



PIWI-Etkileşimli RNA'ların Biyogenezi ve İşlevleri

Biogenesis and Functions of PIWI-Interacting RNAs

Kezban Kartlaşmış¹, Umut Kökbaş¹, Levent Kayrın¹

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana, Turkey

ABSTRACT

Small-RNA-mediated gene regulation is a repeated topic in biology. Animal germ cells are characterized by an interesting small RNA mediated gene silencing mechanism known as the PIWI pathway. PIWI-interacting RNAs (piRNAs) are endogenous small noncoding RNAs that act as guardians of the genome, protecting it from invasive transposable elements in the germline. piRNAs are 25 to 33 nt in length, depending on the PIWI protein that they bind to. piRNAs derive from distinct transposons that are referred to as piRNA clusters. It remains unclear how piRNAs are generated, but potential methods have been suggested, and it is certain their biogenesis pathway is distinct from miRNA and siRNA, while rasiRNAs are a piRNA subspecies. The purpose of this review is to highlight piRNA factors, biogenesis, non-gonadal function and role of genomic integrity insights in the piRNA world.

Key words: Piwi interacting RNA, piwi protein, piRNA.

Öz

Küçük RNA aracılı gen regülasyonu, biyolojide tekrarlanan bir konudur. Hayvan germ hücreleri, PIWI yolu olarak bilinen ilginç bir küçük RNA aracılı gen susturma mekanizması ile karakterizedir. PIWI etkileşimli RNA'lar (piRNA'lar) genomun koruyucuları olarak davranan, invaziv transpoze edilebilir elementlerden koruyan endojen küçük RNA'lardır. Bağlandıkları PIWI proteinine bağlı olarak, piRNA'lar 25-33 nt uzunluğundadır. piRNA'lar, piRNA kümeleri olarak adlandırılan farklı transpozonlardan elde edilir. piRNA'ların nasıl üretildiği belirsizliğini koruyor ancak potansiyel yöntemler önerilmektedir. Biyogenez yolağı, miRNA ve siRNA'dan farklı olarak rasiRNA'lar da piRNA alttürlerindedir. Bu derlemenin amacı, piRNA dünyasında piRNA faktörlerini, biyogenezini, gonadal olmayan fonksiyonu ve genom bütünlüğünün korunmasındaki rolünü vurgulamaktır.

Anahtar Kelimeler: Piwi etkileşimli RNA, piwi proteini, piRNA.



Giriş

Genomumuz çeşitli hücrel işlevlerden sorumlu binlerce gen kodlamaktadır ve bu genlerin paternleri ve ifade seviyelerinin düzenlenmesi, gelişim ve homeostaz için oldukça önemlidir¹. Bu düzenleme molekül içi ve moleküller arası olayların birleşimle gerçekleşmektedir². RNA susturulması (RNA interferans, RNAi), birçok ökaryottaki anahtar gen düzenleyici yollardan birisidir. 20-31 nükleotit uzunluğundaki küçük RNA'lar üretimi, RNA susturma yollarının merkezine iletilmektedir^{3,4}. Argonot proteinler, RNA ile uyarılan susturucu komplekse bağlanır ve hedef transkriptleri endonükleaz aktiviteyle keser böylece gen susturulmasını sağlar⁵. Bu gen susturulması; translasyonel gen susturumu, belirli kromatinlerin modifikasyonu aracılığıyla gerçekleşen transkripsiyonel gen susturumunu içermektedir⁶.

