

GUILLAUME JANNOT

**CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DE LA
VOIE DES MICROARNS CHEZ LE NEMATODE
CAENORHABDITIS ELEGANS**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2013

Résumé

Les microARNs sont des petites molécules d'ARN non-codant conservées à travers les espèces qui régulent négativement l'expression génique au niveau post-transcriptionnel. Ils figurent parmi les acteurs majeurs du maintien de l'homéostasie cellulaire et leur dérégulation est à l'origine de nombreuses pathologies humaines. Leur biogenèse consiste en deux étapes de maturation successives effectuées par les enzymes Drosha et Dicer, pour générer une molécule effectrice d'ARN d'une longueur de 21-23 nucléotides. La courte molécule produite s'assemble avec une protéine de la famille Argonaute pour former un complexe ribonucléoprotéique capable de cibler spécifiquement un ARNm et d'éteindre son expression. Pour mieux comprendre comment les microARNs régulent l'expression génique, l'objectif principal de mon doctorat a été d'étudier le rôle de la protéine Argonaute ALG-1, en utilisant le nématode *Caenorhabditis elegans* comme modèle animal. Nous avons dans un premier temps recherché quelles caractéristiques moléculaires étaient importantes pour déterminer la sélection spécifique des protéines Argonautes essentielles à la voie des microARNs parmi les nombreuses Argonautes retrouvées chez le nématode *C. elegans*. Par une approche génétique, nous avons découvert que la sélection des protéines Argonautes est affectée à la fois par la structure du duplex d'ARN double brins et par les caractéristiques spécifiques de chacune d'elles. Pour étudier plus précisément la fonction de la protéine Argonaute ALG-1, nous avons entrepris un criblage double-hybride pour identifier de nouveaux partenaires protéiques. Parmi eux, nous avons identifié puis prouvé l'importance de la protéine ribosomale RACK1 dans la voie de régulation des microARNs chez le nématode et l'humain. Nous avons démontré que la perte de fonction de RACK1 affecte l'association des microARNs et des protéines Argonaute avec les ribosomes actifs suggérant une contribution de cette protéine dans le recrutement de ces complexes aux sites actifs de traduction. Finalement, nous avons développé une approche génétique systématique permettant d'adresser génétiquement l'implication des partenaires d'ALG-1 dans la voie des microARNs. Collectivement, mes travaux de doctorat nous ont permis de contribuer à l'élargissement des connaissances associées à cette mécanistique complexe de régulation des gènes par les microARNs chez l'animal.

Abstract

MicroRNAs are small non-coding RNA conserved from plants to animals that negatively affect gene expression at the post-transcriptional level. They play an important role in the gene regulation of several biological processes and their misregulations lead to many human diseases including cancers. The production of microRNAs involved two sequential maturation steps by RNase Type III enzymes Drosha and Dicer to produce 21-23 nucleotides long RNA species. These tiny molecules form a ribonucleoprotein complex containing one Argonaute protein able to specifically target mRNA and repress translation.

In order to better understand how microRNAs regulate gene expression, the main objective of my thesis was to investigate the role of the microRNA-specific Argonaute ALG-1, using the nematode *Caenorhabditis elegans* as animal model. We first focused our work in the identification of molecular cues important for the selection of specific Argonautes essential for the microRNA pathway among the several ones found in *C. elegans*. Using powerful genetic tools, we discovered that the selection of Argonaute proteins is affected by the structure of the Dicer-produced duplex and by characteristics specific to each protein. To next better understand the functions of the Argonaute protein ALG-1 in the microRNA pathway, we conducted a two-hybrid screen to identify new protein interactors. Among them, we characterized the new role of the ribosomal protein RACK1 in the microRNA pathway in both nematodes and human cells. We demonstrated that the alteration of RACK1 affects the association of the miRNA complex to the translating ribosome suggesting that RACK1 could contribute to recruit the miRISC to the active site of translation. Finally, we also developed a systematic genetic approach to analyze the implication of identified ALG-1 interactors in the microRNA pathway in animals. Collectively, my thesis work, help us to gain new insights about the roles of the microRNA-specific Argonaute complex in gene regulation by microRNAs in animals.

Remerciements

Cette aventure scientifique et humaine n'aurait pas été aussi belle sans l'aide inconditionnelle de mon directeur de thèse. Mon plus grand remerciement s'adresse donc au Dr Martin Simard pour sa participation dans la réussite de ce doctorat et dans mon intégration dans cette merveilleuse ville de Québec.

Un immense Merci à Sandra, ma partenaire de travail et de vie, qui a accepté d'échanger sa magnifique Normandie pour la vie Québécoise. Merci pour ton considérable soutien, ton aide et ton réconfort constant tout au long de cette thèse, jusqu'à la rédaction...et aussi pour les années à venir. Que dire de la plus belle des princesses, Océane, qui s'est invitée dans notre vie en 2010 et qui m'a fait comprendre qu'il était possible d'aimer une personne encore plus fort qu'on pouvait l'imaginer...et ça, c'est grâce à toi Sandra...Merci!

Un grand Merci à mes parents, qui m'ont poussé tout au long de ma scolarité à passer d'une classe à l'autre, sans s'imaginer un jour que j'aurai un BAC+8... Merci maman de m'avoir défendu à chaque conseil de classe (et c'était pas facile) et de t'être battue pour mon passage en STL-Bio. Ton dévouement a fait ce que je suis désormais...Et vous êtes maintenant des grands-parents formidables !

Un grand Merci à la plus gentille des belle-mères, Brigitte, ainsi qu'à toute la famille de Normandie, qui a fait découvrir le beau terroir Normand (surtout la pomme et le gigot...) à une sympathique famille d'Ile de France.

Un grand Merci à notre Famille du Québec qui s'agrandit considérablement avec les années : Nico et Céline, Renaud et Peggy, et particulièrement Stéphane et Jess, nos plus fidèles partenaires d'escapades et de bonnes bouffes. Merci pour votre joie de vivre ! Merci aussi à Mick, Christelle et Julien qui nous ont accompagné pendant quelques années et ont partagé leur bonne humeur pour finalement rejoindre la France.

Merci à nos meilleurs amis de France, Florent, Loic, Gus et Romain, Delphine, Lucile, Stourmette et Nico, pour nos belles retrouvailles chaque année, où l'on dirait que le temps s'est arrêté pour continuer de fêter comme il y a 10 ans !

Je remercie ensuite mes partenaires de laboratoire présents et passés : Isabelle pour m'avoir permis de démarrer ma maîtrise dans de bonnes conditions d'organisation, Irfan pour la transmission de sa cuisine indienne, Gabriel notre journaliste sportif qui va bientôt troquer son hockey pour le soccer et Alejandro notre ré-inventeur de protocole.

Merci à nos collaborateurs, et particulièrement le Dr György Hutvágner et son étudiante Sarah Bajan.

Finalement, je tiens à remercier les membres du jury, Dr Barbara Papadopoulou, Dr Benoit Chabot et Dr Jacques Côté, pour avoir accepté d'évaluer ma thèse de doctorat. En espérant que vous allez apprécier...

Avant-Propos

Les travaux présentés dans ce manuscrit représentent six années d'effort effectuées durant ma maîtrise et mon doctorat. Au cours de ma maîtrise, j'ai été initié au modèle animal du nématode *C. elegans*. La culture, l'observation des phénotypes et la micro-injection ont été d'importantes étapes à intégrer pour débiter efficacement mon doctorat. Durant ces deux premières années, j'ai eu la chance parallèlement à mon projet de recherche de participer et terminer le projet de Marie-Eve Boisvert, ancienne étudiante à la maîtrise dans le laboratoire. Cette collaboration a abouti à un article publié en 2008 dans le journal « RNA journal », disponible en annexe 2 et présenté dans le CHAPITRE 2 :

■ *Two molecular features contribute to the Argonaute specificity for the microRNA and RNAi pathways in C. elegans.* Jannot G, Boisvert ME, Banville IH, Simard MJ.

Au cours de mon doctorat, un deuxième article scientifique a vu le jour en collaboration avec le Dr Hutvagner et son étudiante Sarah Bajan, avec qui je suis co-premier auteur. Cet article ne serait bien entendu pas publié sans la belle contribution des membres du laboratoire, Samir Bouasker, Nellie Giguère, Isabelle Banville et Sandra Piquet. Cet article publié en 2011 dans le journal « EMBO reports » est disponible en annexe 3 et présenté dans le CHAPITRE 3 :

■ *The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both C. elegans and humans.* Jannot G, Bajan S, Giguère NJ, Bouasker S, Banville IH, Piquet S, Hutvagner G, Simard MJ.

Il est important de noter que pendant ma formation, j'ai également eu le privilège de publier deux autres articles scientifiques en tant qu'auteur principal. Un article de revue paru dans le journal scientifique « Oncogene », disponible en annexe 1, ainsi qu'en collaboration avec mon collègue Alejandro Vasquez-Rifo, un article de méthode publié dans le journal « Methods in Molecular Biology » disponible en annexe 4 et présenté dans le CHAPITRE 5, intitulés respectivement :

■ *Tumour-related microRNAs functions in Caenorhabditis elegans.* Jannot G, Simard MJ.

■ *Argonaute pull-down and RISC analysis using 2'-O-methylated oligonucleotides affinity matrices.* Jannot G, Vasquez-Rifo A, Simard MJ.

Finalemment, j'ai participé aux projets d'Alejandro Vasquez-Rifo et de Bart Engels du laboratoire du Dr Hutvagner en contribuant aux articles présentés en annexes 5 et 6 intitulés respectivement :

■ *Developmental characterization of the microRNA-specific C. elegans Argonautes alg-1 and alg-2.* Vasquez-Rifo A, Jannot G, Armisen J, Labouesse M, Bukhari SI, Rondeau EL, Miska EA, Simard MJ.

■ *Polypyrimidine tract binding protein (hnRNP I) is possibly a conserved modulator of miRNA-mediated gene regulation.* Engels B, Jannot G, Remenyi J, Simard MJ, Hutvagner G.

Une immense Passion pour l'infiniment Petit...

« Dominique Jannot »

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Remerciements.....	iii
Avant-Propos	v
Liste des tableaux.....	xii
CHAPITRE 1 Introduction.....	20
1.1 Organisation génomique des microARNs.	22
1.2 Biosynthèse des transcrits primaires de microARNs.....	24
1.2.1 Transcription par l'ARN polymérase II.....	24
1.2.2 Régulation transcriptionnelle des microARNs	25
1.3 Maturation nucléaire des microARNs primaires.	26
1.3.1 Structure d'un microARN primaire	26
1.3.2 Le complexe Microprocesseur.....	27
1.3.3 Clivage du pri-miARN par le complexe Drosha/DGCR8.	27
1.3.4 Maturation atypique des microARNs primaires.	29
1.3.5 Régulation de l'activité du complexe Drosha/DGCR8.	30
1.3.5.1 Facteurs stimulant l'activité du complexe Microprocesseur	32
1.3.5.2 Facteurs inhibant l'activité du Microprocesseur.....	33
1.3.5.3 Régulation co-transcriptionnelle des microARNs.	34
1.3.6 Exportation cytoplasmique du pré-miARN par l'Exportin-5	35
1.4 Maturation cytoplasmique des précurseurs de microARNs	36
1.4.1 Organisation structurale de la protéine Dicer	37
1.4.2 Partenaires de l'enzyme Dicer	38
1.4.3 Reconnaissance et maturation du pré-miARN.....	38
1.5 Les protéines de la famille Argonaute	42
1.5.1 Généralités	42
1.5.2 Caractéristiques structurales des protéines Argonautes.....	44
1.5.2.1 Le domaine PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille)	45
1.5.2.2 Le domaine MID (MIDdle)	46
1.5.2.3 Le Domaine PIWI (P-element Induced WImpy testis).....	47
1.5.2.3.1 Mécanisme endonucléolotique des protéines Argonautes.....	47
1.5.2.4 Le domaine N-terminal	49
1.5.3 Formation du complexe effecteur miRISC.....	51
1.5.4 Sélection du brin guide du complexe RISC.....	51
1.6 Phase effectrice de la voie des microARNs.....	52
1.6.1 Reconnaissance de l'ARNm cible par les microARNs	52
1.6.1.1 Caractéristique du brin guide des microARNs	52
1.6.1.2 Caractéristiques de la séquence 3' non traduite des ARNm ciblés.....	54
1.6.2 Régulation post transcriptionnelle par les microARNs	56
1.6.2.1 Mécanisme d'initiation de la traduction	56
1.6.2.2 Répression traductionnelle durant l'étape d'initiation.....	57
1.6.2.3 Répression traductionnelle durant l'étape d'élongation	59
1.6.3 Mécanismes de dégradation des ARNm par les microARNs	61
1.6.4 La protéine GW182, composante de la voie des microARNs	61

1.6.4.1	Organisation structurale de la protéine GW182	62
1.6.4.2	Implication de GW182 dans la répression de la traduction.....	63
1.6.4.3	La protéine GW182 : une plateforme d'interaction pour les complexes de déadénylation	63
1.6.5	Modèle de régulation des ARNm par les microARNs	65
1.6.6	Facteurs influençant le mode de répression par les microARNs.....	66
1.6.6.1	Facteurs inhibant la phase effectrice de régulation par les microARNs...	66
1.6.6.2	Facteurs stimulant la phase effectrice de régulation par les microARNs.	66
1.7	Objectifs de la thèse de doctorat	67
CHAPITRE 2	Two molecular features contribute to the Argonaute specificity for the microRNA and RNAi pathways in <i>C. elegans</i>	70
	Avant-Propos	71
	Résumé.....	72
	Résumé.....	72
	Abstract.....	73
2.1	Introduction.....	74
2.2	Results and discussion	75
2.2.1	A small dsRNA trigger able to enter both miRNA and RNAi pathways	75
2.2.2	Mismatches in the dsRNA trigger increase the <i>let-7</i> rescue but circumvent the RNAi capacity.....	77
2.2.3	The dsRNA trigger is not the only molecular cue that guides the specific requirement of Argonaute proteins	79
2.2.4	The sorting of small RNAs may occur after Dicer cleavage	80
2.2.5	The dsRNA structure and their distinct molecular features affect Argonaute protein selection.....	81
2.3	Materials and methods	86
2.3.1	Design and preparation of dsRNA molecules.....	86
2.3.2	RNAi interference and rescued experiments	86
2.3.3	Worm strains.....	87
2.4	Acknowledgments	87
CHAPITRE 3	The Ribosomal Protein RACK1 is required for microRNA function of both <i>C. elegans</i> and humans	88
	Avant-Propos	89
	Résumé.....	90
	Abstract.....	91
3.1	Introduction.....	92
3.2	Results and Discussion	92
3.2.1	RACK1 interacts with components of the miRISC of <i>C. elegans</i>	92
3.2.2	RACK-1 is important for miRNA function in <i>C. elegans</i>	96
3.2.3	RACK1 interacts with the human miRISC.....	97
3.2.4	Human miRNA gene silencing requires RACK1	99
3.2.5	Alteration of RACK1 levels impairs miRNA and Argonaute association with translating ribosomes	101
3.3	Methods	103
3.3.1	Nematode methods	103
3.3.2	<i>C. elegans</i> polysomes fractionation.....	104
3.3.3	Human cells sucrose cushion.....	104

3.3.4	siRNA transfection in Human cells	104
3.4	Supplemental data.....	105
3.4.1	Supplemental figures	105
3.4.2	Materials and Methods.....	113
3.5	Acknowledgments	119
CHAPITRE 4	Analyse phénotypique systématique permettant la caractérisation des interacteurs de la protéine ALG-1 dans la voie des microARNs.....	121
	Avant propos.....	122
	Résumé.....	123
4.1	Introduction.....	124
4.2	Objectifs et mode opératoire.....	125
4.2.1	Objectifs.....	125
4.2.2	Mode opératoire.....	126
4.3	Résultats.....	127
4.3.1	Identification des partenaires de la protéine ALG-1 par criblage double- hybride chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	127
4.3.2	Analyses phénotypiques des cellules souches hypodermiques.....	129
4.3.3	Analyse de l'interaction génique avec le microARN <i>let-7</i>	131
4.3.4	Analyse de l'interaction génique avec les microARNs de la famille <i>let-7</i>	133
4.4	Conclusion	135
4.5	Matériels et méthodes	136
4.5.1	Souches de nématode <i>C. elegans</i> utilisées.....	136
4.5.2	Synchronisation des différentes populations de <i>C. elegans</i>	136
4.5.3	Perte de fonction des candidats par génétique inverse (RNAi).	137
4.5.4	Microscopie	137
CHAPITRE 5	Argonaute pull-down and RISC analysis using 2'-O-methylated oligonucleotides affinity matrices.....	139
	Avant-Propos	140
	Résumé.....	142
	Abstract.....	143
5.1	Introduction.....	144
5.2	Materials	145
5.2.1	<i>C. elegans</i> culture and extract preparation.....	145
5.2.2	Immobilized 2'-O-methylated oligonucleotide matrices.....	146
5.2.3	SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).	148
5.2.4	Western Blotting for Argonautes Associated to the RISC.	148
5.2.5	Total RNA extraction.....	149
5.2.6	Analysis of short RNA integrity by 12 % mini-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.....	149
5.2.7	Quantitative Real-Time PCR for <i>let-7</i> microRNA.	150
5.3	Methods (<i>see</i> Note 11).....	150
5.3.1	Preparation of agar NGM plate seeded with concentrated OP50.	151
5.3.2	Preparation of a synchronous <i>C. elegans</i> population.....	152
5.3.3	Preparation of the crude <i>C. elegans</i> extract.	153
5.3.4	<i>Let-7</i> microRNA pull-down and RISC analysis using 2'-O-methylated oligonucleotide affinity matrices (<i>see</i> Note 13).....	154
5.3.5	SDS-PAGE (8%) electrophoresis.	155

5.3.6	Western Blotting for ALG-1 protein.	156
5.3.7	Total RNA extraction.....	157
5.3.8	Preparation of 12 % Polyacrylamide Gel Electrophoresis.....	158
5.3.9	Quantitative Real Time PCR for <i>let-7</i> microRNA.....	159
5.4	Notes	160
5.5	Acknowledgments	162
CHAPITRE 6	Discussion.....	163
	Conclusion générale.....	187
	Bibliographie	189
ANNEXES	214

Liste des tableaux

Chapitre 4

Tableau 4-1 : Facteurs présentant une interaction forte avec la protéine Argonaute ALG-1 suite au criblage double-hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*..... 128

Chapitre 5

Tableau 5-1 : Techniques décrites dans le manuscrit « Argonaute Proteins, Methods and protocols ».....141

Chapitre 6

Tableau 6-1 : Prédiction des résidus sérine et thréonine phosphorylés de la protéine ALG-1 par les protéines kinases PKC.....178

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1-1 : Corrélation entre le degré de complexité structurale et le nombre de microARNs.....	21
Figure 1-2 : Distribution génomique des microARNs chez l'humain, la souris et le poisson zèbre.....	22
Figure 1-3 : Organisation génomique et rôle fonctionnel du cluster miR-17-92.....	24
Figure 1-4 : Structure d'un microARN primaire.....	27
Figure 1-5 : Clivage du microARN primaire par le complexe Microprocesseur.....	29
Figure 1-6 : Maturation des microARNs primaires dépendante ou non du complexe Drosha/DGCR8.....	30
Figure 1-7 : Cofacteurs du complexe Microprocesseur.....	31
Figure 1-8 : Interaction intramoléculaire entre le complexe Exportin-5/RanGTP et un précurseur de microARN.....	36
Figure 1-9 : Organisation structurale de la protéine humaine Dicer.....	37
Figure 1-10 : Modèle de reconnaissance d'un pri-miARN par Dicer.....	39
Figure 1-11 : Modélisation structurale de la protéine humaine Dicer.....	40
Figure 1-12 : Etapes séquentielles de maturation des microARNs.....	41
Figure 1-13 : Origine de l'appellation des protéines Argonautes.....	42
Figure 1-14 : Organisation structurale des protéines Argonautes.....	45
Figure 1-15 : Modélisation de l'activité de clivage des protéines Argonautes possédant une activité endonucléase.....	48
Figure 1-16 : Trajectoire envisagée des brins d'acide nucléique au delà de la position 16 de chaque côté du domaine N-terminal.....	50
Figure 1-17 : Maturation des complexes pré-RISC.....	52
Figure 1-18 : Différents types de sites de liaison aux microARNs.....	54
Figure 1-19 : Activation de l'ARNm par les protéines d'initiation de la traduction.....	57
Figure 1-20 : Mécanisme de régulation par les microARNs durant l'initiation de la traduction.....	59
Figure 1-21 : Mécanisme de régulation par les microARNs après l'initiation de la traduction.....	60
Figure 1-22 : Organisation des domaines de la protéine GW182 humaine (TNRC6A).....	62
Figure 1-23 : Recrutement des complexes PAN2-PAN3 et CCR4-NOT-1-CAF1 par GW182.....	64

Chapitre 2

Figure 2-1 : Chimeric dsRNA molecules trigger both microRNA and RNAi pathways in <i>C. elegans</i>	76
Figure 2-2 : The Argonaute proteins are sorted properly to their respective pathways.....	78
Figure 2-3 : Sorting of small RNAs occurs after Dicer cleavage.....	81
Figure 2-4 : Model for the Argonaute proteins selection in <i>C. elegans</i>	85

Chapitre 3

Figure 3-1 : RACK1 interacts with constituents of <i>Caenorhabditis elegans</i> and human miRISC.....	94
Figure 3-2 : ceRACK-1 affects level of miRNAs in an <i>alg-1</i> dependent manner.....	97
Figure 3-3 : RACK1 interacts with hAgo2 and miRNAs.....	99
Figure 3-4 : RACK1 is required for miRNA silencing in human cells.....	101
Figure 3-5 : RACK1 is important to recruit the miRISC to translating ribosomes.....	103
Figure S3-1 : ALG-1 interacts with ceRACK-1 in yeast two-hybrid but not with ALG-2 or three small and large ribosomal subunits.....	105
Figure S3-2 : ceRACK-1 interacts with constituents of the miRISC complex in <i>C. elegans</i>	106
Figure S3-3 : RACK1 is a highly conserved scaffolding protein.....	107
Figure S3-4 : RACK1 does not influence mRNA level of miRNA targets.....	108
Figure S3-5 : RACK1 is required for miRNA-mediated gene repression.....	109
Figure S3-6 : RPS3 is not involved in miRNA-mediated gene.....	110
Figure S3-7 : RACK1 is not required for RNAi.....	111
Figure S3-8 : Sucrose gradient fractionations of <i>C. elegans</i> samples and knockdown efficiency of RACK1.....	112

Chapitre 4

Figure 4-1 : Contrôle du développement larvaire chez <i>C. elegans</i> par les microARNs...	125
Figure 4-2 : Défaut de régulation des cellules souches hypodermiques.....	130
Figure 4-3 : Augmentation du phénotype de la souche mutante thermosensible codant pour le microARN <i>let-7</i> à température permissive.....	132
Figure 4-4 : Intéraction génétique entre Y71H2AM.4 et les microARNs de la famille <i>let-7</i>	134
Figure 4-5 : La perte de fonction de Y71H2AM.4 abolit la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm rapporteur <i>hbl-1::gfp</i>	135

Chapitre 5

Figure 0-1 : Representative backbone of a single stranded 2'-O-methylated oligonucleotide.....	145
Figure 0-2 : Let-7 2'-O-methylated oligonucleotides design.....	147
Figure 0-3 : Experimental procedure.....	151
Figure 0-4 : Western blot analysis of the GFP-tagged ALG-1 protein associated with let-7 microRNA.....	157
Figure 0-5 : Assessment of the integrity of the 5.8S, and 5S rRNAs.....	159
Figure 0-6 : qRT-PCR results.....	160

Chapitre 6

Figure 6-1 : Molécule d'ARNdb 100% complémentaire introduite par micro-injection dans le nématode <i>C. elegans</i>	165
---	-----

Figure 6-2 : Molécule d'ARNdb introduite par micro-injection dans le nématode <i>C. elegans</i>	165
Figure 6-3 : Domaines N-terminaux des protéines Argonautes ALG-1 et ALG-2.....	171
Figure 6-4 : Représentation de la liaison de RACK1 à la petite sous-unité ribosomale 40S.....	173
Figure 6-5 : Modèle d'organisation des polysomes sur un ARNm.....	176
Figure 6-6 : Modèle d'interaction entre les sites de liaison aux microARNs et le complexe miRISC/RACK1.....	177
Figure 6-7 : Représentation de l'activité de <i>lgy-6</i> sur la spécialisation des neurones ASEL et ASER.....	182
Figure 6-8 : Affinité du peptide λ N issu du bactériophage λ pour la séquence d'ARN Box-B.....	184
Figure 6-9 : Efficacité du système de recrutement artificiel de la protéine ALG-1 sur un ARNm rapporteur.....	185

Liste des abréviations

µg : microgramme
 µl : microlitre
 2'-O-me : 2'-O-methyl
 7mG : 7-methylGuanosine
 A : adénine
 A : adénosine
 ADAR : Adenosine Deaminases Acting on RNA
 ADN : Acide DésoxyriboNucléique
 ADNc : ADN complémentaire
 APOBEC3G : APOlipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide-like
 ARN : Acide RiboNucléique
 ARN pol II : ARN polymérase II
 ARNdb : ARN double brin
 ARNm : ARN messenger
 ARNnc : ARN non codant
 ARS2 : Arsenite-Resistance Protein 2
 ASEL : Antagonistic Sensory Left
 ASER : Antagonistic Sensory Right
 Asp : Acide aspartique
 BMP : Bone Morphogenic Protein
 BRCA1 : Breast Cancer 1
 BSA : Bovine Serum Albumine
 C. elegans : Caenorhabditis elegans
 CAF1 : CCR4 Associated Factor 1
 CCR4 : Carbon Catabolite Repression 4
 D : Acide aspartique
 DBD : DNA Binding Domain
 DCP : DeCapping Protein
 DDE : asp/asp/glu
 DDH : asp/asp/his
 dev. : Developmental
 DGCR8 : DiGeorge syndrome Critical Region gene 8
 DND1 : Dead end
 dsRNA : double-stranded RNA
 DTT : DiThioThréitol
 DUF : Domain of Unknown Function
 E : Acide glutamique

ECL : Enhanced ChemiLuminescence
EDD : E3 isolated by Differential Display
EDTA : EthyleneDiamineTetraAcetic acid
ER α : Estrogen Receptor α
FAM : 6-carboxyfluorescein
GFP : Green Fluorescent Protein
GST : Glutathione S-Transferase
HA : HaemAgglutinin
HEPES : 4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid
His : Histidine
hnRNP A1 : Heterogeneous Nuclear RiboNucleoProtein A1
HOX : HomeobOX
HRP : HorseRadish Peroxidase
HSC : Heat Shock Cognate
HSP : Heat Shock Protein
HuR : Human antigen R
I : Inosine
IP : ImmunoPrecipitation
IRES : Internal Ribosome Entry Site
K : Lysine
KCl : Potassium Chloride
KDa : kilo Dalton
KSRP : KH-type Splicing Regulatory Protein
L : Leucine
lin-28 : abnormal cell Lineage -28
Loqs : Loquacious
M : molaire
MDa : Méga Dalton
MEM : Minimal Essential Medium
Mg²⁺ : ion Magnésium
MgCl₂ : Magnesium chloride
miARN : microARN, brin guide
miARN* : microARN, brin passager
mid : middle
miRISC : microRNA-Induced Silencing Complex
miRNP : micro-RiboNucleoProtein
mM : millimolaire
n : number
NA : Non Applicable
Na N₃ : Azide de sodium

NF : Nuclear Factor
ng : nanogramme
NOT1 : Negative On Tata less 1
NPC : Nuclear Protein Complex
OB : oligonucleotide/Oligosaccharide Binding
ORF : Open Reading Frame
PABPC : Poly-A Binding protein C-terminal
PABP : Poly-(A)-Binding Protein
PACT : PKR ACtivor Protein
PAIP2 : PABP-Interacting Proteins 2
PAM2 : PABPC-interacting Motif 2
PAN3 : Poly A Nuclease
PAZ : Piwi/Argonaute/Zwille
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
piARNs : Piwi Interacting RNAs
PIWI : P element-Induced Wimpy testes
PKR: Protein Kinase RNA-activated
Pr. : professeur
pré-miARN : précurseur de microARN
pri-miARN : microARN primaire
PUF : PUmilio Family
PVDF : PolyVinylidene Fluoride
Q : glutamine
R : Arginine
RACK-1 : Receptor for Activated C-Kinase-1
RanGTP : Guanosine triphosphatase
rde-4 : RNAi DEficient-4
RISC : RNA-Induced Silencing Complex
RNAi : RNA interference
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SF2/ASF : Splicing Factor 2 / Alternative Splicing Factor
siARN : small interfering ARN
siRISC : small interfering RNA-Induced Silencing Complex
snoRNA : Small nucleolar RNAs
SSC : Saline Sodium Citrate
TBS-T : Tris Buffer Salt-Tween
TCA : TriChloroAcetate
TDP-43 : TAR DNA-binding Protein-43
TDRD7 : TuDoR Domain containing
TGF- β : Transforming Growth Factor - β

TNRC6A : TriNucleotide Repeat-Containing gene 6A
TRBP : Transactivating Response (TAR) RNA-Binding Protein
TRIM71 : TRIPartite Motif
ts : thermosensitive
Tudor-SN : Tudor Staphylococcal Nuclease
U : uridine
UBA : UBiquitin Associated like domain
UT : Unité de Transcription
UTR : UnTranslated Region
W : tryptophane
WAGO : Worms ArGOnaute-specific group
WT : Wild Type
XRN : eXoRiboNuclease

CHAPITRE 1

Introduction

Préambule

Notre conception moderne du gène est née en 1958 lorsque le Pr. Francis Crick proposa le « dogme central de biologie moléculaire » (Crick, 1970; Crick, 1958) :

« La transmission de l'information génique est initiée par différents segments de la molécule d'ADN, véhiculée ensuite par l'ARN messenger pour produire la molécule effectrice responsable du phénotype, la protéine. »

Le terme gène se voit ainsi simplement défini comme une « séquence codant pour une protéine » et celle-ci devient désormais la composante fonctionnelle essentielle d'un organisme. Mais l'avènement du séquençage et des techniques d'analyse à grande échelle des génomes a jeté un paradoxe dans le monde de la biologie moléculaire et du développement. Très peu de concordances sont observées entre le degré de complexité développementale, qui est considérablement variable chez les organismes supérieurs, et le nombre de « séquences codant pour des protéines ». De plus, à l'inverse des organismes procaryotes ou les variations phénotypiques corrént massivement avec la nature du protéome (Hayashi et al., 2001), celui-ci n'est pas une signature parfaite des organismes eucaryotes (Mattick and Gagen, 2001). Ainsi, une possible explication de ce paradoxe serait que le niveau de complexité d'un organisme supérieur serait étroitement lié au niveau d'orchestration des nombreux facteurs de régulation qui permettent d'assembler et de moduler les composantes fonctionnelles de la cellule (Mattick, 2007; Sempere et al., 2006). Parmi ces facteurs on retrouve une nouvelle classe d'ARNs non-codants, la famille des microARNs, qui sont considérés comme des éléments déterminants dans l'évolution de la complexité des organismes (Lee et al., 2007). En effet, comme le schématise la Figure 1-1, le nombre de ces molécules coïncide avec le degré de complexité structurale des

organismes supérieurs, suggérant alors une contribution des microARNs dans l'établissement de la diversification des espèces.

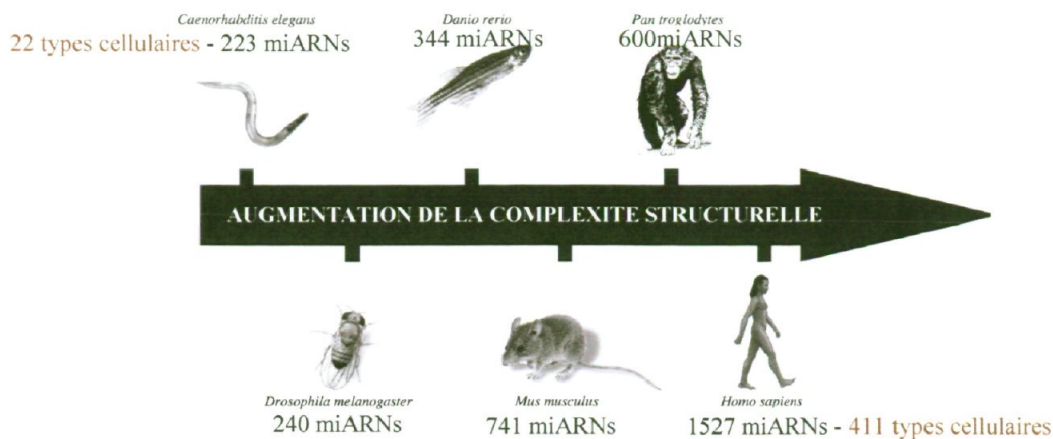


Figure 1-1 : Corrélation entre le degré de complexité structurale et le nombre de microARNs.

Le nombre de microARNs mentionné correspond aux données les plus récentes (avril 2012) disponibles sur le site internet de base de donnée « miRbase » (<http://www.mirbase.org/>). La figure indique le nombre de types cellulaires du nématode *C. elegans* et de l'humain, illustrant l'évolution du degré de complexité structurale par rapport au nombre de microARNs présents par organisme.

Figure adaptée de (Lee et al., 2007)

Les microARNs se caractérisent par de courtes séquences d'ARN d'environ 21-23 nucléotides capables de reconnaître spécifiquement par un appariement de base classique de type Watson-Crick la séquence d'un ARN messager puis de moduler son expression. Ainsi, les microARNs orchestrent le dosage approprié de presque la moitié des ARNm de la cellule et participent activement à une variété de processus biologiques critiques comme le développement embryonnaire, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que l'apoptose. Finalement, leurs rôles déterminants dans l'évolution des processus cancéreux et de maladies diverses supportent leur fonction d'éléments régulateurs majeurs dans le maintien de l'homéostasie cellulaire chez les organismes eucaryotes supérieurs. Ainsi, l'étude des mécanismes de régulation par les microARNs ainsi que leur biogenèse est vite devenue indispensable pour tenter de comprendre encore mieux le fonctionnement de la cellule...

...La thèse présentée ici contribue à élargir un peu plus les connaissances de ce mode passionnant de régulation des gènes.

1.1 Organisation génomique des microARNs.

En 2011, 1527 microARNs ont été recensés dans le génome humain. (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa). Leur organisation génomique s'avère être hétérogène et variable d'un organisme à l'autre. Chez l'humain, environ 50% des microARNs ont été cartographiés dans des régions intergéniques distantes des gènes annotés (Rodriguez et al., 2004) alors que les 50% restants sont localisés dans des régions introniques d'unités de transcription (UTs) connues codant ou non pour des protéines (Rodriguez et al., 2004) (Figure 1-2). Parmi eux, certains microARNs se retrouvent localisés dans des régions codant pour des protéines (Berezikov et al., 2011; Maselli et al., 2008).

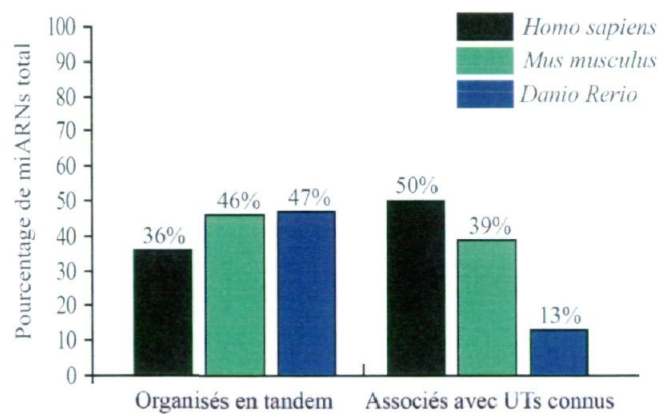


Figure 1-2 : Distribution génomique des microARNs chez l'humain, la souris et le poisson zèbre.

Les premier et second groupes de mesure représentent respectivement le pourcentage de miARNs organisés en tandem et le pourcentage de miARNs associés avec des unités de transcription connues à travers trois génomes distincts (Rodriguez et al., 2004), (Thatcher et al., 2008).

Figure adaptée de (Lee et al., 1993; Olena and Patton, 2010)

Alors que les microARNs localisés dans des régions intergéniques possèdent leur propre promoteur transcriptionnel, les microARNs encodés dans des introns sont majoritairement co-exprimés avec leur gène hôte. D'ailleurs, plusieurs exemples illustrent la présence de boucles de régulation entre microARNs et gènes hôtes suite à leur expression coordonnée (Barik 2008, van Rooij et al 2007, Rodriguez et al 2004). D'autre part, certains microARNs situés dans des régions intergéniques peuvent également posséder des activités régulatrices sur les gènes qui les entourent. La régulation des gènes HomeoBox (HOX) est un très bel

exemple qui illustre ce type de relation. Les gènes HOX sont regroupés en différents « *clusters* » ayant la particularité d'être exprimés de façon colinéaire dans l'espace et le temps pour déterminer l'établissement de l'axe antéro-postérieur des vertébrés. Pour maintenir adéquatement ce système d'expression colinéaire, d'importants mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels existent. Récemment, il a été démontré que les séquences codant pour les microARNs miR-10 et miR-196, qui se retrouvent respectivement entre les gènes Hox4 - Hox5 et Hox9 - Hox10, font partie des importants régulateurs de cette famille de gènes durant le développement embryonnaire (McGlenn et al., 2009).

Les séquences codant pour les microARNs primaires sont transcrites soit sous forme monocistronique soit polycistronique pour être ensuite maturées en microARNs individuels matures (Figure 1-3). De façon très intéressante, bien que les microARNs organisés en tandem soient souvent de séquence homologue (Yu et al., 2006), certains « *clusters* » produisent des microARNs de familles différentes où chacun peut agir indépendamment (Ota et al., 2004). Par exemple, l'amplicon 13q31 que l'on retrouve amplifié dans différents lymphomes humains (Ota et al., 2004), contient le « *cluster* » *mir-17-92* qui encode pour 6 microARNs de 4 familles différentes (Tanzer and Stadler, 2004). Comme l'illustre la Figure 1-3, chacune de ces familles de microARNs agit de façon soit indépendante, soit coordonnée, pour être responsable du caractère oncogénique de l'amplicon 13q31. Ainsi, l'expression du « *cluster* » *mir-17-92*, désigné maintenant sous le pseudonyme de *oncomir-1*, illustre parfaitement l'impact fonctionnel d'une organisation génomique de ce type sur les processus biologiques d'un organisme (He et al., 2005).

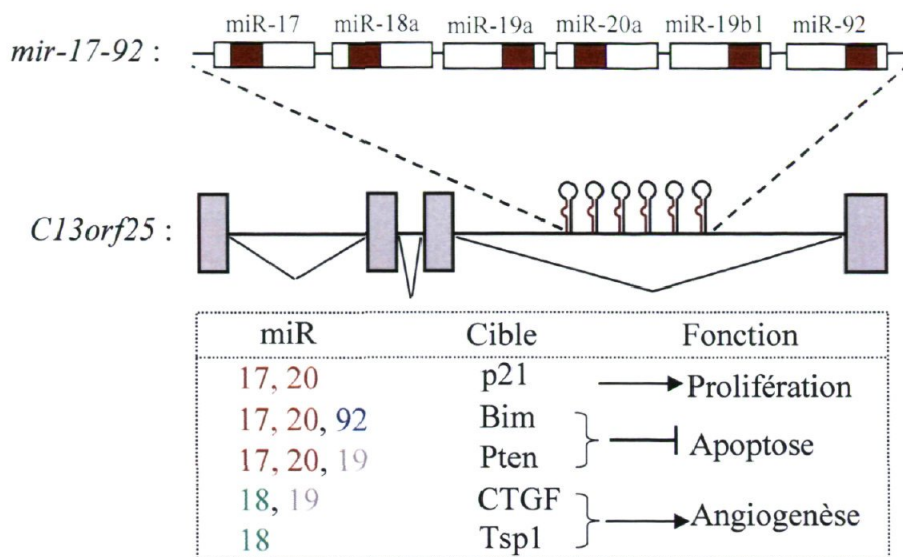


Figure 1-3 : Organisation génomique et rôle fonctionnel du « cluster » *miR-17-92*.

miR-17-92 contient six miARNs organisés en tandem regroupés dans la troisième région intronique du transcrit *C13orf25* situé dans la région 13q31.3 du chromosome 13 humain.

Les six microARNs, miR17, 18a, 19a, 20a, 19b-1 et 92a-1 sont issus de 4 familles différentes représentées par le code couleur suivant : Rouge, famille miR-17 ; Bleu, famille miR-92 ; Gris, famille miR-19 ; Vert, famille miR-18. Dépendamment du type cellulaire et du contexte physiologique, *mir-17-92* peut induire la prolifération cellulaire (Hayashita et al., 2005; Lu et al., 2005), augmenter l'activité angiogénique (Dews et al., 2006; Suarez et al., 2008), et inhiber l'apoptose (Xiao et al., 2008).

1.2 Biosynthèse des transcrits primaires de microARNs

1.2.1 Transcription par l'ARN polymérase II

Chez les vertébrés, les gènes codant pour les protéines ou les long ARNs non codants sont majoritairement transcrits par l'ARN polymérase II (Kornberg, 1999). Initialement, les microARNs étaient prédits pour être transcrits par l'ARN polymérase III responsable de la transcription de la plupart des courts ARNs non codants (ARNs de transfert et ARNs ribosomaux 5S). Cependant, leur organisation dans le génome sous forme polycistronique, suggérant l'expression d'un transcrit de taille élevée, ainsi que leur présence dans des portions introniques d'unités de transcription connues codant pour des protéines, suggérait

une transcription par l'ARN polymérase II. Désormais plusieurs évidences expérimentales ont confirmé ce mode de transcription, comme la découverte d'une association physique entre l'ARN pol II et le promoteur du « cluster » *mir-23a-27a-24-2* (Lee et al., 2004a), ou bien encore l'observation d'une sensibilité élevée à l' α -amanitine de l'expression transcriptionnelle des microARNs, un inhibiteur spécifique de l'ARN pol II (Lee et al., 2004a). Finalement, à l'image de la grande majorité des ARNs pré-messagers eucaryotes, les caractéristiques structurales des transcrits primaires de microARNs disposant d'un résidu 7-méthyl-guanosine ainsi que d'une queue polyadénylée à leurs extrémités 5' et 3' confirment leur mode de transcription par l'ARN polymérase II (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004a). Cependant, il existe certaines exceptions comme les microARNs miR-515-1, miR517a, miR-517c et miR-519a-1 qui sont co-exprimés aux côtés des éléments répétés transposables Alu connus pour être transcrits par l'ARN polymérase III (Borchert et al., 2006).

1.2.2 Régulation transcriptionnelle des microARNs

La régulation transcriptionnelle des microARNs est une phase majeure dans le contrôle de leur biosynthèse. Compte tenu de l'importance fonctionnelle des microARNs dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et de leur implication dans la formation des cancers (Volinia et al., 2006), il est facile de s'imaginer qu'un dérèglement dans leurs niveaux de transcription peut être une des causes d'apparition de ces cancers. Plusieurs microARNs sont en effet retrouvés sous le contrôle de facteurs de transcription oncogéniques ou suppresseurs de tumeurs. Ainsi, le facteur de transcription oncogénique Myc active ou réprime de nombreux microARNs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose (Chang et al., 2008; Dews et al., 2006; He et al., 2005). Par ailleurs, on retrouve également le contrôle épigénétique de certains locus codant pour des microARNs, comme l'hyperméthylation du locus codant pour miR-203 fréquemment associée à certaines tumeurs hématopoïétiques (Bueno et al., 2008). Inversement, le contrôle de l'activité transcriptionnelle de la famille miR-34 par la protéine p53 permet l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose, jouant ainsi le rôle de suppresseur de tumeurs (He et al., 2007).

1.3 Maturation nucléaire des microARNs primaires.

La transcription par l'ARN polymérase II des séquences codant pour des microARNs génère un long transcrit appelé microARN primaire ou pri-miARN caractérisé par la présence de structures secondaires en forme de « tige boucle ». Cette signature moléculaire est cruciale puisqu'elle va être reconnue spécifiquement comme un substrat de clivage lors de la maturation du pri-miARN par le complexe Microprocesseur (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Lee et al., 2003).

1.3.1 Structure d'un microARN primaire

Les pri-miARNs, dépendamment de leur organisation génomique, contiennent une ou plusieurs structures en forme de tige boucle (Rodriguez et al., 2004; Thatcher et al., 2008) comportant trois régions distinctes importantes pour l'efficacité de maturation du microARN primaire (Han et al., 2006; Zhang and Zeng, 2010) (**Figure 1-4**). Typiquement, un pri-miARN est composé d'une boucle simple brin de taille variable (environ 10 nucléotides). On retrouve également une tige centrale double brin comportant des mésappariements, contenant la séquence du microARN mature, d'une longueur approximative de trois tours d'hélice (environ 30 paires de bases). Enfin, deux segments basaux d'ARN simple brin flanquent la jonction de la tige. Ces caractéristiques structurales sont essentielles puisqu'elles vont d'une part déterminer et discriminer à leur avantage la reconnaissance du complexe de maturation (Microprocesseur) par rapport aux multiples structures secondaires semblables présentes dans le noyau (Pedersen et al., 2006) et d'autre part permettre une maturation précise du pri-miARN.

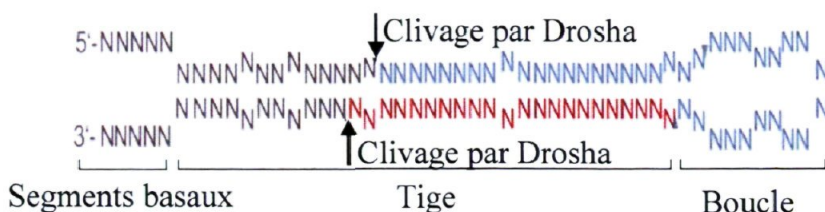


Figure 1-4 : Structure d'un microARN primaire.

Trois régions distinctes composent le pri-miARN. La boucle, une partie centrale double brin correspondant à la tige comportant la séquence du microARN mature (en rouge), et les segments basaux simple brin. Les sites de clivage par l'enzyme Drosha sont représentés par des flèches verticales.

Figure adaptée de (Han et al., 2006)

1.3.2 Le complexe Microprocesseur.

Le complexe Microprocesseur est constitué principalement des protéines Drosha et DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*) (Han et al., 2004). Drosha est une protéine de 160 kilodaltons composée de deux domaines de type RNase III responsables de l'activité endonucléase, et d'un domaine de liaison à l'ARN double brin (Han et al., 2004). Son cofacteur, la protéine DGCR8, connue sous le nom de Pasha chez la drosophile et *C. elegans*, ne possède pas d'activité catalytique mais est composée de deux domaines de liaison à l'ARN double brin essentiels pour la liaison du pri-miARN (Landthaler et al., 2004). Un domaine WW riche en résidus tryptophane est connu pour être un module d'interaction avec les domaines protéiques riches en proline (Macias et al., 2002).

1.3.3 Clivage du pri-miARN par le complexe Drosha/DGCR8.

La précision du clivage par l'hétérodimère Drosha-DGCR8 est absolument déterminante pour la production finale d'un microARN mature fonctionnel. Un positionnement non précis du complexe aurait pour conséquence la production de pseudo précurseurs de microARNs dont la structure ne serait pas compatible avec la suite de leur biosynthèse (Figure 1-5). Par exemple une structure empêchant sa reconnaissance par la machinerie d'export nucléaire, ou inhibant l'activité subséquente de clivage dans le cytoplasme.

Finalement, le décalage d'un seul nucléotide pourrait influencer la force d'appariement entre les deux séquences du duplex de microARN, entraînant le choix du mauvais brin à être incorporé dans le complexe effecteur (voir section 1.5.4 Sélection du brin guide du complexe RISC). Ainsi, la coopération entre Drosha et DGCR8 est essentielle pour la maturation d'un microARN primaire correct. Pour ce faire, le microARN primaire va être reconnu spécifiquement par la protéine DGCR8 au niveau de la jonction entre le segment basal simple brin d'ARN et la tige double brin. Ce positionnement spécifique de l'hétéroduplex à la base de la tige du pri-miARN permet de placer adéquatement le site de clivage de la protéine Drosha au niveau de la tige d'ARNdb. Suite à cette reconnaissance, la tige d'ARNdb est clivée par Drosha à une distance moyenne de 11 paires de bases de la jonction entre le segment basal et la tige (Han et al., 2006). L'importance de la boucle a récemment été démontrée, puisqu'elle augmenterait l'efficacité de clivage (Zhang and Zeng, 2010). De ce clivage il va résulter un fragment en tige boucle tronqué d'approximativement 70 nucléotides, comportant deux nucléotides flottants en 3' correspondant à la signature caractéristique des produits de clivage des enzymes appartenant à la classe des RNases III. Ce nouveau fragment généré par le complexe Microprocesseur est appelé précurseur de microARN ou pré-miARN.

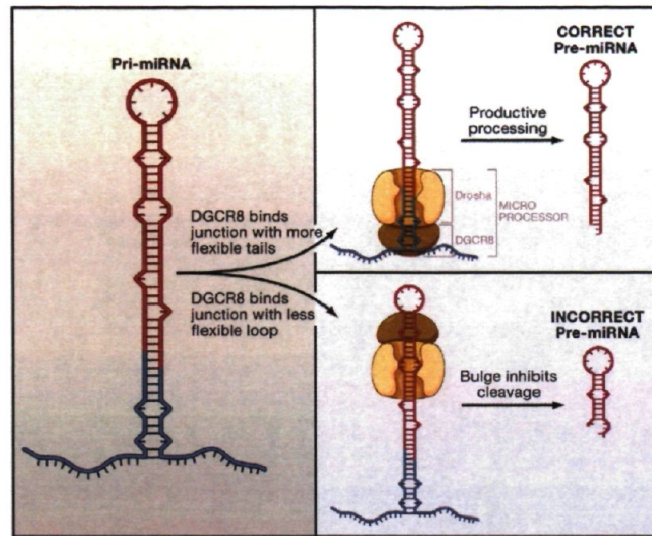


Figure 1-5 : Clivage du microARN primaire par le complexe Microprocesseur.

Les caractéristiques structurales du microARN primaire déterminent la précision de clivage du complexe Microprocesseur. L'affinité de liaison de la protéine DGCR8 au niveau de la jonction des segments basaux d'ARN simple brin du microARN primaire permet d'accommoder précisément la protéine Drosha à environ 11 paires de bases de l'extrémité de la tige, pour effectuer le clivage et produire un microARN primaire correct d'environ 70 nucléotides. Une reconnaissance non spécifique de la structure du microARN primaire engendrerait la maturation d'un pri-miARN aberrant non fonctionnel.

Figure adaptée de (Seitz and Zamore, 2006)

1.3.4 Maturation atypique des microARNs primaires.

La maturation des ARNs pré-messagers par la machinerie d'épissage génère des séquences exoniques codant pour des protéines ainsi que des séquences introniques dont les implications fonctionnelles restent indéterminées. Certaines de ces séquences encodent pour des petits ARNs nucléaires impliqués dans la maturation des ARNs ribosomiaux (Bachelier et al., 1995; Sollner-Webb, 1993). En 2007, une nouvelle fonction a été attribuée à ces séquences introniques. En effet, il a été montré que certains produits d'épissage issus de très courtes séquences introniques arborent une structure en forme de tige boucle, semblable à celle des précurseurs de microARNs (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007). Générés indépendamment de l'activité du complexe Drosha-DGCR8 (Babiarz et al., 2008; Martin et al., 2009) ces pré-miARNs empruntent ensuite la voie de biogenèse des microARNs, pour générer ultimement un microARN mature fonctionnel (Figure 1-6).

Chez la souris, ces courts ARNs appelés mirtrons représenteraient entre 5 et 10% des gènes codant pour des microARNs (Berezikov et al., 2007; Glazov et al., 2008).

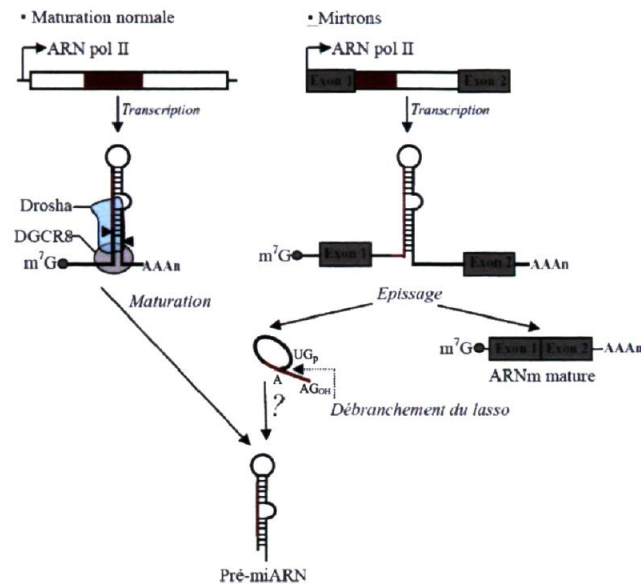


Figure 1-6 : Maturation des microARNs primaires dépendante ou non du complexe Drosha/DGCR8.

Le schéma de gauche représente la maturation typique d'un microARN primaire par le complexe microprocesseur composé de DGCR8 en gris et Drosha en bleu. Le schéma de droite représente le cas des mirtrons où la séquence intronique d'un microARN primaire est épissée par la machinerie d'épissage des ARNs pre-messagers.

Finalement, la diversification des sources de microARNs c'est à nouveau élargit puisque récemment, le séquençage des courts ARNs à partir de cellules souches embryonnaires de souris mutantes pour Drosha/DGCR8 a permis d'identifier certaines classes de microARNs générés de façon indépendante du complexe Microprocesseur en plus des mirtrons (Babiarz et al., 2008). Parmi eux, on retrouve les microARNs miR-1839 et miR-1983 issus respectivement de la maturation des ARNs de transfert et des courts ARNs nucléolaires (snoRNAs) (Ender et al., 2008).

1.3.5 Régulation de l'activité du complexe Drosha/DGCR8.

La purification de la protéine Drosha par chromatographie d'affinité suivie d'une étape de séparation de complexe par filtration sur gel a révélé la présence du complexe

Microprocesseur (Drosha-DGCR8) ainsi que d'un deuxième gros complexe de 2MDa regroupant une vingtaine de partenaires protéiques de Drosha (Gregory et al., 2004). La présence de ces nombreux facteurs protéiques associée au fait que le niveau de microARNs matures ne corrèle pas toujours avec celui des pri-miARNs laisse supposer l'existence de mécanismes de contrôle post-transcriptionnel des pri-miARNs (Obernosterer et al., 2006; Thomson et al., 2006; Wulczyn et al., 2007). En effet, ces dernières années, certaines des protéines accessoires co-purifiées avec Drosha ont été caractérisées comme des éléments de stimulation ou d'inhibition de l'activité du complexe Microprocesseur (Figure 1-7). Cependant, le détail moléculaire de ces modulations est souvent inconnu. D'autre part, la plupart de ces modulateurs agissent de façon très spécifique, suggérant pour l'instant l'absence de modulateur universel.

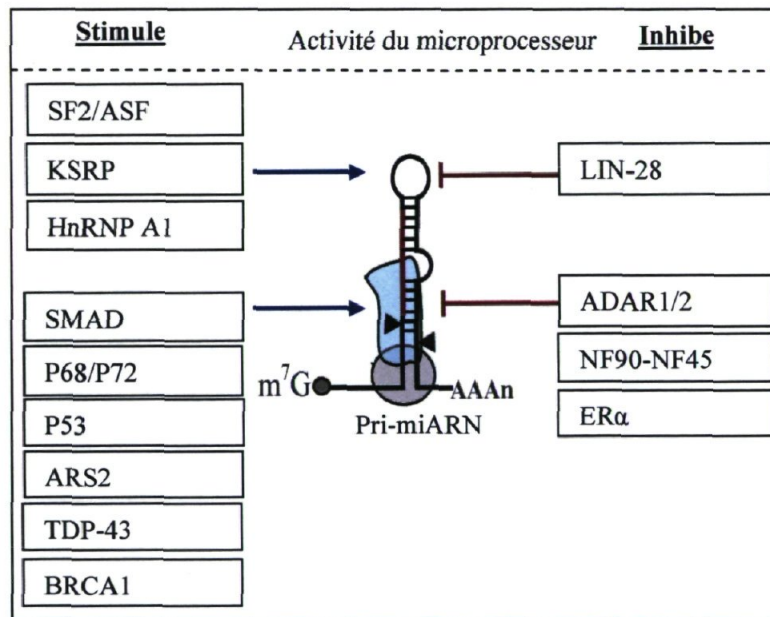


Figure 1-7 : Cofacteurs du complexe Microprocesseur.

Les protéines stimulatrices de l'activité de clivage de la protéine Drosha (représentée par les deux flèches pleines noires) sont énumérées dans la partie de gauche. Cette stimulation peut se faire par contact direct avec la protéine Drosha (en bleu) ou par l'intermédiaire du microARN primaire. À l'inverse, les protéines inhibant cette activité sont énumérées dans la partie de droite.

Les détails de ces stimulations et inhibitions sont respectivement décrits dans les sections 1.3.5.1 et 1.3.5.2. La protéine DGCR8 est schématisée en gris.

1.3.5.1 Facteurs stimulant l'activité du complexe Microprocesseur

Parmi les protéines stimulant l'activité du complexe Drosha/DGCR8, on retrouve les protéines **p68** et **p72** qui font partie de la famille des « *DEAD-Box* » hélicases d'ARN et sont requises pour la maturation de certains microARNs primaires *in vitro* en interagissant avec Drosha (Fukuda et al., 2007). La protéine **TDP-43** (« *TAR DNA-binding Protein-43* ») facilite la maturation post-transcriptionnelle des microARNs primaires pri-miR-132, 143, 558, 574, 17, 423 et 766 en interagissant soit directement avec leur séquence soit par l'intermédiaire de Drosha. La réduction des niveaux de miR-132 et miR-132* suite à l'altération de TDP-43 corrèle avec une atténuation de la croissance neuronale de neuroblastomes en cours de différenciation (Kawahara and Mieda-Sato, 2012). La protéine suppresseur de tumeur **BRCA1** (« *BR*east *C*ancer *1* ») a récemment été identifiée comme un partenaire du complexe Microprocesseur possédant la capacité de lier certains microARNs primaires via son domaine de liaison à l'ADN (DBD) (Kawai and Amano, 2012). Parmi ces microARNs primaires, on retrouve les pri-miR-16-1, *let-7a* et miR-145 connus pour être dérégulés dans des lymphomes (Cimmino et al., 2005), cancers des poumons (Johnson et al., 2005) et du colon (Slaby et al., 2007) respectivement.

Certains cofacteurs du complexe Microprocesseur stimulent l'activité de maturation des microARNs primaires suite à un stimulus externe comme les protéines de la famille **SMAD** retrouvées associées au complexe p68/Drosha/DGCR8 pour activer la biosynthèse du pri-miR-21 suite à la stimulation au TGF- β (« *Transforming Growth Factor* ») ou BMP (« *Bone Morphogenic Protein* »). L'augmentation subséquente de miR-21 permet la différenciation des muscles vasculaires lisses en cellules contractiles (Davis et al., 2008). Cette stimulation de l'activité enzymatique de Drosha résulte de la reconnaissance d'une séquence consensus retrouvée dans la tige du pri-miARN par les protéines SMAD fournissant alors une plateforme d'interaction favorable pour l'activité du complexe Microprocesseur (Davis et al., 2010). Suite aux dommages à l'ADN, la protéine suppresseur de tumeur **p53** se retrouve liée au complexe Microprocesseur et augmente l'activité de maturation post-transcriptionnelle d'un certain nombre de microARNs primaires comme miR-16-1, miR-143 et miR-145, ayant pour conséquence directe le blocage de la prolifération cellulaire. De manière intéressante, l'interaction de p53 avec

Drosha nécessite la présence des protéines p68 et p72 pour stimuler l'activité de maturation (Suzuki et al., 2009).

1.3.5.2 Facteurs inhibant l'activité du Microprocesseur.

La protéine **Lin-28** (« *abnormal cell Lineage* ») régule spécifiquement la maturation des microARNs de la famille *let-7* grâce à sa haute affinité pour une courte séquence retrouvée dans la structure en forme de boucle de ces microARNs primaires (Newman et al., 2008; Viswanathan et al., 2008). Cette liaison interfère avec le clivage de Drosha et donc la maturation en précurseurs de microARNs. Chez *C. elegans*, il a été montré que cette interaction se fait de façon cotranscriptionnelle, supportant un peu plus encore le couplage entre la transcription et la régulation de microARNs primaires (Van Wynsberghe et al., 2011). La régulation de Lin-28 est fondamentale d'un point de vue développemental. En effet, son activité inhibitrice permet de garder un état pluripotent et d'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires. Durant le développement précoce, l'évolution en cellules différenciées va corréluer avec la diminution du niveau de Lin-28 et l'augmentation du niveau des microARNs matures de la famille *let-7* (Viswanathan et al., 2008). Ainsi, le fort caractère oncogénique de la protéine Lin-28 implique l'axe de régulation Lin-28/*let-7* dans 15% des lignées cancéreuses répertoriées par l'Institut National du Cancer (NCI-60) (Viswanathan et al., 2009). Les protéines **NF90-NF45** (« *Nuclear Factor* ») inhibent la maturation des microARNs primaires, et par conséquent induisent l'accumulation d'une grande quantité de pri-miARNs. Cette inhibition s'explique par la forte affinité de l'hétérodimère NF90-NF45 à la tige de certains microARNs primaires, empêchant ainsi l'accessibilité au complexe Microprocesseur (Sakamoto et al., 2009). La protéine ER α (« *Estrogene Receptor α* ») s'associe avec les protéines Drosha/p68/p72 pour forcer la dissociation du complexe Microprocesseur des pri-miR145, -195, -16, et -190 et ainsi inhiber leur maturation (Yamagata et al., 2009). Finalement, on retrouve les protéines **ADAR1** et **ADAR2** (« *Adenosine Deaminases Acting on RNA* ») impliquées dans les mécanismes de modifications post-transcriptionnelles des ARNs doubles brins par édition de séquence chez les organismes eucaryotes (« *RNA editing* »). Ces deux enzymes catalysent la déamination de l'adénosine en inosine (« *A-to-I editing* ») (Gerber and Keller, 2001). Récemment, il a été prédit qu'environ 15% des microARNs primaires seraient ciblés

par les protéines ADAR, pouvant alors entraîner des modifications de séquence non compatibles avec le complexe Microprocesseur (Kawahara et al., 2008). Par exemple, l'édition de onze adénosines du pri-miR-142 inhibe le clivage par Drosha et augmente son affinité pour la protéine Tudor-SN (« *Tudor Staphylococcal Nuclease* ») qui va être responsable de sa dégradation (Yang et al., 2006). L'impact de cette régulation sur le niveau de miR-142 est important puisque celui-ci fait partie des facteurs impliqués dans la différenciation des cellules hématopoïétiques (Chen et al., 2004).

1.3.5.3 Régulation co-transcriptionnelle des microARNs.

L'analyse de l'organisation génomique des séquences codant pour les microARNs a révélé qu'environ 50% d'entre elles étaient contenues dans des régions introniques d'unités de transcription (UTs) connues codant ou non pour des protéines (voir section 1.1). L'expression de ces microARNs coïncide largement avec le niveau de transcription de leurs UTs hôtes, indiquant alors l'existence d'une possible corégulation et d'un transcrit précurseur commun (Baskerville and Bartel, 2005). Effectivement, par la suite plusieurs données ont démontré que la maturation des microARNs primaires pouvait se faire de façon cotranscriptionnelle en coordination avec les mécanismes d'épissage (Kim and Kim, 2007; Morlando et al., 2008). D'autre part, Drosha et les pri-miARNs se retrouvent enrichis aux sites de transcription et sont associés avec des fractions chromatiniennes nucléaires suggérant la présence d'une étape de maturation qui précède le relâchement du pri-miARN de l'ADN (Pawlicki and Steitz, 2008). L'existence d'une coordination entre transcription et maturation implique alors un nouveau palier de régulation des précurseurs de microARNs. Ainsi, certains cofacteurs de Drosha décrits ci-dessous sont impliqués dans différents processus biologiques durant la transcription tel que les protéines ARS2, SF2/ASF, KSRP et hnRNP A1 et supportent l'existence d'une régulation cotranscriptionnelle de la maturation des microARNs primaires.

La protéine **ARS2** (« *Arsenite-Resistance Protein 2* ») est une composante du complexe liant la coiffe 7-méthyl-guanosine à l'extrémité 5' des transcrits en cours de synthèse et interagit avec Drosha pour assurer la stabilité et la maturation des pri-miR-21, pri-miR-155 et pri-let-7 en cours de synthèse (Gruber et al., 2009; Sabin et al., 2009). On retrouve

également les protéines d'épissage **SF2/ASF** (« *Splicing Factor 2 / Alternative Splicing Factor* ») qui stimulent la maturation du microARN primaire pri-miR-7, indépendamment de leur activité d'épissage (Wu et al., 2010). La protéine **hnRNP A1** (« *Heterogeneous Nuclear RiboNucleoProteins* ») interagit avec la boucle du pri-miR-18a et induit une structure conformationnelle de la tige plus favorable pour l'activité de clivage de Drosha (Guil and Caceres, 2007; Michlewski et al., 2008). Finalement, la protéine **KSRP** (« *KH-type Splicing Regulatory Protein* ») s'associe spécifiquement avec la boucle du *pri-let-7* et miR-196a via la reconnaissance d'un triplet de guanosine et favorise l'activité de clivage de Drosha (Trabucchi et al., 2009).

1.3.6 Exportation cytoplasmique du pré-miARN par l'Exportin-5

Une fois le microARN primaire transformé en précurseur de microARN, celui-ci doit être transporté vers le cytoplasme pour y subir une deuxième étape de maturation puis exercer son rôle de régulateur. Le transport nucléocytoplasmique s'effectue à travers des complexes protéiques appelés NPC (« *Nuclear Protein Complex* ») ancrés de part et d'autre de la membrane nucléaire sous forme de pores. Des protéines de transport solubles reconnaissent spécifiquement comme substrat une molécule cargo et l'escortent jusqu'au NPC en interagissant avec les nucléoporines qui le composent (Nakielny and Dreyfuss, 1999).

L'export des précurseurs de microARNs vers le cytoplasme se fait grâce au complexe Exportin-5/RanGTP (« *Guanosine TriPhosphatase* ») dont la structure tertiaire pourrait être associée à l'image d'un gant de baseball (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). La signature biochimique de deux nucléotides flottants après le clivage par Drosha va permettre la reconnaissance spécifique du pré-miARN par l'Exportin-5. Les deux arches de cette protéine établissent une structure forme en U et entourent 16 paires de bases de la région double brin du pré-miARN. La boucle est rejetée vers l'extérieur tandis que les parties 5' et 3' sont ancrées à l'intérieur de l'Exportin-5 (Figure 1-8). Cet enlacement de l'Exportin-5 autour du pré-miARN lui fournirait une protection physique contre les exonucléases nucléaires (Okada et al., 2009; Zeng and Cullen, 2004), ce qui justifierait l'absence d'accumulation de pré-miARNs dans des cellules sans Exportin-5 (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003).

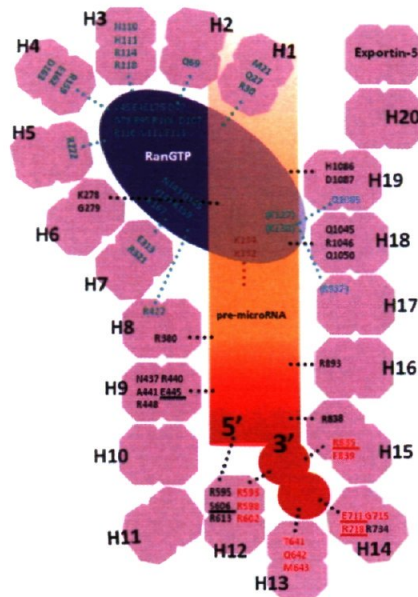


Figure 1-8 : Interaction intramolécule entre le complexe Exportin-5/RanGTP et un précurseur de microARN.

Le pré-miARN est coloré en rouge orangé. La partie rouge représente l'interaction avec les résidus basiques de l'Exportin-5. Les octogones roses schématisent les domaines HEAT qui consistent en plusieurs répétitions de deux hélices alpha antiparallèles. Les résidus colorés en rouge sont responsables de l'interaction avec les deux nucléotides libres de l'extrémité 3' du pré-miARN alors que les résidus colorés en noir interagissent avec la tige double brin. Les résidus verts indiquent l'interaction entre l'Exportin-5 et RanGTP.

Figure adaptée de (Okada et al., 2009)

1.4 Maturation cytoplasmique des précurseurs de microARNs

La biogenèse des microARNs nécessite deux étapes de maturation séquentielles, accomplies par deux enzymes appartenant à la famille des RNAses de type III. Comme décrit précédemment, le premier niveau de maturation est nucléaire et implique le complexe Microprocesseur composé de la protéine Drosha, responsable du clivage, et de son co-facteur DGCR8. Le produit généré, un précurseur de microARN d'environ 70 nucléotides sous forme de tige boucle caractéristique, est ensuite exporté dans le cytoplasme par l'action coordonnée du complexe Exportin-5/RanGTP et des nucléoporines. Le deuxième niveau de maturation est cytoplasmique et emploie une seconde enzyme à l'activité endonucléase, la protéine Dicer qui va être responsable de la production des microARNs de 21-23 nucléotides.

1.4.1 Organisation structurale de la protéine Dicer

La protéine Dicer est une enzyme hautement conservée chez les organismes eucaryotes. Son rôle dans la maturation des précurseurs de microARNs a été découvert en 2001 chez les mammifères et le nématode *C. elegans* (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001). Chez *C. elegans* et l'humain, un gène unique codant pour la protéine Dicer va être responsable de la biogenèse des miARNs issus de pré-miARNs, mais aussi des siARNs issus d'ARN double brin. A l'inverse, chez la drosophile et les plantes, on va retrouver respectivement deux et quatre protéines Dicer. Chez ces organismes, il va exister alors une spécialisation de chaque paralogue comme par exemple chez la mouche à fruit, où Dcr-1 va être associé à la maturation des pré-miARNs alors que Dcr-2 va être responsable de la génération de siARNs (Lee et al., 2004b).

Dicer est une protéine cytoplasmique à multiples domaines d'environ 220 KDa appartenant à la famille des RNAses de type III (Bernstein et al., 2001). Les différents domaines la constituant s'organisent de la portion N-terminale jusqu'au C-terminal de la façon suivante : un domaine hélicase d'ARN « *DEAD-Box* », un domaine DUF283 de fonction inconnue (« *Domain of Unknown Function* »), un domaine PAZ (*Piwi/Argonaute/Zwille*), et deux domaines RNase III organisés en tandem suivis d'un domaine de liaison à l'ARN double brin (Figure 1-9).



Figure 1-9 : Organisation structurale de la protéine humaine Dicer.

Les domaines RNase III, RIIIDa et RIIIDb, représentés en jaune et orange respectivement, correspondent aux domaines catalytiques de l'enzyme Dicer responsables de l'activité endonucléase. La protéine Dicer arbore également un domaine de liaison à l'ARN double brin dans sa partie N-terminale et un domaine hélicase à son extrémité C-terminale. Le domaine central, PAZ, est impliqué dans la reconnaissance de l'extrémité 3'-hydroxyle des cours duplex d'ARN.

Figure adaptée de (Kim, 2005).

1.4.2 Partenaires de l'enzyme Dicer

In vitro, l'activité catalytique endonucléase de la protéine recombinante Dicer est suffisante pour cliver un précurseur de microARNs ou bien un long ARN double brin (Myers et al., 2003; Provost et al., 2002). Dans la cellule, cette activité est catalysée par l'association de Dicer avec certains cofacteurs possédant des domaines de liaison à l'ARN double brin. Le gène *rde-4* (*RNAi DEficient-4*), isolé lors d'un criblage génétique chez le nématode *C. elegans* (Tabara et al., 1999), a été le premier cofacteur identifié essentiel pour initier une réponse à l'interférence par l'ARN suite à l'introduction d'une longue molécule d'ARN double brin. Cependant, cette association est spécifique pour la voie du RNAi puisque la perte de fonction de *rde-4* ne phénotype pas une perte de fonction associée à la voie des microARNs (Tabara et al., 2002). Chez la drosophile, les protéines Loquacious (Loqs) et R2D2 interagissent de façon spécifique avec Dcr-1 et Dcr-2 respectivement (Forstemann et al., 2005; Liu et al., 2003; Saito et al., 2005). Ainsi l'association Dcr-1/Loqs va être responsable de la maturation du pré-miARN en duplex de microARN alors que Dcr-2/R2D2 va permettre de générer les duplex de siARNs.

La protéine Dicer humaine interagit avec deux protéines possédant des domaines de liaison à l'ARN double brin. La protéine TRBP (« *Transactivating Response (TAR) RNA-Binding Protein* »), qui est l'homologue humain de la protéine Loquacious, a été initialement identifiée et caractérisée comme possédant une affinité pour TAR, un ARN en forme d'épingle à cheveux encodé par le virus HIV de type 1 (Gatignol et al., 1991) et la protéine PACT (« *PKR Activator Protein* ») un activateur de la protéine PKR impliqué dans la réponse à l'interféron (Patel and Sen, 1998). Chacune de ces deux protéines est importante pour la stabilité et pour l'efficacité de clivage des pré-miARNs et des longs ARNs doubles brins par la protéine Dicer (Chendrimada et al., 2005; Kok et al., 2007; Lee et al., 2006). L'analyse biochimique du complexe Dicer/TRBP démontrent également son association avec la protéine Argonaute Ago2 et son rôle dans l'assemblage du complexe RISC (Chendrimada et al., 2005).

1.4.3 Reconnaissance et maturation du pré-miARN

Les caractéristiques biologiques principales de la protéine Dicer pour la biogenèse des microARNs sont la spécificité de reconnaissance du précurseur de microARNs, et la

précision de clivage de ce substrat pour générer un duplex d'ARN de 21-23 nucléotides capable d'être incorporé dans le complexe effecteur. Pour ce faire, c'est le domaine PAZ qui va être en partie responsable de la reconnaissance spécifique de l'extrémité 3' flottante des précurseurs de microARNs (Ma et al., 2004; Zhang et al., 2004) (Figure 1-10). Le domaine hélicase de Dcr-1 chez la drosophile semble également contribuer à la reconnaissance du pri-miARN *via* sa liaison spécifique avec la boucle contenant un nombre suffisant de nucléotides (Tsutsumi et al., 2011).

