

· 综 述 ·

脊椎动物 Argonaute 蛋白的研究进展

谢贤华, 茹盟, 彭剑玲, 翁林健, 黄建珍*

江西农业大学 动物科学技术学院, 江西 南昌 330045

谢贤华, 茹盟, 彭剑玲, 翁林健, 黄建珍. 脊椎动物 Argonaute 蛋白的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4418-4438.
XIE Xianhua, RU Meng, PENG Jianling, WENG Linjian, HUANG Jianzhen. Research progress in Argonaute proteins of vertebrates[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4418-4438.

摘 要: Argonaute 蛋白是广泛活跃于不同生物体的整个生命周期、与小 RNA (small RNA, sRNA) 结合并调控基因表达的一类蛋白。脊椎动物 Argonaute 蛋白有 2 个分支, Ago 蛋白和 Piwi 蛋白, 均包含 N、L1、L2、PAZ、MID 和 PIWI 结构域。N 结构域有助于 sRNA 单链加载; L1、L2 起结构域连接作用; PAZ 和 MID 结构域通过锚定 sRNA 发挥功能; 部分 Argonaute 蛋白的 PIWI 结构域类似 RNase H, 具有核酸内切酶功能。Ago 蛋白主要在转录及转录后水平调控基因表达; Piwi 蛋白主要存在于生殖细胞, 通过多种途径沉默转座子以保护机体基因组免受破坏, 同时参与基因表达调控。本文结合近年来 Argonaute 蛋白在晶体结构、功能解析、表达模式等方面的研究进展, 从蛋白结构、sRNA 依赖性、基因表达调控机制、生物学功能等方面对脊椎动物 Ago 和 Piwi 蛋白分支进行比较阐述, 以期阐明其在表观遗传调控中的作用, 并为后续 Argonaute 蛋白的深入研究和实际应用提供参考。

关键词: Argonaute 蛋白; 小 RNA; 基因表达调控机制; 生物学作用

Research progress in Argonaute proteins of vertebrates

XIE Xianhua, RU Meng, PENG Jianling, WENG Linjian, HUANG Jianzhen*

College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China

Abstract: Argonaute proteins are active throughout the lifetime in a variety of organisms and they bind to small RNAs (sRNAs) to regulate gene expression. The Argonaute proteins of vertebrates can be classified into two clades: the Ago clade and the Piwi clade. Both clades have N, L1, L2, PAZ, MID and PIWI domains. The N domain is involved in the loading of sRNAs. L1 and L2 domains facilitate the linking between domains. The PAZ and MID domains exert

资助项目: 国家自然科学基金(32360867)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32360867).

*Corresponding author. E-mail: huang813813@163.com

Received: 2024-01-10; Accepted: 2024-06-20; Published online: 2024-06-20

functions by anchoring sRNAs. The PIWI domain of some Argonaute proteins has RNase H-like structure and exerts the endonuclease function. Ago proteins regulate gene expression at transcriptional and post-transcriptional levels. Piwi proteins mainly exist in the germ cells, silencing transposons in different ways to keep genome integrality and regulating gene expression. In recent years, great progress has been made in Argonaute proteins in terms of the crystal structures, functions, and expression patterns. By reviewing the relevant studies, we elaborate on the structures, sRNA dependence, gene expression regulation, and biological roles of the Ago and Piwi proteins in vertebrates, aiming to clarify the roles of Argonaute proteins in epigenetic regulation and provide a reference for further research and application of these proteins.

Keywords: Argonaute protein; small RNA; regulation of gene expression; biological role

脊椎动物 Argonaute 分为 Ago 蛋白和 Piwi 蛋白这两大分支, Ago 蛋白分支包含 Ago1、Ago2、Ago3 等多个成员, Piwi 蛋白分支同样包含 Piwil1、Piwil2、Piwil3 等多个成员^[1]。Argonaute 蛋白首次在拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.] 中被发现, Ago1 突变影响植物叶片形状结构^[2], 随后在古细菌、细菌、植物、动物中陆续报道^[3]。Argonaute 蛋白是小 RNA (small RNA, sRNA) 引导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complexes, RISC) 的核心蛋白。大量研究表明 sRNA 与基因表达存在相关性^[4-6], 但具体的机制研究却相对较少, 这限制了 sRNA 的后续研究及应用。功能性非编码 sRNA 引导的 mRNA 降解、染色质结构改变是表观遗传学的重要组成部分, 而 sRNA 功能发挥依赖于 Argonaute 蛋白。Argonaute 蛋白家族成员众多、结构复杂, 结合不同辅助蛋白可发挥不同调控功能, 各成员之间有明显的相似性和差异性。阐明 Argonaute 与 sRNA 在表观遗传调控中的作用机制, 可为其后续研究和应用奠定基础。

1 Argonaute 蛋白的多样性与分类

Argonaute 蛋白多样性表现在物种、家族成

员和功能上。秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的 Argonaute 蛋白有 27 个成员, 它们按一定顺序参与 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 过程^[7]。哺乳动物 Ago 蛋白有 4 个成员, Ago1-4; 人、黄金地鼠等动物 Piwi 蛋白也有 4 个成员, Piwil1-4^[1,8]; 小鼠 Piwi 蛋白有 3 个成员, Piwil1 (也被称为 Miwi)、Piwil2 (也被称为 Mili) 和 Piwil4 (也被称为 Miwi2)^[9]。植物 Argonaute 家族成员也非常丰富, 拟南芥有 10 个 Ago 蛋白成员, 杨树 [*Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)] 有 15 个, 玉米 (*Zea mays* L.) 有 17 个, 水稻 (*Oryza sativa* L.) 有 19 个^[10]。真核生物 Argonaute 受 sRNA 引导并靶向 RNA 或 DNA, 是基因表达调控的重要途径^[11-12]。原核生物的 Argonaute 比真核生物更具多样性, 结构上分为长链和短链 (图 1A), 长链和短链结构域组成不同, 但无一例外都保留了 PIWI 结构域^[13-14]; 原核生物 Argonaute 受 DNA 或 RNA 引导并靶向降解外源核酸^[15-16], 甚至可不依赖 DNA 或 RNA 进行核酸切割^[17], 或杀死宿主以阻止外源核酸传播^[18], 是细菌抵抗外源核酸侵扰的重要机制^[19]。Argonaute 有悠久的进化历史和高度的保守性, 但也有生物缺乏此类蛋白, 如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* H.), 这可能与其进化过程中 RNA 干扰途径丢失有关^[13,20-21]。

真核生物 Argonaute 家族根据结构和功能

特征分为 3 个分支: Ago、Piwi (P-element induced wimpy testis)和 Wago (worm-specific Argonaute)。Ago 蛋白分支存在于多种动物的整个生命周期,主要与微小 RNA (microRNA, miRNA)、短干扰 RNA (short interfering RNA, siRNA)等 sRNA 相互作用,在转录及转录后水平调控基因表达,是重要的表观遗传调控方式。Piwi 蛋白分支在动物生殖细胞和节肢动物体细胞特异性表达,与 piRNA (Piwi-interacting RNA)结合并沉默靶标转座子,保障生殖细胞的正常发生和节肢动物体细胞的正常功能保驾护航^[22]。Wago 蛋白分支特异性存在于线虫,调控染色质活性。脊椎动物主要受 Ago 蛋白和 Piwi 蛋白调控,接下来将从蛋白的结构、结合的 sRNA、表观调控机制和生物学功能等方面对这 2 个分支蛋白进行比较阐述。

2 Argonaute 蛋白结构

脊椎动物 Ago 蛋白有 6 个结构域: N、L1、PAZ、L2、MID 和 PIWI (图 1B)。N 末端是 N 结构域的前序列,并作为“梁”贯穿 6 个结构域,起到稳固 Ago 蛋白结构的作用。有研究表明 Ago2 的 N 末端截短剪接异构体 Ago2-ex1/3 可导致其结构域之间灵活性增强,从而靶向更多 mRNA^[23]。sRNA 双链与 Ago 结合过程中, N 结构域作为楔子打开 sRNA 双链,其中一条作为乘客链被排出,另一条作为引导链被 MID 和 PAZ 识别固定^[24]。MID 识别引导链 5'端, PAZ 识别引导链 3'端^[25], 引导链 5'端第 1 个核苷酸通过与 Ago 相互作用增加 RISC 与靶标的结合时间^[26], 第 2-8、9-12、13-16 和 17-结尾核苷酸分别称作“种子”“中心”“3'补充区”和“尾巴”序列,分别起到靶标识别、mRNA 剪切、靶标稳定结合、调节靶标旋转的作用,这些区域也可能招募其他蛋白因子^[27]。L1 和 L2 共同稳固

RISC 结构^[28]。L2 有 1 个 Helix-7 结构,可与引导链第 6-7 位的 mRNA 接触,协同 L2 与 PAZ 运动,以调节引导链-靶 mRNA 双链相应位置扭曲,增加 RISC 结合及处理靶 mRNA 的效率^[29]。PIWI 结构域是整个蛋白功能发挥的核心,不管是长链还是短链 Ago,都包含该结构域。Ago2 和 Ago3 的 PIWI 结构域有保守的 Asp-Glu-Asp-His 基序,可进行 mRNA 剪切,而 Ago1 和 Ago4 无此功能^[12,30]。PIWI 结构域还影响 miRNA 种子序列与靶标 mRNA 的亲合力及切割力,如将拟南芥 Ago10 和人 Ago2 (以下简称 hAgo2) PIWI 结构域的 1 个 9-氨基酸环互换,会使 hAgo2 与靶标亲和力下降而剪切力增强,而互换对拟南芥 Ago10 的影响刚好相反^[31]。Ago 有 2 个“LAKes”池,当捕获 miRNA 时, Ago 会迅速识别 miRNA 磷酸骨架,“LAKes”瞬间吸附多个水分子,使 Ago 的 6 个结构域相互作用更紧密,形成 RISC 复合体^[12]。RISC 表面带许多正电荷, quasi-Markov State 模型研究 RISC 识别靶标过程发现,限制靶标识别速度的不是 mRNA 与 miRNA 互补配对,而是 mRNA 磷酸基团与 RISC 带正电荷残基配位^[32]。Nakanishi^[12]在分析 Ago 结构时也推测 RISC 可能通过其表面电荷微弱吸附非特异性 mRNA,部分 mRNA 的 3' UTR 区先与引导链暴露在外的序列结合,再进一步与所有种子序列配对,未能配对的 mRNA 经短暂吸附后迅速分离。RISC 的形成过程如图 1C 所示。

Piwi 蛋白有类似 Ago 的 N、L1、PAZ、L2、MID 和 PIWI 结构域,且各结构域行使功能类似。但 Piwi 蛋白与 Ago 蛋白序列重叠度不高,这些序列差异决定了它们之间的结构差异,进而导致了功能差异。如家蚕 (*Bombyx mori*) Piwi 家族的 Siwi 蛋白与 hAgo2 序列只有 13%-32% 重叠区域, Siwi 蛋白的 PAZ 上有一段 7 个核苷

酸的插入(Piwi-Ins, 残基 405–412), 该插入使 N-PAZ 通道上产生一凸起结构, 可能有利于其与长链 sRNA 结合^[33]。冷冻电镜下比较海绵体 (*Ephydatia fluviatilis*)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、家蚕的 Piwi 蛋白及 hAgo2 蛋白结构发现, hAgo2 有 L1、L2 和 PAZ 结构域组成的“中心门”, 而 Piwi 蛋白缺乏该结构, 取而代之的是 piRNA 种子结合位置附近多了 1 个 α -螺旋(helix-6); 与 hAgo2 结合的 sRNA 的 3'端

(g5–g7)呈现有序且保守的扭曲摆放, 而结合 Piwi 蛋白的 piRNA 的 3'端(g5–g7)摆放是无序的^[34]。功能上, 仅 sRNA 种子序列(g2–g8)与靶标配对时, hAgo2 与靶标的亲和力远高于 Piwi 蛋白, 当配对延伸到 sRNA 的中心区(g9–g12)时, hAgo2 与靶标的亲和力几乎不受影响, 而 Piwi 蛋白与靶标的亲和力大大增加; Piwi 蛋白剪切活力受 piRNA 3'端与靶标配对程度的影响, 配对程度越高, 剪切活力越强, 直至达到最大剪切活力^[34]。