Argonot proteinler 2 alt aileye ayrılmaktadır: Argonot (AGO) ve PIWI ailesi⁷. AGO alt ailesi miRNA (micro RNA) ve siRNA'lara (small interfering RNA) bağlanmakta ve birçok dokuda ifadenmektedir. Bunlar çift zincirli öncüllerden 20-22 nükleotit uzunluğunda Dicer bağımlı mekanizmalarla işlenmektedir. (Şekil 1)⁸ PIWI alt aile üyeleri (PIWI proteinleri) ise başlıca germ hücrelerinde ifade edilmektedir ve piRNA (Piwi-interacting RNA) ile birlikte kendilerine özel RISC (piRISC) komplekslerinde üretilmektedir⁹.

piRNA'lar : miRNA ve siRNA'lara göre biraz daha uzun olan (24-31 nükleotit), 3' ucunda 2'-O-metil bulunduran ve Dicer enziminden bağımsız bir mekanizma aracılığıyla piRNA kümeleri olarak adlandırılan intergenik bölgelerden ifadenir (Şekil 1)¹⁰ Tek zincirli öncül transkriptler ile işlenir. piRNA kümeleri çok sayıda ve çeşitli transpozonları barındırmaktadır bu nedenle piRNA'ların temel görevi transpozon aktivitesini düzenlemektir. Transpozonların transpozisyonu sonucu genomun hasar görme riski yüksektir bu nedenle transpozonların piRNA aracılı düzenlenmesi esansiyeldir ve normal gametogenez ve reproduksiyon işlemlerinin korunmasını sağlamaktadır¹¹. Bu derlemede son 10 yıldır daha da popüler konulardan biri olan piRNA ve piwi proteinlerinin biyogenez, genom bütünlüğünü sağlamadaki rolünü, non-gonadal işlevlerine açıklık getirmek amaçlanmaktadır.

Genom Bütünlüğünde PIWI Proteinler ve piRNA'nın Önemi

Piwi proteinleri ve piRNA'lar süngerlerden ökaryotlara kadar uzanan geniş bir aralıkta korunmakta ve gonadlarda ifadenmektedir¹². Piwi proteinlerinin prototipi *Drosophila piwi* (P-element-induced wimpy testes) genleri, germ hattı gelişiminde esansiyel gen sınıfı olarak tanımlanmaktadır¹³. *Drosophila*'da piwi genleri (ago3, aubergine:aub, piwi) erkek ve dişi

fertilitesi için gereklidir¹⁴. Transpozonların derepresyonu, piwi mutant ovaryumların hepsinde gözlemlenmektedir. Aub ve Ago3 hedef transpozon transkriptlerini stoplazmada parçalarken, piwi hedef transpozonları transkripsiyonel seviyelerde çekirdekte düzenlemektedir¹⁵. *Drosophila* piRNA yolağı telomer devamlılığını sağlamak için transpozon aktivitesini de düzenlemektedir. Birçok ökaryotun aksine kromozomal uçlara transpozon setinin aktarımı *Drosophila* kromozomlarının devamlılığını korur. Bu nedenle piRNA yolağındaki kusurlar telomere özgün piRNA'ların ifadenemesinin azalmasına ve telomer koruma kompleksinin bağlantısının bozulmasına yol açabilir. Bu sırada piRNA yolağı kusurları somatik dokulardaki telomer yapısını ve transpozon ifadenmesini etkilemez^{16,17}.

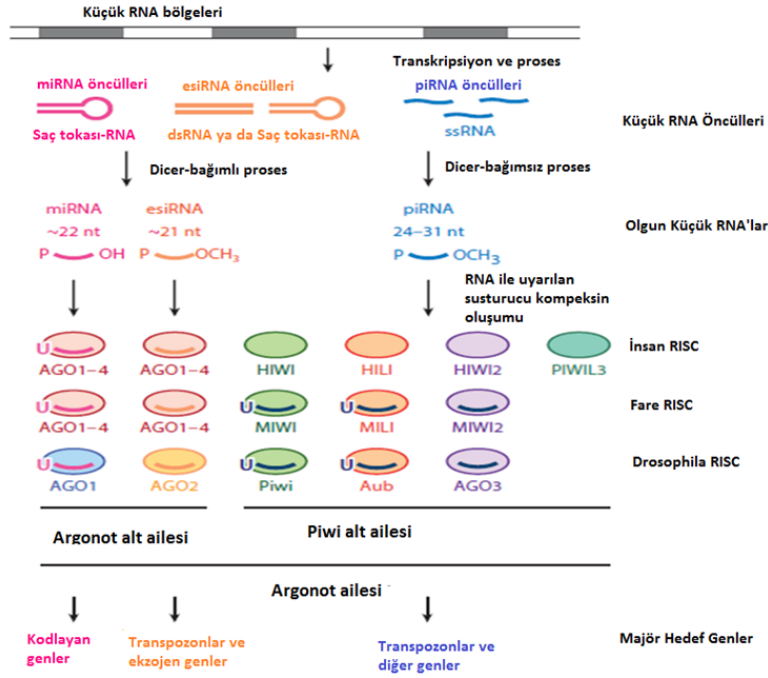
Fare ifadelenen 3 piwi proteini: MIWI, MIWI2 ve MILI'dir (Şekil 1). Bu 3 piwi proteinin hepsi spermatogenez sırasında farklı aşamalarda ifadenmektedir, fakat yalnızca MILI çok az da olsa dişi germ hücrelerinde ifade edilmektedir. Fare PIWI genlerindeki mutasyonlar erkek germ hattını etkiler fakat dişi germ hattını etkilemez. MILI ya da MIWI2'deki hasarlar uzun serpiştirilmiş çekirdek elementlerinin ve uzun terminal tekrarı retrotranspozonların (LTR) aktivasyonuna yol açmaktadır¹⁸.