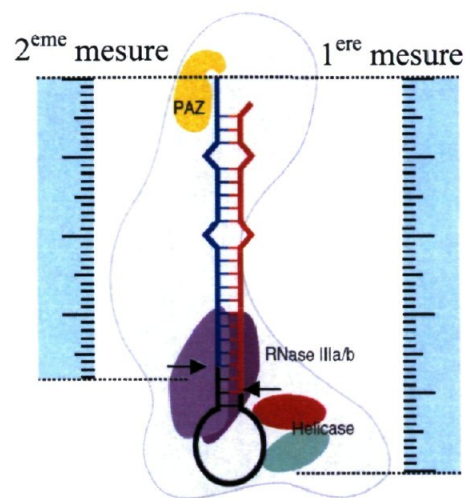


Figure 1-10 : Modèle de reconnaissance d'un pri-miARN par Dcr-1.

La reconnaissance du pri-miARN se fait de manière coordonnée entre le domaine PAZ (jaune) qui cible l'extrémité 3' flottante et le domaine hélicase (bleu-rouge) qui reconnaît l'authenticité de la boucle. Cette reconnaissance de la boucle correspond à la 1^{ère} mesure physique du pri-miARN permettant un enchâssement adéquat à l'intérieur de la protéine. La 2^{ème} mesure physique correspond à la distance entre l'extrémité 3' flottante et le centre de maturation unique arboré par les domaines RNaseIII (violet).
Figure adaptée de (Tsutsumi et al., 2011).

La plus récente étude structurale de la protéine Dicer humaine en complexe avec une molécule d'ARNdb parfaitement complémentaire obtenue par microscopie électronique nous permet d'extrapoler un modèle de maturation d'un pré-miARN (Lau et al., 2012) :

Suite à la reconnaissance de l'extrémité 3' du pré-miARN, la tige d'ARN double brin se voit projetée à l'intérieur d'une structure en forme de poche composée du domaine de liaison à l'ARNdb. Le domaine hélicase qui compose l'extrémité de la protéine va être

responsable de la liaison avec la boucle du pré-miARN. Une fois le pré-miARN enlacé par l'enzyme, une dimérisation intramoléculaire des deux domaines RNase III va former un centre unique de maturation (Zhang et al., 2004). Situés à deux tours d'hélices (22 paires de bases) du domaine PAZ, ces deux domaines vont fonctionner ensemble pour cliver un pont phosphodiester sur chaque brin opposé. Cependant la nature exacte de ce mécanisme de clivage reste encore à déterminer dans le cadre d'un précurseur de microARN. Deux domaines appelés « *platform* » et « *ruler* » situés entre les domaines RNase III et PAZ fourniraient un espacement physique capable de dicter la longueur des futurs microARNs (Figure 1-11).

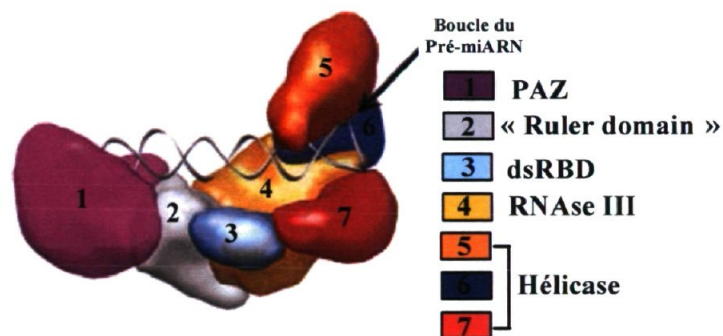


Figure 1-11 : Modélisation structurale de la protéine humaine Dicer.

Un pré-miARN est modélisé à l'intérieur de la structure de Dicer. La boucle du pré-miARN est enchâssée dans la tête de la protéine contenant les domaines hélicase (5, 6, 7). La tige se loge au niveau d'une poche contenant le centre de maturation (4). Le domaine PAZ (1) lie l'extrémité 3' flottante du pré-miARN. Le « *ruler domain* » (2) dicte indirectement la longueur du futur pré-miARN.

Figure adaptée de (Lau et al., 2012).

Le séquençage à très haut débit des microARNs suggère qu'une fraction des miARNs peut être l'objet de modifications *via* l'addition d'un faible nombre de nucléotides à leur extrémité 3'hydroxyle, tel que des événements d'uridination ou d'adénylation impliquant des nucléotidyl transférases (Burroughs et al., 2010; Heo et al., 2008; Heo et al., 2009). Pour contourner le problème de ces modifications qui pourraient altérer la position de clivage, puis de façon subséquente générer un microARN mature aberrant, un mécanisme de secours appelé le « *5' model counting* » permet à Dicer de mesurer la distance de 22 nucléotides à partir de l'extrémité 5' (Park et al., 2011). Bien que certains acides aminés

contenus dans le domaine PAZ et en amont de celui-ci soient essentiels pour cette fonction, la base moléculaire de cette activité reste encore indéterminée (Park et al., 2011).

Ainsi, les caractéristiques de la boucle et de l'extrémité 3' flottante permettent de cibler spécifiquement les précurseurs de microARNs. Cette reconnaissance permet alors le positionnement adéquat du pré-miARN et son clivage subséquent en un fragment d'ARN double brin de 21-23 nucléotides contenant deux nucléotides simples brins non appariés, aux extrémités 3'-hydroxyle sortantes, signature caractéristique des produits RNase III (Drosha et Dicer). Le produit de Dicer ainsi généré va être lié par les protéines de la famille Argonaute pour former un complexe miRISC (« *microRNA-Induced Silencing Complex* ») fonctionnel capable d'aller cibler spécifiquement un ARNm et ultimement de moduler négativement son expression (Figure 1-12). Le rôle de la protéine Argonaute est alors déterminant dans les dernières phases de la voie des microARNs.

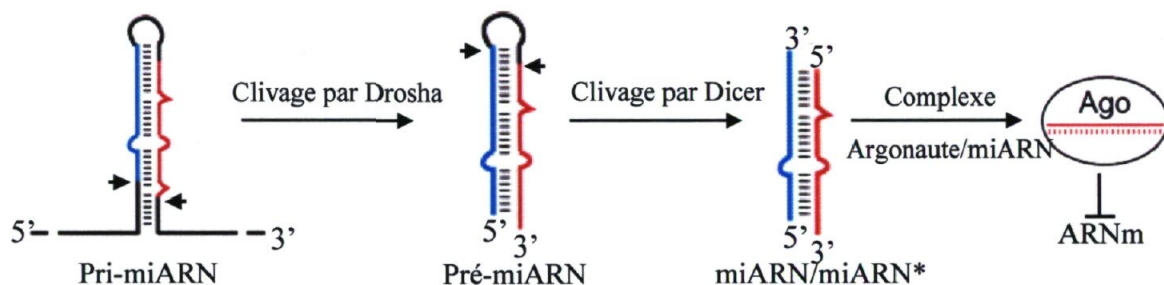


Figure 1-12 : Etapes séquentielles de maturation des microARNs.

La première étape de maturation est nucléaire et correspond au clivage du pri-miARN par un complexe composé de l'enzyme Drosha et de son cofacteur DGCR8. Cette activité laisse une première signature biochimique correspondant à une extrémité 3' sortante de 2 nucléotides. La deuxième étape de maturation est cytoplasmique et correspond au clivage du pré-miARN par l'enzyme Dicer qui laisse également la même signature biochimique. Le produit de Dicer contenant alors deux extrémités 3'-hydroxyle sortantes va être incorporé dans la protéine Argonaute pour former un complexe effecteur fonctionnel.

Les flèches de part et d'autre de la molécule d'ARN représentent le site de clivage des enzymes.

Figure adaptée de (Ruby et al., 2007).

1.5 Les protéines de la famille Argonaute

1.5.1 Généralités

Les premiers gènes codant pour les protéines de la famille Argonaute ont été initialement identifiés lors d'un criblage génétique visant à isoler des gènes impliqués dans l'élongation cellulaire chez les plantes supérieures. Parmi les différents mutants d'*Arabidopsis thaliana* isolés, une série d'entre eux affichait un phénotype peu commun caractérisé par la présence de quatre pétales et sépales anormalement longs et étroits. Les auteurs ont comparé cette morphologie atypique aux tentacules retrouvés chez les mollusques céphalopodes comme l'espèce *Argonauta argo* (Figure 1-13). Le terme « protéine Argonaute » est né (Bohmert et al., 1998).

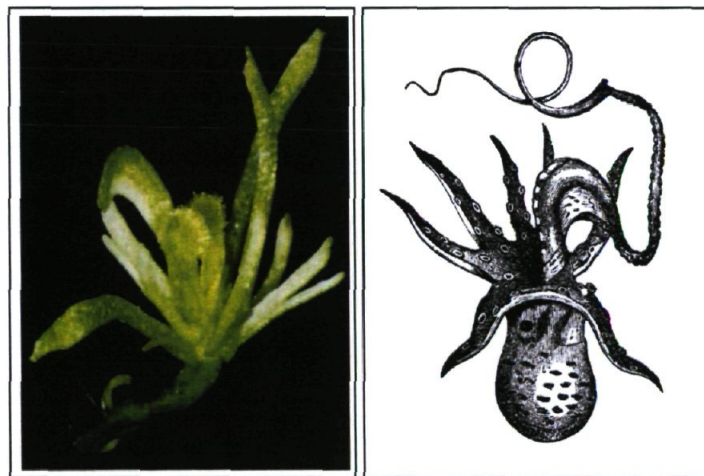


Figure 1-13 : Origine de l'appellation des protéines Argonautes.

L'image de gauche représente le phénotype associé à une mutation hypomorphique du gène *AT1G48410.1* chez *Arabidopsis thaliana* après 6 semaines de culture. Il se caractérise par la présence de pétales et sépales anormalement étroits et longs (Bohmert et al., 1998).

L'image de droite représente un mollusque céphalopode de l'espèce *Argonauta argo* (Dwight W, 1902).

Les protéines Argonaute sont hautement conservées à travers les espèces. On les retrouve présentes chez certaines bactéries et archéobactéries comme *Aquifex aeolicus* (Yuan et al., 2005) et *Pyrococcus furiosus* (Ma et al., 2005; Song et al., 2004), et chez les organismes eucaryotes. Chez ces derniers, la diversification du nombre de protéines Argonautes est

étonnante. En effet, une seule protéine Argonaute est retrouvée chez la levure *Schyzosaccharomyces pombe*, alors que les plantes et le nématode *C. elegans* encodent respectivement 10 et 26 paralogues. Le haut niveau de duplication génique chez les plantes et métazoaires est à l'origine de cette diversité numérique, entraînant alors au fil de l'évolution un considérable degré de spécialisation fonctionnelle des protéines Argonautes dans les différents mécanismes d'interférence par l'ARN (Cerutti and Casas-Mollano, 2006). Aujourd'hui, chez les organismes eucaryotes, les protéines de la famille Argonaute peuvent être subdivisées en deux sous-groupes de paralogues basés sur leur homologie de séquence : le groupe « *Argonaute-like* » et le groupe « *Piwi-like* » (Carmell et al., 2002). L'analyse phylogénétique des protéines de la famille Argonaute supporte l'idée que le génome de notre ancêtre commun eucaryote encodait pour chaque paralogue des deux sous-groupes. Cependant, au cours de l'évolution, certaines lignées eucaryotiques ont perdu un sous-groupe d'Argonautes. Ainsi, les champignons, algues vertes et plantes encodent exclusivement pour des protéines du groupe « *Argonaute-like* ». A l'inverse, le génome de certains protozoaires comme *Tetrahymena thermophila* et de la paramécie *Paramecium tetraurelia* encode uniquement pour le groupe « *Piwi-like* ». Cependant L'Homme, le nématode *C. elegans* ou encore la mouche à fruits *Drosophila melanogaster* encodent pour les deux groupes de protéines Argonautes.

Le groupe PIWI (« **P** element-Induced **W**impy testes ») regroupe les protéines Argonautes exprimées dans les lignés germinales et impliquées dans l'extinction des éléments mobiles via leur association avec les courts ARNs non codants de type piARNs (« *Piwi Interacting RNAs* »). Quatre protéines PIWI sont encodées par le génome humain, alors que l'on en retrouve trois chez *C. elegans* et la mouche à fruits.

Le groupe « *Argonaute-like* » regroupe les protéines Argonautes exprimées de façon ubiquitaires qui prennent en charge les microARNs et siARNs pour former un complexe effecteur communément nommé complexe RISC pour « *RNA-Induced Silencing Complex* ». Ce complexe va être responsable du ciblage spécifique d'ARNs messagers suivi de leur extinction par clivage direct ou modulation de l'expression protéique. On retrouve quatre paralogues chez l'humain, deux chez la drosophile, et cinq chez le nématode.

Une analyse phylogénétique plus récente a permis d'identifier un troisième groupe de 18 protéines Argonautes ayant la particularité d'être spécifiques au nématode *C. elegans* et dont certaines sont impliquées dans la réponse secondaire du mécanisme de RNAi (Yigit et al., 2006). En effet, chez *C. elegans* la voie du RNAi diffère de la plupart des autres animaux de par son amplification sa transmission systémique et générationnelle ainsi que son rôle dans la défense contre les pathogènes viraux (Felix et al., 2011). Suite à l'introduction d'une molécule d'ARN double brin, la première génération de siARNs produits par Dicer va être prise en charge par la protéine Argonaute RDE-1. Après la reconnaissance de l'ARN messager ciblé, une ARN polymérase ARN dépendante génère un nouveau brin antisens complémentaire à cet ARNm qui va servir de base pour la production de différents siARNs appelés siARNs secondaires. Ces nouveaux siARNs vont être pris en charge par certaines protéines Argonautes du groupe 3 appelées WAGO (*Worms ArGO*naut-*specific group*) pour initier une nouvelle boucle de régulation

1.5.2 Caractéristiques structurales des protéines Argonautes

Les protéines Argonautes sont des protéines d'environ 100 kDa arborant une structure générale bilobée constituée de quatre domaines fonctionnels. Chaque lobe correspond au domaine PAZ et au domaine PIWI. Chacun est flanqué du domaine N-terminal et du domaine MID (Figure 1-14).

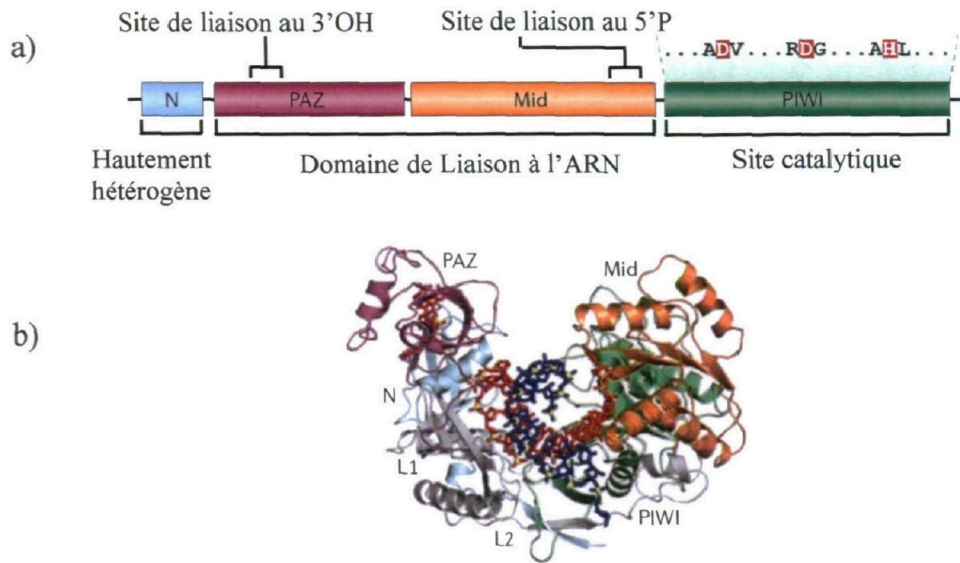


Figure 1-14 : Organisation structurale des protéines Argonautes.

(A) Organisation linéaire des différents domaines qui composent les protéines Argonautes. Le domaine PAZ en violet lie l'extrémité 3' hydroxyle des duplex d'ARN, alors que le domaine Mid en orange, se lie à l'extrémité 5' phosphate. Le domaine PIWI en vert possède une triade d'acides aminés Asp-Asp-His essentielle pour l'activité catalytique d'endonucléase. (B) Vue en trois dimension de la structure cristalline de la protéine Argonaute de *Thermus thermophilus* liée à un hétéroduplex ARN-ADN (Wang et al., 2008b).

Figure adaptée de (Czech and Hannon, 2011)

1.5.2.1 Le domaine PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille)

Le domaine PAZ, retrouvé également chez la protéine Dicer, est composé de deux sous-domaines. Un domaine similaire au domaine OB (« *oligonucleotide/oligosaccharide binding* ») qui se caractérise pour son affinité de liaison aux acides nucléiques simples brins (Murzin, 1993) et une seconde partie riche en feuillets β et hélices α . Le domaine PAZ est impliqué dans la reconnaissance spécifique de deux nucléotides flottants aux extrémités 3' des ARNs doubles brins. Il semble reconnaître préférentiellement les molécules d'ARN que d'ADN, sans toutefois posséder une sélectivité de séquence (Lingel et al., 2003; Ma et al., 2004; Song et al., 2003; Yan et al., 2003). De par cette affinité de séquence, le domaine PAZ est impliqué dans la reconnaissance spécifique des extrémités 3' flottantes des microARNs et siARNs.

1.5.2.2 Le domaine MID (MIDdle)

L'analyse fonctionnelle du domaine MID de la protéine humaine Ago2 en complexe avec des nucléosides monophosphates, mimant l'extrémité 5' phosphate des microARNs, démontre l'existence d'une interaction spécifique entre le domaine MID et les nucléosides. Cette étude confirme également que ce domaine possède une préférence pour les extrémités contenant une base azotée uracile ou adénine (Frank et al., 2010). A ce jour, plusieurs modèles tentent d'expliquer l'impact fonctionnel du domaine MID dans la voie des microARNs.

Initialement, une courte séquence composant le MID a été décrite comme similaire à un motif de liaison de la coiffe des ARNs messagers retrouvés chez le facteur de traduction eIF4E. Sa caractérisation a suggéré alors un rôle du domaine MID dans la liaison de la coiffe des ARNm permettant alors de compétitionner avec la machinerie de traduction (Kiriakidou et al., 2007). Alors que cette séquence n'a jamais pu être identifiée et validée par la suite (Kinch and Grishin, 2009) un deuxième modèle suggère l'existence d'un effet allostérique entre deux sites de liaison aux nucléotides contenus dans le domaine MID permettant une interaction avec la coiffe. En effet, suite à la liaison de l'extrémité 5' du microARN, l'affinité du deuxième site pour la coiffe des ARNm est augmentée, permettant alors à la protéine Argonaute d'altérer la machinerie traductionnelle comme pour le premier modèle (Boland et al., 2010; Djuranovic et al., 2010). Cependant l'affinité du domaine MID pour le nucléotide modifié 7-méthyl-guanosine semblerait non spécifique (Frank et al., 2011) et la prédiction de l'existence du deuxième site basée sur l'analyse du cristal du domaine MID seul pourrait être faussée par la présence du domaine PIWI.

Ainsi, un troisième modèle plus récent basé sur l'analyse de la structure cristalline du domaine MID-PIWI suggère que les résidus impliqués dans la régulation allostérique contribuent finalement à conserver une stabilité conformationnelle du domaine MID-PIWI absolument essentielle pour fournir une affinité de liaison à l'extrémité 5' du microARN (Boland et al., 2011). D'autre part, l'interface du domaine MID-PIWI lié avec le microARN rend possible son interaction avec la protéine GW182 (Boland et al., 2011), partenaire protéique des protéines Argonautes qui est essentiel lors de l'étape d'inhibition de la traduction (Jakymiw et al., 2005; Liu et al., 2005a). Par conséquent, la stabilisation

puis la conformation adoptée du domaine MID-PIWI après la liaison avec son substrat semble essentielle pour la fonction de la protéine Argonaute dans la phase effectrice de la voie des microARNs

1.5.2.3 Le Domaine PIWI (P-element Induced Wimpy testis)

La structure tertiaire du domaine PIWI est similaire au domaine RNase H, qui catalyse l'hydrolyse d'un brin d'ARN à partir d'un hétéroduplex ADN-ARN. L'analyse de l'alignement de séquences des domaines PIWI montre que la plupart des protéines Argonautes contiennent un motif caractéristique composé d'une triade d'acides aminés correspondant à deux acides aspartiques et une histidine (motif DDH) qui constitue le noyau catalytique similaire au motif Asp/Asp/Glu (motif DDE) du domaine RNase H (Tolia and Joshua-Tor, 2007). Les domaines PIWI constitués de ce noyau catalytique actif vont induire le clivage d'un brin du duplex d'ARN de 21-23 nucléotides parfaitement complémentaire appelé siARN (*small interfering RNA*), et forcer sa dissociation pour former un complexe siRISC mature (Leuschner et al., 2006; Matranga et al., 2005; Miyoshi et al., 2005). L'activité enzymatique du domaine PIWI va être également requise pour cliver un ARNm ciblé par le complexe siRISC qui est spécifique à la voie du RNAi, suite à l'appariement parfait du brin guide avec la partie codante de cet ARNm (Parker et al., 2004; Song et al., 2004).

1.5.2.3.1 Mécanisme endonucléolique des protéines Argonautes

L'étude de la structure cristalline complète de la protéine Argonaute bactérienne *Thermus thermophilus*, en complexe avec un hétéroduplex ADN-ARN a révélé le mécanisme moléculaire de l'activité endonucléasique des protéines Argonautes catalytiquement actives (Wang et al., 2009). Comme l'illustre la Figure 1-15, les extrémités 3'hydroxyle et 5' phosphate du brin d'ADN guide sont ancrés respectivement dans les domaines PAZ et MID. L'étape de nucléation s'amorce par l'appariement de l'extrémité 5' phosphate du brin guide avec la molécule d'ARN cible. Il s'en suit alors la propagation de l'appariement jusqu'au seizième nucléotides de l'ADN guide. A cette étape, la formation de l'hétéroduplex accumule suffisamment d'énergie pour « arracher » l'extrémité 3' de la molécule guide de son site de liaison au domaine PAZ. Cette libération entraîne alors une rotation du domaine PAZ suivi d'un changement conformationnel de la structure de la

protéine permettant d'aligner parfaitement un tour d'hélice de l'hétéroduplex avec le noyau catalytique pour initier l'activité de clivage entre les nucléotides 10 et 11 du brin d'ARN en présence de deux ions magnésium. Le produit de clivage arbore alors une signature caractéristique des enzymes de type RNase H, avec une extrémité 3'hydroxyle et 5' phosphate.

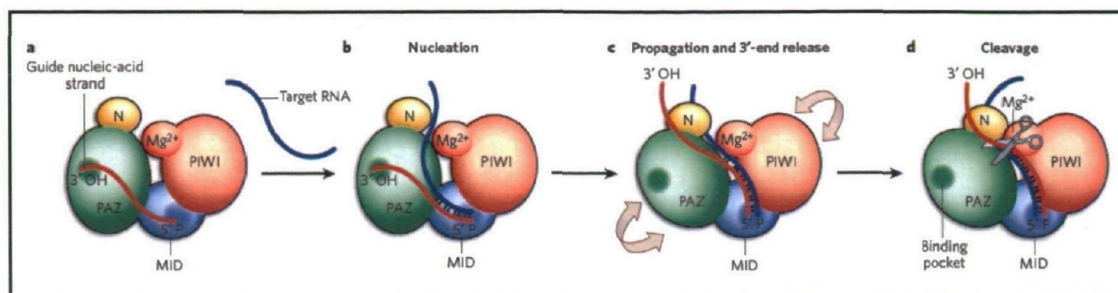


Figure 1-15 : Modélisation de l'activité de clivage des protéines Argonautes possédant une activité endonucléase.

(A) Liaison des extrémités 3'hydroxyle et 5'phosphate de l'ARN guide au domaine PAZ et PIWI respectivement de la protéine Argonaute. (B) Etape de nucléation correspondant à l'auto assemblage spontané du brin guide associé à la protéine Argonaute avec l'ARN cible. (C) Propagation de l'appariement de base entre l'ARN cible jusqu'au seizième nucléotide du brin d'ADN guide. Perte de la liaison entre l'extrémité 3'OH du brin guide et le domaine PAZ. (D) Changement conformationnel de la protéine Argonaute entraînant une position adéquate de l'hétéroduplex avec le noyau catalytique du domaine PIWI. Clivage du brin d'ARN cible entre les nucléotides 10-11 en présence de deux ions divalents.

Figure adaptée de (Bouasker and Simard, 2009).

Cependant, l'activité endonucléase n'est pas présente chez toutes les protéines Argonautes. Chez l'humain, la protéine Ago2 qui est l'unique protéine à être associée avec les siARNs pour initier une réponse RNAi en plus d'être impliquée dans la voie microARNs, possède une activité catalytique. A l'inverse, les domaines PIWI des protéines Ago1 et Ago4 n'arborent pas de noyau catalytique caractéristique, et le domaine PIWI de Ago3 possèdent bien un authentique motif DDH mais n'affiche pas d'activité de clivage (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004). La conservation d'une unique protéine Argonaute avec un domaine catalytique actif peut trouver son explication dans l'identification récente dans les ovocytes de souris de siARNs endogènes produits par Dicer utilisant comme source d'ARN double brin l'appariement des produits de transcription antisens de pseudogènes et d'ARN messagers (Tam et al., 2008). De plus, la découverte du microARN atypique miR-451 dont la maturation est indépendante de Dicer mais requiert l'activité catalytique de Ago2 pour

être produit en forme mature et fonctionnelle supporte la conservation de l'activité endonucléase d'au moins une protéine Argonaute chez l'humain (Cheloufi et al., 2010; Cifuentes et al., 2010).

Chez la drosophile, Ago1 qui est associée à la voie des microARNs affiche une faible activité endonucléase comparée à Ago2 qui est associée à la voie des siARNs (Forstemann et al., 2007). Ainsi, l'activité endonucléase ne semble pas essentielle pour maintenir la voie métabolique des microARNs chez les animaux. En effet les duplex de microARNs associés aux complexes miRISC contiennent suffisamment de mésappariements pour initier une dissociation des deux brins de façon indépendante du clivage (Kawamata et al., 2009; Yoda et al., 2010). D'autre part, l'activité endonucléase qui est requise pour la voie du RNAi lors du clivage de l'ARN messager ciblé n'est pas nécessaire dans le cadre de la voie des microARNs. Celui-ci utilise un mode de répression indépendant du clivage où le complexe miRISC inhibe la synthèse protéique (voir section 1-6). A cette étape, l'appariement non parfait du microARN à sa cible génère une structure double brin partielle qui est alors non conforme pour permettre une activité endonucléase (Doench and Sharp, 2004; Grimson et al., 2007).

1.5.2.4 Le domaine N-terminal

Le domaine N-terminal correspond à la région protéique des protéines Argonautes le moins étudié présentement. Cependant, un rôle inattendu a émergé de l'analyse structurale de la protéine Argonaute *Thermus thermophilus* (TtAgo) durant le processus catalytique d'endonucléase décrit dans la section 1.5.2.3.1 (Wang et al., 2009). En effet, il semble être responsable du blocage de la propagation de l'appariement entre l'ARN cible et le brin

guide en maintenant à distance ces deux extrémités comme l'illustre la Figure 1-16.

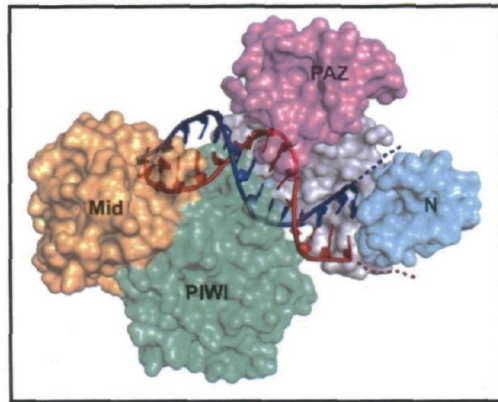


Figure 1-16: Trajectoire envisagée des brins d'ADN et d'ARN au delà de la position 16 de chaque côté du domaine N-terminal.

La structure cristalline du complexe ternaire Argonaute / brin d'ADN guide en rouge/ brin d'ARN cible en bleu révèle l'absence d'appariement entre le brin guide (position 17 à 21) et le brin d'ARN cible (position 17 à 19). Chaque extrémité simple brin représentée en pointillé est projetée de part et d'autre du domaine N-terminal en bleu ciel. Figure adaptée de (Wang et al., 2009).

Récemment, il a été démontré que l'intégrité fonctionnelle du domaine N-terminal de Ago2 était essentielle pour initier l'étape de mésappariement des duplex de miARNs et siARNs mais également pour l'activité de clivage de Ago2 sur le duplex de siARN. Ainsi, considérant les données observées par Wang *et al.*, les auteurs attribuent au domaine N-terminal un rôle dissociatif lui permettant de disjoindre les deux brins d'une des extrémités des duplex et de les conserver séparés jusqu'à l'étape de mésappariement (Kwak and Tomari, 2012; Wang et al., 2009). L'obtention très récente du cristal de la protéine humaine Ago2 démontre un éloignement du domaine N-terminal avec le domaine PIWI en comparaison avec TtAgo (Elkayam et al., 2012; Schirle and MacRae, 2012). Cette différence structurale suggère une étape de nucléation plus étendue permettant ainsi d'accueillir des molécules d'ARNdb plus grandes.

1.5.3 Formation du complexe effecteur miRISC

L'incorporation efficace du produit de Dicer dans les protéines Argonautes est un processus qui nécessite l'assistance des protéines chaperonnes HSP90 (« *Heat Shock Protein 90* ») et HSC70 (« *Heat Shock Cognate 70* ») dont l'interaction avec les protéines Argonautes va induire une conformation favorable à la protéine Argonaute pour accueillir le duplex (Iwasaki et al., 2010; Johnston et al., 2010; Miyoshi et al., 2010). Dicer est également un composant du pré-RISC. Chez la drosophile, l'incorporation du duplex de siARN dans Ago2 nécessite la liaison spécifique de Dcr-2 et de son partenaire R2D2 (Tomari et al., 2004). Cet hétérodimère perçoit l'asymétrie thermodynamique du duplex pour s'engager de part et d'autre du duplex et permettre l'orientation du brin. Toutefois, la nécessité de Dcr-1 et de son partenaire Loquacious pour l'incorporation du duplex de miARN dans Ago1 reste incertaine. Chez les mammifères, ce mécanisme est peu caractérisé, mais il semblerait que l'unique Dicer humaine avec son partenaire TRBP humaine permettraient l'incorporation des duplex dans Ago2 (Gregory et al., 2005; MacRae et al., 2008), bien que des cellules souches embryonnaires de souris mutantes pour Dicer supportent les mécanismes d'extinction génique par les siARNs (Murchison et al., 2005).

1.5.4 Sélection du brin guide du complexe RISC

L'orientation de la molécule d'ARN double brin au sein de la protéine Argonaute va être déterminant dans le choix du brin qui va composer le complexe effecteur RISC. C'est pourquoi l'incorporation adéquate du duplex est guidée par la stabilité thermodynamique des premières bases à chaque extrémité 5'. Ainsi, comme le montre la Figure 1-17, l'extrémité 5' la moins stable, va être incorporée de façon telle qu'elle correspondra au brin guide (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). On parle alors de la théorie de l'asymétrie. Suite à l'incorporation de la molécule d'ARN double brin, les deux brins vont être dissociés pour former le complexe effecteur RISC. Cette dissociation nécessite au préalable un clivage du brin passager lors d'un duplex parfaitement complémentaire. Dans le cas des courts ARNs doubles brins de type microARNs, la présence de mésappariements internes suffit pour initier l'étape de dissociation (Kawamata et al., 2009; Matranga et al., 2005; Miyoshi et al., 2005; Rand et al., 2005). Bien qu'il est assumé que le brin passager

noté miARN* est par la suite dégradé, il a été démontré que certains miARNs* chez la drosophile étaient fonctionnels autant que leurs homologues guides (Okamura et al., 2008).

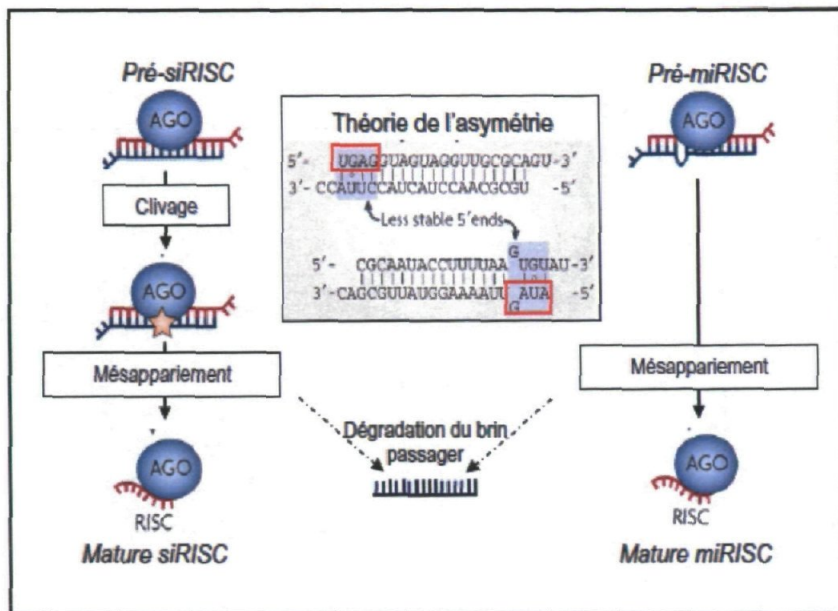


Figure 1-17 : Maturation des complexes pré-RISC.

La molécule d'ARN double brin est incorporée dans le complexe pré-RISC selon la théorie de l'asymétrie où le brin ayant l'extrémité 5' la moins stable du duplex va servir de brin guide (en rouge). Le duplex de siARN, parfaitement complémentaire, va alors subir un clivage de son brin passager (en bleu) permettant ainsi l'initiation du mésappariement du duplex. Dans le cas d'un duplex de microARN, la présence de mésappariements internes empêche le clivage mais suffit pour initier le mésappariement du duplex. Le brin passager est par la suite dégradé. Le complexe effecteur RISC mature est formé.

Figure adaptée de (Hutvagner and Simard, 2008) .

1.6 Phase effectrice de la voie des microARNs

1.6.1 Reconnaissance de l'ARNm cible par les microARNs

1.6.1.1 Caractéristique du brin guide des microARNs

La distinction de l'ARN messager avec son élément régulateur, le microARN, se produit par l'appariement de base de type Watson-Crick du microARN avec le plus souvent la partie 3' non codante de l'ARN messager ciblé (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993).

Plus exactement, cette reconnaissance implique principalement les nucléotides 2 à 7 en partant de l'extrémité 5' phosphate du microARN (Brennecke et al., 2005; Lewis et al., 2005; Lewis et al., 2003). Cette séquence nommée « *seed sequence* » correspond à la portion la plus conservée des microARNs chez les métazoaires (Lim et al., 2003a) et son altération par substitution de base abolit la phase effectrice de répression (Doench and Sharp, 2004). Cependant, comme l'illustre la Figure 1-18, il existe une certaine flexibilité quant à la nature exacte de l'appariement de séquences entre le microARN et l'ARN messager. Ainsi, basé sur l'analyse de 87 familles de microARNs hautement conservés chez les vertébrés, trois types distincts d'appariements peuvent être catalogués (Friedman et al., 2009).

- 1) Les sites canoniques correspondant à l'appariement minimal de la région « *seed* », encadrés par l'appariement du 8^{ème} et/ou du 1^{er} nucléotide, ce dernier étant préférentiellement représenté par un uracile (Lewis et al., 2005).
- 2) Les sites marginaux, qui sont représentés par les microARNs offrant uniquement 6 nucléotides pour l'appariement, c'est-à-dire la région « *seed* » ou la région allant du 3^{ème} au 8^{ème} nucléotide (Lewis et al., 2005).
- 3) Finalement le troisième groupe, beaucoup plus rare, représente les sites dits atypiques. Dans ce cas, l'appariement souvent non parfait de la région « *seed* » est complété ou compensé par l'association de nucléotides retrouvés en 3' du microARN (Grimson et al., 2007). Un bel exemple de ce type de reconnaissance atypique est illustré chez le nématode *C. elegans* où le microARN *let-7* possède une spécificité pour l'ARNm de *lin-41* contrairement aux microARNs issus de la même famille (miR-48, miR-84, miR-241) comportant une séquence « *seed* » identique mais une région 3' différentes (Lau et al., 2001; Lim et al., 2003b). Ceci a un impact fonctionnel direct puisque l'expression précoce des microARNs miR-48, miR-84 et miR-241 n'altère pas l'activité fonctionnelle de l'ARNm de *lin-41* qui est essentiel dans les premiers stades de développement du nématode (Abbott et al., 2005; Reinhart et al., 2000).

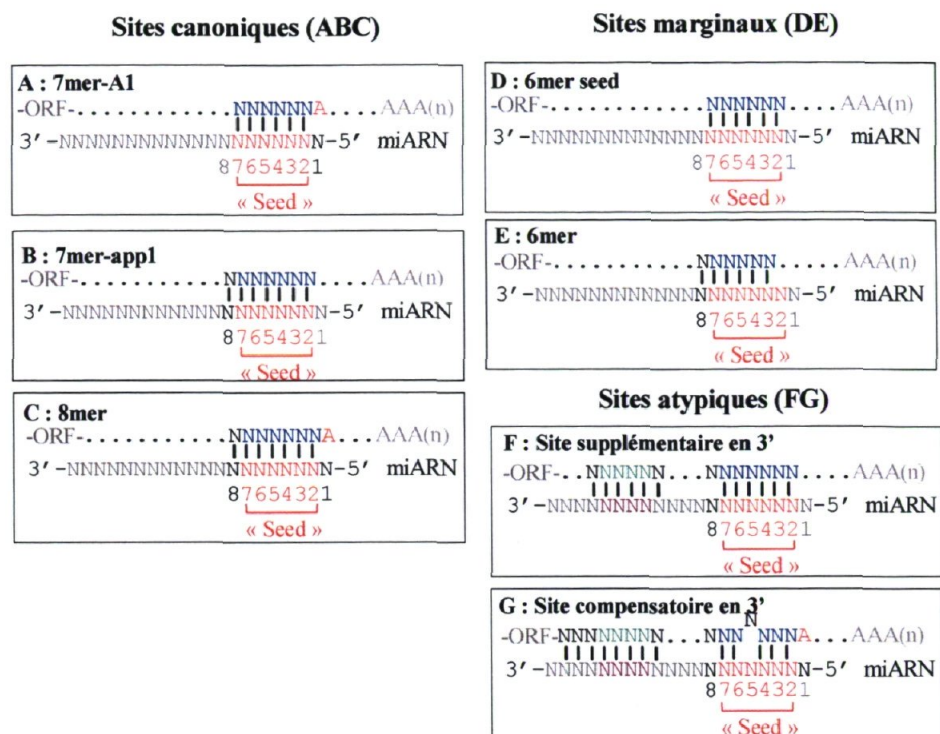


Figure 1-18 : Différents types de sites de liaison aux microARNs.

(A-C) représentent les sites canoniques. A et B correspondent à l'appariement de la région « *seed* » plus la présence d'une adénine à la position 1 ou l'appariement du nucléotide à la position 8 respectivement. C correspond à l'appariement de la région « *seed* » plus la présence d'une adénine à la position 1 et l'appariement du nucléotide à la position 8. (D-E) représentent les sites marginaux. D correspond à l'appariement de la séquence « *seed* » uniquement alors que E correspond à l'appariement des nucléotides 3 à 8. (F-G) représentent les sites atypiques. F correspond à l'appariement de la région « *seed* » additionné de l'appariement de sites supplémentaires en 3' du microARN. G correspond à l'appariement non parfait de la région « *seed* », compensé par l'appariement de base en 3' du microARN. Les traits verticaux indiquent l'appariement de base de type Watson-Crick. Figure adaptée de (Bartel, 2009).

1.6.1.2 Caractéristiques de la séquence 3' non traduite des ARNm ciblés.

On constate que la reconnaissance entre les microARNs et leurs ARNm cibles nécessite un faible appariement de séquences qui va être suffisant pour permettre d'induire la répression de l'ARNm. Les sept nucléotides composant la région « *seed* », essentielle pour cette reconnaissance, offrent donc la possibilité de cibler une quantité importante d'autres séquences de façon non spécifique. De ce fait, comment la cellule a-t-elle évolué pour limiter les effets engendrés par cette non spécificité ? Une première réponse à cette question

a été émise en 2005 lorsque l'analyse dans différents tissus des profils d'expression des microARNs et des ARNm a révélé qu'il existait une co-expression spatio-temporelle entre les microARNs et leurs ARNs messagers cibles (Farh et al., 2005). Un second élément qui tend à limiter l'impact fonctionnel d'une régulation non spécifique par les microARNs réside dans la petite taille des régions 3' non traduites des gènes de ménages (« *housekeeping gene* »). En effet, leur expression ubiquitaire et constitutive les expose largement à ce type de régulation, contrairement à leurs orthologues chez la plante possédant une séquence 3'UTR plus grande, mais dont la régulation par les microARNs au niveau de ces séquences est perdue (Stark et al., 2005). Cependant, une grande partie de l'efficacité fonctionnelle de la régulation par les microARNs est influencée par la nature de la séquence 3' non traduite. On peut ainsi dénombrer trois caractéristiques importantes permettant d'accentuer cette activité (Gaidatzis et al., 2007; Grimson et al., 2007; Majoros and Ohler, 2007; Nielsen et al., 2007) :

- 1) Le type de site, correspondant au nombre d'appariements de bases de type Watson-Crick entre le microARN et l'ARN messenger. Cette efficacité s'échelonne de la manière suivante : 8mer > 7mer-m8 > 7mer-app1 > sites marginaux > absence de site.
- 2) Le nombre de sites, qui reflète la coopérativité entre plusieurs sites de microARNs au sein d'un même ARN messenger.
- 3) La position des sites, qui caractérise une plus forte efficacité lorsque il existe un éloignement d'au moins 15 paires de bases entre le codon de terminaison de la traduction et le site de microARNs. A l'inverse, leur positionnement au centre des longues régions 3' non traduites semble diminuer cette efficacité. D'autre part, la coopérativité entre deux sites semble augmenter lorsqu'ils sont espacés d'au moins 8 paires de bases, pour un maximum de 40.

Cette première étape de la phase effectrice de la voie des microARNs, visant à cibler spécifiquement un ARN messenger à travers l'association par complémentarité de bases de deux courtes séquences complémentaires, va permettre la mise en place d'une machinerie complexe dont le rôle sera de freiner la traduction de ce messenger en protéine. Les mécanismes mis en œuvre pour moduler cette expression sont la source de différents modèles permettant d'expliquer cette régulation post-transcriptionnelle par les microARNs. Ainsi, savoir si cette modulation se fait par inhibition de la traduction avec une contribution

directe ou non de la machinerie de dégradation des ARNm reste encore un sujet vivement controversé (Djuranovic et al., 2011).

1.6.2 Régulation post transcriptionnelle par les microARNs

1.6.2.1 Mécanisme d'initiation de la traduction

La traduction d'un ARN messager en protéine met en œuvre différentes étapes, allant du recrutement et de la mise en place des unités ribosomales sur l'ARNm à la lecture appropriée du message, nécessaire à l'assemblage de la chaîne peptidique qui va donner naissance à la protéine. Cette mécanistique complexe est divisée en trois grandes étapes communément appelées initiation, élongation et terminaison. L'initiation est considérée comme l'étape limitante durant le processus traductionnel, elle est donc la plus souvent ciblée lors des mécanismes de régulation de la traduction. De ce fait, les microARNs ciblent en partie ce mécanisme moléculaire complexe pour éteindre la traduction d'un ARNm cible. (voir section 1.6.2.2).

L'initiation de la traduction chez les organismes eucaryotes se caractérise par l'assemblage des sous unités ribosomales 40S et 60S au site de démarrage de la traduction pour former un complexe ribosomal 80S compétant pour l'étape d'élongation (Jackson et al., 2010). Pour ce faire, la 7-méthylguanosine (appelée coiffe ou « 5'cap ») qui se lie à l'extrémité 5' de l'ARN messager par une liaison triphosphate est reconnue spécifiquement par le complexe d'initiation de la traduction eIF4F (« *eukaryotic initiation Factor* ») en coopération avec le facteur eIF4B nécessaire pour le mésappariement des structures secondaires retrouvées dans la région proximale de la coiffe. Cette activation de l'ARNm permet alors la liaison du complexe de pré-initiation de la traduction correspondant à la petite sous unité ribosomale 40S, additionnée de facteurs d'initiation, de l'ARN de transfert initiateur porteur de l'anticodon d'initiation, et de l'acide aminé méthionine. Le recrutement efficace de ce complexe ribosomal se fait grâce à l'association entre la coiffe et la queue polyadénylée située aux extrémités 5' et 3' respectivement de l'ARNm via l'interaction entre la protéine PABP (*Poly-(A)-Binding Protein*) et le facteur eIF4G, comme l'illustre la Figure 1-19.

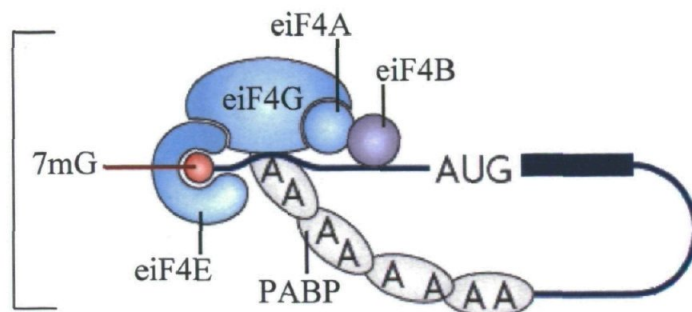


Figure 1-19 : Activation de l'ARNm par les protéines d'initiation de la traduction.

Le complexe eIF4F, en bleu, est formé de la protéine de liaison à la coiffe eiF4E, d'une protéine arborant une activité hélicase nécessaire pour le mésappariement des structures secondaires retrouvées dans la région 5' de l'ARNm (eiF4A), de l'imposante protéine eiF4G interagissant avec l'ARNm et les facteurs d'initiations eiF4E/4A/3 ainsi que de la PABP. La protéine eiF4B, en violet, augmente l'activité hélicase de eiF4A. L'interaction de eiF4G avec la PABP, en gris, induit la circularisation de l'ARNm et permet le recrutement du complexe de pré-initiation 43S. 7mG réfère à la 7-méthylGuanosine qui lie l'extrémité 5' de l'ARN messenger
Figure adaptée de (Jackson et al., 2010)

S'en suit alors le balayage de la région 5' non traduite de l'ARNm jusqu'au site d'initiation de la traduction permettant la reconnaissance du véritable triplet adénine-uracile-guanine pour assurer la fidélité du processus d'initiation. Cette reconnaissance implique l'appariement par complémentarité de bases du codon d'initiation avec l'ARN de transfert initiateur enchâssé dans le ribosome. Suite à cette reconnaissance, l'hydrolyse du GTP par eiF2 va permettre à la grosse unité ribosomale 60S de s'associer au complexe de pré-initiation, induisant alors une réorganisation des nombreux facteurs d'initiation pour former le complexe ribosomal 80S.

1.6.2.2 Répression traductionnelle durant l'étape d'initiation

Les évidences expérimentales suggérant un mécanisme de répression au niveau de l'initiation de la traduction proviennent de l'utilisation d'ARNs messagers rapporteurs arborant une coiffe artificielle. Contrairement aux ARNm coiffés d'une structure typique 7mG, ceux pourvus d'une coiffe artificielle non méthylée ne supportent plus aussi bien un mode de régulation par les microARNs, suggérant alors un mécanisme d'inhibition durant l'initiation de la traduction (Humphreys et al., 2005; Mathonnet et al., 2007; Pillai et al.,

2004; Thermann and Hentze, 2007). L'implication des facteurs d'initiation dans la réponse aux microARNs a été démontrée suite à l'ajout du complexe purifié eIF4F dans des extraits cellulaires de souris contenant des ARNm rapporteurs ciblés par des microARNs. Dans cette condition, l'activité de régulation par les microARNs est supprimée, confirmant la dépendance de la machinerie d'initiation de la traduction pour soutenir la régulation par les microARNs (Mathonnet et al., 2007). Pour démontrer l'importance de la reconnaissance de la coiffe, Pillai et al. ont provoqué le recrutement artificiel des protéines eIF4E et eIF4G dans une région intergénique d'un ARNm rapporteur bicistronique sous contrôle du microARN *let-7* (Pillai et al., 2005). Le deuxième cistron, traduit indépendamment de la coiffe, n'affichait pas de sensibilité à la modulation par le microARN *let-7*, contrairement au premier cistron traduit dépendamment de la coiffe.

Plusieurs autres investigations récentes, collectivement avec les données évoquées plus haut, suggèrent que les microARNs inhibent la traduction en interférant avec la reconnaissance de la coiffe des ARNm par la protéine eIF4E (Ding and Grosshans, 2009; Zdanowicz et al., 2009).

Toutefois, il existe à ce jour encore peu de détails moléculaires permettant d'illustrer ce modèle de régulation par les microARNs (Figure 1-20). En 2007, Kiriakidou et al. ont démontré que la protéine humaine Ago2 avait la capacité de lier la coiffe des ARNm, suggérant une compétition avec eIF4E pour la liaison de cette structure (Kiriakidou et al., 2007). En 2008, l'étude de Eulalio et al. rend questionnable cette activité puisqu'elle démontre que les deux résidus aromatiques présentés comme essentiels pour cette activité de liaison sont finalement impliqués dans l'interaction avec la protéine GW182, une composante du miRISC déterminante pour l'activité de répression (voir section 1.6.4). Ces données sont renforcées par des études structurales qui démontrent l'absence de similitudes entre le domaine de reconnaissance à la coiffe de eIF4E et le domaine prédit pour Ago2 (Kinch and Grishin, 2009).

Finalement, deux études proposent un modèle alternatif d'inhibition de la traduction durant l'étape d'initiation tardive en suggérant une perte d'interaction entre la sous-unité ribosomale 60S et 40S, entraînant l'absence de complexe ribosomal 80S compétent pour initier l'étape d'élongation (Chendrimada et al., 2007; Wang et al., 2008a).

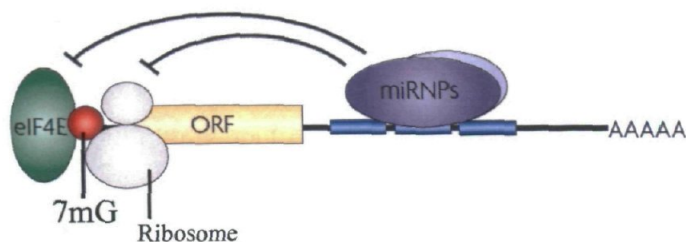


Figure 1-20 : Mécanisme de régulation par les microARNs durant l'initiation de la traduction.

Mécanisme d'inhibition de la traduction par le complexe RISC, en inhibant la reconnaissance entre la coiffe et la protéine eIF4E, en vert, ou en altérant l'association entre les complexes ribosomiques 40S et 60S.

Figure adaptée de (Filipowicz et al., 2008).

1.6.2.3 Répression traductionnelle durant l'étape d'élongation

Bien qu'actuellement le modèle de répression par les microARNs durant l'étape d'initiation de la traduction *via* l'altération de la reconnaissance de la coiffe par la protéine eIF4E prédomine, les données initiales concernant la mécanistique de régulation des microARNs suggère un mécanisme après l'étape d'initiation de la traduction. Ces données ont été obtenues lors de l'étude du microARN *lin-4* sur ses ARNm cibles *lin-14* et *lin-28*. La première vision d'une régulation par inhibition de la traduction faisait suite à l'observation que le niveau de ces ARNm réprimés restait constant, et qu'ils étaient encore associés aux ribosomes en cours de traduction (polysomes) alors que l'expression protéique était fortement diminuée (Olsen and Ambros, 1999; Seggerson et al., 2002). Plusieurs études subséquentes chez les mammifères sont venues corroborer ces données (Maroney et al., 2006; Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006). En effet, suite à l'utilisation de rapporteurs ciblés par des microARNs synthétiques ou endogènes, la majorité des ARNm réprimés ainsi que les microARNs et les protéines Argonautes se retrouvaient associés avec les polysomes actifs. D'autre part, certains rapporteurs contenant une séquence IRES (« *Internal Ribosome Entry Site* »), permettant le démarrage de la traduction sans la mise en place de l'étape d'initiation, étaient également sensibles à la régulation par les microARNs. Pour expliquer ces observations, Nottrott *et al.* et Peterson *et al.* ont proposé des modèles différents dans lesquels la régulation par les microARNs permettrait la dégradation du peptide en cours d'élongation et/ou un ralentissement suivi d'une

déstabilisation des ribosomes actifs entraînant leur dissociation de l'ARNm (Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006) (Figure 1-21).

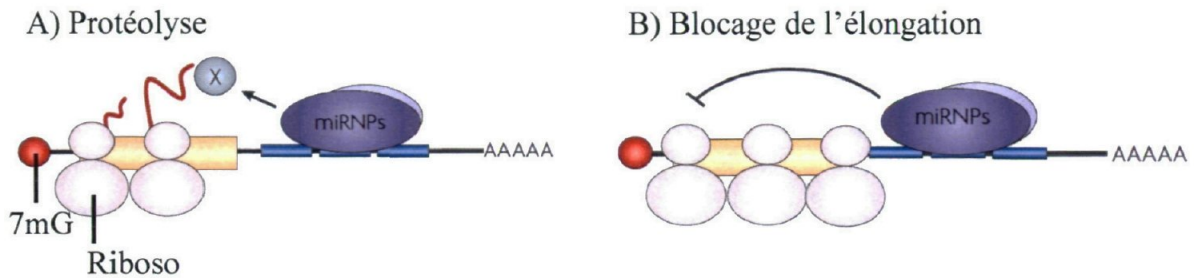


Figure 1-21 : Mécanisme de régulation par les microARNs après l'initiation de la traduction.

(A) Mécanisme par protéolyse du peptide en cours de formation. La protéine X fait référence à une protéase qui n'a pas été encore identifiée. (B) Mécanisme par ralentissement de l'élongation suivie d'un relâchement des ribosomes actifs.

Figure adaptée de (Filipowicz et al., 2008).

Alors que les différents mécanismes d'inhibition de la traduction cités plus haut semblent être des éléments clé de la phase effectrice menée par les microARNs, ils sont également en étroite collaboration avec la machinerie de dégradation des ARNs messagers dont l'importance devient de plus en plus évidente. En effet, les analyses du génome entier aussi bien que de cibles spécifiques de microARNs démontrent l'existence d'une déstabilisation des ARNs messagers engagés dans un mode de régulation par les microARNs (Baek et al., 2008; Bagga et al., 2005; Guo et al., 2010; Lim et al., 2005; Selbach et al., 2008). Il est désormais évident que les microARNs répriment la traduction, mais également qu'ils induisent une dégradation rapide des ARNm. Très récemment, l'analyse cinétique de la répression d'un ARNm rapporteur par un microARN et l'analyse de la distribution des ribosomes sur un ARNm ciblé par miR-430 chez le poisson zèbre et la drosophile respectivement suggèrent que l'étape d'inhibition de la traduction précède la déstabilisation (Bazzini et al., 2012; Djuranovic et al., 2012). Cependant, comme décrit dans les paragraphes ci-dessous, d'autres études suggèrent que la déstabilisation peut être un facteur causal de la répression d'expression d'un ARNm ciblé par un microARN.

1.6.3 Mécanismes de dégradation des ARNm par les microARNs

La déstabilisation des ARNs messagers ciblés par des microARNs s'amorce par une étape de déadénylation suite à l'action consécutive de deux différents complexes à l'activité 3'-5'-exoribonucléase. L'interaction de la protéine PAN3 (*Poly A Nuclease*) avec la PABP permet le recrutement de la sous-unité catalytique PAN2 pour initier la dégradation de la longue queue polyA en une séquence polyadénylée d'environ 50 à 100 nucléotides. L'étape de déadénylation restante est catalysée par le complexe CCR4 (*Carbon Catabolite Repression 4*) - CAF1 (*CCR4 Associated Factor 1*) - NOT1 (*Negative On Tata less*) (Yamashita et al., 2005). La fonction du premier complexe est importante mais pas essentielle puisque un mutant inactif de PAN2 ralentit mais n'abolit pas complètement la déadénylation d'un ARNm rapporteur ciblé par un microARN (Chen et al., 2009). À l'inverse, la surexpression d'un mutant catalytique de CAF1 ou CCR4 supprime totalement le mode de régulation par les microARNs (Chen et al., 2009; Piao et al., 2010). Par ailleurs, l'analyse du transcriptome suite à la suppression des composant du complexe CCR4 - CAF1 - NOT1 montre que la majorité des ARNm ciblés par des microARNs sont sur exprimés (Eulalio et al., 2009b). Suite à cette étape de déadénylation, la coiffe située à l'extrémité 5' est décrochée par le complexe DCP1-DCP2 (« *DeCapping Protein* ») entraînant alors une dégradation de l'ARN messager de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' catalysée par l'enzyme XRN1 (« *eXoRiboNuclease* ») (Parker and Song, 2004). Alors que cette étape de déstabilisation est bien caractérisée, la manière dont le complexe miRISC recrute la machinerie de déadénylation est restée longtemps obscure jusqu'à très récemment, suite à la caractérisation fonctionnelle fine de la protéine GW182 composante du miRISC durant la phase effectrice de régulation par les microARNs

1.6.4 La protéine GW182, composante de la voie des microARNs

La protéine GW182 est importante pour soutenir le mode de régulation par les microARNs. Ainsi, même en l'absence de la protéine Argonaute, son recrutement artificiel sur un ARN messager cause la répression de la traduction (Chekulaeva et al., 2009; Lazzaretti et al., 2009; Zipprich et al., 2009). La protéine Argonaute agit alors comme un partenaire de liaison permettant le recrutement de GW182 à l'ARNm ciblé lors de la phase effectrice. La dérégulation par ARN interférence (RNAi) de GW182 abroge à la fois la répression

traductionnelle et la déstabilisation des ARNm ciblés par des microARNs, démontrant ainsi son implication dans les deux mécanismes associées à la répression des ARNm par les microARNs (Behm-Ansmant et al., 2006; Chekulaeva et al., 2009; Ding et al., 2005; Ding and Grosshans, 2009; Zipprich et al., 2009).

1.6.4.1 Organisation structurale de la protéine GW182

GW182 a été initialement identifiée chez le nématode *C. elegans* lors d'un criblage génétique (Ding et al., 2005), puis isolée biochimiquement suite à la purification d'un complexe comportant la protéine Ago2 chez les mammifères (Meister et al., 2005). Les vertébrés ont trois paralogues, TNRC6A (« *TriNucleotide Repeat-Containing gene* »), connu sous le nom de GW182, TNRC6B et TNRC6C, alors qu'une seule protéine GW182 est retrouvée chez la drosophile. Le génome de *C. elegans* encode pour deux paralogues, AIN-1 et AIN-2. La protéine GW182 est constituée d'un large domaine N-terminal contenant une multitude de répétitions des acides aminés G-W nécessaires pour l'interaction avec la partie MID/PIWI des protéines Argonautes (Takimoto et al., 2009). La région C-terminale nommée « *silencing domain* » est constituée de deux parties, le domaine « mid » impliqué dans la liaison avec la protéine PABPC1 et le domaine C-terminal, tous deux flanqués par un motif de reconnaissance à l'ARN (motif RRM) non essentiel (Eulalio et al., 2009a; Zipprich et al., 2009) (Figure 1-22).

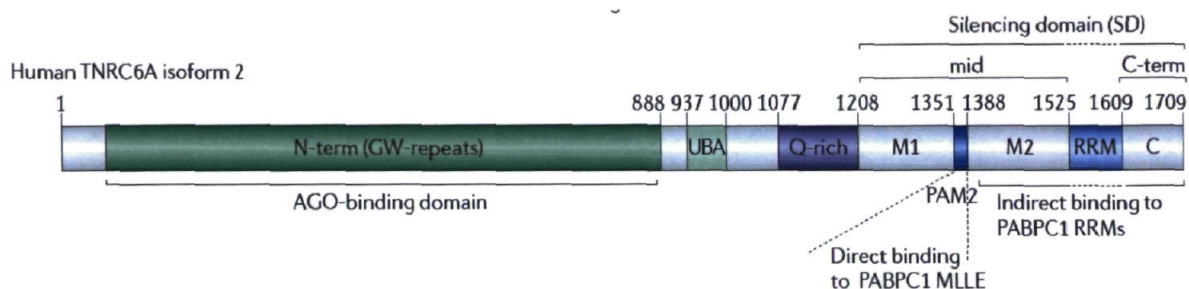


Figure 1-22 : Organisation des domaines de la protéine GW182 humaine (TNRC6A).

GW182 contient un domaine N-terminal riche en répétitions Glycine-Tryptophane impliqué dans l'interaction avec les protéines Argonautes. Un domaine UBA (« *UBiquitin Associated like domain* ») et Q-rich (riche en acides aminés glutamine) de fonction inconnue. La région C-terminale, dénommée « *silencing domain* » est composée de deux sous parties : une partie C-terminale, et une partie « mid », constitué du motif PAM2 (« *PABPC-interacting Motif 2* ») nécessaire à l'interaction avec la PABPC1, encadré par deux sous parties M1 et M2.

Figure adaptée de (Braun et al., 2011)

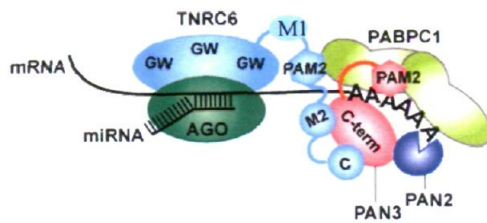
1.6.4.2 Implication de GW182 dans la répression de la traduction

Le domaine PAM2 de la protéine GW182 interagit avec le domaine MLLE situé dans la partie C-terminale de la protéine PABP, et cette interaction joue un rôle important dans l'activité de répression par les microARNs (Fabian et al., 2009). La liaison entre GW182 et PABP laisse supposer un mécanisme de répression par lequel l'activité de la PABP dans la circularisation de l'ARNm serait affectée, comme observé lors de l'interaction de PAPC avec la protéine PAIP2 (« *PABP-Interacting Proteins 2* »), un inhibiteur de la traduction (Khaleghpour et al., 2001). Cette hypothèse est renforcée par le fait que la surexpression de PABPC1 supprime l'activité de répression (Walters et al., 2010; Zekri et al., 2009) et que GW182 compétitionne avec eif4G pour la liaison de la PABP (Fabian et al., 2009; Huntzinger et al., 2010; Zekri et al., 2009).

1.6.4.3 La protéine GW182 : une plateforme d'interaction pour les complexes de déadénylation

La caractérisation fonctionnelle des domaines d'interaction du « *silencing domain* » de la protéine GW182 a permis d'éclaircir la nature du recrutement des complexes de déadénylation sur un ARNm ciblé par le complexe miRISC. Comme l'illustre la Figure 1-23, la protéine GW182 recrute les complexes PAN2-PAN3 et CCR4-NOT-1-CAF1 à l'ARNm ciblé. Ce recrutement se fait grâce à l'interaction directe des protéines PAN2 et NOT1 avec les domaines M2 et C-terminal de GW182, faisant de cette protéine une véritable plateforme d'interaction pour les complexes de déadénylation.

A) Recrutement de PAN2-PAN3



B) Recrutement de CCR4-NOT-1-CAF1

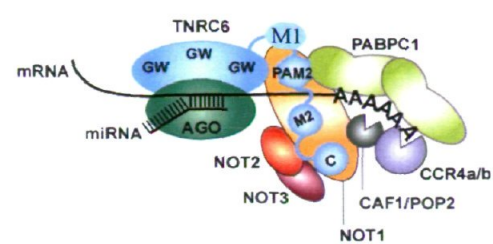


Figure 1-23 : Recrutement des complexes PAN2-PAN3 et CCR4-NOT-1-CAF1 par GW182

(A) PAN3 s'associe directement avec les domaines M2 et C-terminal de GW182 puis avec la PABP et recrute la déadénylase PAN2. (B) Les domaines M1, M2 et C-terminal de GW182 permettent le recrutement du complexe CCR4-CAF1-NOT via la liaison avec la sous-unité NOT1.

Il n'est pas déterminé si ces interactions ont lieu de façon séquentielle ou simultanément.

Figure adaptée de (Braun et al., 2011).

Ainsi, l'association des complexes de déadénylation avec la protéine GW182, et par conséquent leur recrutement à l'ARNm, renforce la notion de causalité de cette mécanistique pour expliquer la répression de l'expression protéique par les microARNs lors de la phase effectrice. D'autre part, en interagissant avec la PABP, GW182 permet d'augmenter l'efficacité de déadénylation du complexe CCR4-NOT-1-CAF1 en rendant la queue poly-A plus accessible (Fabian et al., 2011). Ainsi, en plus d'assurer le recrutement des complexes de déadénylation, la protéine GW182 agit comme un coactivateur de l'activité déadénylase.

De façon intéressante, il a été montré que les composantes du complexe CCR4-NOT-1-CAF1 sont également capables de réprimer l'activité d'un ARNm non polyadénylé, et ce sans affecter le niveau de cet ARNm. Ainsi, le complexe CCR4-NOT-1-CAF1 en plus de participer à l'étape de déstabilisation d'un ARNm ciblé par un microARN, possède une activité de répression de la traduction (Chekulaeva et al., 2011).

Récemment, Su et al. ont identifié puis caractérisé une protéine à activité E3 ubiquitine ligase, la protéine EDD (*E3 isolated by Differential Display*) arborant un domaine PABC (*Poly-A Binding protein C-terminal*) (Su et al., 2011). Ce domaine, identique à celui de PABP, est capable de reconnaître les motifs PAM2 retrouvés dans diverses protéines impliquées dans la répression et la stabilité des ARNm (Albrecht and Lengauer, 2004). Les

auteurs ont démontré que la protéine EDD était capable d'interagir avec la protéine GW182 et le complexe miRISC, et partageait la même interface d'interaction que la PABP *via* le domaine PABC. Parmi ces interactions on retrouve la liaison avec la protéine RCK/p54 et les protéines TOB1-TOB2 qui participent au recrutement du complexe déadénylase CCR4-NOT1 (Ikematsu et al., 1999), tous reconnus comme impliqués dans la voie des microARNs (Behm-Ansmant et al., 2006; Chu and Rana, 2006; Su et al., 2011). Ainsi, les auteurs suggèrent un rôle parallèle et chevauchant entre les protéines EDD et PABP durant la répression de la traduction.

1.6.5 Modèle de régulation des ARNm par les microARNs

Collectivement, l'analyse de toutes ces données permet de faire émerger un modèle dans lequel le recrutement du miRISC sur un ARN messager spécifique permet d'interférer avec la machinerie de traduction en empêchant la mise en place des complexes d'initiation au niveau de la coiffe. Parallèlement, le recrutement des complexes déadénylases par la protéine GW182 induit l'étape de déadénylation et de déstabilisation rapide pour consolider le phénomène de répression. D'autre part, l'interaction de GW182 avec la PABP permet de faciliter l'activité de raccourcissement de la queue poly-A, tout en interférant avec la circularisation de l'ARNm, fragilisant un peu plus la dynamique de traduction. Le recrutement du complexe CCR4-NOT-1-CAF1 peut également initier un mécanisme de répression de la traduction qui reste à déterminer. Est-ce que ces étapes s'effectuent simultanément, alternativement, consécutivement, ou sont dominantes dans un contexte particulier plutôt qu'un autre est encore une énigme. En effet, les nombreux modèles proposés peuvent s'expliquer par la possibilité que la nature de la répression des microARNs peut dépendre du type cellulaire et surtout de l'outil expérimental utilisé pour caractériser cette mécanistique (ex : utilisation d'ARNm rapporteurs aux caractéristiques différentes : dynamique du promoteur, taille du 3'UTR...) (Kong et al., 2008; Lytle et al., 2007; Nissan and Parker, 2008). La présence de différentes protéines Argonautes au sein d'un même organisme pourrait également contribuer à cette diversité.

1.6.6 Facteurs influençant le mode de répression par les microARNs

L'hétérogénéité des mécanismes de répression par les microARNs peut également être la conséquence d'une connexion entre le miRISC et une variété de déterminants influençant négativement ou positivement le potentiel de répression des microARNs. Parmi ces déterminants, on va retrouver des facteurs protéiques secondaires interagissant avec les composants clés du complexe miRISC dans des contextes physiologiques particuliers, ou de manière spécifique.

1.6.6.1 Facteurs inhibant la phase effectrice de régulation par les microARNs

Ainsi, comme facteurs inhibant la voie des microARNs, on retrouve les protéines **HuR** (« *Human antigen R* »), qui dans des conditions de stress, suppriment la répression de l'ARNm *cat-1* par le microARN miR-122 en liant les séquences riches en adénines et uridines (« *AU-rich element* ») proches du site de liaison au microARNs. Une autre protéine de liaison à l'ARN, **DND1** (« *Dead end* »), empêche le recrutement du microARN miR-430 sur les ARNm NANOS1 et TDRD7 (« *TuDoR Domain containing* ») en liant les séquences riches en uridine qui flanquent le site de liaison au microARN chez le poisson zèbre. Cette modulation est spécifique aux cellules germinales primordiales et permet leurs viabilités (Kedde et al., 2007). On retrouve également la protéine **APOBEC3G** (« *APOLipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide-like* ») qui freine la répression des ARNm ciblés par les microARNs miR-10b, miR-16, miR-25, et *let-7a* dans les cellules HeLa en culture (Huang et al., 2007). La protéine **Mei-P26** chez la drosophile est impliquée dans la diminution du niveau de microARNs (Neumuller et al., 2008). Également, la protéine **TRIM71** (« *TRIPartite Motif* ») chez les mammifères a été identifiée comme diminuant l'activité des microARNs en induisant la polyubiquitination et la dégradation de la protéine HsAgo2 par la machinerie du protéasome (Rybak et al., 2009).

1.6.6.2 Facteurs stimulant la phase effectrice de régulation par les microARNs

A l'inverse, les protéines de la famille **PUF** (« *PUmilio Family* ») collaborent avec les complexes miRISC pour stimuler la répression. Ainsi, PUF9 chez *C. elegans* stimule la répression de l'ARNm *hbl-1*, une cible du microARN *let-7* (Nolde et al., 2007). De plus, une analyse à grande échelle des séquences reconnues par les protéines de la famille PUF

démontre que ces régions sont significativement enrichies dans les régions 3'UTR contenant des sites de liaison aux microARNs suggérant un rôle coopératif plus général (Galgano et al., 2008).

La protéine **FMRP**, un régulateur négatif de la traduction, est associée au complexe contenant Dicer et Ago2 (Hock et al., 2007). Elle collabore avec le miRISC pour réprimer la traduction d'ARNm spécifiques dans le développement neuronal (Jin et al., 2004). Chez les mammifères et *C. elegans*, les protéines **TRIM32** et **NHL2** respectivement semblent augmenter l'activité de microARNs spécifiques sans toutefois changer leur niveau par un mécanisme encore indéterminé (Hammell et al., 2009; Schwamborn et al., 2009).

Parmi les facteurs associés aux miRISC qui régulent positivement la voie des microARNs on retrouve certains composants des corps-P. Ces corps-P ou « *P-bodies* » correspondent à des domaines cytoplasmiques qui regroupent une variété de ribonucléoprotéines impliquées dans la dégradation et la répression des ARNm. Consistant avec leurs rôles dans la dégradation des ARNm, on y retrouve les protéines Argonautes et GW182 associées aux microARNs (Liu et al., 2005a; Liu et al., 2005b; Sen and Blau, 2005). La sous régulation de certains composants des corps-P comme la protéine à activité hélicase d'ARN **RCK/p54** (Chu and Rana, 2006), les enzymes catalysant le décoiffage de l'extrémité 5' des ARNm DCP1-DCP2 (Rehwinkel et al., 2005) ou le complexe de déadénylation **CCR4-NOT1-CAF1** (Behm-Ansmant et al., 2006) compromet la répression par les microARNs. Certaines modifications post-traductionnelles sont nécessaires également pour la stabilité de la protéine humaine Ago2, comme l'hydroxylation sur la proline 700 (Qi et al., 2008) ou la phosphorylation sur la sérine 387 (Zeng et al., 2008).

1.7 Objectifs de la thèse de doctorat

L'objectif général du sujet de thèse présenté dans ce manuscrit s'articule autour de deux thèmes, qui ont en commun l'étude de la mécanistique des microARNs en utilisant comme modèle animal le nématode *Caenorhabditis elegans*.

Thématique 1

La première thématique (chapitre deux), cherche à comprendre par quelle(s) caractéristique(s) moléculaire(s) la protéine Argonaute ALG-1 est associée spécifiquement à la voie des microARNs.

Chez le nématode *C. elegans*, les voies des microARNs et du RNAi sont bien compartimentées et mettent en jeu des protéines Argonautes différentes. Les protéines ALG-1 et ALG-2 sont associées spécifiquement avec les microARNs alors que la protéine RDE-1 est associée au processus d'interférence par l'ARN (RNAi) prenant en charge une autre classe de courts ARNs non-codant, les siARNs. Cependant, bien que ces deux types de courts ARNnc soient maturés en fragments de 21-23 nucléotides par la même enzyme, Dicer, leur mécanisme de répression génique est différent. Les microARNs participent à la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique en modulant l'expression protéique des ARNm tandis que les siARNs utilisent une voie de dégradation par clivage endonucléolique de l'ARNm ciblé. Le mécanisme moléculaire par lequel cette spécialisation a lieu a été la première question à adresser pour l'étude de la voie des microARNs.

Notre hypothèse de travail pour expliquer cette partition était que la nature de la source d'ARN double brin permet de spécifier une voie plutôt qu'une autre. En effet, une structure d'ARNdb en forme de tige boucle contenant des mésappariements est à l'origine des molécules de microARNs, alors qu'une molécule d'ARNdb parfaitement complémentaire génère les siARNs.

Pour répondre à cette hypothèse, notre objectif a été de développer un outil génétique nous permettant d'adresser *in vivo* et de façon combinée l'impact de la nature d'une molécule d'ARNdb sur les mécanismes d'interférence par l'ARN (microARN et RNAi)

Les détails et résultats de cet objectif sont présentés dans le deuxième chapitre sous forme d'un article scientifique intitulé :

- Two molecular features contribute to the Argonaute specificity for the microRNA and RNAi pathways in *C. elegans*.

Jannot G, Boisvert ME, Banville IH, Simard MJ. RNA. 2008 May;14(5):829-35.

Thématique 2

La deuxième thématique, (chapitres trois et quatre), vise à découvrir de nouveaux facteurs protéiques interagissant avec la protéine Argonautes ALG-1.