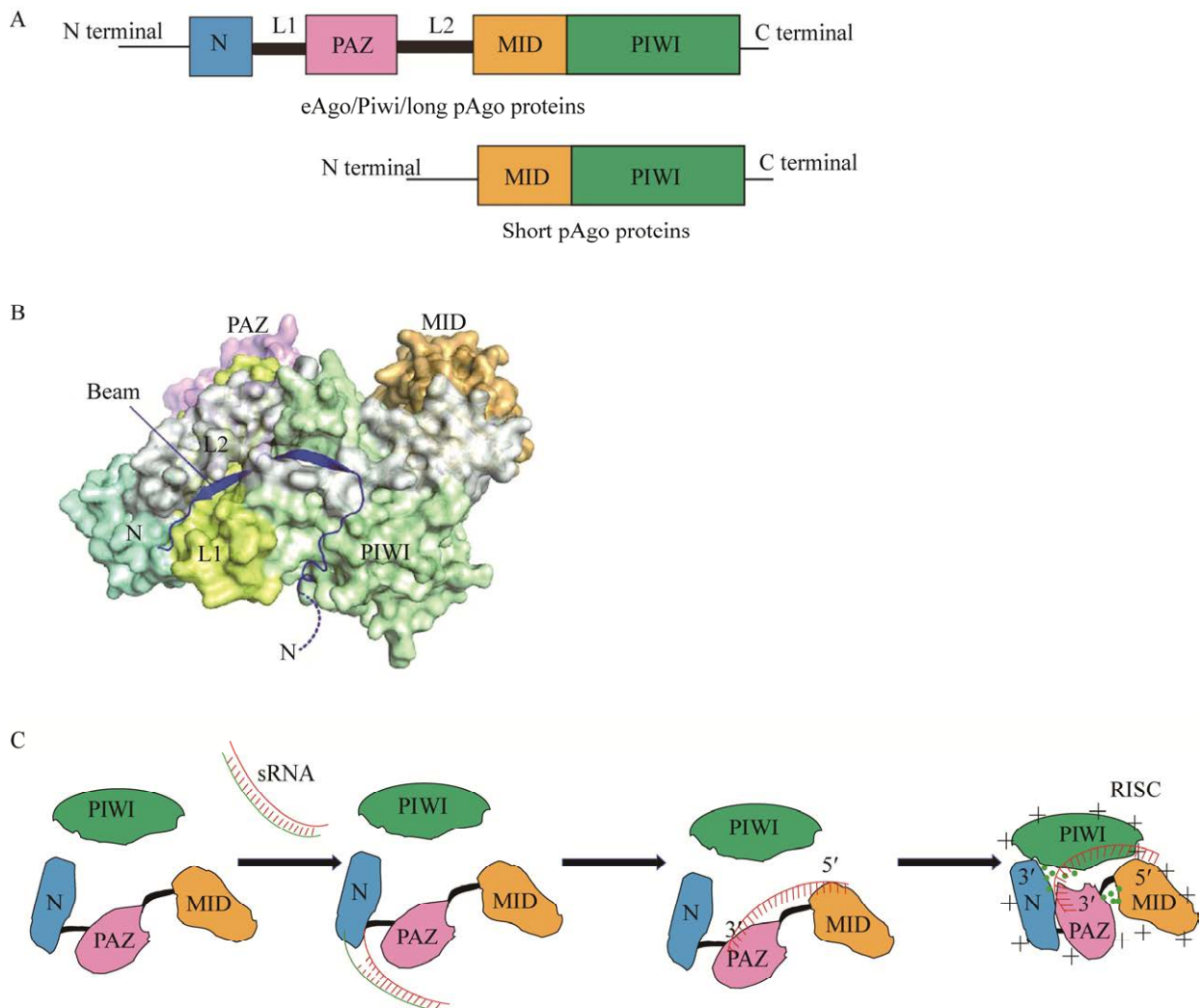


图 1 Argonaute 蛋白结构 A: 真核和原核 Argonaute 蛋白结构的线性表示. B: Ago 蛋白结构^[12]. C: sRNA 与 Ago 蛋白的结合过程

Figure 1 Argonaute protein structure. A: Linear domain of eukaryotic and prokaryotic Argonaute proteins. B: Structure of Ago protein^[12]. C: The process of sRNA binding to Ago protein.

3 加载至 Argonaute 蛋白的 sRNA

sRNA 主要包括 miRNA、siRNA 以及 piRNA。miRNA 是长约 22 nt 的单链小 RNA，其前体 pri-miRNA 被 Drosha-DGCR8 复合体剪切成短而带发夹结构的 pre-miRNA，pre-miRNA 转运出核后被 Dicer 切除发夹结构两端，形成短双链 RNA，在加载至 Ago 蛋白过程中双链裂开，形成成熟的单链 miRNA^[35]。siRNA 为长约 21–23 nt 的双链小 RNA，由其前体长双链 RNA 受 Dicer 酶剪切加工形成，加载至 Ago 蛋白的过程与 miRNA 类似。Dicer 是核糖核酸酶 III，可识别 pre-miRNA 和长双链 RNA 切割位点附近的“GYM”结构(配对的鸟嘌呤，配对的嘧啶，不配对的腺嘌呤或胞嘧啶)，然后精确剪切 RNA 双链；当底物没有“GYM”结构时，Dicer 作为“分子丈量尺”测量底物从 5'或 3'末端至约 22 个核苷酸的位置并在此进行剪切^[36]。Dicer 加工产生的小双链 RNA 均含有 5'端单磷酸盐和 3'端 2 nt 的核苷酸悬臂结构，该结构对其与 Ago 蛋白的结合有重要作用。

Ago 蛋白结合 sRNA 存在重叠性和偏好性。重叠性是因为 Ago 序列和结构存在保守性；偏好性与 sRNA 类别、Ago 蛋白丰度及结构差异等有关。hAgo 成员共享约 80%氨基酸和 75% miRNA 相关结构域^[1,37]。MCF7 乳腺癌细胞系中，大部分可与 hAgo1 结合的 miRNA 也可与 hAgo2 结合，但结合丰度存在差异，且该差异与 miRNA 来源于正义链还是反义链相关^[38]。从分别敲除 Ago1、Ago2 以及两者均敲除的小鼠中发现：与 Ago1、2 和 3 结合的 miRNA 池具有相似性，当缺失 Ago1 和 Ago2 时，Ago3 结合 miRNA 能力增强，结合能力与 Ago 丰度相关^[39]。Ago 对 sRNA 的偏好性还与 sRNA 序列有关，Juvvuna 等^[40]研究不同发育期小鼠大脑发现，

miRNA-124 在小鼠发育过程中会进行 3'末端缩短性修饰，胚胎期未进行缩短性修饰的 miRNA-124 倾向于结合 Ago1；成年期 miRNA-124 进行缩短性修饰，Ago2 可高效促进该修饰的发生并结合修饰后的 miRNA-124；进一步研究发现，Ago2 的 PAZ 结构域有一个区别于其他 Ago 蛋白的 RH(精氨酸组氨酸)结构，该结构使 miRNA-124 的 3'末端修剪更加高效地进行。

piRNA 是一类长 21–35 nt 的单链小 RNA，存在 5'单磷酸尿嘧啶(U)偏好性，主要出现在动物生殖细胞中，也有文献报道癌症患者存在 piRNA 在体细胞异常表达的情况^[41]。piRNA 的发生包括 2 个路径^[42]。第一个是“乒乓循环”路径，起始 piRNA 引导 Piwi 蛋白两步剪切靶标 RNA，产生应答 piRNA 和带 5'单磷酸尿嘧啶末端的尾 RNA 链。应答 piRNA 又引导 Piwi 蛋白两步剪切反义靶标 RNA，产生与起始 piRNA 序列相同的 piRNA。第二路径与第一路径相关，“乒乓循环”中被 Piwi 蛋白剪切产生的尾 RNA 链受到 Piwi 蛋白或其他+1 U 识别偏好的核酸内切酶(如 Zucchini)剪切，形成新的 piRNA 和新的尾 RNA 链，新的尾 RNA 链继续通过第二路径产生 piRNA，该路径可产生大量新的 piRNA。不管产生路径如何，成熟 piRNA 形成前其 3'端都要受核酸酶(如 Pnlcd1)剪切并添加 2'-O-CH₃，Pnlcd1 还具有 polyA 末端修剪功能，可能参与 piRISC 引导的 mRNA 降解^[42-45]。哺乳动物主要产生 3 种 piRNA：(1) 26–28 nt 的主要沉默转座子的 piRNA，主要出现在胎儿睾丸中^[46]；(2) 26–27 nt 来自于 mRNA 3' UTR 端的 piRNA^[47]；(3) 开始产生于减数分裂粗线期并持续产生的约 30 nt 的 piRNA，种类丰富，但转座子 piRNA 较胎儿睾丸少^[48]。piRNA 通过结合 Piwi 蛋白形成 piRISC，发挥基因表达调控功能。

Piwi-Ins 结构长度调控 piRNA 生成长度, 并调节 Piwi 蛋白的 piRNA 结合偏好性。Wang 等^[49]通过蛋白序列比对发现 Piwi-Ins 结构存在于人、鼠、蝇、线虫、海绵体等动物的所有 Piwi 蛋白中, 但 Ago 蛋白不存在; 野生型小鼠睾丸提取物中的 Miwi 能利用 50 nt 的 piRNA 前体产生 30 nt 的成熟 piRNA, 而敲除其 9 个氨基酸 Piwi-Ins 序列的变异 Miwi 只能产生 28 nt 的 piRNA, 用另一物种 27 个氨基酸 Piwi-Ins 序列代替 9 个氨基酸序列的新 Miwi 蛋白可产生约 33 nt 的 piRNA; 小鼠活体试验也验证了这一现象, 敲除该结构的 Miwi^{Δins} 小鼠产生比野生型更短片段的 piRNA, 导致精子发生失败, 小鼠不育; 缺失 Piwi-Ins 结构的 Miwi 蛋白更倾向于富集短序列 piRNA, 结合短 piRNA 的 Miwi 蛋白同样有调控基因表达功能, 但由于 piRNA 3'端与靶标缺少延伸区互补配对, Miwi/eIF3f/HuR 翻译激活复合物组装受阻, 导致很多基因不能被激活翻译; 通过分子动力学模拟发现, Piwi-Ins 片段大小和带电状态都参与决定了其装载的 piRNA 长度。可见, Piwi-Ins 结构对 piRNA 的正常产生及功能发挥都至关重要。

4 脊椎动物 Argonaute 蛋白的基因表达调控机制

4.1 Ago 蛋白的基因表达调控机制

Ago 蛋白于转录及转录后水平调控基因表达(图 2A)。转录水平调控表现为改变 DNA 的甲基化状态和组蛋白修饰, 招募不同功能蛋白因子, 既可激活转录也可抑制转录; 转录后水平调控表现为沉默靶标 mRNA、改变 miRNA 修饰、影响可变剪接等。

4.1.1 转录水平调控

Ago 蛋白通过调控 DNA 甲基化抑制基因转录。RNA 依赖的 DNA 甲基化(RNA-directed

DNA methylation, RdDM)现象在植物中普遍存在, 其过程是: 植物 Pol IV 产生的转录物被复制成长双链 RNA, 再经 Dicer 剪切成 siRNA; siRNA 与植物 Ago4 蛋白结合成 RISC, 再转运至核内; RISC 靶向识别并结合至 Pol V 正在产生的转录物支架上; 最终 RISC 招募大量蛋白因子和 DNA 甲基化酶将 Pol V 附近 DNA 序列的胞嘧啶甲基化^[50]。因该过程所需要的 RNA 聚合酶 Pol IV 和 Pol V 是植物特有酶, 由 Pol II 进化而来, 科研人员一直认为 RdDM 是植物特有的表观修饰。直至有研究发现动物中也存在 RdDM, 2019 年 Chalertpet 等^[51]发现人类 HEK293 细胞系中, 相较于 Ago1-3, Ago4 与全基因组 DNA 甲基化有更强相关性, 耗尽内源性 Ago4 会使其靶点 DNA 去甲基化, 而外源补救 Ago4 可恢复该甲基化; 2022 年 Watcharanurak 等^[11]在 HEK293 细胞系中发现, 人类 RdDM 过程可甲基化由 Hmgb1 蛋白产生的 DNA gaps 附近的 DNA 序列以稳定基因结构。

