpoznawania specyficznych sekwencji jest wykorzystanie białek wiążących DNA i RNA, czego przykładem są czynniki transkrypcyjne. W mysich embrionalnych komórkach macierzystych kompleks białkowy KAP1/TRIM28 rozpoznaje klasę promotorów retrotranspozonów i hamuje ich aktywność [87]. Jednakże w sekwencjach transpozonów, a zwłaszcza występujących w postaci RNA, retrotranspozonów, w porównaniu do sekwencji genów kodujących białka, szybko dochodzi do mutacji. W związku z tym sekwencje elementów repetytywnych w komórce mogą być bardziej różnorodne niż rozpoznające je białka, kodowane przez genom. Innym bardziej adaptacyjnym sposobem rozpoznawania specyficznych sekwencji jest zjawisko interferencji RNA oraz powiązane z nim procesy. Zjawisko to wykorzystuje małe niekodujące RNA, by naprowadzić białka należące do rodziny Argonaute lub związane z nimi kompleksy, celem przecięcia lub translacyjnego wyciszenia docelowych cząsteczek RNA, bądź zmodyfikowania komplementarnych loci DNA [88]. Białka Argonaute oddziałujące z miRNA lub siRNA są szeroko rozpowszechnione w organizmach eukariotycznych. Poprzez kontrolowanie stabilności lub aktywności translacyjnej endogennych mRNA lub sekwencji obcych, regulują one różnorakie procesy komórkowe i rozwojowe. Takie działanie procesu RNAi prawdopodobnie wywodzi się z dawnej odpowiedzi obronnej na dwuniciowe cząsteczki RNA pochodzące z transpozonów, wirusów i sekwencji repetytywnych, w której uczestniczy inny wyspecjalizowany mechanizm RNAi, zwany szlakiem Piwi. Jego rolą jest wyciszenie retrotranspozonów w komórkach płciowych zwierząt [89]. W szlaku tym białka Piwi, należące do rodziny Argonaute, oddziałują z piRNA [90-93] w celu kontrolowania retrotranspozonów zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i potranskrypcyjnym. Co ciekawe geny, o których przez długi czas uważano, że uczestniczą w specyfikacji i różnicowaniu komórek płciowych, odgrywają kluczową rolę w szlaku Piwi [94-97]. A zatem kontrola transpozonów jest ściśle związana z prawidłowym rozwojem komórek rozrodczych, a genom gospodarza wyposażył się w olbrzymie środki, by uchronić swoją informację genetyczną w komórkach płciowych.

U ssaków transpozony i ich pozostałości zajmują około połowę genomu (u człowieka w przybliżeniu 45%, u myszy 37%) w odróżnieniu od sekwencji egzonów kodujących białka,

zajmujących 1-2% genomu [98]. Pomimo że większość z tych elementów ruchomych jest nieaktywna na skutek mutacji i skrócenia długości, niektóre z nich pozostają aktywne i wciąż rozprzestrzeniają się, tworząc nowe kopie w genomie. Transpozony podzielone na dwie klasy w zależności od sposobu przemieszczania się i amplifikowania. Transpozony DNA przemieszczają się poprzez wycinanie z pierwotnego położenia, a następnie „wklejanie się” w nowe miejsce z udziałem transpozazy i białek systemu naprawy. Zajmują one około 2-3% genomu ssaków, ale wszystkie kopie, z pojedynczymi wyjątkami, są nieaktywne z powodu nagromadzenia mutacji [98]. Druga klasa transpozonów, retrotranspozony, amplifikuje poprzez cząsteczki RNA transkrybowane z genomowego locus, które następnie są odwrotnie transkrybowane do DNA i „wklejane” do nowego miejsca w genomie. Retrotranspozony są podzielone na podstawie struktury na trzy główne podklasy: zawierające na obu końcach długie powtórzone sekwencje nukleotydów (LTR, ang. *long terminal repeats*), nieposiadające sekwencji LTR długie rozproszone elementy (LINE, ang. *long interspersed nuclear elements*), nieposiadające sekwencji LTR krótkie rozproszone elementy (SINE, ang. *short interspersed nuclear elements*) [99]. Retrotranspozony LTR są podobne do retrowirusów i zajmują około 8-10% genomu ssaków. U człowieka są w większości nieaktywne, podczas gdy mysz genom zawiera aktywne kopie, jak na przykład retrotranspozon IAP (ang. *intracisternal A particle*) [100]. Retrotranspozony LINE są to najliczniej występujące w genomie ssaków elementy repetytywne. Najpowszechniejszy typ, L1, jest obecny w ponad 500 000 kopii, obejmując w przybliżeniu 20% ludzkiego i mysiego genomu. Spośród nich w genomie człowieka występuje około 100 kopii pełnej długości aktywnego elementu L1 i około 300 kopii w genomie myszy [86]. Retrotranspozony SINE są krótkie (kilkaset par zasad w porównaniu do retrotranspozonów LTR oraz LINE o długości 5000 – 10000 par zasad) i nie kodują funkcjonalnych białek, a zatem nie mogą samodzielnie przemieszczać się w obrębie genomu. Najpowszechniejszym retrotranspozonom SINE u człowieka jest sekwencja Alu, która stanowi około 10% genomu, podczas gdy elementy B1 i B2 są najbardziej rozpowszechnionymi transpozonomi SINE u myszy, a każdy z nich zajmuje 2-3% genomu.

Spośród tych trzech klas retrotranspozonów, LINE i SINE najaktywniej rozprzestrzeniają się w genomach ssaków. U człowieka przynajmniej jeden osobnik na pięćdziesiąt posiada nową kopię L1, podczas gdy jeden na trzydzieści zawiera nową transpozycję elementu Alu. Szacuje się, że u myszy te wartości są wyższe, a nowe insercje transpozonów są głównym źródłem spontanicznych zmian fenotypowych u spokrewnionych

osobników [86, 100]. Oczywiście transpozony rozprzestrzeniają się w populacji poprzez swoją aktywność w komórkach linii płciowej, zarówno wczesnych komórkach pluripotencjalnych, jak i płciowo zdeterminowanych komórkach rozrodczych. Faktycznie poza kilkoma somatycznymi liniami komórkowymi i niektórymi komórkami nowotworowymi, retrotranspozony ulegają ekspresji zarówno we wczesnych zarodkach, jak i komórkach płciowych [32]. Niewiadomo dokładnie, w jaki sposób retrotranspozony są aktywnie transkrybowane, zwłaszcza w komórkach płciowych, ale do regulacji ekspresji LINE1 wykorzystują one elementy komórkowej maszyny transkrypcyjnej, takie jak polimerazę RNA II oraz czynniki transkrypcyjne (YY1, SOX2, SOX11, RUNX3) [101].

Organizmy wykorzystują różne molekularne mechanizmy obronne, by zwalczać aktywność transpozonów. U ssaków kluczowym mechanizmem jest epigenetyczna metylacja genomowego DNA. Metylotransferaza DNA, DNMT1, uczestniczy w hamowaniu transpozonów i nie dopuszcza do letalności embrionów, podczas gdy inna metylaza, DNMT3L, pełni bardziej specyficzną rolę w regulacji retrotranspozonów w komórkach płciowych [98]. Również modyfikacja histonów pełni istotną funkcję w epigenetycznym wyciszaniu transpozonów, jak wykazano dla *Setdb1/Eset* i H3K9 w mysich embrionalnych komórkach macierzystych [87]. Oprócz mechanizmów regulacji epigenetycznej, transkrypty transpozonów, po tym jak ulegną ekspresji, stanowią cel dla mechanizmu RNAi. W komórkach płciowych w szczególności funkcjonuje system oparty na białkach Piwi i cząsteczkach piRNA. Pełni on kluczową rolę w ochronie ich stabilności genomowej oraz utrzymaniu sprawności rozrodczej organizmu.

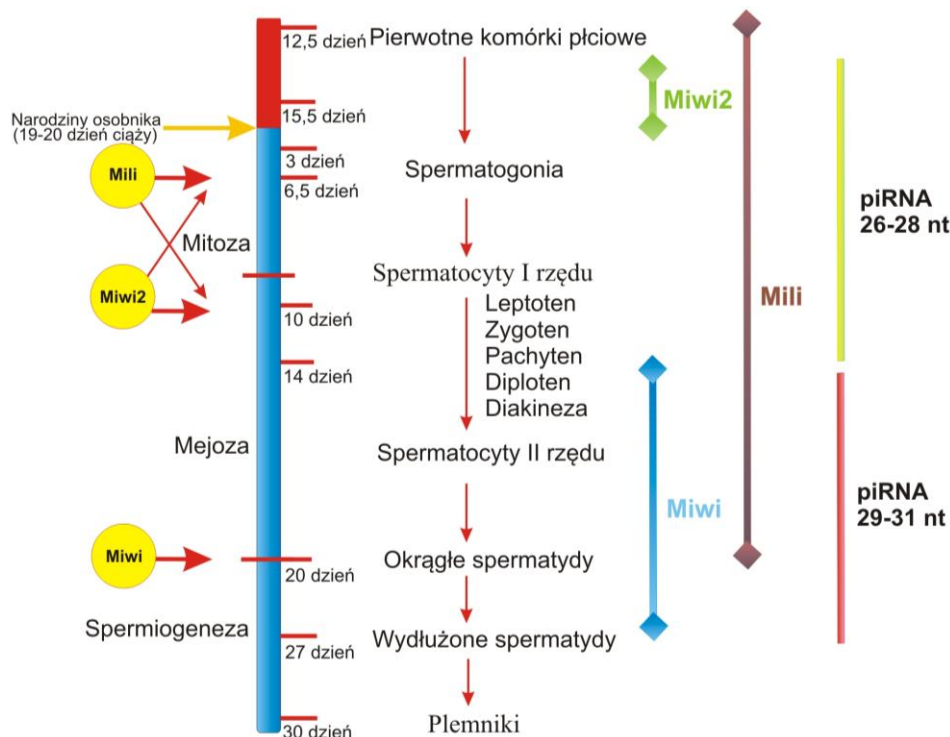
1.3.2. Biogeneza i funkcja piRNA

Białko Piwi, które po raz pierwszy zostało zidentyfikowane u *D. melanogaster*, pełni istotną funkcję w utrzymaniu płodności organizmu. U osobników męskich zaobserwowano, że utrata jego funkcji powiązana jest z ciężkimi defektami procesu spermatogenezy, z czego wywodzi się nazwa genu *piwi* (ang. *P-element induced wimpy testis*) [102]. U *D. melanogaster* występują trzy białka należące do podrodziny Piwi: Piwi, Aubergine (Aub) oraz Argonaute 3 (Ago3). Również u ssaków zidentyfikowano trzy homologii białka Piwi: Piwil1, Piwil2 oraz Piwil4, będące produktami ekspresji genów *Piwil1*, *Piwil2* oraz *Piwil4*, niezbędne dla prawidłowego przebiegu procesu spermatogenezy [103-105]. W literaturze często używa się nazw historycznych odpowiednio Miwi, Mili i Miwi2 dla

mysich oraz HIWI, HILI i HIWI2 dla ludzkich białek Piwil1, Piwil2 oraz Piwil4. Wykazano, że małe RNA, które oddziałują i funkcjonują w połączeniu z białkami Piwi, nazwane piRNA, ulegają ekspresji i pełnią swoją rolę głównie w komórkach płciowych [90-92].

piRNA powstają z jednoniciowych prekursorów bez udziału rybonukleazy Dicer, która jest niezbędna w procesie biogenezy siRNA i miRNA [106, 107]. Cząsteczki te tworzą kompleksy z białkami Piwi, należącymi do rodziny białek Argonaute, a ich długość to około 24-32 nt. Sekwencje piRNA występują w genomie w postaci klastrów, które często mapują do regionów repetytywnych [106]. Klastry te zawierają od kilku do kilku tysięcy piRNA, co daje sekwencje o długości nawet do 100.000 par zasad, składające się głównie z sekwencji różnych transpozonów. Dlatego piRNA, zwłaszcza te pojawiające się w komórkach myszy przed fazą pachytenu profazy pierwszego podziału mejotycznego podczas spermatogenezy oraz piRNA występujące w gonadach *D. melanogaster*, są bogate w sekwencje ruchomych elementów genetycznych. Większość tych małych RNA wykazuje orientację antysensową w stosunku do transkryptów transpozonów i poprzez hybrydyzację może indukować ich wyciszenie [108]. Mutacje powodujące utratę funkcji piRNA i ich kofaktorów – białek Piwi – powodują aktywację transpozonów, co umożliwia im przemieszczanie się w obrębie genomu i wbudowywanie swoich kopii w przypadkowe miejsca. Prowadzi to do aktywacji punktu kontrolnego uszkodzenia DNA, zależnego od kinazy Chk2, co skutkuje błędnym rozwojem gonad, często prowadzącym do bezpłodności [109].

piRNA występujące u myszy można podzielić na dwie podklasy różniące się sposobem regulacji oraz długością – piRNA powstające przed fazą pachytenu profazy pierwszego podziału mejotycznego, o długości 26-28 nt (pre-pachytenowe piRNA) oraz piRNA powstające po fazie pachytenu, o długości 29-31 nt (pachytenowe piRNA) [110]. Pre-pachytenowe piRNA ulegają ekspresji w spermatogoniach, przed rozpoczęciem mejozy i zanikają wraz z wejściem komórek w fazę pachytenu. Synteza pachytenowych piRNA zachodzi natomiast w trakcie mejozy. Występują one w spermatocytach I rzędu wchodzących w fazę pachytenu, a ich ilość zmniejsza się, gdy komórki osiągną stadium haploidalnej okrągłej spermatydy. Podczas gdy pachytenowe piRNA oddziałują z mysimi białkami Miwi i Mili, to pre-pachytenowe piRNA preferencyjnie tworzą kompleksy z białkami Mili i Miwi2 (Rys. 3). Jeśli chodzi o funkcje obydwu klas, to sugeruje się, że pre-pachytenowe piRNA kontrolują elementy ruchome genomu, gdyż ich sekwencje są bogate w sekwencje elementów repetytywnych. Biologiczna funkcja pachytenowych piRNA nie została jeszcze wyjaśniona [106, 110, 111].



Rysunek 3. Ekspresja piRNA i białek Piwi podczas spermatogenezy u myszy. Po lewej stronie kolorem czerwonym oznaczono prenatalny okres życia osobnika oraz dzień narodzin, natomiast kolorem niebieskim okres od narodzin do osiągnięcia dojrzałości płciowej. Na schemacie wyróżniono poszczególne stadia spermatogenezy. Zarówno intensywne podziały mitotyczne spermatogonii, jak i wytwarzanie plemników zachodzą przez całe życie osobnika. Kolorem żółtym oznaczono moment zatrzymania spermatogenezy w przypadku mutacji poszczególnych białek Piwi. Po prawej stronie z kolei zaznaczono ekspresję białek Miwi, Mili i Miwi2 oraz dwóch populacji piRNA na poszczególnych etapach spermatogenezy.

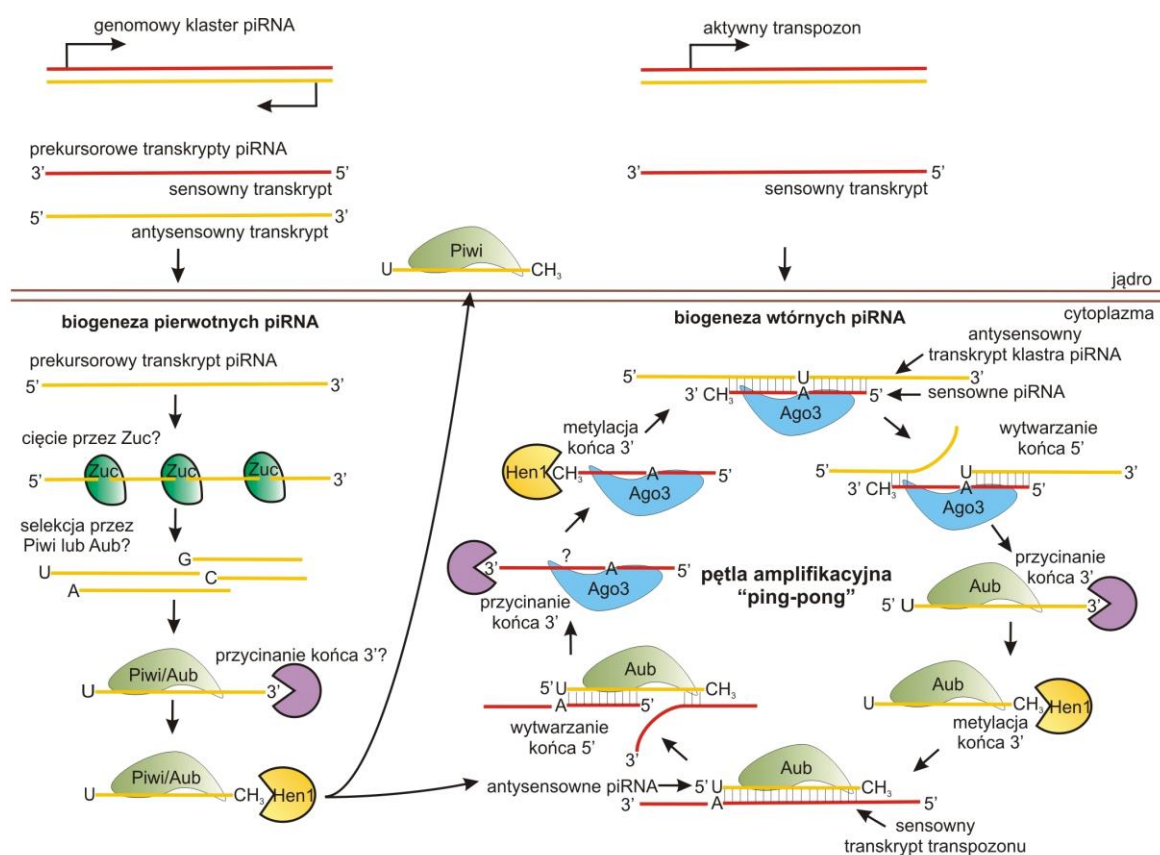
Obszerna analiza populacji piRNA, pochodzących z gonad różnych zwierząt zarówno zdrowych, jak i posiadających mutacje zaburzające przebieg gametogenezy, doprowadziła do wyodrębnienia dwóch szlaków biogenezy piRNA: szlaku pierwszorzędowego oraz drugorzędowej pętli amplifikacyjnej „ping-pong”. Jednakże mechanizmy leżące u ich podstaw pozostają w dużej mierze nieznane. Jednym z powodów jest ograniczenie obszaru występowania piRNA do tkanek rozrodczych.

Transkrypty powstające z klastrów piRNA są przetwarzane do pierwotnych cząsteczek piRNA, które następnie tworzą kompleksy z białkami Piwi (Rys. 4). Czynniki zaangażowane w transkrypcję, a także sposób regulacji całego procesu, pozostają nieznane. Obecnie sugeruje się, że koniec 5' cząsteczki piRNA zostaje ustalony zanim cząsteczka ta zwiąże się z białkiem

Piwi. Jednakże na końcu 3' znajdują się dodatkowe nukleotydy, które po związaniu piRNA z białkiem Piwi muszą zostać usunięte [112]. Podczas tego etapu zostaje zdeterminowana długość dojrzałej cząsteczki piRNA, która zależy głównie od wielkości białek Piwi. Dlatego piRNA wiążące się z poszczególnymi białkami Piwi wykazują różną długość. Czynniki odpowiedzialny za skrócenie cząsteczki piRNA z końca 3' pozostaje jak dotychczas nieznanymi. Następnie koniec 3' ulega 2'-O-metylacji przy udziale metylotransferazy Pimet będącej homologiem, występującej u roślin, metylotransferazy Hen1 [113]. Modyfikacja ta zwiększa stabilność cząsteczek piRNA *in vivo* [114]. Tylko wybrane białka Piwi tworzą kompleksy z pierwszorzędowymi piRNA. Muszka owocowa posiada trzy białka Piwi, z których tylko Aubergine (Aub) oraz Piwi, ale nie Ago3, oddziałują z pierwotnymi piRNA. U myszy, spośród trzech białek Piwi, Miwi i Mili asocjują z pierwszorzędowymi piRNA, podczas gdy Miwi2 oddziałuje głównie z drugorzędowymi piRNA, podobnie jak Ago3 u muszki owocowej [115].

Pierwszorzędowe piRNA są następnie poddawane amplifikacji celem zwiększenia ich zawartości w komórkach płciowych. Proces ten nazwano pętlą amplifikacyjną ping-pong (Rys. 4) [106, 116]. Białka Aub u muszki owocowej oraz Mili u myszy, tworzące kompleksy z pierwszorzędowymi piRNA, przecinają docelowy RNA dzięki swojej aktywności endonukleazowej [116]. W procesie tym zostaje określony koniec 5' drugorzędowych piRNA. U muszki owocowej piRNA dziedziczone w linii żeńskiej, mogą również inicjować zajście cyklu „ping-pong”, podobnie jak pierwszorzędowe piRNA [117]. Produkty cięcia są następnie przenoszone na inne białka Piwi, Ago3 u muszki owocowej oraz Miwi2 u myszy i przycinane na końcu 3', co skutkuje powstaniem dojrzałych drugorzędowych cząsteczek piRNA. Następnie u muszki owocowej, białko Ago3 związane z drugorzędowym piRNA przecina docelowy RNA, co prowadzi do wytworzenia kolejnych drugorzędowych piRNA, tworzących kompleksy z białkiem Aub [106, 116]. Wzajemne działanie obydwu białek wykazujących aktywność endonukleolityczną zapewnia nieustanne funkcjonowanie pętli amplifikacyjnej u *D. melanogaster* (Rys. 4). Natomiast białko Piwi po związaniu z pierwszorzędowymi piRNA jest transportowane do jądra, dlatego w bardzo małym stopniu przyczynia się ono do produkcji drugorzędowych piRNA w cyklu „ping-pong” [118]. Białko to ulega ekspresji w komórkach somatycznych gonad muszki owocowej, gdzie także oddziałuje z pierwszorzędowymi piRNA. Jednakże ekspresja białek Aub i Ago3 w tych komórkach jest zbyt niska, by pętla amplifikacyjna mogła sprawnie funkcjonować. Dlatego

mechanizm biogenezy piRNA w komórkach somatycznych jajnika jest prawdopodobnie inny niż w komórkach płciowych.

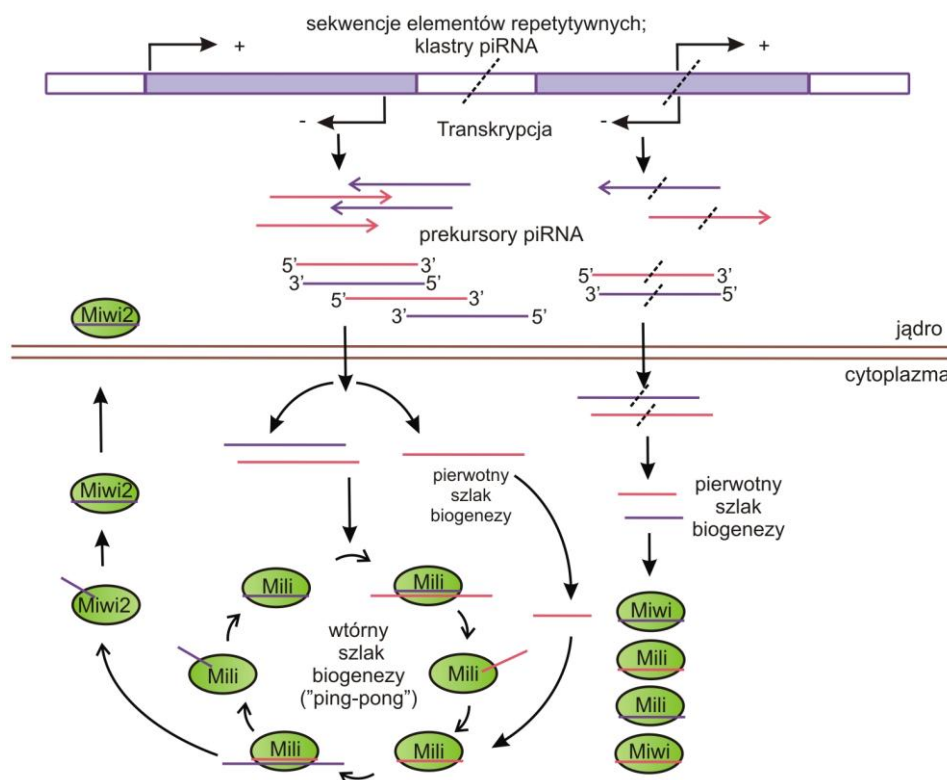


Rysunek 4. Biogeneza pierwszorzędowych i drugorzędowych piRNA u *D. melanogaster*. W pierwotnym szlaku biogenezy, prekursorowe, antysensowne transkrypty piRNA są przecinane prawdopodobnie przez endonukleazę Zucchini (Zuc), a powstałe fragmenty łączą się z białkami Piwi lub Aub. Na tym etapie preferencyjnie wybierane są fragmenty posiadające na końcu 5' resztę U. Po związaniu z białkami cząsteczki RNA są skracane z końca 3' przez nieznaną enzym, po czym metylowane przy udziale Hen1. Następnie pierwotne piRNA oddziałujące z Aub zostają włączone do wtórnego szlaku biogenezy zwanego pętlą amplifikacyjną ping-pong, natomiast kompleksy piRNA-Piwi są transportowane do jądra i nie biorą udziału w cyklu amplifikacyjnym. Białko Aub rozpoznaje i przecina komplementarny do cząsteczki piRNA transkrypt transpozonu, co prowadzi do wytworzenia wtórnych cząsteczek piRNA oddziałujących z Ago3. Z kolei kompleksy piRNA-Ago3 poprzez przecinanie antysensownych transkryptów produkują nowe piRNA, które łączą się z Aub i biorą udział w wyciszaniu mRNA transpozonów, tworząc tym samym pętlę amplifikacyjną.

Podobnie jak w przypadku białka Piwi u muszki owocowej, mysie białko Miwi2 po utworzeniu kompleksów z drugorzędowymi piRNA jest transportowane do jądra (Rys. 5). Dlatego też Miwi2 prawdopodobnie nie bierze udziału w wytwarzaniu drugorzędowych piRNA na drodze cyklu „ping-pong”. Zatem uważa się, że szlak, podczas którego dochodzi do utworzenia kompleksów Miwi2-piRNA, jest szlakiem „jednokierunkowej” biogenezy drugorzędowych piRNA [111, 119]. Istnieją jednak dowody popierające opinię, że w komórkach płciowych myszy kompleksy Mili-piRNA mogą tworzyć cykl „ping-pong”, w którym uczestniczy wyłącznie białko Mili, tzw. cykl homotypowy (Rys. 5) [119]. Białko Miwi oddziałuje z piRNA, których ekspresja rozpoczyna się w fazie pachytenu profazy pierwszego podziału mejotycznego. Ta frakcja piRNA jest również w bardzo małym stopniu zaangażowane w przebieg pętli amplifikacyjnej [120].

Ponieważ przebieg pętli amplifikacyjnej zależy od aktywności nukleolitycznej białek Piwi, drugorzędowe piRNA asocjujące z białkami Aub u muszki owocowej i Mili u myszy wykazują komplementarność w stosunku do piRNA oddziałujących odpowiednio z Ago3 (u muszki owocowej) i Miwi2 (u myszy). Komplementarność ta jest całkowita i dotyczy pierwszych 10 zasad od końca 5' cząsteczek. Dodatkowo kompleksy Aub-piRNA wykazują silną tendencję do posiadania reszty uracylu na końcu 5' (1U), a kompleksy Ago3-piRNA mają tendencję do posiadania reszty adeniny w pozycji dziesiątej od końca 5' (10A). Są to typowe cechy cząsteczek piRNA, których powstawanie przebiega na drodze cyklu „ping-pong” lub na drodze „jednokierunkowej” biogenezy drugorzędowych piRNA [106, 116].

Podczas cyklu amplifikacyjnego „ping-pong” transkrypty transpozonów są przecinane przez kompleksy piRISC. Oznacza to, że cykl ten spełnia jednocześnie dwa zadania, a mianowicie produkuje drugorzędowe piRNA i wycisza transpozony, poprzez przecinanie ich transkryptów. U myszy pierwszorzędowe piRNA oddziałujące z Mili wykazują głównie orientację sensową w stosunku do transkryptów transpozonów, co uniemożliwia im hybrydyzację do nich. Jądrowe białko Miwi2 tworzy kompleksy z antysensowymi piRNA, dzięki czemu może indukować wyciszenie transpozonów niezależnie od tego, czy celem są bezpośrednio genomowe loci transpozonów, czy RNA transkrybowane z tych loci. Białka Miwi2 oraz Mili powiązane także z procesem metylacji DNA docelowych genów [111]. Jednakże mechanizm molekularny leżący u podstaw tego procesu pozostaje wciąż niejasny.



Rysunek 5. Biogeneza piRNA u myszy. Pierwotne piRNA powstają z jednoniciowych prekursorów transkrybowanych z sekwencji elementów repetytywnych, bądź klastrów piRNA i oddziałują z białkami Mili i Miwi. Miwi poprzez wytwarzanie kompleksów z frakcją piRNA powstającą po fazie pachytenu bierze udział w cytoplazmatycznym wyciszaniu genów, jednak sekwencje docelowe dla tych kompleksów są mało poznane. Białko Mili oddziałujące z pierwotnymi piRNA przecina antysensowne transkrypty, wytwarzając wtórne cząsteczki piRNA, wiążące się z Miwi2. Kompleksy Miwi2-piRNA są transportowane do jądra, gdzie uczestniczą w metylacji de novo sekwencji transpozonów. Natomiast białko Mili uczestniczy w homotypowym cyklu „ping-pong”.

1.3.3. Udział piRNA w obronie genomu

Do tej pory dowiedziono, że piRNA występujące u ssaków i organizmów niższych są zaangażowane w rozwój męskich komórek płciowych, poprzez regulację epigenetyczną oraz represję transpozonów [98]. Rola piRNA w obronie genomu i kontrolowaniu elementów ruchomych została udowodniona u muszki owocowej, nicieni oraz w zarodkach myszy [37, 111, 115]. Ekspresja transpozonów jest kontrolowana na poziomie transkrypcyjnym poprzez metylację DNA oraz wytwarzanie heterochromatyny, a także potranskrypcyjnie przy udziale małych RNA. Męskie komórki płciowe myszy są narażone na atak transpozonów podczas przeprogramowania epigenetycznego odbywającego się w życiu płodowym, co prowadzi do chwilowego uwolnienia transpozonów spod kontroli epigenetycznej. Dlatego

w komórkach rozrodczych rozwinęła się dodatkowa strategia wyciszania transpozonów i utrzymania integralności genomu, i wydaje się, że to właśnie maszyna piRNA w znaczny sposób przyczynia się do obrony genomu. Wyciszanie transpozonów przy udziale piRNA na poziomie potranskrypcyjnym odbywa się przez przecinanie transkryptów transpozonów, aczkolwiek wykazano również związek pomiędzy działaniem piRNA, a metylacją genów transpozonów [37, 111]. Specyficzny mechanizm biogenezy piRNA, czyli pętla amplifikacyjna „ping-pong”, został wykorzystany do zwiększenia ilości piRNA właśnie podczas kontroli transpozonów. Pierwszorzędowe piRNA połączone z białkami Piwi rozpoznają komplementarne, docelowe cząsteczki RNA i przecinają je, produkując w ten sposób drugorzędowe piRNA, co powoduje kontynuację cyklu wzmacniającego odpowiedź piRNA.

Cząsteczki piRNA mogą pełnić swoje funkcje po związaniu z białkami Piwi. Trzy mysie białka Piwi - Miwi, Mili i Miwi2 - ulegają ekspresji wyłącznie w komórkach płciowych, lecz na różnych etapach gametogenezy [103, 104, 121]. Białko Miwi2 ulega ekspresji w bardzo wąskim przedziale czasowym. Występuje ono w embrionalnych prospermatogoniach oraz po urodzeniu w bardzo wczesnych spermatogoniach, co pokrywa się z czasem przeprogramowania epigenetycznego i procesem metylacji DNA *de novo* [103, 122]. W komórkach tych białko Miwi2 umiejscowione jest w jądrze oraz w ziarnistościach cytoplazmy zwanych ziarnami piP (ang. *piP-bodies*), które zawierają również inne typowe dla ziaren P (ang. *P-bodies*) białka [122]. Białko Mili również występuje w prospermatogoniach, ale zlokalizowane jest w innych ziarnistościach (ang. *pi-bodies*). Obydwa typy ziarnistości są ze sobą powiązane i uczestniczą w biogenezie piRNA, metylacji DNA *de novo* oraz wyciszaniu transpozonów [122]. U myszy posiadających niefunkcjonalne geny *miwi2* i *mili* dochodzi do zatrzymania spermatogenezy na etapie wczesnej mejozy [103, 121], co prawdopodobnie wynika z niestabilności genomowej, spowodowanej anormalną ekspresją transpozonów.

1.3.4. Udział piRNA w spermatogenezie

Dwa mysie białka Piwi – Miwi i Mili - ulegają ekspresji podczas spermatogenezy po urodzeniu, gdzie funkcje piRNA są znacznie mniej poznane niż w przypadku prospermatogonii. Białko Mili występuje w cytoplazmie spermatogonii, spermatocytów znajdujących się w fazie pachytenu oraz okrągłych spermatyd, podczas gdy ekspresja Miwi

rozpoczyna się w komórkach mejotycznych i kontynuowana jest przez cały proces różnicowania się spermatyd [98]. Białka Miwi i Mili, zlokalizowane są głównie w ziarnistościach komórek płciowych, takich jak IMC (ang. *intermitochondrial cement*) w spermatocytach i CB (ang. *chromatoid body*) w spermatydach [104, 121, 123]. Ekspresja piRNA jest masowo indukowana w spermatocytach będących w fazie pachytenu i ta grupa piRNA jest określana jako pachytenowe piRNA [90, 92]. Pachytenowe piRNA różnią się od tych występujących w okresie płodowym i piRNA pojawiających się przed fazą pachytenu profazy pierwszego podziału mejotycznego, oddziałujących z białkiem Mili [98]. Dowiedziono, że produkcja pachytenowych piRNA jest niezależna od mechanizmu amplifikacyjnego „ping-pong”. Natomiast bardziej prawdopodobne jest, że powstają one na drodze przetwarzania pierwotnego [120].

Delecja genu *miwi* u myszy skutkuje zatrzymaniem spermatogenezy w stadium okrągłej spermatydy, bez żadnych defektów w przebiegu mejozy i całkowitym brakiem wydłużonych spermatyd [104]. Ekspresja pachytenowych piRNA jest znacznie zredukowana u osobników nieposiadających białka Miwi [92], co sugeruje, że obecność funkcjonalnego białka ma wpływ na ich powstawanie. Białka należące do rodziny Argonaute, w tym białka Piwi, wykazują aktywność nukleazową i po związaniu z małymi RNA mogą przecinać docelowe, komplementarne cząsteczki RNA. Co ciekawe, zmutowane myszy, posiadające katalitycznie nieaktywną formę białka Miwi, bez aktywności przecinania RNA, wykazują prawie identyczny fenotyp jak myszy całkowicie pozbawione białka Miwi. Oznacza to, że biologiczna funkcja białka Miwi w znacznej części obejmuje działanie nukleolityczne tego białka, sterowane małymi RNA. Aktywność ta obejmuje potranskrypcyjne cięcie transkryptu retrotranspozonu LINE [124]. Natomiast biogeneza pierwotnych piRNA jest nienaruszona u osobników z nieaktywnym katalitycznie białkiem Miwi. Dlatego wydaje się, że produkcja pachytenowych piRNA wymaga obecności białka Miwi, ale nie jego aktywności nukleolitycznej. Jednakże dokładny mechanizm produkcji pachytenowych piRNA pozostaje wciąż niejasny. Ostatnie badania zwróciły uwagę na inne białka, takie jak Zucchini/MITOPOLD/PLD6 oraz helikaza MOV10L1, które biorą udział w biogenezie pierwszorzędowych, pachytenowych piRNA, jako nukleazy specyficzne wobec jednoniciowych kwasów nukleinowych [125]. Sugeruje się również, że biogeneza pierwszorzędowych piRNA wymaga 3'-5' egzonukleolitycznego przetwarzania, celem wytworzenia dojrzałego końca 3' piRNA, po tym jak prekursorowy transkrypt z przetworzonym końcem 5' wiąże się z białkiem Piwi [112].

Funkcja pachytenowych piRNA i powód ich bardzo wysokiej ekspresji wciąż pozostają przedmiotem intensywnych badań. Jak wspomniano wyżej, kompleksy Miwi-piRNA mogą pośredniczyć w wyciszaniu transpozonów [124]. Jednakże populacja pachytenowych piRNA jest różnorodna i tylko około 20% piRNA mapuje do sekwencji repetytywnych. Większość pachytenowych piRNA tworzy klastry w regionach międzygenowych pozbawionych powtórzeń. Istnieje także frakcja mapująca do genów kodujących białka. Głębokie sekwencjonowanie niskocząsteczkowych RNA związanych z białkami Mili i Miwi wykazało, że większość piRNA, których geny znajdują się w regionach międzygenowych, bądź w obrębie genów kodujących białka, nie posiada komplementarnych, dłuższych, docelowych RNA [112]. To sugeruje, że białka Miwi i Mili nie wykorzystują cząsteczek piRNA do naprowadzania ich na niezawierające powtórzeń fragmenty RNA. Obecnie nie wiadomo, w jakim celu produkowane są piRNA, nieposiadające komplementarnych docelowych RNA. Jedną z możliwości jest to, że są one końcowymi produktami mechanizmu degradacji transkryptów RNA, powstałych w trakcie mejozy, które są zbędne w komórkach haploidalnych [112]. Funkcjonalna charakterystyka pachytenowych piRNA pozostaje wyzwaniem ze względu na złożoność procesu spermatogenezy i brak modelowych kultur *in vitro* dla mejotycznego i pomejotycznego różnicowania komórek. Co więcej wydaje się, że białka, które uczestniczą w szlaku Piwi-piRNA, posiadają inne, niezależne od piRNA funkcje. Na przykład wykazano, że białko Miwi wiąże, ochrania i hamuje translację mRNA, powstających w trakcie spermiogenezy, bez udziału piRNA [112].

1.3.5. Rola piRNA w specyfikacji i utrzymaniu komórek linii płciowej u *D. melanogaster*

Rola białek Piwi w specyfikacji komórek linii płciowej u muszki owocowej jest dobrze poznana. Białko to zlokalizowane jest w ziarnach biegunowych i jest potrzebne do wytworzenia komórek biegunowych (prapłciowych) w sposób zależny od poziomu ekspresji [51], co oznacza, że zwiększona ilość białka Piwi dziedziczonych w linii żeńskiej prowadzi do proporcjonalnego wzrostu liczby powstających komórek prapłciowych. Co ciekawe, ponieważ wykazano, że białko Piwi poza tworzeniem kompleksów z piRNA, oddziałuje także z niewielką ilością miRNA, nie jest jasne, czy białko to wpływa na specyfikację komórek linii płciowej poprzez oddziaływanie z piRNA, czy z miRNA [51]. Dodatkowy dowód, wiążący cząsteczki piRNA z procesem specyfikacji komórek linii płciowej, dotyczy fenotypu zarodków powstałych z samic, posiadających zmutowany gen

aubergine. Gen ten koduje białko Aub, będące homologiem białka Piwi i jest zlokalizowane, tak jak Piwi, w ziarnach biegunowych [126]. Embryony te nie wytwarzają komórek płciowych na skutek zaburzenia translacji mRNA białka Oskar, które odgrywa główną rolę w umiejscowieniu plazmy płciowej, ponieważ ziarna biegunowe tworzą się tam, gdzie znajduje się mRNA genu *oskar*. Tak więc odpowiednie rozmieszczenie i ilość białka Oskar kontrolują ilość plazmy biegunowej i liczbę tworzących się komórek płciowych. Jednakże jak dotychczas bezpośredni udział piRNA w tym procesie nie został wykazany.

Białka Piwi u muszki owocowej ulegają ekspresji w komórkach somatycznych i płciowych zarówno samców, jak i samic [127]. Osobniki obu płci posiadające zmutowany gen *piwi* nie są zdolne do utrzymania populacji komórek macierzystych linii płciowej, podczas gdy nadekspresja Piwi w komórkach somatycznych gonady żeńskiej powoduje wzrost zarówno szybkości podziałów GSC, jak i ich liczby [127]. Istotnie białka Piwi i Aub pełnią ważną funkcję w rozwoju gonad i komórek płciowych, ponieważ ich właściwe funkcjonowanie zapewnia osobnikom męskim i żeńskim płodność [102, 127]. Ponadto wykazano, że białko Ago3 jest potrzebne dla zachowania płodności u osobników żeńskich, lecz tylko częściowo u osobników męskich [128].

1.3.6. Inne komponenty szlaku piRNA-Piwi

Białka Piwi oraz piRNA są kluczowymi składnikami szlaku piRNA-Piwi, aczkolwiek nie działają one w pojedynkę. Tworzą one większe kompleksy rybonukleoproteinowe, w skład których wchodzi inne funkcjonalne komponenty (Tab. 1). Zidentyfikowanymi po raz pierwszy białkami oddziałującymi z Piwi były białka należące do rodziny Tudor [95-97]. W genomie ssaków istnieje około 30 genów, które kodują domeny Tudor, a białka zawierające te domeny, takie jak TDRD1 i TDRD9, uczestniczą w szlaku piRNA-Piwi. Ogólnie biorąc domeny Tudor rozpoznają dimetylowane reszty argininy występujące w obrębie docelowych białek. Ostatnie badania wykazały, że argininy znajdujące się na N-końcu mysich białek Piwi są dimetylowane i w związku z tym są rozpoznawane przez domeny Tudor białek TDRD [97]. Białko Mili tworzy kompleks z TDRD1, Miwi2 z TDRD9, a Miwi z TDRD6. U osobników posiadających zmutowane geny *tdrd1* oraz *tdrd9* dochodzi do aktywacji retrotranspozonu LINE1 w trakcie spermatogenezy oraz znacznej zmiany w profilu ekspresji piRNA. Aktywacja retrotranspozonu IAP nie jest wykrywalna, inaczej niż w przypadku mutacji *mili* i *miwi2*, a przyczyna tego pozostaje nieznana. U osobników

ze zmutowanymi genami *tdrd1* oraz *tdrd9*, metylacja *de novo* promotorów LINE1 zachodząca w (pro)spermatogoniach jest wyraźnie obniżona, co wskazuje, że te dwa białka Tudor, oddziałujące z białkami Piwi są niezbędne do regulacji LINE1 zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i potranskrypcyjnym. Inne białka należące do rodziny Tudor, TDRD5 i TDRD7, również biorą udział w wyciszaniu transpozonów. Białko TDRD5 działa poprzez szlak piRNA-Piwi, natomiast białko TDRD7 może funkcjonować w odmienny sposób [129, 130]. Na poziomie molekularnym białka TDRD funkcjonują prawdopodobnie, jako rusztowanie gromadzące kompleksy makromolekularne za pomocą domen Tudor, jak również innych domen wchodzących w skład białek tworzących te kompleksy. Ewolucyjnie geny rodziny *tudor* występujące u innych gatunków włącznie z genem *tudor* u muszki owocowej, *spn-E/homeless* (homolog *tdrd9*) oraz innymi genami (*Tejas*, *Yb*, *Krimper*) również uczestniczą w szlaku piRNA-Piwi [131]. Zatem rodzina genów *tudor* jest kluczowym, konserwatywnym składnikiem szlaku piRNA-Piwi, zapewniający integralność komórek płciowych u różnych organizmów.

Innym ciekawym i konserwatywnym składnikiem szlaku piRNA-Piwi jest gen *vasa* (mysi homolog *vasa* - *Mvh/Ddx4*). Geny *vasa* są ewolucyjnie konserwatywne i przez długi czas były wykorzystywane, jako specyficzne markery komórek płciowych u wielu organizmów. Białko Vasa posiada domenę helikazy RNA i zaangażowane jest w metabolizm RNA, aczkolwiek szczegółowa molekularna funkcja pozostaje nieznana. Ostatnie badania przeprowadzone u myszy i muszki owocowej, posiadających zmutowany gen *vasa* wykazały, że gen ten przede wszystkim pełni rolę w szlaku piRNA-Piwi [94, 118]. U myszy mutacja *Mvh/Ddx4* doprowadziła do zwiększonej ekspresji retrotranspozonów LINE1 i IAP, co spowodowało zatrzymanie spermatogenezy na etapie mejozy. U zmutowanych osobników nie pojawia się frakcja płodowych piRNA oddziałujących z Miwi2, co skutkuje uszkodzeniem procesu metylacji DNA. Obserwacje te jasno wskazują na kluczową rolę genu *vasa* w szlaku piRNA-Piwi. W biologii rozwojowej geny *vasa* i *tudor* przez długi czas były uważane za kluczowe geny, kontrolujące procesy rozwojowe, istotne dla specyfikacji komórek płciowych u muszki owocowej i ich różnicowania u myszy [98]. Jednakże obecnie okazało się, że geny te, jak również inne geny (łącznie z *piwi*) zaangażowane w rozwój komórek płciowych, uczestniczą w kontroli transpozonów poprzez szlak piRNA-Piwi, co wskazuje na ogromne znaczenie kontroli transpozonów podczas rozwoju komórek płciowych.

Białko Mov10L1 (homolog białka Armitage występującego u muszki owocowej) jest kolejną helikazą RNA niezbędną w procesie pierwotnej biogenezy i łączenia piRNA z białkami Piwi, a także supresji retrotranspozonów LINE1 oraz IAP podczas spermatogenezy [132, 133]. Helikaza ta, podobnie jak produkty genów *Mvh/Ddx4* oraz *Tdrd9* (białko to także posiada domenę helikazową) [94], jest ewolucyjnie konserwatywna i ważna dla prawidłowego funkcjonowania szlaku piRNA-Piwi.

Inne komponenty szlaku piRNA-Piwi zidentyfikowane do tej pory to białka Maelstrom [134] i GASZ/ASZ1 [135]. Maelstrom posiada domenę HMG-box i jest konieczne do supresji transpozonów LINE1 oraz IAP, a utrata jego funkcji powoduje defekty w ekspresji piRNA oraz przejściową hipometylację LINE1 w (pro)spermatogoniach. Białko Gasz/Asz1 zawiera powtórzenia ankirynowe (33-aminokwasowy motyw białkowy składający się z dwóch alfa-helis oddzielonych pętlą) oraz domenę SAM (ang. *sterile alpha motif*), a jego rola polega na supresji transpozonów LINE1 oraz IAP, prawdopodobnie poprzez stabilizację białka Mili oraz innych czynników szlaku piRNA-Piwi.