La recherche de partenaires protéiques figure parmi les méthodes d'investigation indispensables pour comprendre en profondeur un mécanisme cellulaire. Comme la mécanistique de régulation associée à la voie des microARNs n'est pas encore parfaitement comprise, ceci nous a poussé à rechercher puis caractériser les partenaires physiques de la protéine Argonaute ALG-1 en utilisant une technique de criblage double hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les candidats obtenus ont ensuite été étudiés de façon systématique pour adresser leur possible implication dans la voie des microARNs. Les résultats de ce second objectif sont présentés dans les chapitres trois et quatre :

Le troisième chapitre présenté sous la forme d'un article scientifique décrit la caractérisation fonctionnelle d'un partenaire physique de la protéine ALG-1 chez le nématode *C. elegans* et l'humain :

- The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and humans.

Jannot G, Bajan S, Giguère NJ, Bouasker S, Banville IH, Piquet S, Hutvagner G, Simard MJ. EMBO Rep. 2011 Jun;12(6):581.

Le quatrième chapitre décrit la mise au point et les résultats d'une étude fine et systématique permettant de caractériser dans la voie des microARNs un nombre important de candidats obtenus lors du criblage double hybride contre la protéine Argonaute ALG-1.

CHAPITRE 2

Two molecular features contribute to the Argonaute specificity for the microRNA and RNAi pathways in *C. elegans*

Guillaume Jannot, Marie-Eve L. Boisvert, Isabelle H. Banville and Martin J. Simard¹

Laval University Cancer Research Centre, Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), Québec City, Québec G1R 2J6, Canada

1: Corresponding author

Email: Martin.Simard@crhdq.ulaval.ca

Phone: 418-525-4444, ext: 15185

Fax: 418-691-5439

Keywords: Argonaute, ALG-1, ALG-2, RDE-1, RNAi, microRNA

Running title: Two features affect Argonaute selection

Avant-Propos

Cet article publié en 2008 dans le « RNA journal » repose sur l'observation de phénotypes précis obtenus suite à l'injection de molécules d'ARN dans le corps de jeunes nématodes au stade larvaire L3. Plusieurs mois de travail ont été nécessaires pour acquérir une dextérité et une reproductibilité indispensables à la mise au point des différentes figures. En effet, outre la petite taille des vers à injecter, les souches de nématodes que nous avons utilisées sont thermosensibles, ce qui impose d'injecter dans une salle à une température contrôlée de 15°C. Toutefois, ces conditions contraignantes m'ont été extrêmement bénéfiques puisque j'ai désormais acquis une excellente expérience dans l'injection de nématodes, expérience qui m'a grandement servi durant ma thèse.

Les souches de nématodes utilisées dans cet article ont été obtenues par différents croisements effectués par le Dr Martin Simard, Isabelle Banville et Marie-Eve Boisvert.

En tant que premier auteur j'ai contribué à la collecte de la totalité des résultats ainsi qu'à la rédaction et la correction de cette publication qui est disponible en format « pdf » à l'annexe 2.

Résumé

Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, les protéines Argonautes sont spécifiquement associées avec la voie du RNAi ou des microARNs. Pour comprendre comment la sélection précise des Argonautes a lieu, nous avons mis au point une molécule d'ARNdb contenant une séquence de siARN et de microARN. Alors que la molécule d'ARN affichant des mésappariements peut entrer uniquement dans la voie des microARNs, une séquence parfaitement complémentaire sauve le phénotype de perte de fonction du microARN *let-7* mais initie également un mode de régulation par RNAi. Nous avons démontré que la protéine Argonaute RDE-1 est essentielle pour générer la réponse RNAi induite par la molécule parfaitement complémentaire, mais non nécessaire pour la voie des microARNs. A l'inverse les protéines ALG-1 et ALG-2 sont exclusivement requises pour la fonction des microARNs. Finalement une molécule d'ARNdb contenant une séquence de microARN avec des mésappariement et une séquence parfaitement complémentaire de siARN peut entrer dans les deux voies, suggérant que le choix des Argonautes peut se faire après le clivage de la molécule par Dicer. Ainsi, nos résultats suggèrent que la sélection des protéines Argonautes est déterminée par au moins deux composantes : (1) la structure du court duplex d'ARN ; et (2) les caractéristiques moléculaires spécifiques de chaque protéine Argonaute.

Abstract

In *Caenorhabditis elegans*, specific Argonaute proteins are dedicated to the RNAi and microRNA pathways. To uncover how the precise Argonaute selection occurs, we designed dsRNA triggers containing both miRNA and siRNA sequences. While dsRNA carrying nucleotides mismatches can only enter the miRNA pathway, a fully complementary dsRNA successfully rescues *let-7* miRNA function and initiates silencing by RNAi. We demonstrated that RDE-1 is essential for RNAi induced by the perfectly paired trigger, yet is not required for silencing by the *let-7* miRNA. In contrast, ALG-1/ALG-2 are required for the miRNA function, but not for the siRNA-directed gene silencing. Finally, a dsRNA containing a bulged miRNA and a perfectly paired siRNA can enter both pathways suggesting that the sorting of small RNAs occurs after that the dsRNA trigger has been processed by Dicer. Thus, our data suggest that the selection of Argonaute proteins is affected by two molecular features: 1-the structure of the small RNA duplex and; 2- the Argonautes specific characteristics.

2.1 Introduction

In animals, the RNAi and the microRNA (miRNA) pathways lead to different outcomes. The RNAi pathway degrades specifically the messenger RNA (mRNA), which is fully complementary to the siRNA embedded in the RISC complex, while miRNA, partially complementary to the untranslated region of the mRNA, will not initiate specific target cleavage but instead will abrogate protein synthesis. Among the cellular factors associated with these processes, members of the Argonaute gene family have been shown to be exclusively associated with either the miRNA or the RNAi pathway. In *Drosophila melanogaster*, Ago1 is associated with miRNA (Okamura et al., 2004) and Ago2 is essential for the RNAi pathway (Hammond et al., 2001). In the nematode *Caenorhabditis elegans*, genetic studies demonstrated that the Argonaute *rde-1* gene is strictly required for RNAi (Tabara et al., 1999) and two Argonaute family members *alg-1* and *alg-2* are essential for the miRNA pathway but have no role into the RNAi pathway (Grishok et al., 2001). Furthermore, recent biochemical data have revealed that RDE-1 is associated with siRNAs (Yigit et al., 2006) and ALG-1 and ALG-2 are associated with miRNAs (Hutvagner et al., 2004). One reason of this disparity could be that trigger molecules are recognized by specific factors that “imprint” the RNA molecule and guide it to the appropriate Argonaute protein and consequently to the appropriate outcome.

To address the role played by the double-stranded RNA (dsRNA) triggers on the Argonaute selection, we designed different dsRNA molecules containing both miRNA and siRNA. Our analysis suggests that the molecular feature of the dsRNA triggers as well as the molecular characteristics of Argonaute proteins contribute to the proper selection of Argonaute in their respective silencing pathways in *C. elegans*.

2.2 Results and discussion

2.2.1 A small dsRNA trigger able to enter both miRNA and RNAi pathways

To perform this study, we have generated small dsRNA molecules that contain both the *let-7* miRNA sequence and a siRNA fully complementary to the *gfp* mRNA (Figure 2-1A). To monitor the capacity of the chimeric dsRNA molecule to generate a functional miRNA, we used a *C. elegans* strain that carries a thermosensitive (ts) allele of the *let-7* gene (Reinhart et al., 2000). We can then provide functional copies of *let-7* miRNA by injecting the chimeric dsRNA into the animals and observe if we can rescue *let-7* loss-of-function phenotypes at the non-permissive temperature. When the *let-7*ts animals are injected with the dsRNA chimeric trigger and then shifted to the non-permissive temperature, more than 50% of these animals had progeny (Figure 2-1B). In contrast, when non-injected L3 larvae stage animals are shifted to 25°C or when animals are injected with non-related dsRNA molecules (data not shown), all of the *let-7*ts animals display bursting vulva phenotype and only 5% of the shifted animals provide few F1 progeny (Figure 2-1B). Thus, our data indicate that a fully complementary double-stranded trigger can efficiently rescue the loss-of-function of a specific miRNA.

We next examined the potential of the fully complementary dsRNA chimeric molecule to enter the RNAi pathway and initiate a specific RNA silencing response. To address this issue, we used the previously described dsRNA trigger that contains an siRNA that is fully complementary to a 21 nucleotide region of the *gfp* mRNA (Figure 2-1A). When transgenic animals carrying the *gfp* gene are injected with the trigger chimera, the green fluorescence signal is rapidly silenced in the animal body (Figure 2-1C). To confirm that the RNAi pathway mediates the GFP silencing, we injected the dsRNA molecule in animals carrying a null allele of the *rde-4* gene, an essential component of the RNAi in *C. elegans* that binds dsRNA molecules (Tabara et al., 2002; Parker et al., 2006). In these animals, the injection of the dsRNA molecule did not affect the fluorescence level observed (Figure 2-1C), indicating that the GFP siRNA produced from the processing of the chimeric dsRNA is entering the RNAi pathway to silence efficiently the targeted mRNA.

We therefore conclude that we have successfully generated a dsRNA trigger that can effectively rescue both miRNA function and specifically silence an mRNA through the RNAi pathway.

2.2.2 Mismatches in the dsRNA trigger increase the *let-7* rescue but circumvent the RNAi capacity

Next, we addressed whether the nature of the dsRNA trigger may affect its capacity to be introduced into the miRNA and RNAi pathway. We then modified the fully complementary dsRNA molecule to generate a dsRNA trigger containing a single mismatch in both *let-7* and GFP siRNA duplexes that mimic the one found in the stem portion of the *let-7* miRNA precursor (Figure 2-1A). As opposed to non-injected animals, 69% of the animal population injected with this molecule can reach the L4-adult transition and give many F1 progeny (Figure 2-1B). In comparison with the fully complementary molecule, animals injected with the dsRNA trigger containing mismatches led to a better rescue of *let-7* miRNA (Figure 2-1B). On the other hand, the transgenic animals carrying GFP gene, injected with the dsRNA trigger containing mismatches do not display any RNAi response contrasting the silencing observed in animals injected with the fully complementary dsRNA molecules (Figure 2-1C). The increased rescue activity of a dsRNA trigger that can only enter the miRNA pathway suggests that RNAi and miRNA initiating complexes may compete for loading their respective Argonautes with small RNAs when the dsRNA trigger carried fully base-paired nucleotides (see model in Figure 2-4).

In addition, we also observed that the rescue of the *let-7*ts animals with dsRNA molecules only lasts less than ninety-six hours after injection (72h for the fully complementary dsRNA and 96h with the dsRNA containing mismatches; Figure 2-1D). In contrast, the fully complementary dsRNA molecule initiates an RNAi response that can be maintained throughout lifespan of the injected animals (Figure 2-1C, data not shown). These data suggest that the miRNA complex has an extremely rapid turnover while the siRNA complex may act during multiple rounds of mRNA cleavage. Thus, the cleavage may

initiate amplification of the RNAi response by RNA-dependent RNA polymerase (Pak and Fire, 2007; Sijen et al., 2007). Accordingly, we observed that the RNA-dependent RNA polymerase *rrf-1* is not required for the *let-7* miRNA rescue (Figure 2-2A) but important for RNAi (Figure 2-2B).

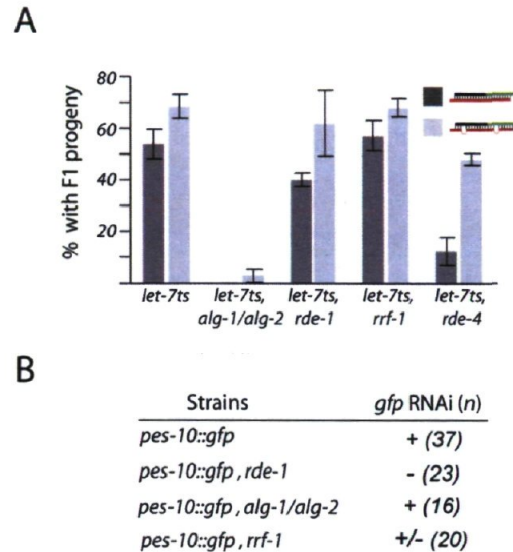


Figure 2-2: The Argonaute proteins are sorted properly to their respective pathways.

(A) The rescue of *let-7* loss-of-function by both dsRNA triggers necessitates ALGs. Once injected by indicated dsRNA triggers, animals are scored at non-permissive temperature for the presence of F1 progeny (greater than three). The error bars represent the 95% confidence interval (as in Figure 1B). **(B)** The RNAi initiated by the fully complementary trigger requires RDE-1 and necessitates partially the RNA-dependent RNA polymerase *rrf-1* (GFP silencing is noted but not as efficient as in the *pes-10::gfp* animals (see Figure 1C)). Numbers (n) of animals observed are indicated. All animals observed for each strain displayed the same GFP level.

From these observations, we conclude that the presence of unpaired nucleotides into the dsRNA trigger abrogates its capacity to enter the RNAi pathway but increase its capacity to initiate the miRNA pathway.

2.2.3 The dsRNA trigger is not the only molecular cue that guides the specific requirement of Argonaute proteins

In RNAi, a perfect base-paired dsRNA molecule initiates the targeted mRNA degradation. On the other hand, the imperfect stem-loop structure of the miRNA leads to translational inhibition. In previous studies, we have shown that the Argonaute RDE-1 interacts with siRNAs (Yigit et al., 2006) while ALG-1 and ALG-2 Argonaute proteins are associated with the *let-7* miRNA (Hutvagner et al., 2004). Therefore, the distinctive outcomes of these two RNA silencing pathways may be mediated by the molecular feature of their triggers (bulged or perfectly paired dsRNAs) or may be associated to their specific Argonaute proteins. To address this possibility, we used the fully symmetrical and perfectly paired dsRNA trigger that efficiently produced miRNA as well as RNAi responses (Figure 2-1B and 1C). We thus generated *let-7*ts strains carrying either nonfunctional *rde-1* gene or *alg-1* and *alg-2* genes and address if *rde-1* and/or *alg-1/alg-2* are important for the *let-7* rescue by the chimeric dsRNA molecule. Despite the fact the dsRNA provided is perfectly base-paired, the rescue of the *let-7* miRNA does not require RDE-1 but requires the presence of ALGs (Figure 2-2A). Interestingly, we observed that in contrast to the chimeric molecule containing mismatches, the fully base-paired dsRNA necessitates the dsRNA binding protein RDE-4 (Figure 2-2A). This data support that RDE-4 is important to promote Dicer cleavage of perfectly base-paired dsRNA trigger (see model Figure 2-4).

In parallel, we also tested the Argonaute proteins requirement for the RNAi-induced response by the trigger chimera. When GFP positive animals lacking functional *alg-1* and *alg-2* genes are injected with the dsRNA trigger, we observe a complete disappearance of the green fluorescent signal as the wild-type animals expressing GFP (Figure 2-2B). However, when the animals are lacking functional alleles of the *rde-1* gene, the dsRNA trigger does not alter the expression of the green fluorescence protein (Figure 2-2B).

Thus, although we are using a dsRNA trigger able to enter both small RNA pathways, they still necessitate their Argonaute proteins, suggesting that RDE-1 and ALGs have molecular characteristics that confer their specific requirements for the RNAi and the miRNA pathway.

2.2.4 The sorting of small RNAs may occur after Dicer cleavage

So far, our data indicate that the presence of mismatch nucleotides affects the capacity of dsRNA triggers to initiate RNAi response and that a perfect paired dsRNA molecule can effectively enter both miRNA and RNAi pathways but still requires the appropriate Argonaute proteins (ALGs or RDE-1, respectively). Thus, the sorting of small RNAs can be produced by specific dsRNA binding proteins that will commit the dsRNA trigger to either RNAi or miRNA pathway or they can be sorted after Dicer cleavage. To address whether the sorting of small RNAs occur prior or after Dicer mediated maturation of the dsRNA trigger, we generated a dsRNA trigger that contains a bulged *let-7* dsRNA and a perfectly paired GFP siRNA (Figure 2-3A). As observed with other dsRNA triggers, the new dsRNA trigger can rescue the *let-7* miRNA loss-of-function phenotype observed when the *let-7ts* allele is shifted to non-permissive temperature (Figure 2-3B). Interestingly, even if the dsRNA trigger contained unpaired nucleotides, the presence of a perfectly paired siRNA is sufficient to initiate silencing of the targeted *gfp* mRNA (Figure 2-3C). In addition, because the fully base-paired molecule requires RDE-4 as well as the Argonaute ALGs to rescue *let-7* function (Figure 2-2A), these observations strongly support that the recognition of the dsRNA trigger by dsRNA binding protein does not significantly affect the selection of Argonaute proteins.

Therefore, our data indicate that the sorting of small RNAs may occur after Dicer processes the dsRNA trigger in *C. elegans*, as very recently reported in *Drosophila* (Forstemann et al., 2007; Tomari et al., 2007).

effectively enter both miRNA and RNAi pathways. Thus, our data strongly suggest that the nature of the dsRNA molecule is not the only step that influences sorting of the Argonaute proteins for miRNA and RNAi pathways but their specific associations with either of these RNA silencing pathways is also influenced by their molecular features.

The Argonaute proteins are essential for all RNA silencing pathways discovered so far in eukaryotes (reviewed in (Hutvagner and Simard, 2008)). The presence of many members of this family suggests specific roles associated to each one of them. In mammals, all four Argonaute proteins can bind miRNAs and siRNAs, but only hAgo2 has the capacity to induce endonucleolytic cleavage of the targeted mRNA (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004). This difference may be explained by the fact that only hAgo2 possesses the catalytic residues essential for the “slicing” activity in its Piwi domain (Rivas et al., 2005). In flies, *ago1* mutants are defective in miRNA pathway but not in siRNA-directed cleavage, whereas *ago2* mutants are defective in RNAi pathway but not in miRNA silencing (Okamura et al., 2004).

As observed in flies, *C. elegans* has distinct requirements for Argonaute proteins in siRNA or miRNA-directed RNA silencing. Genetic studies have demonstrated that the Argonaute RDE-1 is essential for the RNAi pathway (Tabara et al., 1999) while ALG-1 and ALG-2 are important for the miRNA pathway (Grishok et al., 2001). Moreover, the overexpression of Argonautes required for the miRNA pathway cannot rescue the loss of the *rde-1* gene for the RNAi response (Yigit et al., 2006). To explain this Argonaute specificity, we hypothesized that the molecular characteristics of dsRNA triggers may be crucial for the Argonaute choice. Our current findings demonstrate that a dsRNA duplex that mimics the unpaired miRNA precursor can influence its capacity to either enter the RNAi or the miRNA pathways. The capacity of a dsRNA duplex structure to partition small RNAs between Argonaute proteins has also been observed in *Drosophila* (Forstemann et al., 2007; Tomari et al., 2007). Using biochemical assays, they have observed that a single mismatch in the RNA duplex weakens the binding of the Ago2 loading complex (Tomari et al., 2007). Interestingly, it has been recently observed in *C. elegans* that the presence of mismatches in the dsRNA trigger will favor the binding of ALG-1 to the small RNA instead of the RDE-1 binding (Steiner et al., 2007). Our experiments now indicate that the

presence of a single mismatch into the small RNA duplex affects the sorting of small RNAs after the cleavage of the dsRNA trigger by Dicer. We can then envision that binding of the RDE-1 loading complex to a small RNA duplex containing mismatches is less efficient, like the Ago2 loading complex, as observed in *Drosophila*. Thus, our data supported by these recent independent experiments, uncover the importance of the dsRNA molecular features to sort functionally distinct Argonaute proteins in animals.

In addition, our data also demonstrate that when a fully complementary dsRNA molecule is used, small RNAs processed from that molecule can enter both miRNA and RNAi pathways. Therefore, the source of the dsRNA trigger does not affect the selective association of Argonaute proteins with either the miRNA or the siRNA pathways. Recent observations in fly suggest that the difference between Ago1 (miRNA pathway) and Ago2 (RNAi pathway) may be explained by the inefficient capacity of Ago1 to induce mRNA cleavage (Forstemann et al., 2007). Therefore, it has been proposed that Ago1 requires mismatches within the seed region of the small RNA duplex to generate functional RISC complex (Tomari et al., 2007). Despite the fact that the Piwi domains of RDE-1 and ALGs Argonautes display the critical amino acids required for endonucleolytic cleavage (Yigit et al., 2006), the contribution of their cleavage activities to the RISC loading complex has not been demonstrated yet. Contrasting with Ago1 in flies, ALGs proteins can mediate translational repression with a miRNA generate from a perfectly base-paired small RNA duplex (Figure 2-1B and Figure 2-2A). Therefore, our data support that in *C. elegans*, ALGs can generate a functional RISC complex from small RNA duplexes irrespective of the presence of unpaired nucleotides within their seed regions. The association of the Argonaute complexes with targeted mRNAs may also contribute to select the proper Argonaute protein. The exclusive specificity of Argonaute proteins in *C. elegans* in the RNAi and miRNA pathways may be attributed to unique molecular partners for RDE-1 and ALGs, as observed for human Ago1 and Ago2 (Meister et al., 2005). These specific interactions may occur prior to or during the Argonaute/small RNA complex enters in association with the mRNA target (Figure 2-4). Based on our observations and recently published experiments, we propose that the specific selection of Argonaute proteins for the miRNA and RNAi pathways in *C. elegans* is controlled at two different levels. Initially, the Argonaute RDE-1 favors small RNAs derived from perfect dsRNA duplex while ALGs

favor RNAs produced from bulged dsRNA duplex (but can still accept small RNAs produced from both types of RNA duplexes). The small RNA binding specificity of these Argonaute proteins can be dictated by their respective loading complexes. For RDE-1, the specificity for RNAi pathway may come from RDE-4, a double-stranded RNA binding protein found in complex with RDE-1 (Duchaine et al., 2006; Tabara et al., 2002); while ALGs, the Argonautes specific to the miRNA pathway, may be influenced by a yet unknown dsRNA binding protein similar to *Drosophila* Loquacious (Forstemann et al., 2005). In addition, the presence of a central mismatch in the small RNA duplex may destabilize the RDE-4 interaction as recently observed for R2D2, the dsRNA binding protein associated with the RNAi pathway in *Drosophila* (Tomari et al., 2007). Once functional Argonaute/small RNA complexes are formed, molecular interactions with specific proteins and/or with the targeted mRNA will influence their capacity to initiate either RNAi or miRNA responses (Figure 2-4).

We believe that extensive biochemical studies and complex analysis of the Argonaute ALGs and RDE-1 proteins will explain how they can specifically alter protein synthesis by miRNAs and mediate specific mRNA degradation guided by siRNAs.

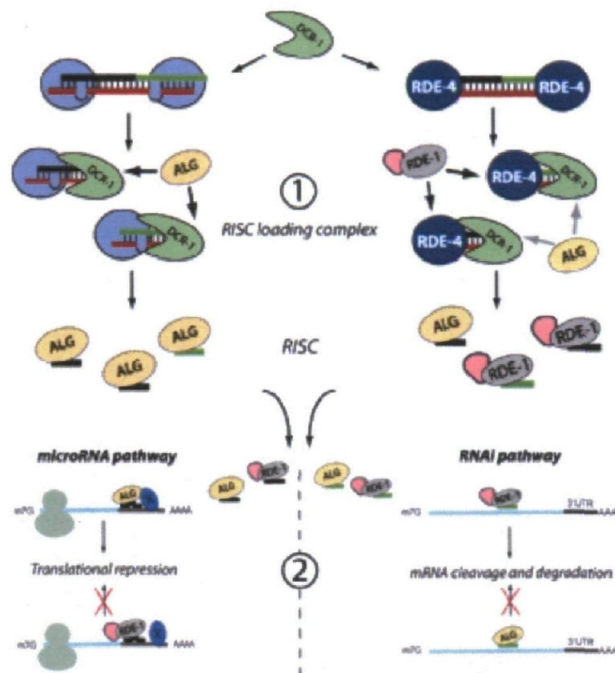


Figure 2-4 : Model for the Argonaute proteins selection in *C. elegans*.

The sequence complementarity of the double-stranded (ds)RNA duplex represents the first step that influences the Argonaute selection (1). Fully base-paired dsRNA molecules are recognized by the dsRNA binding protein RDE-4 that recruits Dicer (DCR-1) to induce dsRNA trigger cleavage (right panel). The presence of RDE-4 on the small RNA duplex processed by DCR-1 might favour the recruitment of RDE-1 over ALGs into the RISC loading complex. Therefore, the majority of RISC complex produced by complementary siRNA duplexes are associated to RDE-1. In contrast, dsRNA duplexes containing mismatched nucleotides are not bound by RDE-4 but instead by another dsRNA binding protein that will favor the recruitment of ALGs to the RISC complex (left panel). Once Argonaute/small RNA complexes are formed, a second step of Argonaute selection occurs at the target level (2). The functionality of the Argonaute protein in either the miRNA pathway (left panel) or the RNAi pathway (right panel) may be dictated by their enzymatic activity as observed in fly (Forstemann et al., 2007) and/or can be mediated by specific interactions with cellular factors associated with the targeted mRNA (X factor on the left panel) or by direct interaction with the Argonaute protein prior to the interaction with the mRNA (pink object). Thus, it is only when the small RNA/Argonaute complex is associated to the target and interacts with specific factors that the translational repression or the mRNA cleavage and degradation occur.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Design and preparation of dsRNA molecules

All RNA oligonucleotides were obtained from Integrated DNA Technologies, Inc. Oligos sequences are the following. 5'-UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU AUC AAU ACC UUU UAA CUC GAU- 3' (*let-7/GFP*); 5'-CGA GUU AAA AGG UAU UGA UAC UAU ACA ACC UAC UAC CUU ACC-3' (*let-7/GFP* reverse); 5'-CGA GUU AAA ACG UAU UGA UAC UAU GCA AUU UUC UAC CUU ACC-3' (*let-7/GFP* mismatches reverse); 5'-CGA GUU AAA AGG UAU UGA UAC UAU GCA AUU UUC UAC CUU ACC-3' (*let-7* bulged/*GFP* reverse). To generate dsRNA trigger molecules, complementary oligos were pooled and annealed (boiled at 100°C for 2 minutes and annealed 2h at 37°C) to obtain a final solution of double-stranded RNA at 2 mg/ml.

2.3.2 RNAi interference and rescued experiments

The *let-7* miRNA rescue and RNAi experiments were performed by injecting dsRNA molecules (2mg/ml) into L3 and L4 larval stage animals, respectively.

For the rescue of *let-7* experiment, *let-7ts* (*n2853*) strains were injected with various dsRNA molecules at permissive temperature (15°C). After five hours recovery, animals were isolated and placed at non-permissive temperature and phenotypes were observed after forty-eight hours post-injection. As control for each *let-7* rescue experiment, equal numbers of uninjected animals were also shifted to the non-permissive temperature (25°C).

For the RNAi assays, various strains expressing GFP driven by *pes-10* promoter were injected. The GFP expression was monitored in injected animals after forty-eight hours under the GFP stereomicroscope. Strong GFP silencing is observed in the pharynx and along the animal body (see Figure 2-1C).

2.3.3 Worm strains

Animals used to generate the studied strains are: *rde-1* (*ne300*), *rde-4* (*ne337*), *rrf-1* (*pk1417*) and *alg-2* (*ok304*).

To obtain *alg-1/alg-2* double mutants, *alg-1* RNAi was performed into *alg-2* (*ok304*) and *let-7ts* (*n2853*); *alg-2* (*ok304*) as previously described in Grishok et al. (2001). L3 stage animals were injected with dsRNA (50µg/ml) targeting *alg-1* mRNA and maintained at permissive temperature, when required, for five hours followed by injections of respective dsRNA trigger molecules. For the RNAi experiment, the dsRNA targeting *alg-1* was injected in late L4 stage animals in order to bypass the *let-7* phenotype observed in *alg-1/alg-2* double mutants. *alg-1/alg-2* double mutants as previously observed (Grishok et al., 2001) still produced dead embryos.

2.4 Acknowledgments

We are grateful to Dr Craig Mello for discussions. We also like to thank Rhea Utley, Jacques Côté, Gyorgy Hutvagner, Jean-Yves Masson, and members of the laboratory for comments on the manuscript. Some nematode strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by the NIH National Center for Research Resources (NCRR). This work has been funded in part by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). M.E.L.B. was supported by a fellowship from the NSERC and M.J.S. is a CIHR New Investigator.

CHAPITRE 3

The Ribosomal Protein RACK1 is required for microRNA function of both *C. elegans* and humans

Guillaume Jannot^{1,*}, Sarah Bajan^{2,*}, Nellie J. Giguère¹, Samir Bouasker¹, Isabelle H. Banville¹, Sandra Piquet¹, Gyorgy Hutvagner^{2,3} and Martin J. Simard¹

1: Laval University Cancer Research Centre, Hôtel-Dieu de Québec, 9 McMahon Street, Quebec City, Québec G1R 2J6, Canada

2: Division of Gene Regulation and Expression, College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee DD1 5EH, United Kingdom

3: University of Technology Sydney, Centre for Health Technologies, Sydney, NSW 2007, Australia

Correspondence to:

Gyorgy Hutvagner, Tel: +44 1382 386310; Fax: +44 1382 386375;

E-mail: g.hutvagner@dundee.ac.uk

Martin J Simard, Tel: +418 525 4444 ext. 15185; Fax: +418 691 5439;

E-mail: martin.simard@crhdq.ulaval.ca

*These authors contributed equally to this work

Received 23 February 2011; Revised 13 March 2011; Accepted 23 March 2011

Keywords: ALG-1/hAGO2 /RACK1/miRISC recruitment/miRNA

Running Title: RACK1 function in miRNA-mediated gene regulation

Avant-Propos

L'article présenté dans le chapitre 3 intitulé « *The Ribosomal Protein RACK1 is required for microRNA function of both C. elegans and humans* » a été publié en juin 2011 dans le journal scientifique « EMBO reports ». Il est le résultat d'une collaboration efficace avec le Dr Hutvagner et son étudiante Sarah Bajan avec qui je partage le titre d'auteur principal.

Durant ma maîtrise, Isabelle Banville a réalisé un criblage double hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans le but d'identifier des partenaires protéiques de la protéine Argonaute ALG-1. Suite à l'identification de nombreux candidats, mon projet de maîtrise, mené en parallèle des expériences décrites dans le chapitre 2, a été d'induire la perte de fonction de ces différentes protéines chez le nématode puis d'analyser le phénotype résultant. L'objectif principal était donc d'isoler un candidat dont le phénotype était comparable au phénotype obtenu lors de la perte de fonction de la protéine ALG-1. Cette étape de caractérisation a été très longue étant donné le nombre important de candidats et la familiarisation avec le modèle animal que je découvrais. En effet, cette partie du projet nécessitait la maîtrise des différentes techniques de RNAi utilisées chez le nématode d'une part, la compréhension des processus développementaux du vers indispensable pour analyser les phénotypes d'autre part. Finalement, en 2008 nous avons identifié la protéine RACK-1. Pour renforcer sa caractérisation et démontrer la conservation de sa fonction chez l'humain, nous avons collaboré avec le Dr Hutvagner établi à l'époque à l'université de Dundee en Ecosse. Ainsi, Sarah Bajan, étudiante au doctorat a réalisé les différentes expériences en cellules humaines illustrées dans les Figure 3-3, Figure 3-4, Figure 3-5 et S3-4, S3-5, S3-7, S3-8. J'ai pour ma part réalisé toutes les expériences effectuées avec le nématode (Figure 3-1, Figure 3-2, Figure 3-5A et S3-2 B et C, S3-4B, S3-8A). Le panneau A de la Figure 3-1 qui démontre l'interaction *in vitro* entre les protéines recombinante ALG-1 et RACK-1 a été réalisé par Samir Bouasker dans le laboratoire puisque son projet de doctorat était axé sur la production des protéines Argonautes recombinantes. Nellie Giguère, ancienne étudiante à la maîtrise, a validé les interactions entre ALG-1 et RACK-1 par double hybride (Fig S3-1) avec l'aide de Sandra Piquet, assistante de recherche.

Résumé

Malgré l'importance de la régulation des gènes par les microARNs, la mécanistique précise permettant au miRISC d'affecter la traduction des ARNm ciblés demeure encore obscure. Les données présentées dans ce manuscrit démontrent l'importance de l'interaction entre le miRISC et un constituant de la sous-unité ribosomale 40S, la protéine RACK-1 (« *receptor for activated C-kinase* »), pour soutenir efficacement la voie des microARNs chez le nématode et l'humain. Dans les deux systèmes, l'altération de l'expression de la protéine RACK-1 affecte la fonction des microARNs et réduit l'association du complexe miRISC avec les ribosomes actifs. Nos données indiquent que la protéine RACK-1 peut contribuer au recrutement du miRISC au site de traduction et supportent un mode de répression de la traduction par les microARN après l'étape d'initiation.

Abstract

Despite the importance of microRNAs (miRNAs) in gene regulation, it is unclear how the miRNA–Argonaute complex—or miRNA-induced silencing complex (miRISC)—can regulate the translation of their targets in such diverse ways. We demonstrate here a direct interaction between the miRISC and the ribosome by showing that a constituent of the eukaryotic 40S subunit, receptor for activated C-kinase (RACK1), is important for miRNA-mediated gene regulation in animals. *In vivo* studies demonstrate that RACK1 interacts with components of the miRISC in nematodes and mammals. In both systems, the alteration of RACK1 expression alters miRNA function and impairs the association of the miRNA complex with the translating ribosomes. Our data indicate that RACK1 can contribute to the recruitment of miRISC to the site of translation, and support a post-initiation mode of miRNA-mediated gene repression.

3.1 Introduction

Initially discovered in *Caenorhabditis elegans*, microRNAs (miRNAs) have emerged as common cellular components with conserved functions in both animals and plants. In all species, miRNAs associate with Argonaute proteins to form the core–effector complex, known as the miRNA-induced silencing complex (miRISC), which is able to alter protein synthesis and/or induce messenger RNA (mRNA) destabilization. In animals, there are several members of the Argonaute gene family, all of which are essential for small-RNA-mediated silencing pathways (reviewed in (Hutvagner and Simard, 2008)).

It has been reported that the miRISC can influence translation in distinct ways ((reviewed in (Filipowicz et al., 2008))). Interestingly, in *Drosophila*, the identity of the Argonaute protein associated with miRNA can dictate the mechanism that will lead to translational inhibition (Iwasaki et al., 2009). This indicates that the Argonaute constituent of the miRISC, as well as its interacting proteins, contribute to regulating protein expression by different mechanisms.

In this study, we identify the **Receptor for Activated C-Kinase (RACK1)** as an interactor of both *C. elegans* and human miRISC, and demonstrate the importance of RACK1 for miRNA-mediated gene silencing in both systems. We observe that the loss of RACK1 affects the association of miRNA and Argonaute with translating ribosomes, suggesting that this component of the 40S ribosomal subunit can mediate the recruitment of the miRISC to the active site of translation.

3.2 Results and Discussion

3.2.1 RACK1 interacts with components of the miRISC of *C. elegans*

To gain a better insight into the miRNA pathway, we carried out a two-hybrid screen to identify the proteins that interact with ALG-1; one of the two Argonaute proteins that are essential for miRNA-mediated gene regulation in *C. elegans* (Grishok et al., 2001). Among the proteins interacting with ALG-1, we identified K04D7.1, the orthologue of the

mammalian protein RACK1 (Fig S3-1). *C. elegans* RACK1 (ceRACK1) has also been identified by mass spectrometry as a constituent of the ALG-1 complex (Chan and Slack, 2009). To confirm the relevance of this interaction, we generated tagged recombinant ALG-1 and ceRACK-1 proteins and performed glutathione *S*-transferase (GST) pulldown assays. When compared with beads coupled to GST protein, we observed that GST-tagged ALG-1 efficiently pulled down His-ceRACK-1 (Figure 3-1A). This suggests that ceRACK1 is a *bona fide* interactor of ALG-1 in *C. elegans*.

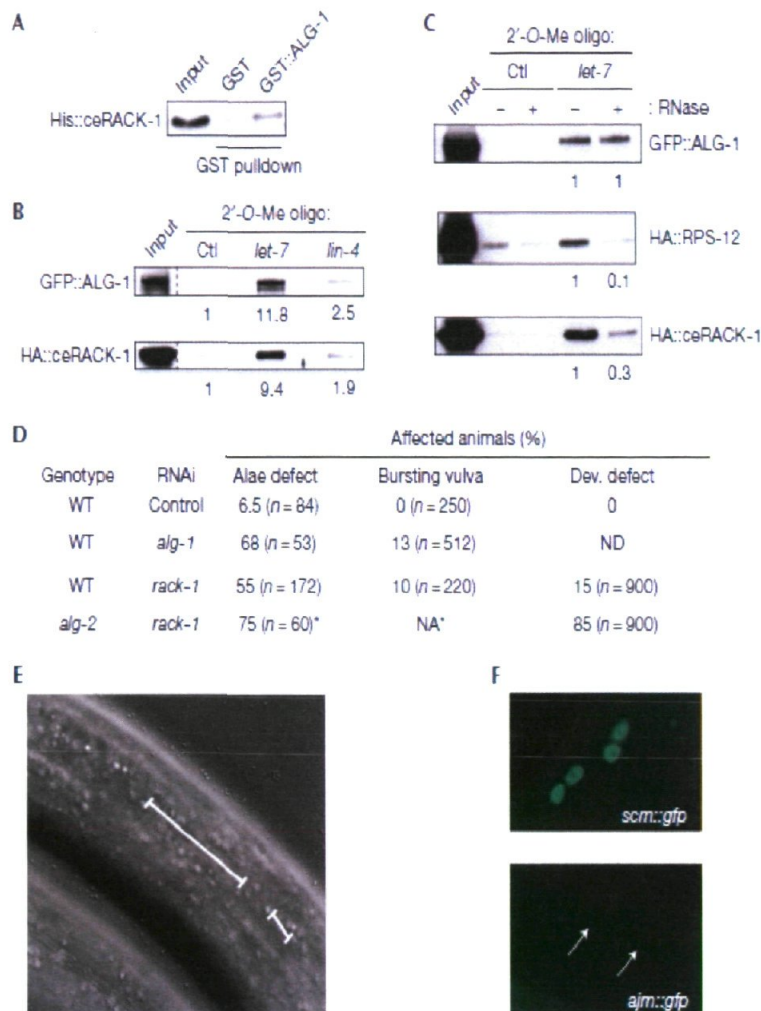


Figure 3-1 : RACK1 interacts with constituents of *C. elegans* and human miRISC.

(A) Recombinant ceRACK-1 interacts with GST-tagged ALG-1. Western blot analysis of GST pull-downs of His-tagged ceRACK-1 incubated with GST or GST-ALG-1 and probed with His antibody. Input represents the equivalent of 10% of the His-RACK1 used for pull-down. (B) ceRACK-1 associates with the miRISC in *C. elegans*. Extracts from MJS10 strain were incubated with the *let-7*-complementary (*let-7*), *lin-4*-complementary (*lin-4*) or nonspecific (*ctl*) tethered 2'-O-methyl oligonucleotide (2'-O-Me oligo). Beads were washed, and bound GFP::ALG-1 and HA::ceRACK-1 were detected by western blotting. (C) Interaction of ceRACK-1, but not RPS-12, with the miRISC is partly resistant to RNase treatment. Strains expressing tagged proteins were incubated with the *let-7*-complementary or nonspecific (control) tethered 2'-O-methyl oligonucleotide. Beads were washed and treated (+) or not (-) with RNase, followed by the detection of GFP::ALG-1, HA::ceRACK-1 and HA::RPS-12 by western blotting. In B and C, input represents the equivalent of 5% of the total extract incubated with tethered oligonucleotides. Dashed lines indicate that unrelated lanes have been removed between samples. Relative intensities of the signal are shown under each lane in

B and **C**. **(D)** Knockdown of ceRACK-1 causes heterochronic defects similar to those observed for *alg-1(RNAi)*. Adult alae defects and bursting vulva were scored on young adult animals fed with bacteria expressing either control, *rack-1* or *alg-1* double-stranded RNA. Developmental (dev.) defects observed include one or more of the following: larval lethality, moulting defects, vulva and gonadal morphogenesis defects. The number (*n*) of animals scored is indicated. Asterisk: as *alg-2(lf); rack-1(RNAi)* animals exhibit severe larval lethality and developmental arrest, sufficient numbers of adult-stage animals could not be obtained to reliably scored vulval bursting; however, alae defects were scored for 60 animals that managed to reach the adult stage. **(E)** Representative adult alae defect (Nomarski optics) observed in *rack-1(RNAi)* animals. The white bars show the region of adult cuticles lacking alae or with abnormal alae morphology. Magnification is $\times 630$. **(F)** Extra seam cells (top panel) and defect in seam-cell fusions (arrows; bottom panel) are observed in adult *rack-1(RNAi)* animals. The magnification of both pictures is $\times 1,000$. GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione *S*-transferase; HA, haemagglutinin; miRISC, miRNA-induced silencing complex; NA, not applicable; ND, not determined; RACK, receptor for activated C-kinase; RNAi, RNA interference; WT, wild type.

To address whether this interaction can occur *in vivo*, we generated a transgenic worm expressing green fluorescent protein (GFP) :: ALG-1 and haemagglutinin (HA) :: ceRACK-1 to overcome the lack of specific antibodies. Using a whole-worm lysate prepared from the transgenic *C. elegans*, we immunoprecipitated GFP :: ALG-1 with HA :: ceRACK-1 and conversely detected HA :: ceRACK-1 in the GFP :: ALG-1 pulldown (Fig S3-2B). To determine whether ceRACK-1 can also interact with miRNAs, we used a 2'-*O*-methylated RNA affinity matrix to trap sequence-specific small RNA complexes that are not bound to target mRNAs (Hutvagner et al., 2004; Yigit et al., 2006).

By using this method, we found that both ALG-1 and ceRACK-1 are associated with *let-7* and *lin-4* miRNAs (Figure 3-1B). To determine whether the interaction between ceRACK1 and the miRISC is only a general interaction with the ribosomes, we generated transgenic animals expressing a HA-tagged 40S ribosomal protein. We observed that although the RNase treatment almost abolished the interaction between the *let-7* miRNA complex and the 40S subunit RPS-12 (Figure 3-1C; Fig S3-2C), a significant fraction of ceRACK-1 remains associated with the *let-7* complex (Figure 3-1C). Therefore, our findings provide evidence that free miRISC interacts with the 40S ribosomal subunit, and ceRACK-1 contributes to this interaction.

3.2.2 RACK-1 is important for miRNA function in *C. elegans*

In *C. elegans*, the miRNA pathway has an important role in the control of animal development. The loss of function of genes associated with this pathway results in pleiotropic phenotypes, probably reflecting their roles in the activity of all *C. elegans* miRNAs (Bussing et al., 2010; Denli et al., 2004; Grishok et al., 2001; Hammell et al., 2009). To examine whether *rack-1* is important for the miRNA pathway in *C. elegans*, we depleted *rack-1* in animals using RNA interference (RNAi) feeding delivery (animals carrying loss-of-function alleles of *rack-1* gene are embryonic lethal; data not shown). Although the depletion of the 40S ribosomal subunit *rps-12* leads mostly to embryonic and larval lethality (data not shown), *rack-1(RNAi)* shows developmental-timing delay, including heterochronic phenotypes that include defects in adult alae (Figure 3-1D, E and F). We also found that a significant proportion of *rack-1(RNAi)* animals burst from the vulval opening after L4 moult, a phenotype characteristic of *let-7*-family miRNA mutants (Abbott et al., 2005): Figure 3-1D). All these phenotypes are similar to those that we observed in *alg-1(RNAi)* animals and are enhanced in *alg-2(lf)* single-mutant animals (Figure 3-1D). The similarity of the phenotypes resulting from the loss of function of *rack-1* and the depletion of core components of the miRNA pathway, the synergy observed with *alg-2*, and the other Argonaute essential for this pathway in *C. elegans* (Grishok et al., 2001), supports the conclusion that *rack-1* functions in the *C. elegans* miRNA pathway.

To better understand the function of *rack-1* in the miRNA pathway, we decided to monitor the miRNA levels of *C. elegans* that was subjected to *rack-1* RNAi. Although, as reported recently (Kato et al., 2009) we observed a significant decrease in the amount of miRNAs in *alg-1(RNAi)* animals (Figure 3-2A), the knockdown of *rack-1* in *C. elegans* led to an increase in *let-7* and *lin-4* miRNA levels (Figure 3-2A). Interestingly, this accumulation of miRNAs was attenuated in the absence of *alg-1* but was unaffected in *alg-2(lf)* animals (Figure 3-2B). This indicates that the accumulation of miRNAs observed in *rack-1(RNAi)* animals requires the Argonaute ALG-1, but not ALG-2.

Although *rack-1* and *alg-1* knockdowns result in similar heterochronic phenotypes (Figure 3-1D), the opposite effect on miRNA levels suggests that ALG-1 and ceRACK-1 are not functioning at the same point in the miRNA pathway. It is likely that RACK1 is not

required for loading and stabilization of miRNAs. The simplest explanation for the accumulation of miRNAs in *rack-1(RNAi)* animals is that the lack of RACK1, which causes failed regulation, could result in a slower turnover of assembled miRISCs. Interestingly, it has been reported that the interaction between the miRNA and its mRNA target leads to the degradation of the miRNA (Ameres et al., 2010). Thus, the accumulation of miRNAs observed in the absence of ceRACK-1 might indicate that a large amount of ALG-1–miRNA complex cannot reach its mRNA target, leading to miRNA accumulation.

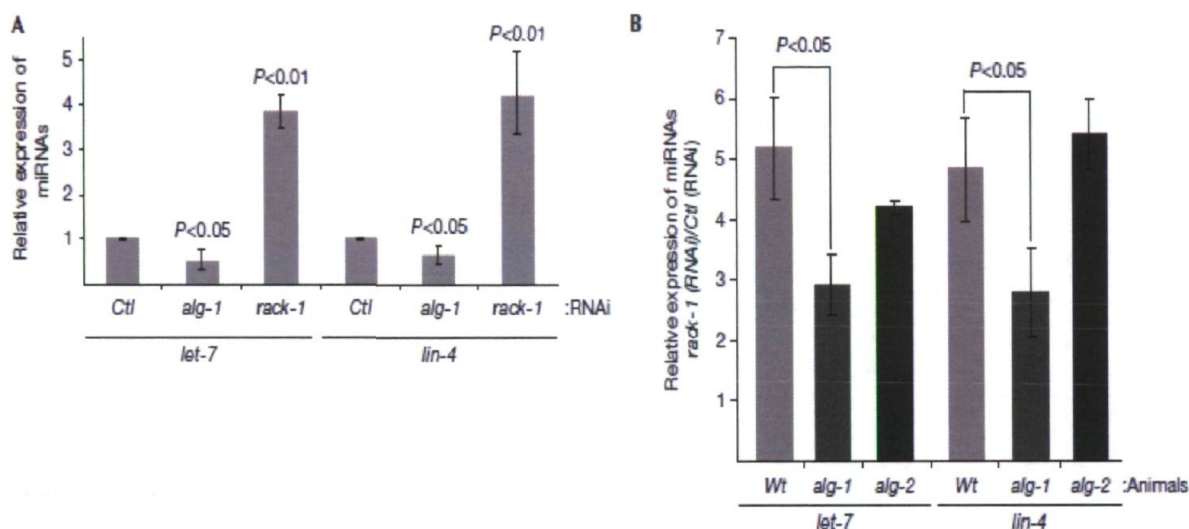


Figure 3-2 : ceRACK-1 affects the level of miRNA in an *alg-1*-dependent manner. (A) Although *alg-1(RNAi)* reduces miRNA levels, *rack-1(RNAi)* leads to an accumulation of miRNAs. (B) ALG-1, but not ALG-2, is important to accumulate miRNAs in *rack-1(RNAi)* animals. The miRNA levels were measured relative to the small nucleolar RNA (*sn2841*) using quantitative reverse transcription–PCR (TaqMan Assays) in adult animals fed with bacteria expressing either control (*Ctl*), *alg-1* or *rack-1* double-stranded RNA, as indicated. In all RNAi conditions, no significant changes were observed in the level of the control RNA *sn2841* (data not shown). The error bars represent the 95% confidence interval from three independent experiments and a Student's two-sided *t*-test was applied on the normalized C_t values to obtain *P*-values. miRNA, microRNA; RACK, receptor for activated C-kinase; RNAi, RNA interference; Wt, wild type.

3.2.3 RACK1 interacts with the human miRISC

Because RACK1 is a highly conserved protein in eukaryotes (Fig S3-3 online), we next asked whether RACK1 associates with Argonautes in mammals. Although we detected ribosomal RNAs, the ribosomal 40S subunit RPS3, human Ago2 (hAgo2) and miRNAs

such as *let-7* and *miR-21* in the RACK1 immunoprecipitate from HeLa cell lysate, we did not observe an interaction between hAgo1 and RACK1 (Figure 3-3; supplementary Fig S3-2D,E). This is surprising as hAgo1 is a member of the Argonaute gene family that is able to bind to miRNAs (Liu et al., 2004) and is also involved in translational repression. However, the mechanism of its action which could be different from hAgo2 is not known (Schmitter et al., 2006). The treatment of the samples with RNase A does not abrogate the association between RACK1 and the miRISC, suggesting that part of the interaction is either direct or mediated by other proteins (Figure 3-3B; Fig S3-2D). Thus, as observed in *C. elegans*, components of the mammalian miRISC interact *in vivo* with RACK1.

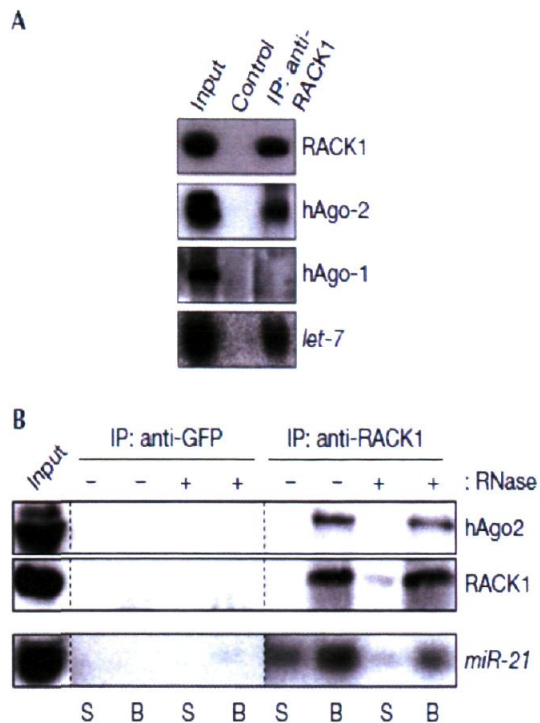


Figure 3-3 : RACK1 interacts with hAgo2 and miRNAs.

(A) Human RACK1 binds to both Ago2 and miRNAs. RACK1 was immunoprecipitated with monoclonal RACK1 antibody (RACK1) and non-conjugated Protein A beads as a negative control. Input represents the equivalent of 4% of the total extract used for immunoprecipitation. The immunoprecipitate was tested for the presence of RACK1, hAgo2 and hAgo1 by western blotting and *let-7* miRNA by northern hybridization. (B) RACK1 interaction with hAgo2 and the miRNA *miR-21* is RNA independent. Immunoprecipitations were performed with mouse monoclonal antibodies raised against RACK1 and GFP (used as a negative control) as indicated. Input represents 10% of total lysate used for the immunoprecipitation. The immunoprecipitates were treated with RNase A for 1 h at 4°C. The supernatant (S) and the immunoprecipitate (B) samples, with or without RNase treatment, were tested for the presence of hAgo2, RACK1 and *miR-21*. GFP, green fluorescent protein; hAgo1/2, human Ago1/2; IP, immunoprecipitation; miRNA, microRNA; RACK, receptor for activated C-kinase; RNAi, RNA interference.

3.2.4 Human miRNA gene silencing requires RACK1

Next, we tested whether RACK1 is required for miRNA-mediated translational repression in mammalian cells. When cells were treated with short-interfering RNA (siRNA)-targeting RACK1, a marked increase in the expression of the endogenous IMP1 and RAS proteins

two characterized *let-7* targets in human cells was observed (Johnson et al., 2005; Selbach et al., 2008); Figure 3-4A).

However, RACK1 knockdown did not alter the steady-state level of IMP1 mRNA, suggesting post-transcriptional regulation (Fig S3-4A). To demonstrate that the effect of RACK1 on translation requires miRNAs, we carried out dual luciferase assays with a miRNA-regulated reporter construct that contains eight tandem *let-7* sites (Iwasaki et al., 2009)

and a luciferase reporter that contains part of the *let-7*-targeted HMGA2 3'UTR. The knockdown of RACK1 with three independent siRNAs significantly and specifically altered the expression of both luciferase reporters (Figure 3-4B; Fig S3-5). To show that this effect is specific to RACK1, we altered the expression of the human 40S ribosomal subunit RPS3. The knockdown of RPS3 resulted in a general inhibition of translation, without any specific effect on the miRNA-targeted luciferase reporter (Fig S3-6). Moreover, when we used a reporter that contains three target sites complementary to endogenous *let-7a*, we observed no change in luciferase expression (Fig S3-7). Therefore, RACK1 seems to be required to mediate miRNA-dependent translational repression, but not for RNAi.

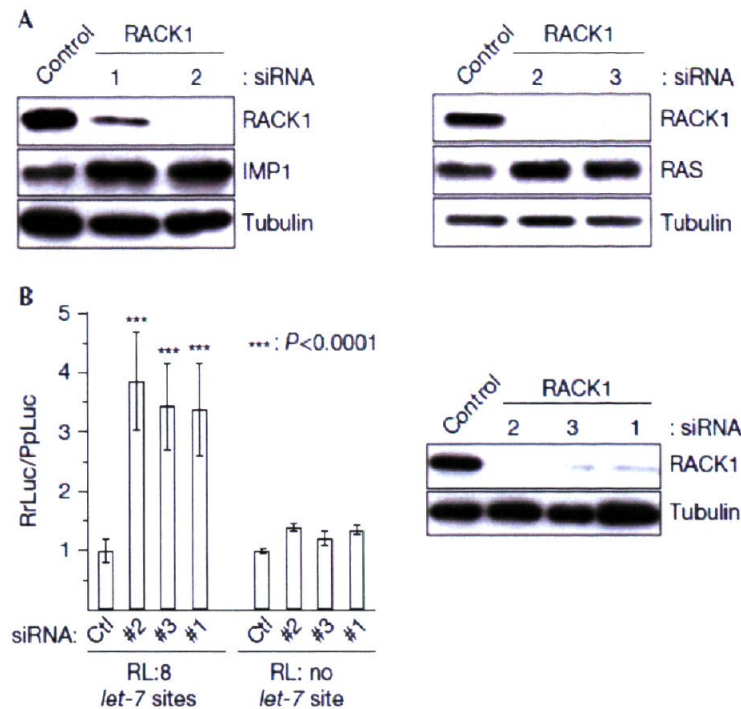


Figure 3-4 : RACK1 is required for miRNA silencing in human cells.

(A) RACK1 is required for the silencing of the human IMP1 and RAS. Lysates from RNAi-treated cells were immunoblotted with RACK1, IMP1 and RAS antibodies, as indicated. Tubulin immunoblot acted as a loading control. (B) RACK1 affects the translation of a reporter that carries miRNA target sites. Renilla luciferase constructs that contain a 3'UTR with either eight *let-7* miRNA target sites or no *let-7* miRNA target sites were transfected in RNAi-treated HeLa cells. Firefly luciferase was used as an internal control. The graph represents the quantification of the dual luciferase assay from five repeats and the error bars represent standard propagated errors and significance that were analysed with a Student's *t*-test. RL:8 *let-7* sites: reporter contains eight tandem *let-7* miRNA target sites. RL:no *let-7* site: reporter without *let-7* miRNA site. Right panel, detection of RACK1 shows the efficiency of the knockdown. Tubulin was used as a loading control. Ctl, control; miRNA, microRNA; RACK, receptor for activated C-kinase; RL, renilla luciferase; RNAi, RNA interference; siRNA, short-interfering RNA.

3.2.5 Alteration of RACK1 levels impairs miRNA and Argonaute association with translating ribosomes

As RACK1 has been identified as a core component of the ribosome (reviewed in (Nilsson et al., 2004), we decided to test whether RACK1 contributes to the recruitment of the miRISC to the translational machinery. We carried out sucrose gradient fractionation to monitor distribution of the *let-7* miRNA in *rack-1(RNAi)* and *control(RNAi)* animals.

Although neither the polysome distribution in the *rack-1(RNAi)* population (Fig S3-8C) or the distribution of *let-7* mRNA targets such as *lin-41* and *daf-12* is significantly affected (Grosshans et al., 2005; Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000; Vella et al., 2004); Figure 3-5A), the amount of *let-7* miRNA associated with polysomes is reduced, compared with *control(RNAi)* animals (Figure 3-5A; $P < 0.005$).

Human Argonautes have been shown to be associated with polysomes, as their association with heavy fractions is abrogated by puromycin treatment (Nottrott et al., 2006). We also observed that hAgo2 cofractionates with RACK1 on the polysomes, by using the sucrose gradient fractionation approach (Fig S3-2F). We tested whether the presence of hAgo2 with polysomes requires RACK1. To monitor the amount of hAgo2 associated with ribosomes, we pelleted ribosomal complexes by using a sucrose cushion (Halbeisen et al., 2009). Compared with control, the level of hAgo2 copelleted with ribosomes is decreased when RACK1 is depleted by RNAi (Figure 3-5B; Fig S3-8B), suggesting that RACK1 contributes to the recruitment of hAgo2 to ribosomes.

This data suggests that RACK1 contributes to miRNA-mediated gene regulation at a post-initiation step. Indeed, RACK1 is a stoichiometric component of the 40S ribosome that is positioned at the exit channel to mediate these types of regulations (Coyle et al., 2009; Sengupta et al., 2004). This could explain the mechanism by which miRNA regulates target gene expression at the elongation step (Kim et al., 2004; Maroney et al., 2006; Nelson et al., 2004; Nottrott et al., 2006; Olsen and Ambros, 1999) and how miRNAs could regulate through target sites in coding regions (Hafner et al., 2010). In *Saccharomyces cerevisiae*, RACK1 is required to recruit Scp160p to specific mRNAs and thus modulate their translations (Baum et al., 2004). These observations and our results suggest that RACK1 functions as an evolutionarily conserved molecular adaptor on ribosomes to recruit a variety of regulators of mRNA translation—such as miRISC—and facilitates their interactions with the translational machinery at diverse steps of translation. The RACK1-dependent miRNA-mediated gene regulation is probably different from canonical GW182-dependent miRNA-mediated gene regulation, and it might also be a fail-safe mechanism that can capture miRNA-targeted mRNAs that escape regulation at the initiation step.

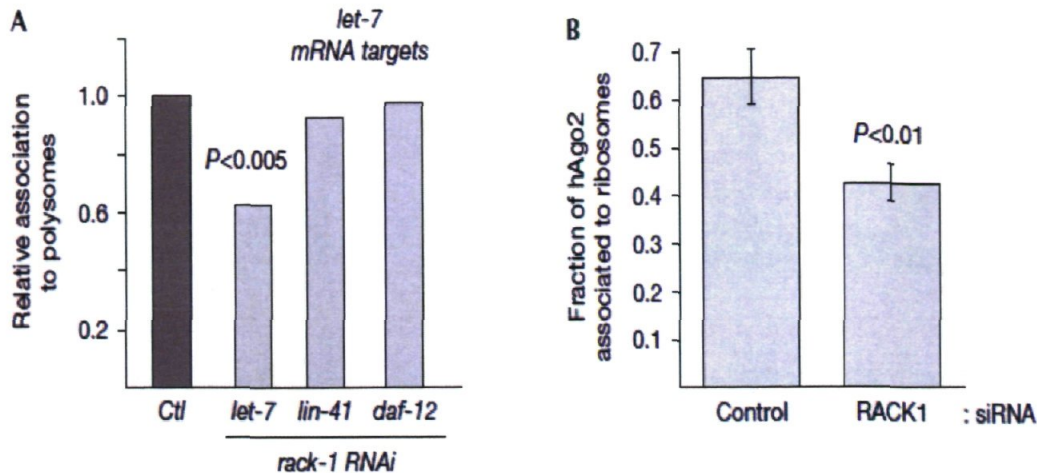


Figure 3-5 : RACK1 is important to recruit the miRISC to translating ribosomes.

(A) The level of *let-7* and *let-7* targets, *lin-41* and *daf-12*, in each fractionation collected from the sucrose gradient was monitored by quantitative reverse transcription-PCR. Mean fold change of *let-7* and mRNA target RNA molecules associated with polysomes fractions of *rack-1*(RNAi) animals relative to animals exposed to control (*ctl*) is shown. Two independent experiments were performed in replicates. Student's two-sided *t*-test was used to assess the significance of the polysomal distribution of *let-7* miRNA between *control*(RNAi) and *rack-1*(RNAi) animals. Before the *t*-test, the Shapiro-Wilk test confirmed that the data were normally distributed. **(B)** Ribosomal proteins were pelleted with a sucrose cushion from HeLa cells that were treated with control or RACK1 siRNAs, and the pellet-associated hAgo2 was quantified and presented as a ratio of the sum of the free and polysome-associated hAgo2. The graph is derived from five independent experiments carried out with three independent RACK1 siRNAs. Error bars represent the standard deviation, and a Student's *t*-test was performed to determine the significance of the data. hAgo2, human Ago2; miRNA, microRNA; mRNA, messenger RNA; RACK, receptor for activated C-kinase; RNAi, RNA interference; siRNA, short-interfering RNA.

3.3 Methods

3.3.1 Nematode methods

C. elegans strains were grown under standard conditions (Brenner, 1974). Transgenic lines MJS10 and MJS17 were produced by microinjection as described in (Mello and Fire, 1995). RNAi experiments were performed with synchronized animal population as previously described in (Chendrimada et al., 2007).

3.3.2 *C. elegans* polysomes fractionation

C. elegans polysomes fractionation was performed as originally described by Ding and Grosshans (Ding and Grosshans, 2009). Quantitative detection of mRNAs and miRNAs were performed using TaqMan Gene Expression and microRNA Assay kits (Applied Biosystems), respectively.

3.3.3 Human cells sucrose cushion

HeLa lysates (lysis buffer: 1% NP40, 10 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.25 mM DTT, 50 μM cycloheximide, 0.4 U/ul RNAsin and protease inhibitors) were pretreated with cyclohexamide, spun down (10,000 X g, 10 minutes, 4°C), and equivalent amounts of supernatant were layered onto a 0.5 M sucrose cushion. Samples were then spun at 107,400 X g for 45 minutes at 4°C in an Optima Max Ultracentrifuge.

3.3.4 siRNA transfection in Human cells

Cells were plated at 1.25×10^5 per well of a 6-well plate. For each well 200 pmol of siRNA was diluted in 175 μl of Opti-MEM (GIBCO). 2 μl of oligofectamine (Invitrogen) was diluted in 13 μl Opti-MEM and incubated at room temperature for 5 minutes. The siRNA mixture and the oligofectamine mixture were mixed and incubated at room temperature for 20 minutes. The sample was then added to the well and mixed gently. The media was replaced after 4-6 hours.

3.4 Supplemental data

3.4.1 Supplemental figures

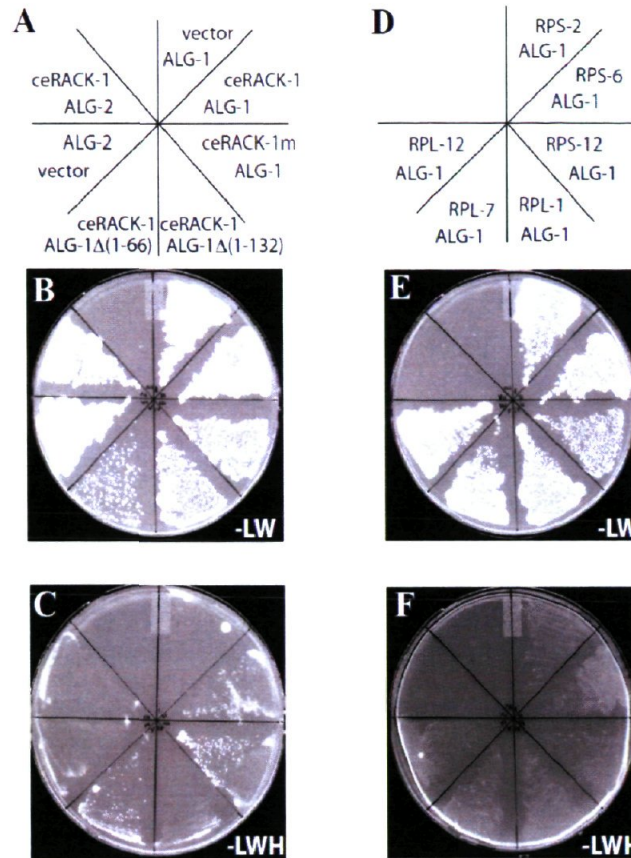


Figure S3-1: ALG-1 interacts with ceRACK-1 in yeast two-hybrid but not with ALG-2 or three small and large ribosomal subunits.

(A) Schematic representation of cotransformed plasmids. The top construct of the pair indicates the cDNA fused to the Gal4 DNA-binding domain (pGBKT7) and the bottom construct represents cDNA fused to the Gal4 activation domain (pGADT7). RACK-1m contains point mutations (R38D K40E; underlined residues shown in Figure S3-3) reported to affect its interaction with the ribosomes (Sengupta et al, 2004); ALG-1 Δ (1-132) and ALG-1 Δ (1-66) are ALG-1 proteins where the first 132 or 66 amino acids have been removed. Once co-transformations were successfully achieved (on medium lacking leucine (L), tryptophane (W); B and E), interactions were monitored by growth on restrictive medium lacking histidine (H) (C and F). (C) ceRACK-1 interacts with the second portion of the N-terminus unique to ALG-1 but not ALG-2. (D) Schematic representation of cotransformed plasmids containing ALG-1 and ribosomal subunits. cDNAs from three small ribosomal subunits (RPS-2, RPS-6 and RPS-12) or three large ribosomal subunits (RPL-1, RPL-7 and RPL-12) were cloned into pGADT7. (F) ALG-1 does not interact with ribosomal subunits.

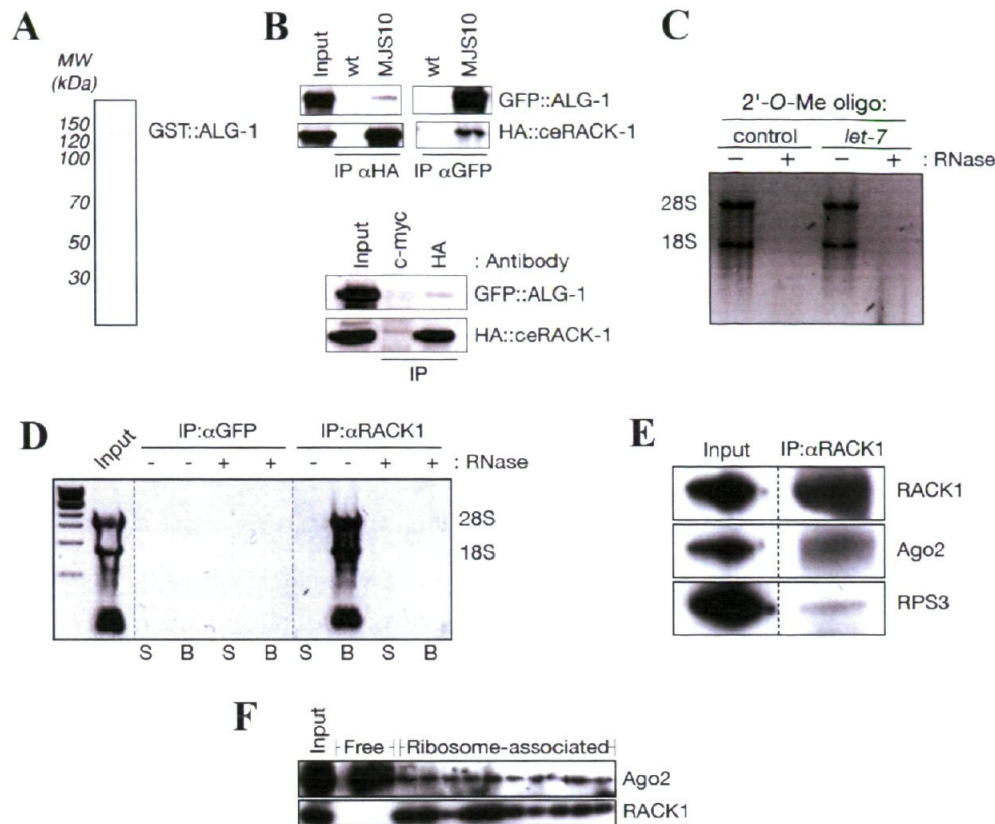


Figure S3-2 : ceRACK-1 interacts with constituents of the miRISC complex in *C. elegans*.

(A) Coomassie stained gel of bacterially expressed GST-tagged ALG-1 protein used for GST pull-down assay. (B) ceRACK-1 interacts with ALG-1 in vivo. Extracts prepared from adult wild-type (wt) or from GFP::ALG-1; HA::ceRACK-1 transgenic worms (MJS10) were immunoprecipitated using anti-HA monoclonal antibody (left panel) and anti-GFP monoclonal antibody (right panel). Input represents the equivalent of 5% of the total extract used for immunoprecipitation. Bottom panel: To test the specificity of interaction between GFP::ALG-1 and HA::ceRACK-1, immunoprecipitation was carried out using a HA monoclonal antibody and mouse monoclonal C-MYC (CM) antibody was used as a negative control. (C and D) Assessment of the efficiency of the RNase treatment for *C. elegans* pulldown experiment (Panel C) and human cell immunoprecipitation (Panel D) shown in Figures 3-1C and 3-3B, respectively. Total RNA was run on an agarose gel and integrity of the 28S and 18S ribosomal RNAs are monitored to determine the success of the RNase treatment. (D, E and F) Ago2 interacts with constituents of the ribosomes. (D) 28S and 18S ribosomal RNAs are found in immunoprecipitated complex containing RACK1 and Ago2 (Figure 3-3B). The supernatant (S) and the immunoprecipitate (B) samples are indicated. (E) RACK1 was immunoprecipitated from HeLa cell extract and the associated Ago2 and RPS3 protein levels were monitored with the corresponding antibodies. (F) RACK1 and Ago2 distribution in the fractions of a 10%-50% sucrose gradient generated from cytoplasmic extract from HeLa cells. The fractions containing the 40S, 60S and 80S ribosomes and polysomes are indicated as ribosome-associated. Input (I) represents 10% of the extract used for the fractionation.

ceRACK-1	1	MVQ	<u>EQMK</u>	<u>LT</u>	<u>GT</u>	<u>LE</u>	<u>GH</u>	<u>TG</u>	<u>WV</u>	<u>TQ</u>	<u>IAT</u>	Y	T	R	N	D	K	T	T	V	L	S	S	<u>SR</u>	<u>DK</u>	<u>TL</u>	<u>VW</u>	D	V	D	S	V	A	P	V	DE	55															
dmRACK1	1	-	<u>MS</u>	<u>ET</u>	<u>LQ</u>	<u>LR</u>	<u>GT</u>	<u>LI</u>	<u>GH</u>	<u>NG</u>	<u>WV</u>	<u>TQ</u>	<u>IAT</u>	-	N	P	K	D	P	D	T	I	I	S	<u>SR</u>	<u>DK</u>	<u>TL</u>	<u>VW</u>	K	L	T	R	-	-	-	-	DE	49														
hsRACK1	1	-	<u>MT</u>	<u>EQ</u>	<u>MT</u>	<u>LR</u>	<u>GT</u>	<u>LK</u>	<u>GH</u>	<u>NG</u>	<u>WV</u>	<u>TQ</u>	<u>IAT</u>	-	T	P	Q	F	P	D	M	I	L	S	<u>SR</u>	<u>DK</u>	<u>TI</u>	<u>IM</u>	<u>WK</u>	L	T	R	-	-	-	DE	49															
ceRACK-1	56	-	G	P	I	<u>GR</u>	<u>PVR</u>	<u>SL</u>	<u>TG</u>	<u>HN</u>	<u>HF</u>	<u>SD</u>	<u>VV</u>	<u>IS</u>	<u>SD</u>	<u>GQ</u>	<u>FAL</u>	<u>SG</u>	<u>SW</u>	<u>DK</u>	<u>TL</u>	<u>RL</u>	<u>WD</u>	<u>LN</u>	<u>QV</u>	<u>ST</u>	<u>RQ</u>	<u>FI</u>	S	109																						
dmRACK1	50	D	T	N	<u>GY</u>	<u>PQR</u>	<u>LY</u>	<u>GH</u>	<u>SH</u>	<u>FI</u>	<u>SD</u>	<u>VV</u>	<u>LS</u>	<u>SD</u>	<u>GNY</u>	<u>AL</u>	<u>SG</u>	<u>SW</u>	<u>DQ</u>	<u>TL</u>	<u>RL</u>	<u>WD</u>	<u>LA</u>	<u>AG</u>	<u>KT</u>	<u>TR</u>	<u>RF</u>	E	G	104																						
hsRACK1	50	-	T	N	<u>GI</u>	<u>PQR</u>	<u>LR</u>	<u>GH</u>	<u>SH</u>	<u>FV</u>	<u>SD</u>	<u>VV</u>	<u>IS</u>	<u>SD</u>	<u>GQ</u>	<u>FAL</u>	<u>SG</u>	<u>SW</u>	<u>DK</u>	<u>TL</u>	<u>RL</u>	<u>WD</u>	<u>LT</u>	<u>GT</u>	<u>TR</u>	<u>RF</u>	V	G	103																							
ceRACK-1	110	<u>HT</u>	<u>KD</u>	<u>VL</u>	<u>SV</u>	<u>AF</u>	<u>SA</u>	<u>DN</u>	<u>RQ</u>	<u>IV</u>	<u>SG</u>	<u>SR</u>	<u>DK</u>	<u>S</u>	<u>IK</u>	<u>LW</u>	<u>NT</u>	<u>LA</u>	<u>Q</u>	<u>CK</u>	<u>YT</u>	<u>IT</u>	<u>DD</u>	<u>CH</u>	<u>TD</u>	<u>WV</u>	<u>ST</u>	<u>VR</u>	<u>FS</u>	P	164																					
dmRACK1	105	<u>HT</u>	<u>KD</u>	<u>VL</u>	<u>SV</u>	<u>AF</u>	<u>SA</u>	<u>DN</u>	<u>RQ</u>	<u>IV</u>	<u>SG</u>	<u>SR</u>	<u>DK</u>	<u>T</u>	<u>IK</u>	<u>LW</u>	<u>NT</u>	<u>LA</u>	<u>E</u>	<u>CK</u>	<u>FT</u>	<u>IQ</u>	<u>ED</u>	<u>GH</u>	<u>TD</u>	<u>WV</u>	<u>SC</u>	<u>VR</u>	<u>FS</u>	P	159																					
hsRACK1	104	<u>HT</u>	<u>KD</u>	<u>VL</u>	<u>SV</u>	<u>AF</u>	<u>S</u>	<u>DN</u>	<u>RQ</u>	<u>IV</u>	<u>SG</u>	<u>SR</u>	<u>DK</u>	<u>T</u>	<u>IK</u>	<u>LW</u>	<u>NT</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>CK</u>	<u>YT</u>	<u>VQ</u>	<u>DE</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	<u>EW</u>	<u>SC</u>	<u>VR</u>	<u>FS</u>	P	158																					
ceRACK-1	165	<u>S</u>	<u>NR</u>	<u>DP</u>	<u>V</u>	<u>IV</u>	<u>SAG</u>	<u>WD</u>	<u>V</u>	<u>VK</u>	<u>VN</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>NC</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	<u>NH</u>	<u>I</u>	<u>GH</u>	<u>T</u>	<u>GY</u>	<u>VN</u>	<u>TV</u>	<u>TV</u>	<u>SP</u>	<u>DG</u>	<u>SL</u>	<u>CA</u>	<u>S</u>	<u>GG</u>	<u>KD</u>	219																		
dmRACK1	160	<u>N</u>	<u>H</u>	<u>SN</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	<u>IV</u>	<u>SC</u>	<u>GW</u>	<u>DR</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>H</u>	<u>H</u>	<u>G</u>	<u>H</u>	<u>NG</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>SP</u>	<u>DG</u>	<u>SL</u>	<u>CT</u>	<u>S</u>	<u>GG</u>	<u>KD</u>	214												
hsRACK1	159	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>SN</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	<u>IV</u>	<u>SC</u>	<u>GW</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	<u>NH</u>	<u>I</u>	<u>GH</u>	<u>T</u>	<u>GY</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>SP</u>	<u>DG</u>	<u>SL</u>	<u>CA</u>	<u>S</u>	<u>GG</u>	<u>KD</u>	213												
ceRACK-1	220	<u>GQ</u>	<u>AM</u>	<u>LW</u>	<u>DL</u>	<u>NE</u>	<u>GK</u>	<u>H</u>	<u>LY</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>W</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>E</u>	274		
dmRACK1	215	<u>SK</u>	<u>AL</u>	<u>LW</u>	<u>DL</u>	<u>ND</u>	<u>GK</u>	<u>N</u>	<u>LY</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>W</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	E	269			
hsRACK1	214	<u>GQ</u>	<u>AM</u>	<u>LW</u>	<u>DL</u>	<u>NE</u>	<u>GK</u>	<u>H</u>	<u>LY</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>W</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	D	268		
ceRACK-1	275	<u>EL</u>	<u>K</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>C</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>W</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>Y</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	325
dmRACK1	270	<u>EL</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>-</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>W</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>-</u>	<u>H</u>	318
hsRACK1	269	<u>EL</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>-</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>W</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>-</u>	<u>R</u>	317

Figure S3-3 : RACK1 is a highly conserved scaffolding protein.