Ago 蛋白还可通过改变靶点表观修饰或招募转录相关蛋白以激活基因转录。Li 等^[52]发现某些小 RNA 可靶向基因启动子并激活转录, 并将这类小 RNA 命名为小激活 RNA (small activating RNAs, saRNAs)。Li 等^[53]对糖尿病小鼠模型和糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy)患者研究发现, miR-320 在糖尿病心肌病个体心脏高表达, 并通过 Ago2 靶向脂肪酸转位酶基因 *CD36* 的启动子, 使 *CD36* 基因高表达, 进而导致糖尿病患者心脏对脂肪酸摄取增加, 增加了心脏的脂毒性。孕激素受体(progesterone receptor, PR)是类固醇/核激素受体超家族成员, 是 saRNA 敏感靶点, 科研人员利用该基因模型研究 saRNA 的激活机制发现, Ago2 是 saRNA 激活基因转录的必需蛋白, 它以 saRNA 反义链 5' 端种子序列依赖的方式靶向基因启动子区域,

改变该区域表观修饰,如降低 H3K9 和 H3K14 乙酰化以及增加 H3K4 二甲基化和三甲基化,并启动基因转录^[54-55]。另有研究表明,Ago2 与 saRNA 复合体靶向启动子,同时可招募 Rita、Rha、Ctr9 复合体,而 Rita 与 RNA 聚合酶 II 相互作用激活基因转录^[56]。Ago1 对基因的转录激活同样有调控作用,但它不是结合基因启动子而是增强子。Ago1 在骨骼肌分化过程中,与增强子 RNA、CREB-结合蛋白乙酰转移酶形成复合物,直接控制全局 H3K27 乙酰化,进而激活基因转录,Ago1 是成肌分化基因 *myod* 和下游成肌基因激活所必需的调控因子^[57]。

Ago 蛋白还影响染色质状态。人 HepG2 细胞中,Ago1 在拓扑相关结构域(topologically associating domain, TAD)边界富集,并依赖增强子 RNA (enhancer RNAs, eRNAs)作用于增强子,它是维持三维染色质结构的关键因子^[58]。当敲除小鼠胚胎干细胞的 Ago1 时,H3K9me3 和异染色质蛋白 HP1 α 在着丝粒周围区域重新分布,而着丝粒周围转录本的表达急剧上调^[59]。Hi-C 与染色质免疫共沉淀技术也证实,果蝇 Ago 与染色质的 TAD 边界相关,并可通过调节 TAD 结构来抑制某些精子发生相关基因的转录^[60]。

4.1.2 转录后水平调控

Ago 蛋白通过剪切、降解 mRNA 调控转录后沉默。Ago2 和 Ago3 具有相同的剪切基序 Asp-Glu-Asp-His 及相似的剪切功能。2004 年,科研人员发现哺乳动物 Ago2 有剪切 mRNA 的功能,突变掉剪切基序后的 Ago2 不能对 siRNA 产生剪切反应,但该团队并未发现 Ago3 有剪切功能^[61]。2020 年, Park 等^[62]发现人类 Ago3 与极微小引导链 RNA (14 nt)结合的 RISC 有剪切功能,且对靶标的剪切效率比 Ago2 更高。Ago1 和 Ago4 因序列差异,没有剪切功能,但依然可加载不同 sRNA 并介导靶标降解:一种

机制认为 GW182 是 RISC 的另一个关键蛋白, GW182 作为支架蛋白招募 poly(A)结合蛋白、Ccr4-Not 及 Pan2-Pan3 复合体, Ccr4-Not 加速 mRNA 的 poly(A)尾移除, Pan2-Pan3 可以使 RNA 去烯化,加速 mRNA 降解,4 种 Ago 蛋白均存在这一沉默机制^[63-64];另一机制认为果蝇 RISC 可招募去帽因子 Dcp1、Hpat 和 Me31B,可能导致 mRNA 沉默降解^[65-66]。转录后沉默不仅发生于细胞质,也发生于细胞核。研究小鼠成肌干细胞、胚胎干细胞和 HEK293 等多个细胞系发现,细胞核存在高水平 Ago 蛋白,其与胞质中一样结合 sRNA 并与 GW182 和 Ccr4-Not 互作,介导靶 mRNA 降解沉默;胞质 mRNA 靶点主要集中于 mRNA 的 3'端,而细胞核内未修饰的前体 mRNA 的外显子和内含子均可成为 RISC 的作用靶点^[67-68]。

Ago 蛋白也可通过甲基化 miRNA 抑制 RNAi 过程。Cheray 等^[69]对胶质母细胞瘤细胞系 U87 细胞系进行研究,发现 102 个 miRNA 存在 m5C 甲基化, Dnmt3a/Ago4 可甲基化 miRNA,而甲基化的 miRNA 失去与 mRNA 结合能力即失去对靶基因的抑制作用。

此外,Ago 蛋白还影响可变剪接。RNA 可变剪接指同一基因的转录产物 pre-mRNA 经过可变剪接复合体加工成不同转录本 mRNA 的过程。人 Ago1、Ago2 和 Ago3 均可调控可变剪接事件,这些事件既有重叠性又有差异性^[70]。宫梦婷^[71]对 Ago2 介导的可变剪接进行深入研究,证实 Ago2 的核质分布及其对可变剪接相关蛋白 HNRNPU 表达量的调控均影响靶基因可变剪接,且该影响依赖于小分子 RNA。Ameyar-Zazoua 等^[72]从 HeLa S3 细胞系分离染色质结合蛋白并进行分析,发现 Ago1 和 Ago2 存在共定位,且与 HP1 γ 、HNRNPU 等剪接因子共定位;Ago1 和 Ago2 促进剪接体招募并调控 Pol II 的延伸速

率, 从而影响可变剪接。Chu 等^[70]利用敲除 *Ago1*、*Ago2*、*Ago1/2*、*Ago1/2/3* 等的大肠癌 HCT116 细胞系研究发现, 在敲除 *Ago1/2*、敲除 *Ago1/2/3* 细胞系中发现了几百个可变剪接变化的 mRNA。可见, Ago 蛋白参与的可变剪接亦是重要的表观调控方式。

4.2 Piwi 蛋白的基因表达调控机制

Piwi 蛋白对转座子和编码基因活性具有调控作用(图 2B)。转座子分为两类, 第一类是逆转座子 (retrotransposons), 先转录成转座子 RNA, 再逆转录成 DNA 片段, 插入到基因组不同位置, 包括 LTR (long terminal repeat)、DIRS (dictyostelium intermediate repeat sequence) 样元件、PLEs (penelope-like elements) 样元件、LINEs (long interspersed nuclear elements) 和 SINEs (short interspersed nuclear elements) 等; 第二类是 DNA 转座子, 包含 TIR (terminal inverted repeat)、Crypton 和 Helitron 等, 根据转座过程 DNA 断裂的链数分为 2 个亚类, 但都不以 RNA 为转座中间体^[73]。转座子插入基因组不同位置, 破坏基因完整性, 影响基因表达。Piwi 蛋白对转座子的抑制是多途径的, 如调控转座子可及性、DNA 甲基化和剪切、降解转座子 RNA 等。Piwi 蛋白的另一个功能是调控编码基因表达, 既可剪切、降解 mRNA 以抑制翻译, 也可激活 mRNA 翻译。

4.2.1 转录水平调控

Piwi 蛋白通过调控染色质可及性抑制转座子活性。果蝇 Piwi 蛋白是果蝇 Piwi 家族成员之一, 在卵巢体细胞的细胞核富集, 可与组蛋白 H1 共定位, 敲除 H1 或 Piwi 蛋白, 都会使某些转座子 RNA 表达显著升高, 研究发现 piRNA-Piwi 引导 H1 在这些转座子附近富集, 降低该区域染色质可及性, 从而抑制转座活性^[74]。同样是果蝇卵巢体细胞, piRNA-Piwi 蛋白亦可引导

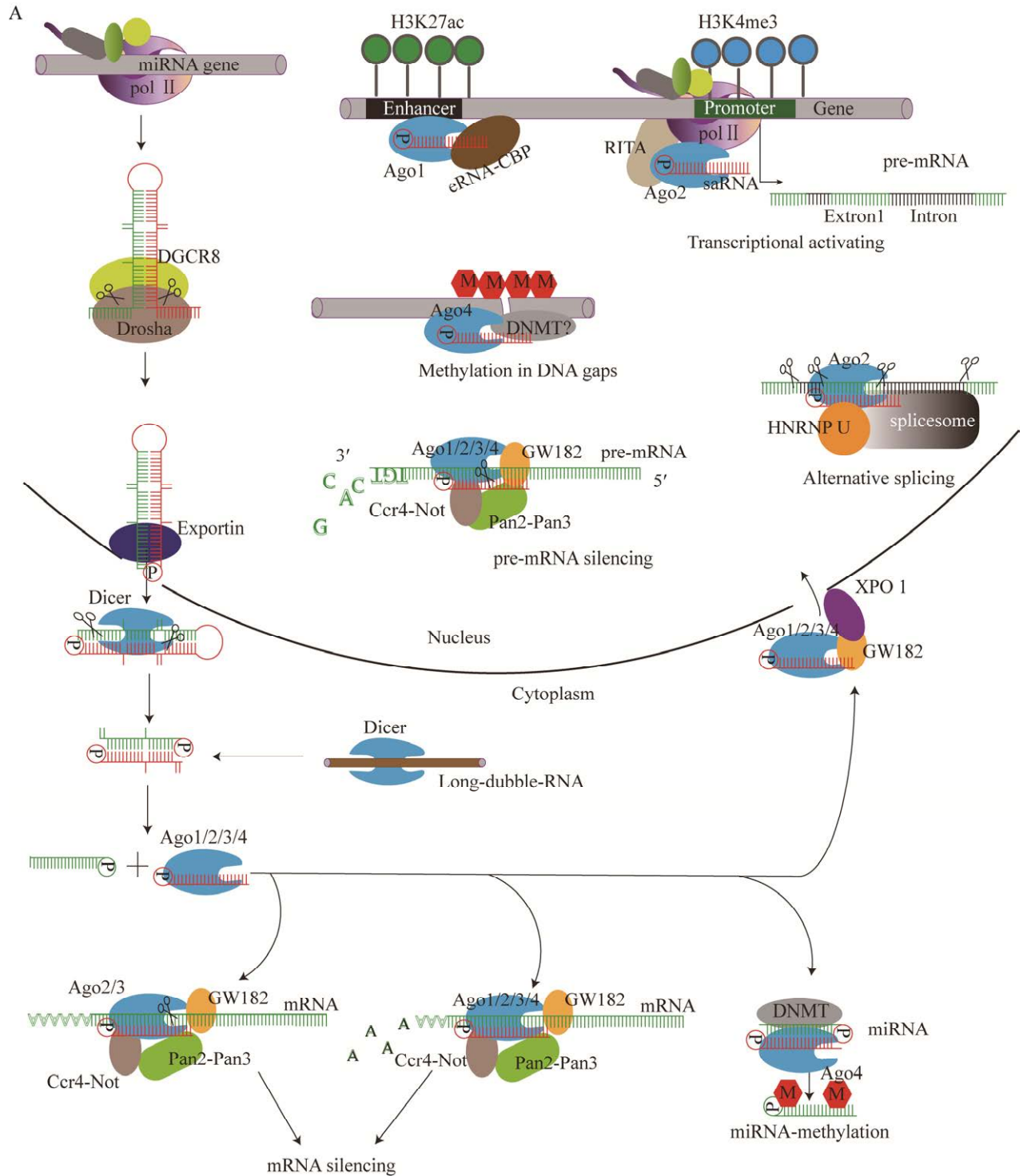
H3K9me3 在某些转座子附近富集^[75]。小鼠雄性生殖细胞中, H3K9me3 标记在 LINE 附近富集, 且 Piwi 家族成员 Miwi2 是其维持富集状态的必需条件^[76], 组蛋白 H1 的变体 H1t 在转座子区域与 H3K9me3、H4K20me3 共定位^[77]。