Innym ostatnio zidentyfikowanym ciekawym składnikiem szlaku piRNA-Piwi jest białko Mitopld/Zucchini/PLD6 należące do rodziny fosfolipazy D, która hydrolizuje fosfolipidy i uczestniczy w szlaku sygnałowym lipidów [136]. Przypuszcza się, że białko Mitopld/Zucchini jest nukleazą odpowiedzialną za przetwarzanie piRNA, jednakże jego aktywność nukleazowa, w przeciwieństwie do aktywności lipazy, nie została dowiedziona [98]. Mutacje w genie *Mitopld/Zucchini* powodują wzrost aktywności retrotranspozonu LINE1, hipometylację DNA oraz poważne błędy w procesie biogenezy pierwszorzędowych piRNA. Co ciekawe białko Mitopld/Zucchini zlokalizowane jest na zewnętrznej błonie mitochondriów, a jego nadekspresja (w komórkach somatycznych) ułatwia fuzję mitochondriów poprzez lipidowy szlak sygnałowy [98], podczas gdy utrata jego funkcji zakłóca dystrybucję mitochondriów oraz powoduje niewłaściwą lokalizację komponentów szlaku piRNA-Piwi, takich jak białka Mili oraz TDRD1. Zatem białko Mitopld/Zucchini jest ważnym czynnikiem, który może łączyć regulację błony mitochondrialnej i lipidowy szlak sygnałowy ze szlakiem piRNA-Piwi.

Tabela 1. Komponenty szlaku piRNA-Piwi u myszy.

Gen	Domena białkowa	Lokalizacja białka	Aktywacja retropozonów u mutantów	Biogeneza piRNA u mutantów	Fenotyp spermatogenezy u mutantów	Lit.
<i>Piwil1 (Miwi)</i>	Piwi, Paz	ciało chromatoidalne	LINE1	utrata pachytenowych piRNA	spermatydy	[104, 124]
<i>Piwil2 (Mili)</i>	Piwi, Paz	„intermitochondrial cement”, ciało chromatoidalne	LINE1, IAP	utrata płodowych piRNA	spermatocyty	[37,110,111, 119,121]
<i>Piwil4 (Miwi2)</i>	Piwi, Paz	ciałka P, jądro	LINE1, IAP	zmiany w płodowych piRNA	spermatocyty	[37,103, 111,119]
<i>Tdrd1 (Mtr-1)</i>	Tudor, Mynd	„intermitochondrial cement”, ciało chromatoidalne	LINE1	zmiany w płodowych piRNA	spermatocyty, spermatydy	[95-97]
<i>Tdrd5</i>	Tudor, Lotus	„intermitochondrial cement”, ciało chromatoidalne	LINE1	brak danych	spermatydy	[129]
<i>Tdrd9</i>	Tudor, helikaza	ciałka P, jądro, ciało chromatoidalne	LINE1	zmiany w płodowych piRNA	spermatocyty	[137]
<i>Ddx4 (Mvh)</i>	helikaza	„intermitochondrial cement”, ciało chromatoidalne	LINE1, IAP	zmiany w płodowych piRNA	spermatocyty	[94]
<i>Mov10L1</i>	helikaza	cytoplazma	LINE1, IAP	utrata okołoporodowych piRNA	spermatocyty	[132,133]
<i>Mael</i>	HMG	ciałka P, ciało chromatoidalne	LINE1, IAP	przejściowa utrata płodowych piRNA	spermatocyty	[122,134]
<i>Asz1 (Gasz)</i>	powtórzenia ankirykowe, SAM	„intermitochondrial cement”	LINE1, IAP	zmiany w pourodzeniowych, prepachytenowych piRNA	spermatocyty	[135]
<i>Pld6 (Zuc/mitoPLD)</i>	fosfolipaza D	mitochondria	LINE1	zmiany w płodowych piRNA	spermatocyty	[136]

1.4. Endogenne siRNA w rozwoju komórek płciowych

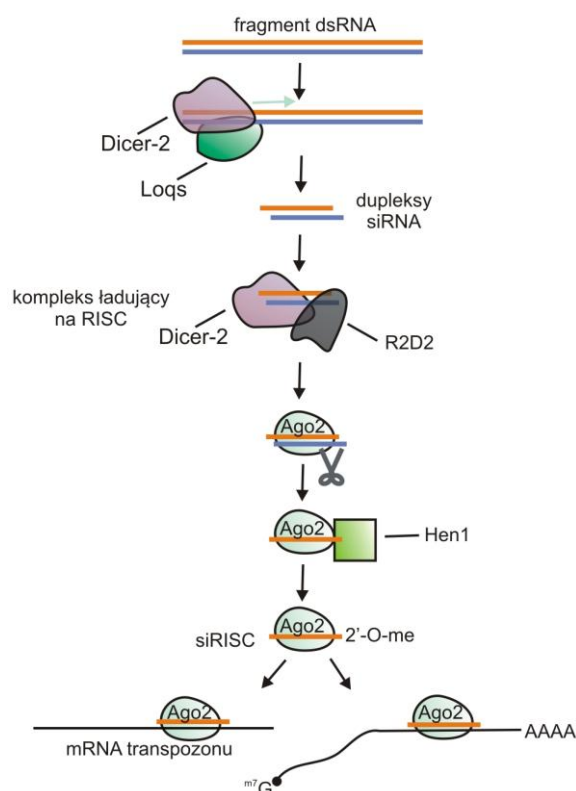
1.4.1. Biogeneza i funkcja endogennych siRNA

Głębokie sekwencjonowanie małych RNA pochodzących z tkanek somatycznych muszki owocowej, pozwoliło na zidentyfikowanie nowej klasy około 21-nt cząsteczek endo-siRNA [138]. Cząsteczki te pochodzą z transkryptów transpozonów, sekwencji heterochromatynowych, dupleksów RNA „sens-antysens”, mRNA, pseudogenów oraz długich struktur typu „spinka do włosów” [139]. Biorąc pod uwagę, że zarówno transpozony, jak i endogenne sekwencje genów stanowią matryce do syntezy prekursorów endo-siRNA oczywiste jest, że ich funkcja nie ogranicza się do wyciszania transpozonów, ale raczej obejmuje regulację ekspresji genów [139]. Dowiedziono, że u muszki owocowej endo-siRNA specyficznie oddziałują z białkiem Ago2 [138]. Natomiast badanie ekspresji małych RNA u myszy również wykazało, że liczne endo-siRNA są obecne w oocytach [140, 141], a także w mniejszych ilościach w embrionalnych komórkach macierzystych [142]. Aktywność cząsteczek endo-siRNA u myszy także związana jest z białkami należącymi do rodziny Ago [140]. Poza szlakiem endo-siRNA białko Ago2 u muszki owocowej uczestniczy również w procesie interferencji RNA poprzez oddziaływanie z egzogennymi siRNA (egzo-siRNA), które powstają z wprowadzonych do komórki długich dwuniciowych RNA (dsRNA) lub dupleksów siRNA. Przykładem jest wykorzystanie procesu interferencji RNA przez *D. melanogaster* do obrony przeciwko wirusom produkującym dsRNA podczas infekcji [143]. Liczne endo-siRNA zostały opisane u innych gatunków, m. in. roślin i *C. elegans* [144]. Szlak endo-siRNA u roślin i nicieni jest bardziej skomplikowany niż ten występujący u muszki owocowej i ssaków, gdyż do wytwarzania endo-siRNA wykorzystują one polimerazy RNA zależne od RNA [144]. Ponieważ muszka owocowa i ssaki nie posiadają RdRP (ang. *RNA-dependent RNA polymerase*), występujące u tych organizmów endo-siRNA powinny być sklasyfikowane, jako nowa grupa cząsteczek, które są produkowane w sposób niezależny od RdRP.

1.4.1.1. Biogeneza endogennych siRNA u *D. melanogaster*

Rozkład wielkości cząsteczek endo-siRNA jest bardzo wąski (~21 nt) w porównaniu na przykład do 21-23-nt cząsteczek miRNA. Kluczem do wyjaśnienia tej różnicy jest prawdopodobnie sposób biogenezy obydwu grup małych RNA. Podobnie jak w przypadku

egzogennych siRNA, ale w odróżnieniu od miRNA, przetwarzanie endo-siRNA zależy od enzymu Dicer2, a nie Dicer1 (Rys. 6) [138]. Co ciekawe, w przeciwieństwie do egzo-siRNA, które wymagają białka R2D2, endo-siRNA, a szczególnie te wywodzące się z długich struktur typu „spinka do włosów”, zależą od białka LOQS, które funkcjonuje w szlaku miRNA [139]. Wydaje się, że Dicer2 oddziałuje z białkiem LOQS w komórkach muszki owocowej [106]. Niewiadomo, w jaki sposób i dlaczego białko LOQS wybiera Dicer2, a nie Dicer1 w procesie przetwarzania endo-siRNA. Ciekawe byłoby również zrozumienie sposobu, w jaki kompleks Dicer2-LOQS rozpoznaje swoje substraty i determinuje miejsca przecięcia.



Rysunek 6. Biogeneza i funkcja endo-siRNA u *D. melanogaster*. Prekursorowe dwuniciowe fragmenty RNA (dsRNA) są przycinane przez białka Dicer-2 oraz Loqs do krótszych dupleksów siRNA. Następnie dupleksy te, za pomocą białek Dicer-2 oraz R2D2, przenoszone są do kompleksu z białkiem Ago2. Po związaniu z Ago2 jedna z nici dupleksu zostaje usunięta, a druga ulega metylacji przy udziale enzymu Hen1. Gotowy kompleks RISC wiąże się z docelowym mRNA bądź RNA transpozonu powodując wyciszenie ekspresji genu.

Prekursory endo-siRNA są produkowane głównie z dupleksów typu „sens-antysens” pochodzących z transpozonów. Mogą one również powstawać w procesie zbieżnej transkrypcji genów kodujących białka lub z nieopisanych regionów genomu [138].

Transkrypty te niekoniecznie są transkrybowane z tych samych loci, zatem dwuniciowe prekursorzy RNA mają tendencję do posiadania naturalnych niesparowań i wybrzuszeń. Drugi typ prekursorów endo-siRNA stanowią jednoniciowe, aczkolwiek hybrydujące do siebie transkrypty tworzące długie struktury typu „spinki do włosów” [138]. Różnią się one od prekursorów miRNA dłuższym regionem dwuniciowym. Co ciekawe znaczna liczba endo-siRNA (około 20% endo-siRNA oddziałujących z Ago2 w komórkach Schneider 2 *D. melanogaster*) posiada w swoich sekwencjach substytucje [145]. Ponieważ większość znalezionych mutacji to substytucje A-G, prawdopodobnie związane jest to z edytowaniem RNA przez białko ADAR (ang. *adenosine deaminase acting on RNA*). Aktywność tego białka w procesie redagowania RNA jest ograniczona do jądra, a jako substraty wykorzystuje ono tylko dwuniciowe RNA. Dlatego dwuniciowe prekursorzy RNA muszą powstać w jądrze, gdzie służą, jako substraty dla enzymu ADAR. Ta potranskrypcyjna modyfikacja nukleotydowa prowadzi do powstawania w cząsteczkach prekursorów wybrzuszeń. Te dwie strukturalne cechy prekursorów endo-siRNA – długie, dwuniciowe struktury i wybrzuszenia – mogą być selektywnie rozpoznawane przez białka Dicer2 i LOQS. Białko Dicer2 może być potrzebne do przetwarzania długich, dwuniciowych RNA oraz do oddziaływań z Ago2. Natomiast białko LOQS może przyczyniać się do wiązania białka Dicer2 do niesparowań występujących w prekursorach oraz do ich łączenia z kompleksem białkowym RISC [146].

Niektóre loci generujące cząsteczki piRNA mogą być źródłem endo-siRNA [145], jednakże jedna z grup badawczych wykazała, że tylko kilka loci piRNA może produkować endo-siRNA [138]. Podobnie jak piRNA, endo-siRNA u muszki owocowej posiadają na końcu 3' grupę 2'-O-metylową, która może być dodana przez metylotransferazę Hen1 [145]. Jednakże piRNA oraz endo-siRNA wyraźnie różnią się pod względem długości (24-29 nt w porównaniu do 21 nt), białek, z którymi oddziałują (Pwi w porównaniu do Ago) oraz komórek, w których ulegają ekspresji (głównie komórki płciowe w porównaniu do wszystkich komórek organizmu). Różny jest również sposób ich redagowania. Endo-siRNA mogą być edytowane przez enzym ADAR, co jest mało prawdopodobne w przypadku piRNA, ponieważ endo-siRNA są generowane z dwuniciowych RNA, podczas gdy piRNA powstają z jednoniciowych RNA. Retrotranspozony mogą być transkrybowane w obydwóch kierunkach. Jednakże ilość produktów powstałych w orientacji sensownej i antysensownej może być różna. Może to skutkować powstaniem mieszaniny jedno- i dwuniciowych RNA. Niezależnie od sposobu redagowania, dwuniciowe RNA są transportowane do cytoplazmy za pomocą nieznanego mechanizmu, gdzie są substratami dla enzymu Dicer2, który generuje

powstanie endo-siRNA. Jednociowe transkrypty również są transportowane do cytoplazmy prawdopodobnie poprzez szlak eksportu mRNA i stają się substratami do produkcji piRNA [146].

1.4.1.2. Biogeneza endogennych siRNA w mysich oocytach

Podobnie jak w przypadku endo-siRNA występujących u muszki owocowej, mysie endo-siRNA mają długość około 21-nt i powstają z różnych źródeł, także z elementów ruchomych [140, 141]. Wspólne cechy dotyczą również procesu biogenezy. Do produkcji mysich endo-siRNA niezbędny jest enzym Dicer, podobnie jak Dicer2 u *D. melanogaster*. Prekursorami mysich endo-siRNA są transkrypty, które zawierają długie struktury typu „spinki do włosów” lub dwuniciowe RNA wywodzące się z dupleksów typu „sens-antysens”. Niektóre z tych dupleksów (prekursory *cis*-endo-siRNA) są transkrybowane zbieżnie z tych samych loci, podczas gdy inne (prekursory *trans*-endo-siRNA) są generowane z dwóch podobnych, ale oddzielnych loci. Wykazano, że transkrypty pseudogenów mogą wytwarzać siRNA poprzez hybrydyzację do ich funkcjonalnie spokrewnionych transkryptów oraz, że ekspresja funkcjonalnych genów jest zwiększona u osobników ze zmutowanymi genami *dicer* i *ago2* [140, 141]. A zatem pseudogeny mogą pełnić funkcję regulatorową poprzez hamowanie ich funkcjonalnych odpowiedników na drodze interferencji RNA.

Co ciekawe, mysie oocyty produkują zarówno endo-siRNA, jaki i piRNA, podczas gdy w mysich jądrach dochodzi do ekspresji tylko piRNA [140, 141]. Tak więc w jajnikach, w wyciszanie transpozonów, zaangażowane są dwa mechanizmy: szlak endo-siRNA oraz piRNA. W toku ewolucji regulacja transpozonów występujących w męskich i żeńskich komórkach linii płciowej mogła zachodzić w odmienny sposób. Mimo że niektóre mechanizmy wciąż pozostają aktywne u osobników żeńskich, to u osobników męskich szlak endo-siRNA mógł zaniknąć [146].

1.4.2. Rola endogennych siRNA w różnicowaniu komórek płciowych – oogeneza

W celu zbadania roli endo-siRNA na wczesnym etapie rozwoju komórek płciowych u muszki owocowej, przeanalizowano jaki wpływ ma brak białek Dicer2 oraz Ago2, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania tych małych RNA. Co ciekawe, podczas gdy zaobserwowano ogromny wpływ na proces przetwarzania dwuniciowych RNA, to obydwie

białka wydają się być zbędne w specyfikacji i utrzymaniu populacji komórek płciowych u *D. melanogaster* [147].

U *C. elegans* osobniki pozbawione polimerazy RNA zależnej od RNA, EGO1 lub innych RdRP, które są potrzebne do syntezy prekursorów endo-siRNA, wykazują poważne defekty w procesie oogenezy i spermatogenezy, prowadzące do niepłodności [148]. Zjawisko interferencji RNA w komórkach płciowych tych osobników jest zredukowane, co powoduje błędy w przebiegu mitozy, przedwczesną mejozę oraz defekty w rekombinacji mejotycznej, co skutkuje powstawaniem wadliwych oocytów.

Podobnie badanie roli endo-siRNA podczas oogenezy u myszy, poprzez analizowanie osobników pozbawionych genów *dicer* i *ago2*, wykazało istotną rolę, jaką odgrywają produkty białkowe tych genów w procesie organizacji wrzeciona podziałowego w trakcie mejozy [140]. W zasadzie fenotyp ten może wynikać z braku endo-siRNA lub odzwierciedlać zapotrzebowanie na miRNA, gdyż funkcjonowanie tych obydwu grup małych RNA zależy od enzymu Dicer. Ponieważ brak białka DGCR8, które jest specyficznie zaangażowane w biogenezę miRNA, nie powodował żadnych konsekwencji w procesie oogenezy, dlatego zaobserwowane defekty w powstawaniu gamet u osobników ze zmutowanym genem *dicer* wskazują na rolę endo-siRNA [149]. Badanie ekspresji w oocytach, posiadających zmutowany gen *dicer* wykazało silne zmiany w poziomie transkryptów mRNA regulowanych przez endo-siRNA [150].

1.4.3. Rola endogennych siRNA w różnicowaniu komórek płciowych – spermatogeneza

Udział zjawiska interferencji RNA w procesie spermatogenezy został po raz pierwszy zauważony u *C. elegans*, gdy u osobników posiadających mutacje w genach szlaku endo-siRNA w sposób nieprawidłowy przebiegało powstawanie plemników [151, 152]. Dodatkowo mutacje wpływające na biogenezę niskocząsteczkowych RNA charakterystycznych dla komórek rozrodczych, 22G i 26G RNA, powodowały liczne nieprawidłowości w spermatogenezie z powodu niewłaściwej segregacji chromosomów w trakcie mitozy i mejozy [152, 153].

Rola 22G RNA w kontrolowaniu mitozy może być powiązana z odkryciem, że cząsteczka ta wiąże czynniki modyfikujące chromatynę, które stymulują miejscową modyfikację histonów i ustalają przycentromerowe domeny chromatyny. Dalsze wiązanie czynników istotnych dla właściwego podziału mitotycznego, takich jak kondensyny

i kohezyny, pozwala na prawidłową segregację chromosomów [153]. Cząsteczki 26G endo-siRNA oddziałujące z białkami Ago – ALG3 i ALG4 – poprzez regulowanie ekspresji genów w trakcie spermatogenezy, pełnią ważną rolę w tym procesie [152].

Podobnie jak w przypadku nieprawidłowości obserwowanych podczas oogenezy, samce myszy posiadające mutację genu *dicer* wykazują duże nieprawidłowości w procesie proliferacji komórek płciowych i w konsekwencji w procesie spermatogenezy, jednak relatywny udział szlaków miRNA oraz endo-siRNA jest trudny do określenia [48].

1.5. miRNA, siRNA oraz piRNA w nowotworach zarodkowych

Niewłaściwa regulacja rozwoju komórki na jakimkolwiek etapie (specyfikacji, migracji, kolonizacji gonad, różnicowania) może mieć fatalne skutki włącznie z nieprawidłowym różnicowaniem i proliferacją komórki, co skutkuje powstaniem nowotworu. O ukrytym potencjale komórek linii płciowej do wytworzenia guza świadczy ich zdolność do wytworzenia embrionalnych komórek płciowych po przeszczepieniu migrujących komórek prapłciowych do hodowli komórkowej i poddaniu ich działaniu specyficznych sygnałów [154.]. Embrionalne komórki płciowe są bardzo podobne pod względem potencjału rozwojowego do embrionalnych komórek macierzystych, a komórki prapłciowe, z których powstają embrionalne komórki macierzyste, wykazują ten potencjał, gdy rozwijają się do różnych typów nowotworów zarodkowych. Małe RNA i białka, które regulują ich aktywność podczas prawidłowego rozwoju komórek płciowych również pełnią decydującą rolę w formowaniu guzów pochodzenia zarodkowego.

Wiele procesów regulowanych przez małe RNA, zachodzących podczas cyklu komórkowego komórki płciowej, jest powiązanych z nowotworzeniem. U muszki owocowej białko Mei-P26 oddziałuje z Ago1 i redukuje poziom miRNA w komórkach macierzystych linii płciowej w jajnikach, co ogranicza ich wzrost i proliferację [155]. Utrata funkcji genu *mei-P26* powoduje rozrost komórek przejściowo namnażających się (TAC, ang. *transit amplifying cell*), ich nieograniczoną proliferację i ostatecznie powstanie guza jajnika. W warunkach prawidłowych białko Vasa pobudza ekspresję *mei-P26* w komórkach płciowych [156], co sugeruje, że anormalne funkcjonowanie tego białka może również prowadzić do powstania nowotworu. Zatem równoważenie poziomu aktywności miRNA w żeńskich komórkach płciowych muszki owocowej jest konieczne, by nie dopuścić do niekontrolowanego wzrostu i proliferacji nowotworu.

Podobnie u myszy aktywność miRNA może promować rozwój guza. Białko Dnd1 osłabia aktywność miRNA i reguluje rozwój komórek płciowych na wielu etapach [157]. Utrata genu *dnd1* powoduje zależną od szlaku miRNA supresję inhibitorów cyklu komórkowego, które w warunkach prawidłowych kontrolują różnicowanie męskich komórek prapłciowych. Dochodzi do niekontrolowanego wzrostu i proliferacji, co powoduje powstanie u myszy w pełni rozwiniętego potworniaka [157]. Jednakże poszukiwanie mutacji w genie *dnd1* w przypadku nowotworów zarodkowych jąder u człowieka, ujawniło tylko jednego pacjenta, posiadającego szkodliwą mutację, z ponad 260 badanych próbek. Wskazuje to na istnienie alternatywnego szlaku derepresji cyklu komórkowego, który prawdopodobnie zachodzi na skutek niewłaściwej regulacji szlaku miRNA [158].

Inne badania wykazały związek pomiędzy małymi RNA oraz białkami, biorącymi udział w ich regulacji, a ludzkimi nowotworami zarodkowymi. U człowieka wysoki poziom miR-372/373 jest związany z występowaniem potworniakoraka [159]. Ludzki klaster miR-371-373 koduje miRNA, dla których docelowym genem jest *lats2*. Gen ten ulega ekspresji w komórkach płciowych i jest ważny dla utrzymania ich genomowej stabilności. Co ciekawe, supresja genu *lats2* przy udziale miRNA może zostać zmniejszona przez białko Dnd1 [160]. To sugeruje, że miRNA oraz regulujące je białka, biorą udział w kontroli pewnej grupy transkryptów, działających w obrębie wspólnego szlaku molekularnego, mającego wpływ na wiele procesów komórkowych. Wysokoprzepustowe badanie ekspresji miRNA w ludzkich próbkach wykazało podwyższony poziom ekspresji klastra miR-371 w nienasieniakowatych guzach jądra oraz zróżnicowany wzór ekspresji dla 156 innych miRNA w różnych typach nowotworów jąder [161].

Niektóre białka, które bezpośrednio hamują aktywność miRNA, są powiązane z progresją guza. Na przykład białko LIN28, które bezpośrednio inhibuje aktywność rodziny miRNA let-7 i w ten sposób pobudza pluripotencję i samoodnawianie embrionalnych komórek macierzystych, ulega nadekspresji w złośliwych ludzkich nowotworach zarodkowych, a nie w łagodnych nowotworach czy zdrowych tkankach jądra [162]. Dodatkowo białko to jest silnym markerem nowotworów zarodkowych jajnika będących w początkowym stadium rozwoju. Inhibicja aktywności LIN28 w nabłonkowych komórkach nowotworowych jajnika spowodowała znaczne zmniejszenie rozwoju i przeżywalności komórek, co potwierdziło, że białko to działa jako onkogen [163].

Również szlak piRNA-Piwi może być zaangażowany w powstawanie nowotworów jąder. Wykazano nadekspresję ludzkiego białka Hiwi, wiążącego piRNA, w większości

nasieniaków, ale nie w przypadku nienasieniaków lub nasieniaków spermatocytowych [164]. Jednakże ustalenie, w jakim stopniu niewłaściwe funkcjonowanie szlaku piRNA-Piwi przyczynia się do rozwoju nowotworów zarodkowych, wymaga jeszcze wielu badań.

Tabela 2. Rola małych niekodujących RNA oraz oddziałujących z nimi białek w rozwoju komórek płciowych – podsumowanie.

Organizm modelowy	Mutacja	Małe RNA podlegające zmianom	Fenotyp	Lit.
Mysz	Dicer1	miRNA, siRNA	<u>Kolonizacja gonad</u> : wolniejsza proliferacja podczas wczesnego różnicowania <u>Spermatogeneza</u> : wczesna proliferacja, późniejsze defekty w morfologii i ruchliwości plemników	[48, 165] [48, 165]
	Dicer	miRNA, siRNA	<u>Spermatogeneza</u> : całkowita degeneracja jąder, defekty rozpoczynają się 5 dni po urodzeniu	[166]
	Dicer	miRNA, siRNA	<u>Oogeneza</u> : większa pula pęcherzyków pierwotnych, przedwczesna folikulogeneza, defekty w migracji oocyty do macicy, niepłodność	[80, 81]
	Dicer1	miRNA, siRNA	<u>Oogeneza</u> : zatrzymanie na etapie pierwszego podziału mejozy, dezorganizacja wrzeciona, błędy w segregacji chromosomów	[150]
	Drosha	miRNA	<u>Spermatogeneza</u> : ubytek spermatocytów i spermatyd	[167]
	klaster miR-290-295	miR-290-295	<u>Migracja PGC</u> : komórki migrują poza prawidłowym kursem <u>Oogeneza</u> : PGC, które kolonizują gonady zanikają, co powoduje sterylność	[168] [168]
	Ago2	siRNA	<u>Oogeneza</u> : dojrzałe oocyty z zdezorganizowanym wrzecionem i błędami w segregacji chromosomów	[169]
	Miwi	piRNA	<u>Spermatogeneza</u> : zatrzymanie na początku stadium okrągłej spermatydy (mejoza II), sterylność męska; samice płodne	[104]
	Mili	piRNA	<u>Spermatogeneza</u> : zatrzymanie w stadium zygotenu/pachytenu mejozy I, sterylność; samice płodne	[121]
	Miwi2	piRNA	<u>Spermatogeneza</u> : zatrzymanie we wczesnej profazie mejozy I, sterylność; samice płodne	[103]
Muszka owocowa	Dicer1	miRNA	<u>Specyfikacja PGC</u> : brak PGC posiadających Vasa	[51]
	Loquacious	miRNA	<u>Oogeneza</u> : niezbędne do utrzymania populacji komórek macierzystych linii płciowej	[170]
	Ago1	miRNA	<u>Oogeneza</u> : niezbędne do utrzymania populacji komórek macierzystych linii płciowej	[67, 155]
	R2D2	miRNA	<u>Oogeneza</u> : niezbędne do wytworzenia komórek pęcherzykowych	[171]
	Dicer2	siRNA	Brak danych na temat fenotypu komórek linii płciowej	[51, 65]

Danio pręgowane	Ago2	siRNA	Brak danych na temat fenotypu komórek linii płciowej	[172]	
	Piwi	piRNA	<u>Specyfikacja PGC</u> : brak PGC posiadających Vasa <u>Gametogeneza</u> : niezbędne do utrzymania populacji komórek macierzystych obydwu płci, ale nie do dalszego różnicowania	[51] [102, 127]	
	Aubergine	piRNA	<u>Specyfikacja PGC</u> : utrata komórek biegunowych	[126]	
	Ago3	piRNA	<u>Oogeneza</u> : samice są sterylne <u>Spermatogeneza</u> : obniżona płodność z powodu niewłaściwego utrzymywania populacji komórek macierzystych	[128] [128]	
	Dicer1	miRNA siRNA	Brak danych na temat fenotypu komórek linii płciowej	[71]	
	Ziwi	piRNA	<u>Wczesna gametogeneza</u> : utrata komórek płciowych z powodu apoptozy	[107]	
	Zili	piRNA	<u>Wczesna gametogeneza</u> : utrata komórek płciowych z powodu apoptozy	[173]	
	<i>C. elegans</i>	Dicer1	miRNA siRNA	<u>Gametogeneza</u> : niewłaściwa morfologia oocytów i migracja przez zbiornik nasienny	[174]
		Ego-1	siRNA	<u>Gametogeneza</u> : defekty mitozy, przedwczesna mejoza, błędy w rekombinacji mejozycznej	[148, 174]
		Prg-1	21U-RNA (piRNA)	<u>Spermatogeneza</u> : plemniki wykazują defekty w procesie aktywacji i zapłodnienia	[175]

1.6. Fragmenty tRNA

Już w latach 70. zaobserwowano, że w komórkach *E. coli*, zainfekowanych bakteriofagiem T4, zachodzi ekspresja fragmentu cząsteczki tRNA^{Leu} [176]. Prawie 30 lat później cząsteczki tRF zostały wyizolowane z komórek ludzkiego nowotworu pęcherza moczowego i po raz pierwszy zbadane pod kątem funkcji [177]. Do tej pory dane pochodzące z metod sekwencjonowania nowej generacji doprowadziły do identyfikacji małych fragmentów tRNA, różniących się długością oraz pochodzeniem. Zaczęto zatem dyskutować, w jaki sposób przebiega ich biogeneza oraz jaką pełnią funkcję.

1.6.1. Rodzaje fragmentów tRNA

Od czasu ich odkrycia terminologia dotycząca małych niekodujących RNA pochodzących z tRNA była bardzo niespójna. Nazywano je połówkami RNA [178], fragmentami RNA pochodzącymi z tRNA (tRF, ang. *tRNA-derived fragments*) [179], małymi RNA indukowanymi stresem (tiRNA) [180, 181], małymi RNA pochodzącymi z tRNA (tsRNA) [182] oraz RNA nowotworu pęcherza moczowego (ubcRNA) [177]. Ostatnio zaproponowano nomenklaturę w oparciu o rozmiar fragmentów tRNA oraz część cząsteczki

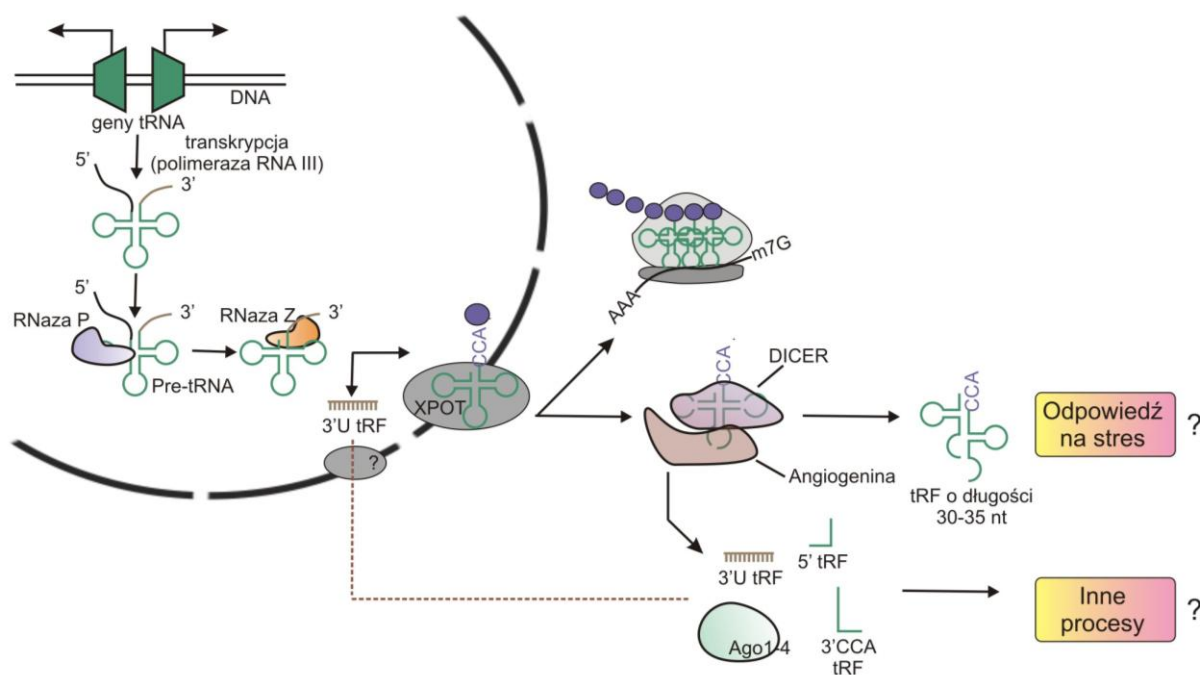
tRNA, z której pochodzą [183]. Według tej nomenklatury, fragmenty tRNA mogą być podzielone na dwie główne klasy: połówki tRNA i małe fragmenty tRNA. Połówki tRNA mają długość 30-35 nt i powstają poprzez przecięcie w obrębie lub w pobliżu pętli antykodonowej w odpowiedzi na niedotlenienie, stres oksydacyjny lub induktory apoptotyczne [178, 184]. Co ciekawe, angiogenina, endonukleaza odpowiedzialna za cięcie tRNA u ssaków [180], jest silnym czynnikiem angiogennym w komórkach zarówno zdrowych, jak i nowotworowych oraz potencjalnym onkogenem.

Małe fragmenty tRNA mają długość około 20 nt i wywodzą się z końca 3' lub 5' dojrzałej cząsteczki RNA (5' tRF i 3'CCA tRF). Mogą one również powstawać z sekwencji oskrzydłającej 3'-pre-tRNA (3'U tRF), podczas procesu przetwarzania pre-tRNA przez RNazę Z. Mechanizmy powstawania cząsteczek 5'- i 3'CAA tRF w komórce nie są jeszcze całkowicie zrozumiałe, aczkolwiek sugeruje się, że w ich produkcję może być zaangażowany enzym Dicer [185]. Na rysunku 7 przedstawiono schemat biogenezy cząsteczek tRF.

1.6.2. Cząsteczki tRF - produkty degradacji tRNA czy nowa klasa małych RNA?

Duża ilość tRNA, ich wszechobecna ekspresja oraz zasadnicza rola w metabolizmie komórkowym narzucają pytanie, czy fragmenty tRNA, które często zostają zidentyfikowane podczas sekwencjonowania, są nowymi, funkcjonalnymi jednostkami, czy tylko produktami obrotu tRNA i odpowiedzi na stres komórkowy. Dowodzi się, że fragmenty tRNA powstają w sposób kontrolowany, co sugeruje, że te małe cząsteczki RNA są nowymi, biologicznymi jednostkami RNA. Wykazano, że ilość dojrzałych tRNA nie zmienia się znacząco podczas stresu, który indukuje cięcie tRNA i powstanie cząsteczek tRF o długości około 30 nt [178, 180, 184]. Co więcej proces wydaje się być kontrolowany poprzez metylację RNA i jest indukowany tylko przez specyficzne bodźce stresowe [186]. Przecięcie często następuje w ściśle określonym miejscu tRNA, co sugeruje, że fragmenty są otrzymywane z w pełni dojrzałych cząsteczek tRNA, w których doszło już do wycięcia intronu i dodania sekwencji 5'-CCA-3' [183]. Ostatnie badania wykazały, że pomimo znacznego zwiększenia liczby kopii genów tRNA w komórkach nowotworowych w porównaniu do zdrowych, relatywny skład pełnej długości tRNA pozostaje prawie identyczny i nie jest to powiązane z występowaniem w komórce znacznej ilości tRF [184]. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze doniesienia, że obecność tRF nie koreluje z liczbą kopii genów tRNA lub rozkładem wykorzystania kodonów. Odrzuca to hipotezę, że ilość tRF odzwierciedla ekspresję genów tRNA i dostarcza

dotychczasowych dowodów, że cząsteczki te są niezależnymi jednostkami, a nie produktami degradacji i obrotu tRNA.



Rysunek 7. Biogeneza i funkcja tRF. tRNA są transkrybowane z poszczególnych genów przez polimerazę RNA III. Z transkryptów pre-tRNA przy udziale RNazy P oraz RNazy Z usuwane są krótkie sekwencje oskrzydlaające cząsteczkę tRNA z obydwu końców i po modyfikacji chemicznej, dodaniu CCA i aminoacylacji, są one transportowane do cytoplazmy przy udziale eksportyny-t, by uczestniczyć w syntezie białek. Cząsteczki 3'U tRF powstają przez odcięcie od tRNA sekwencji oskrzydlającej koniec 3' przy udziale RNazy Z. Czynniki stresowe mogą indukować powstawanie ok. 30-nt tRF poprzez przecięcie dojrzałych cząsteczek tRNA w obrębie pętli antykodonu przy udziale angiogeniny. Krótsze cząsteczki 5'tRF oraz 3'CCA tRF mogą powstawać z końców 5' i 3' dojrzałych tRNA przy udziale Dicer. Poprzez oddziaływanie z białkami Ago mogą one uczestniczyć w różnych procesach transkrypcyjnej i potranskrypcyjnej regulacji.

1.6.3. Biologiczna rola oraz mechanizm działania cząsteczek tRF

1.6.3.1. tRF jako cząsteczki sygnałowe w odpowiedzi na czynniki stresowe

Chociaż dokładna rola cząsteczek tRF musi jeszcze zostać wyjaśniona, to sugeruje się, że małe RNA pochodzące z tRNA uczestniczą w dwóch głównych typach procesów biologicznych. Pierwszym z nich jest odpowiedź komórkowa na czynniki stresowe, w której to cząsteczki te pełnią funkcje sygnałowe. Do tej pory wykazano, że ilość tRF zwiększa się

pod wpływem warunków stresowych, a szczególnie na skutek głodu i stresu oksydacyjnego [180, 184, 186]. Cząsteczki te mogą pobudzać tworzenie ziaren stresu [181], będących cytoplazmatycznymi rybonukleoproteinami, które odgrywają istotną rolę podczas inhibicji translacji indukowanej stresem oraz translacyjnej indukcji białek biorących udział w naprawie i przeżywaniu komórki. W tym przypadku pobudzanie wytwarzania ziaren stresu przez fragmenty pochodzące z tRNA może być ważnym szlakiem sygnałowym w warunkach głodu i niedotlenienia w komórkach nowotworowych [188]. Co ciekawe, wykazano, że tRNA mogą inhibować apoptozę poprzez oddziaływanie z cytozolemowym cytochromem-C, co zapobiega jego interakcji z białkiem Apaf-1 i blokuje aktywację kaspazy 9. W tym samym czasie, zastosowanie RNazy specyficznej dla tRNA zwiększa aktywację kaspazy 9 i apoptozę [189]. Wykazano, że w komórkach raka prostaty dochodzi do zwiększenia ilości tRF [190]. Co więcej w linii komórkowej raka prostaty ekspresja 3'U tRF pozytywnie koreluje z tempem podziałów komórkowych, a wyciszenie ekspresji 3'U tRF za pomocą siRNA powoduje osłabienie proliferacji komórek [179].

Podsumowując, cząsteczki tRF wydają się uczestniczyć w odpowiedzi na stres komórkowy oraz wpływać na podziały komórkowe. Warunki stresowe, takie jak niedożywienie lub stres oksydacyjny, często poprzedzają apoptozę, ale są również powszechne w środowisku nowotworowym. W większości tych warunków, ekspresja fragmentów pochodzących z tRNA wzrasta proporcjonalnie [184, 186]. Możliwe, że w zdrowych komórkach fragmenty tRNA funkcjonują, jako wewnętrzne, apoptotyczne cząsteczki sygnałowe lub powodują apoptozę pośrednio, np. za pomocą inhibicji translacji. Można również przypuszczać, że szlak przecinania tRNA powiązany ze stresem oddziałuje lub przechwytuje główne szlaki nowotworowe, co prowadzi do uniknięcia apoptozy i indukcji proliferacji komórek nowotworowych. Niezbędne są dalsze badania, by wyjaśnić dokładnie, w jaki sposób powstają i jaka jest funkcja fragmentów tRNA indukowanych stresem oraz jaka jest ich rola w biologii nowotworów.

1.6.3.2. tRF jako regulatory ekspresji genów

Druga funkcja, jaką przypisuje się fragmentom tRNA to regulacja ekspresji genów. Pierwsze sugestie dotyczące udziału fragmentów tRNA w regulacji i wyciszaniu genów związane były z charakterystyką małych RNA występujących w komórkach zakażonych ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV) [191]. Zidentyfikowano występujący

w dużych ilościach 18-nt mały RNA pochodzący z dwuniciowych hybryd RNA utworzonych przez miejsce wiązania startera wirusa HIV oraz koniec 3' ludzkiego komórkowego tRNA^{Lys}. tRNA^{Lys} jest jednym z trzech RNA (tRNA^{Lys}, tRNA^{Pro}, tRNA^{Trp}) wykorzystywanych przez wirusową odwrotną transkryptazę, jako starter do inicjacji procesu odwrotnej transkrypcji i syntezy DNA [192]. Oddziaływanie cząsteczki 3'tRF pochodzącej z tRNA^{Lys} z białkami Dicer i Ago2 oraz jej zdolność do wyciszania genów w systemie reporterowym sprawiły, że zaproponowano jej udział w procesie komórkowej interferencji RNA, mającej na celu ochronę przed wirusem HIV.

Co ciekawe, ludzki wirus opryszczki zaadoptował szlak biogenezy tRNA w celu wytworzenia w pełni funkcjonalnych wirusowych miRNA. W systemie tym krótkie transkrypty zawierające cząsteczki podobne do 5' tRNA oflankowane przez spinki 3'-pre-miRNA są produkowane przy udziale polimerazy RNA III i następnie cięte przez komórkową RNazę Z w celu uwolnienia pre-miRNA przetwarzanych przez Dicer do dojrzałych wirusowych miRNA [193]. Podobne struktury, dające początek małym RNA, odnaleziono w genomie myszy, co wskazuje na zbieżne wykorzystanie transkryptów polimerazy RNA III do produkcji małych RNA z genomów zarówno ssaczych, jak i wirusowych [193]. W genomie ludzkim wysoce konserwatywny, przypominający strukturę tRNA, mascRNA, powstaje z regionu 3' RNA MALAT1. Jest to długi niekodujący RNA, którego regulacja w wielu ludzkich nowotworach jest zaburzona. MascRNA jest przetwarzany przez RNazę P i RNazę Z, a następnie dodawana jest do niego sekwencja CCA w celu wytworzenia dojrzałego 61-nt transkryptu mascRNA, który jest eksportowany do cytoplazmy [194]. Chociaż funkcja mascRNA pozostaje nieznana, jego istnienie w genomie ludzkim prawdopodobnie nie jest pojedynczym przypadkiem.

System generowania miRNA zaadoptowany przez myszy wirus opryszczki uderzająco przypomina produkcję 3'U tRF opisanego w linii komórkowej raka prostaty [179] i komórkach embrionalnych nerki zainfekowanych ludzkim wirusem HDV [182]. Jednakże w przeciwieństwie do wirusów, nie wykazano dla tego tRF zdolności do wyciszania w systemie reporterowym, co sugeruje, że 3'U tRF działa w szlaku innym niż miRNA [179, 182]. Co więcej, zaobserwowano dominujące oddziaływanie 3'U tRF z białkami Ago3 i Ago4 [182], których funkcja obecnie jest w dużej mierze nieznana. Podobne oddziaływanie dowiedziono również dla białek Ago i 3'CCA tRF, który jednakże wykazuje niewielki efekt wyciszający w systemie reporterowym. Co ciekawe, bardzo podobny 3'CCA tRF

z *Tetrahymena* oddziałuje z niezbędnym dla wzrostu białkiem Piwi - Twi12, co może stanowić dawny szlak regulacji genów lub tworzenia heterochromatyny [195].

Podobnie jak fragmenty pochodzące z 3' tRNA, cząsteczki 5' tRF nie wydają się silnie oddziaływać z Ago2, ale w zamian preferencyjnie oddziałują z Ago1 [185]. Co ciekawe, Ago1 jest zaangażowane w transkrypcyjne wyciszanie genów na drodze tworzenia heterochromatyny przy udziale siRNA oraz miRNA, które namierzają regiony promotorowe w komórkach ludzkich [196]. Sugeruje to udział również fragmentów pochodzących z tRNA w transkrypcyjnym wyciszaniu genów.

Niedawno wykazano, że słabo aminoacylowany ludzki izoakceptor tRNA^{Asp} może przyjąć alternatywną strukturę typu „spinki do włosów” i wiązać się do elementu Alu zawartego w regionie 3'UTR mRNA jego syntetazy aspartyl-tRNA, stabilizując mRNA, by mogła zajść wydajna translacja [197]. Co ciekawe, tRNA^{Asp} wiąże się z elementem Alu poprzez parowanie zasad od pozycji 21 do 55, pozostawiając 20-nt odcinek na końcu 5' tRNA (rozmiarem i swoim położeniem przypominający 5' tRF), który jest dostępny dla nukleaz. Wyniki te wskazują nie tylko na możliwą funkcję wielu izoakceptorów i pseudogenów tRNA, ale również wskazują na nowy sposób wytwarzania tRF.

Ostatnie analizy w oparciu o metody głębokiego sekwencjonowania oraz bioinformatyczne porównanie ludzkich komórek nowotworowych z mysimi komórkami embrionalnymi [198] wykazały obecność 16-18-nt cząsteczek 3'CCA tRF, które nie są przetwarzane przez enzym Dicer, ale są endogennie powiązane z Ago2 i mogą prowadzić do obniżenia ekspresji docelowych RNA *in vitro*. Co ciekawe, te małe cząsteczki tRF są wysoce komplementarne do endogennych retrowirusowych miejsc wiązania primera w genomie ludzkim. Dlatego zaproponowano, że cząsteczki te pełnią rolę w regulowaniu ekspresji endogennych wirusów poprzez szlak interferencji RNA.

Podsumowując, pomimo że fragmenty pochodzące z tRNA wydają się licznie występować w komórkach, to obecnie ich prawdziwa funkcja pozostaje nieznaną. Jednakże coraz więcej dowodów wskazuje na to, że cząsteczki te mogą działać, jako cząsteczki sygnałowe pod wpływem warunków stresowych oraz regulować ekspresję genów poprzez alternatywny mechanizm prawdopodobnie powstały z dawnych szlaków regulatorowych. Konieczne są dodatkowe badania skierowane na poszukiwanie molekularnych partnerów tRF, a także rozwój narzędzi bioinformatycznych do przewidywania ich miejsc docelowych, aby można było wyjaśnić dokładny sposób ich działania.

2. Wprowadzenie i cel pracy

Reprodukcja jest bardzo ważnym procesem życiowym umożliwiającym wydanie potomstwa, co jest warunkiem istnienia gatunków, a złożony proces powstawania komórek płciowych jest regulowany przez znaczną liczbę genów. W ostatnich latach wykazano, że niskocząsteczkowe RNA, takie jak piRNA, miRNA oraz endo-siRNA, a także oddziałujące z nimi białka, odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji genów podczas gametogenezy. Zaburzenia w procesie ich powstawania oraz funkcjonowania powodują liczne defekty w przebiegu gametogenezy, czemu towarzyszą zaburzenia rozrodu. Jak dotychczas poznano tylko niektóre mechanizmy związane z udziałem niskocząsteczkowych RNA w procesie gametogenezy u ssaków, w związku z tym ich rola w powstawaniu komórek płciowych pozostaje przedmiotem intensywnych badań.

