

piRNA-REITIN MERKITYS MIESTEN SUKUSOLUJEN ERILAISTUMISESSA JA TOIMINNASSA

Riikka Palimo

Luonnontieteiden kandidaatin tutkielma

Turun yliopisto

Biolääketieteen koulutusohjelma

Lääketieteellinen tiedekunta

Biolääketieteen laitos

24.6.2025

TIIVISTELMÄ

Miesten lisääntymisterveyden tutkimukset ovat osoittaneet miesten lisääntymiskyvyn olleen laskussa jo vuosikymmenten ajan. Kun tarkastellaan suomalaisten miesten tilannetta, voidaan todeta, että jo pelkästään siemennesteen siittiömäärän perusteella puolella miehistä lisääntymiskyky on alentunut. Tämä näkyy myös THL:n tilastoissa hedelmöityshoitojen määrästä Suomessa. Tilastot osoittavat hedelmöityshoitojen määrän kasvaneen tasaisesti vuodesta 2001 saakka.

Spermatogeneesi on tarkoin säädelty prosessi, jonka tavoitteena on tuottaa hedelmöityskykyisiä siittiöitä. Spermatogeneesi voidaan jakaa karkeasti kolmeen vaiheeseen: mitoottiseen vaiheeseen, meioottiseen vaiheeseen ja haploidien solujen erilaistumisvaiheeseen. Erilaistumisen aikana solujen kromatiini pakataan tiiviisti, suurin osa sytoplasmasta poistetaan ja niiden morfologia muuttuu radikaalisti. Spermatogeenin jälkeen siittiöt siirtyvät kiveksistä kypsyään lisäkiveksiin, joissa ne kehittyvät liikkumiskykyisiksi ja käyvät läpi muutoksia niin RNA- kuin proteiinitasolla.

piRNA:t ovat pieniä ei-koodaavia RNA-molekyylejä, joiden toiminnan on osoitettu olevan välttämätön osa siittiöiden kypsyamisprosessia. Myös piRNA:t voidaan jaotella kolmeen tyyppiin: fetaali-, prepakyteeni- sekä pakyteeni-piRNA:ihin, jotka ilmentyvät sukusolujen erilaistumisen eri vaiheissa. piRNA:t osallistuvat geenien ilmentymisen säätelyyn sitoutumalla sukusoluspesifisiin PIWI-proteiineihin. Interaktio piRNA:iden ja PIWI-proteiinien välillä mahdollistaa piRNA:iden toiminnan sukusoluissa. piRNA:iden toimintamekanismit ovat moninaisia eikä niitä vielä tunneta tarkkaan. Tärkein tunnettu piRNA:iden toimintamekanismi on fetaali-piRNA:iden aikaan saama transposonien hiljentäminen epigeneettisen uudelleenohjelmoinnin aikana alkion sukusoluissa. Toisaalta piRNA:iden tiedetään myös osallistuvan lähetti-RNA:iden säätelyyn ja sitä kautta vaikuttavan solujen proteiinisynteesiin

Vaikka piRNA:iden kaikki toimintamekanismit eivät ole toistaiseksi selvillä, on kuitenkin selvää, että häiriöt piRNA:iden toiminnassa johtavat spermatogeenin pysähtymiseen. Spermatogeenin pysähtyminen puolestaan johtaa hedelmättömyyteen sukusolujen erilaistumisen estyessä. piRNA-biogeneesin häiriöt aiheutuvat piRNA-reitin kannalta oleellisinten geenien mutatoituessa. Nämä geenit koodaavat mm. PIWI-proteiineja, TDRD-proteiineja sekä muita piRNA-reitin proteiineja. Ihmisten hedelmättömyyden taustalta on löydetty erinäisiä häiriöitä piRNA-reitin toiminnassa. Nämä häiriöt on yhdistetty mm. atsoospermiaan, eli kypsien siittiöiden puuttumiseen siemennesteessä, sekä siittiöiden puutteelliseen liikkumiskykyyn.

piRNA-reitti ja sen toiminta ovat merkityksellisiä tutkimuskohteita miesten lisääntymisterveyteen ja hedelmättömyyteen liittyvissä tutkimuksissa. piRNA-reitin toiminnan tunteminen auttaa ymmärtämään hedelmättömyyden syitä, ja toisaalta tieto sen toiminnasta avaa myös mahdollisuuksia diagnostisten työkalujen ja hoitojen kehittämiseksi.

Asiasanat: spermatogeneesi, siittiö, piRNA, lisääntymisterveys

LYHENNELUETTELO

A-MYB	A-MYB-transkriptiotekijä (eng. MYB Proto-Oncogene Like 1)
DDX4	eng. ATP-dependent RNA helicase DDX4
GASZ	eng. Ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper domain-containing protein 1
HENMT1	HEN-metyylitransferaasi I (eng. HEN Methyltransferase 1)
IMC	eng. intermitochondrial cement
MOV10L1	eng. RNA helicase Mov10l1
mRNA	lähetti-RNA (eng. messenger RNA)
PGC	primaarinen siittön kantasolu (eng. primordial germ cell)
piRNA	piwi-interaktoiva RNA (eng. piwi-interacting RNA)
PIWI	eng. Piwi Like RNA-Mediated Gene Silencing
PLD6	eng. Phospholipase D Family Member 6
PNLDC1	eng. PARN Like Ribonuclease Domain Containing Exonuclease 1
TDRD	eng. Tudor domain-containing protein
THL	Terveysten ja hyvinvoinnin laitos
UAP56	eng. ATP-dependent RNA helicase UAP56
WHO	Maailman terveysjärjestö (eng. World Health Organization)

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO.....	5
2 LYHYT KATSAUS SPERMATOGENEESIIN	6
2.1 Sukusolujen muodostuminen alkion kehityksen aikana.....	6
2.2 Mitoottinen ja meioottinen vaihe	7
2.3 Spermiogeneesi.....	7
2.4 Lisäkivesten rooli siittiöiden erilaistumisessa	8
3 piRNA:IDEN TUOTANTO JA TOIMINTA.....	9
3.1 piRNA:iden ilmentyminen sukusolujen kehityksen aikana.....	9
3.2 piRNA-biogeneesi.....	11
3.3 piRNA:iden toiminta.....	12
3.3.1 Fetaali-piRNA:t.....	13
3.3.2 Prepakyteeni-piRNA:t	13
3.3.3 Pakyteeni-piRNA:t	14
3.4 piRNA:t ja sukusolugranulat	15
4 piRNA BIOGENEESIN HÄIRIÖT JA VAIKUTUKSET LISÄÄNTYMISTERVEYTEEN	15
4.1. Häiriöt PIWI-perheen proteiineissa.....	16
4.2. Häiriöt TDRD-perheen proteiineissa.....	16
4.3. Häiriöt muissa piRNA-reitin proteiineissa	17
4.4. piRNA-reitin häiriöt ihmisillä.....	18
5 YHTEENVETO.....	19

1 JOHDANTO

Tuoreet tutkimukset osoittavat suomalaisten miesten siemennesteen laadun olevan laskussa. Miesten sukusolujen ja siemennesteen laadulla on merkittävä rooli hedelmättömyydessä. Vuonna 2019 tehdyn tutkimuksen mukaan 25% prosenttia suomalaisista miehistä ei täytä maailman terveystajärjestö WHO:n (eng. World Health Organization) kriteerejä, mitä tulee normaaliin siemennesteen laatuun. (1) Kun tarkastellaan suomalaisten miesten siittiöiden määrää siemennesteessä, tämän perusteella jo puolella miehistä on alentumaa lisääntymiskyvyssä. (2)

Ongelmat suomalaisten heikentyneessä hedelmällisyydessä näkyvät myös terveydenhuollon datassa, jossa hedelmöityshoitojen määrä on ollut nousussa aina vuodesta 2001 saakka. Vuonna 2022 hedelmöityshoitoja aloitettiin Suomessa julkiselle sektorilla 14 650 kappaletta. (3) Kun tarkastellaan miehien osuutta hedelmättömyystapauksissa, on todettu, että 50% tapauksista hedelmättömyys johtuu ainakin osittain miehen siittiöiden ja/tai siemennesteen laadusta. (4)

Jotta hedelmättömyyttä voidaan ymmärtää, ennaltaehkäistä ja hoitaa, tulee ymmärtää, miten sukusolut kehittyvät, erilaistuvat ja toimivat normaalitilassa. Miehen sukusolut tuotetaan spermatogeneesiksi kutsutussa prosessissa, joka käynnistyy murrosiän alkaessa. (5) Spermatogeneesin aikana kiveksien kantasoluista kehittyy kypsiä siittiöitä, joiden kypsyminen jatkuu kiveksistä vapautumisen jälkeen vielä lisäkiveksissä. (6–8)

Piwi-interaktoivat RNA-molekyylit, eli piRNA:t, ovat 21-35 nukleotidiä pitkiä pieniä ei-koodaavia sukusoluspesifisiä RNA-molekyylejä. piRNA:iden toiminnan on osoitettu olevan välttämätön osa normaalia miesten sukusolujen erilaistumista ja toimintaa. (9–13) piRNA:iden biogeneesi ja normaalitoiminta on riippuvaista useista eri proteiineista, kuten PIWI-proteiineista (eng. Piwi Like RNA-Mediated Gene Silencing) (14,15), TDRD-perheen (eng. Tudor domain-containing protein) proteiineista (16–21) sekä muista piRNA-reitin toimintaan osallistuvista proteiineista. (22–26). Häiriöt piRNA:iden biogeneesin ja toiminnan osalta johtavat tyypillisesti steriiliyteen. (14–26) piRNA-reitin häiriöiden on todettu vaikuttavan malliorganismien lisäksi myös ihmisten lisääntymisterveyteen ja sukusolujen kehitykseen. (27–30)

Tässä kandidaatin tutkielmassa perehdytään piRNA-reitin toimintaan sekä rooliin osana miesten sukusolujen erilaistumista ja toimintaa. Tutkielmassa spermatogeneesiä sekä piRNA-reitin toimintaa on tarkasteltu pääosin hiirimalleista saatujen tietojen perusteella, ellei toisin mainita. Normaalitilan lisäksi tutkielma paneutuu tunnettuihin piRNA-reitin häiriöihin niin hiirimalleissa kuin ihmislöydöksissä.