Piwi 蛋白通过 piRNA 依赖的 DNA 甲基化沉默转座子。在哺乳动物中, DNA 甲基化是转座子沉默的重要途径。生殖细胞发育过程需经历全基因组范围的去甲基化和甲基化重建, 但转座子, 如 LINE1、IAP (intracisternal A particle elements) 和 LTR 等可躲过全基因组甲基化而继续表达, 这对基因组来说是严重威胁, 而 Piwi 蛋白可对这些转座子进行甲基化, 从而保护基因组的完整性^[78]。小鼠 Mili 蛋白在细胞质中剪切降解转座子 RNA 以抑制其转座活性, 同时产生大量 piRNA, 敲除 *Mili* 会导致胚胎时期睾丸大部分 piRNA 消失^[79]。*Mili* 为 *Miwi2* 的甲基化功能提供 piRNA, 同时 *Mili* 也是转座子甲基化的重要因子, 当敲除 *Mili* 时, 精母细胞 LINE1 和 LTR 甲基化水平降低, 而 *Miwi2* 缺失并不影响 LTR 的甲基化水平, 可见 LTR 是通过区别于 *Miwi2* 途径的 *Mili* 途径被甲基化的^[78-80]。*Miwi2* 也参与 piRNA 生成, 但并不必需, 它主要定位于细胞核, 以 piRNA 依赖的方式甲基化某些转座子。当敲除出生后 10 d 的小鼠睾丸中的 *Miwi2* 时, LINE1 家族的新转座子 L1-T、L1-Gf 以及内源性病毒家族 (endogenous retrovirus, ERV) 的 IAPEy 表达量显著上升, *Miwi2* 缺失对全基因组 DNA 甲基化水平影响不大, 但 L1-T、L1-Gf 以及 ERV 家族的甲基化水平显著降低^[80]。参与 *Miwi2* 调控机制的蛋白因子复杂而多样, Zoch 等^[81]通过免疫共沉淀, 共鉴定到 28 种 *Miwi2* 相关蛋白, 它们可能参与 *Miwi2* 相关的 piRNA 生成或 DNA 从头甲基化, 并通过实验验证了 *Spocd1* 是 *Miwi2* 从头甲基化 DNA 的重要蛋白因子。

4.2.2 转录后水平调控

Piwi 蛋白通过剪切、降解 mRNA 调控转录后沉默，类似 Ago 分支但又有一定区别。成年

小鼠睾丸组织中大量 mRNA 存在与 piRNA 配对的潜在切割位点，剪切位点位于 piRNA 5'端第 10 位，这些 mRNA 与 Miwi 蛋白存在直接相



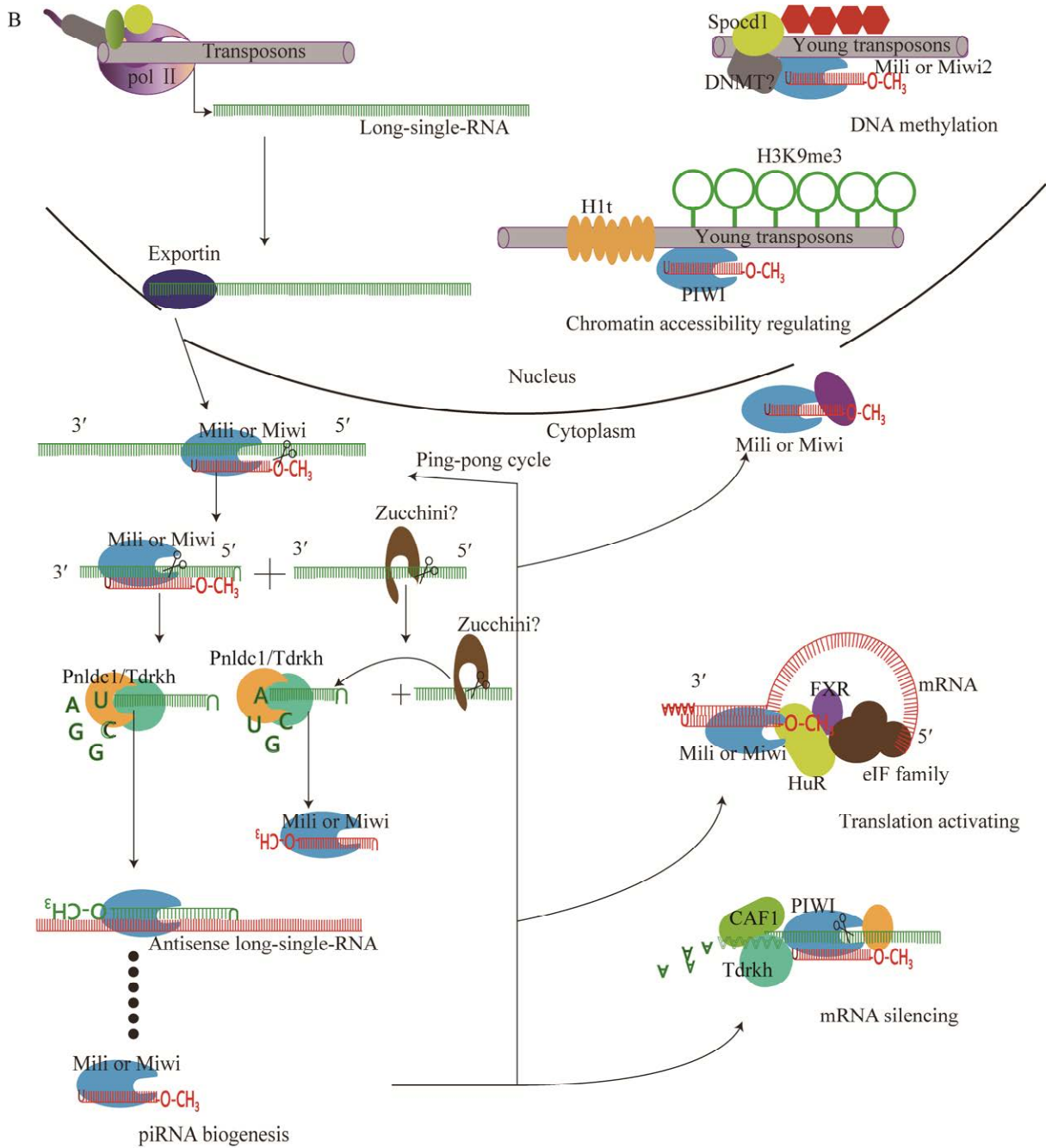


图2 人 Ago 蛋白与小鼠 Piwi 蛋白的功能 A: 人 AGO 蛋白的功能. B: 小鼠 PIWI 蛋白的功能

Figure 2 Functions of human Ago and mouse Piwi proteins. A: Functions of human Ago proteins. B: Functions of mouse Piwi proteins.

互作用, 当 *Miwi* 基因突变时, 这些 piRNA 靶向的 mRNA 表达量显著升高^[9], Pi6 是一组来自小鼠 6 号染色体的 piRNA, 其缺失会导致小鼠精子难以穿透透明带而降低受精率, 研究表

明该组 piRNA 通过直接切割其靶标 mRNA 而影响基因表达^[82]。Gou 等^[83]发现, 小鼠精子细胞向精子转变的过程中, 粗线期 piRNA-Miwi 与去烯化酶 Caf1 结合并诱导 mRNA 去烯化和

衰变,清除胞内大量 mRNA,给精子变形创造条件。这些研究表明 Piwi 蛋白存在类似 Ago 蛋白的剪切、沉默 mRNA 功能。区别在于 Ago 蛋白剪切、降解功能需要“种子”序列与靶标的精确互补配对; piRISC 与靶标配对可不从第 2 个核苷酸开始,但要求至少 15 个连续核苷酸配对,当转座子发生突变而 piRNA 库还未更新时, Piwi 蛋白对其转录本仍能剪切,只是剪切效率不同^[84]。

除了负向调控, Piwi 蛋白也可正向调控基因表达。果蝇 Piwi 蛋白 Aub 不仅在果蝇卵巢表达,也在其生殖干细胞表达,可通过直接结合靶 mRNA 并与翻译起始因子相互作用来促进自我更新和分化因子翻译^[85]。Dai 等^[86]利用小鼠 GC-2spd(ts)细胞系研究发现, piRNA-Miwi 蛋白除了抑制 mRNA 活性,还在早期精子细胞内与 eIF3f、HuR 等翻译起始因子形成超级复合物并激活细胞内某些 mRNA 翻译, Fxr1 参与了这一激活过程^[87],解锁了 Piwi 蛋白新调控机制。可见,与 Ago 蛋白一样,结合不同蛋白因子时, Piwi 蛋白可能起着截然相反的调控功能。

5 Argonaute 蛋白的生物学作用

由于 sRNA 多样性、Argonaute 蛋白种类以及功能多样性, RISC 的生物学作用广泛而多样。Ago 蛋白从免疫、DNA 修复、生殖、发育和癌症等多方面影响个体的生命活动; Piwi 蛋白受其表达时空限制,仅在生殖和癌症方面存在重要的调控作用。下面将对 Argonaute 影响的各生物学作用进行细致阐述。

5.1 免疫

siRNA 介导的转录后沉默是动物病毒免疫的重要途径。研究人员发现 siRNA 介导的 RNAi 是植物和非脊椎动物抵抗病毒感染的重要途

径。siRNA 介导的免疫机制主要分 3 个阶段: (1) 病毒在宿主内进行基因组复制时产生双链 RNA; (2) Dicer 酶识别双链 RNA 并进行剪切加工,产生 siRNA; (3) siRNA 与 Ago 蛋白结合形成 RISC 复合物,该复合物靶向并降解病毒 RNA,从而达到清除病毒的作用^[88]。脊椎动物的病毒免疫主要依赖于干扰素途径, RNAi 途径一直受到争议,因为干扰素的存在会抑制病毒 siRNA 产生^[89],在持续感染的 T 细胞中检测不到显著水平的病毒源性 siRNA^[90]。后来研究人员发现脊椎动物在 RNAi 抑制因素缺失的情况下, RNAi 可发挥免疫作用: Maillard 等^[91]在抑制干扰素途径情况下,在哺乳动物细胞系中观察到了感染病毒的 siRNA; Qiu 等^[92]在人类细胞系以及小鼠中用人类肠道病毒 HEV71 作为模型发现, HEV71 病毒包含 RNAi 抑制蛋白 3A,当突变掉该蛋白基因时,突变病毒感染的细胞系和小鼠中均可检测到大量 HEV71 病毒源性 siRNA。严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV2) 病毒是一种引起重症急性呼吸综合征的冠状病毒,可抑制人体干扰素免疫机制,此时人体潜在的 RNAi 途径将代替干扰素机制行使自然免疫功能^[93]。Lopez-Orozco 等^[94]在培养人肺癌、肝癌等多种细胞系时发现, Ago2 蛋白会在 SARS-CoV2 病毒复制复合物附近聚集,敲除 Ago2 后细胞的病毒 RNA 丰度和病毒滴度都大幅增加,且该病毒免疫机制依赖于病毒复制过程产生的 siRNA 和 Ago2 的核酸内切酶功能。病毒免疫的 RNAi 途径受到争议的另一原因是体内正常 Dicer 酶剪切长双链 RNA 效率低下,但 Poirier 等^[95]在人和小鼠多种细胞系、器官及胚胎干细胞中均观察到正常 Dicer 的另一变体,缺失外显子 7 和 8 的短 Dicer,可有效进行长双链 RNA 加工并产生抗病毒 siRNA。由此