Fare PIWI proteinleri 2 fazda ifade edilen piRNA'lara bağlanır: Prepakiten piRNA'lar ve pakiten piRNA'lar. Prepakiten piRNA'lar, gonosit evresinde MILI ve MIWI2 ile bağlantılı ve transpozon elementlerden köken almaktadır. Pakiten piRNA'lar ise genomun çeşitli bölgelerinde yer alan piRNA kümelerinden köken alır ve MILI ve MIWI2'ye bağlanır (Şekil 2)^{19,20}.

Fare piwi proteinlerinin işlevleri sadece transpozon transkriptlerinin kırılmasıyla post-transkripsiyonel gen susturumu değil aynı zamanda transpozon bölgeleri üzerinde doğrudan CpG DNA metilasyonu ile transkripsiyonel susturmayı da sağlamaktadır. MILI ve MIWI2 genlerin aktivitesindeki kusurlar, erkek germ hattında DNA metilasyonu ve susturma mekanizmalarını azaltmaktadır. Bu bulgular piRNA'ların hedef transpozonları susturmada de novo DNA metilasyonu kullandığını göstermektedir^{22,23}.

PIRNA'ların Biyogenezi

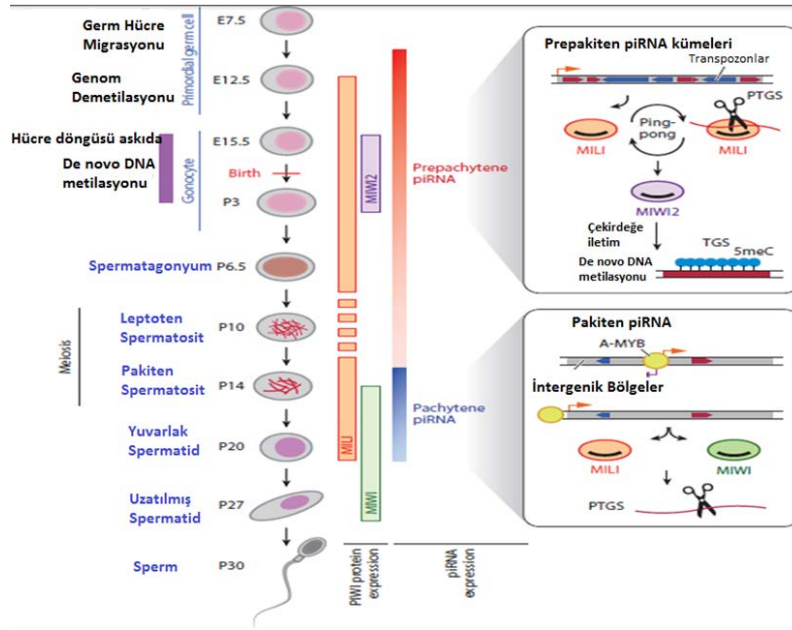
PIRNA'lar 2 ana yolla üretilmektedir: primer yolak ve sekonder piRNA'ların üretildiği ping-pong çevrimidir (Şekil 3). Primer piRNA'lar 5' nükleik asitinde uridin'e (U) sahipken sekonder piRNA'lar primer RNA yapısına ek olan 10 nükleotit ve adenozin (A) bulundurur^{7,24}. *Drosophila* ovaryumlarında primer yolak germ hattı ve somatik hücre periferinde düzenlenir oysa ping-pong çevrimi sadece germ hücrelerinde düzenlenmektedir²⁵.