Wybór świni domowej (*Sus scrofa domestica*) jako organizmu modelowego do badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej podyktowany został kilkoma czynnikami. Pod względem biologicznym i fizjologicznym jest to organizm bliższy człowiekowi niż na przykład owady i gryzonie, organizmy modelowe dotychczas wykorzystywane w badaniach struktury oraz funkcji piRNA i białek Piwi. Ponadto świnia domowa wykazuje ogromne podobieństwo do człowieka pod względem wielkości, anatomii i fizjologii, dzięki czemu wyniki prowadzonych na niej badań z dużym prawdopodobieństwem będą przekładać się na organizm ludzki.

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy była próba wyjaśnienia na poziomie molekularnym udziału białek Piwi oraz oddziałujących z nimi piRNA w procesie gametogenezy na przykładzie świni domowej. Cel ten obejmował trzy zagadnienia, a mianowicie (1) występowanie oraz rolę białek Piwi, (2) charakterystykę piRNA tworzących kompleksy z białkami Piwi w komórkach płciowych oraz (3) analizę czynników wpływających na specyficzność oddziaływań białek Piwi z piRNA w warunkach *in vitro*.

1. W ramach tego zagadnienia zamierzano ustalić sekwencje świńskich białek Piwi, zbadać ich tkankową specyficzność oraz określić podobieństwo do sekwencji występujących u innych ssaków. Ponadto postanowiono ustalić jak zmienia się ekspresja genów *Piwi* w gonadach męskich i żeńskich podczas dojrzewania tych zwierząt, a także poprzez porównanie ich ekspresji w jajnikach i jądrach uzyskać odpowiedź na pytanie, czy białka Piwi regulują proces oogenezy u *S. scrofa*.

2. Zamierzano także dokonać charakterystyki frakcji piRNA występującej w męskich i żeńskich gonadach *S. scrofa*. W związku z możliwością wykonania głębokiego sekwencjonowania rozszerzono to zadanie o analizę bioinformatyczną roli piRNA w spermatogenezie i oogenezie. Ponadto korzystając z uzyskanych danych postanowiono podjąć próbę charakterystyki innych niskocząsteczkowych RNA występujących w gonadach świni domowej.
3. Ostatnim zadaniem planowanych badań było skonstruowanie wektorów do nadprodukcji białek Piwi w systemie bakteryjnym, ich nadekspresja i oczyszczenie, a także zbadanie ich oddziaływań z niskocząsteczkowymi RNA.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Zmiany ekspresji genów *Piwi* oraz piRNA na różnych etapach rozwoju *S. scrofa*

3.1.1. Identyfikacja genów *Piwi* w genomie *S. scrofa*

W celu zidentyfikowania genów *Piwi* w genomie *S. scrofa* przeszukano aktualnie dostępne bazy danych, zawierające genowe sekwencje nukleotydowe różnych organizmów, takie jak NCBI oraz Ensembl. Przy użyciu programu BLAST poszukiwano sekwencji homologicznych do wcześniej zidentyfikowanych sekwencji kodujących mysich i ludzkich białek *Piwi*. Analiza ta pozwoliła na zidentyfikowanie przypuszczalnych sekwencji kodujących trzech genów *Piwi* w genomie świni domowej, które następnie zostały powielone techniką PCR i wklonowane do plazmidu. Po namnożeniu w hodowli bakteryjnej ustalono ich sekwencję z zastosowaniem sekwencjonowania automatycznego przy użyciu 8 starterów dla każdego genu. W celu wyeliminowania błędów ustalono sekwencje obydwu nici DNA. Otrzymane sekwencje kodujące zostały opublikowane w bazie danych GenBank z następującymi numerami dostępu: mRNA białka *Piwi1* – JX036536, mRNA białka *Piwi2* – JX036537 oraz mRNA białka *Piwi4* – JX036538. Co ciekawe, sekwencje te wykazują pewne różnice w stosunku do wcześniej zdeponowanych w bazach danych domniemanych sekwencji białek *Piwi* oraz sekwencji pochodzących ze świni chińskiej rasy Taihu [199]. Porównując Linię 990 oraz rasę Taihu obserwuje się w przypadku białka *Piwi1* trzy zmiany aminokwasów w pozycji 189, 231 oraz 605, natomiast w przypadku białka *Piwi2* zmiana dotyczy aminokwasu 435. Co ciekawe, u obu osobników zidentyfikowano dodatkowych 11 aminokwasów obecnych w białku *Piwi4*, które nie występowały w przypuszczalnych sekwencjach zdeponowanych w bazach danych. Zmiany te, przedstawione w tabeli 3, mogą wynikać z różnych ras świń użytych jako organizmy modelowe, linii 990 hodowanej w Polsce oraz chińskiej rasy Taihu, wykazujących różnice fenotypowe. Na poziomie sekwencji nukleotydowej wykryto znacznie więcej różnic, jednakże nie miały one wpływu na zmianę sekwencji aminokwasowej, dlatego mogą one zostać potraktowane jako polimorfizm nukleotydowy.

3.1.2. Zachowawczość ewolucyjna sekwencji aminokwasowej białek Piwi u ssaków

Analiza otwartej ramki odczytu genów *Piwi* u świni domowej wykazała następujące długości sekwencji aminokwasowych białek Piwi: Piwil1 – 861 aa, Piwil2 – 985 aa oraz Piwil4 – 853 aa (Tab. 4). Przy użyciu programu ClustalW przeprowadzono porównanie sekwencji białek Piwi obecnych u *S. scrofa* w stosunku do sekwencji występujących u innych organizmów: człowieka (*Homo sapiens*), rezusa (*Macaca mulatta*), szympansa (*Pan troglodytes*), myszy (*Mus musculus*) oraz szczura (*Rattus norvegicus*). Największą zachowawczość w stosunku do sekwencji białek Piwi u innych ssaków zaobserwowano w przypadku białka Piwil1, gdzie zbieżność sekwencji wynosiła 96-98%. Dla białka Piwil2 zachowawczość była nieco mniejsza, a sekwencje były identyczne w 84-87%. Natomiast najniższe podobieństwo, wynoszące 66-80%, stwierdzono w przypadku białka Piwil4 (Tab. 4).

Tabela 3. Różnice w sekwencji aminokwasowej białek Piwi.

Białko	Przypuszczalne sekwencje zdeponowane w bazie danych NCBI oraz Ensemble	Linia 990	Taihu
Piwil1	189aa - Glu		189aa - Gly
	231aa – Asn		231aa – Ser
	605aa - Ala		605aa - Thr
Piwil2	brak 11 aminokwasów	11 dodatkowych aminokwasów (170-181)	
	435aa - Asn		435aa - Ser
Piwil4	69aa – Ala	69aa - Thr	brak danych
	191aa - Ala	191aa - Val	

Tabela 4. Porównanie zachowawczości sekwencji aminokwasowych trzech białek Piwi u świni domowej w stosunku do sekwencji występujących u innych ssaków.

Białko	Organizm	Długość (aa)	Organizm	Długość (aa)	Podobieństwo (%)
Piwi1	<i>Sus scrofa</i>	861	<i>Homo sapiens</i>	861	96
	<i>Sus scrofa</i>	861	<i>Macaca mulatta</i>	861	96
	<i>Sus scrofa</i>	861	<i>Mus musculus</i>	862	98
	<i>Sus scrofa</i>	861	<i>Pan troglodytes</i>	861	96
	<i>Sus scrofa</i>	861	<i>Rattus norvegicus</i>	862	98
Piwi2	<i>Sus scrofa</i>	985	<i>Homo sapiens</i>	973	86
	<i>Sus scrofa</i>	985	<i>Macaca mulatta</i>	973	87
	<i>Sus scrofa</i>	985	<i>Mus musculus</i>	971	84
	<i>Sus scrofa</i>	985	<i>Pan troglodytes</i>	973	86
	<i>Sus scrofa</i>	985	<i>Rattus norvegicus</i>	971	85
Piwi4	<i>Sus scrofa</i>	853	<i>Homo sapiens</i>	852	81
	<i>Sus scrofa</i>	853	<i>Macaca mulatta</i>	852	80
	<i>Sus scrofa</i>	853	<i>Mus musculus</i>	878	66
	<i>Sus scrofa</i>	853	<i>Pan troglodytes</i>	852	80
	<i>Sus scrofa</i>	853	<i>Rattus norvegicus</i>	848	74

Tabelę stworzono w oparciu o sekwencje aminokwasowe białek Piwi, znajdujące się w bazie danych GenBank, posiadające następujące numeru dostępu: *Mus musculus* – NP_067286 (Piwi1), NP_067283 (Piwi2), NP_808573 (Piwi4); *Homo sapiens* - NP_004755 (izoforma 1 Piwi1), NP_001129193 (Piwi2), NP_689644 (Piwi4); *Macaca mulatta* - NP_001182640 (Piwi1), NP_001182592 (Piwi2), NP_001182443 (Piwi4); *Pan troglodytes* - XP_001137815 (przewidywana izoforma 1 Piwi1), XP_528083 (przewidywane Piwi2), XP_001143022 (przewidywana izoforma 1 Piwi4); *Rattus norvegicus* – NP_001102323 (Piwi1), NP_001100746 (Piwi2), Q4G033 (Piwi4).

Poznano również lokalizację trzech genów kodujących białka Piwi na chromosomach u świni domowej. Geny *Piwi1* oraz *Piwi2* znajdują się na chromosomie 14, natomiast gen *Piwi4* znajduje się na chromosomie 9. Rozmieszczenie genów *Piwi* w genomie świni różni się w porównaniu do innych ssaków. Dla przykładu w genomie człowieka geny dla białek PIWI zlokalizowane są oddzielnie na następujących chromosomach: *PIWIL1* – 12, *PIWIL2* – 8 oraz *PIWIL4* – 11. Co ciekawe, u myszy lokalizacja genów białek Piwi na chromosomach jest podobna do ich lokalizacji u *S. scrofa*. Geny *Piwi2* i *Piwi4* występują na tych samych chromosomach co u świni domowej, a mianowicie chromosomach 14 i 9, natomiast gen *Piwi1* zlokalizowany jest na chromosomie 5. Obserwowane rozbieżności w lokalizacji genów *Piwi* na chromosomach w genomach człowieka, świni oraz myszy mogą wynikać

z różnic w ilości chromosomów u tych organizmów. Człowiek posiada 46, świnia 40, a mysz 38 chromosomów. Co ciekawe, pomimo że geny *Piwi* u świni i myszy wykazują podobną lokalizację chromosomową, to największe podobieństwo sekwencji aminokwasowej białek *Piwi* u świni obserwuje się nie w stosunku do gryzoni, lecz do naczelnych.

Porównanie sekwencji aminokwasowych białek *Piwi* świni domowej pozwoliło na identyfikację dwóch zachowawczych domen białkowych: PAZ i PIWI (Rys. 8). Domena PAZ, która zlokalizowana jest pośrodku sekwencji białek *Piwi*, występuje również w białkach podrodziny *Ago* i odpowiada za oddziaływanie białek z końcem 3' niskocząsteczkowych RNA (miRNA, siRNA oraz piRNA) [200]. Niedawno przeprowadzone badania strukturalne przy użyciu metod krystalograficznych oraz spektroskopii NMR wykazały, że domena PAZ mysiego białka *Piwi1* oraz ludzkiego białka *PIWIL2* tworzy stabilne kompleksy z piRNA [201, 202]. Natomiast druga domena - PIWI - znajduje się przy C-końcu białek *Piwi* i w przypadku niektórych białek rodziny Argonaute posiada ona aktywność endonukleazy zdolnej do przecinania łańcucha RNA [200].

Piwi11	-----MTGRARARARGRARGQET-----	18
Piwi14	-----MSGRARVRARGLARS LG-----	17
Piwi12	MDPVRPPSRVLSVPHVPSRVRMPGSRPQASKPLDSALGRAGPSGRGHVFGMGEEPSQSG	60
	*** ** . .	
Piwi11	-----AQHVG--AAASQPGYMQ	34
Piwi14	-----ATDVGRIPASAASPPSVA	35
Piwi12	PTQRESVGLVPMFQGLGLETASQTSLKQEMPPLGRGILGRGLSTRVARKDKEEHPHTLLD	120
	: * . * :	
Piwi11	PRPQQP-----PAEGELVGRGRQRTVGATAKSQLQISAGFQE	73
Piwi14	LSDSEA-----SSSTDFVGTSR-----ISQKYAGGISGGAD	67
Piwi12	PSVLAAGDSKMAEASFGWNRMLGRGNLDASLLPVGRAG-RGIRGVVYKPLSAPSLTGVIG	179
	. : . ** . : *	
Piwi11	LSLAERGRRR-DFHDLG-----VNTRQNLDHVESKTSGSSGIIVRLS	115
Piwi14	CTFKERGGKIRGDMDLA-----VCTRETLAHRVDCCTGSSGIPVKLV	110
Piwi12	RGVYKAPGLTSPDPAQLSSPSPLPAPLHSLDHPPLGTAEHKEKILVKQSGKGTPOYLQ	239
	. : * * : * . : * : * : * : * : *	
Piwi11	TNHFRLTSRPQWALYQYHIDYNPLMEARRLSALLFQHEDLIGRCHAFDGTILFLPKRLQ	175
Piwi14	TNLFNLDLPPDWLYQYHVTYSPDIESRRLRIALLYSHRELSKAKAFDGVILFSLQKLE	190
Piwi12	LNLIKIQQN-EAVYQYHVTSPNVECKRMRFGMLRDHQAVTGNTPFDGSLYLVPVKLQ	278
	* : . : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Piwi11	HKVTEVFSQTRNGEHRVITITLTLNELPPTSPTCLQFYNIIFRLLKIMNLQQIGRNYNYP	235
Piwi14	AKVTELSTETQRGETVMTIVLTRELPASSFVCIQVFSIIFKKILKRLSMYQIGRNYFKP	230
Piwi12	QVLELKSQRKTDSEAITIKIQLTKILEPCSDLCPFYNVVFRVVKLLDMLTVGRNFYDP	358
	: . . : * * * . * * * : . : * : * : * : * : *	
Piwi11	SDPIDPNHRLVIWPGFTTSLQYENIMLCTDVSHKVLRS	295
Piwi14	SEPVEIPQHKLSPGFAVSVSHFESRLLFSAVSYKILR	290
Piwi12	IRVMVLQHRQLQWPGYAAIRRTDGLFLADVSHKVI	417
	: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Piwi11	QEQVSKELIGLIVLTKYNNKTYRVDIDWDQNPKSTFKKADGSEVSEFLEYRQYQOIEI	355
Piwi14	LETCEKELGLIVLTRYNNKTYRIDDIWSVKPHTFKRQDGTETTYVDYKQYDITLS	350
Piwi12	KDECTLLVGSIVITRYNNRTYRIDDDWNTKPKDSPTMSDGKEITFLEYSKNYGITVR	477
	: * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Piwi11	DLKQPVLSVQPKRRRGGGTLPG-PAMLIPELCYLTGLD	414
Piwi14	DLNQPVLSRSLKSKRN-DDTEAR-MIHLIPELCFTGLG	408
Piwi12	SEDOPLLIHRPSERONNOGMLKGEILLLPELSFMTGIE	537
	: . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Piwi11	EQRQREVGRLLIDYIHKDDNVQRELRDWGLSFDNLLSFGSRI	474
Piwi14	LGRQORVARLADDIQNKDARFELETWGLHFG-CQMSLTGRVVPSEKILMQDHICQP-VS	466
Piwi12	KQHDALECLLQRISKNEIANNELTRWGLCLQKDVHKVEGRVLPMERINLRSTSFIP-SQ	596
	: : * * : * : * : * * * : . . * : * : * : *	
Piwi11	FADWSKETRGAPLISVKPLDNWLLIYTRRNYEAANSIQNLKVT	534
Piwi14	AADWSKDMRACKILSAQSLKWLIIFSNRAESVTEFLNCLR	526
Piwi12	ELNWMKEITRDLSTLTPMHFWALFYPKRAVDQARELVNMLEK	656
	: * * : . . . * : * : * : * : * : * : * : *	
Piwi11	DD-RTEAYLRVLIQ-QKVTSDTQ	591
Piwi14	QE-NPAAFLHAIQ--KHVDPEVQ	583
Piwi12	KDDRIETYVRTIQSILGVEGKIC	716
	: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Piwi11	GKQQTVMAIATKIALQMNCKMGELWRVDMPLKAMIVGIDCYHDTTAGRRSIAGFVASI	651
Piwi14	SKQGMIMSIAATKIALQMAKLGELWALEIPLKALMVVGIACVKDAPSQGTVVVGFVAST	643
Piwi12	SQPTKLSVAQKILLQINCKLGGELWVDIPLKQLMVI	776
	: : . : * * * * : * : * * * : * : * : * : *	
Piwi11	NEGMRWFSRVCFQDRGQELVDGLKVLQALRAWNSCNEYMPSRI	711
Piwi14	NPRI TRWFSRCILQRSSTADIADCLKVMTGALNRWYKHHGLPARI	703
Piwi12	NLTLTKWHSQVVFQMPHOEIVDSLKLVGSLKFKYOVNHCLPEKIVVYR	836
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Piwi11	LVNYEVPQLDCLKSVGRGNPRLTVIVVKRVRNARFFAQSGGRLQNP	771
Piwi14	LIDYEVPLLASVTDASNTSPRLSVIVVRRRCTPRFLTESGRTLENP	763
Piwi12	VAGFEIPOLQOCFEAFON-YOPKVVVVFVOKKISTNLYLAAOHVFT	895
	: . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Piwi11	PEWYDFIVSQAVRSGSVSPHYNVIYDSSGLKPDHIQRLTYKLC	831
Piwi14	PEWYDFYLSQVARQGTNVNPTYYNVIYDNGLKPDMQRLTFKLC	823
Piwi12	CEWVDFYLAHVROGCGIPTHYCVLNTANLSPDHMRQLTFKLC	955
	** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Piwi11	CQYAKHLAFLVGGSIHREPNSLSNRLYYL	861
Piwi14	CQYARKLTLVAQSIHKEPSLELANSLFYL	853
Piwi12	CKYAKHLAFLSGQILHREPAIQLCENLFFL	985
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

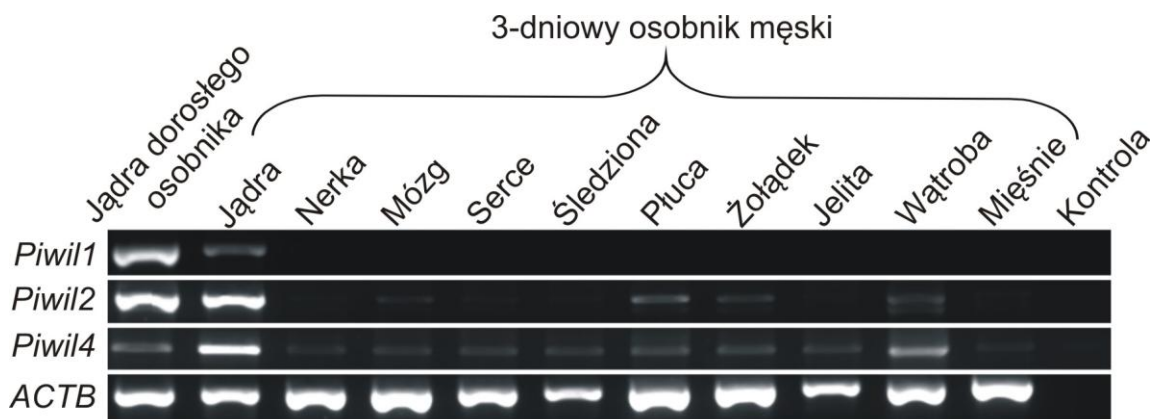
DOMENA PAZ

DOMENA PIWI

Rysunek 8. Porównanie sekwencji trzech białek Piwi występujących u świni domowej. Na rysunku zaznaczono domeny PAZ i PIWI.

3.1.3. Tkankowo specyficzna ekspresja genów *Piwi* u świni domowej

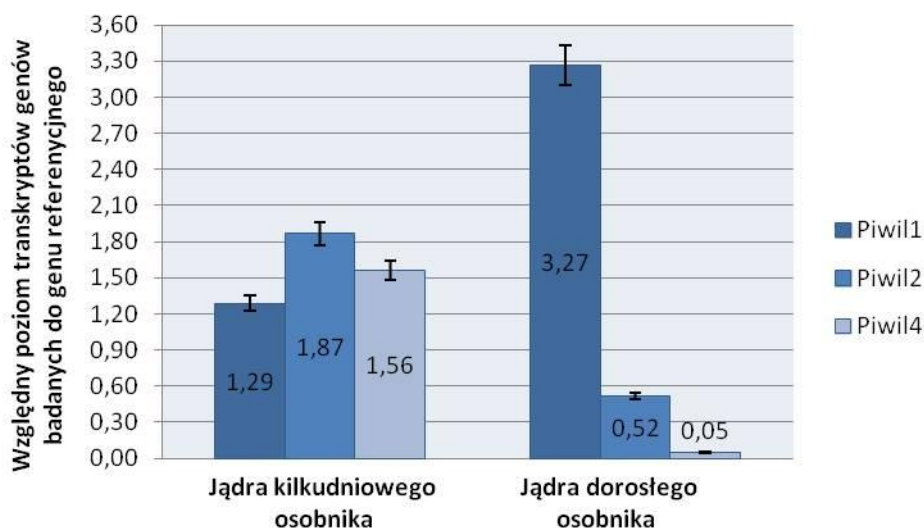
Do analizy ekspresji genów *Piwil1*, *Piwil2* i *Piwil4* w tkankach świni domowej wykorzystano metodę RT-PCR (ang. *reverse transcription polymerase chain reaction*). Ekspresję badano w jądrach dorosłego osobnika oraz jądrach, nerce, mózgu, sercu, śledzionie, płucach, żołądku, jelitach oraz mięśniach 3-dniowego osobnika. Analiza wykazała, że badane świńskie geny *Piwi* ulegają specyficznej ekspresji wyłącznie w jądrach (Rys. 9). Ekspresja genu *Piwil1* występowała głównie w jądrach dorosłego osobnika i była znacznie słabsza w przypadku jąder młodego samca. Ekspresja genu *Piwil2* zachodziła na zbliżonym poziomie u obu osobników, natomiast ekspresja genu *Piwil4* ograniczała się przede wszystkim do jąder młodego osobnika. Zaobserwowano również relatywnie bardzo niską ilość transkryptów w przypadku genów *Piwil2* oraz *Piwil4* w płucach i wątrobie. Jednakże ekspresja genów *Piwi* w tkankach innych niż jądra nie została wykryta przy zastosowaniu wielokrotnie czulszej metody PCR w czasie rzeczywistym. Uzyskane wyniki, dotyczące tkankowo specyficznej ekspresji genów *Piwi* u świni, są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami na temat ekspresji genów *Piwi* u myszy, które pokazują, że ekspresja ta u osobników męskich jest ograniczona tylko do jąder [104, 105].



Rysunek 9. Tkankowo specyficzna ekspresja genów *Piwi* w jądrach dorosłego i 3-dniowego osobnika oraz w dziewięciu tkankach somatycznych pochodzących z 3-dniowego osobnika. Ekspresję genów wykryto metodą RT-PCR. Jako kontrolę wewnętrzną wykorzystano ekspresję genu *ACTB*.

3.1.4. Analiza względnej ilości transkryptów genów *Piwi* w jądrach świni domowej

Przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono analizę względnej ilości transkryptów genów *Piwi* w jądrach kilkudniowego oraz dorosłego osobnika. Porównanie względnej ilości transkryptów genów *Piwi* w obu tkankach wykazało, że największe zmiany w poziomie ekspresji dotyczą genu *Piwil4* (Rys. 10). Zaobserwowano wysoki poziom mRNA białka *Piwil4* w jądrach kilkudniowego osobnika oraz ponad 30-krotnie niższy w przypadku dojrzałego płciowo, 2-letniego samca. Także ekspresja genu *Piwil2* jest 3,5-krotnie niższa u dorosłego osobnika w porównaniu do kilkudniowego prosięcia. Natomiast w przeciwieństwie do spadku ekspresji genów *Piwil2* oraz *Piwil4*, zaobserwowano 2,5-krotnie wyższy poziom transkryptu genu *Piwil1* w jądrach dojrzałego płciowo samca w porównaniu do nowo narodzonego osobnika.



Rysunek 10. Względny poziom transkryptów (+/- SEM) genów *Piwil1*, *Piwil2*, *Piwil4* w jądrach kilkudniowego i dorosłego osobnika w odniesieniu do genu referencyjnego *ACTB*.

Obserwowane zmiany we względnym poziomie transkryptów genów *Piwi* w zależności od wieku i dojrzałości płciowej osobnika wynikają ze zróżnicowanej ekspresji genów *Piwi* podczas rozwoju osobniczego. Wykazano, że ekspresja mysiego genu *Piwil4* (*Miwi2*) zachodzi w bardzo wąskim przedziale czasowym, a mianowicie białko to występuje w embrionalnych prospermatogoniach oraz w bardzo wczesnych spermatogoniach przez kilka dni po urodzeniu [103, 122]. Analiza przeprowadzona w gonadach męskich świni potwierdza bardzo niewielką, a wręcz znikomą w porównaniu do innych genów *Piwi*, ekspresję genu *Piwil4* u dorosłego osobnika. Jeśli chodzi o mysie białko *Piwil2* (*Mili*), to podobnie jak białko

Piwil4, występuje ono już w prospermatogoniach, ale jego ekspresja trwa dłużej i kończy się około 20 dni po narodzinach osobnika na etapie wykształcenia okrągłych spermatyd. W przeciwieństwie do myszy, ekspresja genu *Piwil2* u dojrzałego płciowo samca świni domowej pozostaje wciąż na dość znaczącym poziomie. Ekspresja białka Piwil1 (Miwi) u myszy rozpoczyna się około 14 dni po narodzeniu w fazie pachytenu profazy pierwszego podziału mejotycznego. W przypadku *S. scrofa* wysoką ekspresję genu *Piwil1* zaobserwowano już u 3-dniowego osobnika.

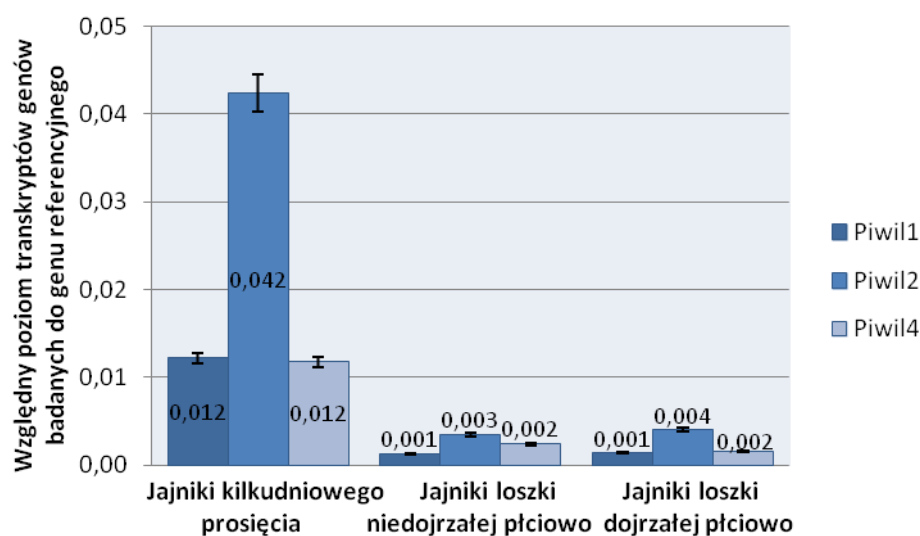
3.1.5. Analiza względnej ilości transkryptów genów *Piwi* w jajnikach świni domowej

Oogeneza jest złożonym procesem, który rozpoczyna się w gonadach już podczas życia płodowego, kiedy to żeńskie komórki płciowe dzielą się mitotycznie i rozpoczynają podział mejotyczny, a kończy się uwolnieniem oocytu do jajowodu u dojrzałych płciowo samic. Oocyt umiejscowiony w pęcherzyku jajnikowym pozostaje w bliskim kontakcie z otaczającymi go komórkami pęcherzykowymi, które wspomagają jego wzrost i dojrzewanie. Do oddziaływania oocytu z komórkami warstwy ziarnistej niezbędnych jest kilka genów kodujących, na przykład czynniki parakrynowe, które ulegają ekspresji w jajniku.

W ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej postawiono sobie pytanie czy białka *Piwi* oraz oddziałujące z nimi piRNA ulegają ekspresji w jajnikach świni, a jeśli tak to czy ekspresja genów *Piwi* zmienia się na różnych etapach rozwoju osobniczego samicy, podobnie jak ekspresja genów *Piwi* u samców. W tym celu wykonano analizę względnej ilości transkryptów genów *Piwi* w jajnikach pobranych od samic różniących się wiekiem i dojrzałością płciową, a mianowicie jajnikach kilkudniowego prosięcia, 6-miesięcznej, niedojrzałej płciowo loszki oraz 1-roczonej, dojrzałej płciowo loszki. Analiza techniką PCR w czasie rzeczywistym wykazała, że w jajnikach występuje znacznie niższy poziom ekspresji genów *Piwi* w porównaniu do ich ekspresji w jądrach (Rys. 11). Największą różnicę stwierdzono w przypadku ekspresji genu *Piwil1*, gdzie względny poziom transkryptu w jajnikach dojrzałej płciowo loszki jest ponad 2000 razy mniejszy w porównaniu do względnego poziomu transkryptu genu *Piwil1* w jądrach dorosłego samca. Natomiast najmniejsza zaobserwowana różnica dotyczy ekspresji genu *Piwil2*, w przypadku którego względny poziom transkryptu w jajnikach kilkudniowego prosięcia jest 44 razy mniejszy w stosunku do względnego poziomu transkryptu genu *Piwil2* w jądrach kilkudniowego

osobnika. W przypadku genów *Piwi* u myszy również wykazano, że ich ekspresja w jądrach zachodzi na znacznie większym poziomie niż w jajnikach [203].

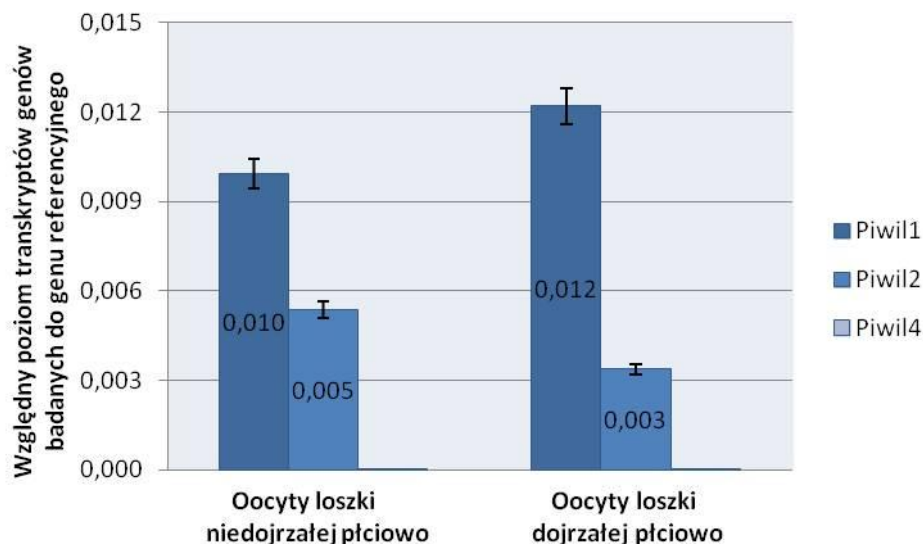
Dodatkowo analiza wykazała, że ekspresja genów *Piwi* jest generalnie wyższa w jajnikach kilkudniowego prosięcia niż w jajnikach dorosłych samic. Poziom ekspresji genu *Piwi2* jest 12-krotnie wyższy w jajnikach nowo narodzonej samicy w porównaniu do jego ekspresji w jajnikach dojrzałej płciowo samicy. W jajnikach 3-dniowych osobników poziom ekspresji genów *Piwi1* oraz *Piwi4* jest porównywalny, natomiast poziom mRNA dla białka *Piwi2* jest prawie 4-krotnie wyższy. Wraz z wiekiem loszki poziom transkryptów genów *Piwi* w jajnikach obniża się kilkukrotnie i dla 6-miesięcznych loszek niedojrzałych płciowo oraz 12-miesięcznych loszek dojrzałych płciowo jest niemal identyczny.



Rysunek 11. Względny poziom transkryptów (+/- SEM) genów *Piwi1*, *Piwi2*, *Piwi4* w jajnikach kilkudniowego prosięcia oraz loszki niedojrzałej i dojrzałej płciowo.

3.1.6. Analiza względnej ilości transkryptów genów *Piwi* w oocytach świni domowej

Podobnie jak w przypadku jajników, względny poziom transkryptów genów *Piwi1*, *Piwi2* oraz *Piwi4* w oocytach pozyskanych z loszek niedojrzałych i dojrzałych płciowo jest znacznie mniejszy w porównaniu do ich ekspresji w jądrach (Rys. 12). W obydwu rodzajach oocytów obserwuje się porównywalny, niski poziom ekspresji mRNA dla białek *Piwi1* i *Piwi2* oraz brak ekspresji genu *Piwi4*. Wynik ten jest o tyle interesujący, że w oocytach myszy obserwowano wyłącznie ekspresję mRNA dla białka *Piwi2* [140].



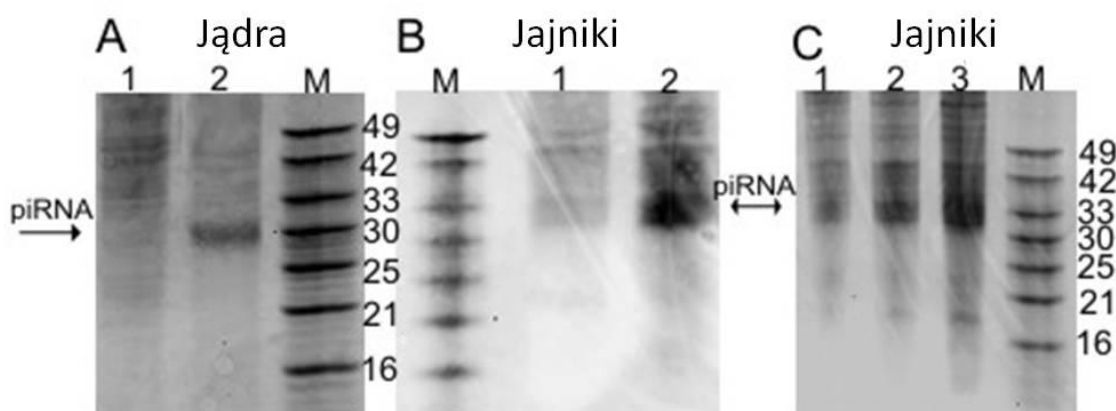
Rysunek 12. Względny poziom transkryptów (+/- SEM) genów *Piwil1*, *Piwil2*, *Piwil4* w oocytach loszki niedojrzalej i dojrzalej płciowo.

3.1.7. Wstępna analiza piRNA występujących w gonadach niedojrzałych i dojrziałych płciowo osobników

Cechą wyróżniającą białka Piwi wśród innych białek rodziny Argonaute jest ich występowanie w kompleksach z piRNA. Męskie komórki płciowe u myszy zawierają duże ilości różnych cząsteczek piRNA i szacuje się, że ich liczba jest nawet o trzy rzędy wielkości większa niż liczba innych, występujących w jądrach, niskocząsteczkowy RNA – miRNA oraz siRNA [204].

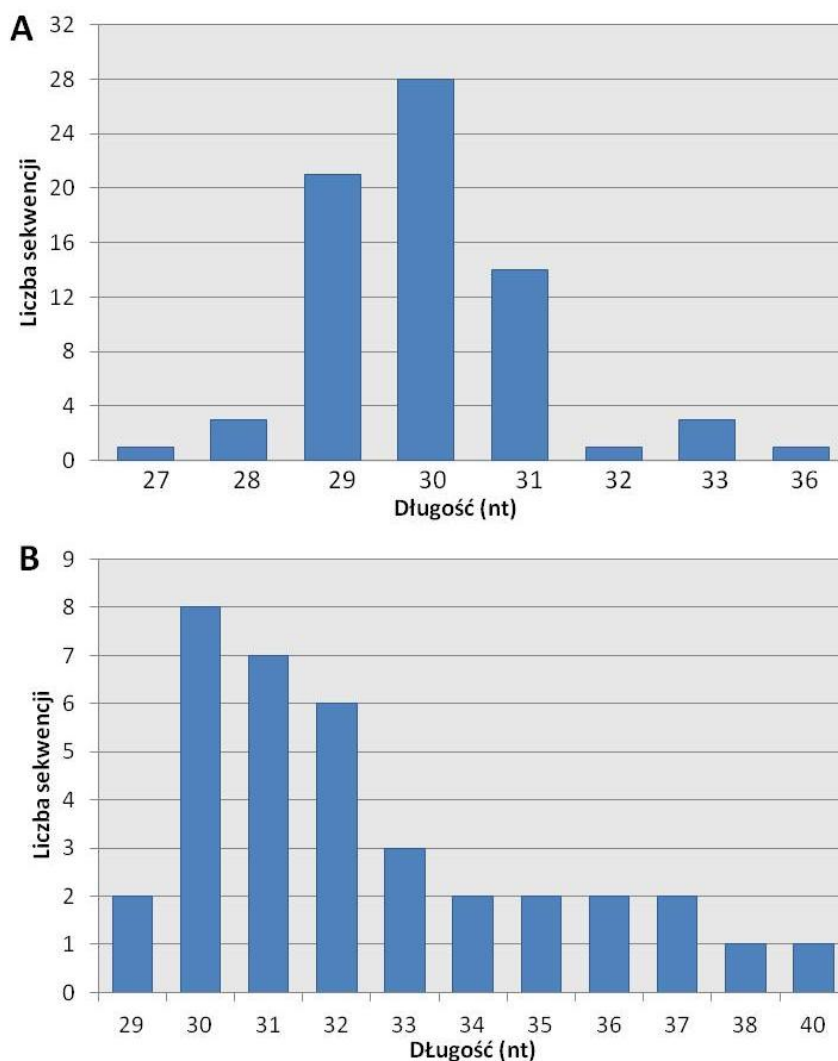
W ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej przeanalizowano frakcję niskocząsteczkowych RNA wyizolowanych z jąder i jajników osobników znajdujących się na różnym etapie rozwoju osobniczego (Rys. 13). Stwierdzono występowanie frakcji niskocząsteczkowych RNA o długości ok. 30 nt w gonadach osobników dojrziałych płciowo. Dla kilkudniowych osobników ekspresja tych RNA była dużo mniejsza. W pierwszym etapie analizy sprawdzono czy pula małych RNA o długości około 30 nt widoczna na żelu poliakryloamidowym to cząsteczki piRNA. W tym celu pulę niskocząsteczkowych RNA odzyskano z żelu, wklonowano do wektora i zsekwencjonowano przy użyciu standardowej metody sekwencjonowania. Przeprowadzona analiza wykazała, że we frakcji niskocząsteczkowych RNA wyizolowanej z gonad świni dominują cząsteczki o długości 29-31 nt w przypadku jąder oraz 30-37 nt w przypadku jajników (Rys. 14).

Uzyskane wyniki były zgodne z danymi na temat typowej dla ssaków długości cząsteczek piRNA [205, 206].



Rysunek 13. Frakcja około 30-nt piRNA zidentyfikowana w jądrach i jajnikach *S. scrofa*. RNA wzbogacone w niskocząsteczkowe RNA wyizolowano z A – jąder kilkudniowego (1) oraz dorosłego (2) osobnika; B – jajników kilkudniowej (1) oraz dojrzałej płciowo (2) samicy; C – jajników 3-miesięcznej (1), niedojrzałej (2) i dojrzałej (3) płciowo loszki. Na 15% żel poliakryloamidowy nakładano 8µg niskocząsteczkowego RNA. Żel wybarwiano barwnikiem SYBR Gold. M – marker wielkości RNA zawierający oligomery o długości od 16 do 49 nt.

Chcąc definitywnie potwierdzić, że analizowana frakcja niskocząsteczkowych RNA zawiera piRNA, uzyskane sekwencje porównano z innymi sekwencjami piRNA zdeponowanymi w bazie danych piRNA [207]. Zaobserwowano, że większość uzyskanych sekwencji piRNA, występujących w gonadach świni, jest identyczna, jak sekwencje piRNA wcześniej zdeponowane w bazie danych, pochodzące z takich organizmów jak człowiek, mysz, szczur, danio pręgowany, muszka owocowa [Tab. 5 i 6]. Ponadto wszystkie uzyskane sekwencje piRNA mapowały do regionów niekodujących genomu świni i wykazywały tym samym cechy podobne do piRNA występujących u myszy [205, 206]. Powyższa analiza potwierdziła, że frakcja niskocząsteczkowych RNA obserwowana na żelu poliakryloamidowym to bez wątpienia cząsteczki piRNA.



Rysunek 14. Rozkład wielkości piRNA wyizolowanych z jąder (A) i jajników (B) *S. scrofa* wklonowanych do wektora i sekwencjonowanych przy użyciu standardowej metody sekwencjonowania.

Porównując na żelu frakcję piRNA, obecną w jądrach i jajnikach niedojrzałych oraz dojrzałych płciowo osobników, zauważa się pewne różnice (Rys. 13). Znaczące zmiany w poziomie ekspresji piRNA w gonadach obserwuje się w przypadku kilkudniowych oraz dorosłych (starszych niż 1 rok) zwierząt. W jądrach i jajnikach nowo narodzonych osobników ilość piRNA wydaje się być na bardzo niskim poziomie. Jednakże podczas rozwoju osobniczego poziom ekspresji piRNA w obu gonadach znacznie wzrasta. Dodatkowo nie zaobserwowano znaczących różnic w ilości piRNA w przypadku jajników niedojrzałych i dojrzałych płciowo samic, co może sugerować, że piRNA prawdopodobnie mają mniej znaczący wpływ na rozwój oocytów.