2 LYHYT KATSAUS SPERMATOGENEESIIN

Spermatogeneesi on tarkkaan kontrolloitu prosessi, jonka aikana siittiöiden kantasoluista kehittyy kiveksissä kypsiä siittiöitä. Spermatogeneesi voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen: mitoottiseen vaiheeseen, meioottiseen vaiheeseen sekä spermiogeneesiin. (6,7) Spermiogeneesin aikana haploidit pyöreät spermatidit käyvät läpi morfologisen muutoksen, jonka jälkeen ne vapautetaan siementiehyisiin kypsinä siittiöinä. (7)

Spermatogeneesi tapahtuu kiveksien siementiehyissä. Siementiehyet sisältävät spermatogeneesiä tukevia Sertolin soluja, jotka luovat siittiöiden kehitykselle otollisen mikroympäristön, ja ovat ainoa somaattinen solutyyppe siementiehyiden epiteelikerroksessa. Siementiehyet sisältävät lisäksi eri kehitysvaiheiden sukusoluja sekä niiden kantasoluja. (7,31,32) Siittiöiden kantasolut voivat jakautua joko erilaistuviksi spermatogonioiksi tai uusiksi kantasoluiksi, mikä ylläpitää kiveksien kantasolubarastoja. (7,33) Siittiöiden kantasolujen jatkuva jakautuminen sekä erilaistuminen mahdollistavat siittiöiden tuotannon läpi koko yksilön elämän. (34) Siementiehyitä ympäröi tukikudos, joka koostuu veri- ja imusuonista, makrofageista sekä Leydigin soluista. Leydigin solut tuottavat testosteronia sekä kasvutekijöitä, jotka ovat välttämätön osa spermatogeneesiä. (7,31)

Spermatogeneesin jälkeen siittiöt siirtyvät jatkamaan kypsymistä lisäkiveksiin, jossa ne saavuttavat täyden toimintakykynsä. Lisäkiveksissä siittiöt kypsyvät liikkumiskykyisiksi, minkä lisäksi niissä tapahtuu useita modifikaatioita, jotka mahdollistavat siittiöiden hedelmöittämiskyvyn. (7,8)

2.1 Sukusolujen muodostuminen alkion kehityksen aikana

Primaarisia siittiöiden kantasoluja (eng. primordial germ cells, PGC) voidaan havaita kuusipäiväisen alkion epiblastikerroksesta. Päätös erilaistua sukusoluiksi tapahtuu solujen sijaitessa epiblastissa. Solujen siirtyessä sukupuolirauhaselle niiden plastisiteetti vähenee sekä sukusoluidentiteetti kasvaa. (5) PGC:t vaeltavat kehittyvässä alkiossa paikoilleen sukupuoliharjanteelle, jossa ne vuorovaikuttavat alkion Sertolin solujen, myeloidisolujen sekä Leydigin solujen kanssa. Kun PGC:t saapuvat sukupuoliharjanteelle, alkion sukupuolen määrittäminen on päättynyt. PGC:t jakautuvat mitoottisesti alkion kiveksissä prospermatogonioiksi. (5,33) Solupopulaation kasvattamisen jälkeen prospermatogoniat pysäyttävät jakautumisen, kunnes ne jakautuvat syntymän jälkeen mitoottisesti spermatogonioiksi ja sukusolujen erilaistuminen käynnistyy. (5)

Epigeneettisen uudelleenohjelmoinnin on osoitettu olevan tärkeä osa PGC:iden sukusoluidentiteetin muodostumisesta ja onnistunutta erilaistumista. (35) Solujen uudelleenohjelmointi tapahtuu ennen jakautumista spermatogonioiksi. Epigeneettisen uudelleenohjelmoinnin aikana solujen DNA:n metylaatiot puretaan, minkä jälkeen DNA voidaan uudelleenmetyloidä. (6,35) DNA:n metylaatioissa

DNA:n metyylitransferaasi liittyy metyyliryhmän DNA:n sytosiiniemäkseen, mikä saa aikaan geenin luennan hiljentymisen. (36) Ennen epigeneettistä uudelleenohjelmointia PGC:t vastaavat epigeneettiseltä profiililtaan somaattisia soluja. PGC:iden epigeneettisen uudelleenohjelmoinnin seurauksena kehittyvät sukusolut saavat sukusoluille ominaisen epigeneettisen profiilin. (37)

2.2 Mittoottinen ja meioottinen vaihe

Spermatogeneesi käynnistyy murrosiässä, jolloin spermatogonioiden erilaistuminen kohti kypsää, hedelmöittämiskykyistä siittiötä, alkaa. Spermatogoneesin mittoottisessa vaiheessa kehittyvät siittiöt käyvät läpi useita solujakoja. Tyypin A spermatogoniat, jotka ovat sitoutuneita siirtymään meioottiseen erilaistumisohjelmaan (5), jakautuvat mittoottisesti vaiheiden A₁-A₄ läpi. Osa tyypin A₄ spermatogonioista jakautuu välimuotoisiksi spermatogonioiksi, jotka puolestaan jakautuvat muodostaen tyypin B spermatogonioita. Tyypin B spermatogoniat jakautuvat kerran mittoottisesti erilaistuen primaareiksi spermatosyyteiksi, jotka aloittavat meioottisen vaiheen. (31)

Meioosin ensimmäinen vaihe, vähennysjako, alkaa profaasilla, joka jaetaan preleptoteeni-, leptoteeni-, tsygoteeni-, pakyteeni- ja diploteenivaiheisiin. Preleptoteenivaiheessa DNA:n replikaatio saa aikaan jokaisen kromosomin kahdentumisen kahdeksi identtiseksi kromatidiksi. Leptoteenivaiheessa homologiset kromosomit alkavat pariutua ja tsygoteenivaiheessa ne aloittavat synaptonemaalisen kompleksin sekä kromosomien välisen synapsin muodostamisen. Pakyteenivaiheessa synaptonemaalinen kompleksi ja synapsi ovat täysin muodostuneet, jolloin kromosomit aloittavat tekijäinvaihdon. Tekijäinvaihdossa toisiinsa kiinnittyneet kromosomit vaihtavat geneettistä materiaalia keskenään mahdollistaen laajemman geneettisen vaihtelun yksilöiden välillä. Diploteenivaiheessa synaptonemaalinen kompleksi hajoaa ja kromosomien välinen kiasma on valmis tekijäinvaihdon tultua päätökseen. Kiasma on kromosomien välinen risteämiskohta, jonka kohdalla homologiset kromosomit ovat vaihtaa geneettistä materiaalia keskenään. Kiasmat pitävät homologiset kromosomit kiinni toisissaan meioosin vähennysjaon aikana. (38)

Meioosin vähennysjaon metafasiin aikana kromosomien väliset kiasmat hajoavat ja anafasiin aikana homologiset kromosomit erkanevat toisistaan. (38) Meioosin vähennysjaon aikana syntyneet sekundaariset spermatosyytit jatkavat meioosin tasausjakoon, jonka tuloksena syntyy haploideja pyöreitä spermatideja. (31)

2.3 Spermogeneesi

Meioosin jälkeen spermogeneesissä pyöreiden spermatidien morfologia muuttuu 16 vaiheen aikana, jolloin niille kehittyvät selkeä pääosa, keskiosa sekä häntä, flagellum. (7,31,32,39) Vaiheiden 1-8 aikana pyöreät spermatidit valmistautuvat morfologiseen muutokseen mm. aloittamalla akrosomin

muodostamisen, mikä on hedelmöityksen kannalta välttämätön vesikkelirakenne. Akrosomin avulla siittiö pystyy hedelmöityksen aikana penetroitumaan onnistuneesti munasoluun. Hännän kehittyminen alkaa myös spermiogeneesin vaiheessa 1 ja jatkuu lähes spermiogeneesin loppuun saakka. Lisäksi pyöreiden spermatidien tuma alkaa muuttua muotoaan vaiheessa 8. (7,31,32) Pyöreiden spermatidien elongaatio tapahtuu spermiogeneesin vaiheissa 9-16. (32) Myös akrosomi jatkaa kehittymistä spermiogeneesin vaiheiden 9-14 aikana. (7,31,32)

Lisäksi elongoituvien spermatidien kromatiinin rakenne muuttuu vaiheiden 11-12 aikana. Tällöin histoniproteiinit, joiden ympärille kromatiini on kietoutunut, korvataan protamiiniproteiineilla ja soluista tulee translationaalisesti inaktiivisia. Vaiheiden 15-16 aikana solujen tumat kondensoituvat ja pitenevät, minkä lisäksi akrosomi kypsyy loppuun. (7,31,32)

Elongoitumisen lopussa pyöreiden spermatidien lähes koko sytoplasma poistetaan. (7,31,32) Sytoplasmasta jää jäljelle ainoastaan sytoplasmisen pisararakenteen (*cytoplasmic droplet*) Sertolin solujen fagosytoidissa suurimman osan siittiöiden sytoplasmasta. Morfologisen muutoksen johdosta sytoplasmisen pisara siirtyy kehittyvän siittiön keskiosan loppupäähän, jossa pisaralla on oma kalvorakenne. (40) Pisara säilyy osana siittiötä, kunnes se irtoaa ejakulaation aikana. (8) Spermiogeneesin päätteeksi kypsät siittiöt vapautetaan siementiehyiden lumeniin tapahtumassa, jota kutsutaan spermiaatioksi. (31)