Şekil 1. İnsan, fare ve *Drosophila*'daki Argonot aile proteinleri ve küçük RNA'larla RNA susturulması. İnsanda özgün olarak 4 PIWI proteini ifade edilmektedir. miRNA, esiRNA ve piRNA'lar için piRNA öncülleri, olgun diziler, RISC oluşumu ve hedef genler özetlenmiştir. İnsan piwi proteinleri ve piRNA'ları arasındaki bağlantı henüz tam olarak aydınlatılmamıştır²¹.

Drosophila ovaryum somatik hücrelerinde primer yolla birlikte yalnızca PIWI alt aile üyelerinden sadece piwi ifadenmekte ve flamenco (flam) gibi tek zincirli tek yönlü transkriptler olan piRNA kümelerinden transkribe edilir. Çoklu adımlar sonucu süreçler işlenir. Bu süreçler de mitokondri yüzeyinde bulunan bir endonükleaz olan Zucchini (Zuc), öncül RNA'ların işlenmesi için gereklidir²⁶. Zuc tercihen 5'ucundaki U bulunan öncül RNA'ları üretmektedir. Mitokondri yüzeyinde oluşum gösteren Yb cisimcikleri olarak adlandırılan perinükleer granüllerde öncül piRNA'lardan olgun piRNA'lar oluşturulur²⁷. Yb cisimcikleri Armitage (Armi), Vreteno (Vret), Shutdown (Shu) proteinleri bir kompleks halinde bulunur ve proteinler hem Yb cisimcikleri için hem de olgun piRNA'lar için esansiyeldir²⁸. Bunlara ek olarak Minotaur (Mino) ve GasZ mitokondri yüzeyinde bulunmakta ve primer piRNA süreçlerinin

işlevleri için gereklidir. piRNA biyogenezi ve mitokondri arasındaki ilişkinin çok önemli olduğu bilinmesine rağmen mitokondriyal aktivitelerin bu biyogenezde mekanizması hala tam olarak açık değildir. Bunun yanı sıra olgun piRNA'ların 3' kırılmasında 3'-5' ekzonükleaz aktivitesinin olup olmadığı da henüz bilinmiyor. DmHen1/Pimet metiltransferaz daha sonra olgun piwi-piRNA kompleksini ya da piwi-piRISC üretmek için 3' uçlarına metil grubu eklemektedir. Piwi-piRNA kompleksi hedef genleri transkripsiyonel olarak düzenlemek için çekirdeğe taşınır (Şekil 3)²⁹.