Tabela 5. Wybrane piRNA zidentyfikowane w jądrach świni domowej.

piRNA	Sekwencja	Długość (nt)	Chromosom	Nić	Początek	Koniec	Organizm
piR1	ATGCCCAAGGCTTCCATCTTCTATCTAGAAA	31	11	+	7424377	7424406	Człowiek
piR2	TGATCTCGTGACAGATACTGTTGGTTCCA	30	14	-	42960799	42960828	-
piR3	CAGGAATCCTAACCGCTAGACCATGTGGGA	30	11	-	21192800	21192829	Danio pręgowane
			1	-	148851467	148851496	
			1	+	10249811	10249840	
			X	+	98879286	98879315	
			11	-	24760363	24760392	
15	+	29171482	29171511				
piR4	TGCCAAGCCTGGGAACCTTCCATATGGCGCA	30	1	-	263196213	263196241	-
piR8	TGAACCCTTGGCCTCCTGGCTTGCCCTGTCCC	32	5	-	6968806	6968837	-
piR10	TAGCTAAGAGCAAGTAAATTAGCCTGAGAGT	31	11	-	7508625	7508655	-
piR12	GGCATTATATATCTTCTTTTGTGAAGTGT	31	X	-	95574195	95574225	Człowiek, Mysz, Szczur
			9	-	38439769	38439799	
			1	+	229842641	229842671	
			1	+	22278590	22278620	
			6	-	8970594	8970620	
piR13	ACACAAAGGTAATTTTGTGTATTACCAACA	31	2	+	15120696	15120726	Szczur
piR14	GACTCCAAGTTCGGAGACCTGGACAATTA	31	2	+	15105010	15105040	-
piR15	ACACACAATACATTAACATCATTCTCTTCA	31	7	+	117966082	117966111	-
piR16	TAACAGAATGCAGTCTGGTTTCATTTGAGC	30	7	+	34501596	34501625	Człowiek, Mysz, Szczur
piR17	TGGCGTCAAGGACTGTGTTTTAACCATTA	30	11	+	7507722	7507751	-
piR18	TAATACAGCCCTTGCCTGCCTCCTGCGG	29	5	-	6967095	6967123	-
piR19	TGGTGACTTGAGCCTTAGTTTCCCTGCAC	29	7	+	34484853	34484881	Danio pręgowane
piR20	AACACTCATCATCAAAGTCGGGCTTATTG	29	7	-	93568325	93568353	-

piR21	TAAACCGCCAGCCAAGATGGGATTTGCTTT	31	11	-	7508683	7508713	-
piR22	TGAATTCATAGTCTTTCTCTCTGGTGACC	31	7	-	34470745	34470775	-
piR23	GCCGCCAGTTTACACCACAGCAATGTGGGAA	31	3	+	54061408	54061437	-
piR24	TATTTATGTGATTAAGTGCAAAGCAGTGTC	31	13	-	94285852	94285882	-
piR25	TGCTCTGAACCTCCTCATGTTGCTTACCTGT	31	14	-	42961244	42961274	-
piR26	TGAGTCCTTTGTCTTGCAAAATGCTCGTGG	30	7	+	34505404	34505433	-
piR27	TGAAGGAGCCTGTGAATTGCTCGTGGTGGT	30	7	-	117959055	117959083	-
piR28	TTGCCAGTGATTGGTTAGGCATGGCCATG	30	5	-	6959461	6959490	Człowiek
piR29	CAGGAATCCTAACCGCTAGACCATATGGGA	30	11	-	24760363	24760392	Danio pręgowane
			15	+	29171482	29171511	
			11	-	21192800	21192829	
			X	+	98879286	98879315	
			1	+	10249811	10249840	
piR30	ACCTATTACCCATCTTGACAGGTCCAAACA	31	7	+	117968527	117968557	Człowiek
piR31	TACCGTCCATCATGACTGGGAAATGGGGTA	30	7	-	95915826	95915855	-
piR32	TGCTCTCACAGTGATCACCTTGCCAGAGT	30	14	-	42963746	42963775	-
			14	+	42978343	42978372	
			14	+	43091557	43091586	
piR33	TCCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATTCTG	30	X	-	98879286	98879315	Danio pręgowane
			11	+	21192800	21192829	
			1	-	10249811	10249840	
			1	+	148851467	148851496	
			15	-	29171482	29171511	
			11	+	24760363	24760392	
piR34	TTCTAACAAGCTCCCTGGAGAATTCACCCA	30	6	-	31978195	31978224	Mysz
			6	+	31880201	31880230	
piR35	TGGCTTCTGAGATTGCGTCCAAGAGATGGT	30	7	+	34497749	34497778	-
piR36	TAAGTCAGATGTGGCATTGCGCAGGTGT	29	7	+	34505124	34505152	Człowiek
piR37	TGAGAACTTAGGTGTTCCAGTTGGGCCA	29	11	+	7433664	7433664	-
piR38	TACAAAGCATGGTGACCTGTGTGTGTGGA	29	7	-	34463718	34463746	Mysz
piR39	GTGCAGGGAACTAAGGCTCAAGTCACCA	29	7	-	34484853	34484881	Danio

								pręgowane
piR40	TCCACACACACAGGTCACCATGCTTTGTA	29	7	+	34463718	34463746		Mysz
piR41	TCACAACTGAGGTAGTTGGGGAACCAGGT	29	7	+	34505603	34505631		-
piR42	GCCGGAAAGAGCTGCGGTCACACTTCA	28	14	-	50840527	50840554		Danio pręgowane
piR43	CAGGCGGCCCGGTTCTGACTCCCGGTATGGGAACCA	36	15	-	29171439	29171472		Danio
			11	+	24760402	24760435		pręgowane
			1	-	10249768	10249801		
			11	+	21192839	21192872		
			1	+	148851506	148851538		
piR44	TCCATATGGTCTAGCGGTTAGGATTCTG	30	15	-	29171482	29171511		Danio
			11	+	24760363	24760392		pręgowane
			X	-	98879286	98879315		
			1	-	10249811	10249840		
			11	+	21192800	21192829		
piR45	TTCCTTATTAGGAGAACCTTCCCTGGTC	30	14	-	42961281	42961310		-
piR46	TCACACCTGCTGCCTGAGGATGGTCCGTC	29	2	+	25518925	25518953		Szczur, Danio pręgowane
piR47	GGGGGGGTGTCCCTCGGGGGCGCGCCGGTT	33	6	-	251767	251799		-
piR48	CTCCACCCGCCCTCCGTCCGCGCCCCCTCGCCG	33	6	-	252161	252193		-
piR67	TGACTGGGAATCAGACTTGGAGCGCAATCC	31	13	-	59256537	59256567		Szczur

Tabela 6. Wybrane piRNA zidentyfikowane w jajnikach świni domowej.

piRNA	Sekwencja	Długość (nt)	Chromosom	Nić	Początek	Koniec	Organizm
piR1	TGGCGTCCGAACAGGGACCTGAACCCTGGACCCTCAGATT	40	7	-	24228794	24228827	Człowiek
			2	-	9814434	9814467	
			16	-	72592496	72592529	
			12	-	50559202	50559235	
			7	+	24079472	24079505	
			7	+	22328188	22328221	
			2	+	9818575	9818608	
			2	+	9939665	9939698	
piR3	CCAGGCGGCCCGGGTTCGACTCCCGGTATGGGAACCA	37	15	-	29171439	29171473	Danio pręgowane
			11	+	24760401	24760435	
			1	+	10249768	10249802	
			11	+	21192838	21192872	
			1	+	148851505	148851538	
piR4	TTCCACACCGGGAGTCGAACCCGGGCCGCTGGGTG	37	11	-	21192835	21192871	Danio pręgowane
			1	-	148851502	148851538	
			1	+	10249769	10249805	
			11	-	24760398	24760434	
			15	+	29171440	29171476	
piR5	TGCATTGGCCGGGAACCGAACCCGGGCCTCCCGCGT	36	12	-	50565564	50565599	Danio pręgowane
			7	+	22918478	22918513	
			7	+	22026330	22026365	
			6	+	9982529	9982564	
			6	+	9983187	9983222	
			6	+	10072406	10072441	
			6	+	10073061	10073096	
15	+	59476045	59476080				
piR6	AACCCGGGACCTCTCGCACCCGAAGCGAGAATCATA	36	4	+	86620909	86620944	Muszka owocowa
			3	+	35039929	35039964	

piR7	GCTCCCCGTCGGGGAATTGAACCCCGGTCTCCCGC	35	5	+	80875449	80875482	Danio pręgowane Muszka owocowa
			5	+	60233310	60233343	
piR9	GTTCCACACCGGGAGTCGAACCCGGGCCGCTG	34	11	-	21192839	21192872	Danio pręgowane
			1	+	10249768	10249801	
			1	-	48851506	148851538	
piR10	TCCTCGTTAGTATAGTGGTGAGTATCCCCGCT	33	7	-	22776509	22776541	Człowiek, Szczer, Danio pręgowane Muszka owocowa
			5	-	82399251	82399283	
			7	+	22687100	22687132	
			7	+	22722607	22722639	
			14	+	28246046	28246078	
			14	+	28249755	28249787	
piR11	AAGTTCTGATGACCACTACCATCGGACCAGCC	33	9	+	101909568	101909600	Mysz
piR12	AGGCTGATGCCTTATCCATTAGGCAATTGGGTC	33	5	+	36016079	36016105	Szczer
piR13	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT	32	7	-	22918517	22918548	Danio pręgowane
			7	-	22026369	22026400	
			6	-	9982568	9982599	
			6	-	9983226	9983257	
			6	-	10072445	10072476	
			6	-	10073100	10073131	
			4	-	103342160	103342191	
			15	-	59476084	59476115	
			4	+	103343681	103343712	
			3	+	99434291	99434322	
			12	+	50565529	50565560	
1	+	18721267	18721298				
piR16	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTCCGCC	32	12	-	50565528	50565559	Człowiek, Mysz
			7	+	22918518	22918549	
piR17	GGCCAGCACGCTCCGCTGCGCAACTCTGCT	32	7	-	22016218	22016249	Człowiek, Szczer, Muszka
			4	-	100141173	100141204	
			3	-	25748935	25748966	

			7	+	22025582	22025613	owocowa
			7	+	22039701	22039732	
			7	+	22584933	22584964	
			7	-	22782671	22782702	
			7	+	22918074	22918105	
			4	+	100241400	100241431	
piR18	GCATTGGTCGTTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT	32	7	-	22918517	22918548	Danio
			7	-	22026369	22026400	pręgowane
			6	-	9982568	9982599	
			6	-	9983226	9983257	
			6	-	10072445	10072476	
			6	-	10073100	10073131	
			4	-	103342160	103342191	
			15	-	59476084	59476115	
			4	+	103343681	103343712	
			3	+	99434291	99434322	
			12	+	50565529	50565560	
			1	+	18721267	18721298	
piR19	GGCGAACGTGATAACCACTACACTACGGAAAC	32	7	-	22315565	22315596	Człowiek,
			7	-	22561147	22561178	Szczur,
			7	-	22848251	22848282	Danio
			4	-	103321431	103321462	pręgowane
			4	-	103324539	103324570	
			4	-	103360758	103360789	
			14	-	103109886	103109917	
			7	+	45218877	45218908	
			7	+	22825189	22825220	
			4	+	103306974	103307005	
			4	+	103337022	103337053	
			4	+	103357454	103357485	
			4	+	103373351	103373382	
			4	+	103376540	103376571	
piR20	GGCGAGAATTCTACCACTGAACCACCAATGCA	32	12	-	50565528	50565559	Danio

			7	+	22918518	22918549	pręgowane
piR21	GGCGAGAATTCTACCACTGAACCACCAATGC	31	4	-	103343681	103343711	Danio
			3	-	99434291	99434321	pręgowane
			12	-	50565529	50565559	
			1	-	18721267	18721297	
			7	+	22918518	22918548	
			7	+	22026370	22026400	
			6	+	9982569	9982599	
			6	+	9983227	9983257	
			6	+	10072446	10072476	
			6	+	10073101	10073131	
			4	+	103342161	103342191	
			15	+	59476085	59476115	
piR23	CGAGAATTCTACCACTGAACCACCAATGC	29	4	-	103343681	103343709	Danio
			3	-	99434291	99434319	pręgowane
			12	-	50565529	50565557	
			1	-	18721267	18721295	
			7	+	22918520	22918548	
			7	+	22026372	22026400	
			6	+	9982571	9982599	
			6	+	9983229	9983257	
			6	+	10072448	10072476	
			6	+	10073103	10073131	
			4	+	103342163	103342191	
			15	+	59476087	59476115	
piR24	GCATTGGTGGTTCAATGGTAGAATTCTCGCC	31	4	+	103302223	103302253	Danio pręgowane
piR25	GTCAGGATGGCCGAGCGGTCTAAGGGCTGCG	31	6	-	20170687	20170718	Danio
			7	+	22216041	22216072	pręgowane
			6	+	20170279	20170310	
			13	+	36704541	36704572	
			1	+	173932953	173932984	

piR26	GCGCCGAATCCTAACCACTAGACCACAGGGA	31	7	-	24237454	24237485	Człowiek, Szczer, Danio pręgowane
			1	-	38786758	38786789	
			4	+	103403682	103403713	
			2	+	65592897	65592928	
piR27	TTAACAATAACCCACAGCCTTCGGACCAACT	31	9	+	101923633	101923663	Mysz
piR28	GCGAGAATTCTACCACTGAACCACCCATGCA	31	14	-	132073701	132073731	Szczer, Danio pręgowane
			1	-	277622457	277622487	
piR31	GCATGGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGC	30	14	+	132073702	132073731	Szczer, Danio pręgowane
			1	+	277622458	277622487	
piR32	TACATTAGCATTGCTGCTTCCTCCTTGCA	30	7	-	40625273	40625302	Szczer
piR35	GCATTGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGC	29	7	-	22918519	22918548	Człowiek
			7	-	22026371	22026400	
			6	-	9982570	9982599	
			6	-	9983228	9983257	
			15	-	59476086	59476115	
			12	+	50565529	50565558	
piR36	TTGGCTAAGATCAAGTGTAGTATCTGTTCTT	31	9	-	79311923	79311953	Mysz
			14	-	120150384	120150845	
			X	+	53337925	53337955	
			9	+	70045065	70045095	
			8	+	119180842	119180872	
			2	+	67380052	67380082	
			2	+	63663234	63663264	
			2	+	12881812	12881842	
			13	+	13749154	13749184	
			11	+	26804963	26804993	

3.1.8. Dyskusja uzyskanych wyników

3.1.8.1. Nomenklatura białek Piwi

Obecnie w literaturze często używa się historycznej nomenklatury białek Piwi, która odnosi się do nazwy badanego organizmu. Przykładowo, dla mysich białek Piwi używa się nazw Miwi, Mili oraz Miwi2, natomiast dla ludzkich HIWI, HILI i HIWI2. Jednakże używanie tej nomenklatury do oznaczania białek Piwi pochodzących z innych organizmów, takich jak na przykład świnia domowa, jest utrudnione. Oznaczanie białek Piwi występujących u świni w taki sam sposób jak u myszy czy człowieka jako Siwi, Sili i Siwi2 jest niemożliwe ponieważ nazwa Siwi została już wcześniej użyta do oznaczenia białka Piwi u jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*) [208]. W literaturze istnieje również inny system nazywania genów, w którym to geny kodujące poszczególne białka Piwi są ponumerowane 1, 2, itd., podczas gdy produkty białkowe tych genów są oznaczone odpowiednio jako Piwil1, Piwil2 oraz Piwil4. W związku z tym w przypadku białek Piwi u świni domowej w niniejszej pracy doktorskiej proponuje się system nazewnictwa, który łączy w sobie łacińską nazwę systematyczną badanego organizmu oraz numer białka Piwi. Zgodnie z tym białka Piwi występujące u myszy oznaczyć można jako: *Mus musculus* Piwil1, *Mus musculus* Piwil2 oraz *Mus musculus* Piwil4, natomiast białka Piwi obecne u świni to: *Sus scrofa* Piwil1, *Sus scrofa* Piwil2 oraz *Sus scrofa* Piwil4. Taki system oznaczania białek Piwi w sposób dokładny i jednoznaczny określa typ badanego białka Piwi oraz pozwala na uniknięcie niejednoznaczności związanych z identyfikacją danego białka.

3.1.8.2. Ekspresja białek Piwi na różnych etapach rozwoju osobniczego

Analiza ekspresji genów *Piwi* w gonadach świni wyraźnie pokazuje, że poziom ekspresji genów *Piwil1*, *Piwil2* oraz *Piwil4* zależy od etapu rozwoju, na którym znajduje się dany osobnik. Wszystkie geny *Piwi* ulegają ekspresji w jądrach kilkudniowego samca. Ekspresja genu *Piwil1* znacząco wzrasta w jądrach dojrzałego płciowo osobnika, podczas gdy ekspresja dwóch pozostałych genów *Piwi* (*Piwil2* i *Piwil4*) zmniejsza się. W przypadku jajników pochodzących z zarówno nowo narodzonego, jak i dorosłego osobnika, ekspresja genów *Piwi* jest znacznie obniżona, a największą ilość transkryptu obserwuje się w przypadku genu *Piwil2* w jajnikach kilkudniowej samicy.

Powszechnie wiadomo, że u *D. melanogaster* w trakcie procesu spermatogenezy białka Piwi aktywnie uczestniczą w wyciszaniu transpozonów oraz biogenezie piRNA i oba te procesy są ze sobą powiązane [108]. Niedawno podobny mechanizm biogenezy piRNA połączony z dezaktywacją transpozonów został zaproponowany u myszy [119, 124]. Dwie grupy badawcze dowiodły, że białka Piwi: Piwil1 (Miwi), Piwil2 (Mili) oraz Piwil4 (Miwi2) są zaangażowane zarówno w wyciszanie transpozonów, jak i produkcję piRNA. Niektóre białka rodziny Argonaute posiadają w swoim miejscu aktywnym katalityczną triadę DDH (Asp-Asp-His), która nadaje im właściwości nukleolityczne. Zmienność sekwencji w miejscu aktywnym powoduje, że nie wszystkie białka Ago/Piwi mają tę właściwość [200]. W celu zbadania roli, jaką odgrywa aktywność endonukleolityczna białek Piwi w procesie biogenezy piRNA oraz wyciszania transpozonów myszy, do białek Piwil2 oraz Piwil4 wprowadzono mutację, powodującą zastąpienie katalitycznej triady DDH motywem DAH (Asp-Ala-His). W przypadku homozygotycznych myszy, posiadających dwa allele *Piwil2^{DAH}*, w pierwotnych komórkach płciowych płodu dochodziło do zaburzenia amplifikacji piRNA, co z kolei powodowało znaczny spadek piRNA oddziałujących z białkiem Piwil4. Uszkodzenie szlaku piRNA u tych myszy powodowało zaburzenie procesu spermatogenezy i bezpłodność. Co ciekawe, myszy posiadające dwa allele *Piwil4^{DAH}* były płodne, nie wykazywały żadnych nieprawidłowości w szlaku biogenezy piRNA, a wyciszanie transpozonów zachodziło u nich w sposób prawidłowy [119]. Dodatkowo białko Piwil1 posiadające zmutowaną triadę ADH pozbawione było aktywności nukleolitycznej zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, co powodowało, że myszy posiadające tę mutację były bezpłodne, a w ich komórkach płciowych dochodziło do nadmiernej akumulacji transkryptów transpozonów [124].

W jądrach kilkudniowej świni wszystkie trzy geny *Piwi* ulegają ekspresji i przypuszczalnie są one zaangażowane w proces spermatogenezy, podczas gdy u osobników dojrzałych płciowo tylko ekspresja genu *Piwil1* zachodzi na stosunkowo wysokim poziomie. Analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowych białek Piwi występujących u świni wykazała obecność katalitycznej triady DDH w białkach Piwil1 oraz Piwil2 (Rys. 15). Natomiast białko Piwil4 zamiast domeny katalitycznej posiada triadę ADR (Ala-Asp-Arg). Należy podkreślić, że homozygotyczne myszy posiadające zmutowane białka *Piwil1^{ADH}* oraz *Piwil2^{DAH}* nie wykazują aktywności nukleolitycznej względem transkryptów transpozonów i nie zachodzi u nich wytwarzanie nowych cząsteczek piRNA [119, 124]. W związku z powyższym jest wielce prawdopodobne, że występujące u świni białka Piwil1 oraz Piwil2, zawierające motyw DDH mogą również wykazywać właściwości nukleolityczne

i uczestniczyć w biogenezie piRNA. Głębokie sekwencjonowanie piRNA wyizolowanych z jąder dorosłego samca rasy Meishan, a także przeprowadzone w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej, wykazało, że większość sekwencji piRNA mapuje do repetytywnych, intronowych oraz międzygenowych sekwencji genomu, co potwierdza ich pochodzenie z sekwencji transpozonów [209].

<i>Mus Musculus</i>	Piwil1	625	LAMIVGIDCYHDT...RVIVYRDGVDG...PCQYAHKLAFLV	843
<i>Sus scrofa</i>	Piwil1	624	LAMIVGIDCYHDT...RIIVYRDGVDG...PCQYAHKLAFLV	842
<i>Sus scrofa</i>	Piwil2	749	QLMVIGIDVYHDP...KIVVYRDGVSDG...PCKYAHKLAFLS	866
<i>Sus scrofa</i>	Piwil4	616	ALMVVGI A VCKDA...RIIVYRDGVDG...PCQYAR R KLTFV	834

Rysunek 15. Porównanie sekwencji wskazujące na obecność katalitycznej triady (motyw DDH zaznaczony kolorem czerwonym) w mysim białku Piwil1 oraz świńskich białkach Piwil1 i Piwil2 oraz jej brak w białku Piwil4.

Świńskie białko Piwil4, zawierające motyw ADR, jest prawdopodobnie pozbawione aktywności katalitycznej. Ekspresja genu *Piwil4* u myszy rozpoczyna się już w życiu płodowym i trwa do około 3. dnia po narodzeniu osobnika [103]. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej pokazują wysoką ekspresję genu *Piwil4* w jądrach kilkudniowego samca i znacznie niższą w przypadku jąder dojrzałego płciowo osobnika. U myszy pozbawionych genu *Piwil4* podczas życia płodowego dochodzi do zwiększonej ekspresji transpozonów z powodu wadliwej metylacji *de novo* regionów regulatorowych retrotranspozonów [37, 111]. Oznacza to, że kompleksy piRNA z białkiem Piwil4 mogą regulować metylację transpozonów i w ten sposób wpływać na ich wyciszenie. Zatem białko Piwil4 pełni w procesie gametogenezy inną funkcję niż białka Piwil1 i Piwil2, które wykazują zdolność przecinania nici RNA. Jednakże poznanie dokładnego mechanizmu działania białka Piwil4 wymaga dalszych badań.

3.1.8.3. Czy białka Piwi regulują proces oogenezy u *S. scrofa*?

Rola białek Piwi i oddziałujących z nimi piRNA w procesie oogenezy u ssaków jest wciąż nieznana. Dlatego w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej zbadano ekspresję genów *Piwi* oraz piRNA zarówno w oocytach, jak i jajnikach pochodzących z samic znajdujących się na różnych etapach rozwoju. Jak wykazano, względna ekspresja trzech genów *Piwi* w jajnikach kilkudniowych samic jest 40-krotnie niższa w przypadku genu *Piwil2*

oraz ponad 100-krotnie niższa w przypadku genów *Piwill* oraz *Piwil4* w porównaniu do względnej ekspresji tych genów w kilkudniowych jądrach. Biorąc te wyniki pod uwagę sugeruje się, że rola białek Piwi w procesie biogenezy piRNA podczas oogenezy może być mniej znacząca niż podczas spermatogenezy. Dodatkowo ilość piRNA w jajnikach dojrzałych loszek jest znacznie wyższa niż w jajnikach kilkudniowych samic. Zatem w związku z niską ekspresją białek Piwi w jajnikach można przypuszczać, że inne białka są zaangażowane w proces biogenezy piRNA w gonadach żeńskich. Niedawno zidentyfikowano kilka białek, które tworzą kompleksy z białkami Piwi, a mianowicie wykazano, że białka Piwi oddziałują z białkami zawierającymi domenę Tudor [130]. U myszy zidentyfikowano 28 białek należących do rodziny Tudor i jak dotąd wykryto oddziaływanie trzech białek Piwi z białkami Tdrd1, Tdrd2, Tdrd4, Tdrd6, Tdrd7, Tdrd8 i Tdrd9 [131]. Jednakże do tej pory nie zbadano ekspresji białek Tudor w zależności od etapu rozwoju osobniczego.

Ekspresja piRNA oraz białek Piwi w oocytach osobników niedojrzałych i dojrzałych pościowo jest na zbliżonym, niskim poziomie. Dlatego udział kompleksów piRNA-Piwi w dojrzewaniu oocytów pozostaje niejasny. Co ciekawe, wykazano, że u myszy podczas dojrzewania oocytów dochodzi do zahamowania aktywności innej grupy niskocząsteczkowych RNA, a mianowicie miRNA [149]. Zatem możliwe jest, że niskocząsteczkowe RNA (miRNA oraz piRNA) odgrywają mniej znaczącą rolę w procesie dojrzewania oocytów. Homozygotyczne samce myszy posiadające zmutowane białko *Piwill*^{ADH} są bezpłodne, natomiast mutacja ta ani nawet brak białka *Piwill* nie wpływają na płodność samic. Obserwacja ta może świadczyć o ograniczonym wpływie białek Piwi na proces oogenezy u ssaków [124].

Ze względu na bardzo niską zawartość cząsteczek piRNA w oocytach świni niemożliwe było zaobserwowanie tej frakcji niskocząsteczkowych RNA na żelu poliakryloamidowym. Natomiast analiza małych RNA wyizolowanych z jajników pozwoliła na zaobserwowanie frakcji piRNA na żelu. Zatem możliwe jest, że cząsteczki piRNA wykryte w jajnikach pochodzą w większości z komórek somatycznych gonady, na przykład komórek pęcherzykowych otaczających oocyt. Badania przeprowadzone u kilku gatunków zwierząt (*M. musculus*, *M. mulatta*, *D. melanogaster*) wykazały obecność cząsteczek piRNA w komórkach somatycznych jajników, jąder oraz w innych tkankach somatycznych [210]. Przy użyciu metody głębokiego sekwencjonowania cząsteczki piRNA wykryto również w centralnym układzie nerwowym myszy [211]. Odkrycia te świadczą o tym, że cząsteczki piRNA być może odgrywają ważną rolę również poza komórkami płciowym.

Podsumowując, stwierdzono nieliniową ekspresję genów *Piwi* oraz piRNA w gonadach *S. scrofa*. W jądrach kilkudniowych osobników wysokiej ekspresji genu *Piwi4* towarzyszy niski poziom ekspresji piRNA. Z kolei w jajnikach dojrzałych płciowo osobników niskiej ekspresji genu *Piwi1* towarzyszy wysoki poziom ekspresji piRNA. Zatem można przypuszczać, że w organizmach ssaków białka *Piwi* oraz piRNA mogą funkcjonować nie tylko w kompleksach, ale również oddzielnie.

3.2. Charakterystyka niskocząsteczkowych RNA występujących w gonadach *S. scrofa*

3.2.1. Dane z sekwencjonowania niskocząsteczkowych RNA

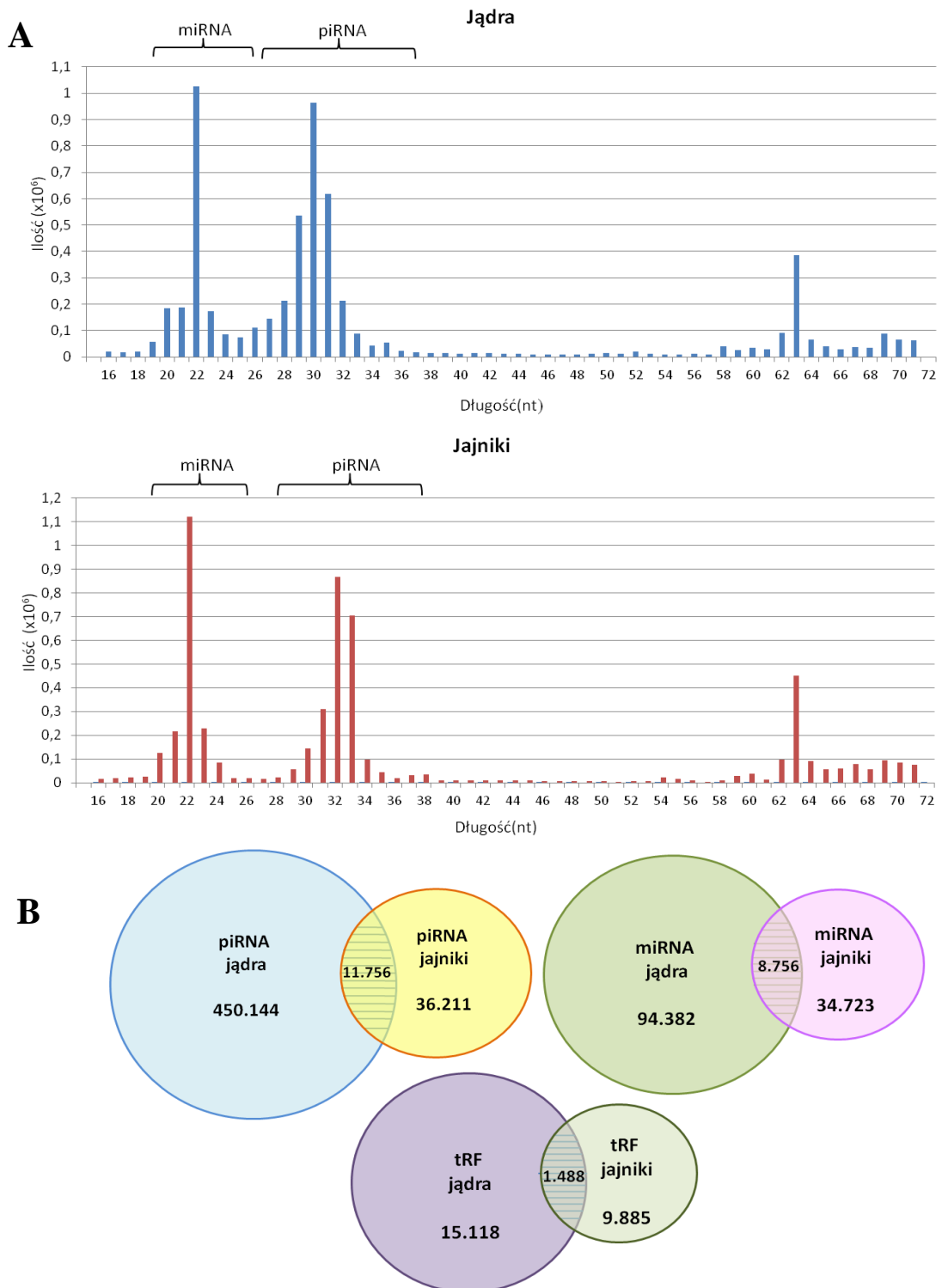
Przedstawiona w rozdz. 3.1.7. wstępna analiza piRNA została uzupełniona o pełną charakterystykę niskocząsteczkowych RNA, występujących w gonadach dojrzałych płciowo osobników. W tym celu wyizolowano z jąder i jajników całkowity RNA wzbogacony we frakcję niskocząsteczkowych RNA. Następnie skonstruowano dwie biblioteki małych RNA i zsekwenjonowano je przy użyciu technologii firmy Illumina[®]. Obie biblioteki wygenerowały w przybliżeniu 6 milionów odczytów, z których 4% wykazywało niską jakość i zostało odrzucone. W rezultacie uzyskano 5.795.730 odczytów dla niskocząsteczkowych RNA otrzymanych z jąder oraz podobną ilość 5.393.588 odczytów w przypadku niskocząsteczkowych RNA otrzymanych z jajników. Po usunięciu sekwencji występujących więcej niż jeden raz, liczba unikalnych sekwencji w bibliotece małych RNA z jąder i jajników wyniosła odpowiednio 893.561 oraz 189.119. Liczba wystąpień każdej z sekwencji została zapisana w nazwie sekwencji. Uzyskane sekwencje niskocząsteczkowych RNA zostały podzielone na dwie grupy: RNA o długości 19-25 nt, odpowiadające długością sekwencjom miRNA oraz RNA o długości 26-40 nt odpowiadające długością sekwencjom piRNA (Rys. 16A). Wszystkie sekwencje zmapowano do genomu przy możliwości niedopasowania jednego nukleotydu. Frakcję dłuższych sekwencji, które idealnie pasowały do sekwencji cząsteczek tRNA, zaklasyfikowano jako fragmenty tRNA – tRF. W rezultacie biblioteka małych RNA otrzymanych z jąder zawierała 94.382 (11%) unikalnych sekwencji miRNA, 450.144 (50%) unikalnych sekwencji piRNA oraz 15.118 (2%) sekwencji zaklasyfikowanych jako tRF (Rys. 16B). Spośród pozostałych sekwencji 19% nie spełniało wymaganego kryterium długości tzn. było krótsze niż 19 nt lub dłuższe niż 40 nt, a 18% nie mapowało do sekwencji genomu. Z kolei biblioteka małych RNA otrzymanych z jajników zawierała 34.723 (18%) unikalnych sekwencji miRNA, 46.096 (19%) unikalnych sekwencji piRNA

oraz 9.885 (5%) sekwencji zaklasyfikowanych jako tRF (Rys. 16B). Spośród pozostałych sekwencji 40% nie spełniało wymaganego kryterium długości tzn. było krótsze niż 19 nt lub dłuższe niż 40 nt, a 18% nie mapowało do genomu. Co ciekawe, w każdej grupie niskocząsteczkowych RNA, liczba sekwencji unikalnych, a więc występujących jeden raz, była znacznie wyższa w jądrach niż w jajnikach. Stosunek liczby unikalnych sekwencji niskocząsteczkowych RNA specyficznych dla jąder do liczby unikalnych sekwencji niskocząsteczkowych RNA specyficznych dla jajników wynosił: 10 dla piRNA, 2,7 dla miRNA oraz 1,5 dla tRF.

3.2.2. Długość piRNA obecnych w męskich i żeńskich gonadach *S. scrofa*

piRNA stanowią najliczniejszą frakcję niskocząsteczkowych RNA w męskich i żeńskich gonadach świni. Analiza porównawcza piRNA uzyskanych z jąder i jajników doprowadziła do zidentyfikowania 11.756 sekwencji występujących w obydwu gonadach (Rys. 16B). Zatem 2.6% sekwencji piRNA z jąder oraz 32.5% sekwencji piRNA z jajników jest obecna zarówno w gonadach męskich, jak i żeńskich.

Analiza sekwencji piRNA obecnych w jądrach i jajnikach wykazała różnice w ich długości, a mianowicie piRNA występujące w jajnikach są dłuższe niż cząsteczki piRNA występujące w jądrach. Rozkład długości piRNA uzyskany metodą głębokiego sekwencjonowania pokazuje, że sekwencje piRNA specyficznie występujące w jądrach posiadają długość 29, 30 i 31 nt, natomiast piRNA obecne w jajnikach mają długość 31, 32 i 33 nt (Rys. 16A). Podobny rezultat uzyskano stosując standardową metodę sekwencjonowania po wklonowaniu niskocząsteczkowych RNA do wektora (Rys. 14). Wcześniejsza analiza puli piRNA wyizolowanej z jąder świni chińskiej rasy Meishan wykazała obecność cząsteczek piRNA o jeden nukleotyd krótszy w porównaniu do tych obserwowanych u świni rasy europejskiej, gdyż najliczniej występujące w rasie Meishan cząsteczki piRNA miały długość 28, 29 i 30 nt [209]. Wy tłumaczeniem powyższej obserwacji mogą być różne cechy fenotypowe tych dwóch gatunków świń, takie jak waga i wielkość dorosłych osobników.

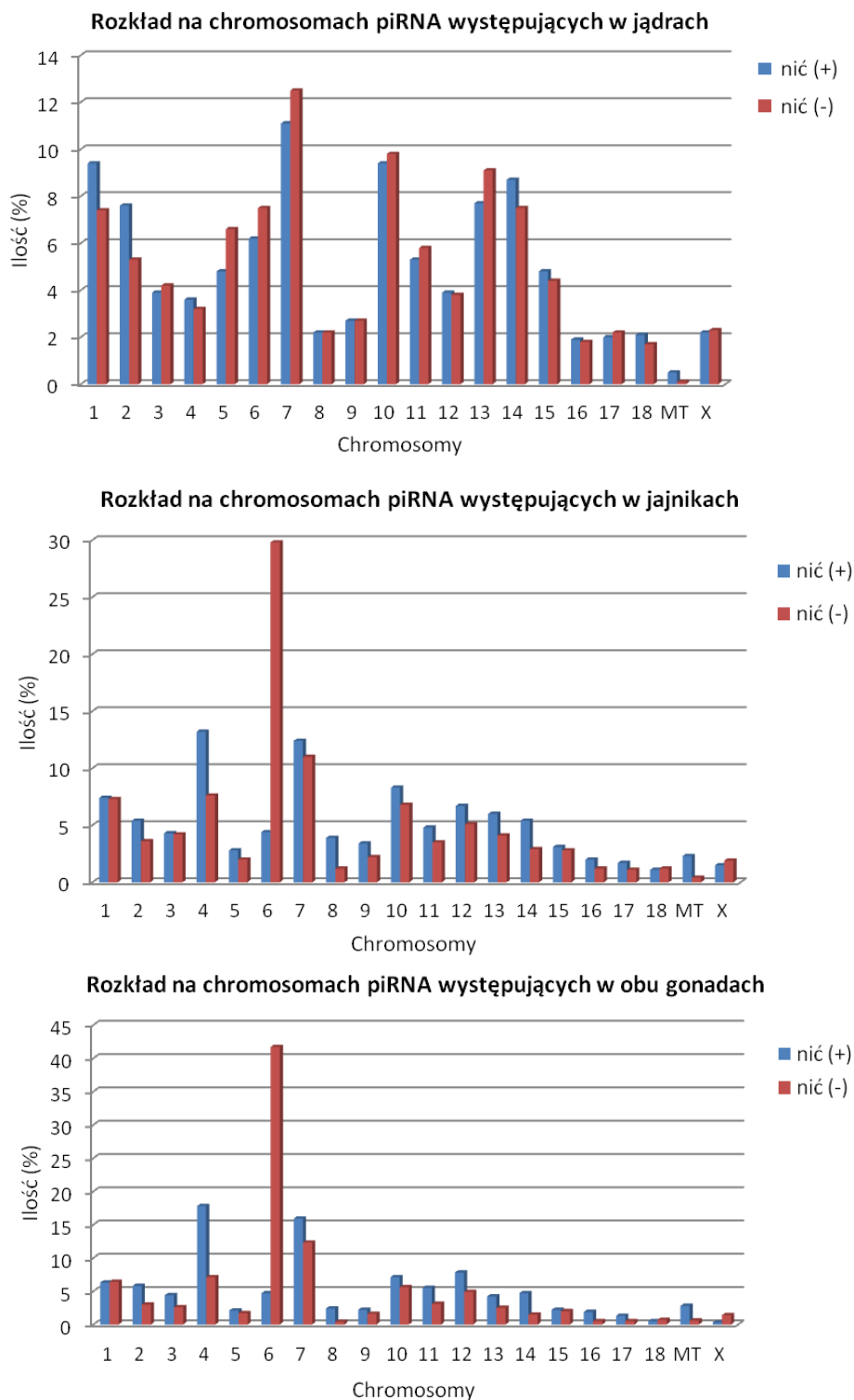


Rysunek 16. Charakterystyka sekwencji niskocząsteczkowych RNA występujących w gonadach świni. A – rozkład długości niskocząsteczkowych RNA wyizolowanych z jąder i jajników. Na wykresach zaznaczono dwie oddzielne frakcje małych RNA – miRNA oraz piRNA. B – liczba sekwencji odpowiadających piRNA, miRNA i tRF w jądrach i jajnikach oraz sekwencji wspólnych dla obu gonad.

piRNA występujące w jądrach myszy posiadają długość od 28 do 32 nt [92]. Mniej wiadomo na temat długości piRNA występujących w gonadach żeńskich myszy. Klonowanie do wektora niskocząsteczkowych RNA wyizolowanych z jajników myszy oraz ich sekwencjonowanie pozwoliło na zidentyfikowanie dwóch frakcji piRNA o długości 27-31 nt oraz 32-38 nt. Mapowanie do genomu wykazało, że dłuższe piRNA wywodzą się z elementów repetytywnych, natomiast sekwencje krótszych piRNA nie są związane z sekwencjami repetytywnymi [206]. Jednakże analiza ta została przeprowadzona na podstawie tylko kilkudziesięciu sekwencji piRNA. Z kolei piRNA występujące w jądrach i jajnikach *D. rerio* posiadają zbliżoną długość (26-28 nt) [107]. Wymienione wyżej dane pochodzące z sekwencjonowania wskazują, że długość cząsteczek piRNA różni się w zależności od organizmu. Dodatkowo ilość nukleotydów może być zmienna u osobników w obrębie tego samego gatunku, jak wykazano dla różnych ras świń – linia 990 i Meishan.

3.2.3. Rozkład sekwencji piRNA na chromosomach

Mapowanie puli piRNA do genomu świni wykazało, że piRNA występujące w gonadach męskich mapują do wszystkich chromosomów, lecz częściej do chromosomu 7 (12%), oraz w mniejszym stopniu do chromosomów 1, 10, 13 oraz 14 (8%). Ponadto piRNA obecne w jądrach mapują prawie w równym stopniu do sensownej i antysensownej nici genomu świni (Rys. 17). Natomiast piRNA występujące w jajnikach najczęściej mapują do nici antysensownej chromosomu 6 (30%). Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku puli piRNA obecnej w obydwu gonadach, gdzie więcej niż 40% cząsteczek piRNA mapuje do nici antysensownej chromosomu 6 (Rys. 17). Oszacowano, że 10-krotnie mniej piRNA mapuje do nici sensownej chromosomu 6 w porównaniu do jego nici antysensownej. Dodatkowo piRNA, które mapują do chromosomów 4 i 7 jest 3-krotnie mniej niż piRNA mapujących do chromosomu 6, jednakże w przypadku chromosomów 4 i 7 piRNA częściej mapują do nici sensownej. Powyższe obserwacje wykazują, że rozmieszczenie sekwencji piRNA na poszczególnych chromosomach nie jest skorelowane z lokalizacją genów kodujących białka Piwi w genomie świni. Geny dla białek Piwil1 oraz Piwil2 w przypadku świni zlokalizowane są na chromosomie 14, natomiast gen kodujący białko Piwil4 znajduje się na chromosomie 9.



Rysunek 17. Rozkład na chromosomach sekwencji piRNA występujących w jądrach, jajnikach oraz frakcji wspólnej dla obu gonad.

W tabeli 7 przedstawiono najliczniej występujące w obu gonadach sekwencje piRNA. Częsteczki te można podzielić na dwie grupy: jedna zawiera piRNA, które mapują do genomu tylko raz, natomiast druga zawiera piRNA, które mapują do wielu miejsc na różnych chromosomach. Na przykład sekwencja piRNA o numerze identyfikacyjnym 39/502 (pierwsza liczba dotyczy jajnika, druga jądra) pojawia się około 18000 razy i mapuje do 17 miejsc w genomie zlokalizowanych na 5 różnych chromosomach. Jednakże 69% piRNA mapuje do chromosomów tylko raz.

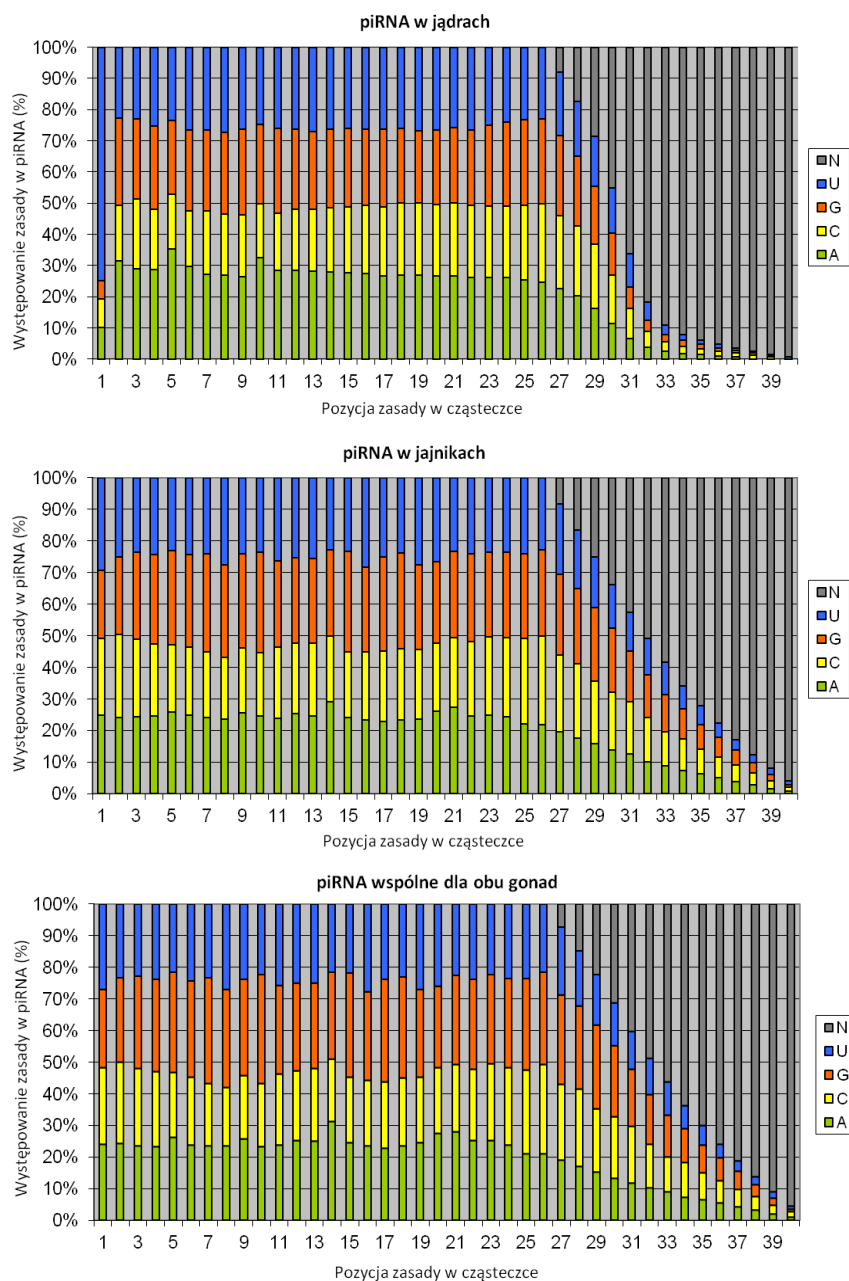
Na rysunku 18 przedstawiono rozkład zasad na całej długości cząsteczek piRNA występujących w gonadach świni. piRNA pochodzące z jąder preferencyjnie zawierają w pozycji pierwszej resztę uracylu (70%). Z kolei uracyl jako pierwsza zasada pojawia się tylko w 30% sekwencji piRNA obecnych w jajnikach oraz piRNA wspólnych dla obu gonad (Rys. 18). Mechanizm potranskrypcyjnej amplifikacji piRNA zwany cyklem ping-pong proponowany w przypadku biogenezy piRNA u *D. melanogaster* wymaga obecności reszty uracylu w pozycji pierwszej (1U) oraz adeniny w pozycji dziesiątej (10A) cząsteczek piRNA [106]. Jednakże piRNA występujące w jądrach i jajnikach świni nie spełniają tych wymagań, gdyż adenina w pozycji dziesiątej pojawia się tylko w przypadku 22% cząsteczek piRNA.

Tabela 7. Charakterystyka cząsteczek piRNA występujących w obu gonadach *S. scrofa*.