2.4 Lisäkivesten rooli siittiöiden erilaistumisessa

Siementiehyistä vapautumisen jälkeen siittiöt siirtyvät kypsyään lisäkiveksiin. Lisäkives koostuu yhdestä putkesta, joka voidaan jakaa neljään osaan: alkuosa (eng. initial segment), pää (*caput*), runko (*corpus*) sekä häntä (*cauda*). Lisäkiveksen veri-lisäkiveseste muodostuu epiteelisoluista, joiden tehtävänä on varmistaa siittiöiden kypsymiselle, suojaamiselle sekä varastoinnille optimaalinen ympäristö. Lisäkiveksen solujen metabolia on vilkasta ja soluista eritetään ulos siittiöiden kypsymisen kannalta tärkeitä molekyylejä. Androgeenihormonit ovat suurelta osin vastuussa lisäkiveksen solujen proteiinisynteesistä, joka mahdollistaa tarvittavien proteiinien tuotannon sekä uloserittämisen soluista. (8)

Osa lisäkiveksen eristystoiminnasta tapahtuu epididosomivälitteisesti. Epididosomit ovat lisäkivekselle spesifejä vesikkelirakenteita, jotka vapautuvat lisäkiveksen epiteelisoluista. (41) Siittiöihin kuljetetaan epididosomivälitteisesti proteiineja sekä RNA:ta, mikä saa aikaan niiden RNA- sekä proteiiniprofiilien muutoksen. (8,41) Lisäkivekset toimivat varastona siittiöille, mutta niiden merkitys osana siittiöiden kypsymistä on myös merkittävä ja siittiöt kehittyvät mm. liikkumiskykyisiksi lisäkiveksissä kypsymisen aikana. Lisäkiveksissä tapahtuvat siittiöiden

muutokset spermatogeneesin jälkeen ovat välttämättömiä siittiön kyvyille hedelmöittää munasolu onnistuneesti. (8)

3 piRNA:IDEN TUOTANTO JA TOIMINTA

piRNA:t ovat 21-35 nukleotidin mittaisia ei-koodaavia RNA-molekyylejä, jotka ilmenevät pääasiallisesti sukusoluissa. piRNA:t interaktoivat PIWI-proteiinien kanssa. (9–13) piRNA:t voidaan jaotella kolmeen luokkaan: fetaali-piRNA:t, prepakyteeni-piRNA:t sekä pakyteeni-piRNA:t. (42–44)

Hiiren genomi koodaa kolmea PIWI-proteiinia: PIWIL1-, PIWIL2- ja PIWIL4-proteiinia, joiden normaalitoiminta ja interaktio piRNA:iden kanssa on edellytys lisääntymiskyvyille. (14,15,43) Fetaali-piRNA:t ilmenevät yhdessä PIWIL2:n ja PIWIL4:n kanssa, prepakyteeni-piRNA:t PIWIL2:n kanssa ja pakyteeni-piRNA:t PIWIL1:n sekä PIWIL2:n kanssa. (42,45–47) Ihmisen genomi koodaa hiiren tavoin kaikkia edellä mainittuja PIWI-proteiineja, minkä lisäksi ihmisen genomi koodaa myös PIWIL3-proteiinia. (48,49) Kehittyvien sukusolujen piRNA-profiili muuttuu sukusolujen kehityksen aikana yhtenevästi PIWI-proteiinien ilmentymisprofiilin kanssa. (42,45)

piRNA:iden on todettu olevan välttämätön osa sukusolujen erilaistumista ja toimintaa niin selkärangkaisilla kuin selkärangattomilla eliöillä. (47) Häiriöt piRNA-reitissä johtavat tyypillisesti steriiliyteen, mikä osoittaa piRNA-reitin normaalin toiminnan olevan tarpeellinen osa lisääntymiskykyä. (50)

3.1 piRNA:iden ilmentyminen sukusolujen kehityksen aikana

piRNA-biogeneesi käynnistyy kehittyvän alkion primaarisissa kantasoluissa lähteestä riippuen alkion kehityspäivänä 12.5-13.5. piRNA:ita tuotetaan kaikissa sukusolujen kehitysvaiheissa. (45,47,51) piRNA:t voidaan luokitella kolmeen eri luokkaan niiden tuottamisajankohdan mukaisesti. Luokkia ovat fetaali-piRNA:t, prepakyteeni-piRNA:t sekä pakyteeni-piRNA:t. (42–44) Fetaali-piRNA:ita aletaan tuottaa 15 päivää hedelmöityksen jälkeen. Fetaali-piRNA:iden tuotanto päättyy kolme päivää syntymän jälkeen. (47) Prepakyteeni-piRNA:ita tuotetaan myös alkion kehittyvissä kiveksissä jatkuen spermiogeneesiin saakka. (47,52,53) Pakyteeni-piRNA:iden tuotanto puolestaan alkaa räjähdysmäisesti 14 päivää syntymän jälkeen, jolloin ne muodostavat suurimman osan kivesten piRNA:ista. Pakyteeni-piRNA:ita voidaan havaita kehittyvissä siittiöissä spermiogeneesin loppuun saakka. (53,54)

Suurin osa piRNA-transkripteista tuotetaan niin kutsutuista genomisista piRNA-klustereista. Lisäksi pieni osa piRNA:ista tuotetaan proteiineja koodaavista geeneistä. (55) Kun piRNA:ita tuotetaan genomisista klustereista, useampi piRNA-geeni transkriptoidaan samaan prekursoriin, josta piRNA:t

myöhemmin pilkotaan ja prosessoidaan sytoplasmassa. (13,54) piRNA:t tuotetaan kolmesta eri prekursorilähteestä: fetaali-piRNA:t transposoni-RNA:sta ja prepakyteeni-piRNA:t 3'UTR RNA:sta, joka on lähtöisin valikoiduista mRNA-molekyyleistä. (42–44,47) Pakyteeni-piRNA:t transkriptoidaan pitkistä ei-koodaavista RNA:ista geenien välisiltä alueilta RNA polymeraasi II:n vaikutuksesta. Transkriptio alkaa, kun A-MYB-transkriptiotekijä (eng. MYB Proto-Oncogene Like 1) kiinnittyy piRNA:ta koodaavan geenin promoottorialueelle, jolloin RNA polymeraasi II aloittaa geenin luennan. (13,42–44,47) Eri prekursoreista lähtöisin olevia piRNA:ita tuotetaan eri vaiheissa sukusolujen erilaistumista ja eri luokkien piRNA:t vuorovaikuttavat sekä sitoutuvat eri PIWI-proteiinien kanssa, minkä lisäksi niillä on toisistaan poikkeavia funktioita. (42–44,47)

Taulukko 1. piRNA:iden luokittelut nisäkkäillä.

Luokka	Fetaali-piRNA:t	Prepakyteeni-piRNA:t	Pakyteeni-piRNA:t
Alkuperä	Transposoni-RNA (47)	3'UTR mRNA (54,56)	lncRNA (42,54,57)
Ilmentyminen	15 päivää hedelmöityksen jälkeen – 3 päivää syntymän jälkeen (47)	PGC:t– spermiogeneesi (47,52,53)	14 päivää syntymän jälkeen – spermiogeneesi (53,54)
Biogeesireitti	Primaarinen biogeesireitti, ping-pong-sykli (47)	Primaarinen biogeesireitti (46)	Primaarinen biogeesireitti (58)
Interaktoivat proteiinit	PIWIL2, PIWIL4 (59)	PIWIL2 (9,15,42,55,60)	PIWIL1, PIWIL2 (47,61)
Funktiot	Transposonien hiljentäminen epigeneettisen uudelleenohjelmoinnin aikana (9,43,44)	Transposonien hiljentäminen meioosin aikana ja sen jälkeen (53,62)	Posttranskriptionaalinen geenien hiljentäminen (63–66)

Transkription jälkeen piRNA-prekursorit kuljetetaan tumasta sytoplasmaan, jossa ne prosessoidaan kypsiksi piRNA-molekyyleiksi. Tumassa UAP56-proteiini (eng. ATP-dependent RNA helicase UAP56) kerää piRNA-prekursorit yhteen tumahuokosten läheisyydessä. Prekursorit siirretään

tumahuokosten läpi sytoplasman puolelle, jossa ne kuljetetaan piRNA-biogeneesipaikalle mitokondrioiden ulkokalvojen läheisyyteen. (50,67)