Amino acid sequence alignment of *Drosophila melanogaster* (dm)RACK1 and human (hs)RACK1 show high similarity with *Caenorhabditis elegans* (ce)RACK-1 (77% between *C. elegans* and *Drosophila*; 80% between *C. elegans* and human RACK1). Identical amino acids are shown in dark grey when conserved in all three species and in light grey when conserved in two species. Underlined in red are conserved amino acids important for the interaction of RACK-1 with the ribosomes (Sengupta et al, 2004).

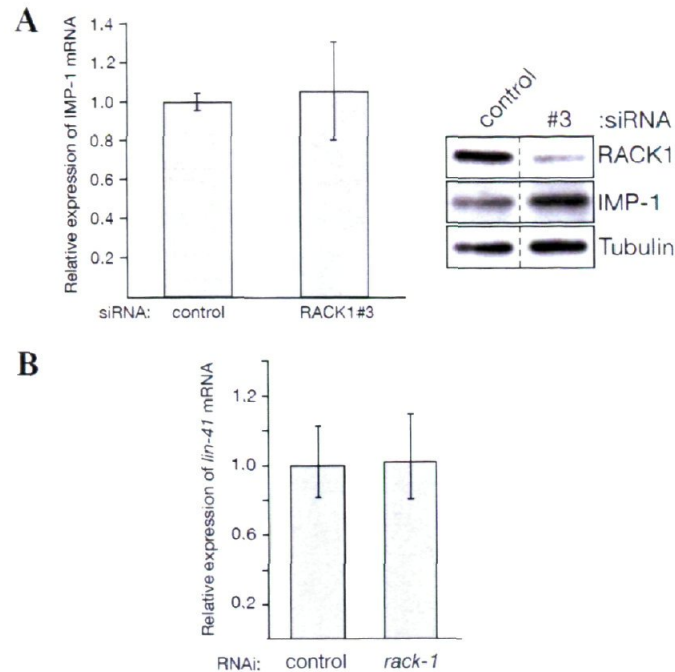


Figure S3-4 : RACK1 does not influence mRNA level of miRNA targets.

(A) RACK1 knockdown does not influence IMP-1 mRNA level. U2OS was transfected with control and RACK1 siRNA and IMP-1 mRNA levels were quantified using quantitative RT-PCR. IMP-1 mRNA level was normalized with Tubulin mRNA level. The error bars represent the standard deviation of six controls and six RACK1 knock down experiments. Right panel. Western blot with RACK1 and IMP-1 antibodies shows the efficiency of the knockdown with siRNA #3. Tubulin was used as a loading control. Dashed lines indicate that unrelated lanes have been removed between samples. (B) *rack-1*(RNAi) does not affect the expression level of *lin-41* mRNA. For wild-type animals exposed to either control(RNAi) or *rack-1*(RNAi), the *lin-41* mRNA levels were measured relative to the actin (*act-1*) mRNA at each time point by quantitative RT-PCR. The error bars represent the 95% confidence interval from five independent experiments.

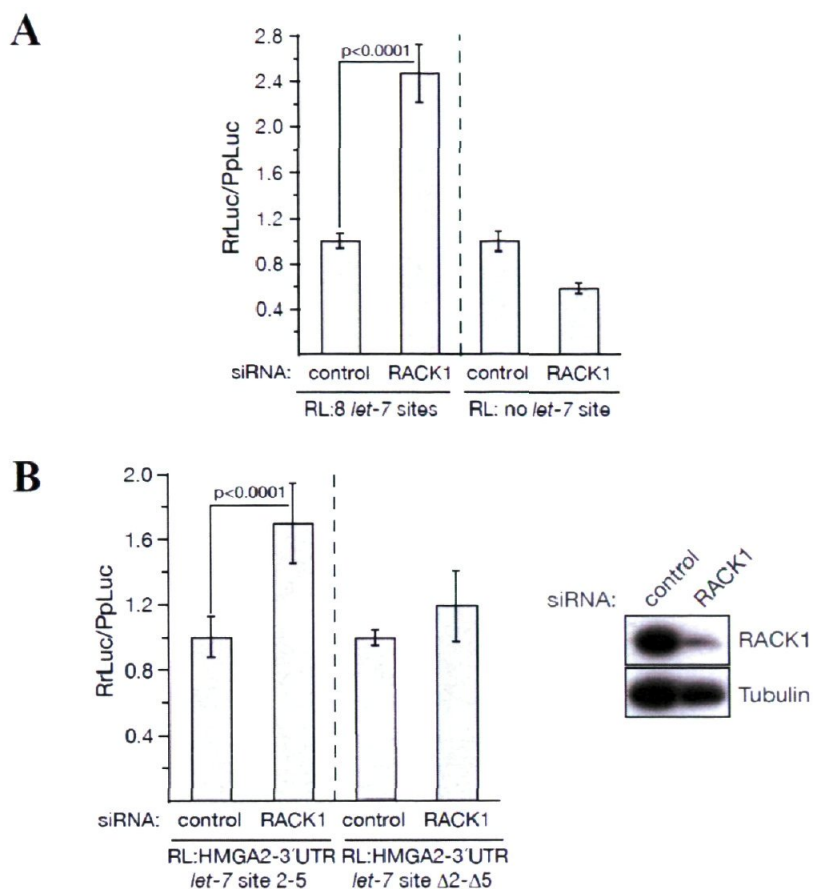


Figure S3-5: RACK1 is required for miRNA-mediated gene repression.

RACK1 is required for the regulation of reporters regulated by *let-7*. **(A)** RL:8 *let-7* sites: reporter contains eight tandem *let-7* target sites. RL:no *let-7* sites: reporter without *let-7* site. RL:HMGA2-3'UTR *let-7* site 2-5: Renilla luciferase containing four *let-7* complementary sites. **(B)** RL:HMGA2-3'UTR *let-7* site $\Delta 2-\Delta 5$: The same construct with the exception that *let-7* seed complementary sites were mutated in all the four *let-7* target sites. Right panel: Western blot with RACK1 antibody shows the efficiency of the knockdown. Tubulin was used as a loading control. Error bars represent the standard deviation of five experiments and significance of the data were analyzed with a Student's t-test.

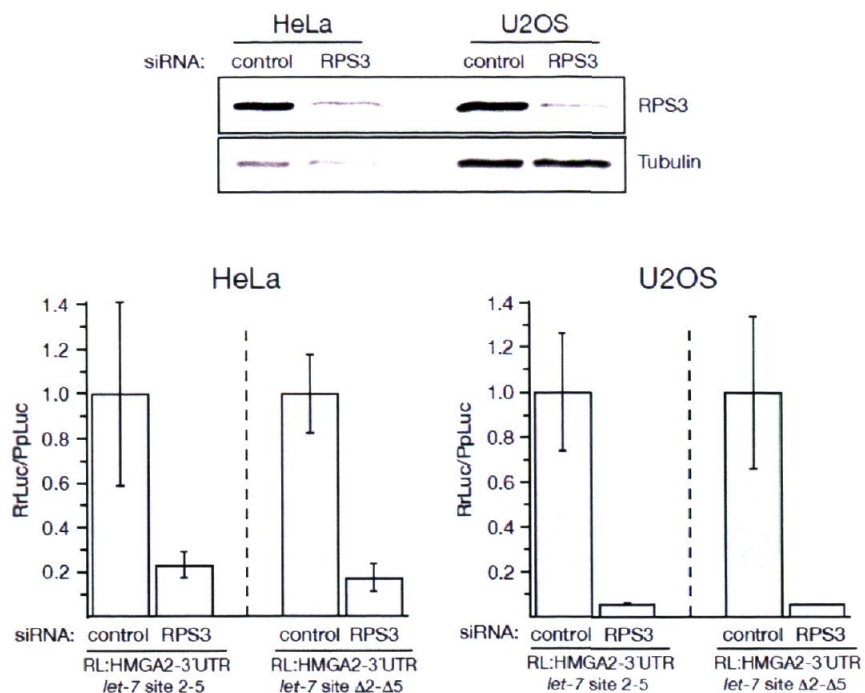


Figure S3-6: RPS3 is not involved in miRNA-mediated gene.

RPS3, a component of the 40S ribosome, was knocked down in HeLa and U2OS cells. Renilla Luciferase reporters containing four let-7 sites from the HMGA2 3'UTR and the mutated version of this was co-transfected with Firefly Luciferase. The data was analyzed using Dual Luciferase assay and error bars represent the standard deviation of six experiments.

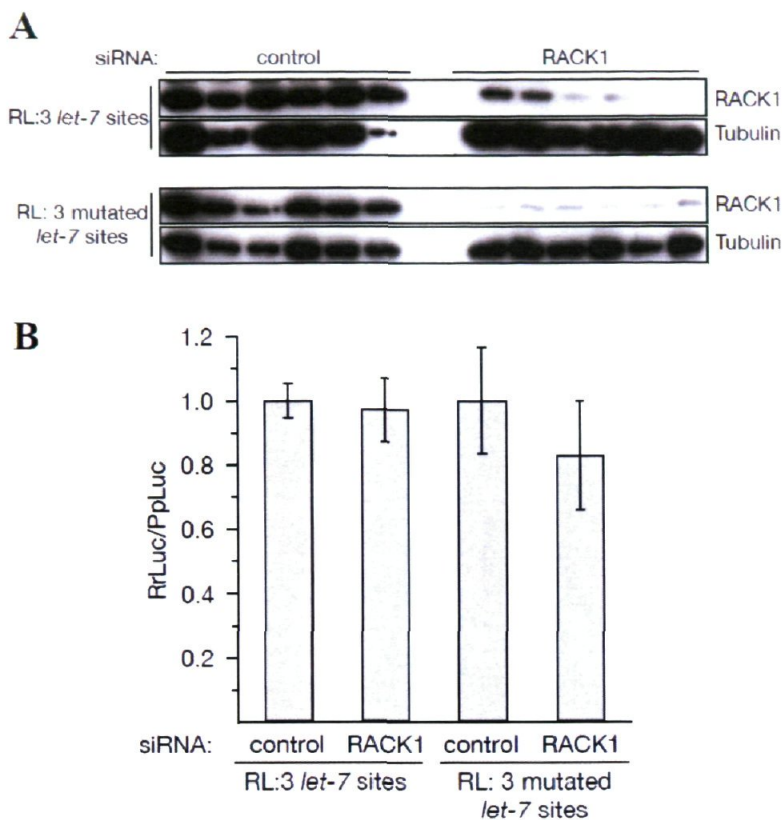


Figure S3-7 : RACK1 is not required for RNAi.

HeLa cells were transfected with control and RACK1 siRNA followed by transfection with a reporter construct that either carries three perfect complementary sites to let-7a (RL:3 *let-7* sites) or with reporters in which these sites were mutated to prevent sequence specific cleavage (RL:3 mutated *let-7* sites). **(A)** The efficiency of RACK1 knock down for each experiment was tested by Western blotting (directly from the transfected and lysed cells). Tubulin was used as loading control. **(B)** Dual luciferase assay of the transfection. Error bars represent the standard deviation of six experiments.

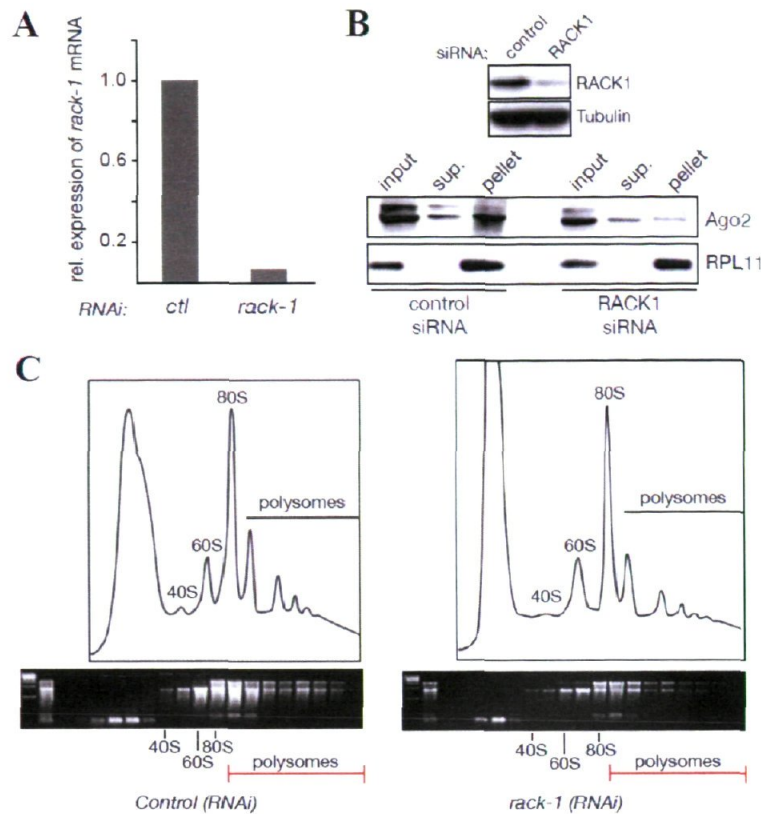


Figure S3-8 : Sucrose gradient fractionations of *C. elegans* samples and knockdown efficiency of RACK1.

(A) Efficiency of *rack-1*(RNAi). The *rack-1* mRNA levels were measured relative to the actin (*act-1*) mRNA. Two experiments in replicates were performed (Student's *t*-test $p < 0.001$). **(B)** A representative figure that shows that Human Ago2 association with ribosomes is RACK1 dependent. Ribosomal proteins were pelleted with sucrose cushion from HeLa cells that were treated with control or RACK1 siRNAs. Ago2 and the large ribosomal subunit L11 level were monitored with the corresponding antibodies. Western blot with RACK1 antibody illustrates the efficiency of the knockdown in the experiment of ribosome association to hAgo2. Tubulin was used as a loading control. **(C)** Representative 254 nm tracings and ribosomal agarose gels. 40S and 60S ribosomal subunits as well as 80S ribosomes and polysomes are annotated. Underlined in red are the fractions used to measure *let-7* and mRNA levels reported in Figure 3-5.

3.4.2 Materials and Methods

- **Nematode transgenic lines**

The HA-tagged *rack-1*, GFP-tagged *alg-1* genes and pRF4; HA-tagged *rps-12*, GFP-tagged *alg-1* genes and pRF4 were coinjected into wild-type (N2) strain to generate MJS10 and MJS17, respectively. Animals whose transgenes were stably integrated into chromosomes were selected following UV irradiation. The plasmid expressing GFP-tag *alg-1* is previously described (Hutvagner et al., 2004). The K04D7.1 (*rack-1*) and *rps-12* genes were tagged with Hemagglutinin (HA) epitope sequence and cloned into plasmids. Two copies of the HA-tag sequence were inserted in frame after the ATG of the *rack-1* and *rps-12* coding regions. RNAi experiments were performed with synchronized animal population as previously described in (Chendrimada et al., 2007).

- **Whole worm extract preparation**

Synchronized animals were harvested at adulthood to perform IP experiments. Since *rack-1(RNAi)* animals have a slight developmental delay, the developmental stage of the population was confirmed by microscopy and then harvested animals were homogenized in ice-cold lysis buffer (100 mM Potassium Acetate, 30 mM Hepes-KOH [pH 7.4], 2mM Magnesium Acetate, 1 mM DDT, 0.5% [v/v] Triton X-100, 2% [v/v] SUPERaseIn (Ambion) and Mini Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (1 tablet/5 ml solution) (Roche)) using One Shot Machine (Constant System) set at 8KPSI. The homogenized extract was clarified by centrifugation at 13,817 X g for 10 min at 4°C and the protein concentrations of the different samples were normalized using Dc protein Assay (Bio-Rad).

- **Protein Immunoprecipitation**

Immunoprecipitation of HA::ceRACK-1 and GFP::ALG-1 containing protein complexes were performed by pre-clearing whole worm lysate with 20 µl of Protein G Agarose beads (Roche) for 1 mg of total protein for 60 minutes at 4°C. The cleared extract was then incubated with either 15 µl of HA monoclonal antibody coupled to Protein A beads (Roche) or 10 µg of monoclonal anti-AFP 3E6 (Qbiogene) covalently linked to 20 µl

Protein G Agarose beads (Roche) for 1 hour at 4°C. Beads were then washed three times with ice-cold lysis buffer.

- **Immobilized 2'-O-methyl oligonucleotide capture of *let-7* and *lin-4* miRNAs**

The 2'-O-methyl oligonucleotide study was performed as reported in (Hutvagner et al., 2004). To remove non-specific interactions, clarified worm lysate was preincubated for 45 minutes with an unrelated 2'-O-methyl-oligonucleotide (5'-Bio-CAU CAC GUA CGC GGA AUA CUU CGA AAU GUC-3') followed by incubation with 2'-O-methyl oligonucleotides that specifically recruited *let-7* miRNA (5'-Bio-UCU UCA CUA UAC AAC CUA CUA CCU CAA CCU U-3') or *lin-4* miRNA (5'-Bio-UCU UCU CAC ACU UGA GGU CUC AGG GAA ACC UU-3'). The 5' Biotin was attached via a six-carbon spacer arm and oligonucleotides were obtained from Integrated DNA technologies.

- **RNase A treatment**

RNase A treatment was performed as described (Hammell et al., 2009). The efficacy of RNase treatment was assessed by monitoring the integrity of ribosomal RNAs using ethidium bromide gels.

- **GST pulldown assay**

GST pulldown experiments were performed as previously described (Kahvejian et al., 2005). GST and GST tagged ALG-1 have been produced as described (Miyoshi et al., 2005) and recombinant His-ceRACK-1 has been produced by following the manufacturer's protocol (Clontech).

- **Immunoprecipitation from HeLa with RACK1 antibody**

Protein G Dynabeads (Invitrogen) were washed 3 times with 1 ml PBS and incubated with 5 µg RACK1 antibody (Santa Cruz Biotechnology) for 30 minutes on ice. The beads were then washed 3 times with 1 ml PBS. The beads were added to HeLa cell lysate (5 mg total protein in 50 mM Tris/HCl [pH 7.4], 0.27 M sucrose, 1% [v/v] Triton, 0.1% [v/v] 2-mercaptoethanol, 0.15 M sodium chloride and one complete protease inhibitor cocktail tablet, and incubated for 90 minutes at 4°C. Beads were washed three times in 1 ml lysis

buffer (50 mM Tris/HCl [pH 7.5], 150 mM sodium chloride, 0.1% [v/v] NP-40 and one complete protease inhibitor cocktail tablet (Roche)).

- **Western Blot analysis of *C. elegans* samples**

To detect GFP tagged ALG-1 and HA tagged ceRACK-1, the beads were boiled for 10 minutes in 20 μ l of SDS loading buffer (10 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% [w/v] SDS, 100 mM DDT and 10% [v/v] glycerol) and proteins were resolved on 8% SDS-Polyacrylamide gel and transferred to Hybond-ECL membranes (Amersham Biosciences). Membranes were incubated overnight at 4°C with either antibody: (i) Mouse monoclonal to HA [12CA5] (Roche) diluted 1:3,000; or (ii) Mouse monoclonal to the Green Fluorescence Protein (GFP) (Roche) diluted 1:2,000. Antibodies were diluted in PBST-5% milk solution (137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl [pH 7.4], and 5% [w/v] dried milk). The membrane was incubated for 1 hour at room temperature with HRP-conjugated secondary antibody in PBST and then visualized by Western Lightening ECL Kit (Perkin Elmer).

- **Western Blot analysis of human cell samples**

The protein concentration of cell lysates was determined by BCA Assay (Thermo Scientific). Samples in 2 x SDS loading dye (125 mM Tris-Cl [pH 6.8], 20% [v/v] glycerol, 4% [w/v] SDS, 0.04% [w/v] Bromophenol Blue, 100mM DTT) were heated to 95°C for 10 minutes before being resolved on a 10% SDS- Polyacrylamide gel, or a 4-12% Bis-Tris gel and transferred to PVDF membranes (Millipore). Membranes were blocked in 5% dry milk [w/v]/TBST for 1 hour and then incubated with the following primary antibodies (i) Mouse monoclonal for RACK1 [B-3] (Santa Cruz), diluted 1:2500 (ii) Goat polyclonal IMP-1 [E-20] (Santa Cruz) (1:2000) (iii) Mouse monoclonal for tubulin (Sigma) (1:6000) (iv) Rat monoclonal to Ago2 [11A9] (Rudel et al., 2008) diluted 1:100 (v) Rat monoclonal to Ago1 [4B8] (1:10) or (iv) Rabbit monoclonal to RAS [EP1125Y] (Abcam; as described in (Johnston et al., 2010). Primary antibodies were diluted in 1x TBS, 2% [w/v] BSA, 0.1% [v/v] Tween-20, 0.1% NaN₃ and incubated with membrane overnight at 4°C. HRP-conjugated secondary antibodies diluted in 5% [w/v] dry milk/TBST were incubated with membrane for 1 hour at room temperature. Membranes were visualized with ECL

(Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) or Immobilon Western (Millipore)).

- **Northern Blot Analysis**

For the detection of the small RNAs in human cells we followed the published protocol for sensitive Northern blot using chemical crosslink (Pall and Hamilton, 2008) with the only modification that the filters were washed three times for an hour at 37°C with 0.1% [w/v] SDS, 2X SSC. Signals were revealed with FLA-5100 phosphoimager (Fujifilm) using Fujifilm screens and visualized and quantified with ImageGauge 4.1 (Fujifilm).

- ***C. elegans* Polysome Fractionation**

The method followed was originally described by (Ding and Grosshans, 2009). Lysates (lysis buffer: 20mM Tris pH 8, 140 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 % [v/v] NP-40, 2% [w/v] PTE (polyoxyethylene (10) tridecyl ether), 1% [w/v] DOC (sodium deoxycholate monohydrate), 1mM DTT, 1mM cycloheximide, 0.4 U/μl RNasin) of worms either pretreated with EDTA or cyclohexamide were spun down at 10,000 X g for 10 minutes at 4°C, and the equivalent amounts of supernatant were layered onto a 10-50% sucrose gradient (20 mM Tris pH 8, 140 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 1 mM cyclohexamide). Samples were then spun at 39,000 rpm in an Optima L-100 XP Ultracentrifuge (Beckman Coulter) for 3 hours. Sucrose gradients were fractionated into 500μl samples.

- **Analysis of mRNAs and microRNA levels by quantitative RT-PCR.**

The total RNA from around 30,000 worms resuspended in TRI Reagent (Sigma) was extracted by repetitive flash-freeze followed by quantification. Quantitative RT-PCR analyses of *lin-41*, *ceRACK-1* and *act-1* (Actin; endogenous control) mRNAs were performed with 100ng of total RNA using TaqMan Gene Expression Assay kit (Applied Biosystems) or SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) for *daf-12* following manufacturer procedures.

Quantitative RT-PCR analyses of *let-7*, *lin-4* microRNAs and *sn2841* (small nucleolar RNA; endogenous control) were performed with 10ng of total RNA using TaqMan microRNA Assay kit (Applied Biosystems) following manufacturer procedures. Specific assays for *let-7* (Assay ID: 000377), *lin-4* (Assay ID: 000258) and *sn2841* (Assay ID: 001759) were purchased from Applied Biosystems. All the statistical analyses were performed with R version 2.8.1.

- **siRNA transfection in Human cells and qPCR primers**

Cells were plated at 1.25×10^5 per well of a 6-well plate. For each well 200 pmol of siRNA was diluted in 175 μ l of Opti-MEM (GIBCO). 2 μ l of oligofectamine (Invitrogen) was diluted in 13 μ l Opti-MEM and incubated at room temperature for 5 minutes. The siRNA mixture and the oligofectamine mixture were mixed and incubated at room temperature for 20 minutes. The sample was then added to the well and mixed gently. The media was replaced after 4-6 hours. siRNAs to knock down RACK1 (1)(sense 5'-CCA UCA AGC UAU GGA AUA CTT-3'; antisense 5'-GUA AAC CAU AGC UUG AUG G-3') and controls (sense 5'-AGG UAG UGU AAU CGC CUU G-3'; antisense 5'-CAA GGC GAU UAC ACU ACC U-3') were purchased from MWG Biotech AG. Alternate RACK1 siRNAs purchased from Thermo Scientific targeted the sequence 5'-GGC ACA CGC UAG AAG UUU A-3' or 5'- GGC CAC AAC GGC UGG GUA A-3' were referred to as 2 or 3 respectively. siRNA to knock down RPS3 was a mixture of four siRNAs (Dharmacon) targeting the following sequences of RPS3: 5'- GCG GAG ACC CUG UUA ACU A-3', 5'-GCC AAA GGC UGC GAG GUU G-3', 5'- GGA CCC AAC UGG UAA-3', 5'-GGA GUU GAG GUG CGA GUU A-3', Predesigned IMP-1 (Gene Symbol: IGF2BP1) qPCR primers were purchased from Qiagen (QuantiTect Primer Assay).

- **Microscopy**

Normarski images were collected using a Zeiss AxioCam HRm digital camera mounted on a Zeiss Axio Imager M1 microscope. The picture was analyzed with Axiovision 4.6 software.

- **Human cells Sucrose Cushion**

HeLa lysates (lysis buffer: 1% [v/v] NP-40, 10 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.25 mM DTT, 50 μ M cycloheximide, 0.4 U/ μ l RNAsin and protease inhibitors) were pretreated with cyclohexamide (50 μ g/ml), spun down (10,000 X g, 10 minutes, 4°C), and equivalent amounts of supernatant were layered onto a 0.5 M sucrose cushion. Samples were then spun at 55,000 rpm for 45 minutes at 4°C in an Optima Max Ultracentrifuge.

- **Human cells Sucrose Gradient and Polysome Fractionation**

HeLa Cells were treated with 50 μ g/ml cyclohexamide for 5 minutes, washed in PBS, trypsinized and centrifuged (1,000 X g for 5 minutes). The cell pellet was resuspended in lysis buffer (0.5% [v/v] NP-40, 130mM KCl, 10mM MgCl₂, 10 μ g/ml cyclohexamide, 0.2 mg/ml heparin, 2.5 mM DTT, 12.5 μ l/2.5 ml of RNAsin (40 U/ μ l)), incubated at 4°C for 15 minutes. The samples were centrifuged at 10,000 X g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was diluted 200 times and layered on 10-50% [w/v] sucrose gradient (1.5 mM DTT, 200 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM KCl, 25 mM MgCl₂). Gradients were centrifuged at 22,227 X g for 3.5 hours at 4°C in a Beckman SW41Ti rotor. Sucrose gradients were fractionated into 500 μ l samples. Proteins from the fractions were precipitated using 1 volume of 100% TCA to 4 volumes of sample. The samples were incubated at 4°C for 10 minutes, centrifuged at 10,000 X g for 5 minutes at 4°C, and the supernatant removed. The remaining pellet was washed with 200 μ l cold acetone and centrifuged (10,000 X g, 5 minutes, 4°C) for a total of two acetone washes.

- **Probes for analysis of mRNAs levels by quantitative RT-PCR**

For *lin-41*:

Forward: 5'- GCGGAAACGAGCTGTCGAT -3'

Reverse: 5'- CCGCGATGGTGGGACATT -3'

FAM probe: 5'- CAGCAGTGAAGGTGACTC -3'

For ceRACK-1:

Forward: 5'-CAAGACCACTGTCCTGTCATCT-3'

Reverse: 5'-CTGTCGACATCCCAAACAAGGA-3'

FAM probe: 5'-CCCGCGACAAGACT-3'

For act-1:

Forward: 5'-GGTATGGGACAGAAGGACTCGTA-3'

Reverse: 5'-CCGTGCTCAATTGGGTACTTG-3'

FAM probe: 5'-CAATCCAAGAGAGGTATCC-3'

For daf-12:

Forward: 5'-GATCCTCCGATGAACGAAAA-3'

Reverse: 5'-CTCTTCGGCTTCACCAGAAC-3'

3.5 Acknowledgments

We thank V. Ambros, R. Utley, A. Sobala and members of our laboratories for comments on the manuscript. We also thank G. Meister for hAgo1 and hAgo2 antibodies and E. Paquet for statistical support. Some nematode strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by the National Institutes of Health National Center for Research Resources. This work was funded by the Wellcome Trust and European Framework 6 SIROCCO consortium fund (G.H.) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; M.J.S.). S.B. is a participant in the Wellcome Trust PhD programme.

G.H. is a Wellcome Trust Career Development fellow and M.J.S. is a CIHR New Investigator.

CHAPITRE 4

Analyse phénotypique systématique permettant la caractérisation des interacteurs de la protéine ALG-1 dans la voie des microARNs

Guillaume Jannot, Sandra Piquet, Nellie Giguère, Martin J. Simard

Avant propos

La recherche de nouveaux facteurs impliqués dans la voie des microARNs est une thématique très importante dans le laboratoire du Dr Martin Simard. Plusieurs techniques biochimiques sont utilisées pour rechercher ces facteurs, telles que le criblage double-hybride, l'immunoprécipitation de complexes, et la purification de miRISCs spécifiquement. Étant donné le nombre important de candidats obtenus, il a été indispensable de mettre au point une étude fine, systématique, et facilement reproductible nous permettant de les analyser. Les données présentées dans le chapitre 4 décrivent l'approche entreprise pour réaliser cette étude. Pour cela, j'ai caractérisé les phénotypes des candidats obtenus suite à un deuxième criblage double-hybride contre la protéine ALG-1 réalisé par Sandra Piquet et Nellie Giguère. Contrairement au criblage utilisé dans le chapitre 3 où la banque d'ADNc provient d'embryons, ce criblage a été effectué contre une librairie d'ADNc issue de vers jeunes adultes. La démarche expérimentale et les analyses phénotypiques présentées dans ce chapitre ont été réalisées par moi-même dans leur totalité.

Résumé

La voie de régulation par les microARNs est essentielle pour le développement et le maintien de l'homéostasie cellulaire. Les protéines de la famille Argonaute sont au cœur des mécanismes participant à l'activité post-transcriptionnelle des microARNs et leur fonction est alors essentielle pour soutenir efficacement ce système de régulation. Une approche traditionnelle pour étudier précisément un mécanisme biologique consiste à identifier puis caractériser les protéines qui le composent. Pour ce faire nous avons identifié les partenaires physiques de la protéine Argonaute ALG-1 du nématode *C. elegans* par une technique de double-hybride conduite chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Pour caractériser les candidats obtenus, nous avons développé une approche de caractérisation fine basée sur l'analyse phénotypique induite suite à leur perte de fonction par RNAi. Pour déterminer leur importance dans la voie des microARNs, nous avons évalué l'altération de la voie de régulation des microARNs *let-7* et de sa famille composée des microARNs miR-48, miR-84 et miR-241. A partir de ce cette approche systématique, nous avons été en mesure d'étudier l'interaction génétique de 53 candidats avec la voie des microARNs et d'isoler particulièrement le gène Y71H2AM.4 comme un acteur important impliqué dans régulation des gènes par les microARNs de la famille *let-7*.

4.1 Introduction

Le rôle essentiel de la voie des microARNs durant le développement du nématode *C. elegans* peut rendre difficile l'identification de facteurs importants. En effet, leur perte de fonction peut se traduire par une létalité embryonnaire comme observé pour le double mutant des gènes codant pour les protéines Argonautes ALG-1 et ALG-2 ou de la protéine Dicer (Grishok et al., 2001; Vasquez-Rifo et al., 2012). Inversement, l'absence de phénotype ne signifie pas pour autant une non fonction du candidats dans la voie des microARNs. En effet, une souche mutante pour le gène *alg-2* affiche un phénotype difficilement observable, alors que le double mutant *alg-1 ; alg-2* est synthétique léthal (Bukhari et al., 2012; Grishok et al., 2001; Vasquez-Rifo et al., 2012). Ainsi, pour augmenter l'efficacité d'identification de candidats associés à la voie des microARNs, il apparaît important de se concentrer sur des phénotypes précis, connus pour être caractéristiques d'une perte de fonction de la voie des microARNs. Pour ce faire, il est intéressant d'utiliser des souches mutantes de nématodes sensibilisées spécifiquement à un axe de régulation contrôlé par les microARNs (Hammell et al., 2009). Cette approche a le double avantage d'établir un lien génétique direct entre les candidats étudiés et la voie des microARNs, et d'augmenter la sensibilité des phénotypes recherchés par rapport à une souche de type sauvage.

Le développement du nématode *C. elegans* se caractérise par la succession de quatre différents stades larvaires (stades larvaires L1 à L4) contrôlés finement par l'expression temporelle des microARNs *lin-4*, *let-7* et de la famille du microARN *let-7* (*let-7fam*) (Abbott et al., 2005; Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000; Wightman et al., 1993). Par conséquent, des vers mutants pour *lin-4* et *let-7fam* affichent des phénotypes développementaux caractéristiques qui sont supprimés suite à la perte de fonction de leurs ARNm cibles respectifs, comme l'illustre la Figure 4-1. L'analyse extensive de ces phénotypes a permis de démontrer que l'expression séquentielle de ces microARNs était déterminante pour contrôler le statut prolifératif des cellules hypodermiques, nécessaires à

l'établissement correct des transitions larvaires (Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000; Wightman et al., 1993)

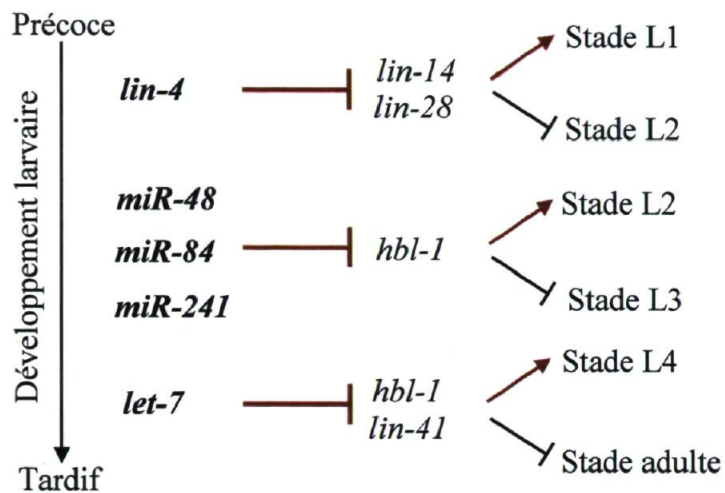


Figure 4-1 : Contrôle du développement larvaire chez *C. elegans* par les microARNs.

L'expression au stade L1 du microARN *lin-4* permet la sous régulation des ARNm *lin-14* et *lin-28* et induit la transition au stade larvaire L2. Les microARNs *miR-48*, *84*, *241* permettent la transition au stade L3 en régulant l'ARNm *hbl-1*. Finalement l'inhibition des ARNm *hbl-1* et *lin-41* par le microARN *let-7* est essentielle pour le passage au stade adulte.

Finalement une mutation nulle du microARN *let-7* est associée plus tardivement à une malformation létale de la vulve entraînant la fuite des organes internes (voir Figure 4-3B). Ces phénotypes hétérochroniques sont également retrouvés lors de la perte de fonction de la protéine Dicer ou de la protéines Argonaute ALG-1 (Grishok et al., 2001). Ainsi, l'axe de régulation contrôlé par la famille du microARN *let-7* s'avère être un bon indicateur phénotypique pour caractériser des candidats associé à la voie des microARNs (Chan and Slack, 2009; Hammell et al., 2009; Parry et al., 2007).

4.2 Objectifs et mode opératoire

4.2.1 Objectifs

Pour comprendre la voie de régulation par les microARNs, nous avons entrepris la recherche de nouveaux facteurs associés à cette voie. Etant donné le grand nombre de

candidats obtenus, notre stratégie fut de développer une analyse phénotypique systématique fine et suffisamment sensible pour identifier de potentiels nouveaux joueurs impliqués dans la voie de régulation par les microARNs.

4.2.2 Mode opératoire

La découverte de nouveaux acteurs s'est faite en recherchant des partenaires physiques de la protéine Argonaute ALG-1 en utilisant la technique de criblage double hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les différents candidats obtenus ont été sous-régulés, puis l'analyse spécifique des phénotypes a été réalisée pour appréhender leur rôle dans la voie des microARNs.

Pour contourner l'apparition des phénotypes sévères comme la létalité embryonnaire, nous avons induit la perte de fonction des différents candidats durant le développement du nématode par génétique inverse en utilisant une technique d'interférence par l'ARN ou l'ARNdb est fournis expérimentalement par des bactéries, source de nourriture des nématodes (Timmons et al., 2001). Ces pertes de fonction ont été effectuées dans différentes souches de nématodes mutantes pour le microARNs *let-7* et sa famille composée de *miR-48*, *miR-84* et *miR-241*. Cette démarche expérimentale nous a permis d'orienter nos observations sur des phénotypes plus sensibles et spécifiques associés à la perte de fonction de ces microARNs (Chan and Slack, 2009; Hammell et al., 2009). Notre outillage expérimental comprend également une souche de vers exprimant la protéine fluorescente GFP dans les cellules souches hypodermiques, ainsi que dans leurs jonctions apicales (*wIs79[ajm-1::gfp; scm-1::gfp]*). Ceci nous a permis d'évaluer le niveau prolifératif ainsi que l'organisation syncytiale de ces cellules hypodermiques, connues pour être sous le contrôle de la famille des microARNs *let-7*.

4.3 Résultats

4.3.1 Identification des partenaires de la protéine ALG-1 par criblage double-hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Le criblage double-hybride de la protéine ALG-1 contre une banque d'ADNc issue de vers jeunes adultes a permis d'isoler 63 différents candidats affichant une interaction avec ALG-1. Parmi ces facteurs, 10 protéines ribosomales ont été volontairement exclues puisque leurs pertes de fonction affichaient un phénotype létal précoce (donnée non montrées). Ainsi, 53 candidats ont été analysés pour déterminer leur implication dans la voie des microARNs (Tableau 4-1).

Nom séquence	Locus	Nbrs clones ^a	Intéraction ^b	% de séquence ^c	Description
F11G11.10	col-17	5	+	21.7	COLlagen
F35C5.6	clec-63	4	++	25.5	C-type LECTin
F01F1.12	aldo-2	3	+	61.7	Fructose-bisphosphate aldolase homologous to human ALDOB
F25H2.10	rpa-0	3	+	50.0	Acidic ribosomal subunit protein P0
Y55B1AR.1	lec-6	2	++++	54.1	Beta-galactosyl-binding lectin
F33H1.2	gpd-4	2	+++	40.5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (GAPDHs)
D2030.6	prg-1	2	+	12.0	Piwi subfamily of highly conserved Argonaut/Piwi proteins;
Y2H9A.3	col-162	2	+	55.2	COLlagen
F22B3.4		1	++++	36.8	Glucosamine-fructose 6-phosphate aminotransferase
T19A6.2	ngp-1	1	++++	20.0	Nuclear/nucleolar GTP-binding Protein family
T21C12.1	unc-49	1	++++	4.8	Subunits of a heteromeric GABA receptor
Y47D7A.13		1	++++	56.9	Unknown
Y71H2AM.4		1	++++	26.6	NADH:ubiquinone oxidoreductase domain
F57F5.1		1	+++	41.6	Unknown
T03E6.7	cpl-1	1	+++	29.1	CathePsin L family
C55B7.4	acd-1	1	++	37.5	Acyl CoA DeHydrogenase
T20F5.2	pbs-4	1	++	84.7	Proteasome Beta Subunit
Y41E3.7		1	++	15.9	Unknown
Y57G11A.2		1	++	10.9	Unknown
F28A10.6	acd-9	1	++	21.0	Acyl CoA DeHydrogenase
F35F10.6		1	++	51.0	Unknown
C36A4.9	acs-19	1	+	31.5	Acyl-CoA synthetase
C05C10.4	pho-11	1	+	4.8	Intestinal acid PHOSphatase
C05D2.4	bas-1	1	+	16.1	Serotonin- and dopamine-synthetic aromatic amino acid decarboxylase (AAADC)
C16H3.2	lec-9	1	+	48.6	Lectin
C34D4.12	cyn-12	1	+	63.3	CYclopheylIN
C36B1.3	rpb-3	1	+	18.4	RNA Polymerase II (B) subunit
C38C6.6	tag-297	1	+	33.1	Unknown
C44C1.2		1	+	14.0	Unknown
C50F2.6	ftb-5	1	+	40.3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase)
C52E12.2	unc-104	1	+	1.3	Kinesin-like motor protein
F39B2.10	dnj-12	1	+	56.2	DNAJ domain (prokaryotic heat shock protein)
F46H5.3		1	+	72.2	Unknown
F52H3.7	lec-2	1	+	37.1	Tandem repeat' type galectin (beta-galactosyl-binding lectin)
F54C9.6	bcs-1	1	+	32.8	Orthologous to the human mitochondrial protein BCS1
F56A6.1	sago-2	1	+	2.3	Synthetic secondary siRNA-deficient ArgONaute mutant
F58A4.10	ubc-7	1	+	76.2	UBiquitin Conjugating enzyme
H14A12.2	fum-1	1	+	41.6	FUMarase
H22K11.1	asp-3	1	+	32.1	ASpartyl Protease
K07D4.8	pqn-48	1	+	77.1	Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein
R09H10.5		1	+	15.5	Unknown
T07C4.5	ttr-15	1	+	83.1	TransThyretin-Related family domain
T10B5.5	cct-7	1	+	22.1	Putative eta subunit of the eukaryotic cytosolic ('T complex') chaperonin
T19B10.2	phi-59	1	+	65.2	Unknown
T27F6.2	clec-12	1	+	28.0	C-type LECTin
Y18D10A.19	ftb-2	1	+	69.4	Peptidylprolyl cis/trans isomerase
Y39H10A.3	mtm-9	1	+	15.8	Catalytically inactive myotubularin lipid phosphatase
Y47G6A.20	rnp-6	1	+	49.0	mRNA splicing regulation, mRNA localization, or transcriptional regulation via TFIIF
Y7A5A.1		1	-	31.2	Unknown
ZC373.7	col-176	1	+	12.8	COLlagen
ZK6.7	lip-5	1	-	39.2	Triglyceride lipase-cholesterol esterase
C25B8.3	cpr-6	1	+	26.3	Cysteine PRotease related
F57B10.3		1	-	23.6	Functions in glycolytic and gluconeogenic metabolism

Tableau 4-1: Facteurs présentant une interaction forte avec la protéine Argonaute ALG-1 suite au criblage double-hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Le tableau présenté ci-dessus indique les facteurs interagissant avec la protéine ALG-1. ^a Nombre de fois où l'interacteur a été retrouvé. ^b Capacité de croissance sur milieu restrictif sans acides aminés Lys Trp His et Ade : correspond à la force d'interaction. ^c Les ADNc contenus dans une banque sont souvent tronqués par rapport aux ARNm pleine longueur. Ces données indiquent en % la taille des protéines isolées par rapport aux protéines entières.

4.3.2 Analyses phénotypiques des cellules souches hypodermiques

Au premier stade larvaire du nématode, chaque côté de l'animal est formé d'une ligne longitudinale de 10 cellules souches hypodermiques. Une première division symétrique (dite proliférative) de six de ces cellules va se produire au cours du deuxième stade du développement, suivie par des divisions asymétriques (la différenciation) durant les stades suivants, pour finalement produire un nombre invariable de 16 cellules souches hypodermiques au stade adulte. Les jonctions apicales séparent les domaines apicaux et baso-latéraux durant le développement puis fusionnent pour former un syncytium hypodermique. La voie de signalisation par les microARNs est déterminante dans les décisions développementales de ces cellules. En effet, un mutant *lin-4* échappe à la première division proliférative et affiche un nombre réduit de ces cellules, alors que les microARNs de la famille *let-7* réitèrent cette étape de division symétrique et induisent une hyper prolifération (Abbott et al., 2005; Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000; Wightman et al., 1993). De façon similaire, la perte de fonction par RNAi des protéines Argonautes ALG-1 et ALG-2 induit un phénotype d'hyper prolifération (Grishok et al., 2001; Wildwater et al., 2011).

La première analyse phénotypique fut d'induire la perte de fonction des candidats par RNAi, puis de déterminer le pourcentage d'animaux affichant un phénotype hétérochronique caractérisé par une hyper prolifération des cellules souches hypodermiques, et une désorganisation de la fusion des jonctions apicales, comme observé pour la perte de fonction d'ALG-1. Douze candidats présentaient un phénotype d'hyper prolifération, parmi lesquels sept affichaient un défaut dans la formation des jonctions apicales (Figure 4-2A). Cependant, il est important de noter qu'aucun d'entre eux n'affiche une pénétrance du phénotype aussi forte que la perte de fonction de la protéine ALG-1 (Figure 4-2A et B).

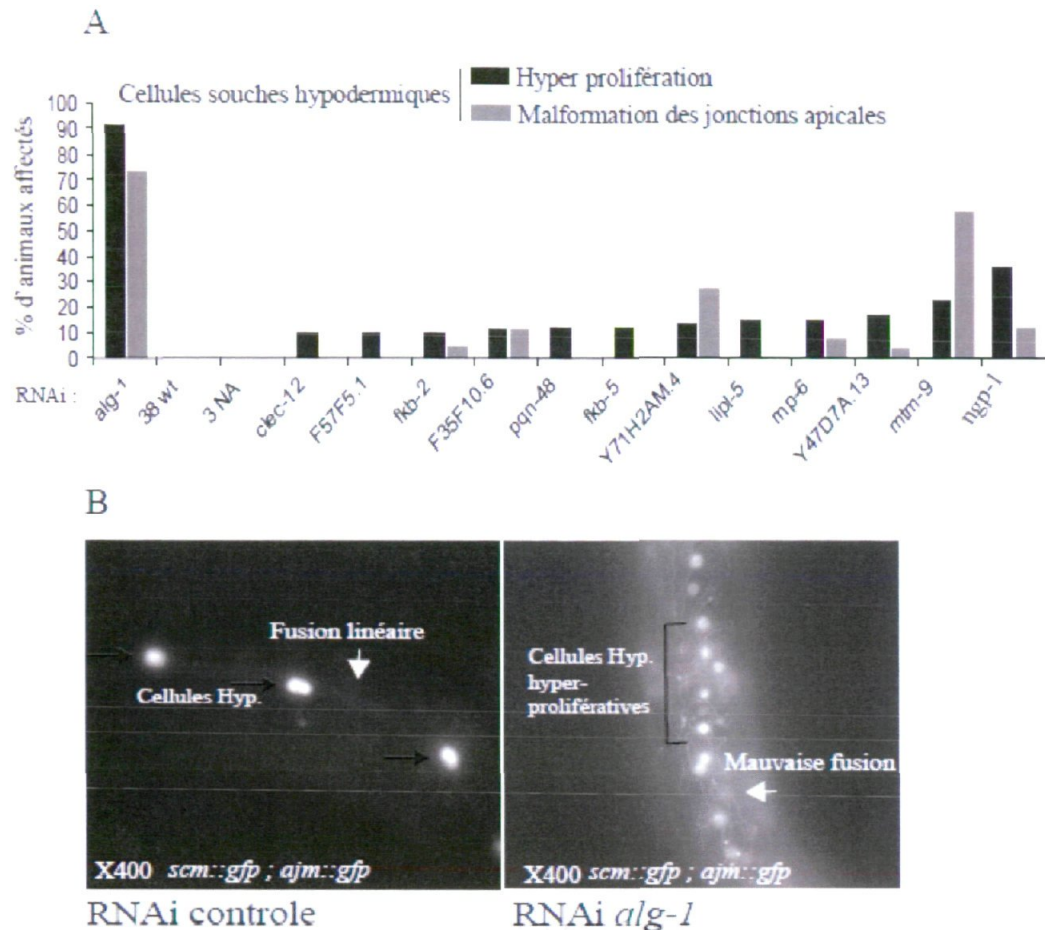


Figure 4-2 : Défaut de régulation des cellules souches hypodermiques.

(A) Entre 20 et 30 vers issus de la souche (*ajm-1::gfp*; *scm-1::gfp*) ont été synchronisés au stade larvaire L1 puis analysés suite à l'induction par RNAi de la perte de fonction des 53 candidats d'interaction avec la protéine Argonaute ALG-1. Après 48h à une température de 20°C, douze candidats présentaient un défaut de régulation du processus développemental des cellules souches hypodermiques entraînant une hyper prolifération souvent associée avec une malformation des jonctions apicales. Trois n'ont pas pu être déterminés à cause de leur phénotype létal post embryonnaire (NA, Non Applicable). 38 candidats n'affichaient aucun phénotype recherché (WT, « Wild Type »). (B) La perte de fonction de la protéine ALG-1 a été systématiquement induite lors des différentes expériences pour contrôler l'efficacité du protocole de RNAi et analysée en même temps que les candidats testés. L'image de gauche illustre une régulation et formation normale des cellules souches hypodermiques. L'image de droite représente l'impact de la perte de fonction de la protéine ALG-1 sur la régulation des cellules souches hypodermiques, incluant un phénotype d'hyper prolifération et une malformation sévère des jonctions apicales.

4.3.3 Analyse de l'interaction génique avec le microARN *let-7*

Pour évaluer l'implication de ces composants dans la voie des microARNs, et plus spécifiquement dans l'axe de régulation par le microARN *let-7*, nous avons analysé l'interaction génétique des potentiels partenaires d'ALG-1 avec le gène mutant *let-7(n2853)*. Ce gène mutant génère le microARN *let-7* caractérisé par la substitution d'une guanine en une adénine. Cette mutation a la caractéristique intéressante d'être thermosensible. Par conséquent, à une température supérieure à 15°C, les nématodes au génotype *let-7(n2853)* meurent suite à la fuite de leurs organes par la vulve (Reinhart et al., 2000) (Figure 4-3B), alors qu'à basse température (15°C) le phénotype est moins pénétrant. Cependant, la pénétrance du phénotype à température permissive peut être augmentée en réduisant l'expression de composants impliqués dans la voie des microARNs, comme observé après la perte de fonction d'ALG-1 (Figure 4-3A). Ceci supporte que la sensibilité de ce phénotype corrèle avec l'intégrité des facteurs impliqués dans la voie des microARNs. Ainsi, la sévérité du phénotype thermosensible à température permissive de la souche *let-7(n2853)* a été analysée suite à l'induction par RNAi de la perte de fonction des différents candidats (Figure 4-3A). Parmi les 53 protéines sous régulées, 27 augmentent la sévérité du phénotype, avec particulièrement Y71H2AM.4 qui affiche une interaction génétique forte avec *let-7(n2853)*, comme observé avec *alg-1(RNAi)*.

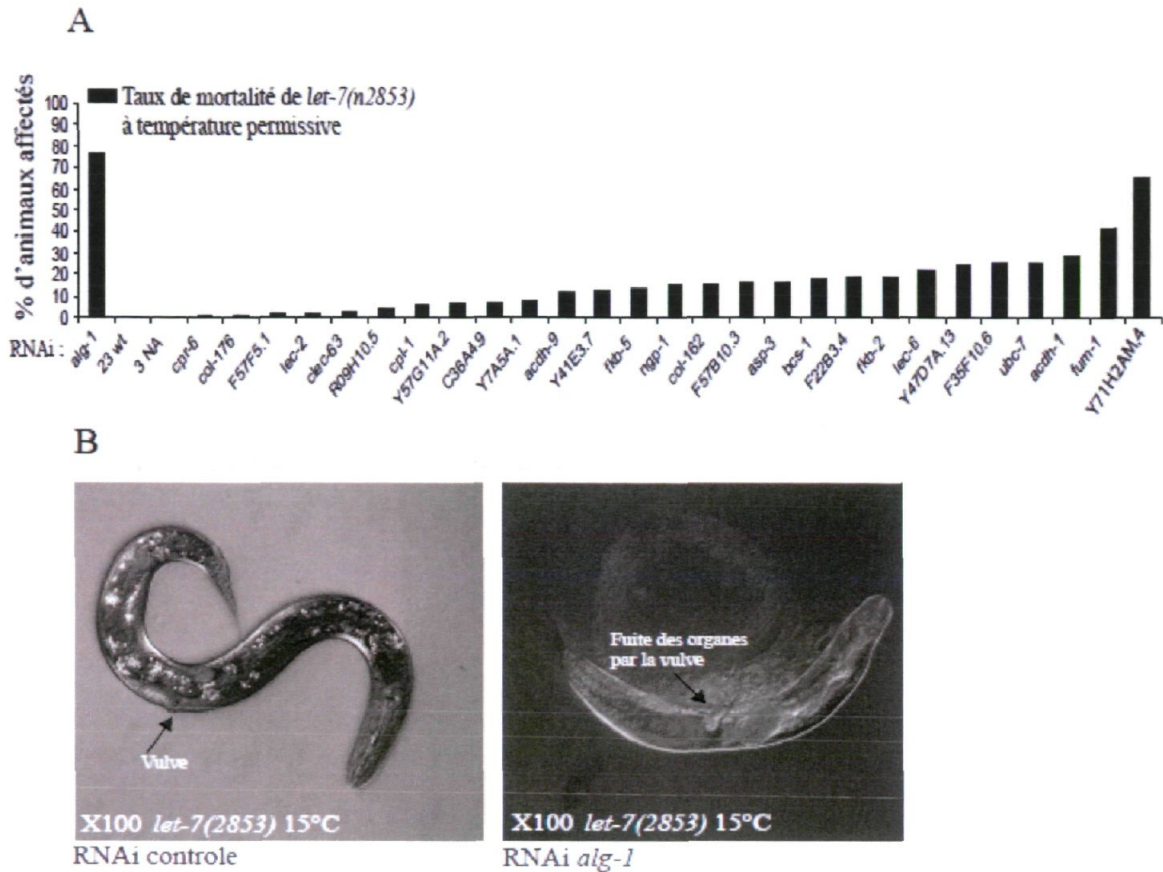


Figure 4-3 : Augmentation du phénotype de la souche mutante thermosensible pour le microARN *let-7* à température permissive.

(A) Entre 40 et 60 vers issus de la souche *let-7(n2853)* ont été synchronisés au stade larvaire L1 puis analysés suite à l'induction par RNAi de la perte de fonction des 53 candidats d'interaction avec la protéine Argonaute ALG-1. Après 48h à une température de 15°C, 27 candidats affichaient une augmentation du phénotype léthal de *let-7 (n2853)*. Trois n'ont pas pu être déterminés à cause de leur phénotype léthal post-embryonnaire (NA, Non Applicable), également observé dans la souche sauvage N2 (donnée non montrées). Vingt-trois candidats n'affichaient aucun phénotype recherché (WT, « *Wild Type* »). (B) La perte de fonction de la protéine ALG-1 a été systématiquement induite en même temps que les candidats testés pour contrôler l'efficacité du protocole de RNAi. L'image de gauche illustre la viabilité d'un ver adulte *let-7 (n2853)* à température permissive. L'image de droite représente le phénotype léthal à 15°C de la souche *let-7 (n2853)* en combinaison avec la perte d'*alg-1* qui se caractérise par la fuite des organes internes de l'animal par la vulve.

4.3.4 Analyse de l'interaction génique avec les microARNs de la famille *let-7*.

Les résultats présentés ci-dessus supportent l'existence d'une interaction génétique entre 27 partenaires potentiels de la protéine Argonaute ALG-1 et la voie de régulation du microARN *let-7*. Pour renforcer le lien génétique de ces candidats avec la voie des microARNs, nous avons déterminé leur impact sur l'axe de régulation des microARNs de la famille *let-7*. Les microARNs *miR-48*, *miR-84*, *miR-241* agissent de façon redondante pour sous-réguler l'ARNm *hbl-1* lors de la transition larvaire L2-L3. De manière similaire à un mutant *alg-1(gk214)*, la triple mutation de ces microARNs affiche un phénotype retardé très fort, caractérisé par l'absence de formation des structures cuticulaires appelées « *alae* », étape finale qui succède à la différenciation et la fusion des cellules latérales hypodermiques (Figure 4-4B). Cependant les simples mutants présentent un phénotype plus faible pouvant être aggravé en combinaison avec l'inhibition de facteurs impliqués dans la voie des microARNs (Hammell et al., 2009).

Ainsi, les 27 candidats augmentant le phénotype de la souche *let-7 (n2853)*, donc susceptibles d'être impliqués dans la voie des microARNs, ont été sous-régulés par RNAi dans les souches simples ou doubles mutants des microARNs de la famille *let-7*. Ensuite, le pourcentage de vers jeunes adultes présentant une absence de structures cuticulaires a été comptabilisé (Figure 4-4A). Nous avons observé que l'absence de formation des « *alae* » est augmentée dans les animaux simples et doubles mutants uniquement en combinaison avec la perte de fonction du gène codant pour la protéine Y71H2AM.4.

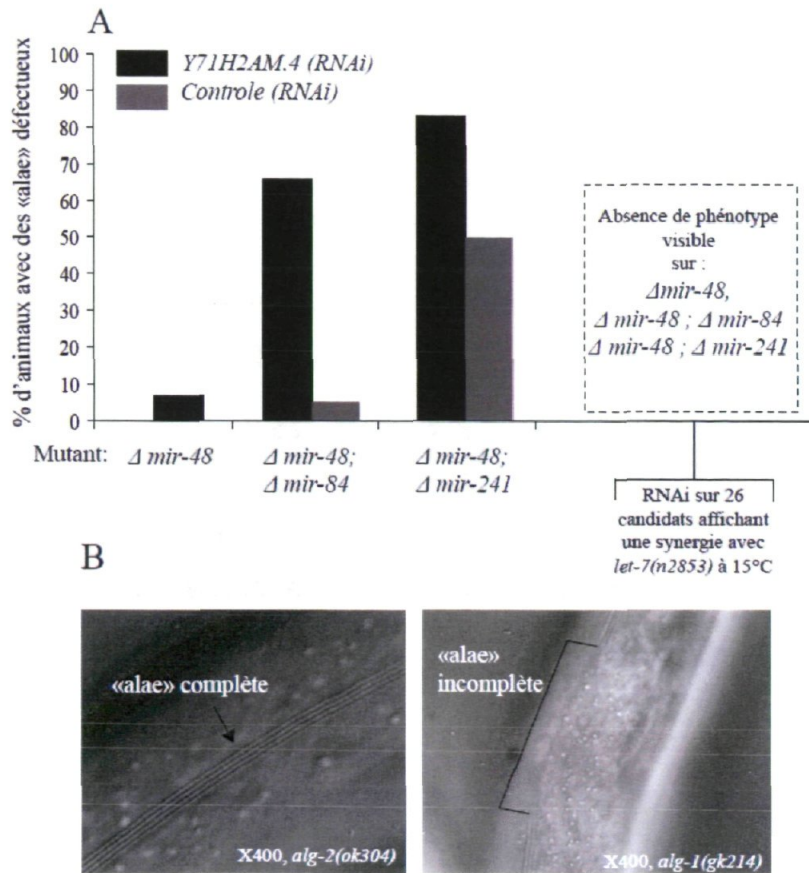


Figure 4-4 : Interaction génétique entre Y71H2AM.4 et les microARNs de la famille *let-7*.

(A) Entre 20 et 30 vers issus des souches simples ou doubles mutants pour les microARNs de la famille *let-7* ($\Delta miR-48$, $\Delta miR48;miR-84$ et $\Delta miR-48;miR-241$) ont été synchronisés au stade larvaire L1 puis analysés suite à l'induction par RNAi de la perte de fonction des 27 candidats interagissant génétiquement avec *let-7*. Après 48h à 20°C, la perte de fonction d'un seul candidat, Y71H2AM.4, génère une malformation voire une absence totale des « alae ». Ce phénotype est sensiblement augmenté dans les souches doubles mutants. (B) L'image de gauche illustre la formation normale des « alae » lors de la transition du stade larvaire L4 à adulte (dans ce cas *alg-2(ok304)*). L'image de droite représente le phénotype hétérochronique caractéristique d'une formation discontinue des « alae » retrouvé dans une souche mutante pour *alg-1* (dans ce cas *alg-1(gk214)*).

Pour renforcer l'interaction génétique observée de ce gène avec les microARNs de la famille *let-7*, nous avons regardé l'impact de sa perte de fonction sur une souche de nématode exprimant un ARNm rapporteur contenant la séquence 3' UTR de l'ARNm *hbl-1*, ciblé naturellement par les microARNs de la famille *let-7*. Comparativement à l'expérience contrôle, ou les cellules hypodermiques perdent l'expression de la GFP durant

le troisième stade larvaire, la perte de fonction de Y71H2AM.4 permet de soutenir cette expression plus tardivement (Figure 4-5). Ceci suggère que la perte de fonction de Y71H2AM.4 augmente les phénotypes hétérochroniques associés à la perte de fonction des microARNs de la famille *let-7* en réduisant l'activité de régulation de l'ARNm *hbl-1* par les microARNs *miR-48*, *miR-84*, *miR-241*.

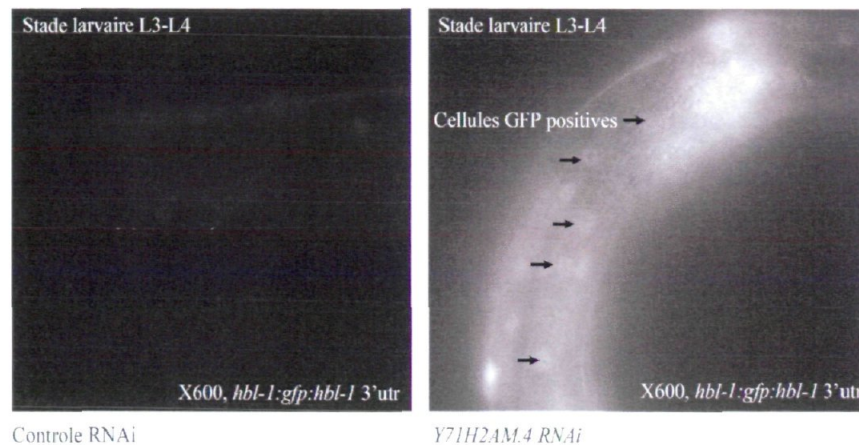


Figure 4-5 : La perte de fonction de Y71H2AM.4 abolit la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm rapporteur *hbl-1::gfp*.

L'image de gauche représente l'impact de l'activité post transcriptionnelle subi par l'ARNm rapporteur codant pour la protéine fluorescente GFP sous contrôle des microARNs de la famille *let-7*. Aucune expression de la GFP n'est identifiable durant la transition larvaire L3-L4. Par contre, les flèches noires de l'image de droite identifient les cellules *hyp-7* où l'expression de la GFP de l'ARNm rapporteur est décelable suite à la perte de fonction de Y71H2AM.4 au même stade larvaire.

(Exposition identique de 100 ms pour les deux photos)

4.4 Conclusion

En combinant la puissance des techniques d'interférence par l'ARN (RNAi) avec la puissance du modèle animal *C. elegans* comme outils génétiques, nous avons été en mesure d'évaluer génétiquement l'implication de 53 candidats dans la voie des microARNs. La mise à disposition récente de souches de nématode mutantes pour des gènes codant pour des microARNs a été déterminante pour l'efficacité de cette étude. En effet, la sensibilisation de ces souches pour des phénotypes caractéristique d'une perte de fonction de la voie des microARNs permet d'identifier des gènes n'affichant aucun phénotype dans

des conditions normales. De plus, les synergies observées permettent d'établir des interactions génétiques spécifiques et renforce ainsi l'outil de caractérisation.

Une discussion présentée dans le chapitre 5 à partir de la page 145 décrit notamment les perspectives envisagées pour renforcer ce système génétique de caractérisation ainsi que le développement d'un nouvel outil permettant d'adresser la contribution des candidats sur la fonction directe de la protéine Argonaute ALG-1. Finalement une brève partie décrit les possibles implications de certains des candidats obtenus basés sur la littérature scientifique actuelle.

4.5 Matériels et méthodes

4.5.1 Souches de nématode *C. elegans* utilisées

Les souches suivantes ont été fournies par le « Caenorhabditis Genetics Center (CGC) » :

MT7626: *let-7(n2853) X*

RB574 : *alg-2(ok304) II*

VC446 : *alg-1(gk214) X*

Les souches suivantes ont été fournies par le laboratoire du Dr Victor Ambros, (University of Massachusetts Medical School , Worcester MA)

VT944: *wIs78[ajm-1::gfp; scm-1::gfp; unc-119(+); F58E10(+)]*

VT1307: *lin-58(n4097) maIs105 V*

VT1064: *lin-58(n4097) maIs105 V; mir-84(n4037) X*

VT1296: *lin-58&mir-241(nDf51) maIs105 V*

BW1932: *ctIs39[hbl-1::gfp, pRF4(rol-6(su1006))]*

4.5.2 Synchronisation des différentes populations de *C. elegans*

Les différentes souches de vers sont cultivées sur des milieux solides de croissance NGM (Normal Growm Medium) dans des Pétris de 100mm de diamètre à la température choisie. Le protocole qui suit est adapté de Jannot et al. (Jannot et al., 2011). Une population représentative d'environ 30 000 vers adultes est ensuite traitée avec une solution

d'hypochlorite de soude (14mL d'H₂O, 4mL d'hypochlorite de soude 6%, 2mL de KOH 5M) permettant la dissolution des vers adultes et la préservation des œufs résistants. Les œufs ainsi obtenus sont incubés à température ambiante dans 10 ml d'une solution isotonique de type M9 sous agitation pendant 18h. Les larves fraîchement écloses et arrêtées au stade larvaire L1 sont dénombrées puis exposées à une source d'ARNdb pour induire une réponse RNAi.

4.5.3 Perte de fonction des candidats par génétique inverse (RNAi).

La méthode expérimentale de génétique inverse par nourriture repose sur le principe issu de Timmons et al. (Timmons et al., 2001). La séquence ciblant spécifiquement l'ARNm désiré est clonée à l'intérieur du site multiple de clonage du vecteur L4440 flanqué par les séquences reconnues par l'ARN polymérase ADN dépendante issue du phage T7. Le vecteur est ensuite transformé par choc thermique dans la souche bactérienne HT115 (DE3) exprimant l'ARN polymérase T7 suite à l'induction par l'IPTG. Les différents clones bactériens correspondant aux 53 candidats étudiés ont été gracieusement fournis par le Dr Labbé (Université de Montréal, Canada) à partir de la librairie du Dr Ahringer (Université de Cambridge, Angleterre) disponible chez Source Bioscience (<http://www.lifesciences.sourcebioscience.com>). Une colonie est mise à incuber dans 100 ml de milieu LB additionné d'ampicilline 18h à 37°C. Une goutte de la solution bactérienne est ensuite déposée sur un Pétri 30mm composé de milieu solide NGM et IPTG à concentration finale de 1mM. Les Pétris sont laissés reposer pour induction durant 48h à température ambiante puis 24h à 4°C. Entre 20 et 40 larves fraîchement écloses sont déposées puis laissées croître à température désirée. L'utilisation de la solution bactérienne comme unique source de nourriture va permettre l'internalisation de l'ARNdb produit et finalement la sous régulation de l'ARNm ciblé.

4.5.4 Microscopie

Les vers sont montés entre lame et lamelle sur une surface solide d'agarose à une concentration finale de 2% m/v. Les images sont collectées grâce à une caméra digitale Zeiss AxioCam HRm montée sur microscope Zeiss Axio Imager M1 à contraste

interférentiel (Image DIC, « **D**ifferential **I**nterference **C**ontrast » ou Nomarski) et les données analysé avec le logiciel Axiovision 4.6.

CHAPITRE 5

Argonaute pull-down and RISC analysis using 2'-O-methylated oligonucleotides affinity matrices

Guillaume Jannot¹, Alejandro Vasquez-Rifo¹ and Martin J. Simard¹

¹: Laval University Cancer Research Centre, Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), Quebec
City, Québec G1R 2J6, Canada

Correspondence to:

Martin J Simard, Tel: +418 525 4444 ext. 15185; Fax: +418 691 5439;

E-mail: martin.simard@crhdq.ulaval.ca

Key words: 2'-O - methyl oligonucleotides/ Argonaute/ Let-7 microRNA/ Affinity
chromatography/ TaqMan chemistry

Avant-Propos

L'article de méthode présenté dans le CHAPITRE 5 fait suite à l'initiative des Dr C.Hobman (Université d'Alberta) et Thomas Duchaines (Université McGill) d'éditer dans un seul et même livre les différentes techniques expérimentales permettant l'étude des protéines Argonautes *via* l'utilisation de divers modèles cellulaires et animaux.

Le manuscrit intitulé « Argonaute Proteins, Methods and protocols » est ainsi compartimenté en vingt chapitres décrivant d'une manière détaillée étape par étape le mode opératoire de vingt différentes techniques importantes pour étudier expérimentalement les rôles fonctionnels des protéines Argonautes (Les 20 techniques sont énumérées dans le Tableau 5-1). Notre chapitre décrit la manière de procéder pour isoler spécifiquement un complexe miRISC chez le nématode *C.elegans*.

- 1. Purification of Native Argonaute Complexes from the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*.**
Shane M. Buker and Mohammad R. Motamedi
- 2. Chromatin Immunoprecipitation in Fission Yeast.**
Thomas A. Volpe and Jessica DeMaio
- 3. Biochemical Analyses of Endogenous Argonaute Complexes Immunopurified with Anti-Argonaute Monoclonal Antibodies.**
Keita Miyoshi, Tomoko N. Okada, Haruhiko Siomi, and Mikiko C. Siomi
- 4. Mapping of Ago2–GW182 Functional Interactions**
Bing Yao, Songqing Li, Shang Li Lian, Marvin J. Fritzler, and Edward K.L. Chan
- 5. Continuous Density Gradients to Study Argonaute and GW182 Complexes Associated with the Endocytic Pathway.**
Derrick Gibbings
- 6. In Vitro RISC Cleavage Assay.**
Julia Stoehr and Gunter Meister
- 7. Native Gel Analysis for RISC Assembly .**
Tomoko Kawamata and Yukihide Tomari
- 8. Purification and Assembly of Human Argonaute, Dicer, and TRBP Complexes .**
Nabanita De and Ian J. MacRae
- 9. Detection of Human Dicer and Argonaute 2 Catalytic Activity .**
Marjorie P. Perron, Patricia Landry, Isabelle Plante, and Patrick Provost
- 10. Imaging the Cellular Dynamics of *Drosophila* Argonaute Proteins .**
Jing Li, Nima Najand, Wendy Long, and Andrew Simmonds
- 11. Live Cell Imaging of Argonaute Proteins in Mammalian Cells .**
Justin M. Pare, Joaquin Lopez-Orozco, and Tom C. Hobman
- 12. Reporter-Based Assays for Analyzing RNA Interference in Mammalian Cells .**
Lydia V. McClure, Gil Ju Seo, and Christopher S. Sullivan
- 13. Artificial Tethering of Argonaute Proteins for Studying their Role in Translational Repression of Target mRNAs .**
Stephanie Eckhardt, Emilia Szostak, Zhaolin Yang, and Ramesh Pillai
- 14. An Efficient System for Let-7 MicroRNA and GW182 Protein-Mediated Deadenylation In Vitro .**
Marc R. Fabian, Yuri V. Svitkin, and Nahum Sonenberg
- 15. Cell-Free microRNA-Mediated Translation Repression in *Caenorhabditis elegans*.**
Edlyn Wu and Thomas F. Duchaine
- 16. Argonaute Pull-Down and RISC Analysis Using 22-O –Methylated Oligonucleotides Affinity Matrices.**
Guillaume Jannot, Alejandro Vasquez-Rifo, and Martin J. Simard
- 17. Cloning Argonaute-Associated Small RNAs from *Caenorhabditis elegans*.**
Weifeng Gu, Julie M. Claycomb, Pedro J. Batista, Craig C. Mello, and Darryl Conte
- 18. Immunoprecipitation of piRNPs and Directional, Next Generation Sequencing of piRNAs.**
Yohei Kirino, Anastassios Vourekas, Eugene Khandros, and Zissimos Mourelatos
- 19. Generation of an Inducible Mouse ES Cell Lines Deficient for Argonaute Proteins.**
Hong Su and Xiaozhong Wang
- 20. Whole Cell Proteome Regulation by MicroRNAs Captured in a Pulsed SILAC Mass Spectrometry Approach.**
Olivia A. Ebner and Matthias Selbach

Tableau 5-1 : Techniques décrites dans le manuscrit « Argonaute Proteins, Methods and protocols »

Résumé

Durant les dernières années, de nombreux courts ARNs non codants impliqués dans divers processus biologiques ont été découverts. Le point commun à ces courts ARNs non codants réside dans leur liaison aux membres de la famille des protéines Argonaute, pour former un complexe effecteur appelé RISC pour RNA Induced Silencing Complex. Ce complexe cible spécifiquement par complémentarité de base un ARN messager pour induire soit un clivage, grâce à l'activité intrinsèque des protéines Argonaute, soit une extinction de la traduction par un mécanisme encore sous investigation. Dans ce chapitre, nous décrivons en détail une méthode de chromatographie d'affinité permettant la purification du microRNP let-7-RISC à partir d'extraits cellulaires du nématode *C.elegans*. Notre méthode exploite la spécificité de séquence du complexe RISC, *via* l'utilisation d'un oligonucléotide 2'-O-méthylé et biotinylé permettant de cibler puis purifier un court ARN et ses protéines associées. Cette technique est facilement adaptable pour d'autres types de courts ARNs mais également facilement transposable dans d'autres systèmes cellulaires. Cette méthode fournit une stratégie très utile pour isoler de nouveaux facteurs associés aux courts ARNs non codants et permet ainsi d'accroître nos connaissances sur la fonction de ces molécules.