Liczba sekwencji		Liczba sekwencji		Liczba dopasowań						
Nr sekwencji (jajnik)		Nr sekwencji (jądro)		Sekwencja	Długość (nt)	Pierwsze dopasowanie				
						Nić	Chromosom	Pozycja		
6	116545	92	4932	GCATTGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT	1	31	-	10	58782524	
8	84959	339	1110	GCATGGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT	2	32	-	1	276742124	
17	39355	246	1475	GCATGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT	2	30	+	4	20495382	
18	35080	572	692	GGCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCGTT	9	34	+	1	132234645	
7485	13	13	29335	TAAGAACTGAGAGATTGTGAACCTTGGCCC	1	30	+	1	261405993	
25	25619	275	1328	GCATTGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCC	1	30	-	10	58782525	
15683	6	17	22761	TCAATGAATAAGAGCAACGTTCTGGCACGT	2	30	+	14	87378312	
38	17642	1058	380	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACT	2	33	+	7	53403061	
39	17223	502	774	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACTTTCGCCT	17	33	+	13	114880302	
41	16332	681	594	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTCCGCCA	17	33	+	13	114880302	
11917	8	23	16327	TTTAAGGTGTTTGTTCAGCTTTTGTAGCCT	1	31	+	2	18514728	
48	14261	625	643	GCATTTGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT	14	32	+	12	55953777	
84	7618	77	6199	GTACATGATGACAACCTGGCTCCCTCTAC	1	28	-	1	33085373	
28421	3	30	11786	TCTTCCAAAGCAAAATATCATAGGGACTT	1	30	+	7	90168570	
14421	6	32	11598	TAGGCAAACGTGACATGTCTGTTTCGGACC	1	30	-	5	7631172	
82	7677	122	3569	GGCTGGTCCGATGGTAGTGGGTCATCAGAACT	1	32	+	10	6079078	
63	10578	729	553	GCATGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCC	2	29	+	4	20495382	
18400	5	40	10438	TAATTCGTCGTGTGAATCTGTCACTTGGC	1	29	-	7	34592571	
26894	3	41	10257	TAAATCACTGTGGAAAAGTAGCTCTCCATT	1	30	+	1	125456109	
95675	1	42	9706	TAGACTGTTTTTAGGATATCAGATTCTGCCT	1	31	-	7	115837458	
44145	2	43	9603	TCGGCAATGACCATACAAGGAAGGTAGGAGC	1	31	-	6	39387801	
182068	1	44	9586	TAGACATCTGAGAACAAGTAAACCTGAACCT	1	31	-	7	91143665	
93	6225	139	2967	TGTACATGATGACAACCTGGCTCCCTCTAC	1	29	-	1	33085373	

23624	3	46	9088	TATTAATAGTAGAAGGCCTTTAACCCAGAA	1	30	+	7	90167971
76	8669	1226	326	GCATTGGTGGTTCAATGGTAGAATTCTCGCCT	1	32	+	4	104735772
19599	4	49	8940	TAGAAAACATGAATGGCACCCAACTATAGG	1	31	+	14	53951797
179692	1	51	8825	TTATCCGTAAATGTGGAGCTGAACTAGCCCA	1	31	-	14	78534128
92	6379	222	1661	AAGCTATGATGATTTTCGATTGCATTGATCATA	2	32	-	X	118532802
30608	3	60	8020	TTCCAAGGAAAATCACAATTCTGAATTACC	1	30	-	5	7631315
159528	1	64	7674	TCAATAAATATTTGTAGAATGCATGAAGGG	1	30	+	7	34609003
49186	2	66	7466	TAAGAACTGAGAGATTGTGAACCTTGGCC	1	29	+	1	261405993
41518	2	67	7118	TTTGTAGAAATGCAAATTCTGGGGCCC	1	28	-	13	131337158
98471	1	68	6975	TTCACTGACAGCTTCTGATGTGCTGGGAGG	1	30	+	7	91180100
41838	2	69	6796	TGGACTGGGAATCAGACTTGGAGCGCAATC	1	30	-	13	77036140
101	5702	390	967	AGTTGGTCCGAAGGCTGTGGGTTATTGTAACT	2	33	+	13	173935499
45286	2	72	6662	TAACATTTGGCTGTATGAACTTCTGCTAAA	1	30	-	7	91151598
46065	2	73	6602	TAACGTACGGACCATATGGAACCTCACCATC	1	30	+	7	34616918
30562	3	75	6443	TAAACTGTACTGAGCGATTCCAGAAATAGC	1	30	+	14	87376022
18983	4	78	6160	TGAAGCATCGATTTGAATCCAAGGACACTG	1	31	-	5	7631278
99	5801	4243	91	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGCTCGCCT	2	33	-	7	22458059
102	5667	1825	213	GCATTGGTCGTTCACTGGTAGAATTCTCGCCT	14	32	+	12	55953777
159694	1	80	5770	TTGGATAGACATCTGAGAACAAGTAAACCT	1	30	-	7	91143671
16580	5	81	5757	TCTCTAGGTAATTAGCTGACACTGGCACCC	1	30	+	7	87266268
106	5389	1101	366	AGCAGAGTGGCGCAGCGGAAGCGTGCTGGGC	11	31	+	3	28905481
105	5596	3253	118	GCATGGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCC	2	31	-	1	276742125
1052	199	87	5422	TCCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTG	3	30	+	11	22178191
21366	4	85	5563	TAGTTGACCTTGAGACACCTTGACTTGGGCC	1	31	+	14	53955622
114	4938	2307	167	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGC	9	32	+	12	7907937
37981	2	90	5011	TAAACACACTACTGAAATCAGAGGACAATG	1	30	+	14	53948333
33582	2	91	4967	TTGGACTTTAATCTGTTGGCAATGGGAA	1	29	-	7	91146589
123	4444	790	516	AGTTGGTCCGAAGGCTGTGGGTTATTGTAAAC	2	32	+	13	173935499
122	4487	1167	346	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTC	8	34	+	3	39947608
232	1752	136	3038	GGCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGC	9	31	+	1	132234645
125	4348	1186	340	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTG	10	29	+	1	132234646

171286	1	98	4623	GAGACAGACTTTTAACTTTTTGAGCAAAGT	1	30	+	14	53948109
192	2383	174	2183	GGCTGGTCCGATGGTAGTGGGTCATCAGAAC	1	31	+	10	6079078
45242	2	101	4516	TACAATCTGGTAAGGGACACAAGACAGCACT	1	31	-	7	34588989
124	4356	3230	119	TGCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCGTT	1	34	+	5	56138058
134389	1	105	4297	TGGGAATTCGCCTCTGAACAAGCCAGACAGG	1	31	+	7	34625902
129	3922	2510	154	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACATTCGCCT	18	33	+	13	114880302
248	1523	158	2479	GGCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTG	10	30	+	1	132234645
155121	1	115	3732	TACTGTGAGAATTTTTGTGCCAATTGGTAGA	1	31	+	1	125447803
121364	1	118	3660	TCAATAAATATTTGTAGAATGCATGAAGG	1	29	+	7	34609003
38411	2	120	3581	TGAATTAGGCACTGTGATCTCGTCCAGAAG	1	30	+	6	90947560
170617	1	121	3575	TAATGAGTGTAGCGAGTAGGACCCGGAGA	1	29	-	5	67574847
33501	2	124	3536	ATGACTGTGAGGCACAGAAACAACATGGCACC	1	32	+	7	34610657
71695	1	125	3484	TAGTTTTAGAAGACAAAGAGAACCTGGCATC	1	31	-	3	8078962
144	3311	2975	129	GGGGGTATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACT	11	32	+	12	24465200
16610	5	129	3397	TACGAGATTGGTAAGAATTAAGGTTATT	1	30	-	5	7619752
43903	2	130	3380	TTTGAATCAGGACTGTTCTGGAAAGTCC	1	29	-	7	115833819
149	3245	3191	120	GCATTGGTAGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT	14	32	+	12	55953777
152	3191	3015	128	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACCTTCGCCT	17	33	+	13	114880302
249	1522	207	1790	TTCCATGAGTGAAATCTAATAGTCTGACA	1	29	-	1	33086430
167	2900	1518	259	TCCCATATGGTCTAGCGTTAGGATTCCTGGTT	1	33	+	15	34740883
333	1011	182	2122	TGTCTATGATGATCCTATCCCGAACC	2	26	+	1	58110462
379	840	176	2159	TGGGGGGCCCAAGTCCTTCTGATCGAGGCC	2	31	-	18	20869690
42146	2	140	2960	TGGTCAAAGAATCATATCTGTAAAATAGAAT	1	31	+	7	90168010
176	2752	2441	158	GCATTGGTGGTTCAATGGTAGAATTCTCGCC	1	31	+	4	104735772
147986	1	143	2866	TTGGAGAATTCTGGACCATGGCTCTGGGT	1	29	+	7	34604658
393	782	195	1964	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGG	2	29	+	7	53403061
48269	2	148	2699	TTTGTTAGAAATGCAAATCTGGGGCC	1	27	-	13	131337159
186	2513	3411	112	GCATTTGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCC	14	31	+	12	55953777
190	2475	5107	75	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGAC	2	32	+	7	53403061

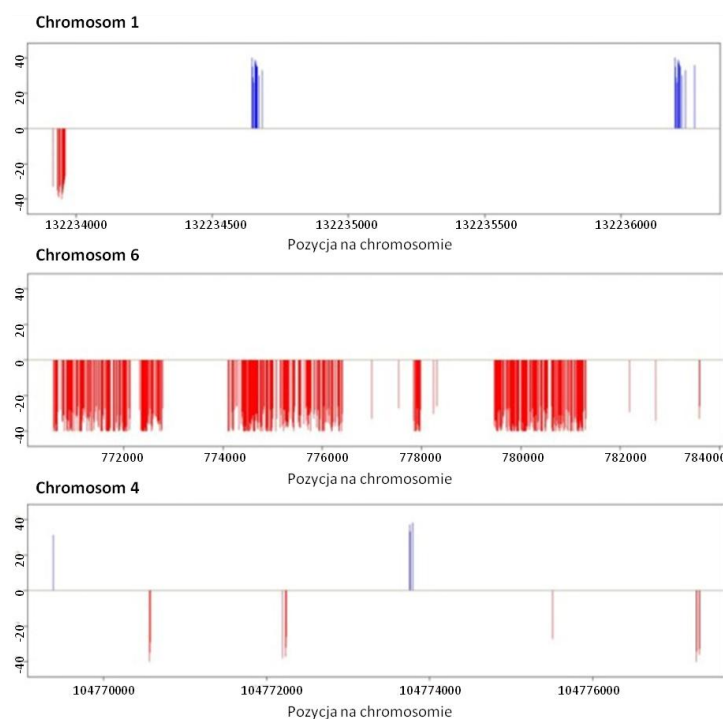


Rysunek 18. Procentowy rozkład zasad w cząsteczkach piRNA pochodzących z jąder, jajników oraz we frakcji wspólnej dla obu gonad.

3.2.4. Kłustry piRNA

Cechą wyróżniającą piRNA wśród innych klas niskocząsteczkowych RNA jest ich występowanie w genomie w postaci kłustrów. Jest to cecha typowa zarówno dla genomu muszki owocowej, jak i myszy [212]. Zbadano zatem, czy piRNA pojawiające się w obu gonadach świni również występują w genomie w postaci kłustrów. W prezentowanych

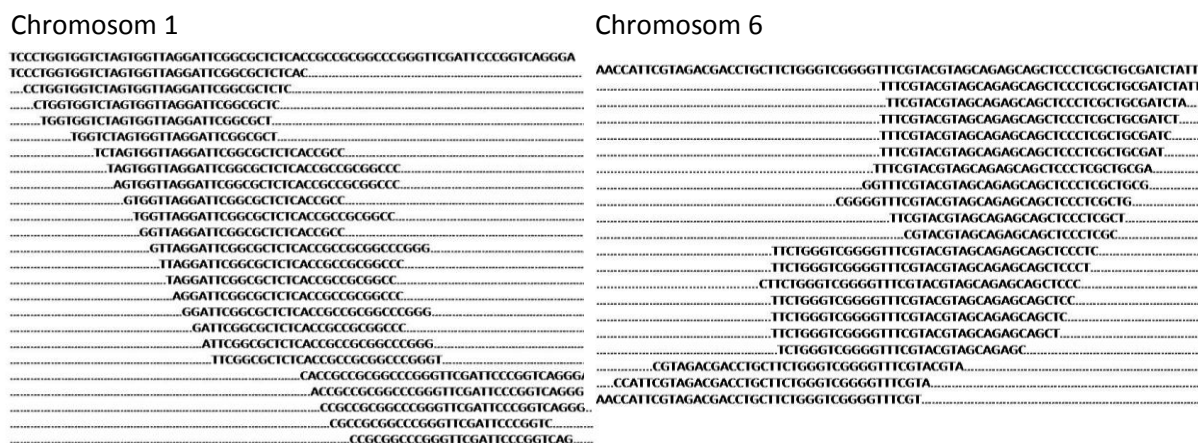
badaniach przyjęto następującą definicję klastra: przynajmniej 80 sekwencji piRNA zlokalizowanych na chromosomie nie dalej niż 2.500 nt od siebie. Spośród piRNA wspólnych dla obu gonad u *S. scrofa* zidentyfikowano 71 klastrów i stwierdzono, że większość piRNA mapuje do tych odrębnych loci. U muszki owocowej oraz myszy piRNA pochodzą z jednej bądź z dwóch nici genomowych [106]. Podobnie dla piRNA występujących w obu gonadach *S. scrofa* obserwuje się występowanie klastrów na jednej lub dwóch niciach genomowych (Rys. 19). Analiza klastrów zlokalizowanych na chromosomach 1 i 4 wykazała, że piRNA mapujące do tych chromosomów pochodzą z obu nici genu. Z kolei w przypadku chromosomu 6 piRNA, które bardzo licznie występują na tym chromosomie, powstają z jednej nici. To duże zagęszczenie piRNA jest zgodne z wcześniejszą obserwacją dotyczącą rozkładu sekwencji piRNA na chromosomach, że ponad 40% sekwencji piRNA wspólnych dla obu gonad mapuje do nici antysensownej chromosomu 6 (Rys. 17). Dane te wskazują, że klastry piRNA są źródłem cząsteczek piRNA obecnych w jądrach i jajnikach *S. scrofa*.



Rysunek 19. Klastry sekwencji piRNA wspólnych dla obu gonad, występujące na chromosomach 1, 6 i 4.

Analiza bioinformatyczna danych pochodzących z sekwencjonowania wykazała, że krótka sekwencja genomowa jest źródłem wielu cząsteczek piRNA ponieważ sekwencje piRNA nakładają się na siebie (Rys. 20). Na przykład region o długości 71 nt znajdujący się na chromosomie 1 jest źródłem 24 cząsteczek piRNA o długości od 28 do 34 nt. Podobnie

z regionu znajdującego się na chromosomie 6 o długości 74 nt generowanych jest 20 różnych cząsteczek piRNA o długości od 26 do 33 nt. Zjawisko nakładania się sekwencji piRNA w obrębie klastrów zaobserwowano również u innych organizmów, np. u myszy [120].



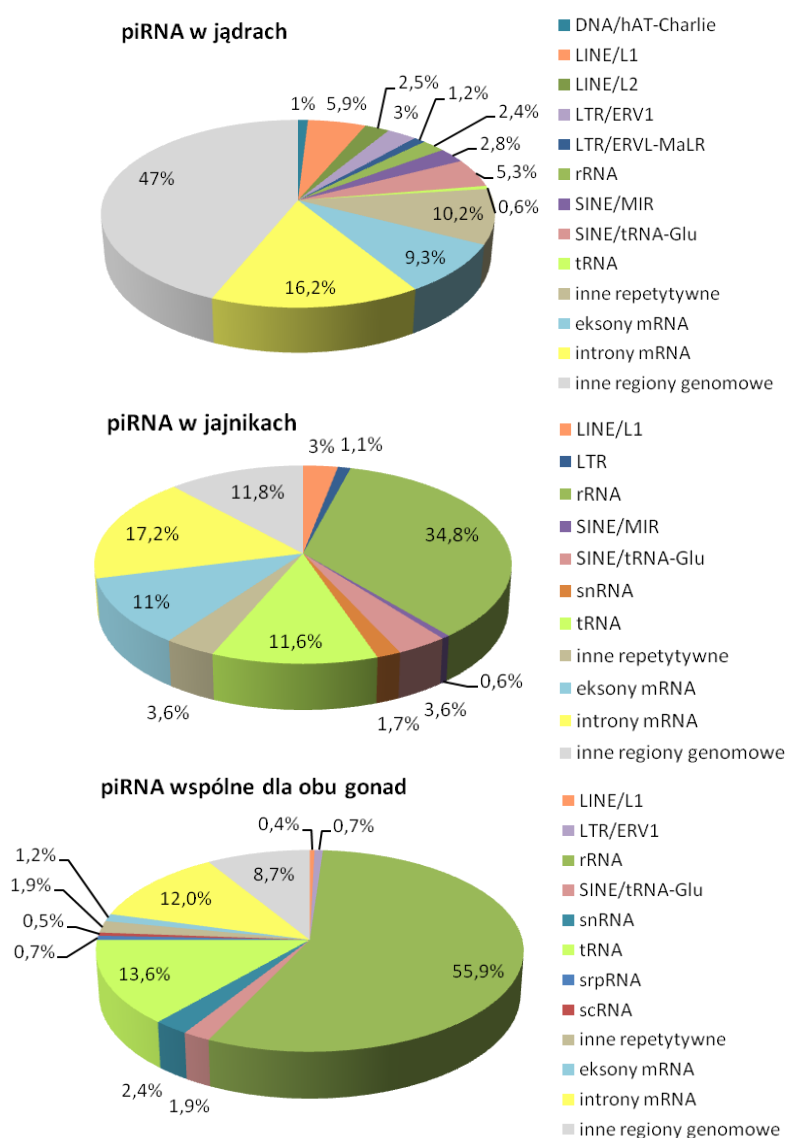
Rysunek 20. Nakładanie się sekwencji piRNA w obrębie klastrów na chromosomie 1 i 6.

3.2.5. Mapowanie piRNA do różnych regionów genomu

Zidentyfikowane w gonadach świni cząsteczki piRNA zmapowano do różnych regionów genomu, takich jak retrotranspozony i inne sekwencje repetytywne, geny kodujące rybosomalny RNA (rRNA) oraz transferowy RNA (tRNA). piRNA występujące w jądrach mapują do wielu retrotranspozonów, takich jak retrotranspozony LTR, elementy SINE oraz elementy LINE (Rys. 21). Podobnych obserwacji dokonano u innych organizmów m.in. muszki owocowej oraz myszy. U *D. melanogaster* zarówno piRNA z jąder, jak i z jajników mapują głównie do transpozonów, natomiast u myszy do sekwencji transpozonów mapuje 17% piRNA zaangażowanych w proces spermatogenezy [212]. Niedawno przy pomocy metody głębokiego sekwencjonowania odkryto, że piRNA, pochodzące z jąder świni chińskiej rasy Meishan, w większości mapują do transpozonów [209]. Analiza piRNA pochodzących z jąder świni polskiej linii 990, potwierdziła tę obserwację i wykazała, że loci transpozonów są powszechne w przypadku piRNA występujących w gonadach męskich *S. scrofa*. Warto zauważyć, że 47% piRNA mapuje do regionów niebędących sekwencjami genów, w porównaniu do 58% piRNA świni rasy Meishan [209].

W przeciwieństwie do piRNA występujących w jądrach, informacje dotyczące mapowania do genomu sekwencji piRNA z jajników są bardzo ograniczone. Przy użyciu

metody standardowego sekwencjonowania po wklonowaniu do wektora scharakteryzowano 79 sekwencji piRNA specyficznych dla jajników myszy [206]. W przybliżeniu 70% piRNA mapowało do regionów repetytywnych genomu. Analiza piRNA występujących w jajnikach *D. rerio* przeprowadzona z wykorzystaniem metody głębokiego sekwencjonowania wykazała, że do regionów repetytywnych genomu mapuje 21% piRNA [107].



Rysunek 21. Mapowanie piRNA obecnych w jądrach, jajnikach oraz frakcji wspólnej dla obu gonad do różnych regionów genomu.

Stwierdzono, że piRNA pochodzące z jajników świni w przeważającym stopniu odpowiadają określonym niekodującym RNA, a mianowicie sekwencjom rRNA (35%) oraz tRNA (12%) (Rys. 21). Sekwencje piRNA wspólne dla obu gonad mapują prawie

wyłącznie do sekwencji rRNA (56%) oraz tRNA (14%) (Rys. 21). Zatem 70% piRNA mapuje do sekwencji niekodujących RNA. Dalsza analiza wykazała, że piRNA, które mapują do transkryptów rRNA preferencyjnie mapują do intronów (81%), co sugeruje, że cząsteczki piRNA generowane są z prekursorów rRNA.

Cząsteczki rRNA oraz tRNA odgrywają ważną rolę w procesie translacji. U organizmów eukariotycznych cząsteczki 28S, 18S oraz 5,8S rRNA wchodzi w skład rybosomu [213], natomiast cząsteczki tRNA odpowiedzialne są za właściwe rozszyfrowanie informacji genetycznej. Nie wiadomo, czy cząsteczki piRNA są zaangażowane w regulację procesu translacji. U myszy kompleksy Miwi-piRNA są powiązane z polirybosomami [92], jednakże brak innych dowodów na udział piRNA w regulacji translacji.

Wiadomo, że sekwencje niskocząsteczkowych RNA mogą być zlokalizowane w obrębie intronów transkryptów RNA. Przykładem mogą być małe jąderkowe RNA (snoRNA, ang. *small nucleolar RNAs*), które regulują metylację oraz pseudourydylację eukariotycznych rRNA, a których sekwencje zostały zidentyfikowane w niektórych intronach [214]. Zidentyfikowano również znaczną grupę miRNA, których sekwencje znajdują się wewnątrz intronów oraz oszacowano, że 50% - 80% wszystkich miRNA jest kodowane przez introny obecne w transkryptach mRNA [215].

3.2.6. Potranskrypcyjna modyfikacja piRNA występujących w gonadach *S. scrofa*

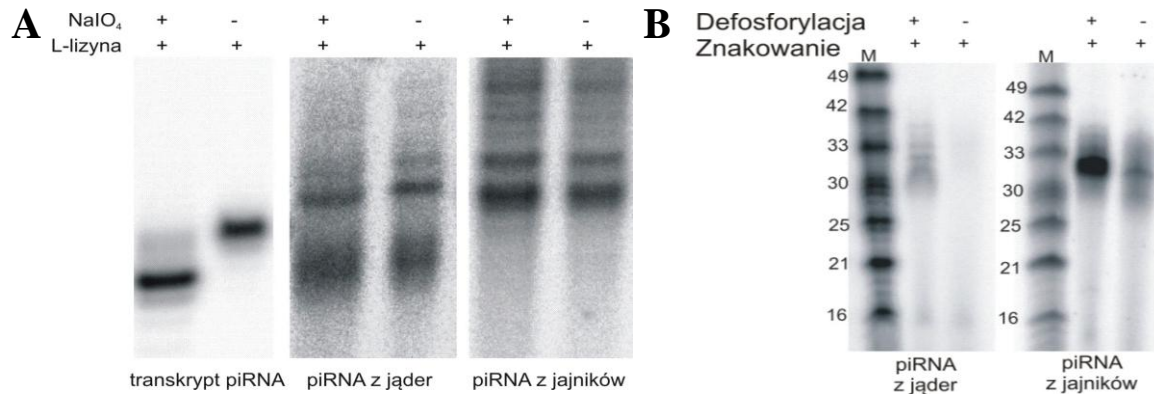
piRNA wyizolowane ze wszystkich do tej pory badanych organizmów zwierzęcych zawierały na swoim końcu 3' metylację grupy hydroksylowej w pozycji 2' rybozy (modyfikacja 2'OMe) [107]. Mimo że modyfikacja ta w przypadku roślinnych siRNA oraz miRNA jest niezbędna do stabilizacji tych niskocząsteczkowych RNA w komórkach, to rola 2'-O-metylacji cząsteczek piRNA u zwierząt pozostaje niejasna [216]. W ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej zbadano, czy piRNA obecne w jądrach i jajnikach świni posiadają modyfikację na końcu 3'. Jako kontrolę wykorzystano piRNA o numerze identyfikacyjnym 63/729 (Tab. 7), obecny zarówno w jajnikach, jak i jądrach świni, który otrzymano metodą transkrypcji *in vitro*, co wykluczyło jakąkolwiek modyfikację tej cząsteczki. W celu wykrycia modyfikacji na końcu 3', wyizolowaną z jąder i jajników frakcję piRNA poddano utlenianiu przy użyciu nadjodanu sodu (NaIO₄), a następnie przeprowadzono reakcję β -eliminacji w obecności L-lizyny. Nadjodan sodu wykazuje silne właściwości utleniające, powodując utlenienie grup 2' 3' hydroksylowych znajdujących się

na końcu 3' cząsteczki RNA do grup aldehydowych i otwarcie pierścienia cukrowego. Następnie reakcja z L-lizyną powoduje usunięcie ostatniego nukleotydu, w wyniku czego powstaje cząsteczka krótsza o jeden nukleotyd. Jednakże obecność grupy metylowej w pozycji 2' rybozy powoduje, że cząsteczka RNA nie jest substratem i reakcja β -eliminacji nie zachodzi. Zatem utlenienie rybozy i skrócenie łańcucha kwasu nukleinowego były możliwe tylko w przypadku syntetycznego RNA, nieposiadającego modyfikacji na końcu 3'. Na skutek zajścia reakcji β -eliminacji zaobserwowano różnicę w migracji w żelu cząsteczki piRNA otrzymanej metodą *in vitro*, potraktowanej i niepotraktowanej nadjodanem sodu. W przypadku piRNA wyizolowanych z jąder i jajników *S. scrofa* obserwuje się, że produkt reakcji migruje na tej samej wysokości co kontrola (Rys. 22A). Wynika to z obecności grupy metylowej na końcu 3' cząsteczek piRNA, która uniemożliwia utlenienie oraz zajście reakcji β -eliminacji. Powyższe wyniki potwierdzają, że cząsteczki piRNA izolowane z gonad świni domowej, podobnie jak w przypadku innych do tej pory badanych zwierząt, posiadają na końcu 3' grupę metylową w pozycji 2'-O rybozy.

W przeprowadzonych badaniach potwierdzono również obecność grupy fosforanowej na końcu 5' piRNA. Cząsteczki piRNA podzielono na dwie frakcje, z których jedną poddano defosforylacji, a drugą nie. Następnie obie frakcje znakowano radioizotopowo z końca 5'. Znaczny wzrost radioaktywności w przypadku próby znakowanej po defosforylacji końca 5' do próby znakowanej bez defosforylacji świadczy o obecności grupy fosforanowej na końcu 5' cząsteczek piRNA izolowanych zarówno z jąder, jak i z jajników (Rys. 22B).

Wszystkie dojrzałe niskocząsteczkowe RNA charakteryzują się obecnością grupy fosforanowej na końcu 5' oraz grupy hydroksylowej na końcu 3'. Cechy te są istotne dla rozpoznawania małych RNA przez mechanizm RNAi. Niektóre niskocząsteczkowe RNA, oddziałujące z białkami Ago posiadają na swoim końcu 3' metylację. Modyfikacja ta występuje w cząsteczkach miRNA oraz siRNA u roślin [217], a także u muszki owocowej w przypadku siRNA oraz nielicznych miRNA oddziałujących z białkiem Ago2. Natomiast miRNA, które u *D. melanogaster* w głównej mierze oddziałują z białkiem Ago1, nie podlegają tej modyfikacji [114, 217]. Przeciwnie grupa metylowa na końcu 3' jest uznawana za zdefiniowaną cechę cząsteczek piRNA u wszystkich do tej pory badanych organizmów zwierzęcych [218]. U roślin grupa metylowa, która przyłączana jest za pomocą metylotransferazy RNA Hen1, chroni małe RNA przed urydylacją na końcu 3' i przez to zwiększa ich stabilność [219]. U muszki owocowej metylotransferaza Pimet, będąca homologiem Hen1, odpowiedzialna jest za metylację zarówno piRNA, jak i małych RNA

oddziałujących z białkiem Ago2, a jej brak obniża stabilność małych RNA, co spowodowane jest urydylacją końca 3' oraz działaniem 3'-egzonukleaz [113, 114]. Dodatkowo wykazano, że grupa metylowa znajdująca się na końcu 3' cząsteczek piRNA wzmacnia ich oddziaływanie z domeną PAZ białek Piwi [201, 202].



Rysunek 22. A - rozdziel w 12% żelu poliakrylamidowym produktów reakcji β -eliminacji wykonanej dla transkryptu piRNA oraz piRNA wyizolowanych z jajników i jąder świni domowej. B – rozdziel piRNA wyizolowanych z jajników i jąder poddanych znakowaniu po defosforylacji końca 5' oraz bez wcześniejszej defosforylacji. M – marker długości RNA.

3.2.7. miRNA obecne w gonadach *S. scrofa*

Analiza porównawcza miRNA obecnych w jądrach i jajnikach świni wykazała, że 8.756 cząsteczek miRNA występuje jednocześnie w obu gonadach. W tabeli 8 zestawiono miRNA najliczniej występujące zarówno w męskich, jak i żeńskich gonadach wraz z regulowanymi przez nie genami. Zaobserwowano wysoką ekspresję miR-10b, które reguluje aktywność genów homeotycznych *hox1a* oraz *hox1b*. Geny te kontrolują rozwój morfologiczny poszczególnych części ciała w początkowych stadiach rozwoju zarodkowego zarówno u bezkręgowców, jak i kręgowców [220]. Warto zauważyć, że ilość miR-10b w obu gonadach jest podobna. Inne miRNA zidentyfikowane w jądrach i jajnikach świni regulują podziały komórkowe (miR-30b, miR-222, miR-145, miR-17), procesy starzenia (miR-106a) oraz rozwój centralnego układu nerwowego (miR-184) [221]. Niektóre, takie jak: miR30c-5p, miR-18a, miR-19a, miR-181b są markerami nowotworowymi [222]. Z kolei inna grupa miRNA, na przykład miR-107, reguluje szlaki metaboliczne poprzez wpływ na ekspresję kinazy pantotenowej, która jest kluczowym enzymem w biosyntezie koenzymu A [223]. Powyższa analiza wskazuje na potencjalną rolę cząsteczek miRNA obecnych w obu gonadach i potwierdza ich ogromne znaczenie w regulacji szeregu procesów biologicznych.

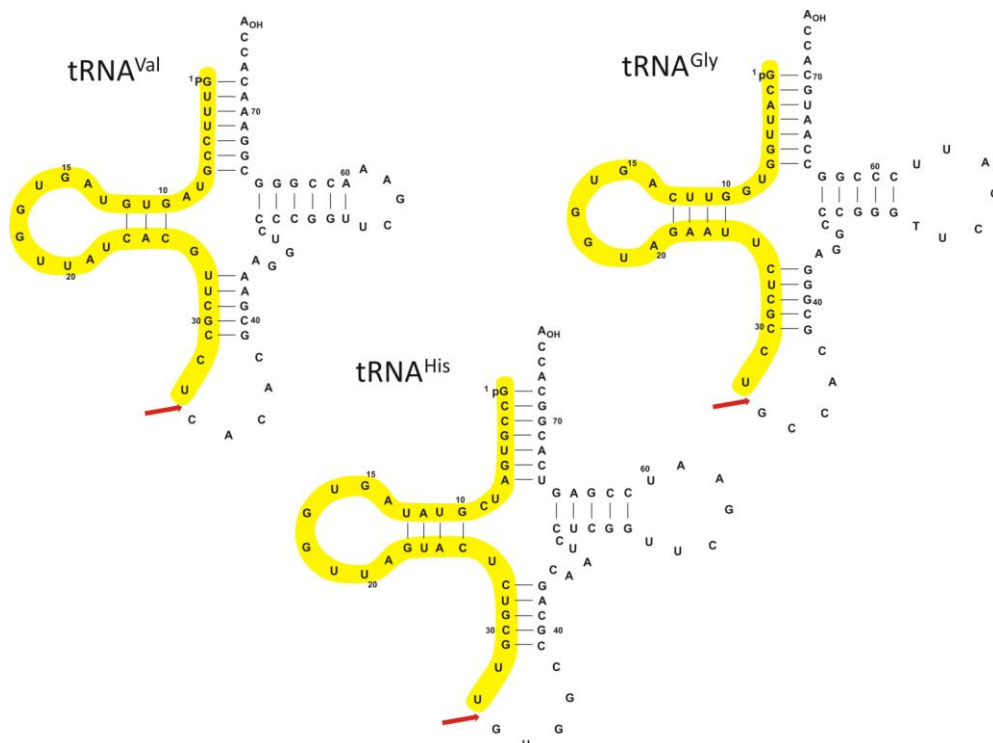
Tabela 8. miRNA występujące w obu gonadach *S. scrofa*, ich geny docelowe oraz prawdopodobne funkcje w komórce.

Numer sekwencji (druga i czwarta liczba oznaczają ilość sekwencji odpowiednio w jajnikach i jądrach)	Długość (nt)	Sekwencja	ID genu do którego mapuje miRNA	ID miRNA z bazy mirBase	Wartość E	Funkcja miRNA w komórce
19-32075-25-14976	23	TACCCTGTAGAACCGAATTTGTG	NR_035383.1	miR-10b	8,00E-08	Regulacja genów homeotycznych <i>HOXA 1a</i> i <i>HOXA3a</i>
28-22700-11-32181	21	ACCCTGTAGAACCGAATTTGT	NR_035383.1	miR10b	4,00E-09	Regulacja genów homeotycznych <i>HOXA 1a</i> i <i>HOXA3a</i>
47-14306-24-16242	23	ACCCTGTAGAACCGAATTTGTGT	NR_035383.1	miR 10b	5,00E-9	Regulacja genów homeotycznych <i>HOXA 1a</i> i <i>HOXA3a</i>
50-14010-57-8542	23	ACCCTGTAGAACCGAATTTGTG	NR_035383.1	miR 10b	4,00E-10	Regulacja genów homeotycznych <i>HOXA 1a</i> i <i>HOXA3a</i>
334-1007-348-1073	20	TGTAAACATCCCCGACTGGA	NR_035380.1	miR-30b	3,00E-10	Regulacja integryn
372-855-3907-298	22	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGA	NR_035382.1	miR320	2,00E-09	Regulacja receptora transferyny
374-854-1280-314	23	AACATTCATTGCTGTTCGGTGGGT	NR_031534.1	miR-181b	2,00E-10	Regulacja receptora jądrowego NR6A1, marker nowotworowy
480-593-773-526	22	TGTAAACATCCTACACTCAGCT	NR_035368.1	miR-30c-5p	2,00E-07	Marker nowotworowy
507-556-696-580	22	AGCAGCATTGTACAGGGCTATC	NR_031539.1	miR-107	7,00E-10	Regulacja kinazy pantotenowej PANK1
529-526-1326-302	22	AACATTCATTGCTGTTCGGTGGG	NR_031534.1	miR-181b	7,00E-10	Regulacja receptora jądrowego NR6A1, marker nowotworowy
586-462-3944-97	24	AACATTCATTGCTGTTCGGTGGGTT	NR_031534.1	miR-181b	5,00E-11	Regulacja receptora jądrowego NR6A1, marker nowotworowy
612-439-1045-383	21	AGCAGCATTGTACAGGGCTAT	NR_031539.1	miR-107	3,00E-09	Regulacja kinazy pantotenowej PANK1
731-343-466-826	24	TGAGAACTGAATTCCATAGGCTGT	NR_035377.1	miR-146	5,00E-9	Regulacja procesu zapalenia
774-313-855-473	21	TTCCTATGCATATACTTCTTT	NR_035399.1	mirR-465a-3p	3,00E-08	Regulacja białka Tnp2 (ang. <i>transition protein</i>)
832-280-924-437	23	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTC	NR_035371.1	miR-221	2,00E-10	Regulacja angiogenezy

835-279-5430-70	21	TGTAAACATCCCCGACTGGAA	NR_035380.1	miR-200	7,00E-09	Inhibicja metastazy oraz przejścia epitelialno-mezenchymalnego
866-259-1288-312	24	TCAGTGCATCACAGAACTTTGTTT	NR_035387.1	miR-148a-3p	5,00E-08	Regulacja podziałów i wzrostu komórek, marker nowotworowy
885-253-840-484	22	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTT	NR_035371.1	miR 221	4,00E-08	Regulacja angiogenezy
1119-183-6665-356	23	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG	NR_031541.1	miR-17	9,00E-08	U myszy delecja miR-17 jest letalna i powoduje defekty rozwojowe płuc i limfocytów
1235-157-670-601	24	AGCTACATCTGGCTACTGGGTCTC	NR_035397.1	miR-222	7,00E-09	Regulacja ekspresji ludzkich embrionalnych komórek macierzystych
1260-153-2126-184	23	TCAGTGCATCACAGAACTTTGTT	NR_035387.1	miR-148a-3p	2,00E-09	Regulacja podziałów i wzrostu komórek, marker nowotworowy
1119-183-6665-56	23	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG	NR_031541.1	miR-106a	8,00E-10	Zmniejszona ekspresja tego miRNA podczas starzenia
1183-168-5514-69	23	AACATTCATTGCTGTTCGGTGGGA	NR_031534.1	miR-181b	8,00E-10	Regulacja receptora jądrowego NR6A1, marker nowotworowy
1213-161-1200-335	22	TCAGTGCATCACAGAACTTTGT	NR_035387.1	miR-148a-3p	4,00E-05	Regulacja podziałów i wzrostu komórek, marker nowotworowy
2835-97-5996-63	22	AACATTCATTGCTGTTCGGTGGGA	NR_031534.1	miR-181b	3,00E-09	Regulacja receptora jądrowego NR6A1, marker nowotworowy
2044-74-6174-61	24	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT	NR_031541.1	miR-106a	8,00E-10	Zmniejszona ekspresja tego miRNA podczas starzenia
2684-50-16453-21	21	AGGGTTGGGCGGAGGCTTTCC	NR_037200.1	miR-411a	7,00E-10	Supresja czynników miogennych
3094-41-33227-10	21	TGTGCAAATCTATGCAAACTG	XM_003124253.2	miR-28-3p	7,00E-07	Regulacja podziałów i wzrostu komórek, marker nowotworowy
2424-58-25881-13	22	TGGACGGAGAACTGATAAGGGT	NR_031535.1.	miR-184	7,00E-10	Regulacja rozwoju zarodkowego, zwłaszcza centralnego układu nerwowego
3663-32-9494-39	21	TGTAAACATCCTACACTCAGC	NR_035368.1	miR-30c-5p	2,00E-07	Marker nowotworowy
3787-31-18570-19	23	TGTGCAAATCTATGCAAACTGA	NR_031537.1	miR-19a	2,00E-10	Nadekspresja w guzach litych

3.2.8. tRF w komórkach płciowych

Co ciekawe, odkryto, że część niskocząsteczkowych RNA obecnych w gonadach świni mapuje do sekwencji tRNA (Tab. 9). Analiza wykazała, że cząsteczki tRF w jajnikach występują w znacznie większej liczbie powtórzeń w porównaniu do jąder. Dla przykładu cząsteczki tRF o numerach identyfikacyjnych 1 i 2 bardzo licznie występują w jajnikach (około 600.000 i 500.000 sekwencji), natomiast w jądrach ich liczba jest wielokrotnie mniejsza i wynosi około 24.000 (Tab. 9). Dziesięć najliczniej występujących cząsteczek tRF w pełni komplementarnych do genomu *S. scrofa* stanowi 1.244.264 i 50.520 sekwencji odpowiednio w jajnikach i w jądrach. Analiza bioinformatyczna wykazała, że te niskocząsteczkowe RNA mapują do sekwencji tRNA rozproszonych na różnych chromosomach. Cząsteczki tRF występujące w gonadach świni pochodzą głównie z tRNA specyficznych dla glicyny (GCC), histydyny (GUG) oraz waliny (UAC) i są generowane przez nieznaną nukleazę, która przecina sekwencję tRNA w obrębie pętli antykodonowej (Rys. 23). Dodatkowo większość zidentyfikowanych u świni tRF mapuje do 5' końca cząsteczek tRNA. Jednakże u innych organizmów wykryto cząsteczki tRF pochodzące zarówno z końca 5' tRNA, jak i z końca 3' [179, 183, 224].



Rysunek 23. Struktura drugorzędowa tRNA specyficznych dla waliny, glicyny i histydyny, które są głównym źródłem cząsteczek tRF obecnych w gonadach *S. scrofa*. Sekwencja tRF została oznaczona kolorem żółtym. Strzałki wskazują miejsce cięcia w pętli antykodonowej.

Rola cząsteczek tRF w regulowaniu funkcji gonad nie została jeszcze poznana. Cząsteczki te zostały wykryte u archeonów [225], roślin [226], w hodowli ludzkich komórek wątroby [183] oraz ludzkich komórkach zainfekowanych wirusem [227]. Typy cząsteczek tRF występujące w różnych organizmach, tkankach czy komórkach przedstawiono w tabeli 10. Niedawno zaproponowano, że cząsteczki tRF zaangażowane są w odpowiedź komórkową na czynniki stresowe oraz biorą udział w supresji nowotworzenia [182, 184]. Duże ilości 5' tRF zostały także wykryte w spermie dojrzałych płciowo myszy [228]. W niniejszej pracy wykazano, że taka grupa niskocząsteczkowych RNA jest również obecna w gonadach świni. Co więcej, 20-krotnie większa ilość tRF w jajnikach w porównaniu do jąder sugeruje, że te niskocząsteczkowe RNA mogą mieć duże znaczenie w procesie oogenezy. Jest to pierwszy zaobserwowany przypadek dużej ilości cząsteczek tRF w jajnikach ssaków. Ciekawe będzie ustalenie, czy cząsteczki tRF tworzą kompleksy z białkami Piwi. Mimo że tRF tworzą słabe kompleksy z białkami Argonaute [226], to jednak mało prawdopodobne jest, że oddziałują z białkami Piwi w gonadach żeńskich ze względu na niski poziom ekspresji genów *Piwi* podczas oogenezy u świni (Roz. 3.1.5. i 3.1.6.).

Tabela 9. Sekwencje tRF najliczniej występujące w obu gonadach.

Długość (nt)	Sekwencja tRF	ID sekwencji oraz liczba tRF w jajnikach i jądrach				Dopasowanie do odpowiednich sekwencji tRNA	Jakość dopasowania
32	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT	1	598847	14	24085	chr7.trna1931-GlyGCC	6E-14
33	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTATCACGTTTCGCCT	2	493802	20	21124	chr7.trna173-ValCAC	2E-14
31	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCC	7	98576	109	4023	chr7.trna1931-GlyGCC	2E-13
33	GCCGTGATCGTATAGTGGTACTACTCTGCGTT	21	30879	936	431	chr4.trna639-HisGTG	2E-14
32	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTATCACGTTTCGCC	35	18260	788	516	chr7.trna173-ValCAC	6E-14
33	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACT	51	13998	1480	266	chr3.trna319-LysCTT	2E-14
33	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTATAGGATTCGGCGCT	60	11045	606	660	chr12.trna51-GluTTC	2E-14
30	GCCGTGATCGTATAGTGGTACTACTCTGC	69	9683	249	1451	chr4.trna639-HisGTG	8E-13
30	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGC	73	9216	379	996	chr7.trna1931-GlyGCC	8E-13
32	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT	76	8669	1226	326	chr4.trna640-GlyCCC	6E-14
34	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTGC	103	5666	215	1702	chr7.trna1931-GlyGCC	4E-15
35	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTGCC	175	2771	126	3461	chr7.trna1931-GlyGCC	1E-15
33	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTATCACGCTCGCCT	99	5801	4243	91	chr7.trna1918-ValAAC	2E-14
31	AGCAGAGTGGCGCAGCGGAAGCGTGCTGGGC	106	5389	1101	366	chr7.trna1932-MetCAT	2E-13
30	TCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTG	1052	199	87	5422	chr1.trna934-GluTTC	8E-13
32	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTATAGGATTCGGCGC	114	4938	2307	167	chr12.trna51-GluTTC	6E-14
34	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACTC	122	4487	1167	346	chr3.trna319-LysCTT	4E-15
29	GCCGTGATCGTATAGTGGTACTACTCTG	125	4348	1186	340	chr4.trna639-HisGTG	3E-12
33	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTG	165	2941	532	742	chr7.trna1931-GlyGCC	2E-14
33	TCCTCGTTAGTATAGTGGTGAGTATCCCCGCCT	162	3083	14008	25	chr7.trna198-AspGTC	2E-14
36	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTGCCA	648	408	160	2439	chr7.trna1931-GlyGCC	3E-16
29	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGG	393	782	195	1964	chr7.trna506-LysCTT	3E-12
32	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGAC	190	2475	5107	75	chr7.trna506-LysCTT	6E-14
32	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGAC	187	2496	7047	53	chr3.trna319-LysCTT	6E-14
33	TCCACATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTGGTT	212	2055	2991	129	chr1.trna934-GluTTC	2E-14

31	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCG	219	1934	5190	74	chr4.trna639-HisGTG	2E-13
30	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTTCGGC	768	315	229	1602	chr12.trna51-GluTTC	8E-13
26	GAACAATAGGACTCGAACCTAACCT	608	445	294	1249	chrM.trna3-GlnTTG	2E-10
34	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTTCGGCGCTC	282	1282	1217	329	chr7.trna249-GluCTC	4E-15
33	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACT	261	1457	10982	33	chr7.trna248-LysTTT	2E-14
31	GAACAATAGGACTCGAACCTAACCTGAGAA	422	719	548	722	chrM.trna3-GlnTTG	2E-13
32	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGAC	276	1332	9355	39	chr7.trna248-LysTTT	6E-14
30	ATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT	288	1237	4231	91	chr7.trna1931-GlyGCC	8E-13
35	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACTCT	330	1020	1424	277	chr7.trna506-LysCTT	1E-15
33	TCCTCGTTAGTATAGTGGTTAGTATCCCCGCCT	283	1280	33891	10	chr5.trna839-AspGTC	2E-14
32	AGCAGAGTGGCGCAGCGGAAGCGTGCTGGGCC	286	1240	12670	28	chr7.trna1932-MetCAT	6E-14
33	AGCAGAGTGGCGCAGCGGAAGCGTGCTGGGCC	319	1071	2226	174	chr7.trna1932-MetCAT	2E-14
28	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCT	346	975	1893	206	chr4.trna639-HisGTG	1E-11
35	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTTCGGCGCTCT	327	1028	2544	152	chr7.trna249-GluCTC	1E-15
33	GAACAATAGGACTCGAACCTAACCTGAGAATT	491	579	717	565	chrM.trna3-GlnTTG	2E-14
34	GGTTCATGGTGTAAATGGTTAGCACTCTGGACTC	322	1056	39645	8	chr7.trna199-GlnCTG	4E-15
30	GAACAATAGGACTCGAACCTAACCTGAGA	444	668	1021	393	chrM.trna3-GlnTTG	8E-13
37	GAACAATAGGACTCGAACCTAACCTGAGAATTCAAA	468	613	1115	362	chrM.trna3-GlnTTG	8E-17
32	GAACAATAGGACTCGAACCTAACCTGAGAAT	555	499	884	456	chrM.trna3-GlnTTG	6E-14
38	GAACAATAGGACTCGAACCTAACCTGAGAATTCAAAA	439	685	1492	264	chrM.trna3-GlnTTG	2E-17
32	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCGT	366	879	16362	22	chr4.trna639-HisGTG	6E-14
32	GGCTCGTTGGTCTAGGGGTATGATTCTCGCTT	387	814	38984	8	chr3.trna1430-ProTGG	6E-14
27	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTC	421	721	4438	87	chr4.trna639-HisGTG	4E-11
30	TCCCATATGGTCTAGCGGTTAGGATTCCTG	1862	85	571	693	chr15.trna1331-GluTTC	8E-13
30	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGG	1161	172	690	586	chr7.trna506-LysCTT	8E-13
34	GGGGGTATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACTGC	568	484	1502	262	chr12.trna209-CysGCA	4E-15
33	GGTTCATGGTGTAAATGGTTAGCACTCTGGACT	407	733	63380	5	chr7.trna199-GlnCTG	2E-14
34	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCGTTG	428	708	15556	23	chr4.trna639-HisGTG	4E-15
31	TTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTTCGCT	682	376	1415	279	chr7.trna173-ValCAC	2E-13
26	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCA	548	503	2674	145	chr3.trna319-LysCTT	2E-10

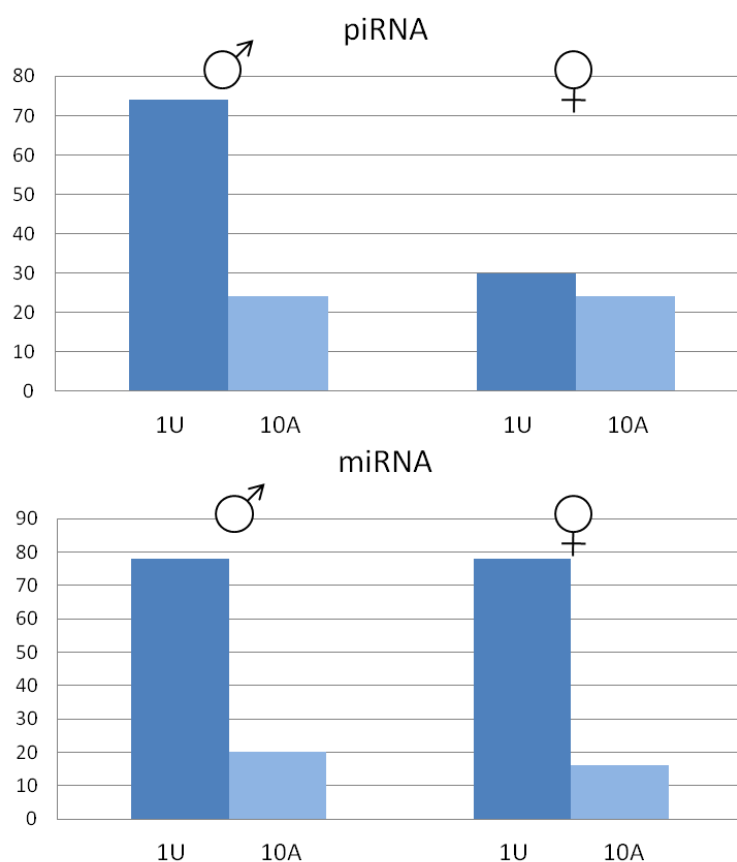
Tabela 10. Występowanie tRF w różnych organizmach, tkankach i komórkach.