3.2 piRNA-biogeneesi

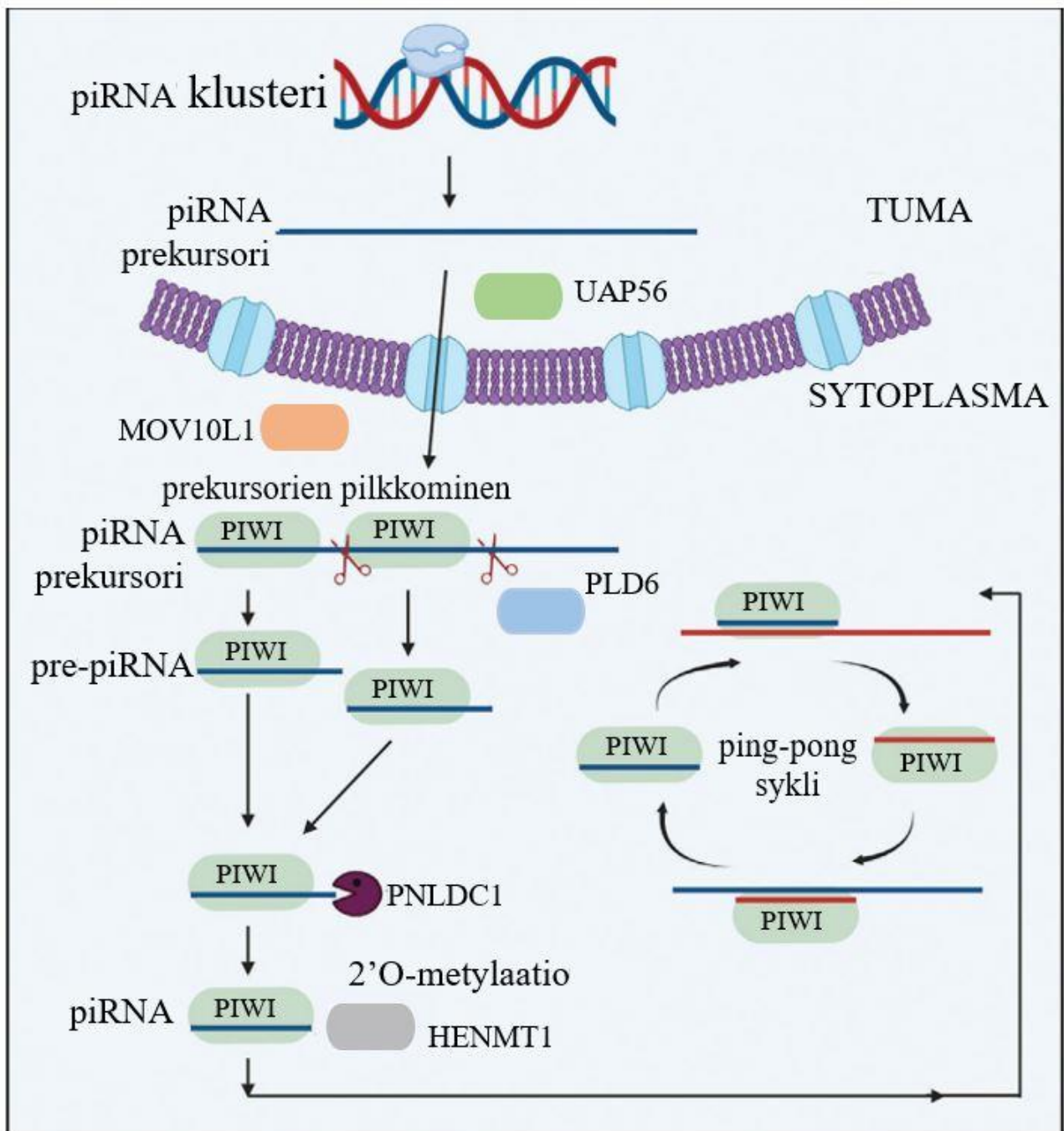
piRNA-biogeneesin aikana sytoplasmaan kuljetetut prekursorit pilkotaan oikeanpituiseksi, minkä lisäksi niihin tehdään muokkauksia, jotka mahdollistavat piRNA:iden toiminnan. Näitä muokkauksia ovat 5'- ja 3'-päiden muokkaukset sekä 3'-pään 2'O-metylaatio. Muokkaukset tapahtuvat osana primaarista piRNA-biogeneesireittiä. (22,23,68,69)

MOV10L1 (eng. Mov10 Like RNA Helicase 1) on proteiini, joka toimii osana piRNA-biogeneesiä siirtämällä piRNA-prekursorit mitokondrioiden ulkokalvojen läheisyyteen. (47) MOV10L1:n on todettu sitoutuvan tarkasti piRNA-prekursoreihin ennen kuin ne sitoutuvat PIWI-proteiinien kanssa. MOV10L1 osallistuu myös piRNA-prekursorien sekundaarirakenteiden muokkaukseen. (70)

PLD6 (eng. Phospholipase D Family Member 6) on fosfolipaasi sekä endonukleaasi, joka pilkkoo piRNA-prekursorit yksittäisiksi pre-piRNA-molekyyleiksi ja osallistuu pre-piRNA:iden 5'-päiden muodostamiseen. (25,71) 5'-pään muodostumisen jälkeen pre-piRNA:iden 3'-pää muokataan 3'-5'-PNLDC1-eksonukleaasilla (eng. PARN Like Ribonuclease Domain Containing Exonuclease 1). (23)

Toimintakykyisten piRNA-molekyylien biogeneesi edellyttää pre-piRNA:iden 3'-päiden 2'O-metylaatiota. HENMT1-proteiini (eng. HEN Methyltransferase 1) metyloi 3'-päät hiirillä. 2'O-metylaatio suojaa piRNA-molekyylejä niiden komplementaariselta hajottamiselta muiden RNA:iden toimesta. Lisäksi metylaatio stabiloi piRNA:ita (72) ja PIWI-proteiinit sitoutuvat piRNA:ihin tiukemmin, kun niiden 3'-päät ovat metyloitu. (73,74)

Primaarisen biogeneesireitin jälkeen piRNA:t voidaan vielä monistaa ping-pong-syklissä. (42,75) Monistamisen aikana primaari-piRNA:iden perusteella tuotetaan sekundaari-piRNA:ita, jotka ovat komplementaarisia primaari-piRNA:ille. (13,76) Ping-pong-syklin tuloksena syntyy transposonien hiljentämiseen kykeneviä sekundaari-piRNA-molekyylejä, joita tuotetaan erityisesti alkion sukusoluissa. (13,42,75)



Kuva 1. piRNA:iden biogeneesireitti. piRNA:t transkriptoidaan piRNA-klustereista pitkiksi piRNA-prekursoreiksi. piRNA-prekursorit kuljetetaan tumahuokosten läheisyyteen UAP56-proteiinin avulla ja siirretään tumasta sytoplasmaan. Sytoplasmassa MOV10L1 siirtää piRNA-prekursorit piRNA-biogeneesin tapahtumapaikalle. Prekursoreista pilkotaan PLD6-proteiinin toimesta pre-piRNA:ita, jotka interaktoivat PIWI-proteiinien kanssa. Pre-piRNA:t, joihin PIWI-proteiinit ovat sitoutuneet, muokataan 3'-pästä PNLDC1-proteiinin toimesta. HENMT1-proteiini 2'O-metyloi 3'-päät. Tätä osuutta piRNA-biogeneesistä kutsutaan primaarisiksi biogeneesireitiksi. Primaarisen biogeneesireitin jälkeen piRNA:t voidaan siirtää ping-pong-sykliin monistettaviksi. Ping-pong-syklin tuottamat piRNA:t ovat komplementaarisia transposonien kanssa.

3.3 piRNA:iden toiminta

piRNA:t osallistuvat useisiin sukusolujen kehityksen ja toiminnan kannalta keskeisiin prosesseihin. piRNA:iden toiminta vaihtelee niiden luokan mukaan eikä niiden kaikkia toimintamekanismeja

tunneta. Fetaali-piRNA:iden tiedetään hiljentävän transposonien toimintaa jo alkionkehityksen aikana. (43) Prepakyteeni-piRNA:iden ja pakyteeni-piRNA:iden toiminta puolestaan on toistaiseksi pitkälti tuntematonta.

3.3.1 Fetaali-piRNA:t

Fetaali-piRNA:iden tehtävänä on estää transposonien toimintaa kehittyvissä sukusoluissa. (9,43,44) Transposonit ovat genomissa ilmentyviä liikkuvia geneettisiä elementtejä. Transposonit voivat liittää itsensä osaksi genomia joko geenien läheisyyteen tai niiden keskelle, jolloin ne voivat vaikuttaa häiritsevästi geenien luentaan. (77) Fetaali-piRNA:iden suojaavat genomia transposonien ilmentymiseltä, mikä on erityisen tärkeää alkioiden sukusoluissa tapahtuvan epigeneettisen uudelleenohjelmoinnin aikana, jolloin DNA:n demetylaatio mahdollistaa transposonien aktivoitumisen. (43) Transposonien toiminnan hiljentäminen mahdollistaa sukusolujen genomien eheyden säilymisen solujen erilaistumisen aikana. (43,44)

Fetaali-piRNA:t muokataan sekä primaarisella biogeneesireitillä että ping-pong-syklissä (47) ja ne interaktoivat PIWIL2:n ja PIWIL4:n kanssa. (9,43,44) PIWIL4:n ilmentyminen kehittyvissä sukusoluissa alkaa 15 päivää hedelmöitymisen jälkeen ja jatkuu kolme päivää syntymän jälkeen. Tänä aikana solusykli on pysähtynyt ja primordiaaliset kantasolut käyvät läpi DNA:n de novo-metylaatioita. (42,78,79) PIWIL4 ohjaa fetaali-piRNA:t takaisin tumaan ping-pong-syklän jälkeen, jossa ne hiljentävät transposonien toimintaa DNA:n de novo-metylaatioiden aikana. (22,59,71) PIWIL2:n kanssa sitoutuneet piRNA:t jäävät sytoplasmaan, jossa niiden toiminta kohdistuu muihin transkripteihin hiljentäen niiden toimintaa. (47)

3.3.2 Prepakyteeni-piRNA:t

Prepakyteeni-piRNA:t, joita kutsutaan myös 3'UTR piRNA-molekyyleiksi, ovat vallitseva piRNA-luokka spermatogeneesin alkuvaiheissa ennen meioosin vähennysjaon pakyteenivaihetta. (54,80) Prepakyteeni-piRNA:iden konsentraatio on korkeimmillaan 10 päivää syntymän jälkeen, jolloin myös PIWIL2-proteiinin tiedetään olevan ainoa ilmentyvä PIWI-proteiini. Prepakyteeni-piRNA:iden tiedetään interaktoivan PIWIL2:n kanssa kehittyvien sukusolujen elongaation alkuun asti. (9,15,42,55,60)