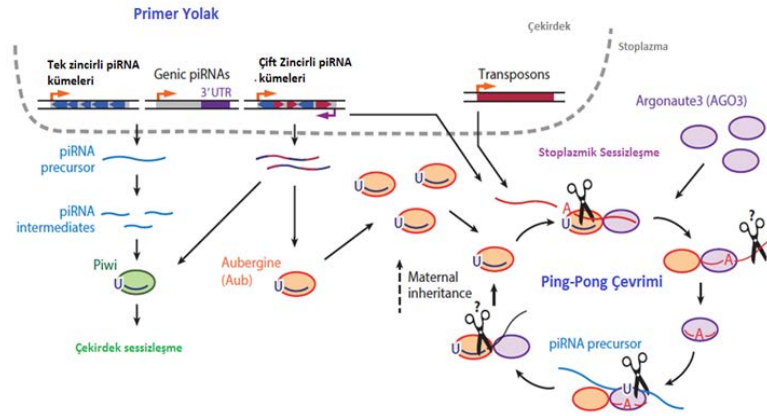


Şekil 2. Spermatogenez sırasında fare piRNA'sı, MILI, MIWI ve MIWI2'nin ifadenme paternleri. piRNA'lar spermatogenez aşamalarının temelinde pakiten piRNA'lar ve prepakiten piRNA'lar olarak 2 ayrı sınıfa ayrılmaktadır. Gonositlerde MILI ve MIWI2, başlıca transpozonlardan oluşan prepakiten piRNA kümelerinden piRNA'lara bağlanmaktadır²¹.

PIWI Proteinlerin ve piRNA'ların Non-gonadal İşlevleri

Birçok çalışma piwi-piRNA komplekslerinin germ hücreleri ve somatik hücrelerde düzenleyici rolü olduğunu savunmaktadır. Bir deniz yumuşakçası olan *Aplysia*'da beyindeki hafıza depolama için piwi-piRNA işlevi gerekmektedir. *Aplysia* piRNA'ları genomdaki piRNA kümelerinden ifadenir ve çekirdeğe lokalizedir. Bu piRNA'lar hedef genleri düzenlemek için

DNA metilasyonunu uyarmaktadır. Hedefler hafızanın transkripsiyonel baskılayıcıları olan CREB2 adı verilen proteini içermektedir³⁰. Çalışmalar sonucunda CREB2'nin promotör bölgelerinin piRNA'lar tarafından metillendiğini ve bu şekilde mekanizmanın kontrol altına alındığını göstermektedir. Burada görev alan piRNA'lar MIWI proteini ile de bağlantı halinde olup dendritik omurga gelişimi için de gereklidir^{31, 32}. Başka bir deniz canlısı olan Ascidians'ta PIWI ortologları olan BI-Piwi ve Piwi tüm vücut yenilenmesi için gereklidir. BI-Piwi'nin baskılandığı durumlarda vücut yenilenmesinin askıya alındığı görülmüştür³³.



Şekil 3. Drosophila piRNA biyogenezindeki primer yolak ve ping-pong çevrimi. Primer yolakta piRNA'lar piRNA kümeleri olarak adlandırılan genomik bölgelerden transkribe edilir, işlenir ve piwi ya da Aub üzerine yüklenir²¹.

Piwi fonksiyonları insan kanser gelişiminde de esansiyel rol oynayabilir. Drosophila'da malign beyin tümörlerinde yaygın olan üretilen faktörler baskılandığında piwi ve Aub proteinlerinin tümör gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. İnsan piwi proteinleri çeşitli kanserlerde ifade edilmektedir. Bunun ilk örneği erkek germ hücre kanseri olan seminomlu hastalarda HIWI proteinin aşırı şekilde ifadenmesidir. Piwi proteinlerinin ektopik ifadenmesi ise meme, mide ve akciğer kanserlerinde doku örneklerinde ve hücre hatlarında gözlenmiştir.

Sonuç

Günümüz itibarıyla piRNA üretimini düzenleyen çok sayıda faktörün olduğu bilinmekte fakat bu faktörlerin işlevsel rolleri ve özellikle çekirdekte piRNA ile uyarılan epigenetik değişimler hala

tam olarak bilinmemektedir. Dahası piRNA üretiminde ve/veya transpozon baskılanmasında görevli olan elementler ve etki mekanizmaları tanımlanmalıdır. Fertilitede bağlantılı olan piRNA'ların transpozon baskılanmasını nasıl gerçekleştirdiği hala bilinmemektedir. Piwi-piRNA yolağındaki çeşitli genlerin germ hattı içinde ve dışında birçok işleve sahiptir³⁴. Piwi-piRNA ve diğer yollar arasındaki etkileşim bu işlevlerin açıklanmasına yardımcı olabilir. Somatik genom düzenlenmesi Tetrahymena piRNA'larının analiziyle ilk defa tanımlanmıştır ve yeni model organizmaların keşfi yararlı yaklaşımların oluşmasına yol açabilir. Örneğin; tüysüz köstebek faresi kanserin herhangi bir işareti olmaksızın 30 yıldan daha fazla süre yaşayabilmekte ve bu canlıda piwi proteinleri kodlanmasına rağmen transpozonlar inaktive edilebilmektedir³⁵⁻³⁷. Bu türlerdeki analizler memeli piwi proteinleri ve piRNA'ların transpozonları düzenleme mekanizmasının anlaşılması ile ilgili bilgi verebilir.