	Organizm/tkanka/komórki	Typ tRF	Długość	Literatura
1.	Archeony (<i>Haloferax volcanii</i>)	Val GAC Cys GCA Ser GCT	26nt 20nt 20nt	[225]
2.	Jaja <i>Schistosoma japonicum</i>	Ala AGC Ala TGC Val TAC Gly GGG	19nt 19nt 23nt 21nt	[229]
3.	<i>Tetrahymena thermophila</i>	Asn GTT Gly TCC Gly GCC Thr AGT	30-35nt 30-35nt 30-35nt 30-35nt	[178]
4.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gly TCC Ala AGC Asp GTC	19nt 16nt 19nt	[230]
5.	Ryż (<i>Oryza sativa</i>)	Ala AGC Pro CGG	20-22 nt 21 nt	[231]
6.	Jęczmień (<i>Hordeum vulgare</i>)	His GTG Gly TCC Ala AGC Arg CCT	20 nt 20 nt 20 nt 20 nt	[232]
7.	Sperma myszy	Glu TTC Gly GCC Val CAC	31nt 30nt 34nt	[228]
8.	Hodowla komórek HeLa	Gln CTG Val AAC Val CAC Lys TTT	19nt 19nt 19nt 19nt	[185]
9.	Komórki nowotworu wątrobowo-komórkowego (HepG2)	His GTG Ile TAT Glu CTC Asp GTC	37/39nt 35nt 22nt 22/37nt	[233]
10.	Gonady <i>Sus scrofa</i>	Gly GCC Val TAC His GTG	33nt 33nt 33nt	

3.2.9. Dyskusja uzyskanych wyników – czy biogeneza piRNA zachodzi na drodze mechanizmu „ping-pong” ?

W przeciwieństwie do mechanizmu biogenezy miRNA, który został dobrze poznany i opisany w wielu publikacjach, szlak biogenezy piRNA u ssaków wciąż pozostaje niezrozumiały i wymaga wielu wyjaśnień. Na podstawie bioinformatycznej analizy sekwencji piRNA, występujących u *D. melanogaster*, zaproponowano model potranskrypcyjnej amplifikacji piRNA zwany mechanizmem ping-pong [106, 116]. Mechanizm ten zakłada amplifikację pierwszorzędowych, istniejących uprzednio w komórce cząsteczek piRNA i produkcję drugorzędowych, nowych piRNA pochodzących z sekwencji transpozonów w komórkach *D. melanogaster*, *D. rerio* oraz myszy [106, 111, 116, 173]. Zatem długie, jednoniciowe RNA pochodzące głównie z niekodujących części genomu (transpozony i inne sekwencje repetytywne, niektóre introny) są substratami w procesie biogenezy piRNA. Za powstawanie pierwotnych piRNA oraz wytwarzanie końca 5' i 3' drugorzędowych piRNA odpowiedzialna jest nieznaną nukleaza [234]. Jednakże niedawno wskazano na możliwą rolę nukleazy Zucchini w biogenezie pierwszorzędowych piRNA [235]. U *D. melanogaster* pierwotne piRNA, które tworzą kompleksy rybonukleoproteinowe z białkami Piwi i Aub, wykazują orientację antysensowną w stosunku do sekwencji transpozonów i preferencyjnie posiadają na końcu 5' resztę uracylu. Cząsteczki te są komplementarne do innej grupy piRNA, która oddziałuje z białkiem Ago3 i posiada resztę adeniny w pozycji dziesiątej. Zatem piRNA tworzące kompleksy z białkami Piwi/Aub oraz piRNA tworzące kompleksy z białkiem Ago3 oddziałują ze sobą i tworzą pary zasad w obrębie pierwszych dziesięciu nukleotydów [106, 116]. Dzięki swojej aktywności nukleolitycznej, białko Aub bierze udział w wytwarzaniu drugorzędowych piRNA, które posiadają w pozycji dziesiątej resztę adeniny i wykazują orientację sensowną w stosunku do mRNA transpozonów. W kolejnym etapie cyklu „ping-pong” drugorzędowe, sensowne piRNA oddziałują z komplementarnymi sekwencjami, co prowadzi do wytworzenia nowych antysensownych piRNA z resztą uracylu na końcu 5'. Ponieważ większość cząsteczek piRNA u *D. melanogaster* mapuje do sekwencji transpozonów, mechanizm ten zaproponowano również jako proces wyciszania transpozonów [116]. Identyczny mechanizm został zasugerowany w przypadku biogenezy piRNA u myszy [119, 124]. Mysie białka Piwil1 oraz Piwil2 posiadają aktywność nukleolityczną i uczestniczą w wyciszaniu transpozonów. Jednakże niedawno zakwestionowano założenie, że taki sam mechanizm może funkcjonować u myszy. Wykazano, że piRNA, oddziałujące z białkami Piwil1 oraz Piwil2, obecne tylko w jądrach dojrzałych płciowo myszy, mapują do tej samej

nici DNA i dlatego nie są komplementarne [120]. Mimo że występujące u myszy piRNA posiadają resztę uracylu w pozycji pierwszej, to wykazują mniejszą tendencję do posiadania reszty adeniny w pozycji dziesiątej sekwencji. Co ciekawe, piRNA obecne w jądrach *S. scrofa* mają podobne właściwości: uracyl występuje w pierwszej pozycji cząsteczki RNA w 70% sekwencji, aczkolwiek tylko 20% posiada adeninę w pozycji dziesiątej (Rys. 24). Inaczej wygląda sytuacja w przypadku piRNA obecnych w jajnikach, w których to uracyl w pozycji pierwszej oraz adenina w pozycji dziesiątej sekwencji piRNA występują z podobną częstotliwością (22-30%) (Rys. 24).



Rysunek 24. Występowanie reszty uracylu w pozycji pierwszej (1U) oraz reszty adeniny w pozycji dziesiątej (10A) w sekwencji nukleotydowej piRNA oraz miRNA.

Warto zauważyć, że miRNA obecne w gonadach świni wykazują cechy podobne do piRNA specyficznie występujących w jądrach, gdyż 78% sekwencji miRNA posiada w pozycji pierwszego nukleotydu uracyl, podczas gdy tylko 18% ma adeninę w pozycji dziesiątej (Rys. 24). Struktura krystalograficzna białka Ago występującego u bakterii i archeonów wykazała, że domena MID białka pośredniczy w oddziaływaniu z fosforylowanym końcem 5' nici wiodącej miRNA, a oddziaływanie to wydaje się być

niezależne od rodzaju nukleotydu, znajdującego się na końcu 5' miRNA. Jednakże analiza znanych sekwencji miRNA z organizmów eukariotycznych dowodzi, że istnieje wyraźna tendencja do obecności uracylu na końcu 5', co jest niezbędne do prawidłowego oddziaływania z białkami Ago [236]. Przykładem może być domena MID ludzkiego białko Ago2, która specyficznie rozpoznaje cząsteczki miRNA rozpoczynające się na końcu 5' resztą uracylu [236]. Niedawno wykazano także znaczenie reszty uracylu na końcu 5' nici miRNA w powstawaniu rybonukleoproteinowego kompleksu RISC [237].

Czy cząsteczki piRNA obecne w gonadach dojrzałych płciowo świń powstają na drodze mechanizmu „ping-pong”? Dane uzyskane na drodze głębokiego sekwencjonowania wskazują, że mechanizm biogenezy piRNA w komórkach świni jest odmienny od tego zaproponowanego wcześniej dla *D. melanogaster*. Po pierwsze, obecność reszty uracylu na końcu 5' piRNA nie jest cechą charakterystyczną biogenezy piRNA i mechanizmu „ping-pong”, lecz jest ona niezbędna do prawidłowej interakcji niskocząsteczkowych RNA z białkami Argonaute. Po drugie, zarówno piRNA, występujące w jądrach jak i piRNA, występujące w jajnikach nie wykazują tendencji do posiadania reszty adeniny w pozycji dziesiątej. Należałoby również znaleźć odpowiedź na pytanie czy mechanizm biogenezy piRNA w jajnikach i jądrach *S. scrofa* jest podobny, czy zupełnie odmienny. piRNA obecne w jajnikach w porównaniu do piRNA z jąder posiadają inne właściwości. Te pierwsze są dłuższe, nie mają tendencji do posiadania reszty uracylu na końcu 5', wykazują odmienny rozkład na chromosomach oraz mapują do innych regionów genomowych. Różnice te mogą sugerować, że biogeneza piRNA w jajnikach zachodzi na drodze innego mechanizmu. W procesie biogenezy piRNA niezbędna jest aktywność nukleolityczna białek Piwi [119, 124]. Wykazano, że ekspresja genów *Piwi* w jajnikach świni zachodzi na bardzo niskim poziomie i jest co najmniej 40 razy niższa w porównaniu do ekspresji tych genów w jądrach (Roz. 3.1.5.). Ta obserwacja również może wskazywać na odmienny mechanizm biogenezy piRNA podczas oogenezy, jednakże jakikolwiek alternatywny mechanizm powstawania tych niskocząsteczkowych RNA pozostaje aktualnie nieznanym.

3.3. Oddziaływanie domeny PAZ białka Piwil4 z niskocząsteczkowymi RNA

3.3.1. Otrzymywanie rekombinowanych białek Piwi w systemie bakteryjnym

Cząsteczki piRNA w komórkach płciowych występują w postaci kompleksów z białkami Piwi. W celu zrozumienia, jakie czynniki decydują o specyficzności oddziaływań piRNA z poszczególnymi białkami Piwi w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę nadekspresji białek Piwi w systemie bakteryjnym. Rozdział ten podsumowuje ponad 3-letnie próby nadekspresji białek Piwi w systemie bakteryjnym oraz badania oddziaływań tych białek z piRNA. Sekwencje kodujące białek Piwil1, Piwil2 i Piwil4 wklonowano do wektora pET151/D-TOPO. W wyniku ich sekwencjonowania uzyskano klony o prawidłowej sekwencji nukleotydowej regionów kodujących białek Piwi świni domowej, które następnie wykorzystano do nadekspresji rekombinowanych białek w komórkach bakteryjnych *E.coli*. Jednakże mimo przetestowania różnych szczepów komórek kompetentnych, przy zastosowaniu różnych pożywek, różnych warunków temperaturowych, różnych stężeń IPTG, a także zmieniając czas hodowli po indukcji IPTG nie udało się uzyskać wydajnej nadekspresji białek Piwi.

Nadekspresja rekombinowanych białek może być znacznie zmniejszona w przypadku białek, których ramki odczytu zawierają kodony rzadko wykorzystywane przez bakterie. W szczególności problem mogą stanowić kodony dla argininy (AGG, AGA, CGA), leucyny (CTA), izoleucyny (ATA), oraz proliny (CCC). Ponieważ białka Piwi zawierają wyżej wymienione kodony, to próby ich uzyskania przeprowadzono także w szczepach BL21-Codon Plus (DE3) RIL oraz BL21-Codon Plus (DE3) RIPL. Szczepy te pozwalają na ekspresję białek, których ramki odczytu zawierają rzadko wykorzystywane u *E. coli* kodony. Jednakże ponownie zastosowanie różnych warunków hodowli, takich jak wydłużenie czasu hodowli, zmiana stężenia IPTG, obniżenie temperatury hodowli, czy zmiana pożywki z LB na TB nie przyczyniło się w żaden sposób do zwiększenia ekspresji białek Piwi.

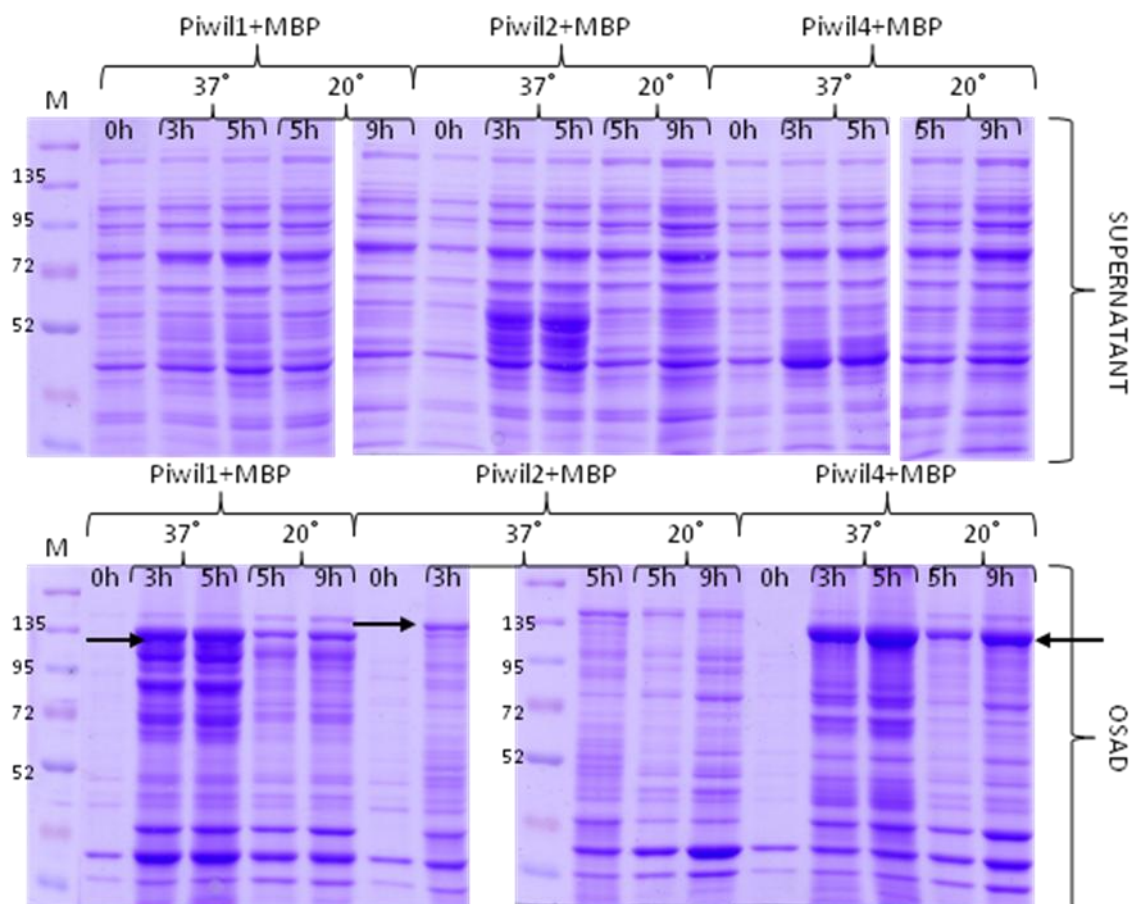
Kolejne próby uzyskania białek Piwi podjęto z wykorzystaniem szczepu BL21-AI. Szczep ten zapewnia wysoki poziom ekspresji i możliwość uzyskania dużych ilości toksycznych dla bakterii białek. Niestety, w przypadku białek Piwi, również ten szczep okazał się nieprzydatny, gdyż nie stwierdzono obecności białek ani we frakcji rozpuszczalnej, ani w osadzie komórkowym

Dopiero po wielu próbach udało się znaleźć szczep *E. coli*, Rosetta2(DE3), w którym zachodziła nadekspresja białek Piwi, jednak białka pojawiały się w osadzie, co oznaczało,

że są nierozpuszczalne i tworzą ciała inkluzyjne. Postanowiono zatem podjąć próbę zwiększenia rozpuszczalności białek przez ich produkcję w fuzji z białkiem wiążącym maltozę (MBP, ang. *maltose binding protein*). Do eksperymentów wykorzystano wcześniej skonstruowane wektory pET-28a(+) zawierające sekwencje kodujące białek Piwi oraz sekwencję MBP. Niestety fuzja białek Piwi z MBP nie przyczyniła się do zwiększenia rozpuszczalności białek Piwi, a białka po nadekspresji nadal pozostawały w osadzie bakteryjnym (Rys. 25). Pełny zakres eksperymentów wykonanych w celu uzyskania białek Piwi w systemie bakteryjnym przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 11).

Tabela 11. Nadekspresja białek Piwi w różnych szczepach komórek *E. coli*.

Białko	Wektor	Szczep bakteryjny	Nadekspresja
Piwi1	pET151/D-TOPO	BL21 Star (DE3)	brak ekspresji
Piwi1	pET151/D-TOPO	C41(DE3)pLysS	brak ekspresji
Piwi1	pET151/D-TOPO	C43(DE3)pLysS	brak ekspresji
Piwi1	pET151/D-TOPO	BL21-Codon Plus (DE3) RIL	brak ekspresji
Piwi2	pET151/D-TOPO	BL21-Codon Plus (DE3) RIL	brak ekspresji
Piwi1	pET151/D-TOPO	BL21-Codon Plus (DE3) RIPL	białko nierozpuszczalne
Piwi2	pET151/D-TOPO	BL21-Codon Plus (DE3) RIPL	brak ekspresji
Piwi4	pET151/D-TOPO	BL21-Codon Plus (DE3) RIPL	brak ekspresji
Piwi1+ MBP	pET-28a	BL21-Codon Plus (DE3) RIPL	brak ekspresji
Piwi2+ MBP	pET-28a	BL21-Codon Plus (DE3) RIPL	brak ekspresji
Piwi4+ MBP	pET-28a	BL21-Codon Plus (DE3) RIPL	brak ekspresji
Piwi1	pET151/D-TOPO	BL21-A1	brak ekspresji
Piwi2	pET151/D-TOPO	BL21-A1	brak ekspresji
Piwi4	pET151/D-TOPO	BL21-A1	brak ekspresji
Piwi1	pET151/D-TOPO	Rosetta2(DE3)pLysS	białko nierozpuszczalne
Piwi2	pET151/D-TOPO	Rosetta2(DE3)pLysS	białko nierozpuszczalne
Piwi4	pET151/D-TOPO	Rosetta2(DE3)pLysS	białko nierozpuszczalne
Piwi1+ MBP	pET-28a	Rosetta2(DE3)pLysS	białko nierozpuszczalne
Piwi2+ MBP	pET-28a	Rosetta2(DE3)pLysS	białko nierozpuszczalne
Piwi4+ MBP	pET-28a	Rosetta2(DE3)pLysS	białko nierozpuszczalne



Rysunek 25. Ekspresja białek Piwil1, Piwil2 oraz Piwil4 w fuzji z MBP w szczepie Rosetta2(DE3). Białka nierozpuszczalne w formie ciał inkluzyjnych widoczne są wyłącznie w osadzie bakteryjnym.

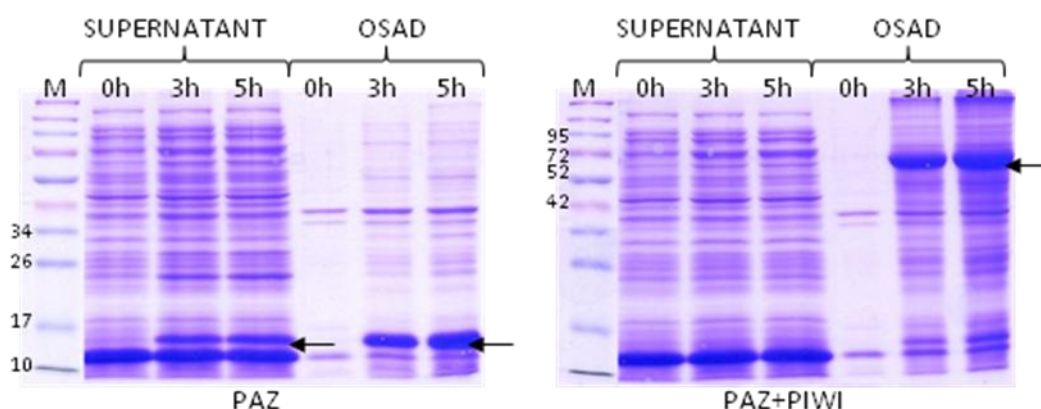
3.3.2. Otrzymanie domeny PAZ białka Piwil4 w systemie bakteryjnym

Pomimo przeprowadzonych licznych prób pełnej długości białka Piwi *S. scrofa* okazały się być nierozpuszczalne i powstawały w formie ciał inkluzyjnych, postanowiono uzyskać domenę PAZ białka Piwil4 odpowiedzialną za oddziaływania z niskocząsteczkowymi RNA oraz domenę PAZ wraz z domeną PIWI, wykazującą właściwości nukleolityczne. W tabeli 12 przedstawiono wyniki analizy bioinformatycznej sekwencji aminokwasowych pełnej długości białek Piwi, jak i poszczególnych domen, wskazujące procent ich nierozpuszczalności podczas nadekspresji w komórkach *E. coli*. Analizę wykonano przy pomocy programu Recombinant Protein Solubility Prediction dostępnego na stronie internetowej www.biotech.ou.edu.

Tabela 12. Procent nierozpuszczalności białek Piwi oraz domen PAZ i PIWI podczas nadekspresji w systemie bakteryjnym.

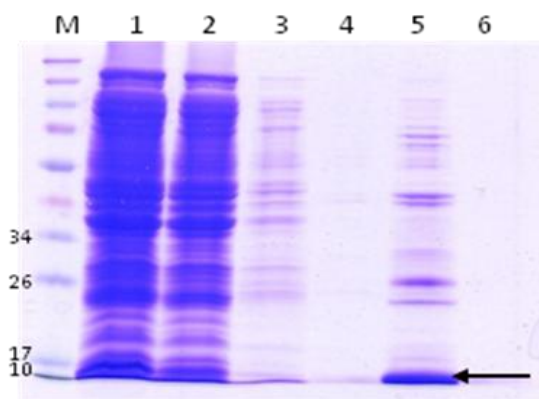
BIAŁKO/DOMENA	% NIEROZPUSZCZALNOŚCI
<u>Piwi1:</u>	81,3
PAZ	63,4
PIWI	74,6
<u>Piwi2:</u>	87,2
PAZ	48,8
PIWI	76,4
<u>Piwi4:</u>	81,6
PAZ	27,4
PIWI	81,7
PAZ+PIWI	73,3

Wyniki analizy bioinformatycznej potwierdziły wyniki eksperymentalne, czyli brak rozpuszczalności białek Piwi. Ponieważ analiza ta wykazała, że domena PAZ może występować w postaci rozpuszczalnej postanowiono wykonać nadekspresję samej tylko domeny PAZ białka Piwi4 oraz dodatkowo domeny PAZ w połączeniu z domeną PIWI. Sekwencję kodującą domenę PAZ oraz domenę PAZ+PIWI białka Piwi4 wklonowano do wektora pET151/D-TOPO. Nadekspresję fragmentów białka Piwi4 przeprowadzono w szczepie Rosetta2(DE3). Zarówno domena PAZ (14 kDa) jak i domena PAZ+PIWI (64 kDa) ulegały nadekspresji. Dłuższy fragment białka Piwi4 był nierozpuszczalny i podobnie jak pełnej długości białka Piwi występował w postaci ciał inkluzyjnych. Natomiast domena PAZ powstawała zarówno w formie rozpuszczalnej występującej w supernatancie, jak i nierozpuszczalnej w osadzie bakteryjnym (Rys. 26).



Rysunek 26. Ekspresja domeny PAZ oraz domen PAZ+PIWI białka Piwi4 w szczepie Rosetta2(DE3). Domena PAZ występuje zarówno w formie nierozpuszczalnej, jak i rozpuszczalnej.

Kolejnym etapem było oczyszczenie domeny PAZ za pomocą chromatografii powinowactwa do unieruchomionych jonów metali (tu: niklu). Początkowo hodowlę bakteryjną prowadzono w pożywce LB w 37°C przez 3h po indukcji IPTG, jednak później zoptymalizowano warunki i zaobserwowano, że znacznie lepszy efekt osiąga się przez hodowlę w pożywce M9 w temperaturze 20° przez 19 godzin. Po hodowli i lizie bakterii białko nakładano na kolumnę zawierającą złożę połączone z jonami Ni²⁺. Ponieważ sekwencja białka zawierała dodatkowe 6 reszt histydyny, tworzącej kompleksy z jonami Ni²⁺, zatem możliwe było odseparowanie białka od zanieczyszczeń niespecyficznie związanych ze złożem poprzez przemycie złoża buforami zawierającymi wzrastające stężenie imidazolu. Następnie wmywano właściwe białko buforem do elucji zawierającym 300 mM imidazol (Rys. 27).

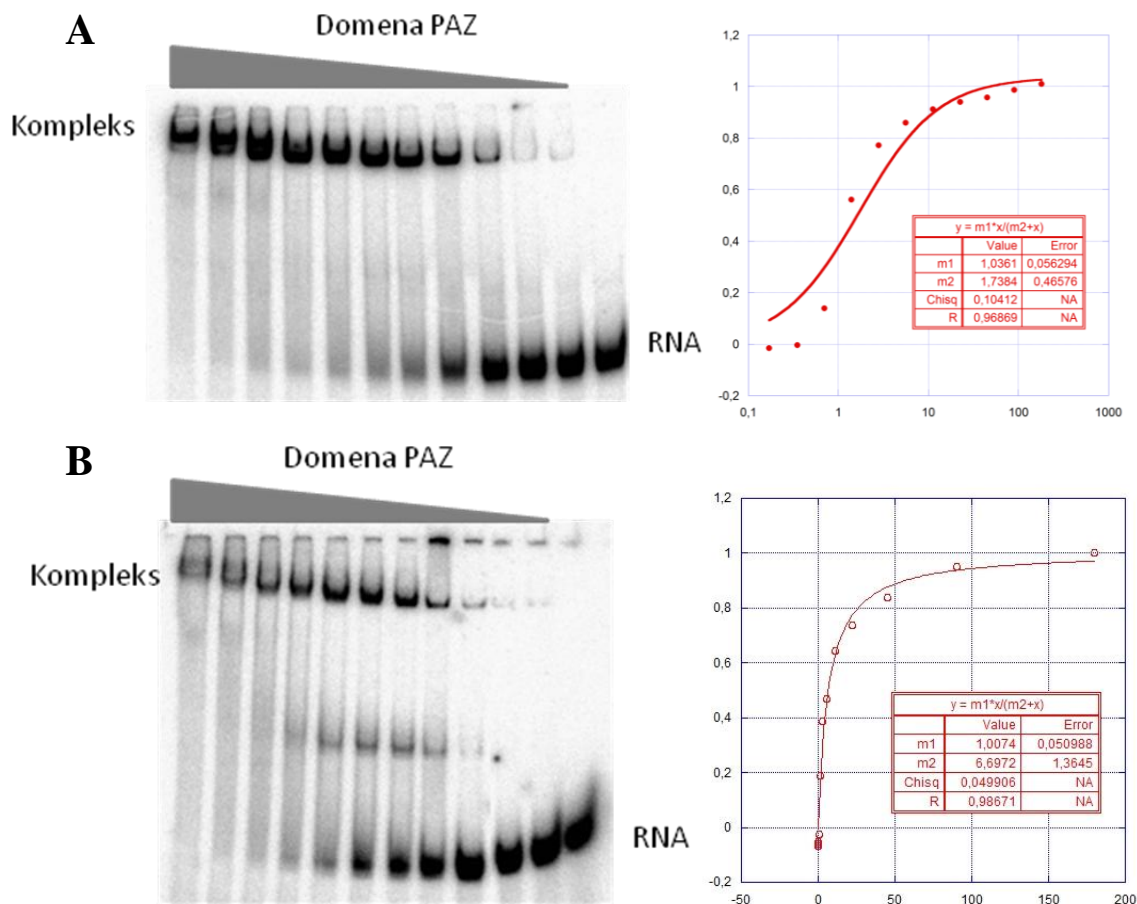


Rysunek 27. Frakcje po oczyszczeniu białka za pomocą chromatografii powinowactwa. 1- supernatant po sonikacji bakterii nałożony na kolumnę ze złożem; 2 – frakcja niezwiązanych na kolumnie białek; 3, 4 - frakcje po przemyciu złoża buforem z 20 mM imidazolem; 5 – frakcja białek po elucji buforem z 300 mM imidazolem zawierająca domenę PAZ; 6 – frakcja po elucji 1 M imidazolem.

3.3.3. Badanie oddziaływań domeny PAZ białka Piwil4 z niskocząsteczkowymi RNA

Do badania oddziaływań domeny PAZ białka Piwil4 z niskocząsteczkowymi RNA użyto transkrypty niskocząsteczkowych RNA uzyskane metodą transkrypcji *in vitro* w układzie T7 RNA polimerazy. Sekwencje badanych transkryptów pozyskano z sekwencji uzyskanych w wyniku głębokiego sekwencjonowania. Do badań użyto m. in. sekwencję piRNA o długości 40 nt (TTTCGTACGTAGCAGAGCAGCTCCCTCGCTGCGATCTATT) oraz sekwencję tRF o długości 32 nt (GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCT). Test opóźnionej migracji w żelu poliakrylamidowym (EMSA, ang. *electrophoretic mobility*

shift assay) w obecności 1 mM jonów Mg^{2+} wykazał wiązanie badanych niskocząsteczkowych RNA do domeny białkowej PAZ (Rys. 28). Stała dysocjacji (K_d) dla wiązania cząsteczki piRNA wynosiła 1,74 μM , natomiast dla tRF 6,7 μM .



Rysunek 28. Analiza tworzenia kompleksów rybonukleoproteinowych między domeną PAZ białka Piwil4, a znakowaną radioizotopowo na końcu 5' cząsteczką piRNA (A) oraz tRF (B) w zakresie stężenia białka 0,17 – 180 μM . Wartości K_d obliczono na podstawie równania Michaelis-Menten.

Zbadano także wpływ stężenia jonów Mg^{2+} na wiązanie jednego z transkryptów piRNA do domeny PAZ. Wyznaczone stałe dysocjacji wynosiły odpowiednio 0,32 μM w nieobecności Mg^{2+} , 3,76 μM przy 1 mM Mg^{2+} oraz 7,30 μM przy 4 mM Mg^{2+} . Ponieważ wiązanie RNA do białka prowadzono w obecności 100 μM jonów K^+ , można przypuszczać, że ich obecność zapewniała wiązanie RNA do białka, natomiast obecność jonów Mg^{2+} miała działanie inhibujące.

3.3.4. Dyskusja uzyskanych wyników

Ze względu na trudności, jakie napotkano podczas nadekspresji białek Piwi, występujących u świni, w systemie bakteryjnym, wstępna analiza czynników warunkujących tworzenie kompleksów rybonukleoproteinowych została ograniczona wyłącznie do domeny białkowej PAZ białka Piwi4. Test opóźnionej migracji w żelu poliakryloamidowym wykazał wiązanie uzyskanej *in vitro* cząsteczki piRNA oraz co ciekawe również cząsteczki tRF do domeny PAZ białka Piwi4. Do tej pory bardzo niewiele wiadomo na temat funkcji oraz oddziaływania cząsteczek tRF z białkami. Wykazano, że cząsteczki te oddziałują z białkami Ago u roślin i uczestniczą w regulacji ekspresji genów, jednakże mechanizm tej regulacji pozostaje na razie nieznany [226]. Niskocząsteczkowe RNA są ważnymi regulatorami ekspresji genów, a rozwój metod głębokiego sekwencjonowania oraz analiz bioinformatycznych przyczynił się do odkrycia nowych klas małych niekodujących RNA, takich jak na przykład tRF. Jest to ciekawe odkrycie, gdyż do tej pory uważano, że w regulację ekspresji genów zaangażowane są głównie miRNA, piRNA oraz siRNA. Odkrycie tRF w komórkach roślinnych i zwierzęcych oraz wykazanie ich oddziaływania z białkami rodziny Argonaute stanowi cenny wkład do badań nad udziałem cząsteczek tRF w regulacji ekspresji genów.

4. Podsumowanie

Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej dotyczą charakterystyki, roli oraz mechanizmu działania cząsteczek piRNA oraz oddziałujących z nimi białek Piwi, a także ich udziału w gametogenezie ssaków na przykładzie świni domowej. W pierwszym etapie badań ustalono sekwencje nukleotydowe oraz aminokwasowe białek Piwi występujących w gonadach świni domowej (dostępne w bazie GenBank pod numerami JX036536, JX036537 i JX036538 odpowiednio dla białek Piwil1, Piwil2 oraz Piwil4). Stwierdzono znaczne podobieństwo świńskich białek Piwi do białek Piwi występujących u człowieka. Ponadto przeprowadzono analizę ekspresji mRNA białek Piwi w oocytach, jajnikach, jądrach oraz kilku tkankach somatycznych pochodzących z osobników znajdujących się na różnych stadiach rozwojowych. Analiza ekspresji techniką RT-PCR wykazała, że ekspresja trzech genów *Piwi* jest tkankowo specyficzna i ograniczona jedynie do gonad, natomiast metoda PCR w czasie rzeczywistym pozwoliła na dokładne określenie względnej ekspresji mRNA białek Piwi w męskich i żeńskich gonadach w zależności od dojrzałości płciowej osobników. Wykryto istotne zmiany w ekspresji genów *Piwi* podczas rozwoju osobniczego *S. scrofa*, a także stwierdzono znacznie wyższą ekspresję genów *Piwi* w jądrach w porównaniu do jajników i oocytów.

Wykorzystanie dwóch metod sekwencjonowania – tradycyjnej z klonowaniem do plazmidów oraz głębokiego sekwencjonowania pozwoliło na ustalenie sekwencji cząsteczek piRNA, a także innych niskocząsteczkowych RNA (miRNA oraz tRF) występujących w gonadach dojrzałych płciowo osobników. Po raz pierwszy oszacowano, jaka część tych sekwencji RNA jest wspólna dla obydwu gonad. Ponadto dokonano dokładnej charakterystyki piRNA występujących zarówno w męskich, jak i żeńskich gonadach. Za pomocą analizy bioinformatycznej określono lokalizację sekwencji piRNA na poszczególnych chromosomach, procentowy rozkład zasad na całej długości cząsteczek piRNA oraz stwierdzono ich występowanie w genomie w postaci klastrów. Zbadano również potranskrypcyjną modyfikację cząsteczek piRNA. Analiza sekwencji genomu odpowiadających sekwencjom piRNA wykazała, że frakcja piRNA występująca w obydwu gonadach, mapuje głównie do sekwencji intronowych rRNA. Jest to pierwsza taka informacja dostępna w literaturze. Ponadto stwierdzono, że mechanizm biogenezy piRNA w gonadach *S. scrofa* jest inny niż zaproponowany w przypadku muszki owocowej. Stwierdzono także, że cząsteczki miRNA wspólne dla obydwu gonad są zaangażowane w regulację podziałów

komórkowych, procesów starzenia oraz nowotworzenie. Natomiast rola występujących w komórkach płciowych cząsteczek tRF, będących w istocie fragmentami cząsteczek tRNA, pozostaje w dużym stopniu nieznana.

Pomimo ponad 3-letnich wysiłków nie udało się opracować warunków efektywnej nadekspresji pełnej długości białek Piwi w systemie bakteryjnym ze względu na brak ich rozpuszczalności i występowanie wyłącznie w formie nierozpuszczalnej. Zatem ostatni etap, jakim było badanie oddziaływań piRNA z białkami Piwi, ograniczono do domeny PAZ białka Piwi4, którą udało się uzyskać w formie rozpuszczalnej. Test opóźnionej migracji w żelu poliakrylamidowym wykazał wiązanie niskocząsteczkowych RNA (piRNA oraz tRF) do domeny PAZ.

5. Materiały i metody

5.1. Aparatura

Zestaw do elektroforezy płytowej S2 (Life Technologies)
Mały zestaw do elektroforezy płytowej
Zestaw do elektroforezy Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad)
Zasilacz E863 (Consort)
Zasilacz PS 3003 (Apelex)
Zasilacz PS 3002 (Apelex)
Termocykler UNO II (Biometra)
Termocykler T-Gradient (Biometra)
S20 SevenEasy pH metr (Mettler Toledo)
Waga laboratoryjna WPT 1 (Radwag)
Waga laboratoryjna BP 2215 (Sartorius)
Lampa UV (Camag)
Wirówka 5804R (Eppendorf)
Wirówka 5415D (Eppendorf)
Wirówka Universal 32R (Hettich)
Cieplarka do hodowli bakterii (Mettler)
Heidolph Inkubator 1000
Thermomixer Comfort (Eppendorf)
Spektrofotometr UV/VIS NanoDrop (Thermo Scientific)
Licznik scyntylicyjny MicroplateCounter 2450 (PerkinElmer)
Zestaw do wizualizacji żeli UVP2000
Skaner radioaktywności FLA-5100 (Fuji-Film)
Suszarka do żeli GelDryer 583 (Bio-Rad)
Pompa próżniowa (Laboport)
Komora laminarna aura mini (BioAir)
Homogenizator IKA T-10 Basic (Ultra Turrax)
Roche LightCycler 2.0
Genome Analyzer IIx (Illumina)
2100 Bioanalyzer (Agilent)
Fluorymetr Qubit (Life Technologies)

5.2. Odczynniki i materiały

Większość odczynników pochodziła z firm Sigma-Aldrich, Lab Empire, Life Technologies, Serva, Thermo Scientific lub Merck Millipore. Filtry strzykawkowe Milex GP oraz zestaw filtrów wirówkowych do zagęszczania białek pochodziły z firmy Merck Millipore. Kolumny do oczyszczania reakcji z soli i nukleotydów zakupiono w firmie Ambion. IPTG zakupiono w firmie Lab Empire, złożę Ni-NTA w firmie Qiagen, natomiast barwnik SYBR Gold w firmie Life Technologies.

5.2.1. Związki promieniotwórcze

[γ ³²P] ATP (4000-5000 Ci/mmol) Hartmann Analytic

5.2.2. Enzymy

Taq DNA polimeraza, Pfu DNA polimeraza, T4 kinaza polinukleotydowa, T4 DNA ligaza, odwrotna transkryptaza RevertAid M-MuLV, EcoRI, NotI, BanI – Thermo Scientific, inhibitor rybonukleaz RNasin – Promega, rybonukleaza H – Ambion, inhibitor proteaz PMSF, lizozym – Lab Empire

5.2.3. Zestawy odczynników

- Zestaw do izolacji plazmidowego DNA z komórek bakterii - Bio Basic i Qiagen
- Zestaw do odwrotnej transkrypcji Superscript III – Life Technologies
- Zestaw do oczyszczania produktów PCR QIAquick PCR Purification Kit - Qiagen
- Zestaw do ekstrakcji DNA z żelu DNA Gel Extraction Kit - Millipore
- Zestaw do klonowania produktów PCR Champion pET151 Directional TOPO Expression Kit – Life Technologies
- Zestaw do izolacji RNA z tkanek RNAqueous Midi Kit – Ambion
- Zestaw do izolacji niskocząsteczkowych RNA mirVana miRNA Isolation Kit – Ambion
- Zestaw do klonowania produktów PCR TOPO TA Cloning Kit – Life Technologies
- Zestaw do transkrypcji *in vitro* MEGAshortscript High Yield Transcription Kit – Ambion
- Zestaw do znakowania kwasów nukleinowych KinaseMax Kit - Ambion
- Zestaw do klonowania małych RNA miRCat Small RNA Cloning Kit – Integrated DNA Technologies
- Zestaw do izolacji małych RNA High Pure miRNA Isolation Kit – Roche

- Zestaw do odwrotnej transkrypcji Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit – Roche
- Zestaw do Real-Time PCR LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I – Roche
- Zestaw do przygotowania biblioteki do sekwencjonowania TruSeq Small RNA Sample Prep Kit - Illumina

5.2.4. Oligonukleotydy

Wszystkie startery DNA użyte w toku wykonywania pracy doktorskiej zostały zakupione w IBB Warszawa.

5.2.5. Plazmidy

- plazmid pET-28a(+) zawierający otwartą ramkę odczytu białka MBP pozyskano z Pracowni Inżynierii Białek IChB PAN

5.2.6. Szczepy bakteryjne

- E. coli* BL21Star(DE3) - Life Technologies
- E. coli* BL21-A1 - Life Technologies
- E. coli* C41(DE3)pLysS - OverExpress
- E. coli* C43(DE3)pLysS - OverExpress
- E. coli* BL21-Codon Plus (DE3) RIL - Agilent Technologies
- E. coli* BL21-Codon Plus (DE3) RIPL - Agilent Technologies
- E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS - Novagen

5.2.7. Standardy do oznaczania wielkości makrocząsteczek

- Marker do oznaczania masy białek w żelach denaturujących z SDS – Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder – Thermo Scientific
- Marker do analizy wielkości fragmentów DNA w żelach agarozowych GeneRuler DNA Ladder Mix – Thermo Scientific
- Marker do analizy wielkości fragmentów RNA w żelach agarozowych RNA Millenium Markers – Ambion

5.2.8. Bufory, roztwory i pożywki

Bufor elektroforetyczny 1xTBE

100 mM Tris, 100 mM kwas borowy, 1 mM EDTA, pH 8,3

Bufor elektroforetyczny 1xTAE

40 mM Tris-kwas octowy, 1 mM EDTA, pH 8,0

Bufor elektroforetyczny 0,5xTB

50 mM Tris, 50 mM kwas borowy, pH 8,3

Bufor TE

10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA

Bufor do elektroforezy białek w warunkach denaturujących (SDS Running Buffer)

25 mM Tris-HCl pH 8,3, 190 mM glicyna, 0,1% SDS

Bufor do żelu zagęszczającego

125 mM Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 6,8

Bufor do żelu rozdzielającego

375 mM Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 8,8

Roztwór do denaturacji i nakładania próbek białkowych – roztwór SSB

63 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% β-merkaptoetanol, 2% SDS, 10% glicerol, 0,02% w/v błękit bromofenolowy

Roztwór do denaturacji i nakładania próbek RNA – elektroforeza w żelu agarozowym – roztwór 10xRSB

50 mM Tris-HCl pH 7,6, 60% glicerol, 0,02% w/v błękit bromofenolowy

Roztwór do dehydratacji żeli białkowych – roztwór „fixing”

50% etanol, 10% lodowaty kwas octowy

Roztwór do barwienia żeli białkowych – roztwór „staining”

50% metanol, 10% lodowaty kwas octowy, 0,05% w/v kumasyna Brilliant Blue R-250

Roztwór do odbarwiania żeli białkowych

5% metanol, 12.5% lodowaty kwas octowy

30% roztwór żelu białkowego 37,5:1 (w/w)

30 g akryloamidu, 0,8 g bisakryloamidu, H₂O do 100 ml

40% roztwór żelu poliakryloamidowego 19:1 (w/w)

38 g akryloamidu, 2 g bisakryloamidu, H₂O do 100 ml

40% roztwór żelu poliakryloamidowego 29:1 (w/w)

38,67 g akryloamidu, 1,33 g bisakryloamidu, H₂O do 100 ml

40% roztwór żelu poliakryloamidowego 40:1 (w/w)

39,02 g akryloamidu, 0,98 g bisakryloamidu, H₂O do 100 ml

Roztwory do nakładania próbek zawierających RNA lub DNA

Elektroforeza w warunkach denaturujących:

8 M mocznik, 0,02% w/v błękit bromofenolowy, 0,02% w/v ksylencjanol

Elektroforeza DNA w żelu agarozowym (6x DNA Loading Dye):

10 mM Tris-HCl pH 7,6, 60% glicerol, 0,02% w/v błękit bromofenolowy, 0,02% w/v ksylencjanol, 60 mM EDTA

Bufor do elucji kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego

300 mM octan sodu pH 5,2, 1 mM EDTA

Bufor I (do lizy bakterii)

50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, pH 8

Bufor II („wash buffer”)

50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7

Bufor III (do wymywania białek gradientem imidazolu)

50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 20 mM – 1 M imidazol, pH 6

Bufor do przechowywania białka

20 mM HEPES-KOH pH 7,4, 100 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,1 mM EDTA pH 8, 10% glicerol

Pożywki do hodowli bakteryjnych

Pożywka stała LB (Luria Broth)

5 g tryptonu, 2,5 g ekstraktu drożdżowego, 2,5 g NaCl, 7,5 g agaru, 1 ml 1 M NaOH, H₂O do 500 ml

Pożywka płynna LB

5 g tryptonu, 2,5 g ekstraktu drożdżowego, 2,5 g NaCl, 1 ml 1 M NaOH, H₂O do 500 ml

Pożywka TB (Terrific Broth)

6 g tryptonu, 12 g ekstraktu drożdżowego, 2 ml glicerolu, 50 ml roztworu 0,17 M KH₂PO₄ i 0,72 M K₂HPO₄, H₂O do 500 ml

Pożywka minimalna M9

12,8 g Na₂HPO₄·7H₂O, 3 g KH₂PO₄, 0,5 g NaCl, 1 g NH₄Cl, 2 ml 1 M MgSO₄, 20 ml 20% glukozy, 1 ml 0,1 M CaCl₂, H₂O do 1000 ml

Antybiotyki

Ampicylina – 50 mg/ml H₂O

Kanamycyna – 50 mg/ml H₂O

Chloramfenikol – 34 mg/ml EtOH

Stężenie końcowe antybiotyku w pożywce do hodowli bakteryjnej dla ampicyliny i kanamycyny wynosiło 50 µg/ml pożywki a dla chloramfenikolu 34 µg/ml pożywki.

5.2.9. Materiał biologiczny

W niniejszej pracy materiał do badań stanowiły tkanki pochodzące od świni domowej (*Sus scrofa domestica*). Jądra i jajniki pobrano z męskich i żeńskich osobników będących w różnych grupach wiekowych i na różnym etapie rozwoju. W badaniach wykorzystano jajniki loszek 12-miesięcznych, dojrzałych płciowo (ang. *pubertal, cyclic*) i 6-miesięcznych, niedojrzałych płciowo, (ang. *prepubertal*) oraz jajniki 3-miesięcznej i 3-dniowej samicy, pozyskane ze świń rzeźnych z dwóch lokalnych ubojni: BEMAR w Luboniu oraz w Kombinacie Wilczyna w Podrzewiu. Jajniki wycinano i klasyfikowano pod względem obecności bądź braku ciałek żółtych i białawych oraz wielkości pęcherzyków jajnikowych. Jajniki loszek dojrzałych płciowo charakteryzowały się obecnością ciałek żółtych oraz pęcherzyków jajnikowych o średnicy 3-6 mm. Jajniki loszek niedojrzałych płciowo cechował mniejszy rozmiar oraz obecność na powierzchni jedynie małych pęcherzyków jajnikowych o średnicy 1-4 mm. Podczas pobierania jajników zwracano także uwagę na morfologię macicy, w celu odróżnienia narządów samic po przebytych ciążach od narządów loszek dojrzałych płciowo. Następnie jajniki przewożono do laboratorium w pojemniku termicznym. Materiał trafiał do badań nie później niż trzy godziny od momentu uboju. Następnie oddzielnie z jajników loszek dojrzałych i niedojrzałych płciowo pobierano kompleksy oocyt-kumulus KOK (ang. *complex oocyte-cumulus COC*) metodą aspiracji przy użyciu strzykawki, umieszczano je w pożywce Hepes-Talp i analizowano pod względem morfologii przy użyciu mikroskopu stereoskopowego. Tylko KOK o prawidłowej morfologii, posiadające przynajmniej trzy warstwy komórek wzgórka jajonośnego oraz ooplazmę równomiernie wypełniającą osłonkę przejrzystą, poddawano dalszej analizie. Następnie oocyty pozbawiano komórek pęcherzykowych i w grupach po 25 przenoszono do próbek, mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C do momentu izolacji RNA. Materiał biologiczny od samic pozyskiwano w ścisłej współpracy z Zespołem Biotechnologii Rozrodu Katedry Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu kierowanym przez prof. D. Cieślak.