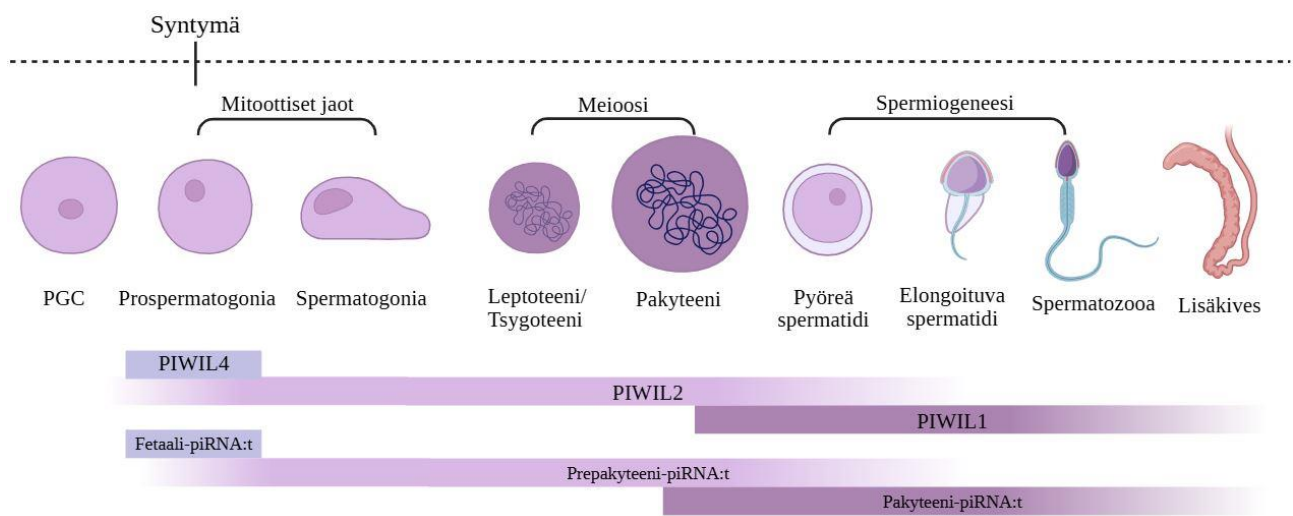
Prepakyteeni-piRNA:t tuotetaan mRNA:iden 3'UTR-alueilta aktiivisen valintaprosessin seurauksena. Valintaprosessissa tietyt mRNA-molekyylit valitaan osaksi piRNA-biogeneesireittiä. Valintaan johtavia tekijöitä ei vielä tunneta. (46) Prepakyteeni-piRNA:t pilkkotaan täysmittaisista mRNA-molekyyleistä ja ribosomit ohjaavat mRNA:iden pilkkomista oikean kokoisiksi fragmenteiksi. Fragmentit jatkavat kypsymistä piRNA-biogeneesireitillä, jossa niille tehdään

piRNA:iden toiminnan kannalta oleelliset muokkaukset. (62) Prepakyteeni-piRNA:t valmistetaan käyttäen primaaria biogeneesireittiä eikä niiden valmistuksessa tarvita ping-pong-syklin komponentteja. (46)

Prepakyteeni-piRNA:iden toiminnasta tiedetään toistaiseksi vähän. On näytetty, että prepakyteeni-piRNA:t osallistuvat meioosin aikana posttranskriptionaalisesti transposonien hiljentämiseen. (53) Prepakyteeni-piRNA:t sisältävät transposoneille komplementaarisia sekvenssejä, minkä vuoksi ne pystyvät hiljentämään transposonien toimintaa meioosin aikana ja sen jälkeen. (62)

3.3.3 Pakyteeni-piRNA:t

Pakyteeni-piRNA:iden tuotanto aloitetaan kehittyvässä siittiöissä meioosin vähennysjaon myöhäisestä pakyteenivaiheessa 14 päivää syntymän jälkeen. (14,42,53,54) Pakyteeni-piRNA-tuotannon alettua ne muodostavat n. 95% aikuisen kiveksien piRNA-populaatiosta. (13) Pakyteeni-piRNA:ita esiintyy myös runsaasti meioosin jälkeisissä pyöreissä ja elongoituviissa spermatideissa. (53,54) Pakyteeni-piRNA:t interaktoivat PIWIL1- sekä PIWIL2-proteiinien kanssa. (47,61) Pakyteeni-piRNA:t ovat lähtöisin genomien välisiltä alueilta. Pakyteeni-piRNA:t pilkotaan pitkistä yksijuosteisista ei-koodaavista RNA-molekyyleistä ja niiden prosessointiin käytetään pääasiallisesti primaaria piRNA-reittiä. (42,54,57)



Kuva 2. Hiiren spermatogeneesin vaiheet sekä piRNA:iden tuotanto. Fetaali-piRNA:t tuotanto alkaa 15 päivää hedelmöityksen jälkeen primordiaalisissa kantasoluissa yhdessä PIWIL2 ja PIWIL4 proteiinien kanssa. Fetaali-piRNA:ita tuotanto jatkuu vielä kolme päivää syntymän jälkeen. Tämän jälkeen prepakyteeni-piRNA:t yhdessä PIWIL2 kanssa ovat ainoat tuotettavat piRNA:t. Pakyteeni-piRNA:iden tuotanto alkaa meioosin pakyteenivaiheessa. Pakyteeni-piRNA:t interaktoivat PIWIL1- ja PIWIL2-proteiinien kanssa.

Pakyteeni-piRNA:iden toiminta on vielä pitkälti tuntematonta. (13) On näytetty, että osa pakyteeni-piRNA:ista ohjaavat PIWI-proteiineja hajottamaan mRNA-molekyylejä, jolloin pakyteeni-piRNA:t osallistuvat geenien ilmentymisen säätelyyn. posttranskriptionaalisesti. Pakyteeni-piRNA:ita

tuotetaan meioosin aikana ja sen jälkeen, jolloin ne pilkkovat meioosin aikaisia ja jälkeisiä mRNA-molekyylejä säädellen näin geenien ilmentymistä. (63–66) Lisäksi on näytetty, että osa pakyteeni-piRNA:ista osallistuu mRNA:iden translaation aktivaatioon PIWIL1-proteiinin kanssa. PIWIL1-piRNA-kompleksia tarvitaan spermiogeneesin aikana mm. akrosomin muodostumiseen osallistuvien mRNA:iden translaatioon. (81)

3.4 piRNA:t ja sukusolugranulat

Sukusolugranulat ovat oleellinen osa kehittyvien siittiöiden pienten RNA:iden prosessointia sekä toimintaa. Sukusolugranulat ovat sukusolujen sytoplasmassa esiintyviä kalvottomia, dynaamisia ribonukleoproteiinigranuloita, jotka koostuvat RNA:sta ja proteiineista. (82,83)

IMC (eng. intermitochondrial cement) ja kromatoidikappale (eng. chromatoid body) ovat kehittyvissä siittiöissä esiintyviä sukusolugranuloita. IMC muodostuu alkion kehityksen aikaisissa prospermatogonioissa ja se havaitaan aina pakyteenivaiheen spermatosyytteihin saakka. (82–84). IMC sijaitsee tuman läheisyydessä mitokondrioiden välissä sitoen mitokondriot paikalleen. (85) Se sisältää mm. TDRD1-, TDRD6-, DDX4- sekä PIWIL2-proteiineja, joita myös kromatoidikappale sisältää. (84,86) Kuitenkin IMC:n ja kromatoidikappaleiden proteomit poikkeavat toisistaan ja vain n. 40% IMC:n komponenteista löytyy myös kromatoidikappaleesta. IMC sisältää useita piRNA-biogeneesiin osallistuvia proteiineja, kuten PLD6, jota havaitaan mitokondrioiden ulkokalvoilla, joita IMC ympäröi. Tämän perusteella ajatellaan, että IMC toimii piRNA-biogeneesin tapahtumapaikkana. (86)

Kromatoidikappale havaitaan pyöreissä spermatideissa meioosin ja IMC:n häviämisen jälkeen. (82,83) Kromatoidikappale koostuu suurelta osin piRNA-reitin kannalta oleellisista proteiineista, joita ovat mm. PIWIL1, DDX4, TDRD6 sekä TDRD7 (82). Sen on todettu akkumuloivan pakyteeni-piRNA:ita. Kromatoidikappaleen proteomi viestii sen osallisuudesta RNA-säätelyyn sekä piRNA-reitin toimintaa, sillä kromatoidikappale sisältää piRNA-reitin sekä niiden toiminnan kannalta oleellisia komponentteja. (87,88) Olemassa olevan tutkimustiedon perusteella on ehdotettu, että kromatoidikappale toimii tapahtumapaikkana pakyteeni-piRNA-välitteiselle RNA-säätelylle. (88)

4 piRNA BIOGENEESIN HÄIRIÖT JA VAIKUTUKSET LISÄÄNTYMISTERVEYTEEN

piRNA-reitin toiminta on välttämätön osa spermatogeneesiä. piRNA-reitin merkitys miesten sukusolujen erilaistumisessa ja toiminnassa on osoitettu niin malliorganismeilla kuin ihmisillä. Reitin

toiminnalle oleellisen geenin poistaminen johtaa spermatogeneesin pysähtymiseen ja steriiliyteen. (14–30,47)

Tyypillistä piRNA-biogeneesin häiriöissä on, että poistogeenimalleissa häiriöt ilmenevät vain homotsygooteilla yksilöillä. Heterotsygotit yksilöt ovat fenotyyplitään villityypin kaltaisia. Homotsygooteilla mutaatiot johtavat yksilöiden steriiliyteen, mikä aiheutuu piRNA-reitin toiminnan häiriintymisestä. Häiriöt reitille tärkeiden proteiinien tuotannossa ja toiminnassa on linkitetty piRNA-biogeneesin häiriintymiseen, minkä seurauksena mm. transposonien hiljentäminen epigeneettisen uudelleenohjelmoimisen aikana on puutteellista johtaen erilaistuvien solujen genomien epävakauteen. (15,23–25,43)

4.1. Häiriöt PIWI-perheen proteiineissa

PIWI-perheen proteiinit PIWIL1, PIWIL2 sekä PIWIL4 ovat välttämätön osa piRNA-reitin toimintaa. (14,15) *PIWIL4*^{-/-} yksilöt ovat steriilejä johtuen spermatogeneesin pysähtymisestä ennen meioosin vähennysjaon pakyteenivaihetta. (43) *PIWIL4*:n mutaatio johtaa myös alkion kivesten vähentyneeseen piRNA-molekyylien määrään. piRNA:iden alentunut määrä johtaa LINE1-retrotransposonien metylaatioiden puuttumiseen, jolloin niiden toimintaa ei hiljennetä. (43,44)