Kaynaklar

1. Farley BM, Collins K. Transgenerational function of Tetrahymena Piwi protein Twi8p at distinctive noncoding RNA loci. *RNA*. 2017;23:530-45.
2. Firmino N, Martinez VD, Rowbotham DA, Enfield KS, Bennewith KL, Lam WL. HPV status is associated with altered PIWI-interacting RNA expression pattern in head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2016;55:43-8.
3. Cao J, Xu G, Lan J, Huang Q, Tang Z, Tian L. High expression of piwi-like RNA-mediated gene silencing 1 is associated with poor prognosis via regulating transforming growth factor-beta receptors and cyclin-dependent kinases in breast cancer. *Mol Med Rep*. 2016;13:2829-35.
4. Zhou Y, Zhong H, Liu S, Yu F, Hu J, Zhang C et al. Elevated expression of Piwi and piRNAs in ovaries of triploid crucian carp. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;383:1-9.
5. Vourekas A, Mourelatos Z. HITS-CLIP (CLIP-Seq) for mouse Piwi proteins. *Methods Mol Biol*. 2014;1093:73-95.
6. Sigurdsson MI, Smith AV, Bjornsson HT, Jonsson JJ. The distribution of a germline methylation marker suggests a regional mechanism of LINE-1 silencing by the piRNA-PIWI system. *BMC Genet*. 2012;13:31.
7. Aravin A A, Hannon GJ, Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science*. 2007;318:761-4.
8. Miesen P, Girardi E, van Rij RP. Distinct sets of PIWI proteins produce arbovirus and transposon-derived piRNAs in *Aedes aegypti* mosquito cells. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:6545-56.
9. Busch J, Ralla B, Jung M, Wotschovsky Z, Trujillo-Arribas E, Schwabe P et al. Piwi-interacting RNAs as novel prognostic markers in clear cell renal cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34:61.
10. Smulders-Srinivasan TK, Szakmary A, Lin H. A *Drosophila* chromatin factor interacts with the Piwi-interacting RNA mechanism in niche cells to regulate germline stem cell self-renewal. *Genetics*.

- 2010;186:573-83.
11. Rizzo F, Rinaldi A, Marchese G, Coviello E, Sellitto A, Cordella A et al. Specific patterns of PIWI-interacting small noncoding RNA expression in dysplastic liver nodules and hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7:54650-661.
 12. Kalmykova AI, Klenov MS, Gvozdev VA. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:2052-9.
 13. Kirino Y, Kim N, de Planell-Saguer M, Khandros E, Chiorean S, Klein PS et al. Arginine methylation of Piwi proteins catalysed by dPRMT5 is required for Ago3 and Aub stability. *Nat Cell Biol*. 2009;11:652-8.
 14. Al-Janabi O, Wach S, Nolte E, Weigelt K, Rau TT, Stohr C et al. Piwi-like 1 and 4 gene transcript levels are associated with clinicopathological parameters in renal cell carcinomas. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842:686-90.
 15. Mathioudakis N, Palencia A, Kadlec J, Round A, Tripsianes K, Sattler M et al. The multiple Tudor domain-containing protein TDRD1 is a molecular scaffold for mouse Piwi proteins and piRNA biogenesis factors. *RNA*. 2012;18:2056-72.
 16. Qiao D, Zeeman AM, Deng W, Looijenga LH, Lin H. Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene*. 2002;21:3988-99.
 17. Saito K, Inagaki S, Mituyama T, Kawamura Y, Ono Y, Sakota E et al. A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in *Drosophila*. *Nature*. 2009;461:1296-9.
 18. Beyret E, Lin H. Pinpointing the expression of piRNAs and function of the PIWI protein subfamily during spermatogenesis in the mouse. *Dev Biol*. 2011;355:215-26.
 19. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M et al. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev*. 2008;22:908-17.
 20. Litwin M, Szczepanska-Buda A, Piotrowska A, Dziegiel P, Witkiewicz W. The meaning of PIWI proteins in cancer development. *Oncol Lett*. 2017;13:3354-62.
 21. Iwasaki YW, Siomi MC, Siomi H. PIWI-Interacting RNA: its biogenesis and functions. *Annu Rev Biochem*. 2015;84:405-33.
 22. Fu A, Jacobs DI, Hoffman AE, Zheng T, Zhu Y. PIWI-interacting RNA 021285 is involved in breast tumorigenesis possibly by remodeling the cancer epigenome. *Carcinogenesis*. 2015;36:1094-102.
 23. Gebert D, Ketting RF, Zischler H, Rosenkranz D. piRNAs from pig testis provide evidence for a conserved role of the piwi pathway in post-transcriptional gene regulation in mammals. *PLoS One*. 2015;10:e0124860.
 24. Bak CW, Yoon TK, Choi Y. Functions of PIWI proteins in spermatogenesis. *Clin Exp Reprod Med*. 2011;38:61-7.
 25. Fang W, Wang X, Bracht JR, Nowacki M, Landweber LF. Piwi-interacting RNAs protect DNA against