Abstract

During the last decade several novel small non-coding RNA pathways have been unveiled, which reach out to many biological processes. Common to all these pathways is the binding of a small RNA molecule to a protein member of the Argonaute family, which forms a minimal core complex called the RNA Induced Silencing Complex or RISC. The RISC targets mRNAs in a sequence-specific manner, either to induce mRNA cleavage through the intrinsic activity of the Argonaute protein, or to abrogate protein synthesis by a mechanism that is still under investigation. We describe here, in details, a method for the affinity chromatography of the *let-7* RISC starting from extracts of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Our method exploits the sequence specificity of the RISC, and makes use of biotinylated and 2'-*O*-methylated oligonucleotides to trap and pull-down small RNAs and their associated proteins. Importantly, this technique may easily be adapted to target other small RNAs expressed in different cell types or model organisms. Such a method provides a useful strategy to identify the proteins associated with the RISC, and hence gain insight in the functions of small RNAs.

5.1 Introduction

RNA mediated gene silencing pathways can be triggered by either the introduction of exogenous double stranded RNA molecules (RNA *interference* or RNAi) or by the endogenous expression of microRNAs. They constitute two distinct pathways that lead to post-transcriptional down regulation of target messenger RNA (mRNA) and induce either the degradation of this message or the inhibition of protein synthesis. RNAi is commonly used in research laboratory as a simple, but powerful technique to knockdown the expression of specific genes. The microRNA pathway can be described as an endogenous process, which is conserved across many species, and is used to control cell homeostasis. It is estimated that 60% of human genes could be regulated by microRNA molecules and it is now becoming clear that the mis-expression of these small RNA molecules significantly contributes to the development of a large spectrum of human diseases. Moreover, the recent findings involving small RNA in the control of spermatogenesis and in the silencing of transposable elements in the germline highlight their role in an important diversity of developmental processes in animals (reviewed in(Stefani and Slack, 2008). Essential to all small RNA mediated gene regulation pathways is a ribonucleoprotein complex called RNA Induced Silencing Complex (RISC) composed of at least one 21-23 nucleotides long, single stranded RNA and a member of the Argonaute protein family (Hutvagner and Simard, 2008). The activity of the RISC on its target depends on the base-pairing between the small RNA and the mRNA. When pairing is perfect, the RISC mediates the mRNA cleavage through the endonuclease activity of the Argonaute protein. When the pairing is imperfect, the RISC prevents protein synthesis by a mechanism that is till unclear.

In 2004, Hutvagner, Simard, and colleagues reported that a modified antisense oligonucleotide is capable of binding to the RISC by base pairing with the small guide RNA and to block RISC-mediated gene regulation *in vivo* (Hutvágner et al., 2004). The replacement of the hydroxyl group by a methyl group, as shown in Figure 5-1 makes the oligonucleotide resistant to cellular ribonucleases (Inoue et al., 1987), and allows the sequence-specific purification of the RISC (see Figure 5-1). A biotinylated 2'-O-methylated oligonucleotide is bound to the RISC complex, and pull-down is performed

using streptavidin-coupled magnetic beads. This approach is useful to identify the proteins associated with small RNAs *in vivo*, as well as to characterize their molecular functions (for examples of utilization, see (Aoki et al., 2007; Fabian et al., 2009; Mayr et al., 2007; Yigit et al., 2006)).

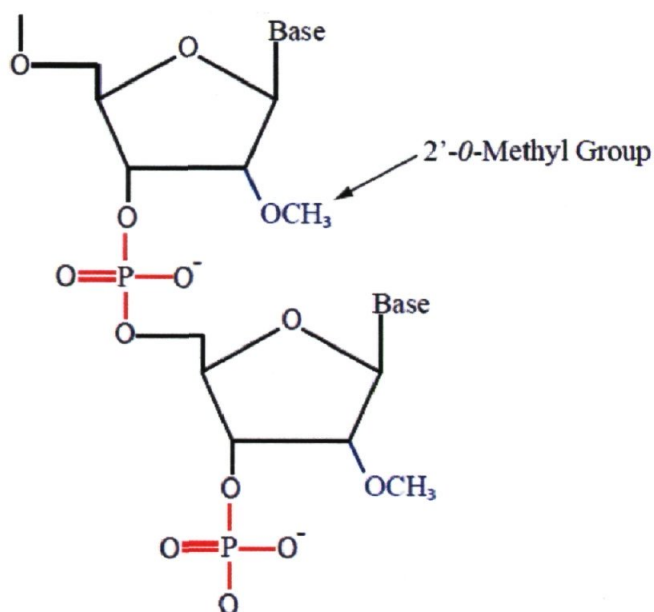


Figure 5-1 : Representative backbone of a single stranded 2'-*O*-methylated oligonucleotide.

Each hydrogen from 2' hydroxyl- groups was replaced by CH₃ (methyl) group. This modification confers a resistance for most RNase activities.

5.2 Materials

5.2.1 *C. elegans* culture and extract preparation

1. The wild-type *C. elegans* Bristol, N2 strain, was obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC, University of Minnesota, USA). The transgenic *C. elegans* strain expressing ALG-1 protein tagged in N-terminus with the Green Fluorescent Protein (GFP) was generated in the laboratory as previously described in (Hutvágner et al., 2004).
2. *E. coli* (OP50) in TB liquid culture, as a food source for *C. elegans*.

3. TB medium (1 L): 12 g bacto-peptone, 24 g bacto-yeast extract and 4 mL glycerol. Sterilize by autoclaving and cool down to $< 60^{\circ}\text{C}$. Add 100 mL of sterile 10X TB phosphates and store at room temperature (RT).
4. 10X TB phosphate (1 L): 23.1 g KH_2PO_4 , 125.4 g K_2HPO_4 . Sterilize by autoclaving. Store at RT.
5. Nematode Grown Medium (NGM) (1 L): 17 g agar, 3 g NaCl, 2.5 g bacto-peptone. Sterilize by autoclaving and cool down to $< 60^{\circ}\text{C}$. Add, 1 mL 1 M MgSO_4 , 1 mL 1M CaCl_2 , 1 mL cholesterol stock solution (5 mg/mL in ethanol), 25 mL PPB stock solution.
6. PPB stock solution (1 L): 98 g KH_2PO_4 and 48 g K_2HPO_4 . Dissolve the salts and complete to 1 L with deionized water. Sterilize by autoclaving. Store at room temperature (RT).
7. M9 Buffer (1 L): Dissolve 3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl, 1 mL 1 M MgSO_4 and complete to 1 L with deionized water. Sterilize by autoclaving. Store at RT.
8. Bleaching solution (20 mL): 2 mL of 5 M KOH, 3 mL of sodium hypochlorite, 15 mL of water (*see Note 1*)
9. Lysis buffer stock solution (1 L): 1 mL of 1 M KAc, 300 μL of 1 M HEPES-KOH pH 7.5, 20 μL of 1 M $\text{Mg}(\text{Ac})_2$. Sterilize by filtration. Store at 4°C .
10. Complete lysis buffer (10 mL): 9.40 mL lysis buffer stock solutions, 10 1 M μL DTT, 50 μL triton X-100, 1 tablet of protease inhibitors (Complete Mini EDTA-free, Roche). Add 2 % [v/v] of RNase inhibitor (SUPERaseIn, Ambion) when indicated.
11. Homogenizer: Wheaton dounce tissue grinders 1 mL (Fisher).

5.2.2 Immobilized 2'-O-methylated oligonucleotide matrices

1. 2'-O-methylated oligonucleotides were synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT). The modification is represented in Figure 5-2.

Unrelated oligo:

5'-Bio_mC_mA_mU_mC_mA_mC_mG_mU_mA_mC_mG_mC_mG_mG_mA_mA_mU_mA_mC_mU_mU_mC_mG_mA_mA_mA_mU_mG_mU_mC-3'; and *let-7* complementary microRNA oligo: 5'-Bio_mU_mC_mU_mU_mC_mA_mC_mU_mA_mU_mA_mC_mA_mA_mC_mC_mU_mA_mC_mU_mA_mC_mC_mU_mC_mA_mA_mC_mC_mU_mU-3' (*see Notes 2 to 5*).

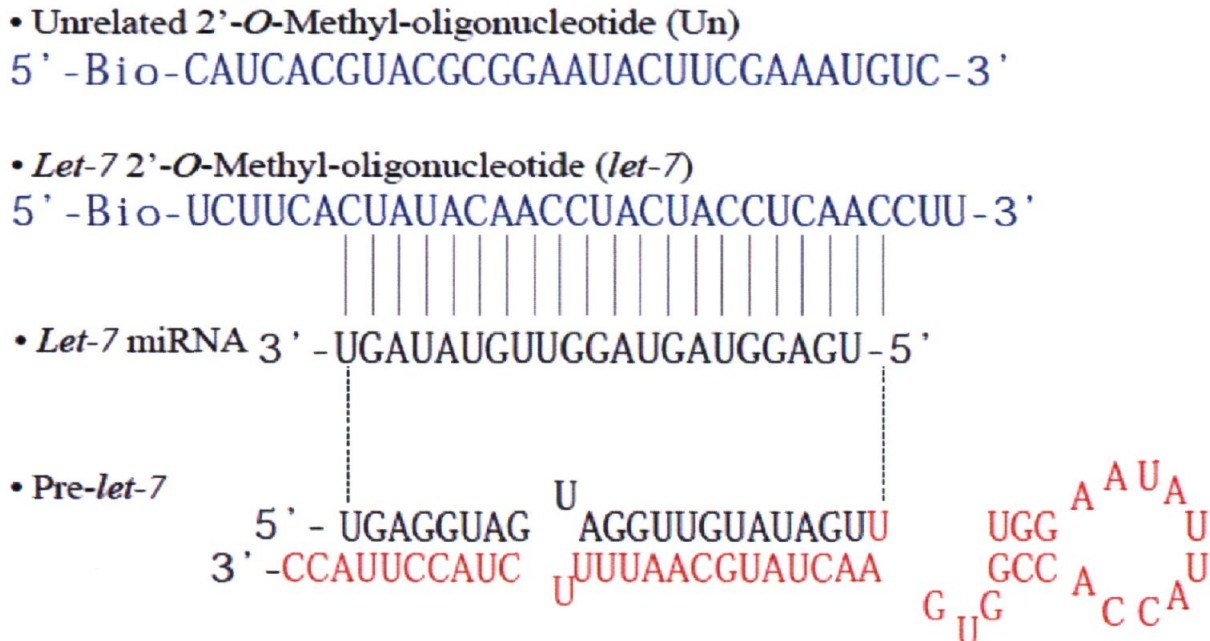


Figure 5-2: *Let-7* 2'-O-methylated oligonucleotides design. *Let-7* precursor microRNA is a substrate for the cleavage activity of Dicer to form mature *let-7* microRNA, which is fully complementary to 2'-O-methylated oligonucleotides used to pull-down *let-7* RISC complex.

2. Dynabeads M-280 streptavidin (Invitrogen): To pull-down the microRNA RISC complex the modified oligonucleotide is biotinylated at the 5' end and were coupled to magnetic beads through streptavidin monolayer attached to the surface of beads (*see Notes 6, 7*).
3. Dynal MPC-S (Invitrogen): We used a magnetic particle concentrator (referred as magnet) compatible with microcentrifuge tube (1.5 mL tube). Dynabeads are separated from the solution when the tube is inserted into the magnet and the magnetic slide is inserted. Bead-bound material is then attracted to the side of the tube.

5.2.3 SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).

1. Resolving buffer 4X (1 L): 182 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 4 g sodium dodecyl sulfate (SDS) in deionized water. Adjust pH to 8.8 with concentrated HCl. Sterilize by filtration. Store at RT.
2. Stacking buffer 4X (1 L): 60 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 4 g SDS in deionized water. Adjust pH to 6.8 with concentrated HCl. Sterilize by filtration. Store at RT.
3. Running buffer 10X (1 L): 30.3 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 144.1 g glycine, 10 g SDS in deionized water. Store at RT (*see Note 8*).
4. 29:1, 40% acrylamide/bis solution (J.T Baker).
(This is a neurotoxic reagent when unpolymerized, handle with care).
5. N,N,N,N'-TEtraMethyl-EthyleneDiamine (TEMED) (this is a corrosive and irritant reagent so handle with care).
5. Ammonium PerSulfate 10 % (APS) (10 mL): 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ in cold deionized water and freeze as 1 mL aliquots at -20°C .
6. Pre-stained molecular weight markers: Kaleidoscope marker (Bio-Rad).
7. Laemmli buffer 4X (20 mL): 4 mL 1 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane -HCl pH 6.8, 0.04 g bromophenol blue, 8 mL glycerol, 1.6 g SDS, 8 mL 1M Dithiothreitol (DTT).
Store at -20°C as 1 mL aliquots.
8. Ethanol 95%.

5.2.4 Western Blotting for Argonautes Associated to the RISC.

1. Transfer buffer (1.6 L): 5.86 g glycine, 11.64 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 0.75 g SDS. Store at RT.
2. Methanol.
3. Nitrocellulose Hybond-ECL membrane (Amersham) and Blotting pad (VWR).
4. TBS-T (1L): 6.05 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 8.76 g NaCl, 1 mL Tween-20. Adjust pH to 7.5 with concentrated HCl. Store at 4°C .

5. Blocking solution: 5 % [w/v] nonfat dry milk in TBS-T.
6. Primary antibody: anti-GFP antibody (Roche) diluted in TBS-T supplemented with 5 % [w/v] nonfat dry milk (*see Note 9*).
7. Secondary antibody: Peroxydase-conjugated Anti-mouse IgG (Roche) diluted in TBS-T supplemented with 5 % [w/v] nonfat dry milk.
8. Enhanced ChemiLuminescence (ECL) reagent (Perkin Elmer) and hyperfilm ECL (Amersham).

5.2.5 Total RNA extraction.

1. TRI-Reagent solution (Sigma).
(The TRI-Reagent solution contains phenol and guanidine thiocyanate, handle with care).
2. Chloroform (chloroform can be fatal if swallowed, inhaled or absorbed. Manipulate in a fume hood).
3. Isopropanol 75 % [v/v] and ethanol 75 % [v/v].
4. Freshly autoclaved deionized water.
5. 1.5 mL RNase-free tube.

5.2.6 Analysis of short RNA integrity by 12 % mini-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

1. SequaGel Sequencing System kit (National Diagnostic): i) SequaGel Concentrate (1 L: 37.5 g of acrylamide, 12.5 g of methylene bis-acrylamide, and 7.5 M urea in a deionized aqueous solution), ii) SequaGel Diluent (7.5 M urea in deionized water), and iii) SequaGel Buffer (0.89 M Tris-Borate-20 mM EDTA buffer pH 8.3 (10X TBE) and urea) (*see Note 10*).
2. TEMED.
3. Amonium PerSulfate 10 % (APS) (10 mL): 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ in cold water and freeze in 1 mL aliquots at -20°C .

4. Formamide-dye loading buffer: 98 % [w/v] deionized formamide, 10 mM EDTA pH 8, 0.025 % [w/v] xylene cyanol, 0.025 % [w/v] bromophenol blue.
5. TBE buffer 10X (1 L): 108 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane and 40 mL of 0.5 M Na₂EDTA, 55 g boric acid. Adjust to pH 8. Sterilize by autoclaving. Store at RT.
6. Ethidium bromide (EtBr) solution at 5 µg/mL (EtBr is a mutagenic agent, so handle with care).

5.2.7 Quantitative Real-Time PCR for *let-7* microRNA.

1. Real-Time PCR machine: 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems).
2. MicroAmp Fast optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems).
3. Optical adhesive covers (Applied Biosystems).
4. MicroRNAs Primers: We used TaqMan probes based chemistry. The primers were obtained from Applied Biosystems and correspond to mature *let-7* microRNA (Assay ID: 000377). We used the short nuclear RNA *sn2841* as an endogenous control (Assay ID: 001759).
5. Reverse Transcription Assays: TaqMan microRNA transcription kit (Applied Biosystems).
6. PCR reaction: TaqMan 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems).

5.3 Methods (see Note 11).

For this protocol, we took *let-7* microRNA-associated to ALG-1 RISC complex as an example to demonstrate the efficiency of the pull-down using 2'-O-methylated oligonucleotides affinity matrices. A transgenic *C. elegans* strain expressing ALG-1 protein tagged in N-terminus with the Green Fluorescent Protein (GFP) was used as described in (Hutvagner et al., 2004). An extract was generated using staged nematodes as starting material, a pull-down assay targeting *let-7* microRNA was performed, and the associated GFP::ALG-1 protein was detected by western blot. As a negative control, we used an unrelated 2'-O-methylated oligonucleotide that do not share base complementarity with any

known microRNA. To confirm *let-7* microRNA depletion, we quantified *let-7* in the recovered unbound fractions by quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR). We also verified the 5.8 and 5S RNA integrity by EtBr staining from total RNA preparations. Figure 5-3 summarizes the experimental procedure followed.

5.3.1 Preparation of agar NGM plate seeded with concentrated OP50.

1. Pour 20 mL of NGM medium in 15 cm diameter petri dishes aseptically, cover with the lids, and let them dry overnight.

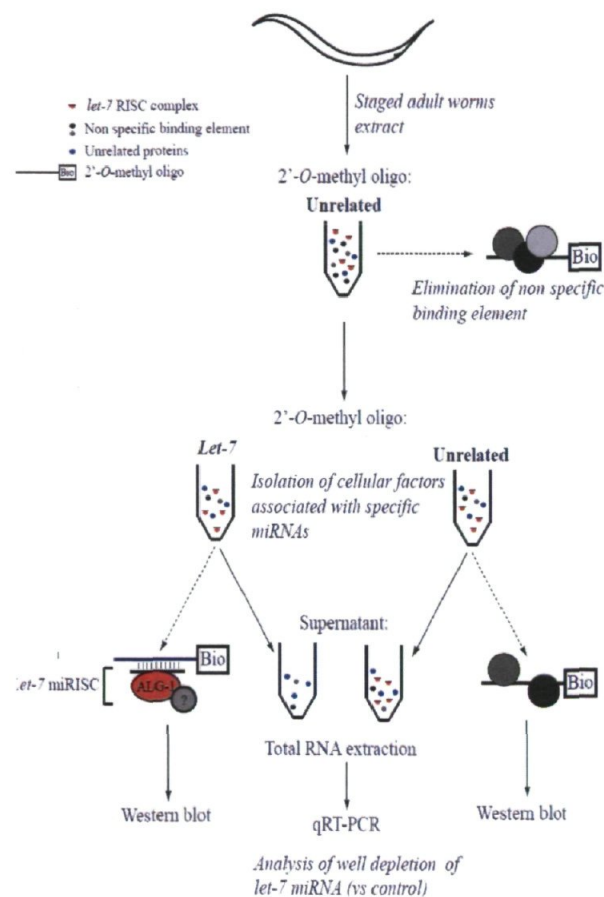


Figure 5-3 : Experimental procedure. This scheme provides an overview of the technical steps in this method: 1) Growing a population of staged *C. elegans*; 2) Extraction of animal proteins; 3) Pull-down of the *let-7* microRNA-associated RISC; 4) Detection of ALG-1 protein by western blot; 5) Analysis of the efficiency of this method by quantification of the level of *let-7* miRNA by qRT-PCR

3. Inoculate one colony of OP50 bacteria into 1 L of TB medium. Incubate 16 hours at 37°C under agitation.
4. Split the overnight culture in two sterile centrifuge bottles (700 mL) and spin for 30 minutes at 3,500 X g.
5. Resuspend the pellet with 20 mL of M9 and transfer into 50 mL Falcon tube.
6. Wash 3 times with sterile M9 and spin for 10 minutes at 4,500 X g.
7. Resuspend the pellet in 4 volumes of M9. Vortex vigorously to obtain a homogenized OP50 solution.
8. Dispense uniformly 3 mL of concentrated food on each plate, and let them dry in a sterile field with the lid open.
9. Store the seeded plates at 4°C for up to for several days.

5.3.2 Preparation of a synchronous *C. elegans* population.

All the following centrifugation steps are done at 2,800 X g for 30 seconds. Manipulation must be done in a sterile field (flame).

1. Starting plates must contain gravid hermaphrodites (bearing fertilized eggs). Transfer starved animals from three 35 mm plates to one large 150 mm plate. Transfer gravid adult population of *C. elegans* in a 15 mL sterile Falcon tube using the M9 solution.
2. Wash 3 times by successively transferring 10 mL of M9 and centrifuging to pellet the animals.
3. Remove the supernatants completely, and add 10 mL of freshly prepared bleaching solution.
4. Shake vigorously for 5 minutes and monitor the lysis of worm cuticles by observing the content of the tube under a stereomicroscope.
5. Once half of the worm cuticles are destroyed, centrifuge, remove the supernatant, and add 10 mL of fresh bleaching solution.
6. Shake vigorously. After an additional 1-2 minutes, most of the animals should be dissolved, leaving only the embryos (eggs) (see **Note 12**).

7. Centrifuge, remove the supernatant and wash the eggs 3 times with M9.
8. Let the eggs hatch in 10 mL of M9 at 20°C under gentle rotation overnight.
9. On the next day, estimate the number of newly hatched larvae (L1) by counting the amount of animals in 1 μ L aliquot of homogenous solution (repeat three times). Centrifuge the L1 animals, wash and resuspend them to obtain approximately 300 animals/ μ L in M9. Dispense 500 μ L (around 150,000 animals total) on a large OP50-seeded plate, and grow the animals at 20°C up to the young adult stage (around 50 hours).
10. Wash the *C. elegans* from the plate with sterile M9 and transfer the animals to a 15 mL Falcon tube.
11. Centrifuge and wash 3 times with M9. Resuspend in 10 mL of M9, and let the suspension rotate gently for 1 hour to completely eliminate the bacteria from the gut of the animals.
12. Centrifuge, eliminate the supernatant and freeze the pellet of young adults at -80°C until used.

5.3.3 Preparation of the crude *C. elegans* extract.

1. Thaw a pellet of 150,000 young adults at room temperature.
2. Wash the pellet 3 times with 3 volumes of complete lysis solution.
3. Add $\frac{1}{2}$ volume of complete lysis solution and transfer into a Wheaton Dounce Tissue grinder.
4. Grind for around 7 minutes on ice to and monitor the lysis efficiency under the microscope by transferring 2 μ L of extract on a glass slide. Continue until the worm cuticles are destroyed.
5. Transfer the lysate in a 1.5 mL tube and spin at 17,000 X g for 15 minutes at 4°C.
6. Transfer the supernatant to a fresh 1.5 mL tube on ice. This is the crude *C. elegans* extract.
7. Determine the protein concentration of the crude *C. elegans* extract using one of the standard colorimetric assays, such as Lowry, Biuret or Bradford (about 10 mg of total proteins should be obtained from 150,000 young adults animals).

5.3.4 *Let-7* microRNA pull-down and RISC analysis using 2'-*O*-methylated oligonucleotide affinity matrices (see Note 13).

1. Resuspend the magnetic beads from the stock tube by pipetting up and down 20 times.
2. Transfer 60 μL of homogenized bead suspension in a 1.5 mL tube, place the tube into the magnet for 1 minute, and discard the supernatant (see Note 14). The beads are washed twice with four volumes of lysis solution containing 2% [v/v] RNase inhibitor.
3. Add 120 μL of the biotinylated unrelated 2'-*O*-methyl oligonucleotide at 1 μM concentration. Incubate for 45 minutes at RT with gentle rotation (see Note 15). Place the tube in a magnet for 1 minute and discard the supernatant.
4. Wash the coated beads twice in stock lysis solution with 2 % [v/v] RNase inhibitor.
5. Place the tube in the magnet for 1 minute and discard the supernatant.
6. Dilute the quantified crude *C. elegans* extract to a working solution of 13.3 mg/mL.
7. Transfer 300 μL of crude *C. elegans* extract at 13.3 mg/mL (4 mg of protein) in a 1.5 mL tube containing the unrelated 2'-*O*-methylated oligonucleotide bound to the beads.
8. Incubate at RT with gentle rotation for 45 minutes. During this incubation prepare the *let-7*-complementary and the unrelated matrix (see Note 16).
9. 30 μL of each bead suspensions are transferred in two separate 1.5 mL tubes. Wash the beads, and coat with 60 μL of either the unrelated or the *let-7* complementary 2'-*O*-methylated oligonucleotides for 45 minutes at RT, as described in steps 2 to 5. Keep the coated beads on ice until used. Discard the buffer just before starting step 10.
10. Once the incubation time of the extract is over (Step 8), place the tube on the magnet for 1-2 minutes and transfer half of the cleared supernatant either to the unrelated or the *let-7* coated beads (Step 9). Incubate at room temperature with gentle rotation for 45 minutes (see Note 17).
11. Place the tubes on the magnet for 1-2 minutes, transfer the supernatants to new 1.5 mL tubes. Keep the supernatants on ice until total RNA extraction and qRT-PCR analysis.
12. Wash the beads twice with 3 volumes of stock lysis solution containing 2% [v/v] of RNase inhibitor.
13. Resuspend the beads in Laemmli 2 X loading buffer and boil them 10 minutes before loading on 8% SDS-PAGE electrophoresis (see section 3.5). As input control, load 100 μg

of total proteins from the *crude C. elegans* extract resuspended and boiled in Laemmli 2 X loading buffer .

5.3.5 SDS-PAGE (8%) electrophoresis.

1. The SDS-PAGE electrophoresis is performed with the “Mini-PROTEAN Tetra Cell” system (Bio-Rad). Ensure that the glasses plates used are clean. Before utilization, it is recommended to wash them with detergent first, then with ethanol 95 %, and finally to let them dry completely.
2. Prepare a 1.5 mm thick, 8 % gel by mixing 2.5 mL of 4X resolving buffer with 2 mL of 40 % acrylamide/bis-acrylamide solution, 5 mL of water, 100 μ L of APS 10 % and 10 μ L of TEMED. Pour the gel while leaving space for the stacking gel (around 1 to 2 cm) and overlay with 95% ethanol. Let the gel polymerize for 30 minutes.
3. Discard the layer of ethanol 95% on the gel.
4. Prepare a 6 % stacking gel by mixing 1.25 mL of 4 X stacking buffer with 750 μ L of 40 % acrylamide/bis-acrylamide solution, 2.9 mL of water, 50 μ L of APS 10 %, and 5 μ L of TEMED. Pour the stacking gel, and insert the comb. Let the stacking gel polymerize for 30 minutes.
5. Prepare the running buffer by dissolving 100 mL of 10X stock solution with 900 mL of water.
6. Once the stacking gel is polymerized, transfer the gel assembly in the tank and fill with running buffer.
7. Remove the comb carefully and wash the wells with running buffer using a 10 mL syringe fitted with a 22-gauge needle.
8. Boil your samples for 1 minute, spin 30 seconds at 17,000 X *g* and load the total sample in the wells. Load one well with a prestained molecular weight marker (*see Note 18*).
9. Connect the gel chamber to a power supply (PowerPac Basic, Biorad) and run at 160 Volts for 1h30, or until the blue dye front runs off the gel.

5.3.6 Western Blotting for ALG-1 protein.

1. The samples that are resolved by SDS-PAGE are transferred using a semi-dry transfer apparatus (Trans-Blot SD semi-dry Transfer cell, Biorad).
2. Prepare working transfer buffer solution (setup buffer) by mixing 200 mL of transfer buffer with 50 mL of methanol.
3. Carefully remove the gel from the glass plate assembly and put the gel in a clean dish containing 50 mL of setup buffer.
4. Cut a sheet of nitrocellulose membrane and two blotting pads of slightly larger dimensions than the size of the separating gel, and soak in the setup buffer.
5. Prepare a sandwich assembly with one wet blotting pad covered with the nitrocellulose membrane. Carefully transfer the resolving gel on the top of the membrane and cover with a second soaked blotting pad. Ensure that no bubbles are trapped in the resulting sandwich by gently rolling a 15 mL Falcon tube on the top of the assembly.
6. Connect to a power supply and run at 15 Volts for 50 minutes.
7. Once the transfer is complete, disassemble the sandwich and wash the nitrocellulose membrane with TBS-T.
8. Incubate the membrane in 25 mL of TBS-T containing 5% [w/v] dry milk for 1 hour at RT with gentle agitation.
9. Discard the blocking buffer, and incubate the membrane with a 1:3000 dilution of the anti-GFP antibody in TBS-T containing 5% [w/v] dry milk overnight at 4°C on a rocking platform.
10. Remove the primary antibody solution and wash the membrane 3 times with TBS-T for 10 minutes each.
11. The secondary antibody, an HRP-coupled anti-mouse, is diluted at 1:10000 in TBS-T and added to the membrane for 45 minutes at room temperature on a rocking platform.
12. Remove the secondary antibody, and wash the membrane 3 times for 10 minutes each with TBS-T.
13. Mix equal volumes of ECL reagent (2 mL each) and keep the mixture at room temperature until used.
14. Cut out two clean acetate sheets with dimensions just larger than the size of the nitrocellulose membrane.

15. Fix a laboratory film (Parafilm) on the working bench and place the 4 ml of mixed ECL reagent on the top.
16. Transfer the membrane protein up side down on the ECL drop, and incubate for 1 minute.
17. Put the membrane side up on the clean acetate sheet, and place the other acetate sheet over membrane and smooth out air bubbles.
18. Place the membrane sandwiched between acetate sheets protector, into an autoradiography cassette and head to the dark room with X-ray films for developing.
19. In the dark room, place the film in an autoradiography cassette for a suitable exposure time, (1-2 minutes for GFP::ALG-1 in our experiment). An example of the result is shown in Figure 5-4.

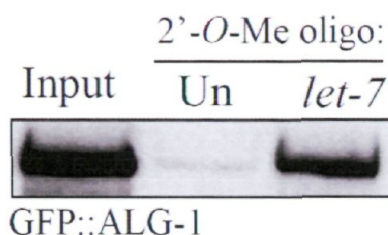


Figure 5-4 : Western blot analysis of the GFP-tagged ALG-1 protein associated with *let-7* microRNA. The input represents 100 μ g of total protein. Each matrix (unrelated or *let-7* biotinylated 2'-O-methylated oligonucleotides) was mixed with 2 mg of protein and pull-down was conducted using Dynabeads coupled to streptavidin. ALG-1 was detected only with *let-7* complementary 2'-O-methylated oligonucleotides, demonstrating the specificity of the experiment

5.3.7 Total RNA extraction

1. Add three volumes of Tri-Reagent in 1.5 mL tubes containing either 2 mg of protein from the input *crude C. elegans* extract, or the supernatant (unbound) samples recovered from the unrelated and the *let-7* matrices, and vortex for 30 seconds.
2. Add one volume of chloroform, vortex for 10 seconds and allow to stand at RT for 3 minutes.

3. Centrifuge the tubes at 13,000 X *g* for 15 minutes at 4°C.
4. Remove the top aqueous layer and transfer to a fresh 1.5 mL RNase free tube (do not disturb or retrieve the interphase).
5. Add an equal volume of isopropanol, mix well and incubate at RT for 10 minutes.
6. Centrifuge at 13,000 X *g* for 15 minutes at 4°C.
7. Discard the supernatant and wash the RNA pellet carefully with 300 µL of ethanol 75%.
8. Spin at 7,500 X *g* for 5 minutes at 4°C.
9. Discard the supernatant, air dry the RNA pellet with the open cap at RT for 5-10 minutes.
10. Dissolve the pellet in deionized, autoclaved water (around 100-200µL). To dissolve the pellet heat at 65°C for 10 minutes and homogenize the RNA solution by pipetting up and down.
11. The concentration of the purified RNA is determined by measuring the absorbance at 260 *nm* in a spectrophotometer.
12. Monitor the short RNA quality by running 15 µg of total RNA on 12 % mini-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (see section 3.8).

5.3.8 Preparation of 12 % Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

1. The 12 % mini-PAGE is performed with the same clean material used for SDS-PAGE assembly.
2. Prepare a 1.5 mm thick, 12% mini-PAGE gel by mixing 4.8 mL of SequaGel concentrate, 4.2 mL of SequaGel Diluent, 1 mL of SequaGel buffer, 80 µL of APS 10 % and 4 µL of TEMED. Pour the gel and insert the comb. Let the gel polymerize for 1 hour.
3. Carefully remove the comb and pre-run the gel for 30 minutes at 150 Volts in 0.5X TBE before loading the samples.
4. While pre-running, prepare the RNA samples. Add ½ volume of formamide-dye loading buffer with 15 µg of total RNA.
5. Heat the RNA samples at 65°C for 15 minutes.
6. Once the pre-run is complete, wash the wells with 0.5X TBE buffer using a 10-mL syringe fitted with a 22-gauge needle.

7. Load the warm samples and run at 150 Volts until the bromophenol blue dye is at the bottom.
8. After completion of the run, allow the plates to cool 10-15 minutes before separation.
9. Carefully remove the gel from the glass plate assembly and put it in clean dish containing 50 mL of 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ EtBr diluted in 0.5X TBE. Incubate for 15 minutes with gentle shaking.
10. Discard the EtBr solution and wash the membrane with 0.5X TBE.
11. Take a picture of the stained gel with a UV transilluminator to record EtBr-stained RNA fluorescence. The result is shown in Figure 5-5.

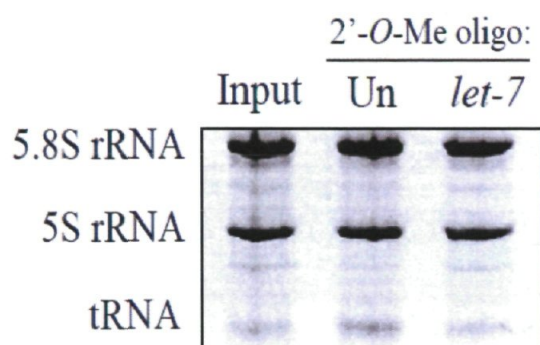


Figure 5-5 : Assessment of the integrity of the 5.8S, and 5S rRNAs.
Discrete bands are visible, demonstrating the integrity of the short RNA preparations.

5.3.9 Quantitative Real Time PCR for *let-7* microRNA.

1. Dilute the total RNA samples in water to obtain a 2 ng/ μL solution.
2. Perform reverse transcription reaction to convert specific microRNAs to complementary DNA with the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (RT) kit, using either *let-7* microRNA-specific primer or the *sn2841* short RNA primer as an endogenous control. We use 10 ng of total RNA per reaction.
3. Perform Quantitative RT-PCR analyses of *let-7*, and *sn284* with TaqMan microRNA Assays kit following manufacturer procedures.

4. Data analysis was performed using the comparative C_t method using the endogenous control to normalize the level of microRNA.
5. The result is shown in Figure 5-6.

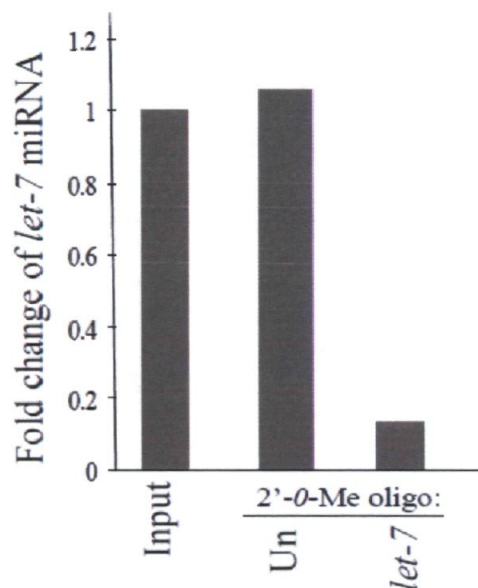


Figure 5-6 : qRT-PCR results. qRT-PCR analysis of *let-7* from either unrelated or *let-7* complementary matrices unbound fractions demonstrates the efficiency, and the specificity of the affinity chromatography. Almost 90 % of the mature *let-7* has been pull-down in this experiment.

5.4 Notes

1. Be aware that sodium hypochlorite get less effective with time. Volume can be changed from 2 to 5 mL to obtain a complete lysis of *C. elegans* cuticles.
2. Biotinylated 2'-*O*-methylated oligonucleotides can be designed to pull-down any small RNA-specific complex. The nucleotide sequences must be fully complementary to the

chosen small RNA, and five extra nucleotides are added on each side of the complementary region to increase the stability of the small RNA complex-oligonucleotide association and the efficiency of the pull-down.

3. Ensure that the RNA molecule has been purified by HPLC techniques.
4. Upon reception of the synthesized modified RNA oligonucleotides, aliquot at 100 μ M in deionized, freshly autoclaved water (use RNase free tubes). Store aliquots at -20°C.
5. 2'-*O*-methylated oligonucleotides are stable in water solution at 4 °C for up to 2 weeks, and stable for at least 6 months if stored at -20°C. Dried oligos stored at -20°C in a nuclease-free environment should be stable for several years.
6. It is very important to store the vial containing beads upright to keep them in liquid suspension. The performance will decrease if the beads air dry. Do not freeze.
7. Dynabeads are not supplied in RNase-free solutions, it is very important to use buffer containing nuclease inhibitors during the binding and washing steps.
8. Running buffer can be used for up to 2 runs if it is cooled down at room temperature between successive runs.
9. The same primary antibody diluted in TBS-T and supplemented with dry milk can be re-used two or three times. This solution can be stored at 4°C for several days or at -20°C for 2-3 weeks.
10. As urea may precipitate if these solutions are refrigerated, the solution should be stored in a tightly capped container and in a dark area at room temperature. However, the urea can be rapidly redissolved when warmed to room temperature.
11. For this protocol manuscript, we used the nematode *Caenorhabditis elegans* as a biological sample. The RISC pull-down assay using 2'-*O*-methylated oligonucleotides as affinity matrices can easily be applied to any other biological samples. The binding of RNA molecules to the beads should be optimized for a lysis buffer adequate for the specific biological sample used.
12. Do not allow the reaction to proceed for longer than 3 minutes as this will result in death of the embryos.
13. For better results and to avoid the microRNA/RISC/protein degradation, the pull-down assay should be performed, if possible, directly after the crude *C. elegans* extract is prepared.

14. We used 30 μL of suspension solution containing 10 mg/mL of beads for 2 mg of protein extract.
15. The binding capacities of beads are around to 200 pmol of RNA molecule for 1 mg of beads. 30 μL of suspension solution correspond to 300 μg of beads, so 60 pmol of 2'-*O*-methylated oligonucleotide molecules are necessary for the binding. This explains why the oligonucleotide solution is diluted to 1 pmol/ μL (1 μM final).
16. Some proteins can interact through stronger interactions than others with the matrix. To limit non-specific binding you may increase the quantity of beads bound to the unrelated oligo in the first step (clearing step) or repeat this step two or three times.
17. If the cell extract is too viscous, some beads may not be separated from the suspension by the magnet. To circumvent this problem, centrifugation may be used to pellet the beads.
18. Sometimes, a small amount of beads are loaded on the gel, along with the samples. This does not prevent the proper running process.

5.5 Acknowledgments

We are grateful to the members of our laboratory for comments on this methods manuscript. Nematode strain, N2 was provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by the NIH National Center for Research Resources (NCRR). Our research is funded work by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Cancer Research Society. M.J.S. is a CIHR New Investigator.

CHAPITRE 6

Discussion

Les microARNs permettent d'orchestrer finement le niveau d'expression des ARNs messagers en modulant négativement le niveau de production des protéines. Ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle, qui semble être impliqué pour presque la moitié des ARNs messagers, est formidablement conservé à travers les espèces et met en jeu une mécanistique complexe dont les protéines de la famille Argonautes en sont les acteurs majeurs. Cette famille de protéines va être associée également à des voies de régulation parallèles mettant en œuvre d'autres types d'ARNs non codant, dont font partie les siARNs. Cette dernière voie correspond à un véritable cadeau de la cellule pour nous, scientifiques, dont la démarche expérimentale d'abolir un gène pour en étudier le phénotype est incontournable pour nous renseigner sur sa fonction. Ainsi, l'introduction expérimentale d'une séquence d'ARN double brin va permettre de générer une molécule d'ARN simple brin capable d'aller cibler un ARNm spécifique et d'en inhiber sa fonction. Ce système, mis en place par la cellule, correspond en fait à un mécanisme de défense du génome, par lequel la voie des siARNs surveille et détruit des séquences nucléiques double brin d'origine endogène, comme les transposons, ou exogène, souvent associé à de l'ARN viral. Par conséquent, les processus mis en place par la voie du RNAi et celle des microARNs nécessitent des caractéristiques fonctionnelles distinctes des protéines Argonautes, mais aussi leur partition adéquate pour engager un mode de régulation correct. Notre première démarche pour la compréhension de la voie des microARNs fut de découvrir par quelles caractéristiques les protéines Argonautes étaient partitionnées entre la voie des microARNs et la voie des siARNs chez le nématode *C. elegans*.

- **Sélection des protéines Argonautes : Structure de l'ARN et caractéristiques propres aux Argonautes**

Chez *C.elegans* les voies des siARNs et des microARNs convergent vers la même protéine Dicer responsable de la formation des duplexes de 21-23 nucléotides, puis divergent dans leurs voies respectives. Les siARNs et microARNs vont alors être associés aux protéines Argonautes RDE-1, et ALG-1 et ALG-2 (noté ALGs) respectivement. Chacune de ces protéines ne peut compenser la perte de fonction de l'autre, en effet une souche de vers *rde-1* mutante n'affiche aucun phénotype visible, et la voie des microARNs reste fonctionnelle. De la même manière, le processus de RNAi est conservé dans une souche affichant une perte de fonction des protéines ALGs. Une raison de cette disparité pourrait être la nature de la source d'ARNdb reconnue par des facteurs spécifiques capables d'orienter dans la bonne voie de régulation les protéines Argonautes. En effet, le microARN est généré suite à la maturation d'un ARNdb sous forme d'une structure caractéristique en tige boucle avec des mésappariements, alors que les siARNs proviennent de molécules d'ARNdb parfaitement complémentaires.

Les résultats présentés dans le chapitre 2 supportent cette hypothèse et démontrent également qu'il existe un deuxième niveau de sélection (ou d'exclusion) d'une voie par rapport à l'autre.

Pour ce faire, nous avons construit deux courtes molécules d'ARNdb symétriques composées de deux parties distinctes de 19 paires de bases, chacune arborant deux nucléotides flottants aux extrémités 3'hydroxyle capables d'entrer respectivement dans la voie des microARNs et du RNAi (Figure 6-1 et Figure 6-2). Nous avons observé que suite à l'injection de ces molécules dans des souches mutantes pour *rde-1* ou *algs*, chacune des réponses d'interférence par l'ARN (miARN ou RNAi) était dépendante de leur protéine Argonaute respective. Ainsi, la protéine RDE-1, liée à la séquence du microARN suite à la maturation de la molécule injectée (noté par la suite complexe miARN/RDE-1), ne peut compenser la perte de fonction d'*alg-1* et *alg-2*. L'inverse est aussi observé avec les protéines ALGs qui ne peuvent assurer une réponse de type RNAi dans une souche mutante pour *rde-1*, même en étant associées aux siARNs (noté par la suite complexe siARN/ALGs). Cette observation signifie donc qu'il existe une spécificité exclusive de ces

protéines Argonautes durant la phase effectrice permettant d'exclure l'activité biologique de l'une par rapport l'autre.

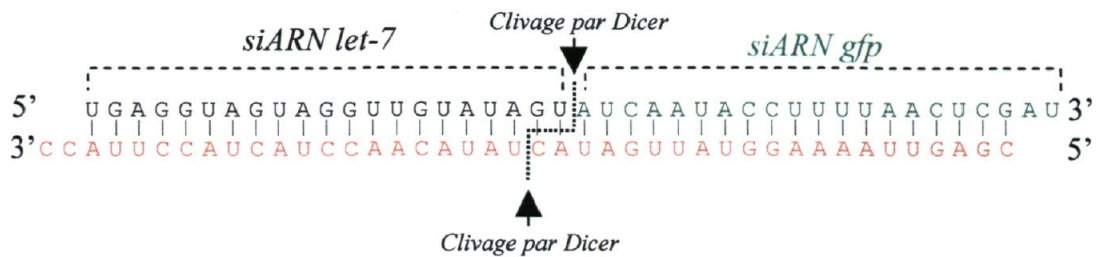


Figure 6-1 : Molécule d'ARNdb 100% complémentaire introduite par micro-injection dans le nématode *C. elegans*.

Cette molécule d'ARNdb parfaitement complémentaire a été dessinée de manière à être un substrat de clivage pour la protéine Dicer. Une fois clivée, elle génère un siARN ciblant de façon dépendante de RDE-1 l'ARNm codant pour la GFP, et un siARN mimant la séquence du microARN *let-7* engagé dans la voie des microARNs nécessitant les protéines ALG-1 et ALG-2.

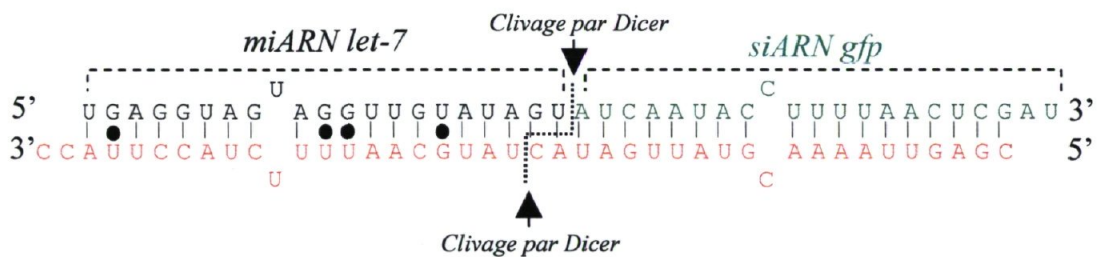


Figure 6-2 : Molécule d'ARNdb introduite par micro-injection dans le nématode *C. elegans*

La molécule d'ARNdb avec mésappariements a été dessinée de manière à être un substrat de clivage pour la protéine Dicer. Les mésappariements ont été introduits à la position 11 de chaque brin pour reproduire fidèlement la tige d'ARNdb contenue dans le précurseur du microARN *let-7*. Les ronds noirs représentent les appariements bancals (woobles) entre une guanine et une uridine retrouvés dans la tige du précurseur de *let-7*.

- **Quelles caractéristiques permettent la spécificité des protéines Argonautes ALGs et RDE-1 durant la phase effectrice ?**

Le niveau de complémentarité d'appariement entre le court ARNnc et son ARNm cible est un déterminant du mode d'action du RISC. Une complémentarité partielle du miARN permet un mode de régulation indépendant de l'activité catalytique de clivage incluant l'inhibition de la traduction. A l'inverse, l'appariement parfait du siARN avec sa cible favorise une régulation dépendante du clivage, comme observé pour DmAgo2 et HsAgo2.

Cependant, d'après nos résultats, cette caractéristique semble ne pas être l'unique déterminant. En effet, dans l'hypothèse où le complexe siARN/ALGs est capable de s'associer à la partie codante de l'ARNm ciblé, son activité de clivage ne semble toutefois pas suffisante pour initier une répression. Cette insuffisance peut être le reflet d'une faible activité catalytique comme observé avec DmAgo1 (microARN) qui affiche une capacité de clivage quarante fois inférieure à celle de DmAgo2 (siARN) (Tomari et al., 2007). Alors que la base moléculaire de cette différence enzymatique demeure inconnue, les auteurs postulent sur l'existence d'un réarrangement conformationnel plus lent du site actif de la protéine Argonaute DmAgo1 affectant la vitesse de clivage de l'ARNm. Cependant, il a été montré *in vitro* que le site de clivage de la protéine ALG-1 était catalytiquement actif aussi bien lors de la maturation d'un duplex de 21-23 nucléotides préformé que sur un ARN cible (Bouasker, 2012). Comment alors expliquer qu'ALG-1 ne soit pas capable de générer une réponse RNAi *in vivo* étant donné son habilité de clivage *in vitro* ?

Chez *C. elegans* l'extinction de l'ARNm par RNAi se fait par un processus complexe qui implique un mécanisme d'amplification du signal suite à la liaison du siARN avec l'ARNm. Cette amplification nécessite des ARN polymérases ARN dépendante capable de générer un brin antisens de l'ARNm (Sijen et al., 2001). Une seconde équipe de siARNs qui dérive de l'action des ARN polymérases est ensuite pris en charge par une série de protéines Argonautes secondaire pour maintenir la réponse RNAi (Yigit et al., 2006). La contribution exacte de l'activité de clivage de RDE-1 dans l'initiation du processus de RNAi reste encore à déterminer. Cependant, Steiner et al (Steiner et al., 2007) ont montré que cette activité était requise pour la maturation du duplex de siARN, puis dispensable pour la phase effectrice. Alors que la caractérisation biochimique de ces données doivent être validées, ceci supporte un mécanisme de répression indépendant du clivage et nécessite donc une contribution de partenaires spécifiques. Ainsi, la spécificité entre RDE-1 et les protéines ALGs pourrait provenir du recrutement de facteurs associés à cette machinerie d'amplification comme l'ARN polymérase RRF-1.

Comme mentionné dans l'introduction, il existe une étroite collaboration entre la machinerie de régulation par les microARNs et l'environnement de la région 3' non traduite de l'ARNm ciblé. Ainsi, la présence d'un site de microARN se retrouvant dans la partie

codante d'un ARNm génère une très faible efficacité de régulation (Bartel, 2009). Cette caractéristique peut expliquer l'absence de répression par le complexe siARN/ALGs une fois associé avec la région codante de l'ARNm ciblé. D'autre part, la dynamique des polysomes sur un ARNm en cours de traduction pourrait interférer avec la cinétique de clivage ou d'inhibition de la traduction du complexe siARN/ALGs et entraîner sa dissociation rapide de l'ARNm. Des données obtenues par Samir Bouasker dans le laboratoire supportent cette hypothèse puisque elles démontrent une différence entre RDE-1 et ALG-1 dans leur capacité de clivage *in vitro* (données non publiées).

Une deuxième hypothèse pour expliquer l'inefficacité du complexe siARN/ALGs pour éteindre l'expression de l'ARNm cible provient de son incapacité à lier la région codante pour s'y appaier. En effet, les protéines Argonautes impliquées dans la voie des microARNs sont associées avec la partie 3' non traduite des ARNm. L'interaction physique d'ALG-1 avec AIN-1 (GW182) permet la liaison de ce complexe avec la protéine PABP et pourrait empêcher sa liaison avec la séquence codante (Kuzuoglu-Ozturk et al., 2012). De cette manière, l'absence de cette interaction par appariement de bases entre le siARN et l'ARNm favoriserait une instabilité du complexe siARN/ALGs suivi d'une dissociation de celui-ci. Finalement, chez la drosophile uniquement, Ago1 (miARN) comparé à Ago2 (siARN) conserve la capacité d'interaction avec GW182 (Behm-Ansmant et al., 2006; Eulalio et al., 2008). Cette sélectivité pourrait se refléter chez le nématode également avec une liaison unique entre les protéines ALGs et AIN-1. Ceci expliquerait pourquoi le complexe miARN/RDE-1 ne soit pas capable de compenser la perte de fonction des protéines ALGs pour restituer la perte de fonction du microARN *let-7*.

- **Comment expliquer le caractère sélectif de la structure du duplexe d'ARN dans le choix des protéines Argonautes ?**

Dans les Figure 2-1 et Figure 2-2 nous avons montré génétiquement que la maturation par Dicer de la molécule parfaitement complémentaire nécessitait RDE-4 pour s'engager dans la voie du RNAi, et de façon surprenante dans la voie des microARNs également. Cependant, l'utilisation d'une molécule d'ARNdb mésappariée favorise uniquement la voie des microARNs de façon indépendante de RDE-4. Ces différences de contribution de la

protéine RDE-4 peuvent expliquer ces observations. L'analyse extensive des protéines DmAgo1 et DmAgo2 chez la drosophile permet d'adresser certaines hypothèses suite à nos observations. En effet, deux complexes distincts produisent les siARNs et microARNs (Lee et al., 2004b) chez la drosophile. Les pré-microARNs sont générés par Dicer-1 (Dcr1) accompagné de son partenaire Loquacious (Loqs) (Forstemann et al., 2007; Forstemann et al., 2005), alors que les siARNs sont produits grâce à Dicer-2 (Dcr2) et de son partenaire R2D2 (Liu et al., 2003). Il a été montré que l'affinité de liaison de R2D2 corrélait directement avec la structure du duplexe d'ARN. Ainsi, un mésappariement central diminuait grandement la formation du complexe Ago2/R2D2 en faveur de Ago1/Loqs (Tomari et al., 2007). Le rôle de la protéine de liaison à l'ARN R2D2 peut être attribuable également à son homologue RDE-4 retrouvé chez *C. elegans*, qui est indispensable pour lier les molécules d'ARN double brin et permettre à Dicer de générer les duplexes de siARNs pour permettre la voie du RNAi (Tabara et al., 2002). La discrimination de RDE-4 pour la molécule mésappariée peu s'expliquer par sa constante de dissociation qui est d'autant plus élevée qu'une molécule d'ARNdb est petite (Parker et al., 2006). Il est donc fortement possible que la contrainte structurale proposée par les mésappariements contenus dans la molécule de 40 paires de bases génère une dissociation rapide de RDE-4 ne permettant pas l'activité de clivage par Dicer. La voie du RNAi ne peut donc être initiée et la voie des microARNs dépendante des protéines ALGs est favorisée.

A ce jour, nous ne savons pas s'il existe des complexes différents contenant la protéine Dicer chez le nématode permettant de cibler spécifiquement la voie du RNAi ou des microARNs comme chez la drosophile. L'activité fonctionnelle des microARNs durant le développement larvaire étant probablement plus actif que la régulation par RNAi dépendante de RDE-1, il est tentant de penser que les protéines Argonautes ALGs sont majoritairement associées à Dicer. Une façon pour détourner ce complexe lors de la présence d'ARNdb exogène pourrait provenir de RDE-4 qui de par son affinité avec les longues molécules d'ARNdb engagerait Dicer dans la voie du RNAi. La faible affinité de RDE-4 pour les structures mésappariées permettrait d'éviter de lier abusivement les formes précurseurs de microARNs et d'empêcher leur association avec la voie des microARNs qui

serait néfaste pour la régulation de la cellule. Récemment, il a été montré qu'un microARN peu commun, miR-243, était associé avec RDE-1 à défaut d'ALGs. De façon surprenante, ce microARN possède une tige atypique avec un seul appariement central et sa séquence mature de 23 nucléotides lie de façon parfaitement complémentaire la région 3' non codante du gène Y47H10.5 pour permettre son extinction par la voie du RNAi (Correa et al., 2010). Il aurait été intéressant d'évaluer la contribution de RDE-4 dans l'initiation de la réponse RNAi de miR-243. En effet, l'absence de liaison de la protéine ALG-1 avec miR-243 peut s'expliquer par la nature de la structure atypique de la tige favorisant l'interaction du complexe Dicer/RDE-4, permettant ainsi son association avec RDE-1. Cette partition n'est toutefois pas exclusive puisque la liaison par RDE-4 de la molécule parfaitement complémentaire est nécessaire pour initier une réponse de type microARN. Ainsi l'absence d'association de miR-243 avec ALG-1 peut être le reflet d'une sélection en aval, au niveau de l'ARNm ou la nature de l'appariement (100% complémentaire) associé à l'unique site de liaison de miR-243 ne permet pas un mode de régulation par ALG-1. Cette absence de fonctionnalité peut alors entraîner une dissociation rapide du microARN avec ALG-1 puisque la stabilité de l'association entre un microARN et ALG-1 est augmentée en présence de l'ARNm régulé (Chatterjee et al., 2011).

Quelles caractéristiques justifient le caractère exclusif de la molécule comportant des mésappariements pour la voie des microARNs, en contraste avec miR-243 capable d'initier une réponse RNAi ? Une des raisons les plus plausibles réside dans la structure de notre molécule. En effet, la partie impliquée dans la voie des microARNs correspond à la séquence retrouvée dans la tige du précurseur de *let-7*. Cette section comprend un mésappariement, mais aussi quatre appariements bancals (*wobble*) correspondant à l'appariement non canonique entre une guanine et une uridine qui affecte la structure secondaire d'un duplex d'ARN. Ainsi, cette caractéristique structurale additionnée d'un second mésappariement dans la séquence du siARN semble générer la spécificité de la voie des microARNs, possiblement en excluant l'activité de liaison de RDE-4. De manière intéressante, l'abolition de ce mésappariement dans la séquence du siARN restitue la voie du RNAi et ceux dépendamment de RDE-4, confirmant l'impact de la structure secondaire de l'ARN sur l'initiation de la voie du RNAi. De plus, il est important de noter que cette

molécule est capable d'entrer dans la voie des microARNs dépendamment de RDE-4, à l'inverse de la molécule 100% complémentaire nécessitant RDE-4. Ainsi, la présence d'une structure typique de précurseur de microARN favorise spécifiquement la voie des microARNs grâce possiblement à la reconnaissance de ces structures par des facteurs de liaisons spécifiques encore indéterminés.

Collectivement, ces données démontrent la contribution de la structure de l'ARNdb sur le choix de la voie empruntée. Une molécule parfaitement complémentaire va être orientée vers la voie du RNAi tandis qu'une molécule affichant des mésappariements favorise la voie des microARNs. Cependant, l'affinité de liaison pour une molécule d'ARNdb n'étant pas toujours exclusive (molécule 100% complémentaire capable de générer une réponse RNAi et microARN), un deuxième niveau de sélection durant la phase effectrice permet la discrimination des voies. Ainsi, l'absence de compensation des protéines ALGs pour générer une réponse RNAi suggère l'existence d'un système de sécurité mis en place par la cellule permettant d'éviter l'initiation d'une réponse RNAi robuste et transmissible lors d'un ciblage non spécifique de microARNs dans une région codante d'un ARNm. À l'inverse, la voie des microARNs permet de moduler l'expression protéique d'ARNm cibles d'une manière suffisamment flexible pour répondre rapidement au besoin de la cellule. Un système de régulation de type RNAi diminuerait cette flexibilité de régulation qui permet d'orchestrer finement l'expression protéique. D'autre part, l'amplification du signal suite à la production de siARNs secondaires augmenterait la capacité de générer des réponses non spécifiques.

Ainsi, l'étude précise des protéines Argonautes est déterminante pour identifier les caractéristiques moléculaires permettant d'afficher une exclusivité pour leur voie respective. C'est dans cette optique que nous avons entrepris l'identification de nouveaux partenaires physiques de la protéine ALG-1 par criblage double hybride dans le but de trouver des nouveaux joueurs impliqués dans la voie des microARNs. Parmi les nombreux candidats obtenus, nous avons identifié puis soulevé l'importance fonctionnelle de la protéine RACK-1 dans la voie des microARNs. Son implication dans de multiples aspects de la régulation cellulaire et de la traduction donne lieu à de nombreuses hypothèses sur ses rôles possibles dans les mécanismes de régulation associés aux microARNs.

- **Identification et caractérisation de la protéine RACK-1**

Nous avons démontré que la perte de fonction de la protéine RACK-1 induite par RNAi affichait des phénotypes hétérochroniques similaires à la perte de fonction de ALG-1 chez le nématode. De manière intéressante, une synergie entre ALG-2 et RACK-1 fut également observée. En effet le double mutant (*alg-2(ok304); rack-1 (RNAi)*) présente de forts phénotypes développementaux pléiotropiques comparé au simple mutant. Cette synergie suggérait donc une interaction génétique entre *rack-1* et la voie des microARNs au même titre que la synergie observé entre *alg-1* et *alg-2*. D'autre part, alors que le phénotype était augmenté dans le mutant *alg-2 (ok304)*, aucune augmentation n'a été observée avec le double mutant (*alg-1(gk214); rack-1 (RNAi)*), ce qui suggérait deux voies différentes de régulation des gènes par les microARNs. Cette hypothèse fut renforcée suite à l'observation de la protéine ALG-2 ne présentant aucune capacité d'interaction physique avec RACK-1 en système double hybride. Les deux protéines Argonautes ALG-1 et ALG-2 sont similaires à 88% avec des régions conservées comme les domaines PAZ, MID et PIWI. Cependant, la partie N-terminale est spécifique pour chacune des Argonautes et plus grande chez ALG-1, ce qui pourrait expliquer cette différence d'affinité pour la protéine RACK-1. Effectivement, nous avons montré que la deuxième partie du domaine N-terminal (66aa → 132aa) était responsable de l'interaction entre ALG-1 et RACK-1 (Figure 6-3).

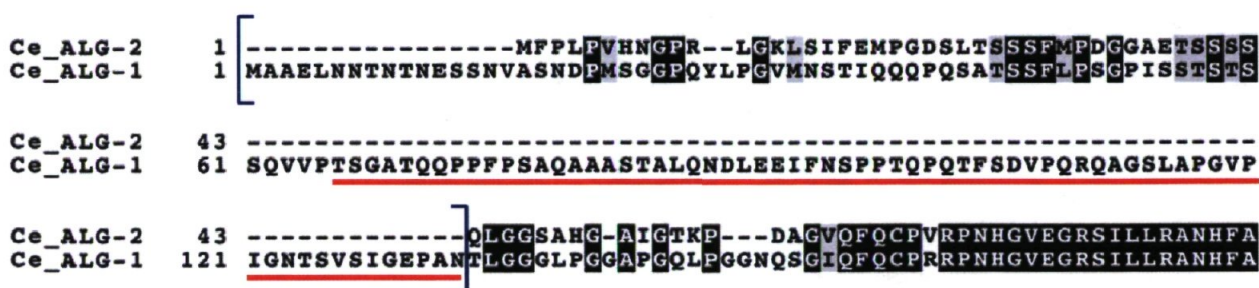


Figure 6-3 : Domaines N-terminaux des protéines Argonautes ALG-1 et ALG-2.

Les domaines N-terminaux de ALG-1 et ALG-2 sont encadrés par des parenthèses bleues. La région de la deuxième partie du domaine N-terminal de la protéine ALG-1 surlignée en rouge est essentielle pour l'interaction avec RACK-1.

Figure adaptée de Vasquez et al (Vasquez-Rifo et al., 2012).

Cette sélectivité d'interaction *via* la partie N-terminale de ALG-1 peut être une caractéristique moléculaire déterminante permettant la mise en place de voies de régulation distinctes par les microARNs. Récemment, nous avons observé que certains microARNs ubiquitaires comme miR-52 et miR-71 étaient liés préférentiellement par les protéines ALG-1 et ALG-2 respectivement (Vasquez-Rifo et al., 2012). Il serait donc intéressant d'évaluer la contribution du domaine N-terminal et plus particulièrement le rôle de RACK-1 dans la sélection des microARNs par les Argonaute ALGs.

Pour confirmer l'interaction physique identifiée entre RACK-1 et ALG-1, nous avons analysé *in vivo* leur association par des techniques de co-immunoprécipitation puis par purification spécifique des complexes miRISC *lin-4* et *let-7* (Hutvagner et al., 2004; Jannot et al., 2011). Alors que l'interaction du miRISC/*let-7* avec la protéine ribosomale RPS-12 est sensible à la RNase, une fraction de RACK-1 affiche une résistance au traitement. De la même manière, l'association de la protéine Argonaute humaine Ago2 avec RACK1 n'est pas dépendante de l'ARN, suggérant ainsi une interaction directe entre le miRISC et la protéine ribosomale RACK1.

Suite à cette caractérisation, nous avons déterminé l'impact de RACK-1 sur la voie de régulation des microARNs. Pour cela, nous avons constaté que la régulation d'ARNm rapporteurs ainsi que de cibles naturelles de microARNs était altérée suite à la perte de fonction de cette protéine. Collectivement, ces résultats suggèrent pour la première fois que la liaison directe entre le complexe miRISC et une protéine ribosomale était importante pour soutenir un mécanisme de régulation par les microARNs chez l'humain et *C. elegans*.

- **Par quel(s) moyen(s) RACK-1 participe à la voie de régulation des microARNs ?**

En 2004, Sengupta *et al* ont utilisé la technique de cryo-microscopie électronique pour caractériser l'interaction de RACK1 avec le ribosome (Sengupta et al., 2004). Grâce à ces données ils ont pu démontrer que RACK1 était liée à la petite sous-unité ribosomale 40S et plus particulièrement proche du tunnel de sortie de l'ARNm (Figure 6-4).

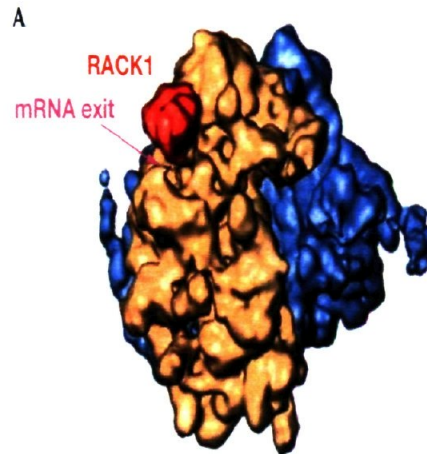


Figure 6-4 : Représentation de la liaison de RACK1 à la petite sous-unité ribosomale 40S.

Une cartographie obtenue par cryo microscopie électronique du ribosome 80S de *Saccharomyces cerevisiae* indique la localisation de RACK1 (en rouge) avec la petite sous unité ribosomale (en jaune) proche du tunnel de sortie de l'ARNm (flèche violette).

Figure adapté de (Nilsson et al., 2004).

Son positionnement sur la partie supérieure de cette sous-unité, très proche du tunnel de sortie de l'ARNm, pourrait ainsi faciliter l'interaction du miRISC avec les sites de liaison aux microARNs. Cette hypothèse est très intéressante puisque présentement aucune information concernant le mode de reconnaissance du microARN avec ces sites de liaison n'a été trouvée. Pour déterminer l'impact de RACK1 sur l'association du miRISC avec la machinerie traductionnelle, nous avons analysé l'association du miRISC avec les polysomes en présence et en l'absence de RACK1. Nous avons constaté que suite à la perte de fonction de la protéine RACK1, le microARN *let-7* et la protéine humaine Ago2 étaient beaucoup moins enrichis aux niveaux des ribosomes actifs. Collectivement, ces données associées à la caractérisation de l'interaction entre RACK1 et le miRISC suggèrent que cette protéine est impliquée dans la stabilité du complexe miRISC avec le ribosome. La protéine RACK1 jouerait ainsi le rôle de protéine d'ancrage permettant aux complexes miRISC de s'associer avec le ribosome proche de l'ARNm pour favoriser l'appariement avec les sites de liaison aux microARNs. Cependant, cette activité semble s'effectuer lorsque les ribosomes sont engagés dans la phase d'élongation, et sous-entend donc un mécanisme d'inhibition de la traduction après l'étape d'initiation.

Ces données peuvent expliquer pourquoi certains ARNm sont régulés par les microARNs de manière indépendante de la coiffe, celle-ci étant déterminante pour un mode de régulation durant la phase d'initiation de la traduction. De plus ce mode de régulation n'est sûrement pas exclusif et pourrait agir en parallèle d'un mécanisme intervenant durant la phase d'initiation. En effet, comme mentionné plus haut, nous avons montré qu'il existait une sélectivité des protéines Argonaute pour la protéine RACK1. Cette sélectivité pourrait déterminer des processus différents d'inhibition de la traduction comme observé chez la drosophile. En effet, bien que la voie des microARNs et siARNs soit associée respectivement avec les protéines de drosophile Ago1 et Ago2, cette dernière dans certaines conditions peut lier des microARNs et inhiber la traduction par un mécanisme différent de Ago1 (Iwasaki et al., 2009). Ainsi, puisque que DmAgo1 et DmAgo2 peuvent former des complexes miRISC possédant des mécanismes d'inhibition distincts, il est possible que l'interaction exclusive de RACK1 avec ALG-1 ou la protéine humaine Ago2 génère un type de d'inhibition distinct du miRISC associé avec ALG-2. Ceci peut expliquer pourquoi la perte de fonction de RACK1 n'altère pas complètement la quantité de microARNs *let-7* associée aux polysomes. Celui-ci pourrait être lié par le complexe miRISC/ALG-2 et être engagé dans un processus différent d'inhibition de la traduction. Par ailleurs, nous avons récemment démontré que le microARN *let-7* était associé avec les protéines ALG-1 et ALG-2, supportant ainsi cette hypothèse (Vasquez-Rifo et al., 2012).

Ding *et al.* ont montré que chez le nématode, les ARNm *lin-41* et *daf-12* ciblés par le microARN *let-7* étaient légèrement enrichis dans les fractions polysomales dans une souche *let-7* mutante (Ding and Grosshans, 2009). Ces données suggéraient alors un mécanisme d'inhibition de la traduction durant la phase d'initiation par le microARN *let-7*. Dans notre cas, la perte de RACK1 ne semble pas avoir d'effet sur la distribution des ARNm *lin-41* et *daf-12* contrairement au microARN *let-7*. Il est alors possible que différentes voies de régulation par les microARNs co-existent comme mentionné plus haut. Le déplacement de *let-7* observé suite à la perte de fonction de RACK1 pourrait correspondre à l'action de *let-7* sur des ARNm différents de *lin-41* et *daf-12* ou pourrait refléter un problème de recrutement ou de stabilité des complexes miRISC sur les ARNm non régulés par des microARNs.

En effet, il est important de noter que la protéine d'échafaudage RACK1 étant une composante ribosomale, il est probable que les complexes miRISC se retrouvent associés à une grande majorité d'ARNm grâce à leur liaison avec RACK1. En effet, il apparaît peu réaliste qu'un complexe miRISC cible de manière spécifique uniquement l'ARNm qu'il régule. En effet, la seule différence entre ces complexes formés par la même protéine Argonaute est apportée par la séquence du microARN qui le compose. La spécificité du miRISC devrait donc se faire uniquement lors de la liaison du miARN par appariement de bases avec la partie 3' non codante de l'ARNm avec qui il est associé. L'analyse des ARNm qui co-immunoprécipitent avec le miRISC ainsi que la fluctuation du niveau des protéines suite l'introduction ou l'ablation de microARNs dans des lignées cellulaires confirme effectivement un mode de ciblage très étendu (Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008).

Il est donc envisageable qu'en l'absence de sites de liaison aux microARNs, le miRISC soit associé avec le polysome par l'intermédiaire de RACK1, mais affiche une constante de dissociation rapide permettant de redistribuer le miRISC sur un autre ARNm. Par contre, en présence de sites de liaison aux microARNs, l'association et la stabilisation du miRISC avec la partie 3' non traduite, favorisée par la présence RACK-1, permet d'induire un mécanisme de répression traductionnel.

D'après notre modèle, le miRISC se lierait avec sa séquence complémentaire par l'intermédiaire de RACK1 qui est favorablement positionné proche du tunnel de sortie de l'ARN. Cette activité est plausible dans le contexte où les sites de liaison aux microARNs sont relativement proches du codon de terminaison. Cependant, la terminaison de la traduction est caractérisée par la dissociation puis le recyclage des ribosomes pour reformer des polysomes actifs. La séquence 3' non traduite n'est alors plus engagée dans le tunnel de la sous-unité 40S et l'interaction avec le miRISC est alors impossible.

Dans cette configuration, RACK1 peut alors engager une interaction indépendamment de sa localisation proche du tunnel de sortie de l'ARNm. Un ARNm actif en cours de traduction adopte une forme circulaire suite à l'interaction physique des facteurs de liaison de la queue polyadénylée et le complexe eIF4F permettant de rapprocher les extrémités 5' et 3' non traduites. Récemment, il a été montré que l'organisation des polysomes sur un ARNm était

antiparallèle avec la sous unité 40S orientée vers l'intérieur de cette circularisation (Figure 6-5) (Kopeina et al., 2008).

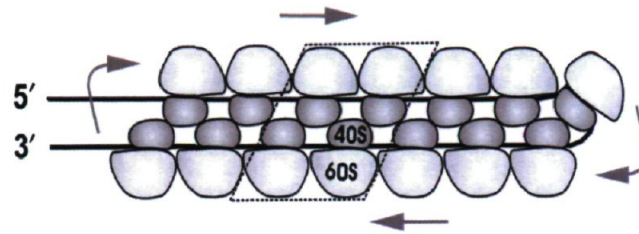


Figure 6-5 : Modèle d'organisation des polysomes sur un ARNm.

Représentation d'un ARNm circulaire en cours de traduction où les polysomes sont organisés en deux rangées collées antiparallèles. Les têtes des petites sous-unités ribosomales 40S sont orientées vers l'intérieur de la structure circulaire. Les flèches indiquent le chemin des ribosomes le long de la chaîne d'ARNm.

Figure adaptée de (Kopeina et al., 2008)

Dans ce contexte, comme le montre le modèle de la Figure 6-6, la sous-unité 40S associée à RACK1 pourrait favoriser l'accessibilité du complexe miRISC avec la partie 3' non traduite et permettre une interaction entre le miRISC et les sites de liaison aux microARNs durant l'étape d'élongation.