PIWIL4^{-/-}-hiirimallin tavoin myös *PIWIL2*^{-/-}-hiiret ovat steriilejä eikä niiden lisäkiveksien *cauda*-osasta löydetä lainkaan kypsiä siittiöitä. Kiveksistä ei myöskään löydetä postmeioottisia sukusoluja. Spermatogeneesi pysähtyy *PIWIL2*^{-/-}-hiirillä meioosin alkuvaiheessa tsygoteenivaiheessa tai aikaisessa pakyteenivaiheessa. (15) *PIWIL2*:n poistaminen sukusoluista laskee piRNA:iden määrää ja johtaa transposonien aktivaation lisääntymiseen.. (44)

PIWIL1:n poistaminen pysäyttää spermatogeneesin pyöreä spermatidi-vaiheeseen. *PIWIL1*^{-/-}-hiiret ovat steriilejä johtuen pakyteeni-piRNA-reitin toimimattomuudesta. (14) *PIWIL1*:n poiston on osoitettu vaikuttavan meioosin vähennys- sekä tasausjaon toimintaan. *PIWIL1*:n poistaminen johtaa sentromeerien ja perisentromeerien ei-koodaavien RNA-molekyylien yli-ilmentymiseen, mikä johtaa satelliitti-RNA:iden liialliseen määrään. Tällöin meioosin vähennysjaossa kromosomit jakautuvat väärin soluissa, mikä johtaa lisääntyneeseen aneuploidiaan meioosin tasausjaossa. Ongelmat kromosomien jakautumisessa johtavat häiriintyneessä meioosissa syntyneiden spermatidien eliminaatioon sekä steriiliyteen. (66)

4.2. Häiriöt TDRD-perheen proteiineissa

TDRD-perheen proteiinit ovat IMC:ssä sekä kromatoidikappaleessa lokalisoituvia proteiineja, jotka ovat välttämätön osa spermatogeneesiä ja hedelmällisyyttä. TDRD-perheen proteiinit osallistuvat sukusolugranuloiden muodostukseen. Näitä proteiineja koodaavien geenien poistaminen estää

tyypillisesti sukusolugranuloiden muodostumisen, mikä johtaa häiriöihin piRNA-reitin toiminnassa. Lisäksi sukusolugranuloille ominaiset proteiinit lokalisoituvat väärin soluissa. *TDRD1*-, *TDRD5*-, *TDRD6*-, *TDRD7*-, *TDRD9*- sekä *TDRD12*-geenien poistamisen on todettu aiheuttavan steriilin fenotyypin hiiritutkimuksissa. (16–21)

TDRD1:n tai *TDRD5*:n poistaminen saa aikaan IMC:n muodostumisen häiriintymisen. (16,17) *TDRD1*:n poisto ei vaikuta kromatoidikappaleen muodostumiseen. *TDRD5*-, *TDRD6*- tai *TDRD7*-geenien poiston seurauksena kromatoidikappaleen muodostuminen häiriintyy pyöreissä spermateideissa. (16,17,19,21) Esimerkiksi PIWI-proteiinit sekä *TDRD1*-proteiini lokalisoituvat väärin *TDRD5*:n tai *TDRD6*:n poistamisen vuoksi. (17,21)

Spermatogeneesi häiriintyy tyypillisesti *TDRD*-geenien poistamisen myötä, mutta sen pysähtymisen ajankohta vaihtelee geeneittäin. (17–19) *TDRD5*-poistogeeniset hiiret ovat steriilejä, sillä niiden spermatogeneesi pysähtyy pyöreä spermatidi-vaiheeseen. Joskus spermatogeneesi pysähtyy meioosin profaasiin. (17) Myös *TDRD7*-poistogeenisyys pysäyttää spermatogeneesin pyöreä spermatidi-vaiheeseen. (19) *TDRD9*-poistogeenisyys johtaa meioosin pysähtymiseen jo ennen pakyteenivaihetta, koska geenin poisto estää kromosomien välisen synapsin muodostumisen. (18)

TDRD-mutaatioille yhteistä on myös transposonien aktiivisuuden lisääntyminen alkion sukusolujen kehityksen aikana. *TDRD5*-, *TDRD7*- ja *TDRD9*-poistogeenisten hiirien LINE-1-retrotransposonien hiljentäminen on estynyt ja piRNA-profiilit poikkeavat villityypin hiiristä. (17–19) *TDRD12*-poistogeenisten hiirien transposonien hiljentäminen on estynyt, minkä lisäksi piRNA:iden interaktio PIWIL4:n kanssa on puutteellista. Tämä vaikuttaa häiritsevästi fetaali-piRNA:iden tuotantoon. *TDRD12* poistamisen ei ole osoitettu vaikuttavan PIWIL2:n ja piRNA:iden yhteistoimintaan. Näin ollen primaari-piRNA-reitti ei häiriinny, vaan ongelmat piRNA:iden tuotannossa alkavat vasta ping-pong-syklin aikana. (20)

4.3. Häiriöt muissa piRNA-reitin proteiineissa

PIWI- ja *TDRD*-perheiden proteiinien lisäksi myös muiden piRNA:iden prosessoinnille oleellisten proteiinien mutaatiot johtavat piRNA-reitin häiriintymiseen ja steriiliin fenotyyppiin. Näitä proteiineja ovat mm. *PLD6*, *GASZ*, *PNLDC1* sekä *HENMT1*. (22–26)

PLD6-proteiini pilkkoo pidempiä piRNA-prekursoreita pre-piRNA-molekyyleiksi niiden 5'-päistä piRNA-biogeneesin aikana. (71) *PLD6*^{-/-}-hiirien kiveksen kehitys ja spermatogeneesi etenevät normaalisti alkion kehityksen sekä ensimmäisten elinviikkojen ajan. Häiriöt spermatogeneesissä hiirillä alkavat 16 päivää syntymän jälkeen. (25) *PLD6*^{-/-}-hiirien spermatogeneesi pysähtyy aikaiseen pakyteenivaiheeseen eikä myöhäisiä spermatoosyyttejä synny. Lisäksi hiiriltä puuttuvat IMC-

sukusolugranulat. (26) Poistogeenisten hiirien piRNA:iden määrä on alentunut ja LINE-1-retrotransposonien hiljentäminen epäonnistuu alkion kehityksen aikana. *PLD6*^{-/-}-fenotyyppi on hyvin samankaltainen kuin esimerkiksi *PIWIL2*, *PIWIL4* ja *TDRD9* poistogeenisillä hiirillä. (25)

GASZ (eng. Ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper domain-containing protein 1) on proteiini, joka kolokalisoituu IMC:ssä yhdessä *PIWIL2*-proteiinia stabiloiden proteiinia. *GASZ*^{-/-} poistogeenisten hiirien *PIWIL2*-proteiinin määrä on huomattavasti villityyppiä matalampi ja hiirien spermatogeneesi pysähtyy tsygoteni/pakyteenivaiheeseen. *GASZ*^{-/-} hiiret ovat steriilejä ja niissä ilmenevä retrotransposonien aktiivisuus on lisääntynyt piRNA-tuotannon ongelmien vuoksi. (24)

PNLDC1-proteiini pilkkoo pre-piRNA:iden 3'-päät piRNA-biogeneesissä ja sen on osoitettu olevan välttämätön osa piRNA:iden toimivuutta. *PNLDC1*^{-/-} hiirillä pre-piRNA:iden 3'-pään pilkkominen epäonnistuu, mikä johtaa väärin käsiteltyjen piRNA:iden kertymiseen kehittyvissä sukusoluissa. Tämä puolestaan johtaa kypsien piRNA-molekyylien vähäisyyteen ja transposonien toiminnan lisääntymiseen. (23)

HENMT1-proteiinin normaalia toimintaa vaaditaan piRNA:iden 3'-pään 2'-O-metylaatioon, joka stabiloi piRNA:ita. Geenin poistaminen johtaa piRNA:iden instabiliteettiin ja piRNA:iden määrän vähentymiseen, jolloin retrotransposonien toimintaa ei estetä. *HENMT1*^{-/-} poistogeenisyys johtaa myös spermatogeneesin pysähtymiseen pyöreiden spermatidien elongaation aikana. Suurin osa soluista kuolee ja ne, jotka selviytyvät kypsyään lisäkiveksiin saakka, ovat morfologialtaan poikkeavia pään sekä hännän osalta. Lisäkiveksiin päätyvien siittiöiden määrä on 10% suhteessa villityypin hiiriin. Hiirimallin steriiliys johtuu siis vähäisestä siittiöiden määrästä sekä niiden poikkeavasta morfologiasta. (22)

4.4. piRNA-reitin häiriöt ihmisillä

Malliorganismeilla tehdyt tutkimukset osoittavan piRNA-reitin olevan välttämätön osa spermatogeneesiä ja hedelmällisyyttä. Eläinmallien lisäksi piRNA-reitin merkitys osana lisääntymiskykyä on näytetty myös ihmisillä. (27–30)

Hedelmättömillä miehillä tehdyissä geenitutkimuksissa on havaittu mutaatioita 14 eri piRNA-reitin kannalta oleellisen geenin osalta. Näitä geenejä ovat mm. *PIWIL1*, *TDRD1* sekä *DDX4*. Pakyteeni-piRNA:iden määrän on todettu vähentyneen näiden miesten kiveksissä, mikä viestii piRNA-reitin toiminnanhäiriöistä. (27)

piRNA:iden alentunut määrä ihmisnäytteissä on linkitetty siittiöiden alentuneeseen liikkumiskykyyn verrattuna normaalisti liikkuviin verrokkeihin. *PLD6*-proteiinin ja piRNA:iden samanaikainen

vähäisyys voisi selittää siittiöiden heikentyneen liikkumiskykyyn. *PLD6*:n mutaatio johtaa piRNA:iden vähäiseen määrään, minkä seurauksena potilaat ovat steriilejä johtuen siittiöiden heikosta liikkumiskyvystä. (28)