- loss during *Oxytricha* genome rearrangement. *Cell*. 2012;151:1243-55.
26. Megosh H B, Cox D N, Campbell C ,Lin H. The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination. *Curr Biol*. 2006;16:1884-94.
 27. Grimson A, Srivastava M, Fahey B, Woodcroft B J, Chiang H R, King N et al. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*. 2008;455:1193-7.
 28. Wilczynska A, Minshall N, Armisen J, Miska E A ,Standart N. Two Piwi proteins, Xiwi and Xili, are expressed in the *Xenopus* female germline. *RNA*. 2009;15:337-45.
 29. van Wolfswinkel JC. Piwi and potency: PIWI proteins in animal stem cells and regeneration. *Integr Comp Biol*. 2014;54:700-13.
 30. Sunanaga T, Inubushi H, Kawamura K. Piwi-expressing hemoblasts serve as germline stem cells during postembryonic germ cell specification in colonial ascidian, *Botryllus primigenus*. *Dev Growth Differ*. 2010;52:603-14
 31. Watanabe T, Lin H. Posttranscriptional regulation of gene expression by Piwi proteins and piRNAs. *Mol Cell*. 2014;56:18-27.
 32. Xiang DF, Zhu JQ, Hou CC, Yang WX. Identification and expression pattern analysis of Piwi genes during the spermiogenesis of *Portunus trituberculatus*. *Gene*. 2014;534:240-8.
 33. Saito K, Nishida K M, Mori T, Kawamura Y, Miyoshi K, Nagami T et al. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev*. 2006;20:2214-22.
 34. Lu J, Clark AG. Population dynamics of PIWI-interacting RNAs (piRNAs) and their targets in *Drosophila*. *Genome Res*. 2010;20:212-27.
 35. Sienski G, Donertas D ,Brennecke J. Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell*. 2012;151:964-80.
 36. Szakmary A, Cox DN, Wang Z ,Lin H. Regulatory relationship among piwi, pumilio, and bag-of-marbles in *Drosophila* germline stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Biol*. 2005;15:171-8.
 37. Tatsuke T, Zhu L, Li Z, Mitsunobu H, Yoshimura K, Mon H et al. Roles of Piwi proteins in transcriptional regulation mediated by HP1s in cultured silkworm cells. *PLoS One*. 2014;9:e92313.

Correspondence Address / Yazışma Adresi

Umut Kökbaş
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı,
Adana , Turkey
e-mail: umutkokbas@gmail.com

Geliş tarihi/ Received: 23.05.2017**Kabul tarihi/Accepted:** 17.09.2017