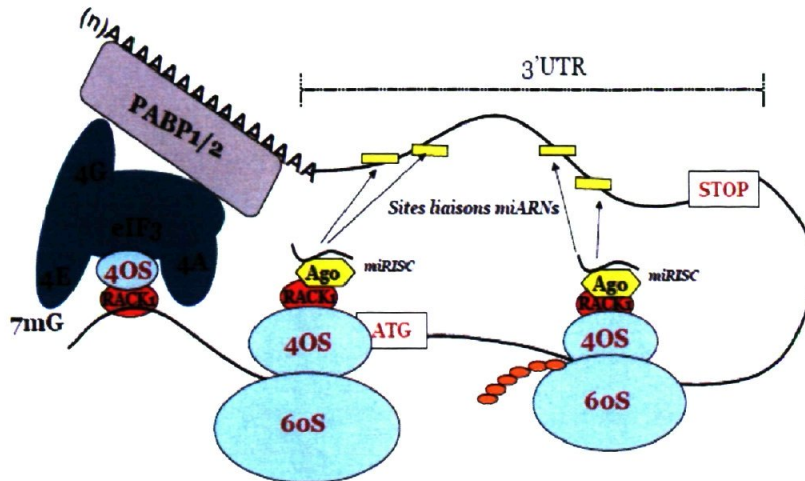


Figure 6-6 : Modèle d'interaction entre les sites de liaison aux microARNs et le complexe miRISC/RACK1.

Le complexe miRISC/RACK1 (jaune et rouge respectivement) est favorablement positionné au niveau de la sous unité ribosomale 40S pour permettre une interaction avec les sites de liaisons aux microARNs (rectangles jaunes) contenus dans la partie 3' non codante. Dépendamment de la taille de la région 3' non traduite et/ou de la localisation des ces sites, leurs accessibilités pourrait avoir lieu durant la phase d'initiation ou d'élongation de la traduction.

La protéine RACK1 a été identifiée initialement comme un partenaire de la protéine PKC β II (« *Protein Kinase C β II* ») permettant de stabiliser la conformation active de cette kinase (Ron et al., 1994). De plus, RACK1 sert de protéine de transport pour PKC β II lui permettant d'aller cibler des substrats de phosphorylation, comme sur le ribosome par exemple (Grosso et al., 2008; Ron et al., 1999). L'association du miRISC avec RACK-1 pourrait induire la phosphorylation des résidus de sérine ou thréonine de la protéine ALG-1 par l'intermédiaire de la protéine PKC β II. Récemment, la caractérisation de l'état de phosphorylation de la protéine humaine Ago2 a révélé sept résidus phosphorylés dont trois sérines et deux thréonines (Rudel et al., 2011). Trois de ces résidus sont conservés chez la protéine ALG-1 dont particulièrement la thréonine T450 prédite pour être un substrat de la protéine kinase C (Tableau 6-1). Il serait donc intéressant de déterminer l'état de phosphorylation de cette thréonine *in vivo* puis son impact sur l'activité d'ALG-1.

Position	Kinase	Score	Position	Kinase	Score
S-26	PKC	0.74	T-450	PKC	0.52
S-30	PKC	0.52	T-500	PKC	0.55
T-36	PKC	0.67	T-504	PKC	0.52
T-38	PKC	0.64	T-506	PKC	0.90
T-45	PKC	0.59	T-511	PKC	0.86
S-62	PKC	0.52	T-570	PKC	0.58
S-132	PKC	0.53	T-698	PKC	0.72
S-196	PKC	0.57	S-704	PKC	0.52
T-200	PKC	0.74	S-760	PKC	0.54
S-244	PKC	0.84	T-771	PKC	0.92
S-284	PKC	0.84	T-786	PKC	0.60
S-293	PKC	0.54	S-895	PKC	0.59
S-347	PKC	0.86	T-902	PKC	0.86
T-402	PKC	0.57	T-932	PKC	0.70
T-428	PKC	0.72	T-937	PKC	0.52

Tableau 6-1 : Prédiction des résidus sérine et thréonine phosphorylés de la protéine ALG-1 par les protéines kinases PKC.

Cette prédiction a été effectuée par le programme NetPhosK disponible sur : <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>. La phosphorylation de la thréonine à la position 450 est encadrée en rouge et correspond à la thréonine T303 qui est phosphorylée chez la protéine humaine Ago2 (Rudel et al., 2011).

Récemment, il a été observé que la stimulation de la traduction par PKC β II était dépendante de RACK1. L'action de PKC β II sur cette stimulation serait en partie causée par la phosphorylation du facteur eiF6 lié à la sous-unité ribosomale 60S (Ceci et al., 2003). De cette manière eiF6 phosphorylé se dissocie du complexe 60S et l'assemblage avec le 40S peut avoir lieu. L'identification de RACK1 comme sous-unité ribosomale a permis de démontrer que la phosphorylation d'eiF6 par PKC se faisait par l'intermédiaire de RACK1 assemblé à la sous-unité 40S (Ceci et al., 2003). En 2007, Chendrimada et col. ont démontré que la protéine eiF6 était associée avec le complexe miRISC pour réguler la traduction dans les cellules Hela et durant le développement du nématode (Chendrimada et al., 2007). Cependant ce mode de régulation ne semble pas conservé chez la drosophile (Eulalio et al., 2008) et l'interaction entre le miRISC et eiF6 reste controversé dans les cellules humaines (Hock et al., 2007). Basé sur ces données, il est possible que dans un contexte cellulaire précis l'interaction entre le miRISC et la protéine RACK1 interfère avec

l'activité de PKC β II et empêche la phosphorylation de la protéine eIF6 pour ultimement empêcher l'assemblage des sous unités 40 et 60S et ainsi inhiber le processus de traduction.

Finalement, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* il a été montré que l'association de RACK1 avec la sous unité 40S est déterminante pour l'arrêt des polypeptides en cours de formation durant l'élongation de la traduction (Kuroha et al., 2010). Ce mécanisme de régulation est induit lors de la synthèse consécutive d'acides aminés basiques chargés positivement et possédant ainsi une forte affinité pour les charges négatives du tunnel de sortie de l'ARNm contenu dans la sous-unité 40S (Dimitrova et al., 2009). Bien que la fonction de RACK1 dans ce mécanisme soit encore indéterminée, sa présence semble cruciale pour l'arrêt de la traduction dans ce contexte précis. Il n'est donc pas impossible que dans un contexte particulier l'association du miRISC avec RACK1 permette d'enclencher un mécanisme similaire capable d'arrêter la synthèse protéique durant l'élongation comme proposé par Nottrott et col (Nottrott et al., 2006).

En conclusion, la fonction précise de RACK1 dans les mécanismes de contrôle de l'expression génique par les microARNs est encore à éclaircir. Cependant son rôle de protéine d'échafaudage associée à sa localisation ribosomale fait de cette protéine une excellente plateforme d'interaction capable de moduler l'activité des ribosomes et de la traduction.

Ceci nous démontre que la compréhension fine de la voie des microARNs n'est pas encore totalement établie et les méthodes d'identification et de caractérisation des nouveaux interacteurs comme RACK1 permettent d'augmenter notre niveau de connaissance de cette mécanistique complexe.

C'est dans cette optique que suite à l'identification de plusieurs protéines interagissant physiquement avec la protéine Argonaute ALG-1, nous avons mis au point un protocole de caractérisation systématique dans le but d'appréhender leur implication dans la voie des microARNs chez le nématode *C. elegans*.

- **Caractérisation génétique systématique des partenaires d'ALG-1 :**

- Signification et perspectives**

Puisque les microARNs sont des acteurs majeurs impliqués notamment durant le développement post-embryonnaire du nématode, l'analyse des défauts hétérochroniques est une méthode souvent utilisée pour étudier la fonction d'une protéine impliquée dans la voie des microARNs. Les différentes études conduites pour cette caractérisation ont permis d'évaluer essentiellement l'impact des candidats sur les décisions développementales entreprises par les cellules souches hypodermiques, dont l'altération abouti à des phénotypes facilement observables et quantifiables. Parmi les 53 candidats, un seul se distingue dans les trois expériences différentes, suggérant un rôle dans la voie de régulation par les microARNs et plus spécifiquement lors de l'établissement du patron de différenciation des cellules souches hypodermiques durant le développement. Ainsi, une caractérisation génétique plus approfondie du gène Y71H2AM.4 sera donc essentielle pour déterminer de façon ferme sa contribution dans la voie des microARNs de la famille *let-7*.

Pour évaluer le phénotype développemental retardé associé à la perte de fonction du microARN *let-7* et de sa famille, il serait intéressant d'utiliser une souche de nématode exprimant un marqueur du stade adulte facilement observable, comme la protéine GFP sous contrôle du promoteur du gène *col-19*, qui est exprimé spécifiquement lors de la transition du stade larvaire L4 au stade adulte (Liu et al., 1995). Ainsi, basé sur les précédents résultats, la perte de fonction de Y71H2AM.4 devrait retarder l'expression de ce rapporteur et valider son rôle dans le développement larvaire tardif. Cependant, une démonstration génétique parfaite serait de supprimer les phénotypes observés en combinant les pertes de fonction de Y71H2AM.4 et des mutants de la famille de microARNs *let-7* avec une perte de fonction de *hbl-1*. Le rétablissement du phénotype sauvage nous démontrerait que l'activité observée de Y71H2AM.4 serait impliquée directement dans la voie de régulation des microARNs *miR-48*, *miR-84*, *miR-241* sur l'ARNm *hbl-1*.

Pour affiner la caractérisation génétique de Y71H2AM.4, il serait intéressant d'évaluer son impact sur d'autres voies de régulation par les microARNs. Ainsi nous pourrions tester l'impact des candidats sur l'activité de *let-60*, l'homologue de la protéine RAS, qui est une cible du microARN *miR-84* (Johnson et al., 2005). La protéine LET-60 joue un rôle

essentiel dans le développement de la vulve où il initie une cascade d'expression de gènes permettant la spécification des tissus. Ainsi un mutant gain de fonction de *let-60* résulte en la formation de pseudo-vulves ectopiques non fonctionnelles (Muv ; Multi vulves). Les animaux hétérozygotes *let-60(n1046)/+* affichent un très faible pourcentage de Muv, qui est sensiblement augmenté suite à l'inactivation de composants impliqués dans la voie des microARNs (Hammell et al., 2009).

L'activité du miRISC peut être également mesurée en étudiant l'activité du microARN *lisy-6*. Ce microARN est impliqué dans l'établissement de la spécialisation de deux neurones symétriques bilatéraux ASEL et ASER (Hammell et al., 2009; Johnston and Hobert, 2003). La caractéristique de ces deux neurones réside dans l'expression exclusive de *lisy-6* dans la cellule ASEL, avec comme cible principale l'ARNm codant pour le facteur de transcription COG-1. Ainsi les animaux affichant une diminution de l'activité de *lisy-6* dans ASEL ne peuvent pas réguler correctement COG-1 et la cellule adopte les caractéristiques de la cellule ASER. Pour visualiser cette caractéristique neuronale, un marqueur GFP fusionné au promoteur de *lim-6*, spécifiquement exprimé dans la cellule ASEL peut être utilisé comme l'illustre la Figure 6-7. Dans des conditions normales, *lim-6::GFP* est exprimé uniquement dans la cellule ASEL, tandis que la perte d'activité de *lisy-6* se traduit par l'absence de GFP, puisque la cellule ASEL a adopté les caractéristiques de ASER. Cet outil s'est montré efficace pour la caractérisation de la protéine NHL-2 démontrée récemment comme importante pour la voie des microARNs (Hammell et al., 2009).

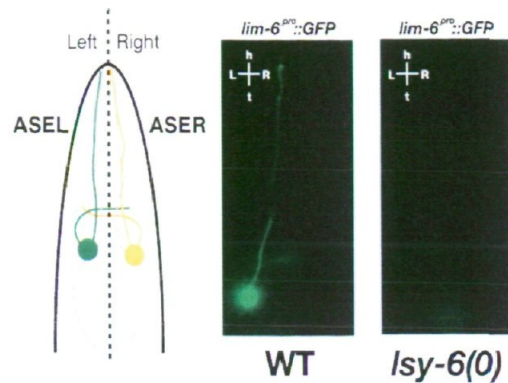


Figure 6-7 : Représentation de l'activité de *lsy-6* sur la spécialisation des neurones ASEL et ASER

L'expression du marqueur *lim-6p::GFP* spécifique à la cellule ASEL est dépendante de l'activité du microARN *lsy-6*. Un vers mutant *lsy-6(0)* adopte les caractéristiques de la cellule ASER dans le neurone ASEL, se traduisant par l'absence d'expression de *lim-6p::GFP*.

Figure adaptée de (Hammell et al., 2009).

Nous avons montré qu'uniquement le gène *y71h2am.4* affichait une synergie avec les microARNs de la famille *let-7*. Cependant la perte de fonction de 35 candidats augmente tout de même le phénotype létal de *let-7*. Pour s'assurer que cette augmentation du phénotype n'est pas un effet indirect dû à l'hypersensibilité de la souche thermosensible *let-7ts* nous allons répéter cette étude en utilisant un allèle plus faible de *let-7* rendant ainsi l'étude plus rigoureuse en utilisant la souche *let-7(mg279)*. Cette souche affiche un niveau réduit du microARN *let-7* mature mais ne présente pas de phénotype létal (Bracht et al., 2004; Reinhart et al., 2000).

Les phénotypes hétérochroniques étudiés suite à l'utilisation des souches mutantes de la famille *let-7* dépendent essentiellement de la sous-régulation de l'ARNm *hbl-1*. Il est donc possible que les candidats n'affichant pas de synergie avec les microARNs de la famille *let-7* soient impliqués dans un axe de régulation différent. Ainsi, les axes de régulation décrits plus haut pourront être également testés de façon systématique afin d'élargir notre champ d'action pour la caractérisation des autres facteurs.

- **Développement d'un outil permettant d'évaluer le rôle des candidats sur la fonction de la protéine ALG-1**

Une limite concernant la technique de criblage double hybride concerne la présence d'interactions faussement positives avec la protéine ALG-1. Ces faux positifs surviennent souvent *via* la capacité de certaines familles protéiques d'interagir de façon non spécifique avec la protéine appât étudiée lors du criblage, comme les protéines ribosomales, les composants du cytosquelette, les protéines « heat-shock » et les sous-unités des protéasomes. La majorité des candidats obtenus interagissant avec la protéine ALG-1 possèdent des rôles métaboliques très précis et variés rendant alors difficile d'établir un lien avec la voie des microARNs. Par exemple le gène *y71h2am.4*, identifié génétiquement comme un composant de la voie de régulation des microARNs de la famille *let-7*, code pour une protéine catalysant les réactions d'oxydo-réduction du couple NAD⁺/NADH dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Même si récemment la protéine humaine Ago2 et certains microARNs ont été retrouvés localisés dans la matrice et la membrane de la mitochondrie (Bandiera et al., 2011), la signification biologique de ce gène dans la voie des microARNs semble difficile. Il est donc possible que les phénotypes hétérochroniques observés soient indirectement liés à la voie des microARNs suite au dérèglement du métabolisme du nématode après la perte de fonction de nos candidats.

Ainsi, pour évaluer la contribution des protéines obtenues directement sur la mécanistique de régulation des gènes par les microARNs et plus particulièrement sur la fonction d'ALG-1, nous avons développé un système biologique nous permettant de forcer le recrutement de la protéine ALG-1. Cette association artificielle a donc l'avantage de ne pas subir les pressions métaboliques du nématode en développement et pourrait nous permettre d'être un outil très intéressant pour caractériser directement la fonction de nos candidats dans la mécanistique de répression par les microARNs. Pour ce faire, nous avons fusionné la protéine ALG-1 avec le court peptide λ N issu du bactériophage λ qui a la particularité d'avoir une forte affinité de liaison pour la séquence d'ARN palindromique Box-B (Figure 6-8) (Chattopadhyay et al., 1995). Pour observer l'impact du recrutement de ALG-1, la séquence d'ARN Box-B a été introduite dans la partie 3' non traduite d'un ARNm rapporteur codant pour la GFP (Figure 6-8).

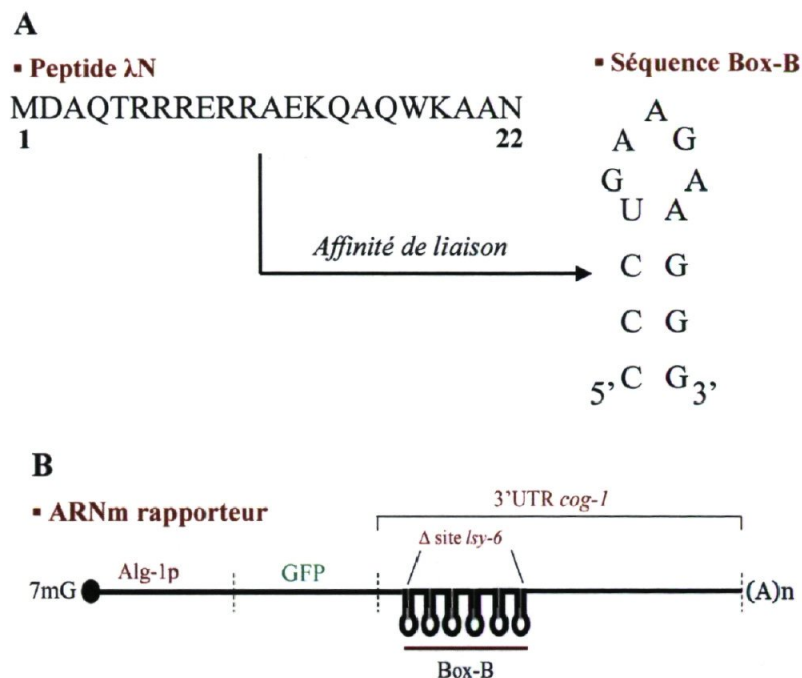


Figure 6-8 : Affinité du peptide λ N issu du bactériophage λ pour la séquence d'ARN Box-B.

(A) Détail des séquences du peptide λ N et de sa cible d'ARN Box-B.

(B) L'ARN rapporteur utilisé est sensible au recrutement artificiel de la protéine ALG-1 fusionnée à la séquence λ N. La séquence Box-B est insérée en six copies à la place du site de liaison au microARN *Isy-6*. L'ARNm rapporteur exprime la protéine fluorescente GFP sous contrôle du promoteur d'ALG-1.

Suite à la co-expression de ces deux transgènes, l'expression de la GFP est fortement éteinte comparativement aux contrôles correspondants à l'expression du rapporteur sans séquence Box-B (Figure 6-9). Pour s'assurer que cette régulation est bien dépendante de ALG-1, nous avons co-exprimé l'ARNm rapporteur avec la construction exprimant le peptide λ N sans la fusion avec ALG-1 (données non montrées). Aucune diminution de la protéine GFP n'a été observée, ce qui supporte le rôle direct de la protéine ALG-1 pour éteindre l'expression de la GFP suite à son recrutement artificiel comme démontré chez l'humain avec Ago2 (Pillai et al., 2004).

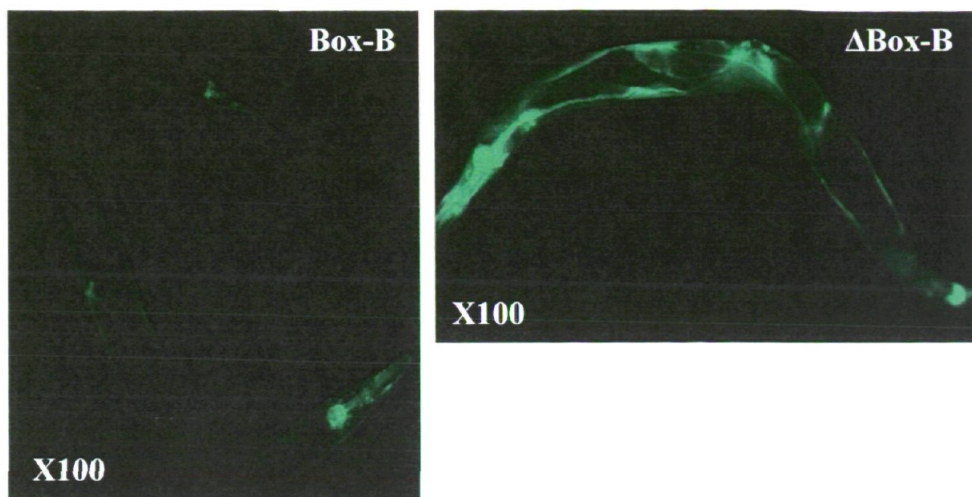


Figure 6-9 : Efficacité du système de recrutement artificiel de la protéine ALG-1 sur un ARNm rapporteur.

L'expression de la GFP de l'ARNm rapporteur arborant les séquences d'ARN Box-B est efficacement éteinte suite au recrutement artificiel d'ALG-1 fusionnée avec le peptide λ N (image de gauche). L'image de droite représente une souche de nématode co-exprimant l'ARNm rapporteur sans les sites Box-B et la protéine ALG-1 fusionnée avec le peptide λ N. On constate une expression forte de la GFP comparée à l'image de gauche.

- **Connexion possible entre certains candidats et la voie des microARNs**

Suite à la comparaison des différents candidats obtenus avec la littérature scientifique en rapport avec la voie de régulation par les microARNs, six d'entre eux se distinguent particulièrement. On retrouve ainsi les gènes *ubc-7*, *fkf-5*, *fkf-6*, *cyn-12* et *dnh-12*.

Le gène *ubc-7* code pour une protéine prédite pour être impliquée dans l'attachement de molécules d'ubiquitine sur un substrat *via* son association avec la protéine E3 ubiquitine ligase. Récemment, Ryback et al, ont mis en évidence pour la première fois un lien entre le miRISC et le processus de dégradation par le protéasome (Rybak et al., 2009). En effet, ils ont démontré que la protéine humaine *mln41*, une E3 ubiquitine-ligase, inhibait la voie des microARNs en interagissant physiquement avec le miRISC pour induire l'ubiquitination de Ago2. Basé sur ces données il est possible que la protéine ALG-1 subisse un mécanisme de dégradation par le protéasome suite à sa liaison physique avec la protéine UBC-7.

Les gènes *fkf-2*, *fkf-5* et *cyn-12* codent pour des protéines possédant un domaine peptidyl prolyl cis/trans isomerase impliqué dans l'arrangement conformationnel des protéines.

Chez la plante la protéine CYP-40 arbore un domaine identique et affecte la voie des microARNs en modulant négativement l'activité de AGO1 laissant ainsi sous entendre un possible lien entre ALG-1 et les protéines FKB-2 et FKB-5 (Iki et al., 2012).

Finalement, la protéine **DNJ-12** est l'homologue de la protéine Hsp40 qui est un cofacteur nécessaire pour la coopération entre les protéines chaperonne Hsc70 et Hsp90. En 2010, ces deux protéines ont été identifiées comme des facteurs importants impliqués dans la formation du complexe RISC chez la drosophile. De plus, l'homologue de DNJ-12 chez la drosophile, co-immunoprécipite avec Ago1 et Ago2 (Iwasaki et al., 2010). Cependant *dnj-12* ne semble ne pas interagir génétiquement avec le microARN *let-7* chez *C. elegans*. La présence d'un nombre important de paralogues suggère l'existence d'une possible redondance entre ces protéines. Ainsi, l'analyse de multiples mutants serait donc utile pour adresser le rôle de ces protéines chez le nématode.

Conclusion générale

La découverte en 1993 du court ARN non-codant *lin-4* chez *C. elegans* a mis à jour une gigantesque famille de molécules, les microARNs. Leur caractérisation fonctionnelle durant ces 20 dernières années les a placés parmi les éléments régulateurs déterminants pour la cellule. Ainsi, considérant le rôle fondamental des microARNs pour le bon fonctionnement de la cellule, l'analyse fine de la biogenèse des microARNs s'est avérée indispensable pour comprendre cette voie de régulation. L'étude de la voie des microARNs dans différents organismes a révélé une biogenèse complexe composée de dénominateurs communs comme les enzymes Drosha et Dicer, et la grande famille des protéines Argonautes. Cependant, les bases moléculaires exactes de la régulation des ARNm par les microARNs ne sont pas encore toutes élucidées et peuvent être sensiblement différentes d'un organisme à l'autre. La recherche des facteurs associés aux différents complexes formés par Drosha, Dicer ou les protéines Argonautes s'est révélée déterminante puisque des protéines comme DGCR8, TRBP ou GW182 ont pu être identifiées et caractérisées comme des cofacteurs essentiels de la voie des microARNs. De plus, de nombreux autres facteurs secondaires se sont révélés importants pour moduler la biologie des microARNs, et de façon intéressante plusieurs agissent de façon très spécifique avec certains microARNs ou bien dans des contextes physiologiques perturbés. Ainsi, l'architecture moléculaire encadrant la voie des microARNs semble encore pleine de ressources et permet de dynamiser encore plus les activités de recherche sur ce sentier cellulaire passionnant.

C'est dans cette optique que l'objectif principal de ma thèse de doctorat fut de participer à l'élargissement des connaissances associées à la voie des microARNs. Pour ce faire nous avons utilisé l'organisme modèle *C. elegans* pour étudier la protéine Argonaute ALG-1. Au cours de cette étude, nous avons déterminé que la structure de la source d'ARNdb est déterminante pour spécifier la voie des microARNs par rapport à la voie des siARNs. D'autre part, ces données ont également mis en évidence que la protéine ALG-1 possède des caractéristiques moléculaires spécifiques permettant de soutenir une réponse de type microARNs. Pour appréhender ces caractéristiques, nous avons décidé de rechercher d'éventuels partenaires physiques de la protéine ALG-1 et de caractériser leur fonction dans la voie des microARNs. Cette recherche nous a aussi permis d'identifier et de souligner

l'importance de la protéine ribosomale RACK-1 dans la voie de régulation des microARNs, chez le nématode et l'humain. Finalement, l'identification d'un nombre important de partenaires physiques associés à la protéine ALG-1 nous a poussé à mettre au point une étude sensible et systématique pour adresser leur rôle dans la voie des microARNs. Cette démarche de caractérisation s'avère être désormais un outil indispensable dans le laboratoire pour la recherche et l'analyse de nouveaux facteurs associés à la voie des microARNs.

Bibliographie

- Abbott, A.L., Alvarez-Saavedra, E., Miska, E.A., Lau, N.C., Bartel, D.P., Horvitz, H.R., and Ambros, V. (2005). The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell* 9, 403-414.
- Albrecht, M., and Lengauer, T. (2004). Survey on the PABC recognition motif PAM2. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 129-138.
- Ameres, S.L., Horwich, M.D., Hung, J.H., Xu, J., Ghildiyal, M., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2010). Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science* 328, 1534-1539.
- Aoki, K., Moriguchi, H., Yoshioka, T., Okawa, K., and Tabara, H. (2007). In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. *Embo J* 26, 5007-5019.
- Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev* 22, 2773-2785.
- Bachellerie, J.P., Michot, B., Nicoloso, M., Balakin, A., Ni, J., and Fournier, M.J. (1995). Antisense snoRNAs: a family of nucleolar RNAs with long complementarities to rRNA. *Trends Biochem Sci* 20, 261-264.
- Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., and Bartel, D.P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455, 64-71.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A.E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122, 553-563.
- Bandiera, S., Ruberg, S., Girard, M., Cagnard, N., Hanein, S., Chretien, D., Munnich, A., Lyonnet, S., and Henrion-Caude, A. (2011). Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria. *PLoS One* 6, e20746.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.
- Baskerville, S., and Bartel, D.P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* 11, 241-247.

- Baum, S., Bittins, M., Frey, S., and Seedorf, M. (2004). Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes. *Biochem J* 380, 823-830.
- Bazzini, A.A., Lee, M.T., and Giraldez, A.J. (2012). Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science* 336, 233-237.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 20, 1885-1898.
- Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 28, 328-336.
- Berezikov, E., Robine, N., Samsonova, A., Westholm, J.O., Naqvi, A., Hung, J.H., Okamura, K., Dai, Q., Bortolamiol-Becet, D., Martin, R., *et al.* (2011). Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence. *Genome Res* 21, 203-215.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J* 17, 170-180.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185-191.
- Boland, A., Huntzinger, E., Schmidt, S., Izaurralde, E., and Weichenrieder, O. (2011). Crystal structure of the MID-PIWI lobe of a eukaryotic Argonaute protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10466-10471.
- Boland, A., Tritschler, F., Heimstadt, S., Izaurralde, E., and Weichenrieder, O. (2010). Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. *EMBO Rep* 11, 522-527.
- Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1097-1101.
- Bouasker, S. (2012). The slicing activity of microRNA-specific Argonautes is essential for the microRNA pathway in *C. elegans*. In *Nucleic acids research*, 40, 10452-10462.
- Bouasker, S., and Simard, M.J. (2009). Structural biology: Tracing Argonaute binding. *Nature* 461, 743-744.

- Bracht, J., Hunter, S., Eachus, R., Weeks, P., and Pasquinelli, A.E. (2004). Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *RNA* *10*, 1586-1594.
- Braun, J.E., Huntzinger, E., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2011). GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol Cell* *44*, 120-133.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* *3*, e85.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *77*, 71-94.
- Bueno, M.J., Perez de Castro, I., Gomez de Cedron, M., Santos, J., Calin, G.A., Cigudosa, J.C., Croce, C.M., Fernandez-Piqueras, J., and Malumbres, M. (2008). Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* *13*, 496-506.
- Bukhari, S.I., Vasquez-Rifo, A., Gagne, D., Paquet, E.R., Zetka, M., Robert, C., Masson, J.Y., and Simard, M.J. (2012). The microRNA pathway controls germ cell proliferation and differentiation in *C. elegans*. *Cell Res* *22*, 1034-1045.
- Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.J., Tomaru, Y., Nishibu, T., Ukekawa, R., Funakoshi, T., Kurokawa, T., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., *et al.* (2010). A comprehensive survey of 3' animal miRNA modification events and a possible role for 3' adenylation in modulating miRNA targeting effectiveness. *Genome Res* *20*, 1398-1410.
- Bussing, I., Yang, J.S., Lai, E.C., and Grosshans, H. (2010). The nuclear export receptor XPO-1 supports primary miRNA processing in *C. elegans* and *Drosophila*. *EMBO J* *29*, 1830-1839.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* *10*, 1957-1966.
- Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q., and Hannon, G.J. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* *16*, 2733-2742.
- Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L.A., Offenhauser, N., Marchisio, P.C., and Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* *426*, 579-584.
- Cerutti, H., and Casas-Mollano, J.A. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet* *50*, 81-99.
- Chan, S.P., and Slack, F.J. (2009). Ribosomal protein RPS-14 modulates let-7 microRNA function in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* *334*, 152-160.

- Chang, T.C., Yu, D., Lee, Y.S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A., and Mendell, J.T. (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* *40*, 43-50.
- Chatterjee, S., Fasler, M., Bussing, I., and Grosshans, H. (2011). Target-mediated protection of endogenous microRNAs in *C. elegans*. *Dev Cell* *20*, 388-396.
- Chattopadhyay, S., Garcia-Mena, J., DeVito, J., Wolska, K., and Das, A. (1995). Bipartite function of a small RNA hairpin in transcription antitermination in bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 4061-4065.
- Chekulaeva, M., Filipowicz, W., and Parker, R. (2009). Multiple independent domains of dGW182 function in miRNA-mediated repression in *Drosophila*. *RNA* *15*, 794-803.
- Chekulaeva, M., Mathys, H., Zipprich, J.T., Attig, J., Colic, M., Parker, R., and Filipowicz, W. (2011). miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 1218-1226.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* *465*, 584-589.
- Chen, C.Y., Zheng, D., Xia, Z., and Shyu, A.B. (2009). Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 1160-1166.
- Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* *303*, 83-86.
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., and Shiekhattar, R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* *447*, 823-828.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* *436*, 740-744.
- Chu, C.Y., and Rana, T.M. (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol* *4*, e210.
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D., *et al.* (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* *328*, 1694-1698.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., *et al.* (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 13944-13949.
- Correa, R.L., Steiner, F.A., Berezikov, E., and Ketting, R.F. (2010). MicroRNA-directed siRNA biogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* *6*, e1000903.

- Coyle, S.M., Gilbert, W.V., and Doudna, J.A. (2009). Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome in vivo. *Mol Cell Biol* 29, 1626-1634.
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561-563.
- Crick, F.H. (1958). On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* 12, 138-163.
- Czech, B., and Hannon, G.J. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet* 12, 19-31.
- Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G., and Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454, 56-61.
- Davis, B.N., Hilyard, A.C., Nguyen, P.H., Lagna, G., and Hata, A. (2010). Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol Cell* 39, 373-384.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.
- Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Sevignani, C., Wentzel, E., Furth, E.E., Lee, W.M., Enders, G.H., Mendell, J.T., *et al.* (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 38, 1060-1065.
- Dimitrova, L.N., Kuroha, K., Tatematsu, T., and Inada, T. (2009). Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J Biol Chem* 284, 10343-10352.
- Ding, L., Spencer, A., Morita, K., and Han, M. (2005). The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*. *Mol Cell* 19, 437-447.
- Ding, X.C., and Grosshans, H. (2009). Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *EMBO J* 28, 213-222.
- Djuranovic, S., Nahvi, A., and Green, R. (2011). A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. *Science* 331, 550-553.
- Djuranovic, S., Nahvi, A., and Green, R. (2012). miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 336, 237-240.
- Djuranovic, S., Zinchenko, M.K., Hur, J.K., Nahvi, A., Brunelle, J.L., Rogers, E.J., and Green, R. (2010). Allosteric regulation of Argonaute proteins by miRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 17, 144-150.
- Doench, J.G., and Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18, 504-511.

- Duchaine, T.F., Wohlschlegel, J.A., Kennedy, S., Bei, Y., Conte, D., Jr., Pang, K., Brownell, D.R., Harding, S., Mitani, S., Ruvkun, G., *et al.* (2006). Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell* *124*, 343-354.
- Elkayam, E., Kuhn, C.D., Tocilj, A., Haase, A.D., Greene, E.M., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2012). The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a. *Cell* *150*, 100-110.
- Ender, C., Krek, A., Friedlander, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N., and Meister, G. (2008). A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell* *32*, 519-528.
- Eulalio, A., Helms, S., Fritsch, C., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2009a). A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *RNA* *15*, 1067-1077.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* *15*, 346-353.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2009b). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* *15*, 21-32.
- Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F., *et al.* (2011). miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 1211-1217.
- Fabian, M.R., Mathonnet, G., Sundermeier, T., Mathys, H., Zipprich, J.T., Svitkin, Y.V., Rivas, F., Jinek, M., Wohlschlegel, J., Doudna, J.A., *et al.* (2009). Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell* *35*, 868-880.
- Farh, K.K., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B.P., Johnston, W.K., Lim, L.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* *310*, 1817-1821.
- Felix, M.A., Ashe, A., Piffaretti, J., Wu, G., Nuez, I., Belicard, T., Jiang, Y., Zhao, G., Franz, C.J., Goldstein, L.D., *et al.* (2011). Natural and experimental infection of *Caenorhabditis* nematodes by novel viruses related to nodaviruses. *PLoS Biol* *9*, e1000586.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* *9*, 102-114.

Forstemann, K., Horwich, M.D., Wee, L., Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2007). *Drosophila* microRNAs Are Sorted into Functionally Distinct Argonaute Complexes after Production by Dicer-1. *Cell* 130, 287-297.

Forstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V.V., Denli, A.M., Bratu, D.P., Klattenhoff, C., Theurkauf, W.E., and Zamore, P.D. (2005). Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol* 3, e236.

Frank, F., Fabian, M.R., Stepinski, J., Jemielity, J., Darzynkiewicz, E., Sonenberg, N., and Nagar, B. (2011). Structural analysis of 5'-mRNA-cap interactions with the human AGO2 MID domain. *EMBO Rep* 12, 415-420.

Frank, F., Sonenberg, N., and Nagar, B. (2010). Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 465, 818-822.

Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19, 92-105.

Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., *et al.* (2007). DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol* 9, 604-611.

Gaidatzis, D., van Nimwegen, E., Hausser, J., and Zavolan, M. (2007). Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. *BMC Bioinformatics* 8, 69.

Galgano, A., Forrer, M., Jaskiewicz, L., Kanitz, A., Zavolan, M., and Gerber, A.P. (2008). Comparative analysis of mRNA targets for human PUF-family proteins suggests extensive interaction with the miRNA regulatory system. *PLoS One* 3, e3164.

Gatignol, A., Buckler-White, A., Berkhout, B., and Jeang, K.T. (1991). Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* 251, 1597-1600.

Gerber, A.P., and Keller, W. (2001). RNA editing by base deamination: more enzymes, more targets, new mysteries. *Trends Biochem Sci* 26, 376-384.

Glazov, E.A., Cottee, P.A., Barris, W.C., Moore, R.J., Dalrymple, B.P., and Tizard, M.L. (2008). A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach. *Genome Res* 18, 957-964.

Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631-640.

- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235-240.
- Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27, 91-105.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106, 23-34.
- Grosshans, H., Johnson, T., Reinert, K.L., Gerstein, M., and Slack, F.J. (2005). The temporal patterning microRNA let-7 regulates several transcription factors at the larval to adult transition in *C. elegans*. *Dev Cell* 8, 321-330.
- Grosso, S., Volta, V., Vietri, M., Gorrini, C., Marchisio, P.C., and Biffo, S. (2008). Eukaryotic ribosomes host PKC activity. *Biochem Biophys Res Commun* 376, 65-69.
- Gruber, J.J., Zatechka, D.S., Sabin, L.R., Yong, J., Lum, J.J., Kong, M., Zong, W.X., Zhang, Z., Lau, C.K., Rawlings, J., *et al.* (2009). Ars2 links the nuclear cap-binding complex to RNA interference and cell proliferation. *Cell* 138, 328-339.
- Guil, S., and Caceres, J.F. (2007). The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol* 14, 591-596.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835-840.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jr., Jungkamp, A.C., Munschauer, M., *et al.* (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* 141, 129-141.
- Halbeisen, R.E., Scherrer, T., and Gerber, A.P. (2009). Affinity purification of ribosomes to access the translome. *Methods* 48, 306-310.
- Hammell, C.M., Lubin, I., Boag, P.R., Blackwell, T.K., and Ambros, V. (2009). nhl-2 Modulates microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 136, 926-938.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18, 3016-3027.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Nam, J.W., Heo, I., Rhee, J.K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.T., and Kim, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887-901.

- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., *et al.* (2001). Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* 8, 11-22.
- Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y., and Takahashi, T. (2005). A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 65, 9628-9632.
- He, L., He, X., Lowe, S.W., and Hannon, G.J. (2007). microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer* 7, 819-822.
- He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., *et al.* (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828-833.
- Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J., and Kim, V.N. (2008). Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell* 32, 276-284.
- Heo, I., Joo, C., Kim, Y.K., Ha, M., Yoon, M.J., Cho, J., Yeom, K.H., Han, J., and Kim, V.N. (2009). TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* 138, 696-708.
- Hock, J., Weinmann, L., Ender, C., Rudel, S., Kremmer, E., Raabe, M., Urlaub, H., and Meister, G. (2007). Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep* 8, 1052-1060.
- Huang, J., Liang, Z., Yang, B., Tian, H., Ma, J., and Zhang, H. (2007). Derepression of microRNA-mediated protein translation inhibition by apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) and its family members. *J Biol Chem* 282, 33632-33640.
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16961-16966.
- Huntzinger, E., Braun, J.E., Heimstadt, S., Zekri, L., and Izaurralde, E. (2010). Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *EMBO J* 29, 4146-4160.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834-838.
- Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 22-32.

- Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C., and Zamore, P.D. (2004). Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2, E98.
- Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C., and Zamore, P.D. (2004). Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2, E98.
- Ikematsu, N., Yoshida, Y., Kawamura-Tsuzuku, J., Ohsugi, M., Onda, M., Hirai, M., Fujimoto, J., and Yamamoto, T. (1999). Tob2, a novel anti-proliferative Tob/BTG1 family member, associates with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 18, 7432-7441.
- Iki, T., Yoshikawa, M., Meshi, T., and Ishikawa, M. (2012). Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. *EMBO J* 31, 267-278.
- Inoue, H., Hayase, Y., Imura, A., Iwai, S., Miura, K., and Ohtsuka, E. (1987). Synthesis and hybridization studies on two complementary nona(2'-O-methyl)ribonucleotides. *Nucleic Acids Res* 15, 6131-6148.
- Iwasaki, S., Kawamata, T., and Tomari, Y. (2009). *Drosophila* argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol Cell* 34, 58-67.
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., and Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell* 39, 292-299.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 113-127.
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M.J., and Chan, E.K. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol* 7, 1267-1274.
- Jannot, G., Vasquez-Rifo, A., and Simard, M.J. (2011). Argonaute pull-down and RISC analysis using 2'-O-methylated oligonucleotides affinity matrices. *Methods Mol Biol* 725, 233-249.
- Jin, P., Zarnescu, D.C., Ceman, S., Nakamoto, M., Mowrey, J., Jongens, T.A., Nelson, D.L., Moses, K., and Warren, S.T. (2004). Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat Neurosci* 7, 113-117.
- Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120, 635-647.
- Johnston, M., Geoffroy, M.C., Sobala, A., Hay, R., and Hutvagner, G. (2010). HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Mol Biol Cell* 21, 1462-1469.

- Johnston, R.J., and Hobert, O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *426*, 845-849.
- Kahvejian, A., Svitkin, Y.V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M.N., and Sonenberg, N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* *19*, 104-113.
- Kato, M., de Lencastre, A., Pincus, Z., and Slack, F.J. (2009). Dynamic expression of small non-coding RNAs, including novel microRNAs and piRNAs/21U-RNAs, during *Caenorhabditis elegans* development. *Genome Biol* *10*, R54.
- Kawahara, Y., Megraw, M., Kreider, E., Iizasa, H., Valente, L., Hatzigeorgiou, A.G., and Nishikura, K. (2008). Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic acids research* *36*, 5270-5280.
- Kawahara, Y., and Mieda-Sato, A. (2012). TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 3347-3352.
- Kawai, S., and Amano, A. (2012). BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. *J Cell Biol* *197*, 201-208.
- Kawamata, T., Seitz, H., and Tomari, Y. (2009). Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 953-960.
- Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J.A., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Orom, U.A., *et al.* (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* *131*, 1273-1286.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* *15*, 2654-2659.
- Khaleghpour, K., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Roy, G., Svitkin, Y.V., Imataka, H., O'Connor-McCourt, M., and Sonenberg, N. (2001). Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol Cell Biol* *21*, 5200-5213.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* *115*, 209-216.
- Kim, J., Krichevsky, A., Grad, Y., Hayes, G.D., Kosik, K.S., Church, G.M., and Ruvkun, G. (2004). Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 360-365.
- Kim, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 376-385.
- Kim, Y.K., and Kim, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* *26*, 775-783.

Kinch, L.N., and Grishin, N.V. (2009). The human Ago2 MC region does not contain an eIF4E-like mRNA cap binding motif. *Biol Direct* 4, 2.

Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., and Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129, 1141-1151.

Kok, K.H., Ng, M.H., Ching, Y.P., and Jin, D.Y. (2007). Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *J Biol Chem* 282, 17649-17657.

Kong, Y.W., Cannell, I.G., de Moor, C.H., Hill, K., Garside, P.G., Hamilton, T.L., Meijer, H.A., Dobbyn, H.C., Stoneley, M., Spriggs, K.A., *et al.* (2008). The mechanism of micro-RNA-mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8866-8871.

Kopeina, G.S., Afonina, Z.A., Gromova, K.V., Shirokov, V.A., Vasiliev, V.D., and Spirin, A.S. (2008). Step-wise formation of eukaryotic double-row polyribosomes and circular translation of polysomal mRNA. *Nucleic acids research* 36, 2476-2488.

Kornberg, R.D. (1999). Eukaryotic transcriptional control. *Trends Cell Biol* 9, M46-49.

Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y., Shirahige, K., and Inada, T. (2010). Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep* 11, 956-961.

Kuzuoglu-Ozturk, D., Huntzinger, E., Schmidt, S., and Izaurralde, E. (2012). The *Caenorhabditis elegans* GW182 protein AIN-1 interacts with PAB-1 and subunits of the PAN2-PAN3 and CCR4-NOT deadenylase complexes. *Nucleic acids research* 40, 5651-5665.

Kwak, P.B., and Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* 19, 145-151.

Landthaler, M., Yalcin, A., and Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* 14, 2162-2167.

Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.

Lau, P.W., Guiley, K.Z., De, N., Potter, C.S., Carragher, B., and Macrae, I.J. (2012). The molecular architecture of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol* 19, 436-440.

Lazzaretti, D., Tournier, I., and Izaurralde, E. (2009). The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *RNA* 15, 1059-1066.

Lee, C.T., Risom, T., and Strauss, W.M. (2007). Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *DNA Cell Biol* 26, 209-218.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., *et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.

Lee, Y., Hur, I., Park, S.Y., Kim, Y.K., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 25, 522-532.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004a). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4051-4060.

Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., and Carthew, R.W. (2004b). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117, 69-81.

Leuschner, P.J., Ameres, S.L., Kueng, S., and Martinez, J. (2006). Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* 7, 314-320.

Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.

Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.

Lim, L.P., Glasner, M.E., Yekta, S., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2003a). Vertebrate microRNA genes. *Science* 299, 1540.

Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769-773.

Lim, L.P., Lau, N.C., Weinstein, E.G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M.W., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2003b). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 17, 991-1008.

Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., and Sattler, M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 426, 465-469.

Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.

- Liu, J., Rivas, F.V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., 3rd, Parker, R., and Hannon, G.J. (2005a). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* 7, 1261-1266.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005b). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7, 719-723.
- Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.E., Smith, D.P., and Wang, X. (2003). R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 301, 1921-1925.
- Liu, Z., Kirch, S., and Ambros, V. (1995). The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene pathway controls stage-specific transcription of collagen genes. *Development* 121, 2471-2478.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., *et al.* (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95-98.
- Lytle, J.R., Yario, T.A., and Steitz, J.A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9667-9672.
- Ma, J.B., Ye, K., and Patel, D.J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429, 318-322.
- Ma, J.B., Yuan, Y.R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 434, 666-670.
- Macias, M.J., Wiesner, S., and Sudol, M. (2002). WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett* 513, 30-37.
- MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V., and Doudna, J.A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 512-517.
- Majoros, W.H., and Ohler, U. (2007). Spatial preferences of microRNA targets in 3' untranslated regions. *BMC Genomics* 8, 152.
- Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T.W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1102-1107.

- Martin, R., Smibert, P., Yalcin, A., Tyler, D.M., Schafer, U., Tuschl, T., and Lai, E.C. (2009). A *Drosophila pasha* mutant distinguishes the canonical microRNA and mirtron pathways. *Mol Cell Biol* 29, 861-870.
- Maselli, V., Di Bernardo, D., and Banfi, S. (2008). CoGemiR: a comparative genomics microRNA database. *BMC Genomics* 9, 457.
- Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., *et al.* (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317, 1764-1767.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., and Zamore, P.D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123, 607-620.
- Mattick, J.S. (2007). A new paradigm for developmental biology. *J Exp Biol* 210, 1526-1547.
- Mattick, J.S., and Gagen, M.J. (2001). The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms. *Mol Biol Evol* 18, 1611-1630.
- Mayr, C., Hemann, M.T., and Bartel, D.P. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 315, 1576-1579.
- McGlinn, E., Yekta, S., Mansfield, J.H., Soutschek, J., Bartel, D.P., and Tabin, C.J. (2009). In ovo application of antagomiRs indicates a role for miR-196 in patterning the chick axial skeleton through Hox gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18610-18615.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15, 185-197.
- Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P.Y., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. (2005). Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol* 15, 2149-2155.
- Mello, C., and Fire, A. (1995). DNA transformation. *Methods in Cell Biology* 48, 451-482.
- Michlewski, G., Guil, S., Semple, C.A., and Caceres, J.F. (2008). Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol Cell* 32, 383-393.
- Miyoshi, K., Tsukumo, H., Nagami, T., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2005). Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev* 19, 2837-2848.
- Miyoshi, T., Takeuchi, A., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2010). A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1024-1026.

- Morlando, M., Ballarino, M., Gromak, N., Pagano, F., Bozzoni, I., and Proudfoot, N.J. (2008). Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat Struct Mol Biol* *15*, 902-909.
- Murchison, E.P., Partridge, J.F., Tam, O.H., Cheloufi, S., and Hannon, G.J. (2005). Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 12135-12140.
- Murzin, A.G. (1993). OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J* *12*, 861-867.
- Myers, J.W., Jones, J.T., Meyer, T., and Ferrell, J.E., Jr. (2003). Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. *Nat Biotechnol* *21*, 324-328.
- Nakielny, S., and Dreyfuss, G. (1999). Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* *99*, 677-690.
- Nelson, P.T., Hatzigeorgiou, A.G., and Mourelatos, Z. (2004). miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *Rna* *10*, 387-394.
- Neumuller, R.A., Betschinger, J., Fischer, A., Bushati, N., Poernbacher, I., Mechtler, K., Cohen, S.M., and Knoblich, J.A. (2008). Mei-P26 regulates microRNAs and cell growth in the *Drosophila* ovarian stem cell lineage. *Nature* *454*, 241-245.
- Newman, M.A., Thomson, J.M., and Hammond, S.M. (2008). Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA* *14*, 1539-1549.
- Nielsen, C.B., Shomron, N., Sandberg, R., Hornstein, E., Kitzman, J., and Burge, C.B. (2007). Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* *13*, 1894-1910.
- Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J., and Nissen, P. (2004). Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* *5*, 1137-1141.
- Nissan, T., and Parker, R. (2008). Computational analysis of miRNA-mediated repression of translation: implications for models of translation initiation inhibition. *RNA* *14*, 1480-1491.
- Nolde, M.J., Saka, N., Reinert, K.L., and Slack, F.J. (2007). The *Caenorhabditis elegans* pumilio homolog, puf-9, is required for the 3'UTR-mediated repression of the let-7 microRNA target gene, hbl-1. *Dev Biol* *305*, 551-563.
- Nottrott, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* *13*, 1108-1114.

- Obernosterer, G., Leuschner, P.J., Alenius, M., and Martinez, J. (2006). Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA* *12*, 1161-1167.
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., and Tsukihara, T. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* *326*, 1275-1279.
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., and Lai, E.C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* *130*, 89-100.
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev* *18*, 1655-1666.
- Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y.T., and Lai, E.C. (2008). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol* *15*, 354-363.
- Olena, A.F., and Patton, J.G. (2010). Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* *222*, 540-545.
- Olsen, P.H., and Ambros, V. (1999). The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* *216*, 671-680.
- Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Tsuzuki, S., Karpas, A., Kira, S., Yoshida, Y., and Seto, M. (2004). Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* *64*, 3087-3095.
- Pak, J., and Fire, A. (2007). Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science* *315*, 241-244.
- Pall, G.S., and Hamilton, A.J. (2008). Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc* *3*, 1077-1084.
- Park, J.E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D.K., Chang, H., Jee, D., Patel, D.J., and Kim, V.N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* *475*, 201-205.
- Parker, G.S., Eckert, D.M., and Bass, B.L. (2006). RDE-4 preferentially binds long dsRNA and its dimerization is necessary for cleavage of dsRNA to siRNA. *RNA* *12*, 807-818.
- Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2004). Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J* *23*, 4727-4737.
- Parker, R., and Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 121-127.

- Parry, D.H., Xu, J., and Ruvkun, G. (2007). A whole-genome RNAi Screen for *C. elegans* miRNA pathway genes. *Curr Biol* *17*, 2013-2022.
- Patel, R.C., and Sen, G.C. (1998). PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J* *17*, 4379-4390.
- Pawlicki, J.M., and Steitz, J.A. (2008). Primary microRNA transcript retention at sites of transcription leads to enhanced microRNA production. *J Cell Biol* *182*, 61-76.
- Pedersen, J.S., Bejerano, G., Siepel, A., Rosenbloom, K., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S., Kent, J., Miller, W., and Haussler, D. (2006). Identification and classification of conserved RNA secondary structures in the human genome. *PLoS Comput Biol* *2*, e33.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* *21*, 533-542.
- Piao, X., Zhang, X., Wu, L., and Belasco, J.G. (2010). CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Mol Cell Biol* *30*, 1486-1494.
- Pillai, R.S., Artus, C.G., and Filipowicz, W. (2004). Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* *10*, 1518-1525.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* *309*, 1573-1576.
- Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Frendewey, D., Samuelsson, B., and Radmark, O. (2002). Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J* *21*, 5864-5874.
- Qi, H.H., Ongusaha, P.P., Myllyharju, J., Cheng, D., Pakkanen, O., Shi, Y., Lee, S.W., Peng, J., and Shi, Y. (2008). Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature* *455*, 421-424.
- Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., and Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* *123*, 621-629.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., and Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* *11*, 1640-1647.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *403*, 901-906.

- Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 340-349.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* *14*, 1902-1910.
- Ron, D., Chen, C.H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E., and Mochly-Rosen, D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 839-843.
- Ron, D., Jiang, Z., Yao, L., Vagts, A., Diamond, I., and Gordon, A. (1999). Coordinated movement of RACK1 with activated beta1IPKC. *J Biol Chem* *274*, 27039-27046.
- Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* *448*, 83-86.
- Rudel, S., Flatley, A., Weinmann, L., Kremmer, E., and Meister, G. (2008). A multifunctional human Argonaute2-specific monoclonal antibody. *Rna* *14*, 1244-1253.
- Rudel, S., Wang, Y., Lenobel, R., Korner, R., Hsiao, H.H., Urlaub, H., Patel, D., and Meister, G. (2011). Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding. *Nucleic acids research* *39*, 2330-2343.
- Rybak, A., Fuchs, H., Hadian, K., Smirnova, L., Wulczyn, E.A., Michel, G., Nitsch, R., Krappmann, D., and Wulczyn, F.G. (2009). The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat Cell Biol* *11*, 1411-1420.
- Sabin, L.R., Zhou, R., Gruber, J.J., Lukinova, N., Bambina, S., Berman, A., Lau, C.K., Thompson, C.B., and Cherry, S. (2009). Ars2 regulates both miRNA- and siRNA-dependent silencing and suppresses RNA virus infection in Drosophila. *Cell* *138*, 340-351.
- Saito, K., Ishizuka, A., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2005). Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in Drosophila cells. *PLoS Biol* *3*, e235.
- Sakamoto, S., Aoki, K., Higuchi, T., Todaka, H., Morisawa, K., Tamaki, N., Hatano, E., Fukushima, A., Taniguchi, T., and Agata, Y. (2009). The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway. *Mol Cell Biol* *29*, 3754-3769.
- Schirle, N.T., and MacRae, I.J. (2012). The crystal structure of human Argonaute2. *Science* *336*, 1037-1040.
- Schmitter, D., Filkowski, J., Sewer, A., Pillai, R.S., Oakeley, E.J., Zavolan, M., Svoboda, P., and Filipowicz, W. (2006). Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *Nucleic Acids Res* *34*, 4801-4815.

- Schwamborn, J.C., Berezikov, E., and Knoblich, J.A. (2009). The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell* 136, 913-925.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
- Seggeron, K., Tang, L., and Moss, E.G. (2002). Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* 243, 215-225.
- Seitz, H., and Zamore, P.D. (2006). Rethinking the microprocessor. *Cell* 125, 827-829.
- Selbach, M., Schwanhauser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58-63.
- Sempere, L.F., Cole, C.N., McPeck, M.A., and Peterson, K.J. (2006). The phylogenetic distribution of metazoan microRNAs: insights into evolutionary complexity and constraint. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 306, 575-588.
- Sen, G.L., and Blau, H.M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7, 633-636.
- Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C.M., Nissen, P., and Frank, J. (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol* 11, 957-962.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H., and Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107, 465-476.
- Sijen, T., Steiner, F.A., Thijssen, K.L., and Plasterk, R.H. (2007). Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science* 315, 244-247.
- Slaby, O., Svoboda, M., Fabian, P., Smerdova, T., Knoflickova, D., Bednarikova, M., Nenutil, R., and Vyzula, R. (2007). Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* 72, 397-402.
- Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the *LIN-29* transcription factor. *Mol Cell* 5, 659-669.
- Sollner-Webb, B. (1993). Novel intron-encoded small nucleolar RNAs. *Cell* 75, 403-405.

- Song, J.J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* *10*, 1026-1032.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* *305*, 1434-1437.
- Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* *123*, 1133-1146.
- Stefani, G., and Slack, F.J. (2008). Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 219-230.
- Steiner, F.A., Hoogstrate, S.W., Okihara, K.L., Thijssen, K.L., Ketting, R.F., Plasterk, R.H., and Sijen, T. (2007). Structural features of small RNA precursors determine Argonaute loading in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 927-933.
- Su, H., Meng, S., Lu, Y., Trombly, M.I., Chen, J., Lin, C., Turk, A., and Wang, X. (2011). Mammalian hyperplastic discs homolog EDD regulates miRNA-mediated gene silencing. *Mol Cell* *43*, 97-109.
- Suarez, Y., Fernandez-Hernando, C., Yu, J., Gerber, S.A., Harrison, K.D., Pober, J.S., Iruela-Arispe, M.L., Merckenschlager, M., and Sessa, W.C. (2008). Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 14082-14087.
- Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* *460*, 529-533.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C.C. (1999). The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* *99*, 123-132.
- Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H., and Mello, C.C. (2002). The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* *109*, 861-871.
- Takimoto, K., Wakiyama, M., and Yokoyama, S. (2009). Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *RNA* *15*, 1078-1089.
- Tam, O.H., Aravin, A.A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E.P., Cheloufi, S., Hodges, E., Anger, M., Sachidanandam, R., Schultz, R.M., *et al.* (2008). Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* *453*, 534-538.
- Tanzer, A., and Stadler, P.F. (2004). Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol* *339*, 327-335.

Thatcher, E.J., Bond, J., Paydar, I., and Patton, J.G. (2008). Genomic organization of zebrafish microRNAs. *BMC Genomics* 9, 253.

Thermann, R., and Hentze, M.W. (2007). *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* 447, 875-878.

Thomson, J.M., Newman, M., Parker, J.S., Morin-Kensicki, E.M., Wright, T., and Hammond, S.M. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* 20, 2202-2207.

Timmons, L., Court, D.L., and Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263, 103-112.

Tolia, N.H., and Joshua-Tor, L. (2007). Slicer and the argonautes. *Nat Chem Biol* 3, 36-43.

Tomari, Y., Du, T., and Zamore, P.D. (2007). Sorting of *Drosophila* Small Silencing RNAs. *Cell* 130, 299-308.

Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., and Zamore, P.D. (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306, 1377-1380.

Trabucchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, A.D., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., and Rosenfeld, M.G. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* 459, 1010-1014.

Tsutsumi, A., Kawamata, T., Izumi, N., Seitz, H., and Tomari, Y. (2011). Recognition of the pre-miRNA structure by *Drosophila* Dicer-1. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1153-1158.

Van Wynsberghe, P.M., Kai, Z.S., Massirer, K.B., Burton, V.H., Yeo, G.W., and Pasquinelli, A.E. (2011). LIN-28 co-transcriptionally binds primary let-7 to regulate miRNA maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Struct Mol Biol* 18, 302-308.

Vasquez-Rifo, A., Jannot, G., Armisen, J., Labouesse, M., Bukhari, S.I., Rondeau, E.L., Miska, E.A., and Simard, M.J. (2012). Developmental characterization of the microRNA-specific *C. elegans* Argonautes alg-1 and alg-2. *PLoS One* 7, e33750.

Vella, M.C., Choi, E.Y., Lin, S.Y., Reinert, K., and Slack, F.J. (2004). The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev* 18, 132-137.

Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., and Gregory, R.I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* 320, 97-100.

Viswanathan, S.R., Powers, J.T., Einhorn, W., Hoshida, Y., Ng, T.L., Toffanin, S., O'Sullivan, M., Lu, J., Phillips, L.A., Lockhart, V.L., *et al.* (2009). Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet* 41, 843-848.

Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., *et al.* (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 2257-2261.

Walters, R.W., Bradrick, S.S., and Gromeier, M. (2010). Poly(A)-binding protein modulates mRNA susceptibility to cap-dependent miRNA-mediated repression. *RNA* *16*, 239-250.

Wang, B., Yanez, A., and Novina, C.D. (2008a). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 5343-5348.

Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2008b). Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* *456*, 921-926.

Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Wardle, G.S., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2009). Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* *461*, 754-761.

Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* *75*, 855-862.

Wildwater, M., Sander, N., de Vreede, G., and van den Heuvel, S. (2011). Cell shape and Wnt signaling redundantly control the division axis of *C. elegans* epithelial stem cells. *Development* *138*, 4375-4385.

Wu, H., Sun, S., Tu, K., Gao, Y., Xie, B., Krainer, A.R., and Zhu, J. (2010). A splicing-independent function of SF2/ASF in microRNA processing. *Mol Cell* *38*, 67-77.

Wulczyn, F.G., Smirnova, L., Rybak, A., Brandt, C., Kwidzinski, E., Ninnemann, O., Strehle, M., Seiler, A., Schumacher, S., and Nitsch, R. (2007). Post-transcriptional regulation of the *let-7* microRNA during neural cell specification. *FASEB J* *21*, 415-426.

Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D.P., Patterson, H.C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J.M., Kutok, J.L., and Rajewsky, K. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* *9*, 405-414.

Yamagata, K., Fujiyama, S., Ito, S., Ueda, T., Murata, T., Naitou, M., Takeyama, K., Minami, Y., O'Malley, B.W., and Kato, S. (2009). Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. *Mol Cell* *36*, 340-347.

Yamashita, A., Chang, T.C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 1054-1063.

- Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L., and Zhou, M.M. (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426, 468-474.
- Yang, W., Chendrimada, T.P., Wang, Q., Higuchi, M., Seeberg, P.H., Shiekhattar, R., and Nishikura, K. (2006). Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol* 13, 13-21.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-3016.
- Yigit, E., Batista, P.J., Bei, Y., Pang, K.M., Chen, C.C., Tolia, N.H., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M.J., and Mello, C.C. (2006). Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* 127, 747-757.
- Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., and Tomari, Y. (2010). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol* 17, 17-23.
- Yu, J., Wang, F., Yang, G.H., Wang, F.L., Ma, Y.N., Du, Z.W., and Zhang, J.W. (2006). Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 349, 59-68.
- Yuan, Y.R., Pei, Y., Ma, J.B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H.Y., Dauter, Z., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell* 19, 405-419.
- Zdanowicz, A., Thermann, R., Kowalska, J., Jemielity, J., Duncan, K., Preiss, T., Darzynkiewicz, E., and Hentze, M.W. (2009). *Drosophila* miR2 primarily targets the m7GpppN cap structure for translational repression. *Mol Cell* 35, 881-888.
- Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstadt, S., and Izaurralde, E. (2009). The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Mol Cell Biol* 29, 6220-6231.
- Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic acids research* 32, 4776-4785.
- Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X., and Graves, P.R. (2008). Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem J* 413, 429-436.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57-68.
- Zhang, X., and Zeng, Y. (2010). The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and Dicer. *Nucleic acids research* 38, 7689-7697.

Zipprich, J.T., Bhattacharyya, S., Mathys, H., and Filipowicz, W. (2009). Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA* 15, 781-793.

ANNEXES

Annexe 1

- **Tumour-related microRNAs functions in *Caenorhabditis elegans*.**

Jannot G, Simard MJ.

Oncogene. 2006 Oct 9;25(46):6197-201. Review.

Contribution

Cet article de revue a été pensé et écrit en collaboration très étroite avec le Dr Martin Simard

Annexe 2

- **Two molecular features contribute to the Argonaute specificity for the microRNA and RNAi pathways in *C. elegans*.**

Jannot G, Boisvert ME, Banville IH, Simard MJ.

RNA. 2008 May;14(5):829-35. Epub 2008 Mar 26.

Contribution

Voir page 71

Annexe 3

- **The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and humans.**

Jannot G, Bajan S, Giguère NJ, Bouasker S, Banville IH, Piquet S, Hutvagner G, Simard MJ.

EMBO Rep. 2011 Jun;12(6):581-6.

Contribution

Voir page 89

Annexe 4

- **Argonaute pull-down and RISC analysis using 2'-O-methylated oligonucleotides affinity matrices.**

Jannot G, Vasquez-Rifo A, Simard MJ.

Methods Mol Biol. 2011;725:233-49

Contribution

Cet article de méthode a été entièrement réalisé par moi-même. Mon collègue Alejandro a contribué à la correction de l'écriture de l'article.

Annexe 5

- **Developmental characterization of the microRNA-specific *C. elegans* Argonautes alg-1 and alg-2.**

Vasquez-Rifo A, Jannot G, Armisen J, Labouesse M, Bukhari SI, Rondeau EL, Miska EA, Simard MJ.

PLoS One. 2012;7(3):e33750.

Contribution

Dans cet article, j'ai effectué les immunoprécipitations des protéines Argonaute ALG-1 et ALG-2 aux différents stades larvaires suivi de l'extraction d'ARN nécessaire pour l'analyse par micro-puces des microARNs associés (Fig.5, S4)

Annexe 6

- **Polypyrimidine tract binding protein (hnRNP I) is possibly a conserved modulator of miRNA-mediated gene regulation.**

Engels B, Jannot G, Remenyi J, Simard MJ, Hutvagner G.

PLoS One. 2012;7(3):e33144.

Contribution

Dans cet article, j'ai contribué à la figure 6 en créant la souche double mutante let-7ts ; ptb-1 suivi de son analyse phénotypique (Fig 6A).



REVIEW

Tumour-related microRNAs functions in *Caenorhabditis elegans*

G Jannot and MJ Simard

Laval University Cancer Research Center, Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), Québec City, Québec, Canada

Altering cell proliferation and differentiation are usually key events leading to cancer. As originally demonstrated by Sydney Brenner in 1960s, the nematode *Caenorhabditis elegans* represents an animal model of choice to study mechanisms important to maintain proper cellular behaviour. This round worm has helped to elucidate components as well as new cellular pathways required for animal development. Among them, the discovery of the programmed cell death and non-coding RNAs (microRNAs) controlling gene expression are two remarkable examples. Recently, two studies have demonstrated, once again, that using *C. elegans* can help gathering insights on cellular mechanisms leading to tumour formation. Two microRNAs, *miR-84* and *miR-61*, control the expression of the oncogene orthologues *Ras* and *Vav* indicating their capacity to act as tumour suppressors. These observations demonstrate that uncovering the function of microRNAs is important to increase our understanding of cancer.

Oncogene (2006) 25, 6197–6201. doi:10.1038/sj.onc.1209921

Keywords: *C. elegans*; microRNA; *miR-61*; *miR-84*; oncogene

‘Cancer: something evil or malignant that spreads destructively’

This definition took from the Merriam-Webster dictionary depicts perfectly how cancer affects the human population around the world. In order to fight properly this ‘evil’, we need to get a better understanding of how cancer occurs and how it can spread so efficiently. To achieve this task, it is essential to gain insights on how cells can be regulated as defective proliferation and differentiation are directly associated with tumour formation. Among the animal models used by scientists to elucidate the ‘nuts and bolts’ of these cellular processes, a little crawling creature containing less than a thousand cells known as *Caenorhabditis elegans* has been so far extremely successful in providing us important clues on these issues.

Initial studies led by John Sulston and H Robert Horvitz in Sidney Brenner’s laboratory at Cambridge

University, have allowed to obtain a precise and complete lineage of every single cell of an entire animal. This phenomenal work led to the discovery of a critical biological phenomenon essential to contain cell proliferation: apoptosis. Their accomplishments have been acknowledged with the attribution of the Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2002. Because the worm contains less than 1000 cells (959 cells in adult hermaphrodites) and cellular pathways are conserved, *C. elegans* rapidly became a model of choice to study how cells into the animal are regulated precisely in time and space to produce a fertile adult. Indeed, *C. elegans* has allowed the discovery and increased our comprehension of many important cellular pathways required in embryogenesis and during the animal development. Among them, the recent discovery of the microRNAs has completely changed our vision of how gene expression is controlled.

New pathways regulating cell differentiation: the microRNAs

In 1993, a new function has been associated to RNA molecules with the discovery of *lin-4*, a small 22 nucleotides RNA implicated in gene regulation. Conducting a genetic screen to find essential components of the larvae development in *C. elegans*, Victor Ambros and Gary Ruvkun groups found a lesion in one of their mutant in a gene called *lin-4* (abnormal cell *LIN*age), which did not encode any protein but was essential for the developmental timing of the worm (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993). This tiny RNA, called microRNA, inhibits protein accumulation through a non-perfect RNA–RNA interaction with a complementary sequence found in the non-coding region of a specific messenger RNA. This discovery was intriguing because eucaryotic gene regulation was known to be carried out by proteins and not by RNA molecules. Seven years later, another example emerged with the discovery of *let-7* (*LE*Thal), an additional gene implicated in *C. elegans* development (Reinhart *et al.*, 2000). The report of a second example along with the observation that the *let-7* microRNA and its target, *lin-41*, were phylogenically conserved (Pasquinelli *et al.*, 2000) provoked a hunt for the identification of microRNAs in other animal species. These discoveries led to the creation of a new and fertile field of research in biology: the gene regulation by small non-coding RNAs.

Correspondence: Dr MJ Simard, Laval University Cancer Research Center, Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), Québec City, Québec, Canada G1R 2J6.

E-mail: Martin.Simard@crhdq.ulaval.ca

So far, studies performed with *C. elegans* indicate that microRNAs are playing an important role in cellular development. Animals carrying mutations in either *lin-4* or *let-7* microRNAs displayed abnormal body cuticules (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000). Other studies have shown that microRNAs are important in insuring asymmetrical expression of a taste receptor in a pair of sensory neurons in *C. elegans* (Johnston and Hobert, 2003; Chang *et al.*, 2004; Johnston *et al.*, 2005). Furthermore, alteration of specific microRNAs leads to major defects such as improper cell proliferation and tissues differentiation important for the animal development (Abbott *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). Thus, these studies indicate that altering microRNA functions leads to inappropriate cell proliferation and differentiation, a hallmark of cancer.

The development of the vulva is guided by the Ras and the Notch pathways

Studying the vulva development in *C. elegans* contributes to understand biological events important for development of all animals (reviewed by Sternberg, 2005). Genetic screens performed with *C. elegans* have contributed to our understanding of how the Notch and the Ras pathways tightly control cell proliferation and cell differentiation implicated in vulva formation (Figure 1a; for further details see review by Sundaram, 2005). During the post-embryonic development of the nematode, the vulva is formed from six precursor cells (called vulva precursor cells (VPCs)) able to adopt three different fates (Figure 1a). The gonadal anchor cell expresses epidermal growth factor (EGF)/abnormal cell *LIN*3 (LIN-3), which stimulates the EGF receptor (EGFR)/LET-23, the starting point of the Ras/LET-60 activation in the VPC P6.p. This activation of the Ras pathway promotes the first (1°) fate and initiates the second (2°) fate to the neighbouring cells, P5.p and P7.p, by the interaction of the Notch/LIN-12 receptor with its ligand Delta/Serrate/Lag-2 (DSL)/LAG-2 (*Lin-12* And *Glp-1* phenotype) expressed by P6.p. Therefore, every single VPC is under control of different intra- and extracellular signals that initiate their differentiation. The crosstalk between the Ras and the Notch pathway within P5.p, P6.p and P7.p VPCs allows an extremely precise differentiation.

The Ras signaling pathway is the most important pathway controlling cell proliferation in mammals. Mutations in this gene produce an uncontrolled proliferation of cells leading to malignant transformation. The *Ras* gene is frequently mutated in many tumours (reviewed by Malumbres and Barbacid, 2003). In *C. elegans*, components of the Ras signaling pathway are highly conserved and also act as a molecular switch that determine cell fate. As observed in mammals, mutations affecting either the Ras or the Notch pathway in *C. elegans* cause a serious defect in cellular proliferation and differentiation. Mutant strains carrying defect in genes involved in these pathways lead to an absence of vulva or a multiple vulva phenotypes (Figure 1b).

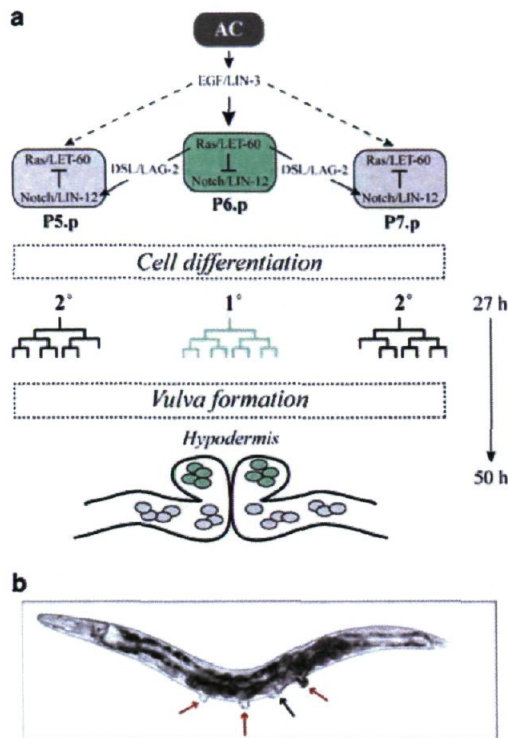


Figure 1 Schematic view of the *C. elegans* vulva formation and vulva defect. (a) A brief description of the *C. elegans* vulva development. The gonadal anchor cell (AC) initiates differentiation through the EGF/LIN-3 signalling pathway of one of the VPC P6.p (in green). Once differentiation is induced, P6.p. cell will release the DSL/LAG-2 protein that will activate the Notch/LIN-12 pathway in the neighbouring cells P5.p and P7.p, to insure their proper differentiation. Thus, only P6.p will adopt the first (1°) vulval fate and P5.p and P7.p precursor cells will adopt the second (2°) vulval fate. Their subsequent proliferation and differentiation will lead to the formation of the functional vulva. The three others VPCs adopting the third (3°) fate will fuse to the hypodermal syncytium (not illustrated). Hours indicate the time after the animal has hatched. The differentiation of six VPCs begins 27 h after the larvae exit the eggshell and the functional vulva is completed 23 h later. (b) Multi vulva phenotype indicates a defect in cell differentiation and proliferation. Nomarski DIC image of a *Ras/let-60(n1046)* mutant. The black arrow indicates de functional vulva and red arrows the extra vulva.

Because the nematode *C. elegans* displays many features that are ideal for model systems (the development of every cell is known with great detail; it has a rapid lifespan; this is a powerful genetic model and; it is extremely simple to work with in a lab environment), its has rapidly been considered as a great animal system to increase our understanding of carcinogenesis. Many proto-oncogenes and tumour suppressors such as Bcl-2 and Retinoblastoma are extensively studied in *C. elegans* (reviewed by Poulin *et al.*, 2004) and the worm has a clear potential to be used for the high-throughput screening of anticancer drugs (Hartwell *et al.*, 1997; Schumacher and Gartner, 2006).

Recently, two studies from Greenwald's group and Slack and collaborators have shown that microRNAs can also act as tumour suppressors by controlling the Notch and the Ras pathways in the vulva development.