Atsoospermiaa tutkittaessa mutaatioita on löydetty PNLDC1-proteiinia koodaavasta geenistä. Ihmistutkimuksissa *PNLDC1*-mutaatio on linkitetty steriilien miesten piRNA:iden poikkeavaan pituuteen sekä vähäiseen pakyteeni-piRNA:iden määrään. Näiden miesten spermatogeneesi on pysähtynyt meiosisin jälkeiseen pyöreä spermatidi-vaiheeseen. Muutokset hiirimallissa ovat yhtenevät ihmislöydöksen kanssa. (29)

Lisäksi *MOV10L1*-geenin polymorfia on linkitetty infertiliteettiin. Tietyissä geenimuodoissa tutkittujen miesten siittiöiden kypsyminen on pysähtynyt meiosisin vähennysjaon alkuvaiheisiin ja on epäilty, että *MOV10L1* polymorfialla olisi rooli spermatogeenin pysähtymisessä. Tämä selittäisi kyseisten geenimuotojen omaavien miesten atsoospermian. (30)

5 YHTEENVETO

Spermatogeenin on osoitettu olevan riippuvainen piRNA-reitin normaalista toiminnasta. (14–30,47) piRNA-reitin toimintahäiriöt johtavat steriiliyteen, joka johtuu tyypillisesti spermatogeenin pysähtymisestä, piRNA-biogeneesin häiriintymisestä, piRNA:iden alentuneesta määrästä sekä transposonien hiljentämisen epäonnistumisesta, mikä johtaa kehittyvien solujen genomiseen epävakauteen. (15,23–25,43)

Ihmisen atsoospermiaa sekä siittiöiden liikkumiskykyä tutkittaessa on tehty samankaltaisia löydöksiä kuin hiirikokeissa. Kuitenkin tällä hetkellä ihmistutkimuksia löytyy vielä rajallinen määrä ja tutkimusta miesten hedelmättömyydestä sekä piRNA:iden merkityksestä osana lisääntymisterveyttä tarvitaan jatkossakin. On kuitenkin selvää, että piRNA-reitin toiminta on välttämätöntä miesten sukusolujen erilaistumiselle ja toiminnalle. Tämä on todistettu niin selkärangattomissa ja selkärangallisissa eläinmalleissa kuin myös tutkittaessa ihmisten hedelmättömyyttä. (27–30)

Vaikka piRNA-reitin, spermatogeenin ja fertilitietin välinen yhteys on tunnistettu merkittäväksi, vaatii aihe edelleen laajaa perustutkimusta. Hedelmättömyys on kasvava ongelma, jonka kokonaisvaltainen ymmärtäminen edellyttää nykyistä laajempaa ymmärrystä piRNA:iden toiminnasta.

LÄHTEET

1. Rodprasert W, Virtanen HE, Sadov S, Perheentupa A, Skakkebaek NE, Jørgensen N, ym. An update on semen quality among young Finnish men and comparison with Danish data. *Andrology*. 1. tammikuuta 2019;7(1):15–23.
2. Jørgensen N, Vierula M, Jacobsen R, Pukkala E, Perheentupa A, Virtanen HE, ym. Recent adverse trends in semen quality and testis cancer incidence among Finnish men. *Int J Androl*. elokuuta 2011;34(4 PART 2).
3. Heino A, Gissler M. Hedelmöityshoidot 2022-2023. 2024.
4. Santi D, Granata ARM, Simoni M. FSH treatment of male idiopathic infertility improves pregnancy rate: A meta-analysis. *Endocr Connect*. 2015;4(3):46–58.
5. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev*. 2016;96:1–17.
6. Koji T, Shibata Y. Global changes in epigenomes during mouse spermatogenesis: possible relation to germ cell apoptosis. *Histochem Cell Biol*. 2020;154(2):123–34.
7. Jan SZ, Hamer G, Repping S, de Rooij DG, Van Pelt AMM, Vormer TL. Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2012;1822(12):1838–50.
8. James ER, Carrell DT, Aston KI, Jenkins TG, Yeste M, Salas-Huetos A. The role of the epididymis and the contribution of epididymosomes to mammalian reproduction. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):1–17.
9. Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, ym. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*. 2006;442(7099):203–7.
10. Grivna ST, Beyret E, Wang Z, Lin H. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev*. 2006;20(13):1709–14.
11. Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*. 2006;442(7099):199–202.
12. Watanabe T, Takeda A, Tsukiyama T, Mise K, Okuno T, Sasaki H, ym. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: Retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev*. 2006;20(13):1732–43.
13. Ozata DM, Gainetdinov I, Zoch A, O'Carroll D, Zamore PD. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nat Rev Genet*. 2019;20(2):89–108.
14. Deng W, Lin H. miwi, a Murine Homolog of piwi, Encodes a Cytoplasmic Protein Essential for Spermatogenesis. *Dev Cell*. 2002;2(6):819–30.
15. Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, ym. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*. 2004;131(4):839–49.
16. Chuma S, Hosokawa M, Kitamura K, Kasai S, Fujioka M, Hiyoshi M, ym. Tdrd1Mtr-1, a tudor-related gene, is essential for male germ-cell differentiation and nuagegerminal granule formation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:15894–9.

17. Yabuta Y, Ohta H, Abe T, Kurimoto K, Chuma S, Saitou M. TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly, and spermiogenesis in mice. *Journal of Cell Biology*. 2011;192(5):781–95.
18. Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, ym. The TDRD9-MIWI2 Complex Is Essential for piRNA-Mediated Retrotransposon Silencing in the Mouse Male Germline. *Dev Cell*. 2009;17(6):775–87.
19. Tanaka T, Hosokawa M, Vagin V V., Reuter M, Hayashi E, Mochizuki AL, ym. Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid bodies during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(26):10579–84.
20. Pandey RR, Tokuzawa Y, Yang Z, Hayashi E, Ichisaka T, Kajita S, ym. Tudor domain containing 12 (TDRD12) is essential for secondary PIWI interacting RNA biogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(41):16492–7.
21. Bi X, Jin H, Wan F, Xia Y, Guo H, Chen S, ym. Loss-of-function variant in TDRD6 cause male infertility with severe oligo-astheno-teratozoospermia in human and mice. *J Cell Mol Med*. 2024;28(18):1–12.
22. Lim SL, Qu ZP, Kortschak RD, Lawrence DM, Geoghegan J, Hempfling AL, ym. HENMT1 and piRNA Stability Are Required for Adult Male Germ Cell Transposon Repression and to Define the Spermatogenic Program in the Mouse. *PLoS Genet*. 2015;11(10).
23. Ding D, Liu J, Dong K, Midic U, Hess RA, Xie H, ym. PNLDC1 is essential for piRNA 3' end trimming and transposon silencing during spermatogenesis in mice. *Nat Commun*. 2017;8(1).
24. Ma L, Buchold GM, Greenbaum MP, Roy A, Burns KH, Zhu H, ym. GASZ is essential for male meiosis and suppression of retrotransposon expression in the male germline. *PLoS Genet*. 2009;5(9).
25. Watanabe T, Chuma S, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Totoki Y, Toyoda A, ym. MITOPLD Is a Mitochondrial Protein Essential for Nuage Formation and piRNA Biogenesis in the Mouse Germline. *Dev Cell*. 2011;20(3):364–75.
26. Huang H, Gao Q, Peng X, Choi SY, Sarma K, Ren H, ym. PiRNA-Associated Germline Nuage Formation and Spermatogenesis Require MitoPLD Profusogenic Mitochondrial-Surface Lipid Signaling. *Dev Cell*. 2011;20(3):376–87.
27. Stallmeyer B, Bühlmann C, Stakaitis R, Dicke AK, Ghieh F, Meier L, ym. Inherited defects of piRNA biogenesis cause transposon de-repression, impaired spermatogenesis, and human male infertility. *Nat Commun*. 2024;15(1).
28. Hong Y, Wu Y, Zhang J, Yu C, Shen L, Chen H, ym. Decreased piRNAs in Infertile Semen Are Related to Downregulation of Sperm MitoPLD Expression. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12.
29. Nagirnaja L, Mørup N, Nielsen JE, Stakaitis R, Golubickaite I, Oud MS, ym. Variant PNLDC1 , Defective piRNA Processing, and Azoospermia . *New England Journal of Medicine*. 2021;385(8):707–19.
30. Sarkardeh H, Totonchi M, Asadpour O, Sadighi Gilani MA, Zamani Esteki M, Almadani N, ym. Association of MOV10L1 gene polymorphisms and male infertility in azoospermic men with complete maturation arrest. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(7):865–71.
31. Nishimura H, L'Hernault SW. Spermatogenesis. *Current Biology*. 2017;27(18):988–94.
32. Hess RA, Renato De Franca L. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Yan Cheng. C, toimittaja. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. 1. p. 2008;636:1–15.