Jądra pobrano z osobników męskich linii 990: młodego, 3-dniowego osobnika oraz dorosłego, 2-letniego. Do badań wykorzystano także tkanki somatyczne pochodzące z 3-dniowego osobnika męskiego, takie jak: nerka, mózg, serce, śledziona, płuca, żołądek, jelita, wątroba oraz mięśnie. Tkanki te pozyskano z Zakładu Doświadczalnego Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Pawłowicach. Pobieranie tkanek

odbywało się pod nadzorem lekarza weterynarii, a tkanki zaraz po izolacji były mrożone w ciekłym azocie i przechowywane w -80°C do momentu izolacji RNA. Badania prowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu nr pozwolenia 70/2008.

5.3. Metody standardowe

5.3.1. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących

Elektroforeza kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących (obecność 8 M mocznika) jest doskonałą metodą rozdziału fragmentów DNA oraz RNA, różniących się nawet o jeden nukleotyd. Metodę wykorzystywano do analizy niskocząsteczkowych RNA wyizolowanych z tkanek oraz analizy produktów reakcji β -eliminacji. Ponadto metoda ta została użyta do oczyszczania fragmentów RNA po transkrypcji *in vitro*, oligomerów DNA po syntezie chemicznej, a także cząsteczek RNA po znakowaniu radioizotopowym. W przypadku analizy niskocząsteczkowych RNA stosowano żel poliakryloamidowy o usieciowaniu 19:1 (stosunek wagowy akryloamidu do bisakryloamidu) z 8 M mocznikiem oraz bufor elektroforetyczny 1xTBE. W pozostałych przypadkach stosowano usieciowanie 29:1. Procentowość żelu uzależniona była od długości rozdzielanych fragmentów i wahała się od 8 do 15%. Przed nałożeniem na żel próbki mieszano z roztworem 8 M mocznika z barwnikami elektroforetycznymi w stosunku 1:1, a następnie denaturowano przez 3 minuty w temperaturze 95°C , po czym umieszczano w lodzie. Każdą elektroforezę poprzedzała preelektroforeza prowadzona przez około 20 minut przy natężeniu prądu 10 mA. Podczas rozdziału elektroforetycznego stosowano natężenie prądu 15-20 mA. Do wizualizacji wyników wykorzystywano: znakowanie radioizotopowe – autoradiografia, analiza niskocząsteczkowych RNA - barwienie żelu barwnikiem SYBR Gold, oczyszczanie RNA po transkrypcji *in vitro* oraz oligomerów DNA po syntezie chemicznej – wygaszanie światła UV, reakcja β -eliminacji – ekrany odwzorowujące z analizą na skanerze radioaktywności.

5.3.2. Elektroforeza cząsteczek DNA i RNA w żelu agarozowym

Elektroforezę w żelu agarozowym stosowano do analizy fragmentów DNA otrzymanych metodą PCR. W zależności od długości rozdzielanych fragmentów stosowano 1-2% (w/v) żel agarozowy z dodatkiem bromku etydy (0,1 $\mu\text{g/ml}$), a jako bufor

elektroforetyczny 1xTBE. Przed nałożeniem na żel próbki DNA mieszano z roztworem do nakładania próbek DNA, w stosunku 6:1. Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej przy stałym natężeniu prądu 60 mA. Fragmenty DNA obserwowano w świetle UV.

Elektroforezę RNA w żelu agarozowym stosowano do analizy jakościowej całkowitego RNA wyizolowanego z tkanek. Stosowano 1,2% (w/v) żel agarozowy i bufor elektroforetyczny 1xTAE. Próbkę mieszano z roztworem RSB, w stosunku 10:1 z dodatkiem bromku etydyny (50 µg/ml). Jako czynnik denaturujący stosowano dejonizowany formamid, którego końcowe stężenie wynosiło 60%. Przed nałożeniem materiału do kieszonek w żelu przeprowadzano denaturację przez 5 minut w temperaturze 65°C, po czym próbki przenoszono na 5 minut do lodu. Elektroforezę prowadzono w temperaturze 4°C przy stałym natężeniu prądu 40 mA. Fragmenty RNA obserwowano w świetle UV.

5.3.3. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących

Metodę stosowano do kontrolowania poszczególnych etapów nadekspresji białek Piwi i domeny PAZ. Żel białkowy składał się z dwóch warstw różniących się procentowością i wartością pH. Stosowano 5% żel zagęszczający pH 6,8 i 12-15% żel rozdzielający pH 8,8, przy czym obydwa zawierały 0,1% SDS jako czynnik denaturujący. Przed elektroforezą próbki mieszano z roztworem SSB w stosunku 1:1 i denaturowano 10 minut w 95°C. Próbkę zwirowywano, pobierano 10-20 µl i nakładano bezpośrednio do kieszonek w żelu. Podczas rozdziału elektroforetycznego stosowano natężenie prądu 20-30 mA.

Po elektroforezie żel zawierający białka umieszczano na 20 minut w roztworze „fixing” z jednoczesnym delikatnym mieszaniem. Następnie żel inkubowano przy delikatnym kołysaniu przez 1 godzinę w roztworze barwiącym zawierającym kumasyne. Po czym żel zalewano roztworem odbarwiającym i inkubowano przy delikatnym kołysaniu przez około 12-16 godzin.

5.3.4. Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego

Po elektroforezie prążki odpowiadające oligomerom DNA lub cząsteczkom RNA wizualizowano w świetle UV. Wycięte pasma żelu inkubowano w buforze do elucji przez 3 godziny w temperaturze pokojowej z okresowym wytrząsaniem.

5.3.5. Odzyskanie DNA z agarozy z wykorzystaniem ekstrakcji fenolowej

Elektroforezę przeprowadzono w 1% żelu z agarozy niskotopliwej, zawierającym bromek etydyny o stężeniu 0,1 µg/ml, z buforem elektroforetycznym 1xTAE. Aby uniknąć wzrostu temperatury, prowadzącej do depolimeryzacji żelu, elektroforezę prowadzono przy niskim napięciu prądu i w temperaturze 4°C. W świetle UV wycięto fragment żelu zawierający prążek DNA, a następnie stopiono go w 65°C. Do rozpuszczonej agarozy dodano 4 objętości buforu TE. Preparat ekstrahowano kolejno fenolem i chloroformem, po czym z zebranej fazy wodnej wytrącano DNA.

5.3.6. Ekstrakcja fenolem

Procedurę wykorzystywano do oczyszczania produktów PCR. Próbkę zawierającą DNA wytrząsano 2 minuty z jedną objętością fenolu (nasyconego buforem TE, pH 8,0) w temperaturze pokojowej i wirowano 1 minutę przy 10000 rpm w celu separacji faz. Następnie, aby usunąć resztki fenolu, do zebranej fazy wodnej dodawano jedną objętość mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy w stosunku 24:1 (v/v) i wytrząsano 1 minutę w temperaturze pokojowej, po czym wirowano 1 minutę przy 10000 rpm. Zbierano fazę wodną i wytrącano DNA.

5.3.7. Wytrącanie kwasów nukleinowych

Cząsteczki DNA lub RNA strącano w obecności 300 mM octanu sodu pH 5,2 dodając 3 objętości 96% etanolu. W przypadku cząsteczek RNA dodawano 1 µl glikogenu o stężeniu 20 mg/ml. Następnie próbki umieszczano na noc w temperaturze -20°C. Wytrącony RNA lub DNA zwirowywano przez 20 minut przy 14000 rpm w temperaturze 4°C. Supernatant usuwano, a osad suszono i rozpuszczano w sterylnej wodzie.

RNA wyizolowany z tkanek wytrącano za pomocą chlorku litu. Do eluentu dodawano chlorek litu w stosunku objętościowym 2:1 i strącano przez 1 godzinę w -20°C. Osad zwirowywano przy 14000 rpm przez 15 minut w 4°C. Po usunięciu supernatantu, osad przemywano dodatkowo 100 µl 70% etanolu i ponownie wirowano. Supernatant usuwano, a osad suszono i rozpuszczano w buforze Elution Solution.

RNA wyizolowany z oocytów wytrącano przy pomocy octanu sodu i niefluorescencyjnego barwnika (*NF Pellet Paint Coprecipitant*), dzięki któremu możliwe

jest obserwowane bardzo małe ilości kwasów nukleinowych. Do 100 μ l RNA dodawano 10 μ l 3 M octanu sodu, 200 μ l 96% etanolu oraz 1,5 μ l barwnika NF i wirowano 10 minut w temperaturze 4°C przy 14000 rpm. Supernatant usuwano, a do niebieskiego osadu dodawano 500 μ l 70% etanolu i powtarzano wirowanie. Następnie powtórzono ten etap używając 96% etanolu. Po usunięciu supernatantu, RNA suszono w 37°C i rozpuszczono w 10 μ l sterylnej wody.

Stężenie kwasu nukleinowego w próbce oznaczano na podstawie pomiarów absorpcji przy długości fali $\lambda = 260$ nm z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop. Stosowano następujące przeliczniki:

ssRNA: $1A_{260}/\text{ml} = 33 \mu\text{g}/\text{ml}$,

ssDNA: $1A_{260}/\text{ml} = 33 \mu\text{g}/\text{ml}$,

dsDNA: $1A_{260}/\text{ml} = 50 \mu\text{g}/\text{ml}$

5.3.8. Izolacja całkowitego RNA z tkanek i oocytów

Do izolacji całkowitego RNA z tkanek wykorzystano zestaw RNAqueous-Midi Kit i postępowano zgodnie z zaleceniami producenta. 500 mg zamrożonej tkanki umieszczono w moździerzu, zalano ciekłym azotem i ucierano do uzyskania proszku, który następnie rozpuszczono w 6 ml buforu Lysis/Binding Buffer. W celu uzyskania lizatu mieszaninę homogenizowano przy 30000 obrotów na minutę za pomocą homogenizatora IKA T-10 Basic. Lizat wirowano przez 10 min przy 6000 obrotów na minutę w celu usunięcia resztek komórkowych i po zmieszaniu z jedną objętością 64% etanolu podawano przez strzykawkę na filtr. Filtr przemywano kilkakrotnie przy użyciu buforów Wash Solution I oraz Wash Solution 2/3. RNA związany na filtrze eluowano podgrzanym do 100°C buforem Elution Solution. Następnie wytrącano osad przy użyciu chlorku litu.

Izolacja całkowitego RNA z oocytów (25 oocytów/próbę) prowadzona była przy użyciu zestaw High Pure miRNA Isolation Kit zgodnie z zaleceniami producenta. Zestaw został zaprojektowany do izolacji frakcji niskocząsteczkowych RNA jednak charakteryzuje go wysoki odzysk całkowitego RNA, w szczególności z prób o małej ilości materiału biologicznego. Do oocytów dodano 150 μ l 20% Binding Buffer i inkubowano przez 2 minuty. Następnie do uzyskanego lizatu dodano 312 μ l 100% Binding Buffer oraz 200 μ L Binding Enhancer i po dokładnym wymieszaniu próby naniesiono na filtr, po czym wirowano 1 minutę przy 13000 g w temperaturze 4°C. Kolejnymi dwoma etapami było przepłukanie

kolumnienki przy użyciu Wash Buffer w celu usunięcia zanieczyszczeń. Ostatecznie RNA eluowano poprzez podanie na kolumnenkę 100 µl Elution Buffer i wirowanie 1 minutę przy 13000 g. RNA strącano przy użyciu octanu sodu i niefluorescencyjnego barwnika (*NF Pellet Paint Coprecipitant*).

5.3.9. Izolacja niskocząsteczkowych RNA z tkanek

Do izolacji niskocząsteczkowych RNA z tkanek wykorzystano zestaw mirVana miRNA Isolation Kit i postępowano zgodnie z zaleceniami producenta. 100-250 mg tkanki homogenizowano w 10 objętościach buforu Lysis/Binding Buffer. Następnie do lizatu dodano 1/10 objętości miRNA Homogenate Additive i inkubowano 10 min na lodzie. Całkowity RNA wyekstrahowano poprzez dodanie równej objętości mieszaniny fenol:chloroform. Otrzymany supernatant zmieszano z 1/3 objętości 96% etanolu i nałożono na filtr. Do filtratu zawierającego frakcję niskocząsteczkowych RNA dodano 2/3 objętości 96% etanolu i nałożono na świeży filtr. Filtr przemywano kilkakrotnie przy użyciu buforów Wash Solution I oraz Wash Solution 2/3. Niskocząsteczkowe RNA związane na filtrze eluowano podgrzanym do 95°C buforem Elution Solution. Stężenie frakcji niskocząsteczkowych RNA zmierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop. Na potrzeby głębokiego sekwencjonowania przeprowadzono po 3 niezależne izolacje z dwóch osobników, a uzyskana frakcja niskocząsteczkowych RNA była łączona.

5.4. Metody stosowane w badaniach własnych

5.4.1. Klonowanie genów *Piwi*

5.4.1.1. Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji wykonano na całkowitym RNA wyizolowanym z jąder dorosłego oraz trzydniowego osobnika, przy użyciu starterów specyficznych dla genów *Piwi* oraz startera oligo(dT). Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 2 µg RNA, 5 pmoli startera specyficznego bądź 400 ng startera oligo(dT)₁₈, 1x bufor reakcyjny (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 0,5 mM każdego z dNTP, 5 mM DTT, 2 U/µl inhibitora RNaz oraz 400 U odwrotnej transkryptazy SuperScript III. RNA wraz ze starterem inkubowano 5 minut w 65°C, a następnie próbę przeniesiono na lód. Po 5 minutach inkubacji na lodzie dodano pozostałe składniki i reakcję inkubowano przez

1 godzinę w 50°C (w przypadku reakcji ze starterem specyficznym) lub 55°C (w przypadku reakcji ze starterem oligo(dT)18). Reakcję zakończono 15-minutową inaktywacją enzymu w 70°C. W celu pozbycia się matrycowego RNA dodawano 2 U RNazy H i inkubowano w 37°C przez 20 minut. Otrzymane cDNA stanowiły matrycę w reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla genów *Piwi*. Do amplifikacji genów *Piwil1* oraz *Piwil2* wykorzystano cDNA powstałe przy użyciu starterów specyficzných na matrycy RNA izolowanego z jąder dorosłego osobnika, natomiast do amplifikacji *Piwil4* posłużyło cDNA powstałe przy użyciu startera oligo(dT)18 na matrycy RNA izolowanego z młodego, trzydniowego osobnika.

5.4.1.2. Otrzymanie sekwencji kodujących białek Piwi

Sekwencje kodujące białek *Piwil1*, *Piwil2* i *Piwil4* amplifikowano przy użyciu polimerazy DNA Pfu. Reakcje PCR prowadzono przy użyciu odpowiednio dobranych starterów DNA oznaczonych jako Pf (ang. *primer forward*) i Pr (ang. *primer reverse*) (Tab. 13). Namnażanie każdego z fragmentów DNA poprzedzały reakcje testowe przeprowadzone w gradiencie temperatury oraz stężenia MgSO₄, a także z różnymi dodatkami stosowanym w celu zwiększenia wydajności reakcji PCR, takimi jak betaina, DMSO, formamid, w celu znalezienia optymalnych warunków amplifikacji. Mieszanina reakcyjna (PCR w skali preparatywnej) zawierała cDNA, dwa startery o stężeniu 0,5-0,75 μM, 20 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA, 2-4 mM MgSO₄, 200 μM każdego z dNTP oraz 0,025-0,04 U/μl Pfu DNA polimerazy. Amplifikację *Piwil2* przeprowadzono w obecności 2,5% DMSO. Z kolei sekwencję kodującą białka *Piwil4* uzyskano w dwóch reakcjach PCR. Pierwsza z nich przebiegała w obecności 1 M betainy, a startery hybrydowały do regionów 5' i 3'UTR *Piwil4*. Właściwy, krótszy produkt, zawierający sekwencję kodującą, uzyskano w reakcji reamplifikacji, do której użyto około 60 ng DNA. Warunki temperaturowe stosowane w poszczególnych reakcjach PCR przedstawiono w tabeli 13. Produkty reakcji PCR analizowano metodą elektroforezy w żelu agarozowym i oczyszczano za pomocą zestawu do oczyszczania produktów reakcji PCR (*Piwil1*), zestawu do ekstrakcji DNA z żelu (*Piwil4*) lub odzyskiwano z agarozy metodą ekstrakcji fenolowej (*Piwil2*). Startery Pf posiadały na końcu 5' dodatkową sekwencję CACC, która zwiększa efektywność wklonowania produktu PCR do wektora we właściwej orientacji.

Tabela 13. Startery oraz warunki temperaturowe stosowane w reakcjach PCR.

Gen	Sekwencja startera w orientacji 5'-3'	Warunki PCR
<i>Piwil1</i>	Pf CACCATGACTGGGAGAGCCAGAG Pr TTAGAGGTAGTAAAGGCGATTTGAC	30 cykli: 95°, 30 s; 65°, 30 s; 72°, 6 min
<i>Piwil2</i>	Pf CACCATGGATCCTGTTTCGACCAC Pr TCACAGAAAGAACAGGTTCTCACAC	30 cykli: 95°, 30 s; 62°, 30 s; 72°, 6 min
<i>Piwil4</i>	Pf AAGACACTGTGGGCTCACTGGGAAC Pr CTAAGGATGTCAGTGCTTCGTGTCA	30 cykli: 95°, 30 s; 55°, 30 s; 72°, 5 min
	Pf CACCATGAGTGGACGGGCCCGCGTG Pr TCACAGGTAGAAGAGAGAATTGGCTAATTCC	33 cykle: 95°, 30 s; 68°, 30 s; 72°, 5 min

5.4.1.3. Klonowanie sekwencji kodujących do plazmidu

Insert i wektor pET151/D-TOPO mieszano w stosunku molowym 2:1. Do reakcji dodano roztwór soli (1,2 M NaCl, 60 mM MgCl₂) i prowadzono inkubację w temperaturze pokojowej (22°C) przez 5 minut. Mieszaniną reakcyjną bez oczyszczania transformowano komórki *E. coli*.

5.4.1.4. Transformacja *E. coli*

Plazmidowy DNA wprowadzono do komórek kompetentnych *E. coli* TOP10 metodą szoku cieplnego. Komórki kompetentne rozmrażano w lodzie przez 30 min. Następnie dodawano 3 µl mieszaniny ligacyjnej i inkubowano 30 min na lodzie. Zawiesinę bakteryjną umieszczano na 30 sekund w temperaturze 42°C, po czym przenoszono na 2 minuty do lodu, dodawano 250 µl pożywki SOC i komórki hodowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (200 rpm). Komórki bakteryjne (50-200 µl) rozprowadzano na powierzchni szalek z pożywką LB i ampicyliną. Hodowlę prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 37°C. Po całonocnej inkubacji wybierano wyraźnie oddzielone kolonie bakteryjne i przeprowadzano test na obecność insertu. Minimalna ilość każdej kolonii przeniesiono do probówki z 30 µl wody i inkubowano 10 minut w 95°C, z czego pobierano po 5 µl jako matrycę do reakcji PCR. W przypadku uzyskania pozytywnej reakcji PCR pozostałe bakterie pochodzące z pojedynczej kolonii, zawierające insert zawieszano w 8 ml pożywki LB z ampicyliną i inkubowano przez 12 godzin w temperaturze 37°C przy 240 rpm. Izolację plazmidu prowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu odczynników firmy Bio Basic. Otrzymane plazmidy sekwencjonowano.

5.4.2. RT-PCR

RNA wyizolowano z 11 tkanek zgodnie z protokołem opisanym wcześniej w Materiałach i Metodach (5.3.8). W celu otrzymania cDNA przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji ze starterem oligo(dT)18 według protokołu opisanego w Materiałach i Metodach (5.4.1.1). Otrzymany cDNA stanowił matrycę w PCR ze starterami specyficznymi dla białek Piwi i β -aktyny (Tab. 14). Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 0,5 μ l cDNA, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween 20, 200 μ M każdego z dNTP, 1,5 mM MgCl_2 , 0,5 μ M startera Pf i Pr i 0,03 U/ μ l polimerazy Taq. Do reakcji kontrolnej zamiast cDNA dodawano 0,5 μ l wody. Reakcja przebiegała w następujących warunkach: 95°C przez 3 minuty, a następnie 30 cykli obejmujących 95°C – 30 sekund, 60°C – 30 sekund, 72°C – 1 minuta, a następnie końcowe wydłużanie 72°C – 5 minut. 5 μ l każdej próbki DNA obciążano roztworem do nakładania próbek DNA i rozdzielano w 1,2% żelu agarozowym.

Tabela 14. Startery stosowane w reakcjach PCR.

Gen	Sekwencja startera w orientacji 5'-3'
<i>Piwil1</i>	Pf CTACATCACCAACTTGCTTG Pr AATCGAAGCTCAAACCCAG
<i>Piwil2</i>	Pf GTGAAGCAAGGATCAAAAGG Pr ATGAAGGAAAGCTCAGGCAG
<i>Piwil4</i>	Pf GAAGCATCTTCTAGCACTGACC Pr GAATTTCCACTGGCTCAGAAGG
<i>ACTB</i>	Pf AGAGCAAGAGAGGCATCCTG Pr CGACGTAGCACAGCTTCTCC

5.4.3. Analiza względnego poziomu transkryptów metodą PCR w czasie rzeczywistym

Analiza względnego poziomu transkryptów została oparta na technice Real-time PCR. Polega ona na odniesieniu ilości transkryptów genów badanych do liczby transkryptów genu referencyjnego. Analizę ekspresji genów na poziomie transkryptów przeprowadzono dla trzech genów *Piwi*: *Piwil1*, *Piwil2* i *Piwil4* oraz genu referencyjnego β -aktyny w następujących tkankach: jądra 3-dniowego i dorosłego osobnika, jajniki 3-dniowej, niedojrzałej i dojrzałej płciowo lochy, oocyty dojrzałej i niedojrzałej płciowo lochy.

5.4.3.1. Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja

Izolację RNA z badanych tkanek prowadzono wg procedury przedstawionej w podrozdziale nr 5.3.8. *Izolacja całkowitego RNA z tkanek i oocytów*. W celu otrzymania cDNA z jąder i jajników przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji ze starterem oligo(dT)₁₈ według protokołu opisanego w Materiałach i Metodach w podrozdziale 5.4.1.1. Natomiast w przypadku oocytów, cDNA otrzymano za pomocą zestawu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, zgodnie z zaleceniami producenta. Do reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystano cały RNA wyizolowany z próby 25 oocytów. RNA, 2,5 μM primer oligo(dT) oraz 60 μM heksamery denaturowano przez 10 minut w temperaturze 65°C. Następnie dodano 1x bufor reakcyjny, 1mM każdego z dNTP, 5 mM DTT, 20 U inhibitora RNaz oraz 10 U odwrotnej transkryptazy i prowadzono reakcję przez 30 minut w temperaturze 50°C. Reakcję zatrzymano poprzez inkubację w temperaturze 85°C przez 5 minut.

5.4.3.2. PCR w czasie rzeczywistym

PCR w czasie rzeczywistym wykonano przy użyciu zestawu LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, zgodnie z zaleceniami producenta. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 1 μl cDNA, 0,5 μM każdego ze starterów, 1x LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (mieszanina buforu reakcyjnego, FastStart Taq DNA polimerazy, dNTP, barwnika SYBR Green I i 1 mM MgCl₂). Stosowano następujące warunki temperaturowe: wstępna denaturacja i aktywacja polimerazy w 95°C przez 10 minut, następnie 45 cykli: 95°C – 15 sekund, 60°C – 10 sekund i 70°C – 10 sekund. Po każdym biegu sporządzono krzywą topnienia produktu poprzez stopniowe podwyższanie temperatury badanej mieszaniny z 60°C do 95°C, co pozwala na wykrycie niespecyficznych produktów. Ostatnim etapem reakcji było chłodzenie próby do temperatury 40°C. Sekwencje starterów przedstawiono w tabeli 15. Analizę prowadzono w dwóch powtórzeniach. Analizę ilości transkryptów oparto na metodzie krzywej standardowej. Dla każdego badanego genu, na podstawie amplifikacji kolejnych, dziesięciokrotnych rozcieńczeń matrycowego DNA, o znanym stężeniu, wyznaczano krzywą standardową. Otrzymana krzywa standardowa służyła jako punkt odniesienia dla wyników uzyskiwanych podczas analizowania prób eksperymentalnych. Standardy DNA o znanym stężeniu przechowywano w -20°C. Do każdej reakcji dodawano jedną próbkę standardu DNA, wykorzystywaną do końcowych obliczeń.

Względny poziom transkryptów dla każdego z badanych genów wyznaczano w odniesieniu do liczby transkryptów genu referencyjnego w tej samej próbie.

Tabela 15. Startery stosowane w *Real-time PCR*.

Gen	Sekwencja startera w orientacji 5'-3'
<i>Piwil1</i>	Pf AAGAAAGCAGATGGCTCTGA Pr CGCATTTTATCAGTTAGACCT
<i>Piwil2</i>	Pf CATCATGTACGGCAGGGGTGTG Pr GATGCAAGATTTGTCCTGACAG
<i>Piwil4</i>	Pf GTCGTGGATCTGGAAGCAACTC Pr TACAGGTGGCACAGTTTGAAGG
<i>ACTB</i>	Pf CAAAGCCAACCGTGAGAAGA Pr GTACCCCTCGTAGATGGGCA

5.4.4. Konstruowanie biblioteki niskocząsteczkowych RNA

Niskocząsteczkowe RNA wyizolowane z jąder i jajników dorosłego osobnika rozdzielono na żelu poliakryloamidowym, po czym frakcje odpowiadające długością cząsteczkom piRNA (29-35 nt) odzyskano z żelu i sklonowano przy użyciu zestawu miRCat Small RNA Cloning Kit, postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Niskocząsteczkowe RNA ligowano z 3' i 5' łącznikowym DNA w dwóch oddzielnych reakcjach. W pierwszym etapie przeprowadzono ligację na końcu 3'. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 200-400 ng RNA, 2 μ M 3' RNA linker, 1x bufor do ligacji, wzmacniacz ligacji oraz 5 U T4 RNA ligazy. Do reakcji dodano również 10 pmoli 21-nt miSPIKE, który posłużył jako wewnętrzna kontrola ligacji oraz marker wielkości. Reakcję prowadzono przez 3 godziny w 22°C, po czym produkty reakcji rozdzielono w 12% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących. Niskocząsteczkowe RNA, które uległy ligacji, zostały odzyskane z żelu metodą elucji i posłużyły jako matryca w reakcji ligacji na końcu 5'. Skład mieszaniny był taki jak powyżej, z tą różnicą, że użyto 5' RNA linker oraz dodano 1 mM ATP. Reakcja przebiegała 6 godzin w 22°C, po czym RNA strącano, wirowano, suszono i rozpuszczano w sterylnej wodzie. Uzyskany RNA poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji w obecności 0,5 μ M startera RT (5'-GATTGATGGTGCCTACAG-3'). RNA inkubowano ze starterem przez 5 minut w 65°C oraz przez 5 minut na lodzie, po czym dodawano 1x bufor reakcyjny (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 0,5 mM każdego z dNTP, 5 mM DTT, 2 U/ μ l inhibitora RNaz oraz 200 U odwrotnej transkryptazy

SuperScript III. Reakcję inkubowano 1 godzinę w 50°C i zakończono ją 15-minutową inaktywacją enzymu w 70°C. Następnie wykonano pięć reakcji PCR, każda w objętości 50 µl. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 4 µl reakcji odwrotnej transkrypcji, 1x bufor reakcyjny (75 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) Tween 20), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM każdego z dNTP, dwa startery o stężeniu 0,2 µM (Pf: 5'-TGGAATTCTCGGGCACC-3' i Pr: 5'-GATTGATGGTGCCTACAG-3') oraz 1,5 U Taq DNA polimerazy. Stosowano następujące warunki temperaturowe: 95°C – 5 minut, a następnie 30 cykli: 95°C – 30 sekund, 52°C – 30 sekund, 72°C – 30 sekund, po czym następowało końcowe wydłużanie w 72°C przez 5 minut. Produkty reakcji PCR analizowano metodą elektroforezy w żelu agarozowym. Wszystkie reakcje łączono i oczyszczano z wykorzystaniem ekstrakcji fenolem, strącano, wirowano i rozpuszczano w wodzie. Produkt reakcji PCR cięto 40 U enzymu restrykcyjnego BanI w obecności buforu O (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA) przez 4 godziny w 37°C, po czym inaktywowano enzym w 65°C przez 20 minut. Reakcję oczyszczano przez ekstrakcję fenolem, a następnie strącano, wirowano i osad rozpuszczano w wodzie. Następnie przeprowadzono konkatameryzację ampikonów w obecności 1x buforu do ligacji (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP pH 7,8), 1 mM ATP i 30 U T4 DNA ligazy przez 16 godzin w 22°C. Mieszaninę reakcyjną po konkatameryzacji rozdzielano w 2% żelu agarozowym, a DNA odzyskiwano z żelu metodą ekstrakcji fenolowej. Następnie konkatamery DNA poddawano reakcji wypełniania końców. Mieszanina reakcyjna zawierała: konkatamery DNA, 1x bufor reakcyjny (75 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) Tween 20), 2 mM MgCl₂, 0,6 mM każdego z dNTP i 0,08 U/µl Taq DNA polimerazy. Reakcję inkubowano 5 minut w 95°C, 15 minut w 72°C oraz chłodzono w 4°C, a następnie oczyszczano przy użyciu zestawu QIAquick PCR Purification Kit. Klonowanie wykonano za pomocą zestawu TOPO TA Cloning Kit, zgodnie z zaleceniami producenta. Reakcję ligacji konkatamerów z wektorem pCR2.1-TOPO inkubowano 25 minut w 22°C w obecności 1,2 M NaCl oraz 60 mM MgCl₂. Transformacja komórek *E. coli* przebiegała zgodnie z protokołem opisanym wcześniej w Materiałach i Metodach (5.4.1.4). Dodatkowo na pożywkę LB naniesiono X-gal umożliwiający selekcję białych i niebieskich kolonii. Po całonocnej hodowli w białych i jasnoniebieskich koloniach przeprowadzono test na obecność insertu. Bakterie zawierające insert o odpowiedniej długości zawieszano w 8 ml pożywki LB z ampicyliną i inkubowano przez 12 godzin w temperaturze 37°C przy 240 rpm. Izolację plazmidu prowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu odczynników firmy Bio Basic.

Otrzymane plazmidy sekwencjonowano. Uzyskane sekwencje DNA analizowano w celu zlokalizowania sekwencji niskocząsteczkowych RNA w wektorze. Każdą wykrytą sekwencję RNA zlokalizowano w genomie świni przy użyciu programu BLAST w przeglądarce UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). Początek i koniec sekwencji w genomie określono na podstawie wyników analizy BLAST. W celu zidentyfikowania piRNA, wszystkie sekwencje przeanalizowano przy użyciu narzędzi dostępnych na stronie piRNA Bank (<http://pirnabank.ibab.ac.in/index.shtml>) [238].

5.4.5. Głębokie sekwencjonowanie

Głębokie sekwencjonowanie wykonano przy użyciu Illumina Genome Analyzer Iix w Europejskim Centrum Genomiki i Bioinformatyki w Poznaniu. Frakcje niskocząsteczkowych RNA wyizolowane z jąder i jajników dorosłych osobników analizowano przy użyciu aparatu do elektroforezy kapilarnej Bioanalyzer 2100. Do przygotowania biblioteki do sekwencjonowania użyto po 1 µg każdej z prób i postępowano zgodnie z instrukcjami TruSeq Small RNA Sample Prep Kit. Przed i po etapie wzbogacenia o prążki o odpowiedniej długości, biblioteki były analizowane jakościowo przy użyciu testu High Sensitivity DNA oraz ilościowane za pomocą fluorymetru Qubit. Zaobserwowano oddzielne piki odpowiadające frakcji miRNA oraz piRNA zarówno w bibliotece pochodzącej z jąder, jak i z jajników. 10 pM oznakowanych bibliotek zmieszano i sekwencjonowano na płycie sekwencyjnej do pojedynczych odczytów, po 8 prób na ścieżkę, z wyjątkiem ścieżki kontrolnej, która zawierała tylko jedną próbkę - kontrolną bibliotekę Phix.

Każda biblioteka otrzymana z jąder i jajników wygenerowała w przybliżeniu 6 milionów odczytów. Sekwencje adaptorowe zostały usunięte z surowych sekwencji, przy możliwości jednego niedopasowania w sekwencji adaptorowej, w wyniku czego pozostało ponad 97% odczytów. Następnie odczyty o niskiej jakości zostały odrzucone, a pozostawiono tylko sekwencje z wynikiem jakości większym bądź równym 30 dla co najmniej 80% nukleotydów. Na etapie tym odrzucono około 4,5% wszystkich odczytów. W następnej kolejności usunięto sekwencje występujące więcej niż jeden raz i pozostawiono tylko jedno wystąpienie każdej sekwencji. Etap ten zredukował liczbę odczytów do 15,5% w przypadku biblioteki otrzymanej z jąder i 3,5% dla biblioteki otrzymanej z jajników. Każda biblioteka została podzielona na dwa zbiory sekwencji, w zależności od ich długości: miRNA (19-25 nt)

oraz piRNA i tRF (26-40 nt). Dwa kolejne zbiory powstały z sekwencji występujących zarówno w bibliotece pochodzącej z jąder, jak i bibliotece pochodzącej z jajników. Zatem ostatecznie otrzymano sześć zbiorów sekwencji: miRNA oraz piRNA i tRF występujące w jądrach, a także miRNA oraz piRNA i tRF występujące w jajnikach. Przycinanie adapterów, filtrowanie jakości oraz usuwanie powtórzeń wykonano przy użyciu programu FASTX-Toolkit, a biblioteki utworzono z wykorzystaniem skryptów napisanych w C++ oraz awk.

Otrzymane niskocząsteczkowe RNA zmapowano do genomu świni (Illumina iGenomes, *S. scrofa*10) przy użyciu programu SOAP [239], z możliwością jednego niedopasowania. Więcej niż 76% odczytów zostało zmapowanych do genomu, a 70% z nich mapowało do pojedynczego miejsca. Genom został zamaskowany za pomocą programu RepeatMasker w celu oznaczenia poszczególnych sekwencji, jako sekwencje tRNA, rRNA, snRNA, scRNA lub sekwencje repetytywne.

Klastry piRNA zdefiniowano jako grupę przynajmniej 80 piRNA zlokalizowanych na chromosomie nie dalej niż 2500 nt od siebie. piRNA mapowały do kilku miejsc w genomie i każde z tych miejsc uwzględniono przy identyfikacji klastrów.

5.4.6. Transkrypcja *in vitro*

Wszystkie cząsteczki RNA wykorzystywane do analizy kompleksów domena PAZ-RNA za pomocą techniki opóźnionej migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym oraz RNA służące jak kontrola w reakcji β -eliminacji otrzymano przy użyciu zestawu do transkrypcji MEGAscript Kit, zgodnie z wytycznymi producenta. Jako matrycę stosowano dwa syntetyczne całkowicie lub częściowo komplementarne oligonukleotydy, posiadające sekwencję promotora dla polimerazy RNA z faga T7 oraz sekwencję odpowiadającą sekwencji piRNA występującego w gonadach świni. Dwuniciową matrycę DNA potrzebną do reakcji transkrypcji *in vitro* otrzymywano na dwa sposoby. Pierwszy polegał na zmieszaniu równomolowych ilości obydwu oligonukleotydów do końcowego stężenia 50 μ M każdy, dodaniu 1x buforu do transkrypcji i inkubowaniu mieszaniny w 100°C przez 2 minuty, na lodzie przez 5 minut i w 37°C przez 5 minut. Drugi sposób polegał na otrzymaniu matrycowego DNA w reakcji PCR. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: dwa oligonukleotydy o stężeniu 50 μ M każdy, 1x bufor do reakcji PCR, 200 μ M każdego z dNTP, 1,5 mM MgCl₂ i 0,03 U/ μ l polimerazy Taq. Reakcja przebiegała

w następujących warunkach: 95°C przez 2 minuty, a następnie 5 cykli obejmujących 92°C – 1 minuta, 57°C – 1 minuta, 72°C – 1 minuta, a następnie końcowe wydłużanie 72°C – 2 minuty. Produkty reakcji oczyszczano z wykorzystaniem ekstrakcji fenolem, strącano, wirowano i rozpuszczano w wodzie. Mieszanina transkrypcyjna zawierała matrycowy DNA, 1x bufor transkrypcyjny, 7,5 mM mieszaninę NTP oraz 2 µl mieszaniny polimeraz RNA. W celu otrzymania RNA z wolną grupą hydroksylową na końcu 5' do mieszaniny transkrypcyjnej dodawano 3'-monofosforan guanozyny do końcowego stężenia 2 mM. Reakcję prowadzono przez 4 godziny w temperaturze 37°C. Transkrypty oczyszczano w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących i wizualizowano w świetle UV. Wycięte pasma żelu poddawano elucji w buforze elucyjnym. RNA strącano, wirowano i rozpuszczano w wodzie.

5.4.7. Znakowanie RNA na końcu 5' izotopem ³²P

Wyizolowaną z jąder i jajników frakcję piRNA znakowano na końcu 5' przy użyciu zestawu KinaseMax Kit, zgodnie z zaleceniami producenta. Początkowo 100-200 ng piRNA poddawano defosforylacji w obecności 1x buforu reakcyjnego i 0,1 U alkalicznej fosfatazy z jelita cielęcego w 37°C przez 1 godzinę. Następnie do reakcji dodawano 10 µl odczynnika do usuwania fosfatazy (ang. *phosphatase removal reagent*), próbę inkubowano 3 minuty, wirowano 15 sekund i supernatant zawierający RNA przenoszono do świeżej próbówki. Mieszanina reakcyjna do znakowania zawierała supernatant z RNA, 1x bufor reakcyjny, 10 U T4 kinazy polinukleotydowej oraz 2 µl [γ -³²ATP] o aktywności 4000-5000 Ci/mmol. Dodatkowo w tych samych warunkach wyznakowano frakcję piRNA, której nie poddano wcześniejszej defosforylacji oraz niskocząsteczkowy marker RNA. Reakcję znakowania prowadzono 1 godzinę w 37°C. Produkty reakcji oczyszczano w 12% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących a wyniki elektroforezy wizualizowano z wykorzystaniem ekranów odwzorowujących oraz skanera radioaktywności.

Mieszanina reakcyjna do znakowania transkryptów RNA otrzymanych *in vitro* zawierała 2-50 pmoli RNA z wolną grupą hydroksylową na końcu 5', 2 µl [γ -³²ATP] o aktywności 4000-5000 Ci/mmol, 1x bufor reakcyjny (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,1 mM spermidyna) oraz 10 U T4 kinazy polinukleotydowej. Przed reakcją przeprowadzono denaturację RNA przez 2 minuty w temperaturze 100°C, a następnie próbkę schładzano przez 10 minut w lodzie. Po dodaniu enzymu reakcję prowadzono przez

30-45 minut w temperaturze 37°C. Produkty reakcji oczyszczano w 12% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących lub z wykorzystaniem zestawu NucAway Spin Columns. Wyznakowane radioizotopowo na końcu 5' cząsteczki wizualizowano przez autoradiografię, wycinano z żelu, eluowano, strącano, wirowano i suszono. Poziom radioaktywności wyznakowanych cząsteczek mierzono za pomocą licznika scyntylicyjnego.

5.4.8. Reakcja β -eliminacji

Reakcję β -eliminacji wykonano dla trzech wyznakowanych wcześniej prób: piRNA wyizolowanych z jąder i jajników dorosłego osobnika oraz transkryptu otrzymanego metodą transkrypcji *in vitro*. Reakcja z transkryptem stanowiła reakcję testową. Skład 25 μ l mieszaniny reakcyjnej był następujący: około 10000 c.p.m. wyznakowanego RNA, 200 ng/ μ l tRNA oraz 10 mM NaIO₄. Dodatkowo dla każdej próby przygotowano reakcję kontrolną, w której zamiast NaIO₄ dodano wodę. Inkubację przeprowadzono na lodzie, w ciemności przez 1 godzinę. Następnie do prób dodano 3,5 objętości 96% etanolu i inkubowano w -20°C przez noc. Próbkę wirowano, osad suszono i rozpuszczono w 60 μ l 1 M lizyny pH 8,5. Inkubację z lizyną prowadzono przez 90 minut w 45°C, po czym wykonano powtórne strącanie. Następnie próby wirowano, suszono i rozpuszczono w 10 μ l 7 M mocznika z barwnikiem elektroforetycznym XC. Produkty reakcji β -eliminacji analizowano w 12% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących.

5.4.9. Otrzymywanie rekombinowanych białek Piwi i domeny białkowej PAZ

5.4.9.1. Nadekspresja białek Piwi w różnych szczepach bakteryjnych

Plazmidy pET151/D-TOPO, zawierające sekwencje kodujące białek Piwi wprowadzono do różnych szczepów komórek kompetentnych *E. coli* takich jak: BL21 Star (DE3), C41(DE3)pLysS, C43(DE3)pLysS, BL21-Codon Plus (DE3) RIL, BL21-Codon Plus (DE3) RIPL, BL21-AI, Rosetta2(DE3)pLysS, postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Nadekspresję białek wykonywano w różnych temperaturach (18°C - 37°C), stosując różne pożywki (LB, TB, M9 minimum), różne stężenia IPTG (0,2 mM – 1 mM) a także różny czas hodowli po dodaniu IPTG. Ponadto skonstruowano wektory pET-28a(+) zawierające sekwencje trzech białek Piwi oraz białka MBP (ang. *maltose binding protein*).

Ich nadekspresję przeprowadzono w szczepach BL21-Codon Plus (DE3) RIPL oraz Rosetta2(DE3)pLysS.

5.4.9.2. Otrzymanie plazmidu z sekwencją kodującą domeny PAZ białka Piwil4

Sekwencję kodującą domeny PAZ białka Piwil4 amplifikowano na matrycy wektora pET151/D-TOPO, zawierającego sekwencję kodującą białka Piwil4. Skład mieszaniny reakcyjnej był taki, jak opisany w podrozdziale 5.4.1.2. *Otrzymanie sekwencji kodujących białka Piwi* z tą różnicą, że zamiast cDNA, do reakcji dodawano wektor o stężeniu 1 ng/μl. Sekwencje starterów oraz warunki temperaturowe przedstawiono w tabeli 16. Produkty reakcji PCR analizowano metodą elektroforezy w żelu agarozowym i oczyszczano za pomocą zestawu do oczyszczania produktów reakcji PCR.

Tabela 16. Startery oraz warunki temperaturowe stosowane w PCR.

Gen	Sekwencja startera w orientacji 5'-3'	Warunki PCR
domena PAZ <i>Piwil4</i>	Pf <u>CACCAACGAGACGGTTCTGGAGTTC</u> Pr TTAGGGAAGCCCTGTTAGAAAGCAG	30 cykli: 95°, 30 s; 64°, 30 s; 72°, 1 min

Kolejne etapy, a mianowicie klonowanie sekwencji do plazmidu oraz transformacja *E. coli* przebiegały zgodnie z protokołami opisanymi wcześniej w podrozdziałach 5.4.1.3. *Klonowanie sekwencji kodujących do plazmidu* oraz 5.4.1.4. *Transformacja E. coli*.

5.4.9.3. Transformacja komórek bakteryjnych

Plazmid pET151/D-TOPO, zawierający sekwencję kodującą domeny białkowej PAZ białka Piwil4 wprowadzono do komórek kompetentnych *E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS metodą szoku cieplnego. Komórki kompetentne rozmrażano w lodzie przez 30 minut. Następnie dodano 10 ng plazmidu pET151/D-TOPO i inkubowano 30 minut na lodzie. Zawiesinę bakteryjną umieszczano na 30 sekund w temperaturze 42°C, po czym przenoszono na 2 minuty do lodu, dodawano 250 μl pożywki SOC oraz chloramfenikol i hodowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (225 rpm). Zawiesinę transformowanych komórek bakteryjnych (75-125 μl) rozprowadzano na powierzchni szalek z pożywką LB z ampicyliną. Hodowlę prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 37°C.

5.4.9.4. Przygotowanie zawiesiny bakterii w glicerynie

W celu przygotowania stoku glicerynowego do długiego przechowywania bakterii, bakterie pochodzące z pojedynczej kolonii zawieszano w 2 ml pożywki LB z ampicyliną oraz chloramfenikolem i inkubowano przez 12 godzin w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (225 rpm). Następnie 200 µl całonocnej hodowli przenoszono do 20 ml pożywki LB z antybiotykami i inkubowano do OD₆₀₀ ~ 0,4 w temperaturze 37°C przy 225 rpm. Do 800 µl bakterii dodawano 100 µl 80% glicerolu, mieszano i przenoszono do -80°C, gdzie przechowywano je do czasu ponownego użycia.

5.4.9.5. Nadekspresja domeny białkowej PAZ

Do 50 ml pożywki LB z ampicyliną i chloramfenikolem przeniesiono trochę stoku glicerynowego i inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 37°C przy 225 rpm. Następnie 25 ml całonocnej hodowli przenoszono do 1000 ml pożywki M9 minimal z ampicyliną i chloramfenikolem, rozdzielano na cztery równe objętości i inkubowano do osiągnięcia wczesnej fazy wzrostu logarytmicznego (OD₆₀₀ = 0,6) przez około 3-3,5 godziny w temperaturze 37°C przy 250 rpm. Po osiągnięciu odpowiedniej wartości OD₆₀₀ nadekspresję białka indukowano przez dodanie izopropylotiogalaktozydu (IPTG), do końcowego stężenia 0,5 mM. Hodowlę kontynuowano przez kolejne 20 godzin w temperaturze 20°C z wytrząsaniem 225 rpm. Po zakończeniu hodowli, zawiesinę bakteryjną wirowano 25 minut w temperaturze 4°C przy 5000 rpm, a osad ważono i zamrażano w temperaturze -80°C, do czasu oczyszczania białka.