可见, RNAi 也是脊椎动物中存在且重要的病毒免疫途径。

5.2 DNA 修复

Ago 蛋白复合物在同源重组修复中发挥重要作用。DNA 断裂(DNA double-strand break, DSB)是非常严重的 DNA 损伤, 其修复机制是 DNA 完整性的重要保障, 包括同源重组修复和非同源末端连接。同源重组修复利用姐妹染色单体模板进行高保真修复, 仅发生于细胞周期 S 期后期和 G2 期。同源重组修复过程分为 4 个步骤: (1) 识别和稳定 DNA 损伤位置。当 DNA 发生断裂性损伤时, 核酸酶和解旋酶复合物识别该区域并将损伤严重的一段剪除, 使 DNA 出现一段较长的单链区域(single-stranded DNA, ssDNA); 然后复制蛋白 RPA 结合至单链以维持单链稳定, RPA 紧接着招募 DNA 损伤应答蛋白 ATM 和 ATR; ATM 和 ATR 将损伤区的 H2A 蛋白变体 H2AX 磷酸化, 即变成 γ H2AX, 并将 γ H2AX 扩散到附近区域。(2) RPA 被 Rad51 蛋白替代。(3) Rad51-ssDNA 寻找并结合至同源 DNA 链上。(4) 利用完好的同源 DNA 为模板将损伤修复, 两条完整的双链 DNA 分离^[96]。Wei 等^[97]和 Gao 等^[98]发现, Ago2 蛋白参与了步骤(2)中的 Rad51 蛋白招募: 在拟南芥和人 DR-GFP/U2OS 细胞系(含有同源重组报告系统)中, DSB 可诱导其断裂点两侧序列产生大量断裂诱导产生的小 RNA (DSB induces production of small RNAs, diRNAs); 这些 diRNA 与 Ago2 结合形成 RISC, 并与 Rad51 共定位于 ssDNA 区域, 当敲除 *dicer* 基因或 Ago2 基因时, Rad51 在 ssDNA 区的富集情况明显降低。另外, 有研究表明 Ago2 S672 位点磷酸化与重组修复有关, 该点突变导致 Ago2 无法在 DNA 损伤位置富集, 减少 Rad51 的招募, 但该点突变并不影响 Ago2 的 miRNA 结合效率及剪切功能^[99]。

Chang 等发现 Kmt2c 蛋白有招募 γ H2AX、Nbs1、Mdc1 等同源重组修复因子的作用, 而 siRNA 和 Ago2 形成的 RISC 有招募 Kmt2c 的作用^[100]。可见, Ago2 蛋白在同源重组修复中扮演重要角色, 但这可能与其剪切和沉默功能无关, 具体机制还有待进一步探究。

5.3 生殖

Ago 蛋白对生殖有重要作用。成年小鼠睾丸中, Ago4 在精母细胞减数分裂 I 期高表达, 其缺失会导致睾丸变小、精子数量减少、性别分化异常、性染色体沉默异常等缺陷^[101]。Ago2 在小鼠雄性生殖细胞减数分裂过程中与染色质及核内 mRNA 结合, 调控精子发生相关基因的表达, Ago2 敲除的雄性小鼠表现出精子头部形态异常、精子数量减少、子代存活率降低等表型^[102]。

Piwi 蛋白以非冗余方式调控动物生殖。小鼠 Miwi 蛋白在精子发生中有不可替代的作用, 当突变掉该蛋白催化剪切基序(Asp-Asp-His)的第 1 个天冬氨酸(Asp)时, 其剪切功能失活, 进而导致转座子 LINE1 的 RNA 表达上调, 以及 DNA 损伤标记 γ H2AX 表达上调, 小鼠精子发生被阻滞在减数分裂之后, 表现出不育表型^[103]。当突变掉小鼠 Mili 催化剪切基序(Asp-Asp-His)的第 2 个 Asp 时, Mili 的功能缺失并阻碍了转座子 piRNA 产生, 导致 Miwi2-piRNA 量减少, 进而导致 LINE1 转座子逃避沉默, Mili 突变纯合子表现出雄性不育表型^[79]。小鼠缺乏 Piwil3 且雌性生殖细胞不受 Piwi 蛋白调控, 以小鼠为模型只能对其雄性生殖细胞 Piwi 家族进行研究, 无法研究哺乳动物雌性生殖细胞的 Piwi 蛋白表达与功能。黄金地鼠含有 Piwil1、Piwil2、Piwil3 和 Piwil4, 其 Piwi 蛋白及 sRNA 表达模式更接近人、牛、猴等哺乳动物, 更适合作为 Piwi 蛋白研究模型。Lv 等^[8]绘制了 Piwi 蛋白家

族在黄金地鼠表达动态图, 产后 3 d 的雄性黄金地鼠只表达 *Piwi2* 和 *Piwi4*, *Piwi2* 只定位于细胞质, 而 *Piwi4* 在细胞质、细胞核都有定位; *Piwi1* 和 *Piwi2* 在地鼠成年睾丸中高表达, 且均只定位于细胞质, 早期精母细胞细线期/偶线期只能观察到 *Piwi2*, 粗线期精母细胞可观察到 *Piwi1* 与 *Piwi2* 共定位, 而到圆形精子时期, 只能观察到 *Piwi1*; 雌性黄金地鼠里, *Piwi1* 和 *Piwi3* 表达于静止和发育中的卵母细胞, *Piwi2* 仅表达于原始卵泡和初级卵泡的卵母细胞细胞质中, 而 *Piwi4* 在整个雌性生殖细胞是缺失的; 雄性地鼠敲除 *piwil2* 和 *piwil4* 中任一基因, 小鼠会表现出完全不育症状, 而雌性地鼠敲除这 2 个基因时生育能力不受影响; 敲除 *piwil3*, 雌性地鼠生育能力下降, 产仔数显著减少。

5.4 发育

Ago 蛋白对脊椎动物生长发育有重要调控作用。不同 *Ago* 蛋白在小鼠胚胎有不同的表达模式: *Ago1*、*Ago3*、*Ago4* 在整个胚胎期呈现低表达, 而 *Ago2* 在桑葚胚期有一个表达高峰^[104]。研究发现, 敲除 *Ago2* 会导致小鼠胚胎分化异常, 如外胚内胚层(extra-embryonic endoderm, ExEn)分化异常、中胚层扩张, 甚至导致胚胎死亡^[105-106]。在早期胚胎中, 胚胎发育需要从母体控制的表达模式转变为胚胎控制的发育模式, 此过程需要降解母体 mRNA, 这也是合子的激活过程。小鼠胚胎母体 mRNA 降解依赖于 *Ago2*, *Ago2* 以内源性 siRNA 依赖的方式降解母体 mRNA, 并结合某些 saRNA 以启动 *Yap1* 和 *Tead4* 表达, 诱导合子激活^[107]。另外, Lessel 等^[108]在 21 例神经发育障碍患者中发现了 13 个 *Ago2* 杂合子变异, 每种错义突变都会导致其 RISC 功能受损。除了 *Ago2*, 其他 *Ago* 蛋白同样对发育有调控作用。Tokita 等^[109]研究发现, 5 例肌张力低下、营养不良和发育迟缓的患者

均存在 1p34.3 染色体区域微缺失, 而 1p34.3 区域包含 *Ago1* 和 *Ago3* 基因, 且其中 4 例患者还存在 *Ago4* 基因部分缺失。Schalk 等^[110]在 26 个无血缘关系的神经发育障碍患者中检测到 15 个 *Ago1* 变异: 其中包括 12 个错义突变, 2 个缺失变异和 1 个可变剪接变异; 经过计算机模拟这些突变 *Ago1* 结构发现, 它们大部分聚集在 L1 与 PAZ 结构域形成的 3D 结构两侧。

5.5 肿瘤

Ago 成员通过各自不同的分子功能影响肿瘤发生。有研究表明, 在小鼠非小细胞肺癌模型中, *Ago2* 存在过表达现象, 通过上调 KRAS 信号通路促进恶性肿瘤发生, 敲除 *Ago2* 可抑制肿瘤细胞 Erk 磷酸化进而抑制 KRAS 通路, 降低肿瘤大小和级别^[111-112]。与 *Ago2* 作用相反, *Ago1* 和 *Ago4* 在肿瘤细胞中起抑制肿瘤生长的作用。果蝇中, *Ago1* 显著富集于生长调节基因 *myc* 启动子, 抑制该基因转录从而抑制生长^[113]。对病患透明细胞肾癌组织及 786-O、TK10 等细胞系研究发现, MiR-153-5p 可以靶向 *Ago1*, 降低 *Ago1* 的表达, 促进肿瘤增殖与转移, 而敲除 *Ago1* 也有相同效果^[114]。*Ago4* 在非小细胞肺癌中呈低表达并能抑制癌细胞增殖与转移, 其过表达导致体内和体外多种 p53 缺陷细胞生长受到抑制^[115]。

一般认为, 正常生理状态下 *Piwi* 蛋白只在脊椎动物生殖细胞中表达, 在体细胞中几乎不表达, 但在多种肿瘤组织中均发现了 *Piwi* 蛋白异常表达的情况。PiRISC 可通过 m6A 甲基化、组蛋白修饰、DNA 甲基化, 甚至不依赖 piRNA 调控肿瘤组织的基因表达^[41]。相对于正常体细胞, *Piwi1* 在人肝细胞癌中表达显著升高, 表达量与癌细胞增殖率呈正相关, 敲除该基因时癌细胞增殖受到抑制; *Piwi1* 可在不影响有氧糖酵解的情况下促进脂肪酸氧化分解, 并为癌

细胞提供能量,抑制脂肪酸氧化可达到与 Piwil1 敲除类似的抑制增殖效果^[116]。在缺乏 piRNA 情况下,人胰腺癌中 Piwil1 作为一种癌蛋白,通过激活(APC/C) E3 复合体,靶向关键的细胞黏附蛋白 Pinin,促进胰腺癌细胞转移^[117]。

6 结语

脊椎动物 Argonaute 家族的 2 个分支蛋白 Ago 和 Piwi 在结构和功能方面均存在异同。相同之处表现为: Ago 和 Piwi 蛋白均存在 PIWI、MID 等 6 个结构域;均受 sRNA 引导;均通过调控 DNA 甲基化、组蛋白修饰等方式改变染色质状态,进而抑制或激活基因的转录;均可通过剪切或降解与 sRNA 互补配对的 mRNA 来沉默 mRNA。不同之处表现为:(1) Ago 和 Piwi 蛋白结合的 sRNA 不同。siRNA 或 miRNA 以双链的形式结合至 Ago,并在紧密结合过程排出其中一条链,形成成熟的 RISC 复合体;Piwi 蛋白结合更长的单链 piRNA,形成 piRISC 复合体。(2) 表达时间不同。Ago 蛋白几乎在整个生命周期均有表达且成员间功能存在冗余;Piwi 蛋白正常情况下表达于生殖细胞发育的不同时期且成员之间常以非冗余方式发挥同向调控功能。(3) 功能不同。Piwi 蛋白在 piRNA 生成过程扮演重要的剪切角色,同时对转座子特别是新产生的转座子抑制作用强;而 Ago 与 miRNA 或 siRNA 生成无关,且主要调控蛋白编码基因的表达。(4) 影响的生物学功能不同。Ago 蛋白影响的生物学功能更加广泛,如免疫、生殖、发育、癌症;Piwi 蛋白主要影响个体生殖以及癌症。

研究人员已经解析了大量 Ago 和 Piwi 蛋白功能,但仍有许多问题有待研究。首先, Ago 和 Piwi 蛋白对基因表达的调控机制有待进一步解析。为何 Ago1 倾向于结合增强子而 Ago2 倾

向于靶向启动子, Ago 如何实现不同蛋白因子筛选及亚细胞定位, Ago 是否还有其他调控机制,不同的调控机制与 Ago 蛋白结构有怎样的联系;哪些因素调控了 Piwi 蛋白成员表达的时空特点,为何 Piwi 蛋白既可降解 mRNA 又可激活 mRNA 翻译而两者却并不冲突,是否还存在其他调控机制。其次,如何将 Argonaute 的理论研究转化为实际应用。Ago 蛋白对肿瘤发展有明显调控作用,但目前尚未开发出相关的治疗方法;已有文献报道 piRNA-Piwi 复合物与雌性生殖疾病相关^[118], Wang 等^[49]已从男性不育症患者 Piwi 蛋白上鉴定到影响男性生育能力的突变,但要理论知识应用到不孕不育症的检测和治疗仍需进一步努力。最后, Argonaute 研究主要集中于小鼠、黄金地鼠等模式动物和人,其在猪、牛、羊、鸡等经济动物上的调控作用是否与模式动物存在差异,该蛋白家族对其经济性状又有怎样的影响,仍有待进一步探究。

本文系统综述了脊椎动物 Argonaute 的结构、作用机制、生物学功能,以比较的形式分析了 Argonaute 家族成员在表观遗传调控中的不同作用,可为研究 sRNA、Argonaute 蛋白及生产应用提供参考。

REFERENCES

- [1] SASAKI T, SHIOHAMA A, MINOSHIMA S, SHIMIZU N. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome[J]. Genomics, 2003, 82(3): 323-330.
- [2] BOHMERT K, CAMUS I, BELLINI C, BOUCHEZ D, CABOCHE M, BENNING C. AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development[J]. The EMBO Journal, 1998, 17(1): 170-180.
- [3] JIN SJ, ZHAN J, ZHOU YQ. Argonaute proteins: structures and their endonuclease activity[J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(5): 4837-4849.
- [4] KILIKEVICIUS A, MEISTER G, COREY DR.