33. De Rooij DG. Stem Cells in the Testis. *Int J Exp Pathol*. 1998;79(2):67–80.
34. Yamada M, De Chiara L, Seandel M. Spermatogonial stem cells: Implications for genetic disorders and prevention. *Stem Cells Dev*. 2016;25(20):1483–94.
35. Maatouk DM, Kellam LD, Mann MRW, Lei H, En L, Bartolomei MS, ym. DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages. *Development*. 2006;133(17):3411–8.
36. Feng S, Jacobsen SE, Reik W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science (1979)*. 2010;330(6004):622–7.
37. Seisenberger S, Peat JR, Hore TA, Santos F, Dean W, Reik W. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: Building and breaking epigenetic barriers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2013;368(1609).
38. Öllinger R, Reichmann J, Adams IR. Meiosis and retrotransposon silencing during germ cell development in mice. *Differentiation*. 2010;79(3):147–58.
39. Kitaoka M, Yamashita YM. Running the gauntlet: challenges to genome integrity in spermiogenesis. *Vsk. 15, Nucleus*. Taylor and Francis Ltd.; 2024.
40. Cooper TG. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl*. 2011;13(1):130–8.
41. Wang H, Wang Z, Zhou T, Morris D, Chen S, Li M, ym. Small RNA shuffling between murine sperm and their cytoplasmic droplets during epididymal maturation. *Dev Cell*. 2023;58(9):779–90.
42. Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, ym. A piRNA Pathway Primed by Individual Transposons Is Linked to De Novo DNA Methylation in Mice. *Mol Cell*. 2008;31(6):785–99.
43. Carmell MA, Girard A, van de Kant HJG, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, ym. MIWI2 Is Essential for Spermatogenesis and Repression of Transposons in the Mouse Male Germline. *Dev Cell*. 2007;12(4):503–14.
44. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, ym. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev*. 2008;22(7):908–17.
45. Molaro A, Falciatori I, Hodges E, Aravin AA, Marran K, Rafii S, ym. Two waves of de novo methylation during mouse germ cell development. *Genes Dev*. 2014;28(14):1544–9.
46. Robine N, Lau NC, Balla S, Jin Z, Okamura K, Kuramochi-Miyagawa S, ym. A Broadly Conserved Pathway Generates 3'UTR-Directed Primary piRNAs. *Current Biology*. 2009;19(24):2066–76.
47. Sun YH, Lee B, Li XZ. The birth of piRNAs: how mammalian piRNAs are produced, originated, and evolved. *Mammalian Genome*. 2022;33(2):293–311.
48. Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome☆. *Genomics*. 2003;82(3):323–30.
49. Sharma AK, Nelson MC, Brandt JE, Wessman M, Mahmud N, Weller KP, ym. Human CD34 stem cells express the hiwi gene, a human homologue of the Drosophila gene piwi. *Hematopoiesis*. 2001;97:426–34.

50. Czech B, Munafò M, Ciabrelli F, Eastwood EL, Fabry MH, Kneuss E, ym. PiRNA-guided genome defense: From biogenesis to silencing. *Annu Rev Genet.* 2018;52:131–57.
51. Aravin AA, Bourc'his D. Small RNA guides for de novo DNA methylation in mammalian germ cells. *Genes Dev.* 2008;22(8):970–5.
52. Du L, Chen W, Zhang D, Cui Y, He Z. The functions and mechanisms of piRNAs in mediating mammalian spermatogenesis and their applications in reproductive medicine. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2024;81(1).
53. Di Giacomo M, Comazzetto S, Saini H, De Fazio S, Carrieri C, Morgan M, ym. Multiple Epigenetic Mechanisms and the piRNA Pathway Enforce LINE1 Silencing during Adult Spermatogenesis. *Mol Cell.* 2013;50(4):601–8.
54. Li XZ, Roy CK, Dong X, Bolcun-Filas E, Wang J, Han BW, ym. An Ancient Transcription Factor Initiates the Burst of piRNA Production during Early Meiosis in Mouse Testes. *Mol Cell.* 11. huhtikuuta 2013;50(1):67–81.
55. Aravin AA, Sachidanandam R, Girard A, Fejes-Toth K, Hannon GJ. Developmentally Regulated piRNA Clusters Implicate MILI in Transposon Control. *Science (1979).* 2007;316(5825):744–7.
56. Gainetdinov I, Colpan C, Arif A, Cecchini K, Zamore PD. A Single Mechanism of Biogenesis, Initiated and Directed by PIWI Proteins, Explains piRNA Production in Most Animals. *Mol Cell.* 2018;71(5):775–90.
57. Sun YH, Zhu J, Xie LH, Li Z, Meduri R, Zhu X, ym. Ribosomes guide pachytene piRNA formation on long intergenic piRNA precursors. *Nat Cell Biol.* helmikuuta 2020;22(2):200–12.
58. Beyret E, Liu N, Lin H. PiRNA biogenesis during adult spermatogenesis in mice is independent of the ping-pong mechanism. *Cell Res.* 2012;22(10):1429–39.
59. Wang X, Ramat A, Simonelig M, Liu MF. Emerging roles and functional mechanisms of PIWI-interacting RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023;24(2):123–41.
60. Robine N, Lau NC, Balla S, Jin Z, Okamura K, Kuramochi-Miyagawa S, ym. A Broadly Conserved Pathway Generates 3'UTR-Directed Primary piRNAs. *Current Biology.* 2009;19(24):2066–76.
61. Grivna ST, Pyhtila B, Lin H, Hogan BLM. MIWI associates with translational machinery and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in regulating spermatogenesis. *PNAS.* 2006;103(36):13415–20.
62. Sun YH, Wang RH, Du K, Zhu J, Zheng J, Xie LH, ym. Coupled protein synthesis and ribosome-guided piRNA processing on mRNAs. *Nat Commun.* 2021;12(1).
63. Gou LT, Dai P, Yang JH, Xue Y, Hu YP, Zhou Y, ym. Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis. *Cell Res.* 2014;24(6):680–700.
64. Zhang P, Kang JY, Gou LT, Wang J, Xue Y, Skogerboe G, ym. MIWI and piRNA-mediated cleavage of messenger RNAs in mouse testes. *Cell Res.* 2015;25(2):193–207.
65. Goh WSS, Falciatori I, Tam OH, Burgess R, Meikar O, Kotaja N, ym. piRNA-directed cleavage of meiotic transcripts regulates spermatogenesis. *Genes Dev.* 2015;29:1032–44.
66. Hsieh C, Xia J, Lin H. MIWI prevents aneuploidy during meiosis by cleaving excess satellite RNA. *EMBO J.* 2020;39(16).

67. Zhang F, Wang J, Xu J, Zhang Z, Koppetsch BS, Schultz N, ym. UAP56 couples piRNA clusters to the perinuclear transposon silencing machinery. *Cell*. 2012;151(4):871–84.
68. Nishimasu H, Ishizu H, Saito K, Fukuhara S, Kamatani MK, Bonnefond L, ym. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature*. 2012;491(7423):284–7.
69. Pane A, Wehr K, Schüpbach T. zucchini and squash Encode Two Putative Nucleases Required for rasiRNA Production in the Drosophila Germline. *Dev Cell*. 2007;12(6):851–62.
70. Vourekas A, Zheng K, Fu Q, Maragkakis M, Alexiou P, Ma J, ym. The RNA helicase MOV10L1 binds piRNA precursors to initiate piRNA processing. *Genes Dev*. 2015;29(6):617–29.
71. Ipsaro JJ, Haase AD, Knott SR, Joshua-Tor L, Hannon GJ. The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature*. 2012;491(7423):279–82.
72. Gainetdinov I, Colpan C, Cecchini K, Arif A, Jouravleva K, Albosta P, ym. Terminal modification, sequence, length, and PIWI-protein identity determine piRNA stability. *Mol Cell*. 2021;81(23):4826–42.
73. Simon B, Kirkpatrick JP, Eckhardt S, Reuter M, Rocha EA, Andrade-Navarro MA, ym. Recognition of 2'-o-methylated 3'-end of piRNA by the PAZ domain of a Piwi protein. *Structure*. 2011;19(2):172–80.
74. Tian Y, Simanshu DK, Ma JB, Patel DJ. Structural basis for piRNA 2'-O-methylated 3'-end recognition by Piwi PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) domains. *PNAS*. 2011;108(3):903–10.
75. De Fazio S, Bartonicek N, Di Giacomo M, Abreu-Goodger C, Sankar A, Funaya C, ym. The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature*. 2011;480(7376):259–63.
76. Czech B, Hannon GJ. One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(4):324–37.
77. Bestor TH. Transposons Reanimated in Mice. *Cell*. 2005;122(3):320–2.
78. Aravin AA, Van Der Heijden GW, Castaneda J, Vagin V V., Hannon GJ, Bortvin A. Cytoplasmic compartmentalization of the fetal piRNA pathway in mice. *PLoS Genet*. 2009;5(12).
79. Soper SFC, van der Heijden GW, Hardiman TC, Goodheart M, Martin SL, de Boer P, ym. Mouse Maelstrom, a Component of Nuage, Is Essential for Spermatogenesis and Transposon Repression in Meiosis. *Dev Cell*. 2008;15(2):285–97.
80. Gainetdinov I, Colpan C, Arif A, Cecchini K, Zamore PD. A Single Mechanism of Biogenesis, Initiated and Directed by PIWI Proteins, Explains piRNA Production in Most Animals. *Mol Cell*. 6. syyskuuta 2018;71(5):775-790.e5.
81. Dai P, Wang X, Gou LT, Li ZT, Wen Z, Chen ZG, ym. A Translation-Activating Function of MIWI/piRNA during Mouse Spermiogenesis. *Cell*. 2019;179(7):1566–81.
82. Meikar O, Da Ros M, Korhonen H, Kotaja N. Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. *Reproduction*. 2011;142(2):195–209.
83. Yadav RP, Kotaja N. Small RNAs in spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;382(1):498–508.
84. Lehtiniemi T, Kotaja N. Germ granule-mediated RNA regulation in male germ cells. *Reproduction*. 2018;155(2):77–91.

85. Wang X, Lv C, Guo Y, Yuan S. Mitochondria associated germinal structures in spermatogenesis: PiRNA pathway regulation and beyond. *Cells*. 2020;9(2).
86. Olotu O, Dowling M, Homolka D, Wojtas MN, Tran P, Lehtiniemi T, ym. Intermitochondrial cement (IMC) harbors piRNA biogenesis machinery and exonuclease domain-containing proteins EXD1 and EXD2 in mouse spermatocytes. *Andrology*. 2023;11(4):710–23.
87. Meikar O, Vagin V V., Chalmel F, Söstar K, Lardenois A, Hammell M, ym. An atlas of chromatoid body components. *RNA*. 2014;20(4):483–95.
88. Anbazhagan R, Kavarthapu R, Dufau ML. Chromatoid Bodies in the Regulation of Spermatogenesis: Novel Role of GRTH. *Cells*. 2022;11(4).