The Vav oncogene orthologue, VAV-1, is regulated by *miR-61*

The importance of the Notch signaling pathway in *C. elegans* is clearly illustrated in worm strains carrying gain-of-function alleles. Animals with mutations in the *Notch/lin-12* have multiple vulva instead of one (Sternberg and Horvitz, 1989). That phenotype is caused by a defect in cellular differentiation; all VPCs adopt the second fate. In their quest to understand how Notch/*lin-12* specified the cellular second fate during the vulval development, Yoo and Greenwald (2005) discovered an important role for the microRNA *miR-61*. They first observed that altering *alg-1* gene function (an essential gene for the microRNA pathway (Grishok *et al.*, 2001)) in animal leads to the expression of a third fate marker into P5.p and P7.p. This observation indicates that a microRNA may be implicated in this cellular differentiation pathway. Thus, using bioinformatics approach and fluorescence localization, Yoo and Greenwald (2005) demonstrated that the transcriptional switch in P5.p and P7.p mediated by the *Ras/let-60* pathway in P6.p, induces the specific expression of *miR-61* in these VPCs. The ectopic expression of the microRNA in P6.p cell induces the second cellular fate instead of the first fate. These experiments demonstrate that *miR-61* is crucial for the developmental control of the vulva in *C. elegans*, by either activating or abrogating a signalization pathway. They discovered that the *miR-61* target is the *vav-1* gene, the orthologue of the proto-oncogene Vav in vertebrates. Their data showed that the regulation of *VAV-1* expression by the *miR-61* microRNA keeps Notch/LIN-12 active and, thus insure that the differentiation to the second cellular fate occurs in P5.p and P7.p.

The pro-oncogene Vav gene family includes *vav* 1,2,3 (review in Bustelo, 2001). In vertebrates, *Vav1* is playing a role in many signalization pathways including the NF- κ B and MAP-kinase pathways. Vav is implicated in the development and in the function of B and T lymphocytes (Tarakhovskiy *et al.*, 1995) and immortalized neuroblastoma cell lines have ectopic expression of VAV proto-oncogene (Hornstein *et al.*, 2003). Furthermore, this gene was recently found to be involved in a large number of pancreatic tumours (Denicola and Tuveson, 2005). Despite the fact that Yoo and Greenwald have not observed any link between Vav and microRNA in mammalian cells, their data obtained using *C. elegans* as a model system suggest that microRNAs controls cellular development by regulating oncogene expression.

The Ras protein is regulated by the *let-7* microRNA family

Previous studies have shown that the *let-7* microRNA negatively controls at least two targets genes, *lin-41* (Slack *et al.*, 2000) and hunchback-like gene *hbl-1* (Abrahante *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003). Genetics approaches in *C. elegans* have shown that the

loss-of-function of *let-7* microRNA is partially suppressed by *lin-41* and *hbl-1* mutations (Slack *et al.*, 2000; Abrahante *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003). The partial suppression indicates that other *let-7* targets exist and their identification will help to uncover functions of this microRNA. To achieve this task, Frank Slack's group undertook a computational screen (Grosshans *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005). Among the genes in which *let-7* complementary sites can be found at their 3' untranslated region (3'UTR), they noticed the *let-60* gene, the orthologue of the oncogene *Ras* (Johnson *et al.*, 2005). As observed with *lin-41* and *hbl-1*, the loss-of-function of *Ras/let-60* gene partially suppress *let-7* mutant phenotype indicating the genetic interaction between these two genes. In addition, when a reporter gene fused to the *Ras/let-60* 3'UTR is expressed in the same tissue of the *let-7* microRNA, they observed an important reduction in the expression of the reporter when the animal reach L4 stage, the stage in which *let-7* is expressed (Reinhart *et al.*, 2000). Thus, their data strongly suggest that *Ras/LET-60* is downregulated by *let-7* microRNA or by the members of its family (i.e. highly conserved sequences between members; Lau *et al.*, 2001; Ambros *et al.*, 2003; Grad *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2003).

As described previously, *Ras/let-60* is playing an important role in vulval development. Among the *let-7* genes family, Slack and co-workers showed that the closest homologue of *let-7*, the *miR-84* microRNA, is strongly expressed in the anchor cells and the P5.p and P7.p cells and barely expressed in the P6.p cell; an expression pattern that can favour interaction with *Ras/LET-60* (highly expressed in P6.p). Furthermore, overexpression of *miR-84* induces abnormal development of the vulva. As that *Ras/LET-60* signalling pathway is active in the P6.p cell and *miR-84* express in all VPCs with the exception of P6.p, they wanted to examine if this microRNA could negatively regulates *Ras/let-60* expression in cells that do not undergo the first vulval fate. Mutations causing gain-of-function of *Ras/let-60* lead to the expression of *Ras* gene into all VPCs, the first fate is adopted by non-P6.p cells and thus, the animal shows multiple vulva (Figure 1b; Beitel *et al.*, 1990). When they overexpressed *miR-84*, it suppresses partially the multiple vulva phenotype observed when *Ras/LET-60* is overexpressed. Moreover, by using reporter gene containing the *Ras/let-60* 3'UTR region expressed into the VPC cells, they showed that this region was sufficient to attenuate the reporter expression into the P5.p and P7.p cells. Thus, their data clearly demonstrated members of the *let-7* microRNA family regulate *Ras/let-60* gene expression through the 3'UTR region.

The interesting data observed in *C. elegans* by Slack and co-workers took a greater significance when they looked for the existence of a similar mechanism of regulation of *Ras* genes in human cells. They found the all three human *Ras* genes, *H-Ras*, *K-Ras* and *N-Ras*, have complementary sites for *let-7* and *miR-84* human homologues in their 3'UTRs. As previously observed in *C. elegans*, they showed that the

level expression of a reporter gene carrying these 3'UTRs is downregulated by *let-7*. In addition, when they exogenously provided *let-7* microRNA in a cell line that do not express it or when they blocked the *let-7* function with a sequence-specific inhibitor (Hutvagner *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004), they noticed that the level of endogenous Ras protein is significantly reduced or enhanced, respectively. Based on the data obtained, Slack and co-workers decided to look for a potential correlation between the expression of *let-7* and Ras proteins in cancer tissues. When they first monitored the level of *let-7* in tissues samples from different patients using microarrays analysis, they noticed that tissues from patients with lung cancer have a lower expression of *let-7*. Interestingly, they monitored a significant increase of the level of Ras proteins in tissues with low *let-7* expression. Their data showed that the expression of the *let-7* microRNA inversely correlates with the expression of Ras genes in lung cancer. Interestingly, others have reported that the overexpression of *let-7* inhibited growth of a lung cancer cell line *in vitro* (Takamizawa *et al.*, 2004). These observations strongly suggest the role of the *let-7* microRNA family as a tumour suppressor in animals.

MicroRNAs key players in tumorigenesis: a lesson from worms

These two studies clearly illustrate the importance of the microRNAs to insure the correct role of the Notch and the Ras pathways in the cell proliferation and differentiation implicated in the vulval development in *C. elegans*. As the misregulation of either Notch or Ras level are frequent in human cancers (reviewed by Malumbres and Barbacid, 2003; Radtke and Raj, 2003), data from Greenwald and Slack groups allow to suggest that microRNAs might be directly associated with tumorigenesis implicating the Notch and the Ras pathway. Thus, these observations, and particularly Slack and co-workers paper, implicate microRNAs as tumour suppressors (Figure 2a). A search for microRNAs binding sites in the worm genome indicates that these small RNAs may regulate expression of many oncogenes as well as tumour suppressors (Table 1). Therefore, in addition to their tumour suppressors activities, the microRNAs could also potentially act as oncogenes and increase tumour formation and proliferation. We can envision that a specific microRNA that regulates tumour suppressor, can lead to tumour formation if the microRNA is overexpressed (Figure 2b). The great potential of *C. elegans* as animal model will surely help to better understand microRNAs functions in this regard.

Once again, the tiny crawling creature called *C. elegans* had brought important insights in animal biology and in our comprehension of cancer. Undoubtedly, we can expect many major contributions from the studies undertaken with the nematode in the

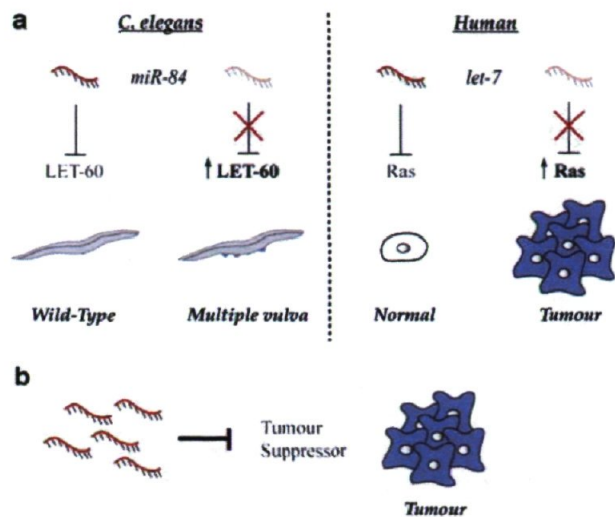


Figure 2 MicroRNAs act as tumour suppressors and oncogenes. (a) The level of Ras protein is regulated by *let-7* microRNA family. In *C. elegans*, *miR-84* restrains *Ras* gene orthologue, *let-60* expression. A significant diminution of *miR-84* expression increases the level of LET-60 protein and, thus leads to multiple vulva phenotype (extra vulva are in purple). In humans, *let-7* microRNA participates to maintain the appropriate cellular Ras protein level. If the microRNA expression is abolished, the amount of the Ras protein will be increase and thus tumours will be generated. (b) Potential role of microRNA as oncogene. The overexpression of microRNA that controls a tumour suppressor expression could lead to tumour formation.

Table 1 Oncogenes and tumour suppressors are potentially regulated by microRNAs

Human gene	<i>C. elegans</i> ortholog	Function	MicroRNAs
<i>Abl</i>	<i>abl-1</i>	Proto-oncogene	<i>miR-259 miR-71 miR-44 miR-238 miR-261 miR-353</i>
<i>Cbl-b</i>	<i>sli-1</i>	Proto-oncogene	<i>miR-239</i>
<i>Bcl-2</i>	<i>ced-9</i>	Proto-oncogene	<i>miR-271</i>
<i>Fyn</i>	<i>src-1</i>	Proto-oncogene	<i>miR-63 miR-65 miR-230 miR-64 miR-66 miR-228 miR-246 miR-43 miR-272</i>
<i>Mek2</i>	<i>mek-2</i>	Proto-oncogene	<i>miR-258</i>
<i>Raf</i>	<i>lin-45</i>	Proto-oncogene	<i>miR-258 miR-355 miR-247 miR-232 miR-70</i>
<i>p53</i>	<i>cep-1</i>	Tumour suppressor	<i>Let-7 family members</i>
<i>pRB</i>	<i>lin-35</i>	Tumour suppressor	<i>miR-61</i>
<i>Ras</i>	<i>let-60</i>	Proto-oncogene	
<i>Vav</i>	<i>vav-1</i>	Proto-oncogene	

Many microRNAs are predicted to target proto-oncogenes and tumour suppressors. *C. elegans* genes that are orthologues to mammalian genes involved in cancer development have been screened for potential microRNAs complementary sites using the miRBase Targets program available on the Wellcome Trust Sanger Institute website (<http://microRNA.sanger.ac.uk/targets/v3/>). The new microRNA targets described in this review are highlighted in red.

near future that will bring us closer to tackle this serious disease.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Jean-Yves Masson, Dr Gyorgy Hutvagner and members of the Simard laboratory for

comments on the manuscript. The *Ras/let-60* mutant strain has been kindly provided by Dr Christian Rocheleau. This work is supported by the Institute of Genetics from Canadian

Institutes of Health Research (CIHR). MJS is a Junior 1 scholar from the Fonds en Recherche de la Santé du Québec (FRSQ).

References

- Abbott AL, Alvarez-Saavedra E, Miska EA, Lau NC, Bartel DP, Horvitz HR *et al.* (2005). The *let-7* microRNA family members *mir-48*, *mir-84*, and *mir-241* function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell* **9**: 403–414.
- Abrahante JE, Daul AL, Li M, Volk ML, Tennessen JM, Miller EA *et al.* (2003). The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. *Dev Cell* **4**: 625–637.
- Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. (2003). MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol* **13**: 807–818.
- Beitel GJ, Clark SG, Horvitz HR. (1990). *Caenorhabditis elegans* *Ras* gene *let-60* acts as a switch in the pathway of vulval induction. *Nature* **348**: 503–509.
- Bustelo XR. (2001). Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene* **20**: 6372–6381.
- Chang S, Johnston Jr RJ, Frokjaer-Jensen C, Lockery S, Hobert O. (2004). MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. *Nature* **430**: 785–789.
- Denicola G, Tuveson DA. (2005). VAV1: a new target in pancreatic cancer? *Cancer Biol Ther* **4**: 509–511.
- Grad Y, Aach J, Hayes GD, Reinhart BJ, Church GM, Ruvkun G *et al.* (2003). Computational and experimental identification of *C. elegans* microRNAs. *Mol Cell* **11**: 1253–1263.
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I *et al.* (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**: 23–34.
- Grosshans H, Johnson T, Reinert KL, Gerstein M, Slack FJ. (2005). The temporal patterning microRNA *let-7* regulates several transcription factors at the larval to adult transition in *C. elegans*. *Dev Cell* **8**: 321–330.
- Hartwell LH, Szankasi P, Roberts CJ, Murray AW, Friend SH. (1997). Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science* **278**: 1064–1068.
- Hornstein I, Pikarsky E, Groysman M, Amir G, Peylan-Ramu N, Katzav S. (2003). The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is expressed in a subset of human neuroblastomas. *J Pathol* **199**: 526–533.
- Hutvagner G, Simard MJ, Mello CC, Zamore PD. (2004). Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* **2**: E98.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A *et al.* (2005). RAS is regulated by the *let-7* microRNA family. *Cell* **120**: 635–647.
- Johnston Jr RJ, Chang S, Etchberger JF, Ortiz CO, Hobert O. (2005). MicroRNAs acting in a double-negative feedback loop to control a neuronal cell fate decision. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 12449–12454.
- Johnston RJ, Hobert O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **426**: 845–849.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**: 858–862.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**: 843–854.
- Li M, Jones-Rhoades MW, Lau NC, Bartel DP, Rougvie AE. (2005). Regulatory mutations of *mir-48*, a *C. elegans* *let-7* family microRNA, cause developmental timing defects. *Dev Cell* **9**: 415–422.
- Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW *et al.* (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* **17**: 991–1008.
- Lin SY, Johnson SM, Abraham M, Vella MC, Pasquinelli A, Gamberi C *et al.* (2003). The *C. elegans* hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable microRNA target. *Dev Cell* **4**: 639–650.
- Malumbres M, Barbacid M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* **3**: 459–465.
- Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, Tuschl T. (2004). Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA* **10**: 544–550.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B *et al.* (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**: 86–89.
- Poulin G, Nandakumar R, Ahringer J. (2004). Genome-wide RNAi screens in *Caenorhabditis elegans*: impact on cancer research. *Oncogene* **23**: 8340–8345.
- Radtke F, Raj K. (2003). The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* **3**: 756–767.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE *et al.* (2000). The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**: 901–906.
- Schumacher B, Gartner A. (2006). Translational regulation of p53 as a potential tumor therapy target. *Future Oncol* **2**: 145–153.
- Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. (2000). The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* **5**: 659–669.
- Sternberg PW. (2005). Vulval development. In: Wormbook (ed). *The C. elegans Research Community*. WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.6.1, <http://www.wormbook.org>.
- Sternberg PW, Horvitz HR. (1989). The combined action of two intercellular signaling pathways specifies three cell fates during vulval induction in *C. elegans*. *Cell* **58**: 679–693.
- Sundaram MV. (2005). The love-hate relationship between Ras and Notch. *Genes Dev* **19**: 1825–1839.
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H *et al.* (2004). Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* **64**: 3753–3756.
- Tarakhovskiy A, Turner M, Schaal S, Mee PJ, Duddy LP, Rajewsky K *et al.* (1995). Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. *Nature* **374**: 467–470.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**: 855–862.
- Yoo AS, Greenwald I. (2005). LIN-12/Notch activation leads to microRNA-mediated down-regulation of Vav in *C. elegans*. *Science* **310**: 1330–1333.



RNA
A PUBLICATION OF THE RNA SOCIETY

Two molecular features contribute to the Argonaute specificity for the microRNA and RNAi pathways in *C. elegans*

Guillaume Jannot, Marie-Eve L. Boisvert, Isabelle H. Banville, et al.

RNA 2008 14: 829-835

Access the most recent version at doi:10.1261/rna.901908

References

This article cites 24 articles, 6 of which can be accessed free at:
<http://rnajournal.cshlp.org/content/14/5/829.full.html#ref-list-1>

Article cited in:

<http://rnajournal.cshlp.org/content/14/5/829.full.html#related-urls>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or [click here](#)

To subscribe to RNA go to:
<http://rnajournal.cshlp.org/subscriptions>

REPORT

Two molecular features contribute to the Argonaute specificity for the microRNA and RNAi pathways in *C. elegans*

GUILLAUME JANNOT, MARIE-EVE L. BOISVERT, ISABELLE H. BANVILLE, and MARTIN J. SIMARD

Laval University Cancer Research Centre, Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), Québec City, Québec G1R 2J6, Canada

ABSTRACT

In *Caenorhabditis elegans*, specific Argonaute proteins are dedicated to the RNAi and microRNA pathways. To uncover how the precise Argonaute selection occurs, we designed dsRNA triggers containing both miRNA and siRNA sequences. While dsRNA carrying nucleotides mismatches can only enter the miRNA pathway, a fully complementary dsRNA successfully rescues *let-7* miRNA function and initiates silencing by RNAi. We demonstrated that RDE-1 is essential for RNAi induced by the perfectly paired trigger, yet is not required for silencing by the *let-7* miRNA. In contrast, ALG-1/ALG-2 are required for the miRNA function, but not for the siRNA-directed gene silencing. Finally, a dsRNA containing a bulged miRNA and a perfectly paired siRNA can enter both pathways suggesting that the sorting of small RNAs occurs after that the dsRNA trigger has been processed by Dicer. Thus, our data suggest that the selection of Argonaute proteins is affected by two molecular features: (1) the structure of the small RNA duplex; and (2) the Argonautes specific characteristics.

Keywords: Argonaute; ALG-1; ALG-2; RDE-1; RNAi, microRNA

INTRODUCTION

In animals, the RNAi and the microRNA (miRNA) pathways lead to different outcomes. The RNAi pathway degrades specifically the messenger RNA (mRNA), which is fully complementary to the siRNA embedded in the RISC complex, while miRNA, partially complementary to the untranslated region of the mRNA, will not initiate specific target cleavage but instead will abrogate protein synthesis. Among the cellular factors associated with these processes, members of the Argonaute gene family have been shown to be exclusively associated with either the miRNA or the RNAi pathway. In *Drosophila melanogaster*, Ago1 is associated with miRNA (Okamura et al. 2004) and Ago2 is essential for the RNAi pathway (Hammond et al. 2001). In the nematode *Caenorhabditis elegans*, genetic studies demonstrated that the Argonaute *rde-1* gene is strictly required for RNAi (Tabara et al. 1999) and two Argonaute family members *alg-1* and *alg-2* are essential for the miRNA

pathway but have no role into the RNAi pathway (Grishok et al. 2001). Furthermore, recent biochemical data have revealed that RDE-1 is associated with siRNAs (Yigit et al. 2006) and ALG-1 and ALG-2 are associated with miRNAs (Hutvagner et al. 2004). One reason of this disparity could be that trigger molecules are recognized by specific factors that "imprint" the RNA molecule and guide it to the appropriate Argonaute protein and consequently to the appropriate outcome.

To address the role played by the double-stranded RNA (dsRNA) triggers on the Argonaute selection, we designed different dsRNA molecules containing both miRNA and siRNA. Our analysis suggests that the molecular feature of the dsRNA triggers as well as the molecular characteristics of Argonaute proteins contribute to the proper selection of Argonaute in their respective silencing pathways in *C. elegans*.

RESULTS AND DISCUSSION

A small dsRNA trigger able to enter both miRNA and RNAi pathways

To perform this study, we have generated small dsRNA molecules that contain both the *let-7* miRNA sequence and

Reprint requests to: Martin J. Simard, Laval University Cancer Research Centre, Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), Québec City, Québec G1R 2J6, Canada; e-mail: Martin.Simard@crhdq.ulaval.ca; fax: (418) 691-5439

Article published online ahead of print. Article and publication date are at <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.901908>.

an siRNA fully complementary to the *gfp* mRNA (Fig. 1A). To monitor the capacity of the chimeric dsRNA molecule to generate a functional miRNA, we used a *C. elegans* strain that carries a thermosensitive (*ts*) allele of the *let-7* gene (Reinhart et al. 2000). We can then provide functional copies of *let-7* miRNA by injecting the chimeric dsRNA into the animals and observe if we can rescue *let-7* loss-of-function phenotypes at the nonpermissive temperature. When the *let-7^{ts}* animals are injected with the dsRNA chimeric trigger and then shifted to the nonpermissive temperature, more than 50% of these animals had progeny (Fig. 1B). In contrast, when noninjected L3 larvae stage

animals are shifted to 25°C or when animals are injected with nonrelated dsRNA molecules (data not shown), all of the *let-7^{ts}* animals display bursting vulva phenotype and only 5% of the shifted animals provide few F₁ progeny (Fig. 1B). Thus, our data indicate that a fully complementary double-stranded trigger can efficiently rescue the loss of function of a specific miRNA.

We next examined the potential of the fully complementary dsRNA chimeric molecule to enter the RNAi pathway and initiate a specific RNA silencing response. To address this issue, we used the previously described dsRNA trigger that contains an siRNA that is fully complementary

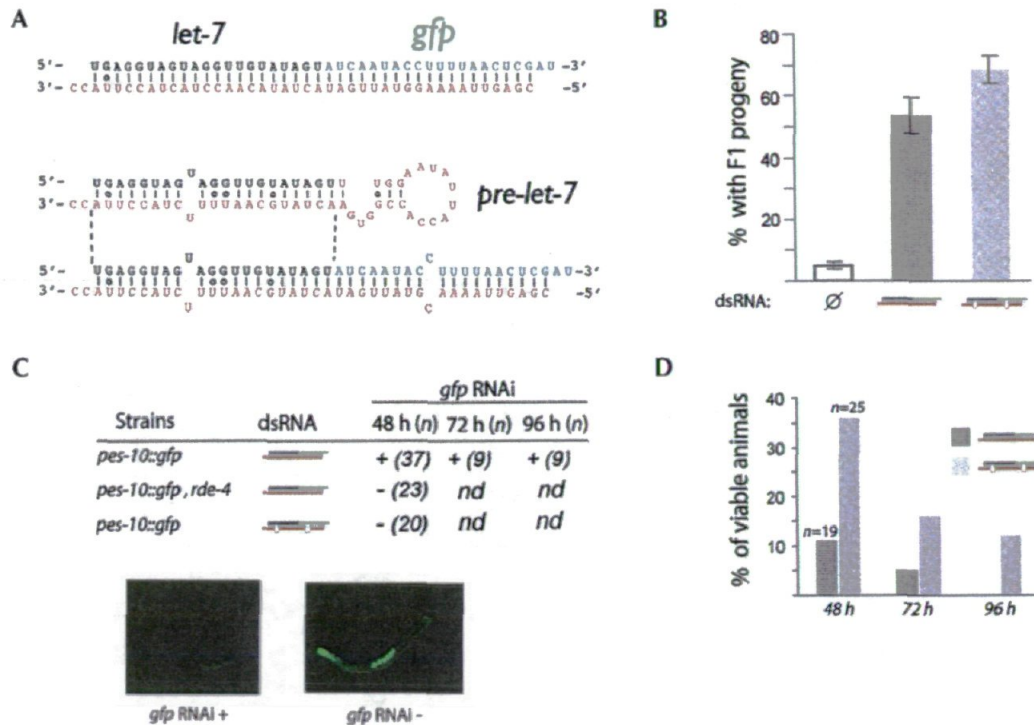


FIGURE 1. Chimeric dsRNA molecules trigger both microRNA and RNAi pathways in *C. elegans*. (A) Diagram of chimeric double-stranded RNA triggers. Chemically synthesized RNA oligos were annealed to generate the dsRNA molecule that contains *let-7* miRNA (black strand) and an siRNA targeting *gfp* mRNA (green strand). The presence of a 2 nt 3' overhang ensures precise cleavage by Dicer to generate functional 21-nt-long *let-7* miRNA and GFP siRNA (Han et al. 2006). The Wobble base pairing found in the hairpin *let-7* miRNA precursor molecule (Pasquinelli et al. 2000) was transferred into the chimeric dsRNA molecule structure to favor the loading of the *let-7* miRNA into the miRISC complex. The asymmetry rule (Schwarz et al. 2003) has also been observed for the design of the portion of the dsRNA molecule that generates the GFP siRNA. To generate the unpaired dsRNA duplex, a portion of the stem of *let-7* precursor (*pre-let-7*) has been reproduced into the dsRNA trigger and the mismatch at the ninth position of the sense strand has also been inserted into the GFP siRNA. (B) dsRNA molecules rescue *let-7* miRNA function. The animals shifted to the nonpermissive temperature (25°C) generating more than three F₁ progeny are scored as rescued. The error bars represent the 95% confidence interval from three independent experiments where between 20 and 30 animals have been scored. (C) Only the fully complementary chimeric dsRNA molecule can initiate RNAi response. The GFP signal is monitored with a GFP stereomicroscope. The (+) indicates that the RNAi is functional (absence of GFP signal) while (-) indicates that the RNAi is deficient (strong expression of GFP) in animals. Ninety-six hours after the dsRNA injection, the GFP signal is still undetectable under the microscope. The number (n) of animals observed is indicated within the parenthesis. All animals observed for each strain displayed the same GFP level. Representative pictures of injected *pes-10::gfp* animals are shown to illustrate a functional (+) or deficient (-) RNAi response. (D) The *let-7* miRNA rescue is rapidly attenuated. Viable animals are scored every 24 h after being transferred for 48 h at nonpermissive temperature (25°C). While nearly all animals from the *let-7^{ts}* strain die after 48 h at nonpermissive temperature from a burst vulva (Reinhart et al. 2000), the phenotype is delayed in animals injected with chimeric dsRNA molecules. All injected animals with fully complementary dsRNA duplex displayed bursting vulva phenotype after 96 h. Numbers (n) of animals observed are indicated.

to a 21 nucleotide (nt) region of the *gfp* mRNA (Fig. 1A). When transgenic animals carrying the *gfp* gene are injected with the trigger chimera, the green fluorescence signal is rapidly silenced in the animal body (Fig. 1C). To confirm that the RNAi pathway mediates the GFP silencing, we injected the dsRNA molecule in animals carrying a null allele of the *rde-4* gene, an essential component of the RNAi in *C. elegans* that binds dsRNA molecules (Tabara et al. 2002; Parker et al. 2006). In these animals, the injection of the dsRNA molecule did not affect the fluorescence level observed (Fig. 1C), indicating that the GFP siRNA produced from the processing of the chimeric dsRNA is entering the RNAi pathway to silence efficiently the targeted mRNA.

We therefore conclude that we have successfully generated a dsRNA trigger that can effectively rescue both miRNA function and specifically silence an mRNA through the RNAi pathway.

Mismatches in the dsRNA trigger increase the *let-7* rescue but circumvent the RNAi capacity

Next, we addressed whether the nature of the dsRNA trigger may affect its capacity to be introduced into the miRNA and RNAi pathway. We then modified the fully complementary dsRNA molecule to generate a dsRNA trigger containing a single mismatch in both *let-7* and GFP siRNA duplexes that mimic the one found in the stem portion of the *let-7* miRNA precursor (Fig. 1A). As opposed to noninjected animals, 69% of the animal population injected with this molecule can reach the L4-adult transition and give many F₁ progeny (Fig. 1B). In comparison with the fully complementary molecule, animals injected with the dsRNA trigger containing mismatches led to a better rescue of *let-7* miRNA (Fig. 1B). On the other hand, the transgenic animals carrying GFP gene, and injected with the dsRNA trigger containing mismatches, did not display any RNAi response contrasting the silencing observed in animals injected with the fully complementary dsRNA molecules (Fig. 1C). The increased rescue activity of a dsRNA trigger that can only enter the miRNA pathway suggests that RNAi and miRNA initiating complexes may compete for loading their respective Argonautes with small RNAs when the dsRNA trigger carried fully base-paired nucleotides (see model in Fig. 4, below).

In addition, we also observed that the rescue of the *let-7ts* animals with dsRNA molecules only lasts less than 96 h after injection (72 h for the fully complementary dsRNA and 96 h with the dsRNA containing mismatches; Fig. 1D). In contrast, the fully complementary dsRNA molecule initiates an RNAi response that can be maintained throughout the life span of the injected animals (Fig. 1C; data not shown). These data suggest that the miRNA complex has an extremely rapid turnover while the siRNA complex may act during multiple rounds of mRNA cleavage. Thus, the

cleavage may initiate amplification of the RNAi response by RNA-dependent RNA polymerase (Pak and Fire 2007; Sijen et al. 2007). Accordingly, we observed that the RNA-dependent RNA polymerase *rrf-1* is not required for *let-7* miRNA rescue (Fig. 2A) but is important for RNAi (Fig. 2B).

From these observations, we conclude that the presence of unpaired nucleotides in the dsRNA trigger abrogates its capacity to enter the RNAi pathway but increases its capacity to initiate the miRNA pathway.

The dsRNA trigger is not the only molecular cue that guides the specific requirement of Argonaute proteins

In RNAi, a perfect base-paired dsRNA molecule initiates the targeted mRNA degradation. On the other hand, the imperfect stem-loop structure of the miRNA leads to translational inhibition. In previous studies, we have shown that the Argonaute RDE-1 interacts with siRNAs (Yigit et al. 2006) while ALG-1 and ALG-2 Argonaute proteins are associated with the *let-7* miRNA (Hutvagner et al. 2004). Therefore, the distinctive outcomes of these two RNA silencing pathways may be mediated by the molecular feature of their triggers (bulged or perfectly paired dsRNAs) or may be associated with their specific Argonaute proteins. To address this possibility, we used the fully symmetrical and perfectly paired dsRNA trigger that efficiently produced

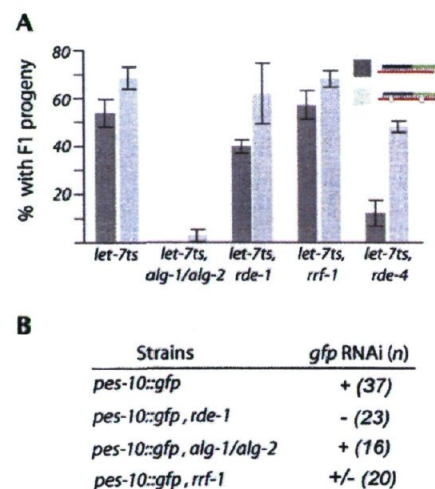


FIGURE 2. The Argonaute proteins are sorted properly into their respective pathways. (A) The rescue of *let-7* loss of function by both dsRNA triggers necessitates ALGs. Once injected by indicated dsRNA triggers, animals are scored at nonpermissive temperature for the presence of F₁ progeny (greater than three). The error bars represent the 95% confidence interval (as in Fig. 1B). (B) The RNAi initiated by the fully complementary trigger requires *rde-1* and necessitates partially the RNA-dependent RNA polymerase *rrf-1* (GFP silencing is noted but not as efficient as in the *pes-10::gfp* animals [see Fig. 1C]). Numbers (n) of animals observed are indicated. All animals observed for each strain displayed the same GFP level.

miRNA as well as RNAi responses (Fig. 1B, C). We thus generated *let-7ts* strains carrying either nonfunctional *rde-1* gene or *alg-1* and *alg-2* genes and addressed whether or not *rde-1* and/or *alg-1/alg-2* are important for the *let-7* rescue by the chimeric dsRNA molecule. Despite the fact that the dsRNA provided is perfectly base-paired, the rescue of the *let-7* miRNA does not require RDE-1 but requires the presence of ALGs (Fig. 2A). Interestingly, we observed that in contrast to the chimeric molecule containing mismatches, the fully base-paired dsRNA necessitates the dsRNA binding protein RDE-4 (Fig. 2A). These data support that RDE-4 is important to promote Dicer cleavage of perfectly base-paired dsRNA trigger (see model in Fig. 4, below).

In parallel, we also tested the Argonaute proteins requirement for the RNAi-induced response by the trigger chimera. When GFP positive animals lacking functional *alg-1* and *alg-2* genes are injected with the dsRNA trigger, we observe a complete disappearance of the green fluorescent signal as the wild-type animals expressing GFP (Fig. 2B). However, when the animals are lacking functional alleles of the *rde-1* gene, the dsRNA trigger does not alter the expression of the green fluorescence protein (Fig. 2B).

Thus, although we are using a dsRNA trigger able to enter both small RNA pathways, they still necessitate their Argonaute proteins, suggesting that RDE-1 and ALGs have molecular characteristics that confer their specific requirements for the RNAi and the miRNA pathway.

The sorting of small RNAs may occur after Dicer cleavage

So far, our data indicate that the presence of mismatched nucleotides affects the capacity of dsRNA triggers to initiate RNAi response and that a perfectly paired dsRNA molecule can effectively enter both miRNA and RNAi pathways but still requires the appropriate Argonaute proteins (ALGs or RDE-1, respectively). Thus, the sorting of small RNAs can be produced by specific dsRNA binding proteins that will commit the dsRNA trigger to either the RNAi or miRNA pathway or they can be sorted after Dicer cleavage.

To address whether the sorting of small RNAs occurs prior to or after Dicer mediated maturation of the dsRNA trigger, we generated a dsRNA trigger that contains a bulged *let-7* dsRNA and a perfectly paired GFP siRNA (Fig. 3A). As observed with other dsRNA triggers, the new dsRNA trigger can rescue the *let-7* miRNA loss-of-function phenotype observed when the *let-7ts* allele is shifted to the nonpermissive temperature (Fig. 3B). Interestingly, even if the dsRNA trigger contained unpaired nucleotides, the presence of a perfectly paired siRNA is sufficient to initiate silencing of the targeted *gfp* mRNA (Fig. 3C). In addition, because the fully base-paired molecule requires RDE-4 as well as the Argonaute ALGs to rescue *let-7* function (Fig. 2A), these observations strongly support that the recogni-

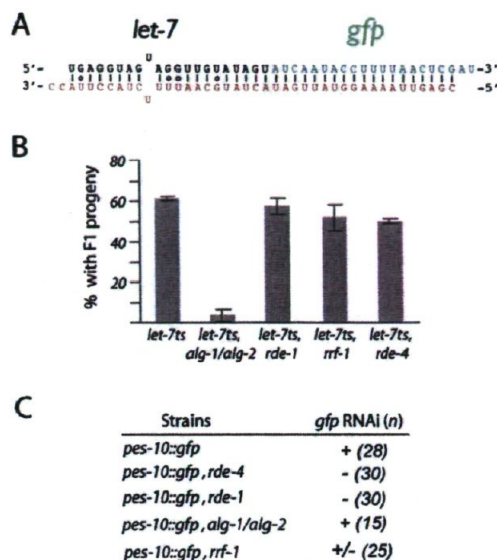


FIGURE 3. Sorting of small RNAs occurs after Dicer cleavage. (A) Diagram of double-stranded RNA trigger containing bulged *let-7* miRNA (black strand) and perfectly paired GFP siRNA (green strand). (B) The bulged/perfectly paired dsRNA can rescue *let-7* loss of function and requires ALGs. Once injected, animals are scored at nonpermissive temperature for the presence of F₁ progeny (greater than three). The error bars represent the 95% confidence interval (as in Fig. 1B). (C) The dsRNA trigger containing perfectly paired siRNA can perform RNAi. The GFP silencing requires *rde-1* and necessitates partially the RNA-dependent RNA polymerase *rrf-1* (as observed in Fig. 2B). Numbers (n) of animals observed are indicated. All animals observed for each strain displayed the same GFP level.

tion of the dsRNA trigger by dsRNA binding protein does not significantly affect the selection of Argonaute proteins.

Therefore, our data indicate that the sorting of small RNAs may occur after Dicer processes the dsRNA trigger in *C. elegans*, as very recently reported in *Drosophila* (Forstemann et al. 2007; Tomari et al. 2007).

The dsRNA structures and their distinct molecular features affect Argonaute protein selection

Taken together, our data indicate that the selection of Argonaute proteins occurs at two different levels. First, dsRNA molecules containing mismatches can only enter the miRNA pathway, while perfectly paired dsRNAs are the only molecules generating an Argonaute complex able to perform RNAi. Second, our experiments using a fully complementary dsRNA trigger demonstrate that, although the same molecule enters both miRNA and RNAi pathways, the specific requirement of the Argonaute genes is not altered. Third, when a dsRNA molecule contains a bulged miRNA and perfectly paired siRNA duplexes, it can effectively enter both miRNA and RNAi pathways. Thus, our data strongly suggest that the nature of the dsRNA molecule is not the only step that influences sorting of the Argonaute proteins for miRNA and RNAi pathways but their specific associations

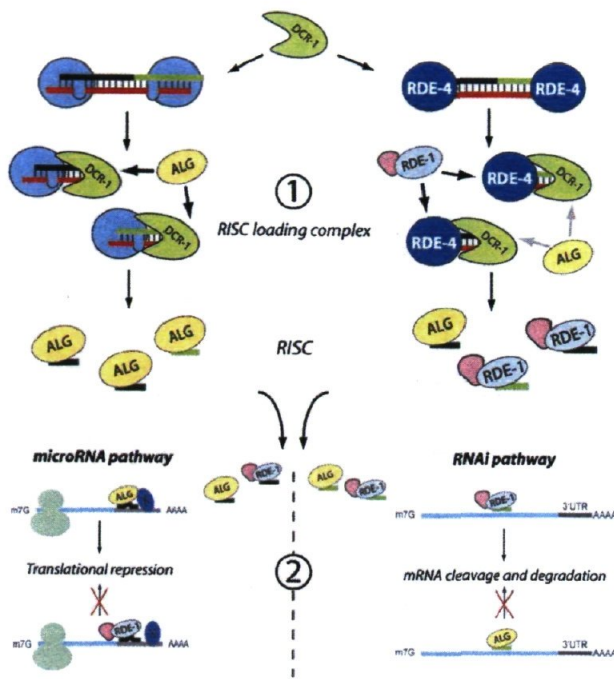


FIGURE 4. Model for the Argonaute proteins selection in *C. elegans*. The sequence complementarity of the double-stranded (ds)RNA duplex represents the first step that influences the Argonaute selection (1). Fully base-paired dsRNA molecules are recognized by the dsRNA binding protein Dicer (DCR-1) to induce dsRNA trigger cleavage (*right* panel). The presence of RDE-4 on the small RNA duplex processed by DCR-1 might favor the recruitment of RDE-1 over ALGs into the RISC loading complex. Therefore, the majority of RISC complex produced by complementary siRNA duplexes are associated to RDE-1. In contrast, dsRNA duplexes containing mismatched nucleotides are not bound by RDE-4 but instead by another dsRNA binding protein that will favor the recruitment of ALGs to the RISC complex (*left* panel). Once Argonaute/small RNA complexes are formed, a second step of Argonaute selection occurs at the target level (2). The functionality of the Argonaute protein in either the miRNA pathway (*left* panel) or the RNAi pathway (*right* panel) may be dictated by their enzymatic activity as observed in *Drosophila* (Forstemann et al. 2007) and/or can be mediated by specific interactions with cellular factors associated with the targeted mRNA (X factor on the *left* panel) or by direct interaction with the Argonaute protein prior to the interaction with the mRNA (pink object). Thus, it is only when the small RNA/Argonaute complex is associated to the target and interacts with specific factors that the translational repression or the mRNA cleavage and degradation occur.

with either of these RNA silencing pathways is also influenced by their molecular features.

The Argonaute proteins are essential for all RNA silencing pathways discovered so far in eukaryotes (reviewed in Hutvagner and Simard 2008). The presence of many members of this family suggests specific roles associated with each one of them. In mammals, all four Argonaute proteins can bind miRNAs and siRNAs, but only hAgo2 has the capacity to induce endonucleolytic cleavage of the targeted mRNA (Liu et al. 2004; Meister et al. 2004). This difference may be explained by the fact that

only hAgo2 possesses the catalytic residues essential for the “slicing” activity in its Piwi domain (Rivas et al. 2005). In flies, *ago1* mutants are defective in the miRNA pathway but not in siRNA-directed cleavage, whereas *ago2* mutants are defective in the RNAi pathway but not in miRNA silencing (Okamura et al. 2004).

As observed in flies, *C. elegans* has distinct requirements for Argonaute proteins in siRNA or miRNA-directed RNA silencing. Genetic studies have demonstrated that the Argonaute RDE-1 is essential for the RNAi pathway (Tabara et al. 1999) while ALG-1 and ALG-2 are important for the miRNA pathway (Grishok et al. 2001). Moreover, the overexpression of Argonautes required for the miRNA pathway cannot rescue the loss of the *rde-1* gene for the RNAi response (Yigit et al. 2006). To explain this Argonaute specificity, we hypothesized that the molecular characteristics of dsRNA triggers may be crucial for the Argonaute choice. Our current findings demonstrate that a dsRNA duplex that mimics the unpaired miRNA precursor can influence its capacity to either enter the RNAi or the miRNA pathways. The capacity of a dsRNA duplex structure to partition small RNAs between Argonaute proteins has also been observed in *Drosophila* (Forstemann et al. 2007; Tomari et al. 2007). Using biochemical assays, they have observed that a single mismatch in the RNA duplex weakens the binding of the Ago2 loading complex (Tomari et al. 2007). Interestingly, it has been recently observed in *C. elegans* that the presence of mismatches in the dsRNA trigger will favor the binding of ALG-1 to the small RNA instead of the RDE-1 binding (Steiner et al. 2007). Our experiments now indicate that the presence of a single mismatch into the small RNA duplex affects the sorting of small RNAs after the cleavage of the dsRNA trigger by Dicer. We can then envision that binding of the RDE-1 loading complex to a small RNA duplex containing mismatches is less efficient, like the Ago2 loading complex, as observed in *Drosophila*. Thus, our data, supported by these recent independent experiments, uncover the importance of the dsRNA molecular features to sort functionally distinct Argonaute proteins in animals.

In addition, our data also demonstrate that when a fully complementary dsRNA molecule is used, small RNAs processed from that molecule can enter both miRNA and RNAi pathways. Therefore, the source of the dsRNA trigger does not affect the selective association of Argonaute proteins with either the miRNA or the siRNA pathways. Recent observations in *Drosophila* suggest that the difference between Ago1 (miRNA pathway) and Ago2 (RNAi pathway) may be explained by the inefficient capacity of Ago1 to induce mRNA cleavage (Forstemann et al. 2007). Therefore, it has been proposed that Ago1 requires mismatches within the seed region of the small RNA duplex to generate a functional RISC complex (Tomari et al. 2007). Despite the fact that the Piwi domains of RDE-1 and ALGs Argonautes display the critical amino acids required for

endonucleolytic cleavage (Yigit et al. 2006), the contribution of their cleavage activities to the RISC loading complex has not been demonstrated yet. Contrasting with Ago1 in *Drosophila*, ALGs proteins can mediate translational repression with an miRNA generate from a perfectly base-paired small RNA duplex (Figs. 1B, 2A). Therefore, our data support that in *C. elegans*, ALGs can generate a functional RISC complex from small RNA duplexes irrespective of the presence of unpaired nucleotides within their seed regions.

The association of the Argonaute complexes with targeted mRNAs may also contribute to selecting the proper Argonaute protein. The exclusive specificity of Argonaute proteins in *C. elegans* in the RNAi and miRNA pathways may be attributed to unique molecular partners for RDE-1 and ALGs, as observed for human Ago1 and Ago2 (Meister et al. 2005). These specific interactions may occur prior to or during the period in which the Argonaute/small RNA complex enters in association with the mRNA target (Fig. 4).

Based on our observations and recently published experiments, we propose that the specific selection of Argonaute proteins for the miRNA and RNAi pathways in *C. elegans* is controlled at two different levels. Initially, the Argonaute RDE-1 favors small RNAs derived from the perfect dsRNA duplex while ALGs favor RNAs produced from the bulged dsRNA duplex (but can still accept small RNAs produced from both types of RNA duplexes). The small RNA binding specificity of these Argonaute proteins can be dictated by their respective loading complexes. For RDE-1, the specificity for the RNAi pathway may come from RDE-4, a double-stranded RNA binding protein found in complex with RDE-1 (Tabara et al. 2002; Duchaine et al. 2006); while ALGs, the Argonautes specific to the miRNA pathway, may be influenced by a yet unknown dsRNA binding protein similar to *Drosophila* Loquacious (Forstemann et al. 2005). In addition, the presence of a central mismatch in the small RNA duplex may destabilize the RDE-4 interaction as recently observed for R2D2, the dsRNA binding protein associated with the RNAi pathway in *Drosophila* (Tomari et al. 2007). Once functional Argonaute/small RNA complexes are formed, molecular interactions with specific proteins and/or with the targeted mRNA will influence their capacity to initiate either RNAi or miRNA responses (Fig. 4).

We believe that extensive biochemical studies and complex analysis of the Argonaute ALGs and RDE-1 proteins will explain how they can specifically alter protein synthesis by miRNAs and mediate specific mRNA degradation guided by siRNAs.

MATERIALS AND METHODS

Design and preparation of dsRNA molecules

All RNA oligonucleotides were obtained from Integrated DNA Technologies, Inc. Oligos sequences are the following:

5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUAUCAAUACCUUUUAAC UCGAU-3' (*let-7/GFP*);
 5'-CGAGUAAAAGGUAUUGAUACUAUACAACCUACUACC UUACC-3' (*let-7/GFP* reverse);
 5'-CGAGUAAAACGUAUUGAUACUAUGCAAUUUUCUACC UUACC-3' (*let-7/GFP* mismatches reverse); and
 5'-CGAGUAAAAGGUAUUGAUACUAUGCAAUUUUCUACC UUACC-3' (*let-7* bulged/*GFP* reverse).

To generate dsRNA trigger molecules, complementary oligos were pooled and annealed (boiled at 100°C for 2 min and annealed 2 h at 37°C) to obtain a final solution of double-stranded RNA at 2 mg/mL.

RNAi interference and rescued experiments

The *let-7* miRNA rescue and RNAi experiments were performed by injecting dsRNA molecules (2 mg/mL) into L3 and L4 larval stage animals, respectively.

For the rescue of *let-7* experiment, *let-7ts* (*n2853*) strains were injected with various dsRNA molecules at permissive temperature (15°C). After 5 h recovery, animals were isolated and placed at nonpermissive temperature and phenotypes were observed after 48 h post-injection. As control for each *let-7* rescue experiment, equal numbers of uninjected animals were also shifted to the nonpermissive temperature (25°C).

For the RNAi assays, various strains expressing GFP driven by *pes-10* promoter were injected. The GFP expression was monitored in injected animals after 48 h under the GFP stereomicroscope. Strong GFP silencing is observed in the pharynx and along the animal body (see Fig. 1C).

Worm strains

Animals used to generate the studied strains were: *rde-1* (*ne300*), *rde-4* (*ne337*), *rrf-1* (*pk1417*), and *alg-2* (*ok304*).

To obtain *alg-1/alg-2* double mutants, *alg-1* RNAi was performed into *alg-2* (*ok304*) and *let-7ts* (*n2853*); *alg-2* (*ok304*) as previously described in Grishok et al. (2001). L3 stage animals were injected with dsRNA (50 µg/mL) targeting *alg-1* mRNA and maintained at permissive temperature, when required, for 5 h followed by injections of respective dsRNA trigger molecules. For the RNAi experiment, the dsRNA targeting *alg-1* was injected in late L4 stage animals in order to bypass the *let-7* phenotype observed in *alg-1/alg-2* double mutants. *alg-1/alg-2* double mutants as previously observed (Grishok et al. 2001) still produced dead embryos.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Craig Mello for discussions. We also thank Rhea Utley, Jacques Côté, Gyorgy Hutvagner, Jean-Yves Masson, and members of the laboratory for comments on the manuscript. Some nematode strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by the NIH National Center for Research Resources (NCR). This work has been funded in part by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). M.-E.L.B. was supported by a fellowship from the NSERC and M.J.S. is a CIHR New Investigator.

Received November 6, 2007; accepted February 6, 2008.

REFERENCES

- Duchaine, T.F., Wohlschlegel, J.A., Kennedy, S., Bei, Y., Conte Jr., D., Pang, K., Brownell, D.R., Harding, S., Mitani, S., Ruvkun, G., et al. 2006. Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell* **124**: 343–354.
- Forstemann, K., Horwich, M.D., Wee, L., Tomari, Y., and Zamore, P.D. 2007. *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct Argonaute complexes after production by Dicer-1. *Cell* **130**: 287–297.
- Forstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V.V., Denli, A.M., Bratu, D.P., Klattenhoff, C., Theurkauf, W.E., and Zamore, P.D. 2005. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol.* **3**: e236. doi: 10.1371/journal.pbio.0030236.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**: 23–34.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., and Hannon, G.J. 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**: 1146–1150.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Nam, J.W., Heo, I., Rhee, J.K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.T., and Kim, V.N. 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* **125**: 887–901.
- Hutvagner, G. and Simard, M.J. 2008. Argonaute proteins: Key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 22–32.
- Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C., and Zamore, P.D. 2004. Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol.* **2**: e98. doi: 10.1371/journal.pbio.0020098.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**: 1437–1441.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* **15**: 185–197.
- Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P.Y., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. 2005. Identification of novel Argonaute-associated proteins. *Curr. Biol.* **15**: 2149–2155.
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., and Siomi, M.C. 2004. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & Dev.* **18**: 1655–1666.
- Pak, J. and Fire, A. 2007. Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science* **315**: 241–244.
- Parker, G.S., Eckert, D.M., and Bass, B.L. 2006. RDE-4 preferentially binds long dsRNA and its dimerization is necessary for cleavage of dsRNA to siRNA. *RNA* **12**: 807–818.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Muller, P., et al. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**: 86–89.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**: 901–906.
- Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. 2005. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 340–349.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**: 199–208.
- Sijen, T., Steiner, F.A., Thijssen, K.L., and Plasterk, R.H. 2007. Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science* **315**: 244–247.
- Steiner, F.A., Hoogstrate, S.W., Okihara, K.L., Thijssen, K.L., Ketting, R.F., Plasterk, R.H., and Sijen, T. 2007. Structural features of small RNA precursors determine Argonaute loading in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**: 927–933.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C.C. 1999. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* **99**: 123–132.
- Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H., and Mello, C.C. 2002. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* **109**: 861–871.
- Tomari, Y., Du, T., and Zamore, P.D. 2007. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* **130**: 299–308.
- Yigit, E., Batista, P.J., Bei, Y., Pang, K.M., Chen, C.C., Tolia, N.H., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M.J., and Mello, C.C. 2006. Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* **127**: 747–757.

scientific report

The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and humansGuillaume Jannot^{1*}, Sarah Bajan^{2*}, Nellie J. Giguère¹, Samir Bouasker¹, Isabelle H. Banville¹, Sandra Piquet¹, Gyorgy Hutvagner^{2,3+} & Martin J. Simard¹⁺⁺¹Laval University Cancer Research Centre, Hôtel-Dieu de Québec, Québec City, Québec, Canada, ²Division of Gene Regulation and Expression, College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, UK, and ³University of Technology Sydney, Centre for Health Technologies, Sydney, New South Wales, Australia

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial No Derivative Works 3.0 Unported License, which permits distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited. This license does not permit commercial exploitation or the creation of derivative works without specific permission.

Despite the importance of microRNAs (miRNAs) in gene regulation, it is unclear how the miRNA–Argonaute complex—or miRNA-induced silencing complex (miRISC)—can regulate the translation of their targets in such diverse ways. We demonstrate here a direct interaction between the miRISC and the ribosome by showing that a constituent of the eukaryotic 40S subunit, receptor for activated C-kinase (RACK1), is important for miRNA-mediated gene regulation in animals. *In vivo* studies demonstrate that RACK1 interacts with components of the miRISC in nematodes and mammals. In both systems, the alteration of RACK1 expression alters miRNA function and impairs the association of the miRNA complex with the translating ribosomes. Our data indicate that RACK1 can contribute to the recruitment of miRISC to the site of translation, and support a post-initiation mode of miRNA-mediated gene repression.

Keywords: ALG-1; hAGO2; RACK1; miRISC recruitment; miRNA
EMBO reports (2011) 12, 581–586. doi:10.1038/embor.2011.66

INTRODUCTION

Initially discovered in *Caenorhabditis elegans*, microRNAs (miRNAs) have emerged as common cellular components with conserved functions in both animals and plants. In all species, miRNAs associate

with Argonaute proteins to form the core-effector complex, known as the miRNA-induced silencing complex (miRISC), which is able to alter protein synthesis and/or induce messenger RNA (mRNA) destabilization. In animals, there are several members of the Argonaute gene family, all of which are essential for small-RNA-mediated silencing pathways (reviewed in Hutvagner & Simard, 2008).

It has been reported that the miRISC can influence translation in distinct ways (reviewed in Filipowicz *et al*, 2008). Interestingly, in *Drosophila*, the identity of the Argonaute protein associated with miRNA can dictate the mechanism that will lead to translational inhibition (Iwasaki *et al*, 2009). This indicates that the Argonaute constituent of the miRISC, as well as its interacting proteins, contribute to regulating protein expression by different mechanisms.

In this study, we identify the receptor for activated C-kinase (RACK1) as an interactor of both *C. elegans* and human miRISC, and demonstrate the importance of RACK1 for miRNA-mediated gene silencing in both systems. We observe that the loss of RACK1 affects the association of miRNA and Argonaute with translating ribosomes, suggesting that this component of the 40S ribosomal subunit can mediate the recruitment of the miRISC to the active site of translation.

RESULTS AND DISCUSSION

RACK1 interacts with the miRISC of *C. elegans*

To gain a better insight into the miRNA pathway, we carried out a two-hybrid screen to identify the proteins that interact with ALG-1; one of the two Argonaute proteins that are essential for miRNA-mediated gene regulation in *C. elegans* (Grishok *et al*, 2001). Among the proteins interacting with ALG-1, we identified K04D7.1, the orthologue of the mammalian protein RACK1 (supplementary Fig S1 online). *C. elegans* RACK1 (ceRACK1) has also been identified by mass spectrometry as a constituent of the ALG-1 complex (Chan & Slack, 2009). To confirm the relevance of this interaction, we generated tagged recombinant ALG-1 and ceRACK-1 proteins and performed glutathione S-transferase (GST) pulldown assays. When compared with beads

¹Laval University Cancer Research Centre, Hôtel-Dieu de Québec, 9 McMahon Street, Québec City, Québec G1R 2J6, Canada²Division of Gene Regulation and Expression, College of Life Sciences, University of Dundee, Dow Street, Dundee DD1 5EH, UK³University of Technology Sydney, Centre for Health Technologies, P.O. Box 123 Broadway, Sydney, New South Wales 2007, Australia

*These authors contributed equally to this work

+Corresponding author. Tel: +44 1382 386310; Fax: +44 1382 386375;

E-mail: g.hutvagner@dundee.ac.uk

++Corresponding author. Tel: +418 525 4444 ext. 15185; Fax: +418 691 5439;

E-mail: martin.simard@crhdq.ulaval.ca

coupled to GST protein, we observed that GST-tagged ALG-1 efficiently pulled down His-ceRACK-1 (Fig 1A). This suggests that ceRACK1 is a *bona fide* interactor of ALG-1 in *C. elegans*.

To address whether this interaction can occur *in vivo*, we generated a transgenic worm expressing green fluorescent protein (GFP)::ALG-1 and haemagglutinin (HA)::ceRACK-1 to overcome the lack of specific antibodies. Using a whole-worm lysate prepared from the transgenic *C. elegans*, we immunoprecipitated GFP::ALG-1 with HA::ceRACK-1 and conversely detected HA::ceRACK-1 in the GFP::ALG-1 pulldown (supplementary Fig S2B online). To determine whether ceRACK-1 can also interact with miRNAs, we used a 2'-O-methylated RNA affinity matrix to trap sequence-specific small RNA complexes that are not bound to target mRNAs (Hutvagner et al, 2004; Yigit et al, 2006). By using this method, we found that both ALG-1 and ceRACK-1 are associated with *let-7* and *lin-4* miRNAs (Fig 1B). To determine whether the interaction between ceRACK1 and the miRISC is only a general interaction with the ribosomes, we generated transgenic animals expressing a HA-tagged 40S ribosomal protein. We observed that although the RNase treatment almost abolished the interaction between the *let-7* miRNA complex and the 40S subunit RPS-12 (Fig 1C; supplementary Fig S2C online), a significant fraction of ceRACK-1 remains associated with the *let-7* complex (Fig 1C). Therefore, our findings provide evidence that free miRISC interacts with the 40S ribosomal subunit, and ceRACK-1 contributes to this interaction.

RACK1 is important for miRNA function in *C. elegans*

In *C. elegans*, the miRNA pathway has an important role in the control of animal development. The loss of function of genes associated with this pathway results in pleiotropic phenotypes, probably reflecting their roles in the activity of all *C. elegans* miRNAs (Grishok et al, 2001; Denli et al, 2004; Hammell et al, 2009; Bussing et al, 2010). To examine whether *rack-1* is important for the miRNA pathway in *C. elegans*, we depleted *rack-1* in animals using RNA interference (RNAi) feeding delivery (animals carrying loss-of-function alleles of *rack-1* gene are embryonic lethal; data not shown). Although the depletion of the 40S ribosomal subunit *rps-12* leads mostly to embryonic and larval lethality (data not shown), *rack-1(RNAi)* shows developmental-timing delay, including heterochronic phenotypes that include defects in adult alae (Fig 1D–F). We also found that a significant proportion of *rack-1(RNAi)* animals burst from the vulval opening after L4 moult, a phenotype characteristic of *let-7*-family miRNA mutants (Abbott et al, 2005; Fig 1D). All these phenotypes are similar to those that we observed in *alg-1(RNAi)* animals and are enhanced in *alg-2(lf)* single-mutant animals (Fig 1D). The similarity of the phenotypes resulting from the loss of function of *rack-1* and the depletion of core components of the miRNA pathway, the synergy observed with *alg-2*, and the other Argonaute essential for this pathway in *C. elegans* (Grishok et al, 2001), supports the conclusion that *rack-1* functions in the *C. elegans* miRNA pathway.

To better understand the function of *rack-1* in the miRNA pathway, we decided to monitor the miRNA levels of *C. elegans* that was subjected to *rack-1* RNAi. Although, as reported recently (Kato et al, 2009), we observed a significant decrease in the amount of miRNAs in *alg-1(RNAi)* animals (Fig 2A), the knockdown of *rack-1* in *C. elegans* led to an increase in *let-7* and *lin-4* miRNA levels (Fig 2A). Interestingly, this accumulation of miRNAs

was attenuated in the absence of *alg-1* but was unaffected in *alg-2(lf)* animals (Fig 2B). This indicates that the accumulation of miRNAs observed in *rack-1(RNAi)* animals requires the Argonaute ALG-1, but not ALG-2.

Although *rack-1* and *alg-1* knockdowns result in similar heterochronic phenotypes (Fig 1D), the opposite effect on miRNA levels suggests that ALG-1 and ceRACK-1 are not functioning at the same point in the miRNA pathway. It is likely that RACK1 is not required for loading and stabilization of miRNAs. The simplest explanation for the accumulation of miRNAs in *rack-1(RNAi)* animals is that the lack of RACK1, which causes failed regulation, could result in a slower turnover of assembled miRISCs. Interestingly, it has been reported that the interaction between the miRNA and its mRNA target leads to the degradation of the miRNA (Ameres et al, 2010). Thus, the accumulation of miRNAs observed in the absence of ceRACK-1 might indicate that a large amount of ALG-1–miRNA complex cannot reach its mRNA target, leading to miRNA accumulation.

RACK1 interacts with the human miRISC

Because RACK1 is a highly conserved protein in eukaryotes (supplementary Fig S3 online), we next asked whether RACK1 associates with Argonautes in mammals. Although we detected ribosomal RNAs, the ribosomal 40S subunit RPS3, human Ago2 (hAgo2) and miRNAs such as *let-7* and *miR-21* in the RACK1 immunoprecipitate from HeLa cell lysate, we did not observe an interaction between hAgo1 and RACK1 (Fig 3; supplementary Fig S2D,E online). This is surprising as hAgo1 is a member of the Argonaute gene family that is able to bind to miRNAs (Liu et al, 2004) and is also involved in translational repression. However, the mechanism of its action—which could be different from hAgo2—is not known (Schmitter et al, 2006). The treatment of the samples with RNase A does not abrogate the association between RACK1 and the miRISC, suggesting that part of the interaction is either direct or mediated by other proteins (Fig 3B; supplementary Fig S2D online). Thus, as observed in *C. elegans*, components of the mammalian miRISC interact *in vivo* with RACK1.

Human miRNA gene silencing requires RACK1

Next, we tested whether RACK1 is required for miRNA-mediated translational repression in mammalian cells. When cells were treated with short-interfering RNA (siRNA)-targeting RACK1, a marked increase in the expression of the endogenous IMP1 and RAS proteins—two characterized *let-7* targets in human cells—was observed (Johnson et al, 2005; Selbach et al, 2008; Fig 4A). However, RACK1 knockdown did not alter the steady-state level of IMP1 mRNA, suggesting post-transcriptional regulation (supplementary Fig S4A online). To demonstrate that the effect of RACK1 on translation requires miRNAs, we carried out dual luciferase assays with a miRNA-regulated reporter construct that contains eight tandem *let-7* sites (Iwasaki et al, 2009) and a luciferase reporter that contains part of the *let-7*-targeted HMGA2 3'UTR. The knockdown of RACK1 with three independent siRNAs significantly and specifically altered the expression of both luciferase reporters (Fig 4B; supplementary Fig S5 online). To show that this effect is specific to RACK1, we altered the expression of the human 40S ribosomal subunit RPS3. The knockdown of RPS3 resulted in a general inhibition of translation, without any specific effect on the miRNA-targeted luciferase

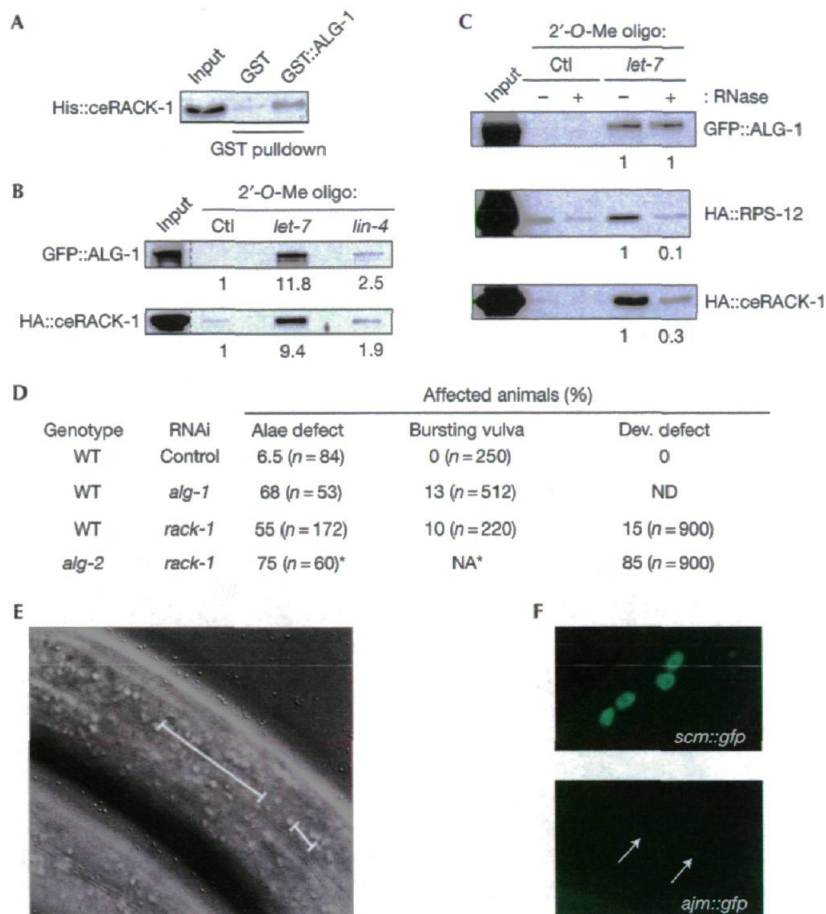


Fig 1 | RACK1 interacts with constituents of *C. elegans* and the human miRISC. (A) Recombinant ceRACK-1 interacts with GST-tagged ALG-1. Western blot analysis of GST pull-downs of His-tagged ceRACK-1 incubated with GST or GST-ALG-1 and probed with His antibody. Input represents the equivalent of 10% of the His-RACK1 used for pull-down. **(B)** ceRACK-1 associates with the miRISC in *C. elegans*. Extracts from MJS10 strain were incubated with the *let-7*-complementary (*let-7*), *lin-4*-complementary (*lin-4*) or nonspecific (*ctl*) tethered 2'-O-methyl oligonucleotide (2'-O-Me oligo). Beads were washed, and bound GFP::ALG-1 and HA::ceRACK-1 were detected by western blotting. **(C)** Interaction of ceRACK-1, but not RPS-12, with the miRISC is partly resistant to RNase treatment. Strains expressing tagged proteins were incubated with the *let-7*-complementary or nonspecific (control) tethered 2'-O-methyl oligonucleotide. Beads were washed and treated (+) or not (-) with RNase, followed by the detection of GFP::ALG-1, HA::ceRACK-1 and HA::RPS-12 by western blotting. In B and C, input represents the equivalent of 5% of the total extract incubated with tethered oligonucleotides. Dashed lines indicate that unrelated lanes have been removed between samples. Relative intensities of the signal are shown under each lane in B and C. **(D)** Knockdown of ceRACK-1 causes heterochronic defects similar to those observed for *alg-1(RNAi)*. Adult alae defects and bursting vulva were scored on young adult animals fed with bacteria expressing either control, *rack-1* or *alg-1* double-stranded RNA. Developmental (dev.) defects observed include one or more of the following: larval lethality, moulting defects, vulva and gonadal morphogenesis defects. The number (n) of animals scored is indicated. Asterisk: as *alg-2(lf)*; *rack-1(RNAi)* animals exhibit severe larval lethality and developmental arrest, sufficient numbers of adult-stage animals could not be obtained to reliably score vulval bursting; however, alae defects were scored for 60 animals that managed to reach the adult stage. **(E)** Representative adult alae defect (Nomarski optics) observed in *rack-1(RNAi)* animals. The white bars show the region of adult cuticles lacking alae or with abnormal alae morphology. Magnification is $\times 630$. **(F)** Extra seam cells (top panel) and defect in seam-cell fusions (arrows; bottom panel) are observed in adult *rack-1(RNAi)* animals. The magnification of both pictures is $\times 1,000$. GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione S-transferase; HA, haemagglutinin; miRISC, miRNA-induced silencing complex; NA, not applicable; ND, not determined; RACK, receptor for activated C-kinase; RNAi, RNA interference; WT, wild type.

reporter (supplementary Fig S6 online). Moreover, when we used a reporter that contains three target sites complementary to endogenous *let-7a*, we observed no change in luciferase expression (supplementary Fig S7 online). Therefore, RACK1 seems to be required to mediate miRNA-dependent translational repression, but not for RNAi.

RACK1 RNAi impairs miRISC association with polysomes

As RACK1 has been identified as a core component of the ribosome (reviewed in Nilsson et al, 2004), we decided to test whether RACK1 contributes to the recruitment of the miRISC to the translational machinery. We carried out sucrose gradient fractionation to monitor distribution of the *let-7* miRNA

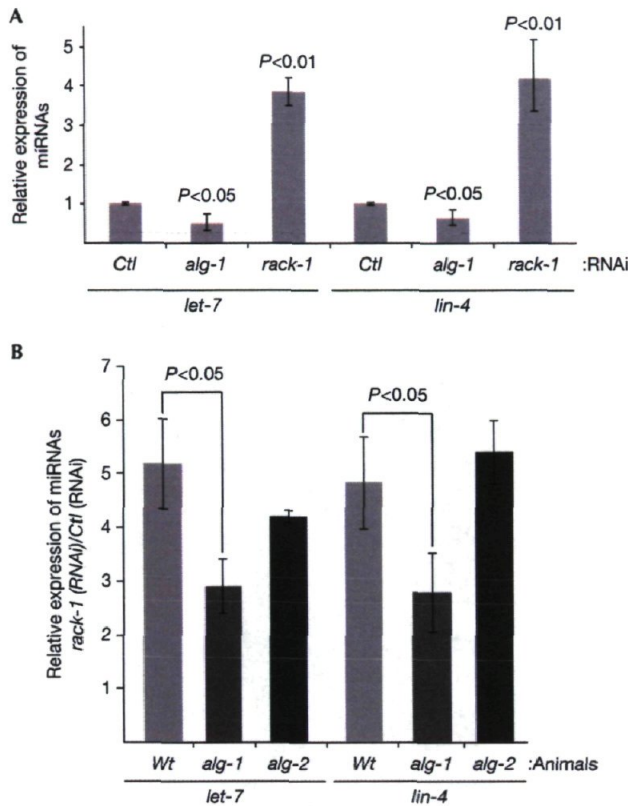


Fig 2 | ceRACK-1 affects the level of miRNA in an *alg-1*-dependent manner. (A) Although *alg-1(RNAi)* reduces miRNA levels, *rack-1(RNAi)* leads to an accumulation of miRNAs. (B) *ALG-1*, but not *ALG-2*, is important to accumulate miRNAs in *rack-1(RNAi)* animals. The miRNA levels were measured relative to the small nucleolar RNA (*sn2841*) using quantitative reverse transcription-PCR (TaqMan Assays) in adult animals fed with bacteria expressing either control (*Ctl*), *alg-1* or *rack-1* double-stranded RNA, as indicated. In all RNAi conditions, no significant changes were observed in the level of the control RNA *sn2841* (data not shown). The error bars represent the 95% confidence interval from three independent experiments and a Student's two-sided *t*-test was applied on the normalized C_t values to obtain *P*-values. miRNA, microRNA; RACK, receptor for activated C-kinase; RNAi, RNA interference; Wt, wild type.

in *rack-1(RNAi)* and *control(RNAi)* animals. Although neither the polysome distribution in the *rack-1(RNAi)* population (supplementary Fig S8C online) or the distribution of *let-7* mRNA targets such as *lin-41* and *daf-12* is significantly affected (Reinhart et al, 2000; Slack et al, 2000; Vella et al, 2004; Grosshans et al, 2005; Fig 5A), the amount of *let-7* miRNA associated with polysomes is reduced, compared with *control(RNAi)* animals (Fig 5A; $P<0.005$).

Human Argonautes have been shown to be associated with polysomes, as their association with heavy fractions is abrogated by puromycin treatment (Nottrott et al, 2006). We also observed that hAgo2 cofractionates with RACK1 on the polysomes, by using the sucrose gradient fractionation approach (supplementary Fig S2F online). We tested whether the presence of hAgo2 with

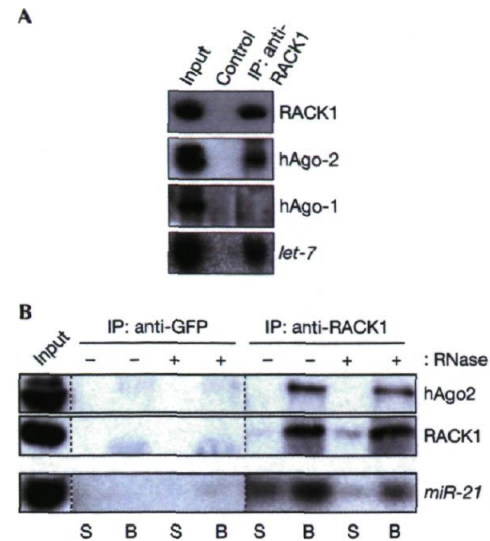


Fig 3 | RACK1 interacts with human Ago2 and miRNAs. (A) Human RACK1 binds to both Ago2 and miRNAs. RACK1 was immunoprecipitated with monoclonal RACK1 antibody (RACK1) and non-conjugated Protein A beads as a negative control. Input represents the equivalent of 4% of the total extract used for immunoprecipitation. The immunoprecipitate was tested for the presence of RACK1, hAgo2 and hAgo1 by western blotting and *let-7* miRNA by northern hybridization. (B) RACK1 interaction with hAgo2 and the miRNA *miR-21* is RNA independent. Immunoprecipitations were performed with mouse monoclonal antibodies raised against RACK1 and GFP (used as a negative control) as indicated. Input represents 10% of total lysate used for the immunoprecipitation. The immunoprecipitates were treated with RNase A for 1 h at 4 °C. The supernatant (S) and the immunoprecipitate (B) samples, with or without RNase treatment, were tested for the presence of hAgo2, RACK1 and *miR-21*. GFP, green fluorescent protein; hAgo1/2, human Ago1/2; IP, immunoprecipitation; miRNA, microRNA; RACK, receptor for activated C-kinase; RNAi, RNA interference.

polysomes requires RACK1. To monitor the amount of hAgo2 associated with ribosomes, we pelleted ribosomal complexes by using a sucrose cushion (Halbeisen et al, 2009). Compared with control, the level of hAgo2 copelleted with ribosomes is decreased when RACK1 is depleted by RNAi (Fig 5B; supplementary Fig S8B online), suggesting that RACK1 contributes to the recruitment of hAgo2 to ribosomes.

This data suggests that RACK1 contributes to miRNA-mediated gene regulation at a post-initiation step. Indeed, RACK1 is a stoichiometric component of the 40S ribosome that is positioned at the exit channel to mediate these types of regulations (Sengupta et al, 2004; Coyle et al, 2009). This could explain the mechanism by which miRNA regulates target gene expression at the elongation step (Olsen & Ambros, 1999; Kim et al, 2004; Nelson et al, 2004; Maroney et al, 2006; Nottrott et al, 2006), and how miRNAs could regulate through target sites in coding regions (Hafner et al, 2010). In *Saccharomyces cerevisiae*, RACK1 is required to recruit Scp160p to specific mRNAs and thus modulate their translations (Baum et al, 2004). These observations and our results suggest that RACK1 functions as an evolutionarily

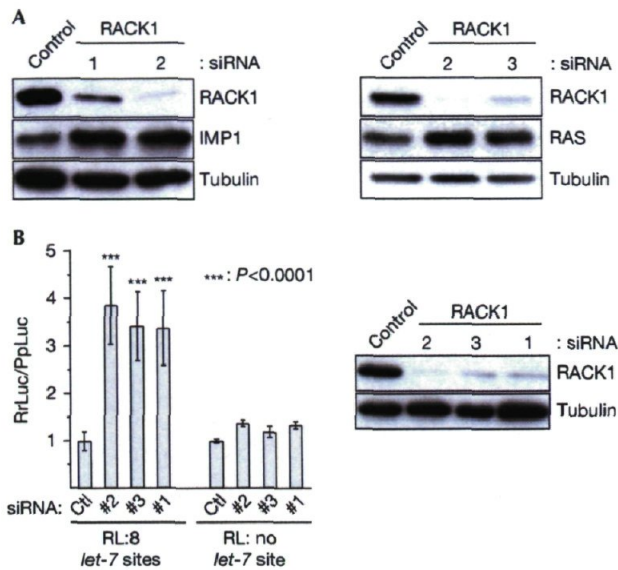


Fig 4 | RACK1 is required for miRNA silencing in human cells. (A) RACK1 is required for the silencing of the human IMP1 and RAS. Lysates from RNAi-treated cells were immunoblotted with RACK1, IMP1 and RAS antibodies, as indicated. Tubulin immunoblot acted as a loading control. (B) RACK1 affects the translation of a reporter that carries miRNA target sites. Renilla luciferase constructs that contain a 3'UTR with either eight *let-7* miRNA target sites or no *let-7* miRNA target sites were transfected in RNAi-treated HeLa cells. Firefly luciferase was used as an internal control. The graph represents the quantification of the dual luciferase assay from five repeats and the error bars represent standard propagated errors and significance that were analysed with a Student's *t*-test. RL:8 *let-7* sites: reporter contains eight tandem *let-7* miRNA target sites. RL:no *let-7* site: reporter without *let-7* miRNA site. Right panel, detection of RACK1 shows the efficiency of the knockdown. Tubulin was used as a loading control. Ctl, control; miRNA, microRNA; RACK, receptor for activated C-kinase; RL, renilla luciferase; RNAi, RNA interference; siRNA, short-interfering RNA.

conserved molecular adaptor on ribosomes to recruit a variety of regulators of mRNA translation—such as miRISC—and facilitates their interactions with the translational machinery at diverse steps of translation. The RACK1-dependent miRNA-mediated gene regulation is probably different from canonical GW182-dependent miRNA-mediated gene regulation, and it might also be a fail-safe mechanism that can capture miRNA-targeted mRNAs that escape regulation at the initiation step.