5.4.9.6. Analizowanie próbek po nadekspresji białek Piwil1, Piwil2, Piwil4 i domeny PAZ białka Piwil4

Próbki po nadekspresji określonego białka analizowano w celu optymalizowania warunków hodowli i preparatyki białka. Próby pobierano w różnych punktach czasowych oraz z hodowli prowadzonych w różnych pożywkach i temperaturach a także z zastosowaniem różnych stężeń IPTG. Za każdym razem sprawdzano efektywność nadekspresji oraz czy białko znajduje się we frakcji nierozpuszczalnej czy rozpuszczalnej. Aby sprawdzić czy nadekspresja białka w danych warunkach zachodzi, pobierano 1 ml hodowli i wirowano przez 5 minut przy 5000 rpm w temperaturze 4°C. Następnie do osadu

dodawano 50 μ l buforu I, 5 μ l lizozymu o stężeniu 20 mg/ml oraz 7 U benzonazy. Próby intensywnie mieszano i dodawano 50 μ l buforu 2x SSB, po czym dokładnie mieszano, denaturowano przez 10 minut w 95°C i 5 μ l mieszaniny nakładano na żel. Do analizy frakcji nierozpuszczalnej i rozpuszczalnej białek pobierano 1 ml hodowli, wirowano i do osadu dodawano 100 μ l buforu I, 10 μ l lizozymu, po czym próbkę kilka razy zamrażano w suchym lodzie i rozmrażano w temperaturze 42°C. Następnie dodawano 7 U benzonazy, dokładnie mieszano i wirowano przez 6 minut przy 16000 rpm w temperaturze 4°C. Oddzielano supernatant od osadu i do supernatantu dodawano 100 μ l buforu 2x SSB, natomiast do osadu 100 μ l buforu 1x SSB. Próby mieszano, denaturowano przez 10 minut w temperaturze 95°C i nakładano na żel.

5.4.9.7. Liza komórek bakteryjnych

Zamrożone w -80°C osady bakteryjne (8-10 g) rozmrażano w lodzie przez 20 minut, po czym rozpuszczano w 20 ml buforu I, wzbogaconego o 20 mM imidazol, 1 mM DTT i 1 mM inhibitor proteaz, fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF). Zawiesinę inkubowano 20 minut w lodzie, po czym dodawano NaCl do końcowego stężenia 0,4 M i ponownie inkubowano w lodzie przez 10 minut. Zawiesinę bakteryjną poddawano 4-minutowej sonikacji w taki sposób, że co 2 sekundy sonikacji następowało 9,9 sekundy przerwy, a zawiesinę przez cały czas trzymano w lodzie, by nie dopuścić do wzrostu temperatury. W celu oddzielenia pozostałości komórek bakteryjnych i nierozpuszczalnej frakcji białkowej zawiesinę wirowano 30 minut w temperaturze 4°C przy 11000 rpm. Supernatant oddzielano od osadu, dodawano do niego 1 objętość buforu II z 20 mM imidazolem i poddawano oczyszczaniu.

5.4.9.8. Oczyszczanie domeny białkowej PAZ

Domenę PAZ białka Piwi14 oczyszczano przy pomocy chromatografii powinowactwa na unieruchomionych jonach metali. Jako złożo wykorzystano agarozę zawierającą jony Ni^{2+} chelatowane kwasem nitrylotrójoctowym. Domena PAZ posiadająca na końcu aminowym rejon bogaty w reszty histydynowe łączy się z Ni-NTA agarozą z dużym powinowactwem. 3 ml złoża Ni-NTA umieszczano w kolumie i przemywano 10 ml buforu II z 20 mM imidazolem. Supernatant zawierający białko dodano do złoża i kilkakrotnie pipetowano do powstania zawiesiny, a następnie inkubowano 30 minut w 4°C z lekkim wytrząsaniem.

Kolumnkę podłączono do pompy próżniowej i usunięto przesącz. Złoże przepłukano dwukrotnie 25 ml buforu II z 25 mM imidazolem w celu usunięcia niespecyficznie związanych białek. Domenę PAZ eluowano ze złoża 10 ml buforu III z 300 mM imidazolem. 10 ml mieszaniny zawierającej domenę PAZ wyeluowaną ze złoża Ni-NTA zagęszczono do objętości 500 μ l przy użyciu filtrów wirówkowych do zagęszczania białek o punkcie odcięcia równym masie cząsteczkowej 3 kDa. Następnie te same filtry wykorzystano do wymiany buforu, w którym prowadzono oczyszczanie, na bufor do przechowywania białka. Roztwór białka dzielono na porcje o objętości 15 μ l i zamrażano w -15°C .

Po nadekspresji i oczyszczaniu domeny PAZ całkowitą ilość otrzymanej domeny białkowej oznaczano na podstawie pomiarów absorpcji przy długości fali $\lambda = 280$ nm, gdzie po wprowadzeniu współczynnika ekstynkcji, który dla domeny PAZ białka Piwi14 wynosi $14440\text{ cm}^{-1}/\text{M}^{-1}$ oraz masy cząsteczkowej równej 13,75 kDa, dokonywano pomiarów z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop.

5.4.10. Analiza kompleksów domena białkowa PAZ-RNA za pomocą techniki opóźnionej migracji kompleksów w żelu poliakryloamidowym

Przygotowanie RNA

Znakowany radioizotopowo z końca 5' RNA (60000-170000 c.p.m.) zawieszono w 10x stężonym buforze do przechowywania białka pozbawionym glicerolu, denaturowano przez 2 minuty w temperaturze 90°C i schładzano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Mieszaninę uzupełniano MgCl_2 do końcowego stężenia 1 mM i inkubowano przez 10 min w temperaturze 37°C .

Przygotowanie domeny białkowej PAZ białka Piwi14

Domenę białkową rozmrażano w lodzie przez 20 minut. Roztwór domeny białkowej przygotowywano przez rozcieńczenie określonej ilości białka w buforze do przechowywania białka pozbawionym glicerolu.

Przygotowane w ten sposób RNA i domenę białkową łączono ze sobą i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, do próbek dodawano 50% glicerol w stosunku 10:1 i nakładano do kieszonek w żelu poliakryloamidowym. Elektroforezę prowadzono w temperaturze 4°C przy stałym natężeniu prądu 10 mA. Żel przenoszono na bibułę Whatman 3MM i suszono 45 minut w temperaturze 65°C . Wyniki elektroforezy wizualizowano z wykorzystaniem ekranów odwzorowujących oraz skanera radioaktywności.

Literatura

- 1) Extavour, C.G. i Akam, M. (2003). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: Epigenesis and preformation. *Development* 130, 5869-5884.
- 2) Findley, S.D., Tamanaha, M., Clegg, N.J. i Ruohola-Baker, H. (2003). Maelstrom, a *Drosophila* spindle-class gene, encodes a protein that colocalizes with Vasa and RDE1/AGO1 homolog, Aubergine, in nuage. *Development* 130, 859-871.
- 3) Ying, Y. i Zhao, G.Q. (2001). Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev. Biol.* 232, 484-492.
- 4) Technau, G. i Campos-Ortega, J. (1986). Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster* III Commitment and proliferation capabilities of pole cells and midgut progenitors. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195, 489-498.
- 5) Richardson, B.E. i Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: Strategies from different organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 37-49.
- 6) Kiger, A.A., White-Cooper, H. i Fuller, M.T. (2000). Somatic support cells restrict germline stem cell self-renewal and promote differentiation. *Nature* 407, 750-754.
- 7) Xie, T. i Spardling, A.C. (1998). Decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Cell* 94, 251-260.
- 8) Xie, T. i Spardling, A.C. (2000). A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* 290, 328-330.
- 9) Davies, E.L. i Fuller, M.T. (2008). Regulation of self-renewal and differentiation in adult stem cell lineages: Lessons from the *Drosophila* male germ line. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 73, 137-145.
- 10) Xie, T., Song, X., Jin, Z., Pan, L., Weng, C., Chen, S. i Zhang, N. (2008). Interactions between stem cells and their niche in the *Drosophila* ovary. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 73, 39-47.
- 11) Hird, S.N., Paulsen, J.E. i Strome, S. (1996). Segregation of germ granules in living *Caenorhabditis elegans* embryos: Cell-type-specific mechanisms for cytoplasmic localization. *Development* 122, 1303-1312.
- 12) Braat, A., Zandbergen, T., van de Water, S., Goos, H. i Zivkovic, D. (1999). Characterization of zebrafish primordial germ cells: Morphology and early distribution of vasa RNA. *Dev. Dyn.* 216, 153-167.
- 13) Knaut, H., Pelegri, F., Bohmann, K., Schwarz, H. i Nusslein-Volhard, C. (2000). Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *J. Cell Biol.* 149, 875-888.
- 14) Ikenishi, K. (1998). Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, and *Xenopus*. *Dev. Growth Differ.* 40, 1-10.

- 15) Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R. i in. (2002). *dead end*, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr. Biol.* 13, 1429-1434.
- 16) Ying, Y., Qi, X. i Zhao, G.Q. (2001). Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7858-7862.
- 17) de Sousa Lopes, S.M., Hayashi, K. i Surani, M.A. (2007). Proximal visceral endoderm and extraembryonic ectoderm regulate the formation of primordial germ cell precursors. *BMC Dev. Biol.* 7, 140.
- 18) Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata Y., Shigeta, M., Yamanaka, K. i Saitou, M. (2008). Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev.* 22, 1617-1635.
- 19) Saitou, M. (2009). Germ cell specification in mice. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 386-395.
- 20) Buehr, M., McLaren, A., Bartley, A. i Darling, S. (1993). Proliferation and migration of primordial germ cells in We/We mouse embryos. *Dev. Dyn.* 198, 182-189.
- 21) Tsuda, M., Sasaoka Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S. i Saga, Y. (2003). Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 301, 1239-1241.
- 22) Stallock, J., Molyneaux, K., Schaible, K., Knudson, C.M. i Wylie, C. (2003). The proapoptotic gene Bax is required for the death of ectopic primordial germ cells during their migration in the mouse embryo. *Dev.* 130, 6589-6597.
- 23) DiNapoli, L., Batchvarov, J. i Capel, B. (2006). FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis. *Dev.* 133, 1519-1527.
- 24) Suzuki, A. i Saga, Y. (2008). Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev.* 22, 430-435.
- 25) Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S. i in. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312, 596-600.
- 26) Menke, D.B., Koubova, J. i Page, D.C. (2003). Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev. Biol.* 262, 303-312.
- 27) Western, P.S., Miles, D.C., van den Bergen, J.A., Burton, M. i Sinclair, A.H. (2008). Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. *Stem Cells* 26, 339-347.
- 28) Gill, M.E., Hu, Y.C., Lin, Y. i Page, D.C. (2011). Licensing of gametogenesis, dependant on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 7443-7448.
- 29) Edson, M.A., Nagaraja, A.K. i Matzuk, M.M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr. Rev.* 30, 624-712.
- 30) Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J. i Surani, M.A. (2002). Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.* 117, 15-23.

- 31) Schaefer, C.B., Ooi, S.K., Bestor, T.H. i Bourc'his D. (2007). Epigenetic decisions in mammalian germ cells. *Science* 316, 398-399.
- 32) Trelogan, S.A. i Martin, S.L. (1995). Tightly regulated, developmentally specific expression of the first open reading frame from LINE-1 during mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1520-1524.
- 33) Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H. i in. (2004). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119, 1001-1012.
- 34) Russell, D.L. i Robker, R.L. (2007). Molecular mechanisms of ovulation: Co-ordination through the cumulus complex. *Hum. Reprod. Update* 13, 289-312.
- 35) Djunarovic, S., Nahvi, A. i Green, R. (2012). miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 336, 237-240.
- 36) Novina, C.D. i Sharp, P.A. (2004). The RNAi revolution. *Nature* 430, 161-164.
- 37) Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M. i in. (2008). DNA methylation of retrotransposons genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev.* 22, 908-917.
- 38) Lee, R.C., Feinbaum, R.L. i Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- 39) Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. i Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- 40) Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. i Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21, 4663-4670.
- 41) Garzon, R., Marcucci, G. i Croce, C.M. (2010). Targeting microRNA in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 775-789.
- 42) Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J. i in. (2003). The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
- 43) Kim, V.N. (2004). MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol.* 14, 156-159.
- 44) Carmell, M.A. i Hannon, G.J. (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 214-218.
- 45) Okamura, K., Liu, N. i Lai, E.C. (2009). Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes. *Mol. Cell* 36, 431-444.
- 46) Fabian, M.R., Sonenberg, N. i Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 351-379.
- 47) Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S. i in. (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* 328, 1694-1698.

- 48) Hayashi, K., de Sousa, C., Lopes, S.M., Kaneda, M., Tang, F., Hajkova, P. i in. (2008). MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One* 3:e1738.
- 49) Zeng, Y., Yi, R. i Cullen, B.R. (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9779-9784.
- 50) Hossain, M.M., Sohel, M.M., Schellander, K. i Tesfaye, D. (2012). Characterization and importance of microRNAs in mammalian gonadal functions. *Cell Tissue Res.* 349, 679-690.
- 51) Megosh, H.B., Cox, D.N., Campbell, C. i Lin, H. (2006). The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination. *Curr. Biol.* 16, 1884-1894.
- 52) Leaman, D., Chen, P.Y., Fak, J., Yalcin, A., Pearce, M., Unnerstall, U. i in. (2005). Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in *Drosophila* development. *Cell* 121, 1097-1108.
- 53) Blaser, H., Eisenbeiss, S., Neumann, M., Reichman-Fried, M., Thisse, B., Thisse, C. i Raz, E. (2005). Transition from non-motile behavior to directed migration during early PGC development in zebrafish. *J. Cell Sci.* 118, 4027-4038.
- 54) Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K. i in. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312, 75-79.
- 55) Mishima, Y., Giraldez, A.J., Takeda, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., Schier, A.F. i Inoue, K. (2006). Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr. Biol.* 16, 2135-2142.
- 56) Mickoleit, M., Banisch, T.U. i Raz, E. (2011). Regulation of hub mRNA stability and translation by miR430 and the dead end protein promotes preferential expression in zebrafish primordial germ cells. *Dev. Dyn.* 240, 695-703.
- 57) Takeda, Y., Mishima, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H. i Inoue, K. (2009). DAZL relieves miRNA-mediated repression of germline mRNAs by controlling poly(A) tail length in zebrafish. *PLoS One* 4, e7513.
- 58) Koebernick, K., Loeber, J., Arthur, P.K., Tarbashevivh, K. i Pieler, T. (2010). Elr-type proteins protect *Xenopus* Dead end mRNA from miR-18-mediated clearance in the soma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 16148-16153.
- 59) Rouget, C., Papin, C., Boureux, A., Meunier, A.C., Franco, B., Robine, N. i in. (2010). Maternal mRNA deadenylation and decay by the piRNA pathway in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 467, 1128-1132.
- 60) Tsang, T.E., Khoo, P.L., Jamieson, R.V., Zhou, S.X., Ang, S.L., Behringer, R. i Tam, P.P. (2001). The allocation and differentiation of mouse primordial germ cells. *Int. J. Dev. Biol.* 45, 549-555.
- 61) Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M. i in. (2008). Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat. Genet.* 40, 1016-1022.

- 62) Nie, K., Gomez, M., Landgraf, P., Garcia, J.F., Liu, Y., Tan, L.H. i in. (2008). MicroRNA-mediated down-regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: A potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas. *Am. J. Pathol.* 173, 242-252.
- 63) Newman, M.A., Thomson, J.M. i Hammond, S.M. (2008). Lin-28 interaction with the let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA* 14, 1539-1549.
- 64) Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J. i Kim, V.N. (2008). Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor microRNA. *Mol. Cell* 32, 276-284.
- 65) Hatfield, S.D., Shcherbata, H.R., Fischer, K.A., Nakahara, K., Carthew, R.W. i Ruohola-Baker, H. (2005). Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* 435, 974-978.
- 66) Yu, J.Y., Reynolds, S.H., Hatfield, S.D., Shcherbata, H.R., Fischer, K.A., Ward, E.J. i in. (2009). Dicer-1-dependant Dacapo suppression acts downstream of insulin receptor in regulating cell division of Drosophila germline stem cells. *Development* 136, 1497-1507.
- 67) Yang, L., Duan, R., Chen, D., Wang, J. i Jin, P. (2007). Fragile X mental retardation protein modulates the fate of germline stem cells in Drosophila. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1814-1820.
- 68) Pek, J.W., Lim, A.K. i Kai, T. (2009). Drosophila maelstrom ensures proper germline stem cell lineage differentiation by repressing microRNA-7. *Dev. Cell* 17, 417-424.
- 69) Liu, N., Han, H. i Lasko, P. (2009). Vasa promotes Drosophila germline stem cell differentiation by activating mei-P26 translation by directly interacting with a (U)-rich motif in its 3' UTR. *Genes Dev.* 23, 2742-2752.
- 70) Iovino, N., Pane, A. i Gaul, U. (2009). miR-184 has multiple roles in Drosophila female germline development. *Dev. Cell* 17, 123-133.
- 71) Giraldez, A.J., Cinalli, R.M., Glasner, M.E., Enright, A.J., Thomson, J.M., Baskerville, S. i in. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308, 833-838.
- 72) Gonzalez-Gonzalez, E., Lopez-Casas, P.P. i del Mazo, J. (2008). The expression patterns of genes involved in the RNAi pathways are tissue-dependant and differ in the germ and somatic cells of mouse testis. *Biochim. Biophys. Acta* 1779, 306-311.
- 73) Song, R., Ro, S., Michaels, J.D., Park, C., McCarrey, J.R. i Yan, W. (2009). Many X-linked microRNAs escape meiotic sex chromosome inactivation. *Nat. Genet.* 41, 488-493.
- 74) Novotny, G.W., Sonne, S.B., Nielsen, J.E., Jonstrup, S.P., Hansen, M.A., Skakkebaek, N.E. i in. (2007). Translational repression of E2F1 mRNA in carcinoma in situ and normal testis correlates with expression of the miR-17-92 cluster. *Cell Death Differ.* 14, 879-882.
- 75) Yu, Z., Raabe, T. i Hecht, N.B. (2005). MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biol. Reprod.* 73, 427-433.
- 76) Lees-Murdock, D.J., Shovlin, T.C., Gardiner, T., De Felici, M. i Walsh, C.P. (2005). DNA methyltransferase expression in the mouse germ line during periods of *de novo* methylation. *Dev. Dyn.* 232, 992-1002.
- 77) Jin, Z. i Xie, T. (2007). Dcr-1 maintains Drosophila ovarian stem cells. *Curr. Biol.* 17, 539-544.

-
- 78) Yang, L., Chen, D., Duan, R., Xia, L., Wang, J., Qurashi, A. i Jin, P. (2007). Argonaute1 regulates the fate of germline stem cells in *Drosophila*. *Development* 134, 4265-4272.
- 79) Poulton, J.S., Huang, Y.C., Smith, L., Sun, J., Leake, N., Schlee, J. i in. (2011). The microRNA pathway regulates the temporal pattern of Notch signaling in *Drosophila* follicle cells. *Development* 138, 1737-1745.
- 80) Lei, L., Jin, S., Gonzalez, G., Behringer, R.R. i Woodruff, T.K. (2010). The regulatory role of Dicer in folliculogenesis in mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 315, 63-73.
- 81) Gonzalez, G. i Behringer, R.R. (2009). Dicer is required for female reproductive tract development and fertility in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 76, 678-688.
- 82) Fiedler, S.D., Carletti, M.Z., Hong, X. i Christenson, L.K. (2008). Hormonal regulation of MicroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. *Biol. Reprod.* 79, 1030-1037.
- 83) Sirotkin, A.V., Laukova, M., Ovcharenko, D., Brenaut, P. i Mlynec, M. (2009). Identification of microRNAs controlling human ovarian cell proliferation and apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 223, 49-56.
- 84) Nicholls, P.K., Harrison, C.A., Walton, K.L., McLachlan, R.I., O'Donnell, L. i Stanton, P.G. (2011). Hormonal regulation of sertoli cell micro-RNAs at spermiation. *Endocrinology* 152, 1670-1683.
- 85) Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. Wood, R.D., Schultz, R.A. i Ellenberger, T. (2005). DNA repair and mutagenesis. 2nd edn. Washington, DC: ASM Press.
- 86) Kazazin, H.H. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626-1632.
- 87) Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I.A., Miyachi, H., Kimura, H. i in. (2010). Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* 464, 927-931.
- 88) Carthew, R.W. i Sontheimer, E.J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.
- 89) Aravin, A.A., Hannon, G.J. i Brennecke, J. (2007). The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 318, 761-764.
- 90) Aravin, A.A, Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N. i in. (2006). A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* 442, 203-207.
- 91) Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J. i Carmell, M.A. (2006). A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 442, 199-202.
- 92) Grivna, S.T., Beyret, E., Wang, Z. i Lin, H. (2006). A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev.* 20, 1709-1714.
- 93) Watanabe, T., Takeda, A., Tsukiyama, T., Mise, K., Okuno, T., Sasaki, H., i in. (2006). 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.* 20, 1732-1743.

-
- 94) Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Takamatsu, K., Chuma, S., Kojima-Kita, K. i in. (2010). MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes Dev.* 24, 887-892.
- 95) Wang, J., Saxe, J.P., Tanaka, T., Chuma, S. i Lin, H. (2009). Mili interacts with tudor domain-containing protein 1 in regulating spermatogenesis. *Curr. Biol.* 19, 640-644.
- 96) Reuter, M., Chuma, S., Tanaka, T., Franz, T., Stark, A. i Pillai, R.S. (2009). Loss of the Mili-interacting Tudor domain-containing protein 1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 639-646.
- 97) Vagin, V.V., Wohlschlegel, J., Qu, J., Jonsson, Z., Huang, X., Chuma, S. i in. (2009). Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes Dev.* 23, 1749-1762.
- 98) Chuma, S. i Nakano, T. (2013). piRNA and spermatogenesis in mice. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 368, 20110338.
- 99) Jurka, J., Kapitonov, V.V., Kohany, O. i Jurka, M.V. (2007). Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 8, 241-259.
- 100) Deininger, P.L., Moran, J.V., Batzer, M.A. i Kazazin, H.H. (2003). Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 651-658.
- 101) Farkash, E.A. i Luning Prak, E.T. (2006). DNA damage and L1 retrotransposition. *J. Biomed. Biotechnol.* 37285.
- 102) Lin, H. i Spradling, A.C. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 124, 2463-2476.
- 103) Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J., Bourc'his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G. i Hannon, G.J. (2007). MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev. Cell* 12, 503-514.
- 104) Deng, W. i Lin, H. (2002). Miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev. Cell* 2, 819-830.
- 105) Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Yomogida, K., Kuroiwa, A., Tadokoro, Y., Fujita, Y. i in. (2001). Two mouse piwi-related genes: Miwi and mili. *Mech. Dev.* 108, 121-133.
- 106) Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R. i Hannon, G.J. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128, 1089-1103.
- 107) Houwing, S., Kamminga, L.M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H. i in. (2007). A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish. *Cell* 129, 69-82.
- 108) Saito, K. i Siomi, M.C. (2010). Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals. *Dev. Cell* 19, 687-697.
- 109) Khurana, J.S. i Theurkauf, W. (2010). piRNAs, transposon silencing, and *Drosophila* germline development. *J. Cell Biol.* 191, 905-913.

- 110) Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Girard, A., Fejes-Toth, K. i Hannon, G.J. (2007). Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science* 316, 744-747.
- 111) Aravin, A.A., Sachidanandam, R.A., Bourc'his, D., Schaefer, C., Pezic, D., Toth, K.F., Bestor, T. i Hannon, G.J. (2008). A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to *de novo* DNA methylation in mice. *Mol. Cell* 31, 785-799.
- 112) Vourekas, A., Zheng, Q., Alexiou, P., Maragkakis, M., Kirino, Y., Gregory, B.D. i Mourelatos, Z. (2012). Mili and Miwi target RNA repertoire reveals piRNA biogenesis and function of Miwi in spermiogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 773-781.
- 113) Saito, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Siomi, H. i Siomi, M.C. (2007). Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev.* 21, 1603-1608.
- 114) Horwich, M.D., Li, C., Matranga, C., Vagin, V., Farley, G., Wang, P. i Zamore, P.D. (2007). The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr. Biol.* 17, 1265-1272.
- 115) Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D. i Aravin, A.A. (2011). PIWI-interacting small RNAs: The vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 246-258.
- 116) Gunawardane, L.S., Saito, K., Nishida, K.M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T. i in. (2007). A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* 315, 1587-1590.
- 117) Brennecke, J., Malone, C.D., Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Stark, A. i Hannon, G.J. (2008). An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. *Science* 322, 1387-1392.
- 118) Malone, C.D., Brennecke, J., Dus, M., Stark, A., McCombie, W.R., Sachidanandam, R. i Hannon, G.J. (2009). Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell* 137, 522-535.
- 119) De Fazio, S., Bartonicek, N., Di Giacomo, M., Abreu-Goodger, C., Sanker, A., Funaya, C. i in. (2011). The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature* 480, 259-263.
- 120) Beyret, E., Liu, N. i Lin, H. (2012). piRNA biogenesis during adult spermatogenesis in mice is independent of the ping-pong mechanism. *Cell Res.* 22, 1429-1439.
- 121) Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T.W., Isobe, T., Asada, N., Fujita, Y. i in. (2004). Mili, a mammalian member of Piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 131, 839-849.
- 122) Aravin, A.A., van der Heijden, G.W., Castaneda, J., Vagin, V.V., Hannon, G.J. i Bortvin, A. (2009). Cytoplasmic compartmentalization of the fetal piRNA pathway in mice. *PLoS Genet.* 5, e1000764.
- 123) Meikar, O., Da Ros, M., Korhonen, H. i Kotaja, N. (2011). Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. *Reproduction* 142, 195-209.

- 124) Reuter, M., Berninger, P., Chuna, S., Shah, H., Hosokawa, M., Funaya, C. i in. (2011). Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature* 480, 264-267.
- 125) Zheng, K. i Wang, P.J. (2012). Blockade of pachytene piRNA biogenesis reveals a novel requirement for maintaining post-meiotic germline genome integrity. *PLoS Genet.* 8, e1003038.
- 126) Harris, A.N. i Macdonald, P.M. (2001). Aubergine encodes a Drosophila polar granule component required for pole cell formation and related to eIF2C. *Development* 128, 2823-2832.
- 127) Cox, D.N., Chao, A., Baker, J., Chang, L., Qiao, D. i Lin, H. (1998). A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 12, 3715-3727.
- 128) Li, C., Vagin, V.V., Lee, S., Xu, J., Ma, S., Xi, H. i in. (2009). Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. *Cell* 137, 509-521.
- 129) Yabuta, Y., Ohta, H., Abe, T., Kurimoto, K., Chuma, S. i Saitou, M. (2011). TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly and spermiogenesis in mice. *J. Cell Biol.* 192, 781-795.
- 130) Tanaka, T., Hosokawa, M., Vagin, V.V., Reuter, M., Hayashi, E., Mochizuki, A.L. i in. (2011). Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid body during spermatogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 10579-10884.
- 131) Siomi, M.C., Mannen, T. i Siomi, H. (2010). How does the royal family of Tudor rule the PIWI-interacting RNA pathways? *Genes Dev.* 24, 636-646.
- 132) Frost, R.J., Hamra, F.K., Richardson, J.A., Qi, X., Bassel-Duby, R. i Olson, E.N. (2010). MOV10L1 is necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 11847-11852.
- 133) Zheng, K., Xiol, J., Reuter, M., Eckardt, S., Leu, N.A., McLaughlin, K.J. i in. (2010). Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 11841-11846.
- 134) Soper, S.F., van der Heijden, G.W., Hardiman, T.C., Goodheart, M., Martin, S.L., de Boer, P. i Bortvin, A. (2008). Mouse maelstrom, a component of nuage, is essential for spermatogenesis and transposon repression in meiosis. *Dev. Cell* 15, 285-297.
- 135) Ma, L., Buchold, G.M., Greenbaum, M.P., Roy, A., Burns, K.H., Zhu, H. i in. (2009). GASZ is essential for male meiosis and suppression of retrotransposon expression in the male germline. *PLoS Genet.* 5, e1000635.
- 136) Watanabe, T., Chuma, S., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Totoki, Y., Toyoda, A. i in. (2011). MITPOLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. *Dev. Cell* 20, 364-375.
- 137) Shoji, M., Tanaka, T., Hosokawa, M., Reuter, M., Stark, A., Kato, Y. i in. (2009). The TDRT9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Dev. Cell* 17, 775-787.

- 138) Czech, B., Malone, C.D., Zhou, R., Stark, A., Schlingeheyde, C., Dus, M. i in. (2008). An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature* 453, 798-802.
- 139) Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M.D., Li, C., Du, T., Lee, S. i in. (2008). Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science* 320, 1077-1081.
- 140) Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y. i in. (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 453, 539-543.
- 141) Tam, O.H., Aravin, A.A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E.P., Cheloufi, S. i in. (2008). Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453, 534-538.
- 142) Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P. i Belloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependant small RNAs. *Genes Dev.* 22, 2773-2785.
- 143) Wang, X.H., Aliyari, R., Li, W.X., Li, H.W., Kim, K., Carthew, R. i in. (2006). RNA interference direct innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* 312, 452-454.
- 144) Chapman, E.J. i Carrington, J.C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Rev. Genet.* 8, 884-896.
- 145) Kawamura, Y., Saito, K., Kin, T., Ono, Y., Asai, K., Sunohara, T. i in. (2008). *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. *Nature* 453, 793-797.
- 146) Kim, V.N, Han, J. i Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature* 10, 126-139.
- 147) Chung, W.J., Okamura, K., Martin, R. i Lai, E.C. (2008). Endogenous RNA interference provides a somatic defense against *Drosophila* transposons. *Curr. Biol.* 18, 795-802.
- 148) Smardon, A., Spoerke, J.M., Stacey, S.C., Klein, M.E., Mackin, N. i Maine, E.M. (2000). EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 10, 169-178.
- 149) Ma, J., Flemr, M., Stein, P., Berninger, P., Malik, R., Zavolan, M. i in. (2010). MicroRNA activity is suppressed in mouse oocytes. *Curr. Biol.* 20, 265-270.
- 150) Murchison, E.P., Stein, P., Xuan, Z., Pan, H., Zhang, M.Q., Schultz, R.M. i Hannon, G.J. (2007). Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev.* 21, 682-693.
- 151) Gent, J.I., Schvarzstein, M., Villeneuve, A.M., Gu, S.G., Jantsch, V., Fire, A.Z. i Baudrimont, A. (2009). A *Caenorhabditis elegans* RNA-directed RNA polymerase in sperm development and endogenous RNA interference. *Genetics* 183, 1297-1314.
- 152) Han, T., Manoharan, A.P., Harkins, T.T., Bouffard, P., Fitzpatrick, C., Chu, D.S. i in. (2009). 26G endo-siRNAs regulate spermatogenic and zygotic gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 18674-18679.

- 153) Gu, W., Shirayama, M., Conte, D.Jr., Vasale, J., Batista, P.J., Claycomb, J.M. i in. (2009). Distinct argonaute-mediated 22G-RNA pathways direct genome surveillance in the *C. elegans* germline. *Mol. Cell* 36, 231-244.
- 154) Cheng, L., Gearing, D.P., White, L.S., Compton, D.L., Schooley, K. i Donovan, P.J. (1994). Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth. *Development* 120, 3145-3153.
- 155) Neumuller, R.A., Betschinger, J., Fischer, A., Bushati, N., Poernbacher, I., Mechtler, K. i in. (2008). Mei-P26 regulates microRNAs and cell growth in the *Drosophila* ovarian stem cell lineage. *Nature* 454, 241-245.
- 156) Liu, N., Han, H. i Lasko, P. (2009). Vasa promotes *Drosophila* germline stem cell differentiation by activating mei-P26 translation by directly interacting with a (U)-rich motif in its 3' UTR. *Genes Dev.* 23, 2742-2752.
- 157) Cook, M.S., Munger, S.C., Nadeau, J.H. i Capel, B. (2011). Regulation of male germ cycle arrest and differentiation by DND1 is modulated by genetic background. *Development* 138, 23-32.
- 158) Linger, R., Dudakia, D., Huddart, R., Tucker, K., Friedlander, M., Phillips, K.A. i in. (2008). Analysis of the DND1 gene in men with sporadic and familial testicular germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 247-252.
- 159) Voorhoeve, P.M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A.J., Stoop, H., Nagel, R. i in. (2007). A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 604, 17-46.
- 160) Kedde, M., Strasse, M.J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J.A., Slanchev, K., le Sage, C. i in. (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits MicroRNA access to target mRNA. *Cell* 131, 1273-1286.
- 161) Gillis, A., Stoop, H., Hersmus, R., Oosterhuis, J.W., Sun, Y., Chen, C. i in. (2007). High-throughput microRNAome analysis in human germ cell tumors. *J. Pathol.* 213, 319-328.
- 162) West, J.A., Viswanathan, S.R., Yabuuchi, A., Cunniff, K., Takeuchi, A., Park, I.H. i in. (2009). A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature* 460, 909-913.
- 163) Peng, S., Maihle, N.J. i Huang, Y. (2010). Pluripotency factors Lin28 and Oct4 identify a sub-population of stem cell-like cells in ovarian cancer. *Oncogene* 29, 2153-2159.
- 164) Qiao, D., Zeeman, A.M., Deng, W., Looijenga, L.H. i Lin, H. (2002). Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene* 21, 3988-3999.
- 165) Maatouk, D.M., Loveland, K.L., McManus, M.T., Moore, K. i Harfe, B.D. (2008). Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline. *Biol. Reprod.* 79, 696-703.
- 166) Kim, G.J., Georg, I., Scherthan, H., Merckenschlager, M., Guillou, F., Scherer, G. i in. (2010). Dicer is required for Sertoli cell function and survival. *Int. J. Dev Biol.* 54, 867-875.

- 167) Wu, Q., Song, R., Ortogero, N., Zheng, H., Evanoff, R., Small, C.L. i in. (2012). The RNase III enzyme DROSHA is essential for microRNA production and spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 25173-25190.
- 168) Medeiros, L.A., Dennis, L.M., Gill, M.E., Houbawiy, H., Markoulaki, S., Fu, D. i in. (2011). Mir-290-295 deficiency in mice results in partially penetrant embryonic lethality and germ cell defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 14163-14168.
- 169) Kaneda, M., Tang, F., O'Carroll, D., Lao, K. i Surani, M.A. (2009). Essential role for Argonaute2 protein in mouse oogenesis. *Epigenetics Chromatin* 2, 9.
- 170) Forstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V.V., Denli, A.M., Bratu, D.P. i in. (2009). Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA binding domain protein. *PLoS Biol.* 3, e236.
- 171) Kalidas, S., Sanders, C., Ye, X., Strauss, T., Kuhn, M., Liu, Q. i in. (2008). Drosophila R2D2 mediates follicle formation in somatic tissues through interactions with Dicer-1. *Mech. Dev.* 125, 475-485.
- 172) Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H. i Siomi, M.C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Gens Dev.* 18, 1655-1666.
- 173) Houwing, S., Berezikov, E. i Ketting, R.F. (2008). Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish. *EMBO J.* 27, 2702-2711.
- 174) Knight, S.W. i Bass, B.L. (2001). A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293, 2269-2271.
- 175) Wang, G. i Reinke, V. (2008). A *C. elegans* Piwi, PRG-1, regulates 21U-RNAs during spermatogenesis. *Curr. Biol.* 18, 861-867.
- 176) Yudelevich, A. (1971). Specific cleavage of an *Escherichia coli* leucine transfer RNA following bacteriophage T4 infection. *J. Mol. Biol.* 60, 21-29.
- 177) Zhao, H., Bojanowski, K., Ingber, D.E., Panigrahy, D., Pepper, M.S., Montesano, R. i Shing, Y. (1999). New role for tRNA and its fragment purified from human urinary bladder carcinoma conditioned medium: inhibition of endothelial cell growth. *J. Cell. Biochem.* 76, 109-117.
- 178) Lee, S.R. i Collins, K. (2005). Starvation-induced cleavage of the tRNA anticodon loop in *Tetrahymena thermophila*. *J. Biol. Chem.* 280, 42744-42749.
- 179) Lee, Y.S., Shibata, Y., Malhotra, A. i Dutta, A. (2009). A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Gens Dev.* 23, 2639-2649.
- 180) Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G.F. i Anderson, P. (2009). Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J. Cell Biol.* 185, 35-42.
- 181) Emara, M.M., Ivanov, P., Hickman, T., Dawra, N., Tisdale, S., Kedersha, N. i in. (2010). Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly. *J. Biol. Chem.* 285, 10959-10968.
- 182) Haussecker, D., Huang, Y., Lau, A., Parameswaran, P., Fire, A.Z. i Kay, M.A. (2010). Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA* 16, 673-695.

- 183) Sobala, A. i Hutvagner, G. (2011). Transfer RNA-derived fragments: origins, processing, and functions. *Wiley Interdiscipl. Rev.: RNA* 2, 853-862.
- 184) Thompson, D.M., Lu, C., Green, P.J. i Parker, R. (2008). tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *RNA* 14, 2095-2103.
- 185) Cole, C., Sobala, A., Lu, C., Thatcher, S.R., Bowman, A., Brown, J.W. i in. (2009). Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependant small RNAs derived from tRNAs. *RNA* 15, 2147-2160.
- 186) Thompson, D.M. i Parker, R. (2009). Stressing out over tRNA cleavage. *Cell* 138, 215-219.
- 187) Mahlab, S., Tuller, T. i Linial, M. (2012). Conservation of the relative tRNA composition in healthy and cancerous tissues. *RNA* 18, 640-652.
- 188) Holcik, M. i Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 318-327.
- 189) Mei, Y., Yong, J., Liu, H., Shi, Y., Meinkoth, J., Dreyfuss, G. i Yang, X. (2010). tRNA binds to cytochrome c and inhibits caspase activation. *Mol. Cell* 37, 668-678.
- 190) Martens-Uzunova, E.S., Jalava, S.E., Dits, N.F., van Leenders G.J., Moller, S., Trapman, J. i in. (2012). Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer. *Oncogene* 31, 978-991.
- 191) Yeung, M.L., Bennasser, Y., Wataski, K., Le, S.Z., Houyet, L. i Jeang, K.T. (2009). Pyrosequencing of small non-coding RNAs in HIV-1 infected cells: evidence for the processing of a viral-cellular double-stranded RNA hybrid. *Nucleic Acids Res.* 37, 6575-6586.
- 192) Herschhorn, A. i Hizi, A. (2010). Retroviral reverse transcriptases. *Cell. Mol. Life Sci.: CMLS* 67, 2717-2747.
- 193) Reese, T.A., Xia, J., Johnson, L.S., Zhou, X., Zhang, W. i Virgin, H.W. (2010). Identification of novel microRNA-like molecules generated from herpesvirus and host tRNA transcripts. *J. Virol.* 84, 10344-10353.
- 194) Wilusz, J.E., Freier, S.M. i Spector, D.L. (2008). 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA. *Cell* 135, 919-932.
- 195) Couvillion, M.T., Sachidanandam, R. i Collins, K. (2010). A growth-essential *Tetrahymena* Piwi protein carries tRNA fragment cargo. *Genes Dev.* 24, 2742-2747.
- 196) Kim, D.H., Villeneuve, L.M., Morris, K.V. i Rossi, J.J. (2006). Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 793-797.
- 197) Rudinger-Thirion, J., Lescure, A., Paulus, C. i Frugier, M. (2011). Misfolded human tRNA isodecoder binds and neutralizes a 3' UTR -embedded Alu element. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 108, E794-802.
- 198) Li, Z, Ender, C., Meister, G., Moore, P.S., Chang, Y. i John, B. (2012). Extensive terminal and asymmetric processing of small RNAs from rRNAs, snoRNAs, snRNAs, and tRNAs. *Nucleic Acids Res.* 40, 6787-6799.

- 199) Zhou, X., Guo, H., Chen, K., Cheng, H. i Zhou, R. (2010). Identification, chromosomal mapping and conserved synteny of porcine Argonaute family of genes. *Genetica* 138, 805-812.
- 200) Farazi, T.A., Juranek, S.A. i Tuschl, T. (2008). The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development* 135, 1201-1214.
- 201) Simon, B., Kirkpatrick J.P., Eckhardt, S., Reuter, M., Rocha, E.A., Andrade-Navarro, M.A. i in. (2011). Recognition of 2'-O-methylated 3'-end of piRNA by the PAZ domain of a Piwi protein. *Structure* 19, 172-180.
- 202) Tian, Y., Simanshu, D.K., Ma, J.B. i Patel, D.J. (2011). Structural basis for piRNA 2'-O-methylated 3'-end recognition by Piwi PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 903-910.
- 203) Ohnishi, Y., Totoki, Y., Toyoda, A., Watanabe, T., Yamamoto, Y., Tokunaga, K. i in. (2010). Small RNA class transition from siRNA/piRNA to miRNA during pre-implantation mouse development. *Nucleic Acids Res.* 38, 5141-5151.
- 204) Pillai, R.S. i Chuma, S. (2012). piRNAs and their involvement in male germline development in mice. *Dev. Growth Differ.* 54, 78-92.
- 205) Ro, S., Park, C., Song, R., Nguyen, D., Jin, J., Sanders, K.M. i in. (2007). Cloning and expression profiling of testis-expressed piRNA-like RNAs. *RNA* 13, 1693-1702.
- 206) Ro, S., Song, R., Park, C., Zheng, H., Sanders, K. M. i Yan, W. (2007). Cloning and expression profiling of small RNAs expressed in the mouse ovary. *RNA* 13, 2366-2380.
- 207) Sai Lakshmi, S. i Agrawal, S. (2008). piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs. *Nucleic Acids Res.* (Database issue):D173-177.
- 208) Kawaoka, S., Minami, K., Katsuma, S., Mita, K. i Shimada, T. (2008). Developmentally synchronized expression of two Bombyx mori Piwi subfamily genes, SIWI and BmAGO3 in germ-line cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 755-760.
- 209) Liu, G., Lei, B., Li, Y., Tong, K., Ding, Y., Luo, L. i in. (2012). Discovery of Potential piRNAs from Next Generation Sequences of the Sexually Mature Porcine Testes. *PLoS ONE* 7, e34770.
- 210) Yan, Z., Hu, H.Y., Jiang, X., Maierhofer, V., Neb, E., He, L. i in. (2011). Widespread expression of piRNA-like molecules in somatic tissues. *Nucleic Acids Res.* 39, 6596-6607.
- 211) Lee, E.J., Banerjee, S., Zhou, H., Jammalamadaka, A., Arcila, M., Manjunath, B.S. i Kosik, K.S. (2011). Identification of piRNAs in the central nervous system. *RNA* 17, 1090-1099.
- 212) Thomson, T. i Lin, H. (2009). The biogenesis and function of Piwi proteins and piRNAs: progress and prospect. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 355-376.
- 213) Jenner, L., Melnikov, S., Garreau de Loubresse, N., Ben-Shem, A., Iskakova, M., Urzhumtsev, A. i in. (2012). Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22, 759-767.
- 214) Kiss, T. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J.* 20, 3617-3622.
- 215) Gromak, N. (2012). Intronic microRNAs: a crossroad in gene regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 759-761.

- 216) Lau, N.C. (2010). Small RNAs in the animal gonad: guarding genomes and guiding development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1334-1347.
- 217) Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W. i in. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307, 932-935.
- 218) Ghildiyal, M. i Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 10, 94-108.
- 219) Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J. i Chen, X. (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 15, 1501-1507.
- 220) Doboule, D. (2007). The rise and fall of Hox gene clusters. *Development* 134, 2549-2560.
- 221) Ma, X., Becker Buscaglia, L.E., Barker, J.R. i Li, Y. (2011). MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J. Mol. Cell Biol.* 3, 59-66.
- 222) Schaefer, A., Jung, M., Mollenkopf, H.J., Wagner, I., Stephan, C., Jentzmik, F. i in. (2010). Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int. J. Cancer* 126, 1166-1176.
- 223) Leonardi, R., Rehg, J.E., Rock, C.O. i Jackowski, S. (2010). Pantothenate Kinase 1 Is Required to Support the Metabolic Transition from the Fed to the Fasted State. *PLoS ONE* 5, e11107.
- 224) Jackowiak, P., Nowacka, M., Strózycki, P. i Figlerowicz, M. (2011). RNA degradome—its biogenesis and functions. *Nucleic Acids Res* 39, 7361-7370.
- 225) Gebetsberger, J., Zywicki, M., Künzi, A. i Polacek, N. (2012). tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii*. *Archaea* 260909.
- 226) Loss-Morais, G., Waterhouse, P.M. i Margis, R. (2013). Description of plant tRNA-derived RNA fragments (tRFs) associated with argonaute and identification of their putative targets. *Biol. Direct* 8, 6.
- 227) Wang, Q., Lee, I., Ren, J., Ajay, S.S., Lee, Y.S. i Bao, X. (2013). Identification and functional characterization of tRNA-derived RNA fragments (tRFs) in respiratory syncytial virus infection. *Mol. Ther.* 21, 368-379.
- 228) Peng, H., Shi, J., Zhang, Y., Zhang, H., Liao, S., Li, W. i in. (2012). A novel class of tRNA-derived small RNAs extremely enriched in mature mouse sperm. *Cell Res.* 22, 1609-1612.
- 229) Cai, P., Piao, X., Hao, L., Liu, S., Hou, N., Wang, H. i Chen, Q. (2013). A deep analysis of the small non-coding RNA population in *Schistosoma japonicum* eggs. *PLoS One.* 8, e64003.
- 230) Hsieh, L.C., Lin S.I., Shih, A.C., Chen, J.W., Lin, W.Y., Tseng, C.Y. i in. (2009). Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in Arabidopsis by deep sequencing. *Plant Physiol.* 151, 2120-2132.
- 231) Chen, C.J., Liu, Q., Zhang, Y.C., Qu, L.H., Chen, Y.Q. i Gautheret, D. (2011). Genome-wide discovery and analysis of microRNAs and other small RNAs from rice embryogenic callus. *RNA Biol.* 8, 538-547.

-
- 232) Hackenberg, M., Huang, P.J., Huang, C.Y., Shi, B.J., Gustafson, P. i Langridge, P. (2013). A comprehensive expression profile of microRNAs and other classes of non-coding small RNAs in barley under phosphorous-deficient and -sufficient conditions. *DNA Res.* 20, 109-125.
- 233) Kawaji, H., Nakamura, M., Takahashi, Y., Sandelin, A., Katayama, S., Fukuda, S. i in. (2008). Hidden layers of human small RNAs. *BMC Genomics* 9, 157.
- 234) Kawaoka, S., Izumi, N., Katsuma, S. i Tomari, Y. (2011). 3' end formation of PIWI-interacting RNAs in vitro. *Mol. Cell* 43, 1015-1022.
- 235) Ipsaro, J.J., Haase, A.D., Knott, S.R., Joshua-Tor, L. i Hannon, G.J. (2012). The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491, 279-283.
- 236) Frank, F., Sonnenberg, N. i Nagar, B. (2010). Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 465, 818-822.
- 237) Steitz, H., Tushir, J.S. i Zamore, P.D. (2011). A 5'-uridine amplifies miRNA/miRNA* asymmetry in Drosophila by promoting RNA-induced silencing complex. *Silence* 2, 4.
- 238) Sai Lakshmi, S. i Agrawal, S. (2008). piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs. *Nucleic Acids Res.* (Database issue):D173-177.
- 239) Li, R., Li, Y., Kristiansen, K. i Wang, J. (2008). SOAP: short oligonucleotide alignment program. *Bioinformatics* 24, 713-714.