- Reexamining assumptions about miRNA-guided gene silencing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(2): 617-634.
- [5] GALAGALI H, KIM JK. The multifaceted roles of microRNAs in differentiation[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2020, 67: 118-140.
- [6] TIWARI M, PANDEY V, SINGH B, BHATIA S. Dynamics of miRNA mediated regulation of legume symbiosis[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2021, 44(5): 1279-1291.
- [7] YIGIT E, BATISTA PJ, BEI YX, PANG KM, CHEN CC G, TOLIA NH, JOSHUA-TOR L, MITANI S, SIMARD MJ, MELLO CC. Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi[J]. *Cell*, 2006, 127(4): 747-757.
- [8] LV XL, XIAO W, LAI YN, ZHANG ZZ, ZHANG HD, QIU C, HOU L, CHEN Q, WANG DD, GAO Y, SONG YY, SHUI XJ, CHEN QH, QIN RX, LIANG S, ZENG WT, SHI AM, LI JM, WU LG. The non-redundant functions of PIWI family proteins in gametogenesis in golden hamsters[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 5267.
- [9] ZHANG P, KANG JY, GOU LT, WANG JJ, XUE YC, SKOGERBOE G, DAI P, HUANG DW, CHEN RS, FU XD, LIU MF, HE SM. MIWI and piRNA-mediated cleavage of messenger RNAs in mouse testes[J]. *Cell Research*, 2015, 25(2): 193-207.
- [10] OLINA AV, KULBACHINSKIY AV, ARAVIN AA, ESYUNINA DM. Argonaute proteins and mechanisms of RNA interference in eukaryotes and prokaryotes[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2018, 83(5): 483-497.
- [11] WATCHARANURAK P, MUTIRANGURA A. Human RNA-directed DNA methylation methylates high-mobility group box 1 protein-produced DNA gaps[J]. *Epigenomics*, 2022, 14(12): 741-756.
- [12] NAKANISHI K. Anatomy of four human Argonaute proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(12): 6618-6638.
- [13] SWARTS DC, MAKAROVA K, WANG YL, NAKANISHI K, KETTING RF, KOONIN EV, PATEL DJ, van der OOST J. The evolutionary journey of Argonaute proteins[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2014, 21: 743-753.
- [14] SALA L, CHANDRASEKHAR S, VIDIGAL JA. AGO unchained: canonical and non-canonical roles of Argonaute proteins in mammals[J]. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 2020, 25(1): 1-42.
- [15] LI WQ, LIU Y, HE RY, WANG LY, WANG YP, ZENG WT, ZHANG ZW, WANG F, MA LX. A programmable pAgo nuclease with RNA target preference from the psychrotolerant bacterium *Mucilaginibacter paludis*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(9): 5226-5238.
- [16] WANG LY, XIE XC, LV B, LIU Y, LI WQ, ZHANG ZW, YANG J, YAN GB, CHEN WP, ZHANG C, WANG F, LI CH, MA LX. A bacterial Argonaute with efficient DNA and RNA cleavage activity guided by small DNA and RNA[J]. *Cell Reports*, 2022, 41(4): 111533.
- [17] ZANDER A, WILLKOMM S, OFER S, van WOLFEREN M, EGERT L, BUCHMEIER S, STÖCKL S, TINNEFELD P, SCHNEIDER S, KLINGL A, ALBERS SV, WERNER F, GROHMANN D. Guide-independent DNA cleavage by archaeal Argonaute from *Methanocaldococcus jannaschii*[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17034.
- [18] KOOPAL B, MUTTE SK, SWARTS DC. A long look at short prokaryotic Argonautes[J]. *Trends in Cell Biology*, 2023, 33(7): 605-618.
- [19] SHEN ZF, YANG XY, XIA SY, HUANG W, TAYLOR DJ, NAKANISHI K, FU TM. Oligomerization-mediated activation of a short prokaryotic Argonaute[J]. *Nature*, 2023, 621: 154-161.
- [20] DRINNENBERG IA, WEINBERG DE, XIE KT, MOWER JP, WOLFE KH, FINK GR, BARTEL DP. RNAi in budding yeast[J]. *Science*, 2009, 326(5952): 544-550.
- [21] DUMAN-SCHEEL M. *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) as an interfering RNA expression and delivery system[J]. *Current Drug Targets*, 2019, 20(9): 942-952.
- [22] LEWIS SH, QUARLES KA, YANG YJ, TANGUY M, FRÉZAL L, SMITH SA, SHARMA PP, CORDAUX R, GILBERT C, GIRAUD I, COLLINS DH, ZAMORE PD, MISKA EA, SARKIES P, JIGGINS FM. Pan-arthropod analysis reveals somatic piRNAs as an ancestral defence against transposable elements[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2018, 2: 174-181.
- [23] LINCK-PAULUS L, MEIBGEIER T, PIEGER K, HORN AHC, MATTHIES A, FISCHER S, MEISTER G, STICHT H, KAPPELMANN-FENZL M, BOSSERHOFF AK. A previously unknown Argonaute

- 2 variant positively modulates the viability of melanoma cells[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2022, 79(9): 475.
- [24] KWAK PB, TOMARI Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2012, 19: 145-151.
- [25] MA JB, YUAN YR, MEISTER G, PEI Y, TUSCHL T, PATEL DJ. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein[J]. *Nature*, 2005, 434: 666-670.
- [26] SCHIRLE NT, SHEU-GRUTTADAURIA J, CHANDRADOSS SD, JOO C, MacRAE IJ. Water-mediated recognition of t1-adenosine anchors Argonaute 2 to microRNA targets[J]. *eLife*, 2015, 4: e07646.
- [27] IWAKAWA HO, TOMARI Y. Life of RISC: formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex[J]. *Molecular Cell*, 2022, 82(1): 30-43.
- [28] YUAN YR, PEI Y, MA JB, KURYAVYI V, ZHADINA M, MEISTER G, CHEN HY, DAUTER Z, TUSCHL T, PATEL DJ. Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage[J]. *Molecular Cell*, 2005, 19(3): 405-419.
- [29] KLUM SM, CHANDRADOSS SD, SCHIRLE NT, JOO C, MacRAE IJ. *Helix-7* in Argonaute 2 shapes the microRNA seed region for rapid target recognition[J]. *The EMBO Journal*, 2018, 37(1): 75-88.
- [30] NAKANISHI K, WEINBERG DE, BARTEL DP, PATEL DJ. Structure of yeast Argonaute with guide RNA[J]. *Nature*, 2012, 486: 368-374.
- [31] XIAO Y, LIU TM, MacRAE IJ. A tiny loop in the Argonaute PIWI domain tunes small RNA seed strength[J]. *EMBO Reports*, 2023, 24(6): e55806.
- [32] ZHU LZ, JIANG HL, CAO SQ, UNARTA IC, GAO X, HUANG XH. Critical role of backbone coordination in the mRNA recognition by RNA induced silencing complex[J]. *Communications Biology*, 2021, 4: 1345.
- [33] MATSUMOTO N, NISHIMASU H, SAKAKIBARA K, NISHIDA KM, HIRANO T, ISHITANI R, SIOMI H, SIOMI MC, NUREKI O. Crystal structure of silkworm PIWI-clade argonaute siwi bound to PiRNA[J]. *Cell*, 2016, 167(2): 484-497.e9.
- [34] ANZELON TA, CHOWDHURY S, HUGHES SM, XIAO Y, LANDER GC, MacRAE IJ. Structural basis for piRNA targeting[J]. *Nature*, 2021, 597: 285-289.
- [35] CUI YZ, LYU XH, DING L, KE L, YANG DC, PIROUZ M, QI Y, ONG J, GAO G, DU P, GREGORY RI. Global miRNA dosage control of embryonic germ layer specification[J]. *Nature*, 2021, 593: 602-606.
- [36] LEE YY, KIM H, KIM VN. Sequence determinant of small RNA production by DICER[J]. *Nature*, 2023, 615: 323-330.
- [37] HAFNER M, LANDTHALER M, BURGER L, KHORSHID M, HAUSSER J, BERNINGER P, ROTHBALLER A, ASCANO M Jr, JUNGKAMP AC, MUNSCHAUER M, ULRICH A, WARDLE GS, DEWELL S, ZAVOLAN M, TUSCHL T. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 129-141.
- [38] TURCHINOVICH A, BURWINKEL B. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma[J]. *RNA Biology*, 2012, 9(8): 1066-1075.
- [39] WANG DM, ZHANG ZJ, O'LOUGHLIN E, LEE T, HOUEL S, O'CARROLL D, TARAKHOVSKY A, AHN NG, YI R. Quantitative functions of Argonaute proteins in mammalian development[J]. *Genes & Development*, 2012, 26(7): 693-704.
- [40] JUVVUNA PK, KHANDELIA P, LEE LM, MAKEYEV EV. Argonaute identity defines the length of mature mammalian microRNAs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(14): 6808-6820.
- [41] ZHANG Q, ZHU YZ, CAO XY, TAN WH, YU JL, LU YQ, KANG R, WANG XL, LI EM. The epigenetic regulatory mechanism of PIWI/piRNAs in human cancers[J]. *Molecular Cancer*, 2023, 22(1): 45.
- [42] OZATA DM, GAINETDINOV I, ZOCH A, O'CARROLL D, ZAMORE PD. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2019, 20: 89-108.
- [43] IZUMI N, SHOJI K, SUZUKI Y, KATSUMA S, TOMARI Y. Zucchini consensus motifs determine the mechanism of pre-piRNA production[J]. *Nature*, 2020, 578: 311-316.
- [44] WANG X, RAMAT A, SIMONELIG M, LIU MF. Emerging roles and functional mechanisms of PIWI-interacting RNAs[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, 24: 123-141.
- [45] DING DQ, LIU JL, DONG KZ, MIDIC U, HESS RA, XIE HR, DEMIREVA EY, CHEN C. PNLDC1 is

- essential for PiRNA 3' end trimming and transposon silencing during spermatogenesis in mice[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 819.
- [46] ARAVIN AA, SACHIDANANDAM R, BOURC'HIS D, SCHAEFER C, PEZIC D, TOTH KF, BESTOR T, HANNON GJ. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to *de novo* DNA methylation in mice[J]. *Molecular Cell*, 2008, 31(6): 785-799.
- [47] ROBINE N, LAU NC, BALLA S, JIN ZG, OKAMURA K, KURAMOCHI-MIYAGAWA S, BLOWER MD, LAI EC. A broadly conserved pathway generates 3'UTR-directed primary piRNAs[J]. *Current Biology*, 2009, 19(24): 2066-2076.
- [48] ÖZATA DM, YU TX, MOU HW, GAINETDINOV I, COLPAN C, CECCHINI K, KAYMAZ Y, WU PH, FAN KL, KUCUKURAL A, WENG ZP, ZAMORE PD. Evolutionarily conserved pachytene piRNA loci are highly divergent among modern humans[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2020, 4: 156-168.
- [49] WANG X, LIN DH, YAN Y, WANG AH, LIAO JY, MENG Q, YANG WQ, ZUO H, HUA MM, ZHANG FJ, ZHU HW, ZHOU H, HUANG TY, HE R, LI GY, TAN YQ, SHI HJ, GOU LT, LI DS, WU LG, ZHENG YG, FU XD, LI JS, LIU RJ, LI GH, LIU MF. The PIWI-specific insertion module helps load longer piRNAs for translational activation essential for male fertility[J]. *Science China Life Sciences*, 2023, 66(7): 1459-1481.
- [50] MATZKE MA, MOSHER RA. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15: 394-408.
- [51] CHALERTPET K, PIN-ON P, APORNTIEWAN C, PATCHSUNG M, INGRUNGRUANGLERT P, ISRASENA N, MUTIRANGURA A. Argonaute 4 as an effector protein in RNA-directed DNA methylation in human cells[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 645.
- [52] LI LC, OKINO ST, ZHAO H, POOKOT D, PLACE RF, URAKAMI S, ENOKIDA H, DAHIYA R. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(46): 17337-17342.
- [53] LI HP, FAN JH, ZHAO YR, ZHANG XR, DAI BB, ZHAN JB, YIN ZW, NIE X, FU XD, CHEN C, WANG DW. Nuclear miR-320 mediates diabetes-induced cardiac dysfunction by activating transcription of fatty acid metabolic genes to cause lipotoxicity in the heart[J]. *Circulation Research*, 2019, 125(12): 1106-1120.
- [54] JANOWSKI BA, YOUNGER ST, HARDY DB, RAM R, HUFFMAN KE, COREY DR. Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs[J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3: 166-173.
- [55] MENG X, JIANG Q, CHANG NN, WANG XX, LIU CJ, XIONG JW, CAO HQ, LIANG ZC. Small activating RNA binds to the genomic target site in a seed-region-dependent manner[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(5): 2274-2282.
- [56] PORTNOY V, LIN SHS, LI KH, BURLINGAME A, HU ZH, LI H, LI LC. saRNA-guided Ago2 targets the *RITA* complex to promoters to stimulate transcription[J]. *Cell Research*, 2016, 26(3): 320-335.
- [57] FALLATAH B, SHUAIB M, ADROUB S, PAYTUVÍ-GALLART A, DELLA VALLE F, NADEEF S, LANZUOLO C, ORLANDO V. Ago1 controls myogenic differentiation by regulating eRNA-mediated CBP-guided epigenome reprogramming[J]. *Cell Reports*, 2021, 37(9): 110066.
- [58] SHUAIB M, PARSI KM, THIMMA M, ADROUB SA, KAWAJI H, SERIDI L, GHOSHEH Y, FORT A, FALLATAH B, RAVASI T, CARNINCI P, ORLANDO V. Nuclear AGO1 regulates gene expression by affecting chromatin architecture in human cells[J]. *Cell Systems*, 2019, 9(5): 446-458.e6.
- [59] MÜLLER M, FÄH T, SCHAEFER M, HERMES V, LUITZ J, STALDER P, ARORA R, NGONDO RP, CIAUDO C. AGO1 regulates pericentromeric regions in mouse embryonic stem cells[J]. *Life Science Alliance*, 2022, 5(6): e202101277.
- [60] NAZER E, DALE RK, CHINEN M, RADMANESH B, LEI EP. Argonaute2 and LaminB modulate gene expression by controlling chromatin topology[J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(3): e1007276.
- [61] LIU JD, CARMELL MA, RIVAS FV, MARSDEN CG, THOMSON JM, SONG JJ, HAMMOND SM, JOSHUA-TOR L, HANNON GJ. Argonaute 2 is the catalytic engine of mammalian RNAi[J]. *Science*, 2004, 305(5689): 1437-1441.
- [62] PARK MS, SIM G, KEHLING AC, NAKANISHI K. Human Argonaute2 and Argonaute3 are catalytically

- activated by different lengths of guide RNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(46): 28576-28578.
- [63] FABIAN MR, CIEPLAK MK, FRANK F, MORITA M, GREEN J, SRIKUMAR T, NAGAR B, YAMAMOTO T, RAUGHT B, DUCHAINE TF, SONENBERG N. miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2011, 18: 1211-1217.
- [64] WAKIYAMA M, TAKIMOTO K. N-terminal Ago-binding domain of GW182 contains a tryptophan-rich region that confer binding to the CCR4-NOT complex[J]. Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms, 2022, 27(9): 579-585.
- [65] NISHIHARA T, ZEKRI L, BRAUN JE, IZAURRALDE E. miRISC recruits decapping factors to miRNA targets to enhance their degradation[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(18): 8692-8705.
- [66] WILCZYNSKA A, BUSHELL M. The complexity of miRNA-mediated repression[J]. Cell Death and Differentiation, 2015, 22(1): 22-33.
- [67] SARSHAD AA, JUAN AH, MULER AIC, ANASTASAKIS DG, WANG XT, GENZOR P, FENG XS, TSAI PF, SUN HW, HAASE AD, SARTORELLI V, HAFNER M. Argonaute-miRNA complexes silence target mRNAs in the nucleus of mammalian stem cells[J]. Molecular Cell, 2018, 71(6): 1040-1050.e8.
- [68] Di FAZIO A, SCHLACKOW M, PONG SK, ALAGIA A, GULLEROVA M. Dicer dependent tRNA derived small RNAs promote nascent RNA silencing[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(3): 1734-1752.
- [69] CHERAY M, ETCHEVERRY A, JACQUES C, PACAUD R, BOUGRAS-CARTRON G, AUBRY M, DENOUAL F, PETERLONGO P, NADARADJANE A, BRIAND J, AKCHA F, HEYMANN D, VALLETTE FM, MOSSER J, ORY B, CARTRON PF. Cytosine methylation of mature microRNAs inhibits their functions and is associated with poor prognosis in glioblastoma multiforme[J]. Molecular Cancer, 2020, 19(1): 36.
- [70] CHU YJ, YOKOTA S, LIU J, KILIKEVICIUS A, JOHNSON KC, COREY DR. Argonaute binding within human nuclear RNA and its impact on alternative splicing[J]. RNA, 2021, 27(9): 991-1003.
- [71] 宫梦婷. miRNAs 在核内通过 AGO₂-hnRNP U 相互作用介导 RNA 干扰与 RNA 剪接[D]. 长沙: 湖南师范大学博士学位论文, 2020.
- GONG MT. miRNAs mediate the cross-talk of RNA interference and RNA splicing by facilitating the formation of AGO₂-hnRNP U complex in the nuclei[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Hunan Normal University, 2020 (in Chinese)
- [72] AMEYAR-ZAZOUA M, RACHEZ C, SOUIDI M, ROBIN P, FRITSCH L, YOUNG R, MOROZOVA N, FENOUIL R, DESCOSTES N, ANDRAU JC, MATHIEU J, HAMICHE A, AIT-SI-ALI S, MUCHARDT C, BATSCHÉ E, HAREL-BELLAN A. Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing[J]. Nature structural & molecular biology, 2012, 19(10): 998-1004.
- [73] WICKER T, SABOT F, HUA-VAN A, BENNETZEN JL, CAPY P, CHALHOUB B, FLAVELL A, LEROY P, MORGANTE M, PANAUD O, PAUX E, SanMIGUEL P, SCHULMAN AH. A unified classification system for eukaryotic transposable elements[J]. Nature Reviews Genetics, 2007, 8: 973-982.
- [74] IWASAKI YW, MURANO K, ISHIZU H, SHIBUYA A, IYODA Y, SIOMI MC, SIOMI H, SAITO K. Piwi modulates chromatin accessibility by regulating multiple factors including histone H1 to repress transposons[J]. Molecular Cell, 2016, 63(3): 408-419.
- [75] SIENSKI G, DÖNERTAS D, BRENNECKE J. Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression[J]. Cell, 2012, 151(5): 964-980.
- [76] PEZIC D, MANAKOV SA, SACHIDANANDAM R, ARAVIN AA. PiRNA pathway targets active LINE1 elements to establish the repressive H3K9me3 mark in germ cells[J]. Genes & Development, 2014, 28(13): 1410-1428.
- [77] MAHADEVAN IA, KUMAR S, RAO MRS. Linker histone variant H1t is closely associated with repressed repeat-element chromatin domains in pachytene spermatocytes[J]. Epigenetics & Chromatin, 2020, 13(1): 9.
- [78] MOLARO A, FALCIATORI I, HODGES E, ARAVIN AA, MARRAN K, RAFII S, McCOMBIE WR, SMITH AD, HANNON GJ. Two waves of *de novo* methylation during mouse germ cell development[J]. Genes & Development, 2014, 28(14): 1544-1549.

- [79] de FAZIO S, BARTONICEK N, Di GIACOMO M, ABREU-GOODGER C, SANKAR A, FUNAYA C, ANTONY C, MOREIRA PN, ENRIGHT AJ, O'CARROLL D. The endonuclease activity of Mili fuels PiRNA amplification that silences LINE1 elements[J]. *Nature*, 2011, 480: 259-263.
- [80] MANAKOV SA, PEZIC D, MARINOV GK, PASTOR WA, SACHIDANANDAM R, ARAVIN AA. MIWI₂ and MILI have differential effects on PiRNA biogenesis and DNA methylation[J]. *Cell Reports*, 2015, 12(8): 1234-1243.
- [81] ZOCH A, AUCHYNNIKAVA T, BERRENS RV, KABAYAMA Y, SCHÖPP T, HEEP M, VASILIAUSKAITĖ L, PÉREZ-RICO YA, COOK AG, SHKUMATAVA A, RAPPSILBER J, ALLSHIRE RC, O'CARROLL D. SPOCD1 is an essential executor of piRNA-directed *de novo* DNA methylation[J]. *Nature*, 2020, 584: 635-639.
- [82] WU PH, FU Y, CECCHINI K, ÖZATA DM, ARIF A, YU TX, COLPAN C, GAINETDINOV I, WENG ZP, ZAMORE PD. The evolutionarily conserved piRNA-producing locus Pi6 is required for male mouse fertility[J]. *Nature Genetics*, 2020, 52: 728-739.
- [83] GOU LT, DAI P, YANG JH, XUE YC, HU YP, ZHOU Y, KANG JY, WANG X, LI HR, HUA MM, ZHAO S, HU SD, WU LG, SHI HJ, LI Y, FU XD, QU LH, WANG ED, LIU MF. Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis[J]. *Cell Research*, 2015, 25(2): 266.
- [84] GAINETDINOV I, VEGA-BADILLO J, CECCHINI K, BAGCI A, COLPAN C, DE D, BAILEY S, ARIF A, WU PH, MacRAE IJ, ZAMORE PD. Relaxed targeting rules help PIWI proteins silence transposons[J]. *Nature*, 2023, 619: 394-402.
- [85] MA X, ZHU XJ, HAN YY, STORY B, DO T, SONG XQ, WANG S, ZHANG Y, BLANCHETTE M, GOGOL M, HALL K, PEAK A, ANOJA P, XIE T. Aubergine controls germline stem cell self-renewal and progeny differentiation *via* distinct mechanisms[J]. *Developmental Cell*, 2017, 41(2): 157-169.e5.
- [86] DAI P, WANG X, GOU LT, LI ZT, WEN Z, CHEN ZG, HUA MM, ZHONG A, WANG LB, SU HY, WAN HD, QIAN K, LIAO LJ, LI JS, TIAN B, LI DS, FU XD, SHI HJ, ZHOU Y, LIU MF. A translation-activating function of MIWI/piRNA during mouse spermiogenesis[J]. *Cell*, 2019, 179(7): 1566-1581.e16.
- [87] KANG JY, WEN Z, PAN D, ZHANG YH, LI Q, ZHONG A, YU XH, WU YC, CHEN Y, ZHANG XZ, KOU PC, GENG JL, WANG YY, HUA MM, ZONG RT, LI B, SHI HJ, LI DS, FU XD, LI JS, NELSON DL, GUO XJ, ZHOU Y, GOU LT, HUANG Y, LIU MF. LLPS of FXR1 drives spermiogenesis by activating translation of stored mRNAs[J]. *Science*, 2022, 377(6607): eabj6647.
- [88] 申东亮, 李用芳. 病毒 siRNA 介导的 RNA 干扰途径与机制[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(4): 1237-1248.
- SHEN DL, LI YF. Pathways and mechanisms of RNA interference mediated by viral siRNA[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(4): 1237-1248 (in Chinese).
- [89] van der VEEN AG, MAILLARD PV, SCHMIDT JM, LEE SA, DEDDOUCHE-GRASS S, BORG A, KJÆR S, SNIJDERS AP, REIS E SOUSA C. The RIG-I-like receptor LGP2 inhibits Dicer-dependent processing of long double-stranded RNA and blocks RNA interference in mammalian cells[J]. *The EMBO Journal*, 2018, 37(4): e97479.
- [90] LIN J, CULLEN BR. Analysis of the interaction of primate retroviruses with the human RNA interference machinery[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(22): 12218-12226.
- [91] MAILLARD PV, van der VEEN AG, DEDDOUCHE-GRASS S, ROGERS NC, MERITS A, REIS E SOUSA C. Inactivation of the type I interferon pathway reveals long double-stranded RNA-mediated RNA interference in mammalian cells[J]. *The EMBO Journal*, 2016, 35(23): 2505-2518.
- [92] QIU Y, XU YP, ZHANG Y, ZHOU H, DENG YQ, LI XF, MIAO M, ZHANG Q, ZHONG B, HU YY, ZHANG FC, WU LG, QIN CF, ZHOU X. Human virus-derived small RNAs can confer antiviral immunity in mammals[J]. *Immunity*, 2017, 46(6): 992-1004.e5.
- [93] KUMAR A, ISHIDA R, STRILETS T, COLE J, LOPEZ-OROZCO J, FAYAD N, FELIX-LOPEZ A, ELAISH M, EVSEEV D, MAGOR KE, MAHAL LK, NAGATA LP, EVANS DH, HOBMAN TC. SARS-CoV-2 nonstructural protein 1 inhibits the interferon response by causing depletion of key host signaling factors[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(13): e0026621.
- [94] LOPEZ-OROZCO J, FAYAD N, KHAN JQ,

- FELIX-LOPEZ A, ELAISH M, ROHAMARE M, SHARMA M, FALZARANO D, PELLETIER J, WILSON J, HOBMAN TC, KUMAR A. The RNA interference effector protein argonaute 2 functions as a restriction factor against SARS-CoV-2[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2023, 435(16): 168170.
- [95] POIRIER EZ, BUCK MD, CHAKRAVARTY P, CARVALHO J, FREDERICO B, CARDOSO A, HEALY L, ULFERTS R, BEALE R, SOUSA CRE. An isoform of Dicer protects mammalian stem cells against multiple RNA viruses[J]. *Science*, 2021, 373(6551): 231-236.
- [96] YAMANAKA S, SIOMI H. diRNA-Ago2-RAD51 complexes at double-strand break sites[J]. *Cell Research*, 2014, 24(5): 511-512.
- [97] WEI W, BA ZQ, GAO M, WU Y, MA YT, AMIARD S, WHITE CI, RENDTLEW DANIELSEN JM, YANG YG, QI YJ. A role for small RNAs in DNA double-strand break repair[J]. *Cell*, 2012, 149(1): 101-112.
- [98] GAO M, WEI W, LI MM, WU YS, BA ZQ, JIN KX, LI MM, LIAO YQ, ADHIKARI S, CHONG ZC, ZHANG T, GUO CX, TANG TS, ZHU BT, XU XZ, MAILAND N, YANG YG, QI YJ, RENDTLEW DANIELSEN JM. Ago2 facilitates Rad51 recruitment and DNA double-strand break repair by homologous recombination[J]. *Cell Research*, 2014, 24(5): 532-541.
- [99] HU XL, LI Y, ZHANG TF, LI L, CHEN S, WU XH, LI HJ, QI BJ, CHEN ZB. Phosphorylation of Ago2 is required for its role in DNA double-strand break repair[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2021, 48(4): 333-340.
- [100] CHANG AT, LIU L, ASHBY JM, WU D, CHEN YN, O'NEILL SS, HUANG S, WANG J, WANG GW, CHENG DM, TAN XM, PETTY WJ, PASCHE BC, XIANG R, ZHANG W, SUN PQ. Recruitment of KMT2C/MLL3 to DNA damage sites mediates DNA damage responses and regulates PARP inhibitor sensitivity in cancer[J]. *Cancer Research*, 2021, 81(12): 3358-3373.
- [101] MODZELEWSKI AJ, HOLMES RJ, HILZ S, GRIMSON A, COHEN PE. AGO4 regulates entry into meiosis and influences silencing of sex chromosomes in the male mouse germline[J]. *Developmental Cell*, 2012, 23(2): 251-264.
- [102] GRIFFIN KN, WALTERS BW, LI HX, WANG HF, BIANCON G, TEBALDI T, KAYA CB, KANYO J, LAM TT, COX AL, HALENE S, CHUNG JJ, LESCH BJ. Widespread association of the Argonaute protein AGO2 with meiotic chromatin suggests a distinct nuclear function in mammalian male reproduction[J]. *Genome Research*, 2022, 32(9): 1655-1668.
- [103] REUTER M, BERNINGER P, CHUMA S, SHAH H, HOSOKAWA M, FUNAYA C, ANTONY C, SACHIDANANDAM R, PILLAI RS. Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing[J]. *Nature*, 2011, 480: 264-267.
- [104] MÜLLER M, FAZI F, CIAUDO C. Argonaute proteins: from structure to function in development and pathological cell fate determination[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2019, 7: 360.
- [105] ALISCH RS, JIN P, EPSTEIN M, CASPARY T, WARREN ST. Argonaute2 is essential for mammalian gastrulation and proper mesoderm formation[J]. *PLoS Genetics*, 2007, 3(12): e227.
- [106] NGONDO RP, CIRERA-SALINAS D, YU J, WISCHNEWSKI H, BODAK M, VANDORMAEL-POURNIN S, GEISELMANN A, WETTSTEIN R, LUITZ J, COHEN-TANNOUJJI M, CIAUDO C. Argonaute 2 is required for extra-embryonic endoderm differentiation of mouse embryonic stem cells[J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(2): 461-476.
- [107] ZHANG JM, HOU WB, DU JW, ZONG M, ZHENG KL, WANG WJ, WANG JQ, ZHANG H, MU YS, YIN Z, DING CM, SUN QY, LIU ZH, KONG QR. Argonaute 2 is a key regulator of maternal mRNA degradation in mouse early embryos[J]. *Cell Death Discovery*, 2020, 6: 133.
- [108] LESSEL D, ZEITLER DM, REIJNDERS MRF, KAZANTSEV A, HASSANI NIA F, BARTHOLOMÄUS A, MARTENS V, BRUCKMANN A, GRAUS V, MCCONKIE-ROSELL A, McDONALD M, LOZIC B, TAN ES, GERKES E, JOHANNSEN J, DENECKE J, TELEGRAFI A, ZONNEVELD-HUIJSSOON E, LEMMINK HH, et al. Germline AGO2 mutations impair RNA interference and human neurological development[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5797.
- [109] TOKITA MJ, CHOW PM, MIRZAA G, DIKOW N, MAAS B, ISIDOR B, Le CAIGNEC C, PENNEY LS, MAZZOTTA G, BERNARDINI L, FILIPPI T, BATTAGLIA A, DONTI E, EARL D, PRONTERA P.

- Five children with deletions of 1p34.3 encompassing AGO1 and AGO3[J]. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 2015, 23(6): 761-765.
- [110] SCHALK A, COUSIN MA, DSOUZA NR, CHALLMAN TD, WAIN KE, POWIS Z, MINKS K, TRIMOUILLE A, LASSEAUX E, LACOMBE D, ANGELINI C, MICHAUD V, VAN-GILS J, SPATARO N, RUIZ A, GABAU E, STOLERMAN E, WASHINGTON C, LOUIE R, LANPHER BC, et al. *De novo* coding variants in the *AGO1* gene cause a neurodevelopmental disorder with intellectual disability[J]. *Journal of Medical Genetics*, 2022, 59(10): 965-975.
- [111] TIEN JCY, CHUGH S, GOODRUM AE, CHENG YH, MANNAN R, ZHANG YP, WANG LS, DOMMETI VL, WANG XM, XU A, HON J, KENUM C, SU FY, WANG R, CAO XH, SHANKAR S, CHINNAIYAN AM. AGO2 promotes tumor progression in KRAS-driven mouse models of non-small cell lung cancer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(20): e2026104118.
- [112] SHANKAR S, TIEN JCY, SIEBENALER RF, CHUGH S, DOMMETI VL, ZELENKA-WANG S, WANG XM, APEL IJ, WANINGER J, EYUNNI S, XU A, MODY M, GOODRUM A, ZHANG YP, TESMER JJ, MANNAN R, CAO XH, VATS P, PITCHIAYA S, ELLISON SJ, et al. An essential role for Argonaute 2 in EGFR-KRAS signaling in pancreatic cancer development[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2817.
- [113] ZAYTSEVA O, MITCHELL NC, GUO LN, MARSHALL OJ, PARSONS LM, HANNAN RD, LEVENS DL, QUINN LM. Transcriptional repression of Myc underlies the tumour suppressor function of AGO1 in *Drosophila*[J]. *Development*, 2020, 147(11): dev190231.
- [114] LI ZY, ZHAO S, ZHU SQ, FAN YD. MicroRNA-153-5p promotes the proliferation and metastasis of renal cell carcinoma *via* direct targeting of AGO1[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12: 33.
- [115] WANG L, LI D, SU XT, ZHAO YC, HUANG AX, LI H, LI J, XIA W, JIA TQ, ZHANG HW, DONG J, LIU XM, SHAO NS. AGO4 suppresses tumor growth by modulating autophagy and apoptosis *via* enhancing TRIM21-mediated ubiquitination of GRP78 in a p53-independent manner[J]. *Oncogene*, 2023, 42: 62-77.
- [116] WANG N, TAN HY, LU YJ, CHAN YT, WANG D, GUO W, XU Y, ZHANG C, CHEN FY, TANG GY, FENG YB. PIWIL1 governs the crosstalk of cancer cell metabolism and immunosuppressive microenvironment in hepatocellular carcinoma[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6: 86.
- [117] LI F, YUAN P, RAO M, JIN CH, TANG W, RONG YF, HU YP, ZHANG FJ, WEI T, YIN Q, LIANG TB, WU LG, LI JS, LI DS, LIU YB, LOU WH, ZHAO S, LIU MF. piRNA-independent function of PIWIL1 as a co-activator for anaphase promoting complex/cyclosome to drive pancreatic cancer metastasis[J]. *Nature Cell Biology*, 2020, 22: 425-438.
- [118] LI Y, LIANG ZJ, LIANG ZK, YANG X, XIA HY, YU H. Abnormal PIWI-interacting RNA profile and its association with the deformed extracellular matrix of oocytes from recurrent oocyte maturation arrest patients[J]. *Fertility and Sterility*, 2021, 115(5): 1318-1326.

(本文责编 郝丽芳)