METHODS

Nematode methods. *C. elegans* strains were grown under standard conditions (Brenner, 1974). Transgenic lines MJS10 and MJS17 were produced by microinjection, as described in Mello & Fire (1995). RNAi experiments were conducted with synchronized animal populations, as described previously (Chendrimada et al, 2007).

***C. elegans* polysome fractionation.** *C. elegans* polysome fractionation was performed as described by Ding & Grosshans (2009). Quantitative detection of mRNAs and miRNAs were performed

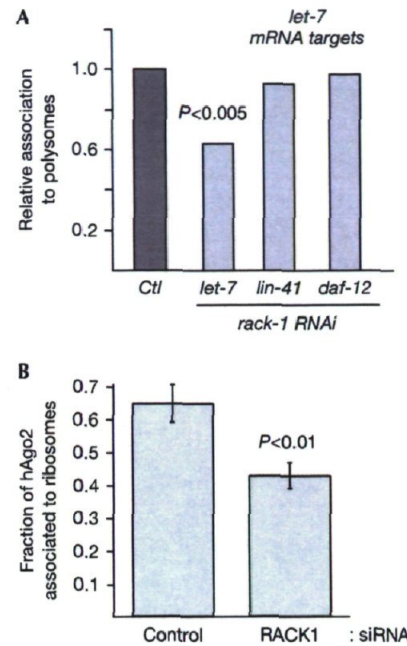


Fig 5 | RACK1 is important to recruit the miRISC to translating ribosomes. (A) The level of *let-7* and *let-7* targets, *lin-41* and *daf-12*, in each fractionation collected from the sucrose gradient was monitored by quantitative reverse transcription-PCR. Mean fold change of *let-7* and mRNA target RNA molecules associated with polysomes fractions of *rack-1*(RNAi) animals relative to animals exposed to control (*ctl*) is shown. Two independent experiments were performed in replicates. Student's two-sided *t*-test was used to assess the significance of the polysomal distribution of *let-7* miRNA between control(RNAi) and *rack-1*(RNAi) animals. Before the *t*-test, the Shapiro-Wilk test confirmed that the data were normally distributed. (B) Ribosomal proteins were pelleted with a sucrose cushion from HeLa cells that were treated with control or RACK1 siRNAs, and the pellet-associated hAgo2 was quantified and presented as a ratio of the sum of the free and polysome-associated hAgo2. The graph is derived from five independent experiments carried out with three independent RACK1 siRNAs. Error bars represent the standard deviation, and a Student's *t*-test was performed to determine the significance of the data. hAgo2, human Ago2; miRNA, microRNA; mRNA, messenger RNA; RACK, receptor for activated C-kinase; RNAi, RNA interference; siRNA, short-interfering RNA.

using TaqMan Gene Expression and microRNA Assay kits (Applied Biosystems), respectively.

Human cells sucrose cushion. HeLa lysates (lysis buffer: 1% NP-40, 10-mM HEPES (pH 7.4), 150-mM KCl, 5-mM MgCl₂, 0.25-mM DTT, 50-μM cycloheximide, 0.4-U/μl RNasin and protease inhibitors) were pretreated with cyclohexamide and spun down (10,000 *g*, 10 min, 4 °C), and equivalent amounts of supernatant were layered onto a 0.5-M sucrose cushion. Samples were then spun at 107,400 *g* for 45 min at 4 °C in an Optima Max Ultracentrifuge.

siRNA transfection in human cells. Cells were plated at 1.25 × 10⁵ per well of a six-well plate. For each well, 200 pmol of siRNA was diluted in 175 μl of Opti-MEM (GIBCO). A volume

of 2 µl of oligofectamine (Invitrogen) was diluted in 13-µl Opti-MEM and incubated at 20 °C for 5 min. The siRNA mixture and the oligofectamine mixture were mixed and incubated at 20 °C for 20 min. The sample was then added to the well and mixed gently. The media were replaced after 4–6 h.

Supplementary information is available at EMBO reports online (<http://www.emboreports.org>).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank V. Ambros, R. Utley, A. Sobala and members of our laboratories for comments on the manuscript. We also thank G. Meister for hAgo1 and hAgo2 antibodies and E. Paquet for statistical support. Some nematode strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by the National Institutes of Health National Center for Research Resources. This work was funded by the Wellcome Trust and European Framework 6 SIROCCO consortium fund (G.H.) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; M.J.S.). S.B. is a participant in the Wellcome Trust PhD programme. G.H. is a Wellcome Trust Career Development fellow and M.J.S. is a CIHR New Investigator.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Abbott AL, Alvarez-Saavedra E, Miska EA, Lau NC, Bartel DP, Horvitz HR, Ambros V (2005) The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell* **9**: 403–414
- Ameres SL, Horwich MD, Hung JH, Xu J, Ghildiyal M, Weng Z, Zamore PD (2010) Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science* **328**: 1534–1539
- Baum S, Bittins M, Frey S, Seedorf M (2004) Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes. *Biochem J* **380**: 823–830
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71–94
- Bussing I, Yang JS, Lai EC, Grosshans H (2010) The nuclear export receptor XPO-1 supports primary miRNA processing in *C. elegans* and *Drosophila*. *EMBO J* **29**: 1830–1839
- Chan SP, Slack FJ (2009) Ribosomal protein RPS-14 modulates let-7 microRNA function in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **334**: 152–160
- Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillet D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* **447**: 823–828
- Coyle SM, Gilbert WV, Doudna JA (2009) Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome *in vivo*. *Mol Cell Biol* **29**: 1626–1634
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature* **432**: 231–235
- Ding XC, Grosshans H (2009) Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *EMBO J* **28**: 213–222
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **9**: 102–114
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**: 23–34
- Grosshans H, Johnson T, Reinert KL, Gerstein M, Slack FJ (2005) The temporal patterning microRNA let-7 regulates several transcription factors at the larval to adult transition in *C. elegans*. *Dev Cell* **8**: 321–330
- Hafner M et al (2010) Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**: 129–141
- Halbeisen RE, Scherrer T, Gerber AP (2009) Affinity purification of ribosomes to access the translome. *Methods* **48**: 306–310
- Hammell CM, Lubin I, Boag PR, Blackwell TK, Ambros V (2009) *nhl-2* modulates microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* **136**: 926–938
- Hutvagner G, Simard MJ (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 22–32
- Hutvagner G, Simard MJ, Mello CC, Zamore PD (2004) Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* **2**: E98
- Iwasaki S, Kawamata T, Tomari Y (2009) *Drosophila* argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol Cell* **34**: 58–67
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120**: 635–647
- Kato M, de Lencastre A, Pincus Z, Slack FJ (2009) Dynamic expression of small non-coding RNAs, including novel microRNAs and piRNAs/21U-RNAs, during *Caenorhabditis elegans* development. *Genome Biol* **10**: R54
- Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, Ruvkun G (2004) Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 360–365
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**: 1437–1441
- Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW (2006) Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1102–1107
- Mello C, Fire A (1995) DNA transformation. *Method Cell Biol* **48**: 451–482
- Nelson PT, Hatzigeorgiou AG, Mourelatos Z (2004) miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *RNA* **10**: 387–394
- Nilsson J, Sengupta J, Frank J, Nissen P (2004) Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* **5**: 1137–1141
- Nottrott S, Simard MJ, Richter JD (2006) Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1108–1114
- Olsen PH, Ambros V (1999) The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* **216**: 671–680
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**: 901–906
- Schmitter D, Filkowski J, Sewer A, Pillai RS, Oakeley EJ, Zavolan M, Svoboda P, Filipowicz W (2006) Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *Nucleic Acids Res* **34**: 4801–4815
- Selbach M, Schwanhauser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**: 58–63
- Sengupta J, Nilsson J, Gursky R, Spahn CM, Nissen P, Frank J (2004) Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 957–962
- Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* **5**: 659–669
- Vella MC, Choi EY, Lin SY, Reinert K, Slack FJ (2004) The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev* **18**: 132–137
- Yigit E, Batista PJ, Bei Y, Pang KM, Chen CC, Tolia NH, Joshua-Tor L, Mitani S, Simard MJ, Mello CC (2006) Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* **127**: 747–757



EMBO reports is published by Nature Publishing Group on behalf of European Molecular Biology Organization. This article is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial No Derivative Works 3.0 Unported License [<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0>]

Chapter 16

Argonaute Pull-Down and RISC Analysis Using 2'-O-Methylated Oligonucleotides Affinity Matrices

Guillaume Jannot, Alejandro Vasquez-Rifo, and Martin J. Simard

Abstract

During the last decade, several novel small non-coding RNA pathways have been unveiled, which reach out to many biological processes. Common to all these pathways is the binding of a small RNA molecule to a protein member of the Argonaute family, which forms a minimal core complex called the RNA-induced silencing complex or RISC. The RISC targets mRNAs in a sequence-specific manner, either to induce mRNA cleavage through the intrinsic activity of the Argonaute protein or to abrogate protein synthesis by a mechanism that is still under investigation. We describe here, in details, a method for the affinity chromatography of the *let-7* RISC starting from extracts of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Our method exploits the sequence specificity of the RISC and makes use of biotinylated and 2'-O-methylated oligonucleotides to trap and pull-down small RNAs and their associated proteins. Importantly, this technique may easily be adapted to target other small RNAs expressed in different cell types or model organisms. This method provides a useful strategy to identify the proteins associated with the RISC, and hence gain insight in the functions of small RNAs.

Key words: 2'-O- methyl oligonucleotides, Argonaute, *Let-7* microRNA, Affinity chromatography, TaqMan chemistry

1. Introduction

RNA-mediated gene silencing pathways can be triggered either by the introduction of exogenous double-stranded RNA molecules (RNA *interference* or RNAi) or by the endogenous expression of microRNAs. They constitute two distinct pathways that lead to posttranscriptional down regulation of targeted messenger RNA (mRNA) through either degradation of the mRNAs or inhibition of protein synthesis. RNAi is commonly used in research laboratory as a simple, but powerful technique to knockdown the expression of specific genes. The microRNA pathway can be described as an endogenous process, which is conserved across many species and is

used to control cell homeostasis. It is estimated that 60% of human genes could be regulated by microRNA molecules and it is now becoming clear that the mis-expression of these small RNA molecules contributes to the development of a large spectrum of human diseases. Moreover, the recent findings involving small RNA in the control of spermatogenesis and in the silencing of transposable elements in the germline highlight their role in an important diversity of developmental processes in animals (reviewed in ref. (1). Essential to all small RNA-mediated gene regulation pathways is a ribonucleoprotein complex called RNA-induced silencing complex (RISC) composed of, at least, one 21–23 nucleotides long, single-stranded RNA and a member of the Argonaute protein family (2). The activity of the RISC on its target depends on the base-pairing between the small RNA and the mRNA. When pairing is perfect, the RISC mediates mRNA cleavage through the endonuclease activity of the Argonaute protein. When the pairing is imperfect, the RISC prevents protein synthesis by a mechanism that is still unclear.

In 2004, Hutvagner *et al.* reported that modified antisense oligonucleotides can block RISC-mediated gene regulation *in vivo* (3) through base pairing with the small guide RNAs in this complex. The replacement of the hydroxyl group by a methyl group, as shown in Fig. 1, makes the oligonucleotide resistant to cellular ribonucleases (4) and allows the sequence-specific purification of the RISC. A biotinylated 2'-*O*-methylated oligonucleotide is bound to the RISC, and pull-down is performed using streptavidin-coupled magnetic beads. This approach is useful to identify the proteins associated with small RNAs *in vivo*, as well as to characterize their molecular functions (for examples of utilization, see (5–8)).

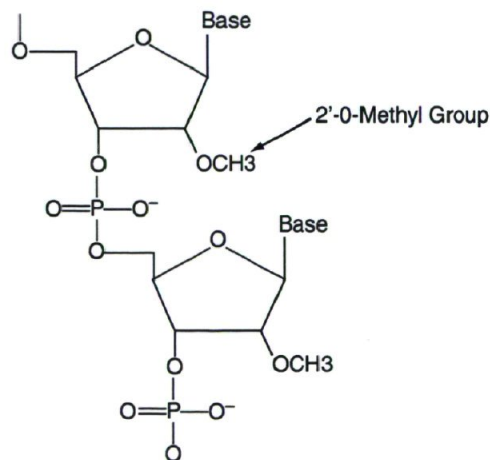


Fig. 1. Representative backbone of a single-stranded 2'-*O*-methylated oligonucleotide is shown. Each hydrogen from 2' hydroxyl groups was replaced by a CH₃ (methyl) group. This modification confers resistance to most RNase activities.

2. Materials

2.1. *Caenorhabditis elegans* Culture and Extract Preparation

1. The wild-type *C. elegans* Bristol, N2 strain, was obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC, University of Minnesota, USA). The transgenic *C. elegans* strain expressing ALG-1 protein tagged at the N-terminus with the Green Fluorescent Protein (GFP) was generated in the laboratory as previously described in (3).
2. *Escherichia coli* (OP50) in TB liquid culture, as a food source for *C. elegans*.
3. TB medium (1 L): 12 g bacto-peptone, 24 g bacto-yeast extract, 4 mL glycerol, in 900 mL of water. Sterilize by autoclaving and cool down to <60°C. Add 100 mL of sterile 10× TB phosphates and store at room temperature (RT).
4. 10× TB phosphate (1 L): 23.1 g KH₂PO₄, 125.4 g K₂HPO₄. Sterilize by autoclaving. Store at RT.
5. Nematode growth medium (NGM) (1 L): 20 g agarose, 3 g NaCl, 2.5 g bacto-peptone. Sterilize by autoclaving and cool down to <60°C. Add, 1 mL 1 M MgSO₄, 1 mL 1 M CaCl₂, 1 mL cholesterol stock solution (5 mg/mL in ethanol), and 25 mL PPB stock solution.
6. PPB stock solution (1 L): 98 g KH₂PO₄ and 48 g K₂HPO₄. Dissolve the salts in deionized water (final volume 1 L). Sterilize by autoclaving. Store at RT.
7. M9 Buffer (1 L): Dissolve 3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl, 1 mL 1 M MgSO₄ in deionized water (final volume 1 L). Sterilize by autoclaving. Store at RT.
8. Bleaching solution (20 mL): 2 mL of 5 M KOH, 3 mL of sodium hypochlorite, 15 mL of water (see Note 1).
9. Lysis buffer stock solution (1 L): 1 mL of 1 M KAc, 300 μL of 1 M HEPES-KOH pH 7.5, 20 μL of 1 M Mg(Ac)₂. Sterilize by filtration. Store at 4°C.
10. Complete lysis buffer (10 mL): 9.40 mL lysis buffer stock solutions, 10 μL 1 M DTT, 50 μL triton X-100, 1 tablet of protease inhibitors (Complete Mini EDTA-free, Roche). Add 2% [v/v] of RNase inhibitor (SUPERaseIn, Ambion) when indicated.
11. Homogenizer: Wheaton dounce tissue grinders 1 mL (Fisher).

2.2. Immobilized 2'-O-Methylated Oligonucleotide Matrices

1. 2'-O-methylated oligonucleotides were synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT). The modification is represented in Fig. 2.

Unrelated oligo: 5'-Bio-_mC_mA_mU_mC_mA_mC_mG_mU_mA_mC_mG_mC_m
G_mG_mA_mA_mU_mA_mC_mU_mU_mC_mG_mA_mA_mA_mU_mG_mU_mC_m-3';

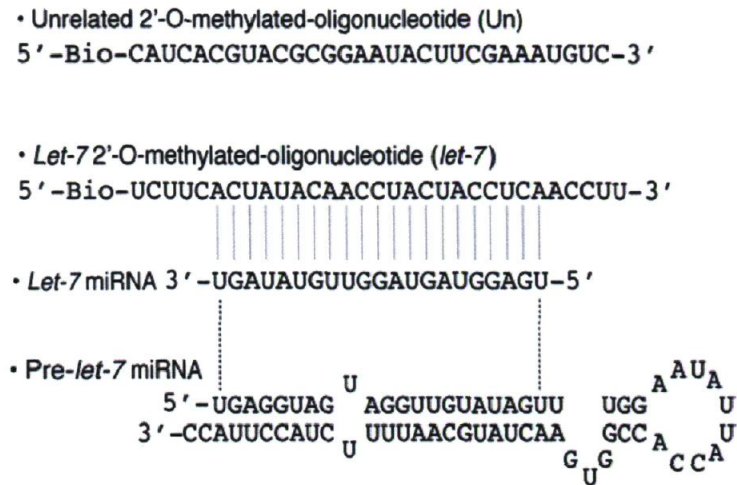


Fig. 2. *Let-7* precursor microRNA is a substrate for the cleavage activity of Dicer to form mature *let-7* microRNA, which is fully complementary to 2'-O-methylated oligonucleotides used to pull-down *let-7* RISC complex.

and *let-7* complementary microRNA oligo: 5'-Bio-^mU^mC^mU^mU^mC^mA^mC^mU^mA^mU^mA^mC^mA^mA^mC^mC^mU^mA^mC^mU^m-
^mA^mC^mC^mU^mC^mA^mA^mC^mC^mU^mU-3' (see Notes 2-5).

2. Dynabeads M-280 streptavidin (Invitrogen): To pull-down the RISC, the modified oligonucleotide is biotinylated at the 5' end and then coupled to magnetic beads through streptavidin monolayer attached to the surface of beads (see Notes 6 and 7).
3. Dynal MPC-S (Invitrogen): We used a magnetic particle concentrator (referred as magnet) compatible with microcentrifuge tube (1.5 mL tube). Dynabeads are separated from the solution when the tube is inserted into the magnet and the magnetic slide is inserted. Bead-bound material is then attracted to the side of the tube.

2.3. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

1. Resolving buffer 4× (1 L): 182 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 4 g Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) in deionized water. Adjust pH to 8.8 with concentrated HCl. Sterilize by filtration. Store at RT.
2. Stacking buffer 4× (1 L): 60 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 4 g SDS in deionized water. Adjust pH to 6.8 with concentrated HCl. Sterilize by filtration. Store at RT.
3. Running buffer 10× (1 L): 30.3 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 144.1 g glycine, 10 g SDS in deionized water. Store at RT (see Note 8).
4. 29:1, 40% Acrylamide/bis solution (J.T Baker). (This is a neurotoxic reagent when unpolymerized, handle with care).

5. *N,N,N,N'*-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) (this is a corrosive and irritant reagent: handle with care).
6. Ammonium persulfate (APS) 10% (10 mL): 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ in cold deionized water and freeze as 1 mL aliquots at -20°C .
7. Prestained molecular weight markers: Kaleidoscope marker (Bio-Rad).
8. Laemmli buffer 4 \times (20 mL): 4 mL 1 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane-HCl pH 6.8, 0.04 g bromophenol blue, 8 mL glycerol, 1.6 g SDS, and 8 mL 1 M Dithiothreitol (DTT). Store at -20°C as 1 mL aliquots.
9. Ethanol 95%.

**2.4. Western Blotting
for Argonautes
Associated to the RISC**

1. Transfer buffer (1.6 L): 5.86 g glycine, 11.64 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 0.75 g SDS. Store at RT.
2. Methanol.
3. Nitrocellulose Hybond-ECL membrane (Amersham) and Blotting pad (VWR).
4. TBS-T (1 L): 6.05 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 8.76 g NaCl, 1 mL Tween-20. Adjust pH to 7.5 with concentrated HCl. Store at 4°C .
5. Blocking solution: 5% [w/v] nonfat dry milk in TBS-T.
6. Primary antibody: anti-GFP antibody (Roche) diluted in TBS-T supplemented with 5% [w/v] nonfat dry milk (see Note 9).
7. Secondary antibody: Peroxydase-conjugated Anti-mouse IgG (Roche) diluted in TBS-T supplemented with 5% [w/v] nonfat dry milk.
8. Enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (Perkin Elmer) and hyperfilm ECL (Amersham).

**2.5. Total RNA
Extraction**

1. TRI-Reagent solution (Sigma). (The TRI-Reagent solution contains phenol and guanidine thiocyanate, handle with care).
2. Chloroform (chloroform can be fatal if swallowed, inhaled, or absorbed. Manipulate with care in a fume hood).
3. Isopropanol 75% [v/v] and ethanol 75% [v/v].
4. Freshly autoclaved deionized water.
5. 1.5 mL RNase-free microcentrifuge tubes.

**2.6. Analysis of Short
RNA Integrity
by 12% Mini-
Polyacrylamide
Gel Electrophoresis**

1. SequaGel Sequencing System kit (National Diagnostic): (1) SequaGel Concentrate (1 L: 37.5 g of acrylamide, 12.5 g of methylene bis-acrylamide, and 7.5 M urea in a deionized aqueous solution), (2) SequaGel Diluent (7.5 M urea in deionized water), and (3) SequaGel Buffer [0.89 M

Tris–Borate–20 mM EDTA buffer pH 8.3 (10× TBE) and 7.5 M urea] (see Note 10).

2. TEMED.
3. APS 10% (10 mL): 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ in cold water and freeze in 1 mL aliquots at -20°C .
4. Formamide-dye loading buffer: 98% [w/v] deionized formamide, 10 mM EDTA pH 8, 0.025% [w/v] xylene cyanol, and 0.025% [w/v] bromophenol blue.
5. TBE buffer 10× (1 L): 108 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane and 40 mL of 0.5 M Na_2EDTA , 55 g boric acid. Adjust to pH 8. Sterilize by autoclaving. Store at RT.
6. Ethidium bromide (EtBr) solution at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (EtBr is a mutagenic agent, so handle with care).

2.7. Quantitative Real-Time PCR for *Let-7* MicroRNA

1. Real-Time PCR machine: 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems).
2. MicroAmp Fast optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems).
3. Optical adhesive covers (Applied Biosystems).
4. MicroRNAs Primers: We used TaqMan probes-based chemistry. The primers were obtained from Applied Biosystems and correspond to mature *let-7* microRNA (Assay ID: 000377). We used the short nuclear RNA *sn2841* as an endogenous control (Assay ID: 001759).
5. Reverse Transcription Assays: TaqMan microRNA transcription kit (Applied Biosystems).
6. PCR reaction: TaqMan 2× Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems).

3. Methods (see Note 11)

For this protocol, we took *let-7* microRNA-associated with ALG-1 RISC as an example to demonstrate the efficiency of the pull-down using 2'-O-methylated oligonucleotides affinity matrices. A transgenic *C. elegans* strain expressing ALG-1 protein tagged at the N terminus with the green fluorescent protein (GFP) was used as described in ref. (3). An extract was generated using staged animals as starting material, a pull-down assay targeting *let-7* microRNA was performed, and the associated GFP::ALG-1 protein was detected by western blot. As a negative control, we used an unrelated 2'-O-methylated oligonucleotide that does not share base complementarity with any known microRNA. To confirm *let-7* microRNA depletion, we quantified *let-7* in the

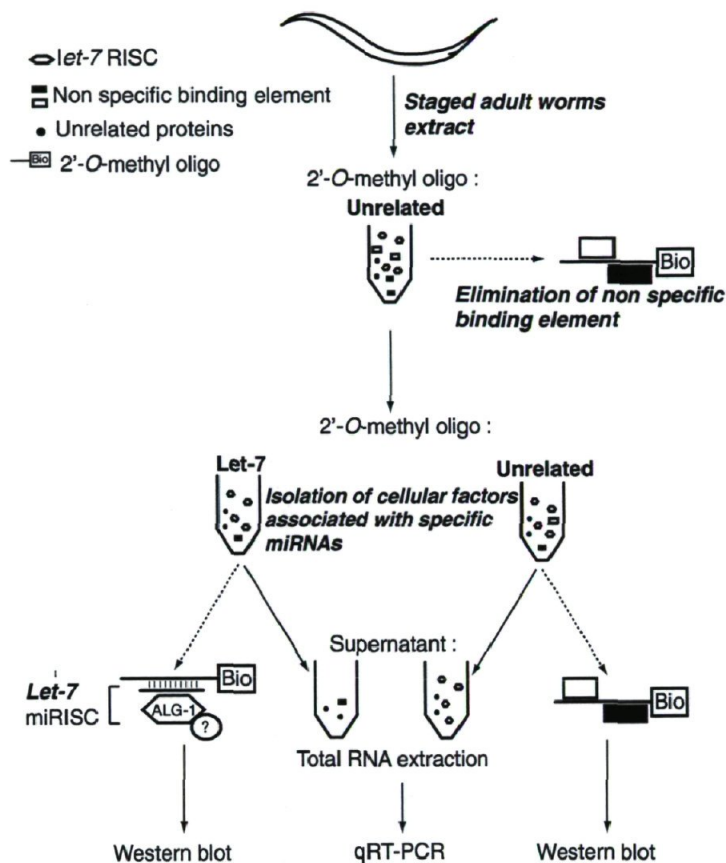


Fig. 3. Experimental procedure. This scheme provides an overview of the technical steps in this method (1) Growing a population of staged *Caenorhabditis elegans*; (2) Extraction of animal proteins; (3) Pull-down of the *let-7* microRNA-associated RISC; (4) Detection of ALG-1 protein by western blot; (5) Analysis of the efficiency of this method by quantification of the level of *let-7* miRNA by qRT-PCR.

recovered unbound fractions by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). We also verified the 5.8S and 5S RNA integrity by EtBr staining from total RNA preparations. Figure 3. summarizes the experimental procedure followed.

3.1. Preparation of Agar NGM Plate Seeded with Concentrated OP50

1. Pour 20 mL of NGM medium in 15 cm diameter Petri dishes aseptically, cover with the lids, and let dry overnight.
2. Inoculate one colony of OP50 bacteria into 1 L of TB medium. Incubate 16 h at 37°C under agitation.
3. Split the overnight culture in two sterile centrifuge bottles (700 mL) and spin for 30 min at 3,500×g.
4. Resuspend the pellet with 20 mL of M9 and transfer into 50 mL Falcon tube.

5. Wash three times with sterile M9 and spin for 10 min at $4,500 \times g$.
6. Resuspend the pellet in four volumes of M9. Vortex vigorously to obtain a homogenized OP50 solution.
7. Dispense uniformly 2 mL of concentrated food on each plate, and let them dry in a sterile field with the lid open.
8. Store the seeded plates at 4°C for up to for several days.

**3.2. Preparation
of a Synchronous
C. elegans population**

All the following centrifugation steps are done at $2,800 \times g$ for 30 s. Manipulation must be done in a sterile field (flame).

1. Transfer starved animals from three 35 mm plates to one 150 mm plate. Once population reach adult stage (hermaphrodites bearing fertilized eggs), transfer gravid adult population of *C. elegans* in a 15 mL sterile Falcon tube using the M9 solution.
2. Wash three times by successively transferring 10 mL of M9 and centrifuging to pellet the animals.
3. Remove the supernatants completely and add 10 mL of freshly prepared bleaching solution.
4. Shake vigorously for 5 min and monitor the lysis of worm cuticles by observing the content of the tube under a stereomicroscope.
5. Once half of the worm cuticles are destroyed, centrifuge, remove the supernatant, and add 10 mL of fresh bleaching solution.
6. Shake vigorously. After an additional 1–2 min, most of the animals should be dissolved, leaving only the embryos (eggs) (see Note 12).
7. Centrifuge, remove the supernatant, and wash the eggs three times with 10 mL of M9.
8. Let the eggs hatch in 10 mL of M9 at 20°C under gentle rotation overnight.
9. On the next day, estimate the number of newly hatched larvae (L1) by counting under a stereomicroscope the amount of animals in 1 μL aliquot of homogenous solution (triplicate). Centrifuge the L1 animals, wash, and resuspend them to obtain approximately 300 animals/ μL in M9. Dispense 500 μL (around 150,000 animals total) on a large OP50-seeded plate, and grow the animals at 20°C up to the young adult stage (approximately 50 h).
10. Wash the young adults from the plate with sterile M9 and transfer the animals to a 15 mL Falcon tube.
11. Centrifuge and wash three times with M9. Resuspend in 10 mL of M9, and let the suspension rotate gently for 1 h to

completely eliminate the bacteria from the gut of the animals.

12. Centrifuge, eliminate the supernatant, and freeze the pellet of young adults at -80°C until use.

**3.3. Preparation
of the Crude
C. elegans Extract**

1. Thaw a pellet of 150,000 young adults at room temperature.
2. Wash the pellet three times with three volumes of complete lysis solution.
3. Add $\frac{1}{2}$ volume of complete lysis solution and transfer into a Wheaton Dounce Tissue grinder.
4. Grind for around 7 min on ice and monitor the lysis efficiency under the microscope by transferring 2 μL of extract on a glass slide. Continue until the worm cuticles are destroyed.
5. Transfer the lysate in a 1.5 mL tube and spin at $17,000 \times g$ for 15 min at 4°C .
6. Transfer the supernatant to a fresh 1.5 mL tube on ice. This is the crude *C. elegans* extract.
7. Determine the protein concentration of the crude *C. elegans* extract using one of the standard colorimetric assays, such as Lowry, Biuret, or Bradford (about 10 mg of total protein should be obtained from 150,000 young adults animals).

**3.4. Let-7 MicroRNA
Pull-Down and RISC
Analysis Using
2'-O-Methylated
Oligonucleotide
Affinity Matrices
(see Note 13)**

1. Resuspend the magnetic beads from the stock tube by pipetting up and down 20 times.
2. Transfer 60 μL of homogenized bead suspension in a 1.5 mL tube, place the tube into the magnet for 1 min, and discard the supernatant (see Note 14). The beads are washed twice with four volumes of lysis solution containing 2% [v/v] RNase inhibitor.
3. Add 120 μL of the biotinylated unrelated 2'-O-methyl oligonucleotide at 1 μM concentration. Incubate for 45 min at RT with gentle rotation (see Note 15). Place the tube in a magnet for 1 min and discard the supernatant.
4. Wash the coated beads twice in stock lysis solution with 2% [v/v] RNase inhibitor.
5. Place the tube in the magnet for 1 min and discard the supernatant.
6. Dilute the quantified crude *C. elegans* extract to a working solution of 13.3 mg/mL.
7. Add 4 mg of crude *C. elegans* extract (300 μL of 13.3 mg/mL suspension) in a 1.5 mL tube containing the unrelated (control) 2'-O-methylated oligonucleotide bound to the beads.

8. Incubate at RT with gentle rotation for 45 min. During this incubation, prepare the *let-7*-complementary oligo, and the unrelated matrices (see Note 16).
9. Transfer 30 μ L of each bead suspensions into two separate 1.5 mL tubes. Wash the beads and coat with 60 μ L of either the unrelated or the *let-7* complementary 2'-O-methylated oligonucleotides for 45 min at RT, as described in steps 2–5. Keep the coated beads on ice until used. Discard the buffer just before starting step 10.
10. Once the incubation time of the extract is complete (step 8), place the tube on the magnet for 1–2 min and transfer half of the cleared supernatant either to the unrelated or to the *let-7* coated beads (step 9). Incubate at room temperature with gentle rotation for 45 min (see Note 17).
11. Place the tubes on the magnet for 1–2 min and then transfer the supernatants to new 1.5 mL tubes. Keep the supernatants on ice until total RNA extraction and qRT-PCR analysis.
12. Wash the beads twice with three volumes of stock lysis solution containing 2% [v/v] of RNase inhibitor.
13. Resuspend the beads in Laemmli 2 \times loading buffer and boil them 10 min before loading on 8% SDS–Polyacrylamide gel (SDS–PAGE) electrophoresis (see Subheading 3.5). As input control, load 100 μ g of total proteins from the crude *C. elegans* extract (resuspended and boiled in Laemmli 2 \times loading buffer).

3.5. SDS–PAGE (8%) Electrophoresis

1. The SDS–PAGE electrophoresis is performed with the “Mini-PROTEAN Tetra Cell” system (Bio-Rad). Ensure that the glass plates are clean. Before use, it is recommended to wash them with detergent first, then with ethanol 95%, and finally to let them dry completely.
2. Prepare a 1.5 mm thick, 8% gel by mixing 2.5 mL of 4 \times resolving buffer with 2 mL of 40% acrylamide/bis-acrylamide solution, 5 mL of water, 100 μ L of APS 10%, and 10 μ L of TEMED. Pour the gel while leaving space for the stacking gel (around 1–2 cm) and overlay with 95% ethanol. Let the gel polymerize for 30 min.
3. Discard the layer of ethanol 95% on the gel.
4. Prepare a 6% stacking gel by mixing 1.25 mL of 4 \times stacking buffer with 750 μ L of 40% acrylamide/bis-acrylamide solution, 2.9 mL of water, 50 μ L of APS 10%, and 5 μ L of TEMED. Pour the stacking gel, and insert the comb. Let the stacking gel polymerize for 30 min.
5. Prepare the running buffer by dissolving 100 mL of 10 \times stock solution with 900 mL of water.

6. Once the stacking gel is polymerized, transfer the gel assembly in the tank and fill with running buffer.
7. Remove the comb carefully and wash the wells with running buffer using a 10 mL syringe fitted with a 22-gauge needle.
8. Boil your samples for 1 min, spin 30 s at $17,000 \times g$, and load the total sample in the wells. Load one well with a prestained molecular weight marker (see Note 18).
9. Connect the gel chamber to a power supply and run at 160 V for 1.5 h, or until the blue dye front runs off the gel.

3.6. Western Blotting for ALG-1 Protein

1. The samples that are resolved by SDS-PAGE are transferred using a semidry transfer apparatus (Trans-Blot SD semidry Transfer cell, Bio-Rad).
2. Prepare working transfer buffer solution (setup buffer) by mixing 200 mL of transfer buffer with 50 mL of methanol.
3. Carefully remove the gel from the glass plate assembly and put the gel in a clean dish containing 50 mL of setup buffer.
4. Cut a sheet of nitrocellulose membrane and two blotting pads of slightly larger dimensions than the size of the separating gel, and soak in the setup buffer.
5. Prepare a sandwich assembly with one wet blotting pad covered with the nitrocellulose membrane. Carefully transfer the resolving gel on the top of the membrane and cover with a second soaked blotting pad. Ensure that no bubbles are trapped in the resulting sandwich by gently rolling a 15 mL Falcon tube on the top of the assembly.
6. Connect to a power supply and run at 15 V for 50 min.
7. Once the transfer is complete, disassemble the sandwich and wash the nitrocellulose membrane with TBS-T.
8. Incubate the membrane in 25 mL of TBS-T containing 5% (w/v) dry milk for 1 h at RT with gentle agitation.
9. Discard the blocking buffer, and incubate the membrane with a 1:3,000 dilution of the anti-GFP antibody in TBS-T containing 5% [w/v] dry milk overnight at 4°C on a rocking platform.
10. Remove the primary antibody solution and wash the membrane three times with TBS-T for 10 min each.
11. The secondary antibody, an HRP-coupled anti-mouse, is diluted at 1:10,000 in TBS-T and added to the membrane for 45 min at room temperature on a rocking platform.
12. Remove the secondary antibody, and wash the membrane three times for 10 min each with TBS-T.
13. Mix equal volumes of ECL reagent (2 mL each) and keep the mixture at room temperature until used.

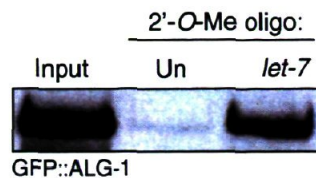


Fig. 4. Western blot analysis of the GFP-tagged ALG-1 protein associated with *let-7* microRNA. The input represents 100 μ g of total protein. Each matrix [unrelated (Un) or *let-7* biotinylated 2'-*O*-methylated oligonucleotides] was mixed with 2 mg of protein and pull-down was conducted using Dynabeads coupled to streptavidin. Notice that ALG-1 is detected only in the *let-7* complementary 2'-*O*-methylated oligonucleotide pulldowns.

14. Cut out two clean acetate sheets with dimensions just larger than the size of the nitrocellulose membrane.
15. Fix a laboratory film (Parafilm) on the working bench and place the 4 mL of mixed ECL reagent on the top.
16. Transfer the membrane protein up side down on the ECL drop and incubate for 1 min.
17. Put the membrane side up on the clean acetate sheet and place the other acetate sheet over membrane and smooth out air bubbles.
18. Place the membrane between acetate sheets protector (as in a sandwich), into an autoradiography cassette and head to the dark room with X-ray films for developing.
19. In the dark room, place the film in an autoradiography cassette for a suitable exposure time (1–2 min for GFP::ALG-1 in our experiment). An example of the result is shown in Fig. 4.

3.7. Total RNA Extraction

1. Add three volumes of TRI-Reagent in 1.5 mL tubes containing either 2 mg of protein from the input crude *C. elegans* extract or the supernatant (unbound) samples recovered from the unrelated and the *let-7* matrices. Vortex for 30 s.
2. Add one volume of chloroform, vortex for 10 s and allow to sit at RT for 3 min.
3. Centrifuge the tubes at 13,000 $\times g$ for 15 min at 4°C.
4. Remove the top aqueous layer and transfer to a fresh 1.5 mL RNase-free tube (do not disturb or retrieve the interphase).
5. Add an equal volume of isopropanol, mix well, and incubate at RT for 10 min.
6. Centrifuge at 13,000 $\times g$ for 15 min at 4°C.
7. Discard the supernatant and wash the RNA pellet carefully with 300 μ L of 75% ethanol.
8. Spin at 7,500 $\times g$ for 5 min at 4°C.

9. Discard the supernatant, air dry the RNA pellet with the open cap at RT for 5–10 min.
10. Dissolve the pellet in deionized, autoclaved water (around 100–200 μ L). To dissolve the pellet, heat at 65°C for 10 min and homogenize the RNA solution by pipetting up and down.
11. The concentration of the purified RNA is determined by measuring the absorbance at 260 nm in a spectrophotometer.
12. Monitor the short RNA quality by running 15 μ g of total RNA on 12% mini-polyacrylamide gel electrophoresis (see Subheading 3.8).

3.8. Preparation of 12% Polyacrylamide Gel Electrophoresis

1. The 12% mini-PAGE is performed with the same clean material used for SDS-PAGE assembly.
2. Prepare a 1.5 mm thick, 12% mini-PAGE gel by mixing 4.8 mL of SequaGel concentrate, 4.2 mL of SequaGel Diluent, 1 mL of SequaGel buffer, 80 μ L of APS 10%, and 4 μ L of TEMED. Pour the gel and insert the comb. Let the gel polymerize for 1 h.
3. Carefully remove the comb and pre-run the gel for 30 min at 150 V in 0.5 \times TBE before loading the samples.
4. While pre-running, prepare the RNA samples. Add $\frac{1}{2}$ volume of formamide-dye loading buffer with 15 μ g of total RNA.
5. Heat the RNA samples at 65°C for 15 min.
6. Once the pre-run is complete, wash the wells with 0.5 \times TBE buffer using a 10-mL syringe fitted with a 22-gauge needle.
7. Load the warm samples and run at 150 V until the bromophenol blue dye is at the bottom.
8. After completion of the run, allow the plates to cool 10–15 min before separation.
9. Carefully remove the gel from the glass plate assembly and put it in clean dish containing 50 mL of 5 μ g/ μ L EtBr diluted in 0.5 \times TBE. Incubate for 15 min with gentle shaking.
10. Discard the EtBr solution and wash the membrane with 0.5 \times TBE.
11. Take a picture of the stained gel with a UV transilluminator to record EtBr-stained RNA fluorescence. An example of a typical experimental result is shown in Fig. 5.

3.9. Quantitative Real-Time PCR for Let-7 MicroRNA

1. Dilute the total RNA samples in water to obtain a 2 ng/ μ L solution.
2. Perform reverse transcription reaction to convert specific microRNAs to complementary DNA with the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (RT) kit, using either *let-7*

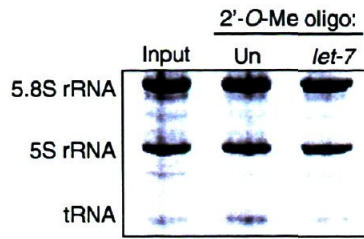


Fig. 5. Assessment of the integrity of the 5.8S and 5S rRNAs in the unbound fractions recovered from either the unrelated (Un) or *let-7* complementary matrices. Discrete bands are visible, demonstrating the integrity of the short RNA preparations.

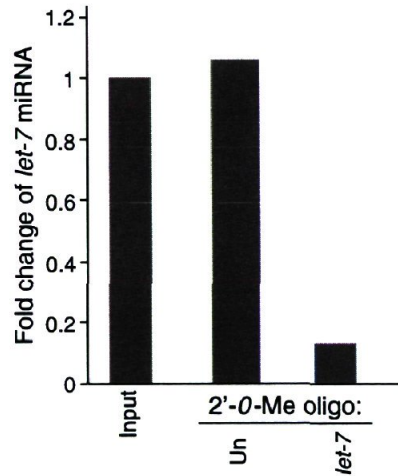


Fig. 6. qRT-PCR analysis of the *let-7* miRNA remaining in the unbound fractions recovered from either the unrelated (Un) or the *let-7* complementary matrices. When using the *let-7* complementary matrix, almost 90% of the mature *let-7* miRNA is depleted from the starting material. This demonstrates the efficiency and the specificity of the affinity chromatography.

microRNA-specific primer or the *sn2841* short RNA primer as an endogenous control. We use 10 ng of total RNA per reaction.

3. Perform Quantitative RT-PCR analyses of *let-7*, and *sn284* with TaqMan microRNA Assays kit following manufacturer procedures.
4. Data analysis was performed using the comparative C_t method using the endogenous control to normalize the level of microRNA.
5. A typical experimental result is shown in Fig. 6.

4. Notes

1. Be aware that sodium hypochlorite solution becomes less effective with time. Volume can be changed from 2 to 5 mL to obtain a complete lysis of *C. elegans* cuticules with an older solution.
2. Biotinylated 2'-*O*-methylated oligonucleotides can be designed to pull-down any small RNA-specific complex. The nucleotide sequences must be fully complementary to the chosen small RNA, and five extra nucleotides are added on each side of the complementary region to increase the stability of the small RNA complex-oligonucleotide association and the efficiency of the pull-down.
3. Ensure that the RNA molecule has been purified by HPLC techniques.
4. Upon reception of the synthesized modified RNA oligonucleotides, aliquot at 100 μ M in deionized, freshly autoclaved water (use RNase-free tubes). Store aliquots at -20°C .
5. 2'-*O*-methylated oligonucleotides are stable in water solution at 4°C for up to 2 weeks, and stable for at least 6 months if stored at -20°C . Dried oligos stored at -20°C in a nuclease-free environment should be stable for several years.
6. It is very important to store the vial containing beads upright to keep them in liquid suspension. The performance will decrease if the beads air dry. Do not freeze.
7. Dynabeads are not supplied in RNase-free solutions, it is very important to use buffer containing nuclease inhibitors during the binding and washing steps.
8. Running buffer can be used for up to two runs, if it is cooled down at room temperature between successive runs.
9. The same primary antibody diluted in TBS-T and supplemented with dry milk can be reused two or three times. This solution can be stored at 4°C for several days or at -20°C for 2–3 weeks.
10. As urea may precipitate if these solutions are refrigerated, the solution should be stored in a tightly capped container and in a dark area at room temperature. However, the urea can be rapidly redissolved when warmed to room temperature.
11. For this protocol manuscript, we used the nematode *C. elegans* as a biological sample. The RISC pull-down assay using 2'-*O*-methylated oligonucleotides as affinity matrices can easily be applied to any other biological samples. The binding of RNA molecules to the beads should be optimized for a lysis buffer adequate for the specific biological sample used.

12. Do not allow the reaction to proceed for longer than 3 min as this will result in death of the embryos.
13. For better results and to avoid the microRNA/RISC/protein degradation, the pull-down assay should be performed (if possible) directly after the crude *C. elegans* extract is prepared.
14. We used 30 μL of suspension solution containing 10 mg/mL of beads for 2 mg of protein extract.
15. The binding capacities of beads are around to 200 pmol of RNA molecule for 1 mg of beads. Thirty microliter of suspension solution corresponds to 300 μg of beads, so 60 pmol of 2'-*O*-methylated oligonucleotide molecules are necessary for the binding. This is why the oligonucleotide solution is diluted to 1 pmol/ μL (1 μM final).
16. Some proteins can interact more strongly than others with the matrix. To limit nonspecific binding, you may increase the quantity of beads bound to the unrelated oligo in the first step (clearing step) or repeat this step two or three times.
17. If the cell extract is too viscous, some beads may not be separated from the suspension by the magnet. To circumvent this problem, centrifugation may be used to pellet the beads.
18. Sometimes, a small amount of beads are loaded on the gel, along with the samples. This does not prevent the proper running process.

Acknowledgments

We are grateful to the members of our laboratory for comments on this methods manuscript. Nematode strain, N2 was provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by the NIH National Center for Research Resources (NCRR). Our research is funded work by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and the Cancer Research Society. M.J.S. is a CIHR New Investigator.

References

1. Stefani, G., and Slack, F. J. (2008) Small non-coding RNAs in animal development, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 219–230.
2. Hutvagner, G., and Simard, M. J. (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 22–32.
3. Hutvagner, G., Simard, M. J., Mello, C. C., and Zamore, P. D. (2004) Sequence-specific inhibition of small RNA function, *PLoS Biol* 2, E98.
4. Inoue, H., Hayase, Y., Imura, A., Iwai, S., Miura, K., and Ohtsuka, E. (1987) Synthesis and hybridization studies on two

- complementary nona(2'-O-methyl)ribonucleotides, *Nucleic Acids Res* **15**, 6131–6148.
5. Fabian, M. R., Mathonnet, G., Sundermeier, T., Mathys, H., Zipprich, J. T., Svitkin, Y. V., Rivas, F., Jinek, M., Wohlschlegel, J., Doudna, J. A., Chen, C. Y., Shyu, A. B., Yates, J. R., 3rd, Hannon, G. J., Filipowicz, W., Duchaine, T. F., and Sonenberg, N. (2009) Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation, *Mol Cell* **35**, 868–880.
 6. Aoki, K., Moriguchi, H., Yoshioka, T., Okawa, K., and Tabara, H. (2007) In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*, *EMBO J* **26**, 5007–5019.
 7. Yigit, E., Batista, P. J., Bei, Y., Pang, K. M., Chen, C. C., Tolia, N. H., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M. J., and Mello, C. C. (2006) Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi, *Cell* **127**, 747–757.
 8. Mayr, C., Hemann, M. T., and Bartel, D. P. (2007) Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation, *Science* **315**, 1576–1579.

Developmental Characterization of the MicroRNA-Specific *C. elegans* Argonautes *alg-1* and *alg-2*

Alejandro Vasquez-Rifo¹, Guillaume Jannot¹, Javier Armisen^{1,2,3}, Michel Labouesse^{1,4}, Syed Irfan Ahmad Bukhari¹, Evelyne L. Rondeau¹, Eric A. Miska^{1,2,3}, Martin J. Simard^{1*}

1 Laval University Cancer Research Centre, Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), Québec City, Québec, Canada, **2** Wellcome Trust Cancer Research UK Gurdon Institute, The Henry Wellcome Building of Cancer and Developmental Biology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, **3** Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, **4** Development and Stem Cells Program, IGBMC, CNRS (UMR7104), INSERM (U964), Université de Strasbourg, BP10142, Illkirch, France

Abstract

The genes *alg-1* and *alg-2* (referred to as “*alg-1/2*”) encode the Argonaute proteins affiliated to the microRNA (miRNA) pathway in *C. elegans*. Bound to miRNAs they form the effector complex that effects post-transcriptional gene silencing. In order to define biological features important to understand the mode of action of these Argonautes, we characterize aspects of these genes during development. We establish that *alg-1/2* display an overlapping spatio-temporal expression profile and shared association to a miRNAs set, but with gene-specific predominant expression in various cells and increased relative association to defined miRNAs. Congruent with their spatio-temporal coincidence and regardless of *alg-1/2* drastic post-embryonic differences, only loss of both genes leads to embryonic lethality. Embryos without zygotic *alg-1/2* predominantly arrest during the morphogenetic process of elongation with defects in the epidermal-muscle attachment structures. Altogether our results highlight similarities and specificities of the *alg-1/2* likely to be explained at different cellular and molecular levels.

Citation: Vasquez-Rifo A, Jannot G, Armisen J, Labouesse M, Bukhari SIA, et al. (2012) Developmental Characterization of the MicroRNA-Specific *C. elegans* Argonautes *alg-1* and *alg-2*. PLoS ONE 7(3): e33750. doi:10.1371/journal.pone.0033750

Editor: Anne C. Hart, Brown University, United States of America

Received: November 18, 2011; **Accepted:** February 16, 2012; **Published:** March 20, 2012

Copyright: © 2012 Vasquez-Rifo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The work has been funded by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (M.J.S.). J.A. and E.A.M. are supported by a program grant from Cancer Research UK and the work in the lab of M.L. was supported by grants from the ANR (Agence Nationale de la Recherche) and ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer). M.J.S. is a CIHR New Investigator. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Martin.Simard@crhdq.ulaval.ca

Introduction

Argonaute family proteins are defined by the presence of the PAZ domain which contributes to the binding of small (21–32 nucleotide long) RNA molecules and the PIWI domain that confers the endonuclease enzymatic activity present in some members of the Argonautes family [1]. This protein family is conserved from archaea to eukarya, and largely expanded in some plants and animals. Distinct kinds of small RNAs are bound by Argonautes which participate in viral defence [2], post-transcriptional gene regulation [3] and transposon silencing [4,5], processes which in turn affect somatic and germline development.

In the nematode *C. elegans*, the Argonaute family comprises 24 genes and 2 pseudogenes, which partition into three groups, the Argonaute-like (AGO-like), the Piwi-like and a nematode-specific clade [1]. The genes *alg-1* and *alg-2* (hereafter, both referred to as “*alg-1/2*”) belong to the conserved AGO-like clade, which includes the fly *D. melanogaster* Ago1 and Ago2, and four mammalian Argonautes, AGO1–4. *Alg-1/2* have been shown to be required for the miRNA pathway but not for exo-RNAi [6], while the fly and mammalian AGOs are differentially required for both RNAi and the miRNA pathway [7,8,9]. Two additional *C. elegans* Argonautes in the same clade, *alg-3* and *alg-4*, are required for the accumulation of 26-nt long endogenous RNAs and affiliate to a separate endo-RNAi pathway [10].

The canonical miRNA pathway involves the processing of a primary RNA molecule by the RNase III enzyme Droscha, to produce a stem-loop precursor molecule which is next cleaved by the Dicer enzyme to release a small double-stranded RNA moiety (21–23 nt). One of strands from this small duplex will then be loaded into the Argonaute protein, forming the core complex that targets the 3' untranslated region (UTR) of mRNAs with sequence specificity to elicit post-transcriptional gene silencing [3].

In distinct organisms, multiple Argonautes are involved in the miRNA pathway. In mammals, ectopic expression of the AGO1–4 Argonautes is able to provide miRNA function in cells [8], while fly Ago1 is typically loaded with most miRNAs, some specific ones are bound by Ago2 [9,11]. The presence of several Argonautes in the miRNA pathway implies possible redundant and specialized functions, an aspect still incompletely understood. In this report, we describe the expression and embryonic phenotypes of *C. elegans* *alg-1/2* along with their post-embryonic miRNA interaction profiles with the purpose of providing insights into the shared and the non-redundant functions of the Argonautes of the miRNA pathway.

Results

Structural features of ALG-1 and ALG-2

The *C. elegans* genes *alg-1* and *alg-2* encode two Argonaute proteins with high amino acid sequence similarity (81%; Fig. 1A).

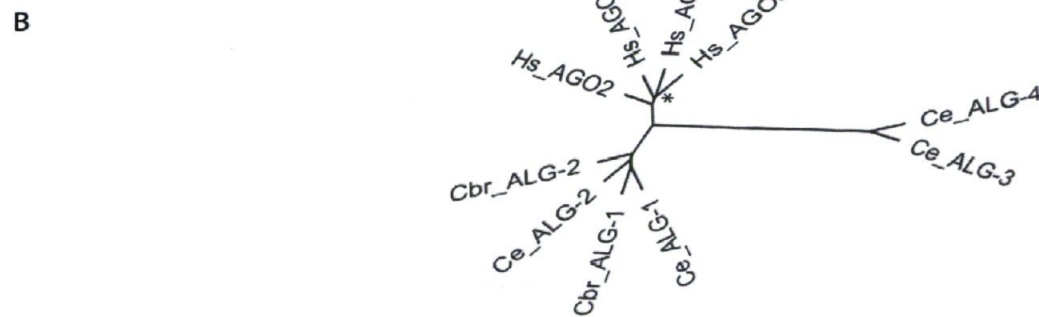
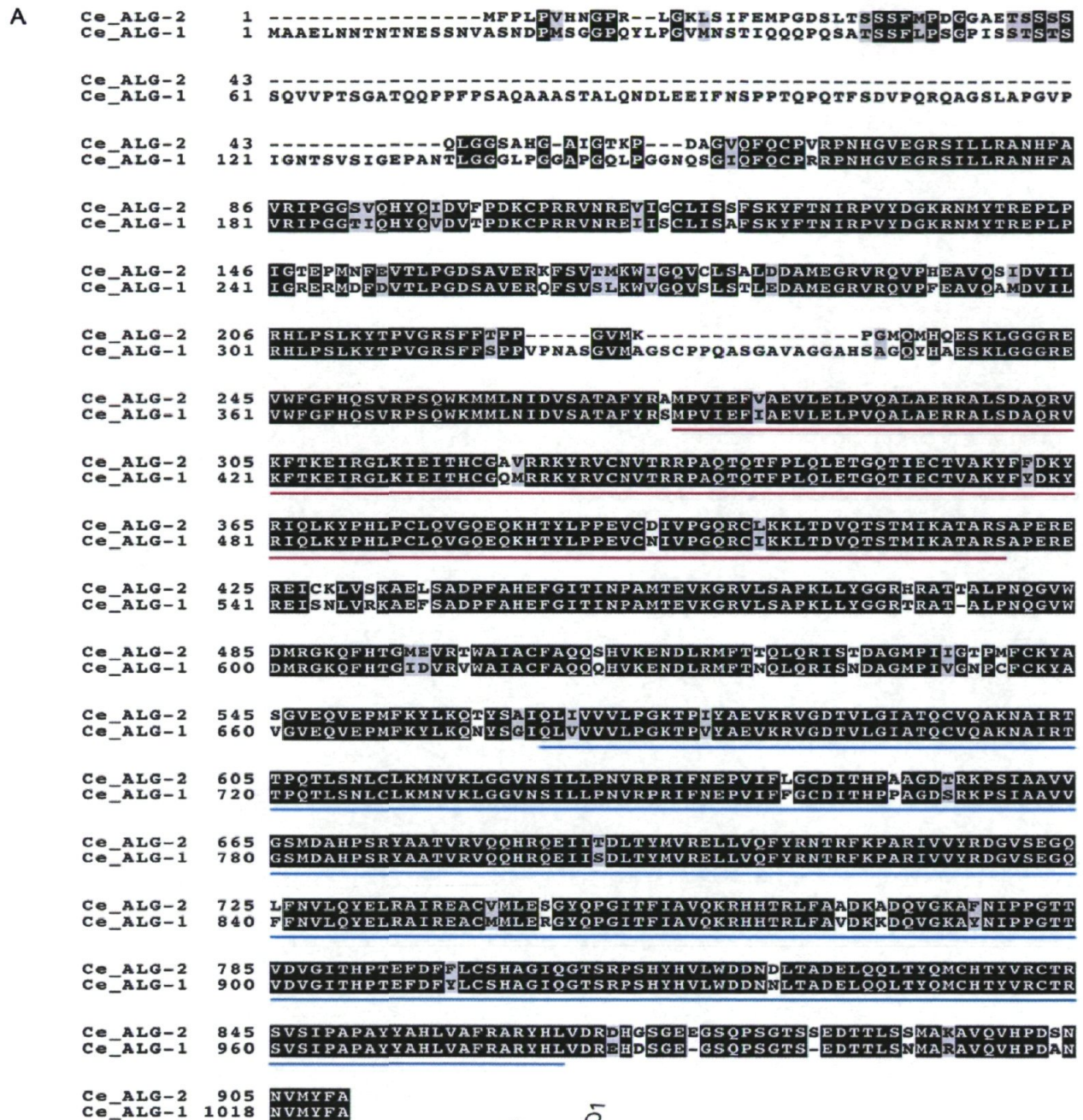


Figure 1. The *C. elegans* microRNA Argonautes *alg-1* and *alg-2*. (A) Amino acid sequence alignment between ALG-1 and ALG-2 proteins (77% identity and 81% similarity). Identical (black) and similar (grey) residues as well as the PAZ (pink) and PIWI (blue) signature domains are indicated. (B)

Neighbor joining tree of nematodes and human AGO-clade Argonautes based on the conserved sites from an alignment of full length protein sequences. With the exception of human AGO1 and AGO3 (*), all the subtrees are robustly significant (higher than 95% bootstrap; 500 trials). Ce, *Caenorhabditis elegans*; Cb, *Caenorhabditis briggsae*; Hs, *Homo sapiens*. doi:10.1371/journal.pone.0033750.g001

The PAZ, PIWI and C-terminal regions of the ALG-1/2 are highly conserved, while the N-terminal region is constituted of amino acids specific to each Argonaute, especially prominent in ALG-1. The N-terminus is involved in protein interactions which confer specificity to ALG-1 [12].

The highly conserved orthologs of both genes that are readily identified in other *Caenorhabditis* species (Fig. 1B) along with the high *alg-1* and *alg-2* DNA sequence similarity, indicates that these genes most probably arose by recent gene duplication as previously suggested by Grishok and collaborators [6].

Expression pattern of ALG-1 and ALG-2

In order to investigate functional differences between *alg-1* and *alg-2*, we first examined their expression pattern using functional translational reporters containing both ALG-1 and ALG-2 tagged with GFP or RFP, preserving their endogenous promoters and UTRs in the respective mutant backgrounds. For simplicity, we refer to the GFP::ALG-2 and RFP::ALG-1 reporters as ALG-2 and ALG-1, respectively. Both Argonautes were found to be broadly expressed in most tissues, but their expression patterns were not completely overlapping. Subsets of neurons in the head ganglia expressed predominantly ALG-2, while the pharynx more prominently expressed ALG-1 (Fig. 2). Cells in the tail also displayed specific expression. Nonetheless, both Argonautes are expressed together in tissues including the vulva, seam cells, ventral nerve chord and somatic gonad (Fig. 2, Table 1, Fig. S1 and Fig. S2). Identical ALG-1 expression was also observed for the common tissues examined by Chan and Slack using similar translational reporter [13]. To confirm that the expression pattern observed with chromosomal arrays reflects the expression of endogenous protein, we performed a whole-worm immunostainings using a polyclonal antibody raised against the ALG-1 specific N-terminus region (ALG-2 specific antibody is not yet available). The endogenous ALG-1 expression was confirmed for the pharynx and head neurons (Fig. S3) further supporting the expression pattern observed with transgenic lines.

We next examined the ALG-1/2 expression in distinct *C. elegans* stages. Examination of the ALG-1/2 expression during larval development did not reveal differences in expression during the four larval stages and adults (Fig. 3). However, during embryogenesis the onset of zygotic expression was distinct. ALG-2 started to be expressed from pre-morphogenetic embryonic stages while ALG-1 is first detected at the beginning of the morphogenetic phase (Fig. 4). Altogether, our data indicated that the ALG-1/2 expression patterns are spatially and temporally overlapping with some specific tissues where one of the Argonautes is predominantly expressed.

microRNA interactions with ALG-1 and ALG-2

To complement the ALG-1/2 expression patterns, we studied the association of a set of miRNAs with ALG-1 and ALG-2 throughout the four larval stages (L1–L4). To achieve this, we first immunoprecipitated ALG-1 and ALG-2 complexes from synchronized larval populations of transgenic worms expressing either ALG-1 or GFP::ALG-2 functional integrated transgenes (Fig. S4). We next purified small RNAs from ALG-1/2 complexes and determined miRNA association by microarrays. While control immunoprecipitations do not show significant difference in miRNA association (data not shown), at each stage of development, we detected a number of miRNAs associated preferentially to ALG-1

or ALG-2 and notably this preferential association was higher in the L1 and L4 stages compared to the L2/L3 stages (Fig. 5). The relative association of miRNAs to the Argonautes at each developmental stage followed a trend of conservation at other stages, but for some miRNAs it changed dramatically during development (*e.g.* miR-44 in L1 and L3 stages associates more with ALG-1 while at L2 and L4 it does with ALG-2, miR-253 switched its relative association from the L1/L2 stages to L3/L4). Therefore, our analysis indicates that while ALG-1/2 largely bind to the same set of miRNAs, the association of specific miRNAs to either Argonaute supports the existence of specificity at the molecular or cellular level that follows specific dynamics during development.

ALG-1/2 are required for embryonic morphogenesis

Although *alg-1* and *alg-2* are highly similar at the sequence level and have mostly overlapping expression patterns, mutants of these Argonautes differ substantially in their phenotypes. Comparison of putative null alleles, reveals that *alg-1(gk214)* mutants have lesser growth and fertility compared to *alg-2(ok304)* [14] and much more penetrant miRNA-related phenotypes like gapped alae (*alg-1* 24%, *alg-2* 0%, *n* = 60) and bursting through the vulva (*alg-1* 27%, *alg-2* 0%, *n* = 40). Besides these post-embryonic phenotypes, neither *alg-1(gk214)* or *alg-2(ok304)* have detectable embryonic lethality under standard growth conditions. To further precise the two Argonautes embryonic phenotypes, a balanced strain with deletion alleles of both genes was constructed (*alg-2(ok304); alg-1(gk214)/unc-84(e1410)*). The strain segregated the expected genotypes but no homozygous *alg-2(ok304); alg-1(gk214)* double mutants (hereafter referred to as double mutants) were ever found as viable worms. Indeed, homozygous double mutants arrested as embryos, consistent with the phenotype observed in simultaneous RNAi knockdown of *alg-1* and *alg-2* [6].

The embryonic arrest of the double mutant indicates that at least one of the two Argonautes has to be zygotically expressed in the embryo to allow complete development. The double mutant predominantly arrested at the 2-fold stage of development at 15 and 25°C (Fig. 6 and data not shown). This stage is part of the morphogenetic phase of development, which follows after most embryonic cell divisions have taken place and comprises major shape changes and completion of organogenesis. The fraction of embryos that arrested either after complete elongation or before morphogenesis is possibly due to incomplete penetrance and variation of the maternally contributed ALG-1 and ALG-2.

To further characterize the embryonic requirement of *alg-1/2*, time-lapse microscopic recordings were conducted. We did not detect developmental defects in the double mutants before the 2-fold stage, and the recordings revealed no evident difference in developmental timing between the double mutant embryos and their viable siblings prior to the 2-fold stage were arrest occurred (Fig. 7 and Movie S1). This supports that the 2-fold arrest is likely caused by the disruption of one or various morphogenetic processes taking place and not the consequence of an earlier embryonic defect.

ALG-1 and ALG-2 requirement in epidermal cytoskeleton and muscle development

The observed embryonic arrest may reflect an impairment of one or several of the process taking place during the morphogenetic phase of development, namely epidermal migration, ventral

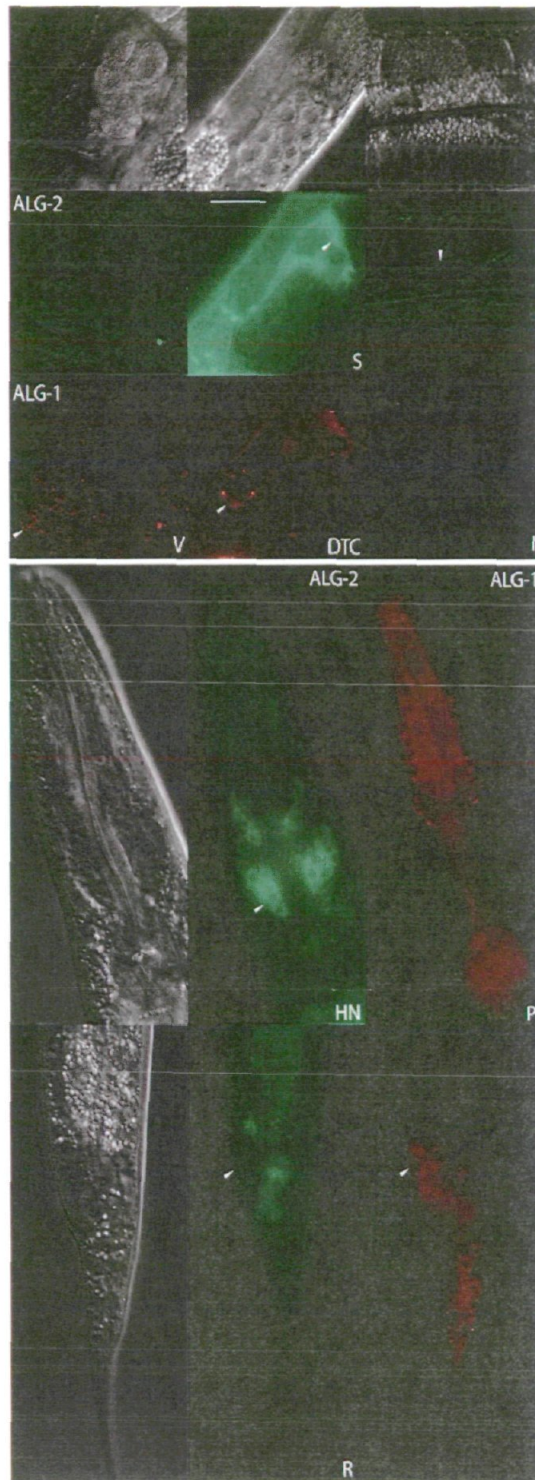


Figure 2. ALG-1 and ALG-2 expression profile in adult worms. **Top panel:** GFP::ALG-2 and RFP::ALG-1 are co-expressed in most tissues including vulva (V) and spermatheca (S). **Bottom panel:** Predominant GFP::ALG-2 expression is seen in a set of head neurons (HN) and tail cells (T) while RFP::ALG-1 is strongly expressed in the pharynx (P) and some tail cells (T). Scale bar 20 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0033750.g002

Table 1. Summary of ALG-1 and ALG-2 expression in different organs and tissues.

Tissue	Abbrev.	ALG-1	ALG-2
Intestine	I	+	+
Pharynx	P	+	-
Head Hypodermis	HH	+	+
Body Hypodermis	BH	+	+
Tail Hypodermis	TH	+	+
Seam cells	SC	+	+
Excretory system	X	+	+
Spermatheca	S	+	+
Distal Tip Cells	DTC	+	+
Uterus	U	+	+
Gonadal Sheath	GS	+	+
Vulva	V	+	+
Body Neurons	BN	+	+
Head Neurons	HN	-	+
Tail Neurons	TN	+	+
Body Muscle	BM	+	+
Rectum	R	+	+

Fluorescence intensity is indicated as + to indicate a discernible signal, and - if signal was not clearly discernible from background fluorescence. doi:10.1371/journal.pone.0033750.t001

enclosure and elongation [15]. During this phase, the epidermal cells, initially located in the embryonic dorsal part, intercalate and extend around the embryo towards the ventral side and fully enclose it. Upon completion of epidermal enclosure, embryos continue to elongate anteroposteriorly, a process whereby epidermal and muscle cells actively drive the constriction of the embryo along its cross-section. Examination of the epidermal adherens junctions, as judged by staining with the junction-specific monoclonal antibody MH27, did not reveal any apparent epithelial polarity defect and revealed a minor epidermal cell shape defect commonly found in embryos with partial or severe muscle defects (data not shown). Consistent with DIC pictures (Fig. 6), embryos could not elongate much beyond the two-fold stage resulting in slightly deformed embryos (Fig. 8B). Thus, proper epidermal specification, dorsal intercalation and ventral enclosure are achieved in the double mutant embryos with very few exceptions.

The elongation process depends on the concerted epidermal and muscle function, and both tissues connect through specialized junctions containing hemidesmosomes and intermediate filaments (known as fibrous organelles) [16]. To investigate their integrity, we co-stained embryos from *alg-2(ok304)*; *alg-1(gk214)/unc-84(e1410)* parents with a hemidesmosome marker (antibodies against VAB-10A protein) and a monoclonal antibody against a muscle marker (NE8/4C6). We observed that fibrous organelles were interrupted, and that muscles appeared to detach from the body wall in those areas in most putative *alg-2(ok304)*; *alg-1(gk214)* embryos: out of 80 embryos laid by heterozygous parents, 21 had elongation defects (putative double mutants), 18 of which also showed fibrous organelle and/or muscle defects (Fig. 8). However, fibrous organelle defects were not as severe as in very strong fibrous organelle mutants such as *vab-10* and *vab-19*, or in *vab-10(e698)*; *eel-1(ok1575)* double mutants [17]. The muscle NE8/

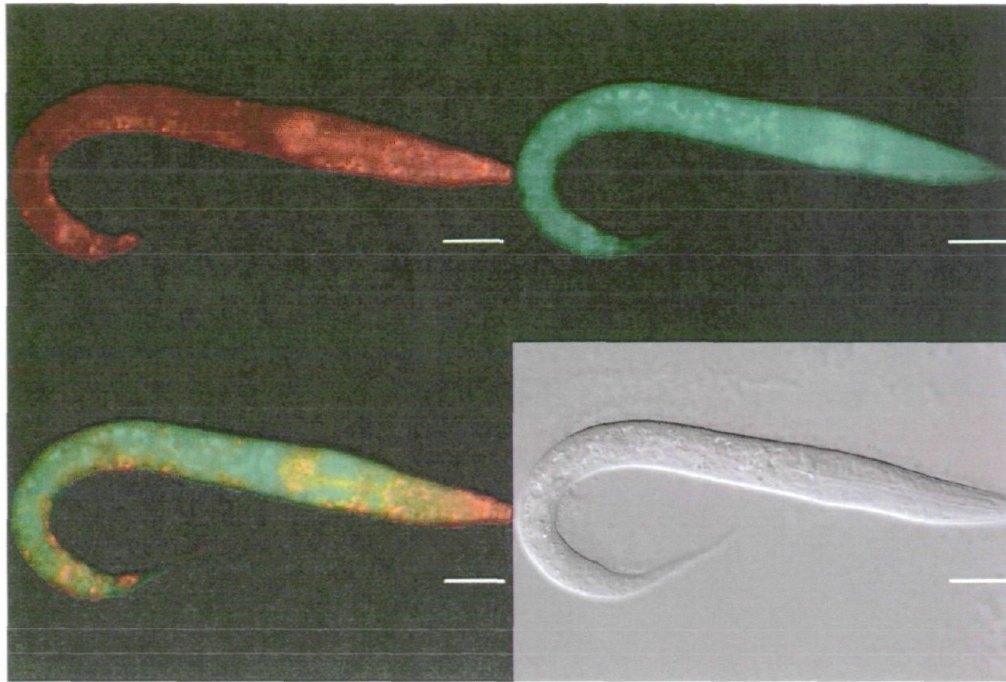


Figure 3. Profile of ALG-1 and ALG-2 expression in larval stage. Expression profile of GFP::ALG-2 and RFP::ALG-1 as seen in the L1 larval stage. Subsequent larval stages (L2 to L4) and adults display the same expression profile (not shown). Scale bar 20 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0033750.g003

4C6 staining pattern was also less severe than in the most severe *pat* mutants which disrupt the attachment of myofibers to the muscle plasma membrane [18].

Altogether our immunofluorescence data are consistent with the time-lapse analysis and suggest that defective embryonic morphogenesis is the primary cause of lethality of the double mutant. The penetrant fibrous organelle defect is compatible with either

disruption of a fibrous organelle component, or of a muscle component.

Discussion

Our study indicates that the Argonaute encoding *alg-1* and *alg-2* genes have remarkable similarities that do not preclude major

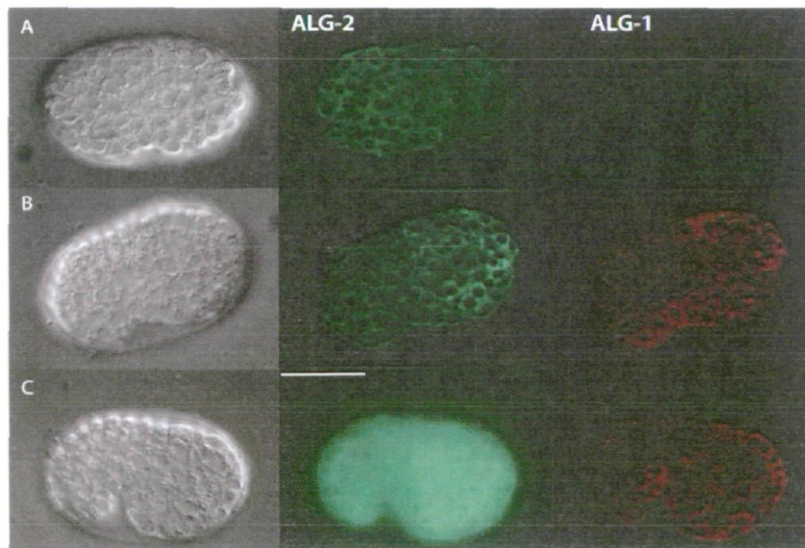


Figure 4. Embryonic ALG-1 and ALG-2 expression. The expression onset of GFP::ALG-2 and RFP::ALG-1 differs. RFP::ALG-1 fluorescence is first detected at the beginning of the morphogenetic phase (B). Scale bar 20 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0033750.g004

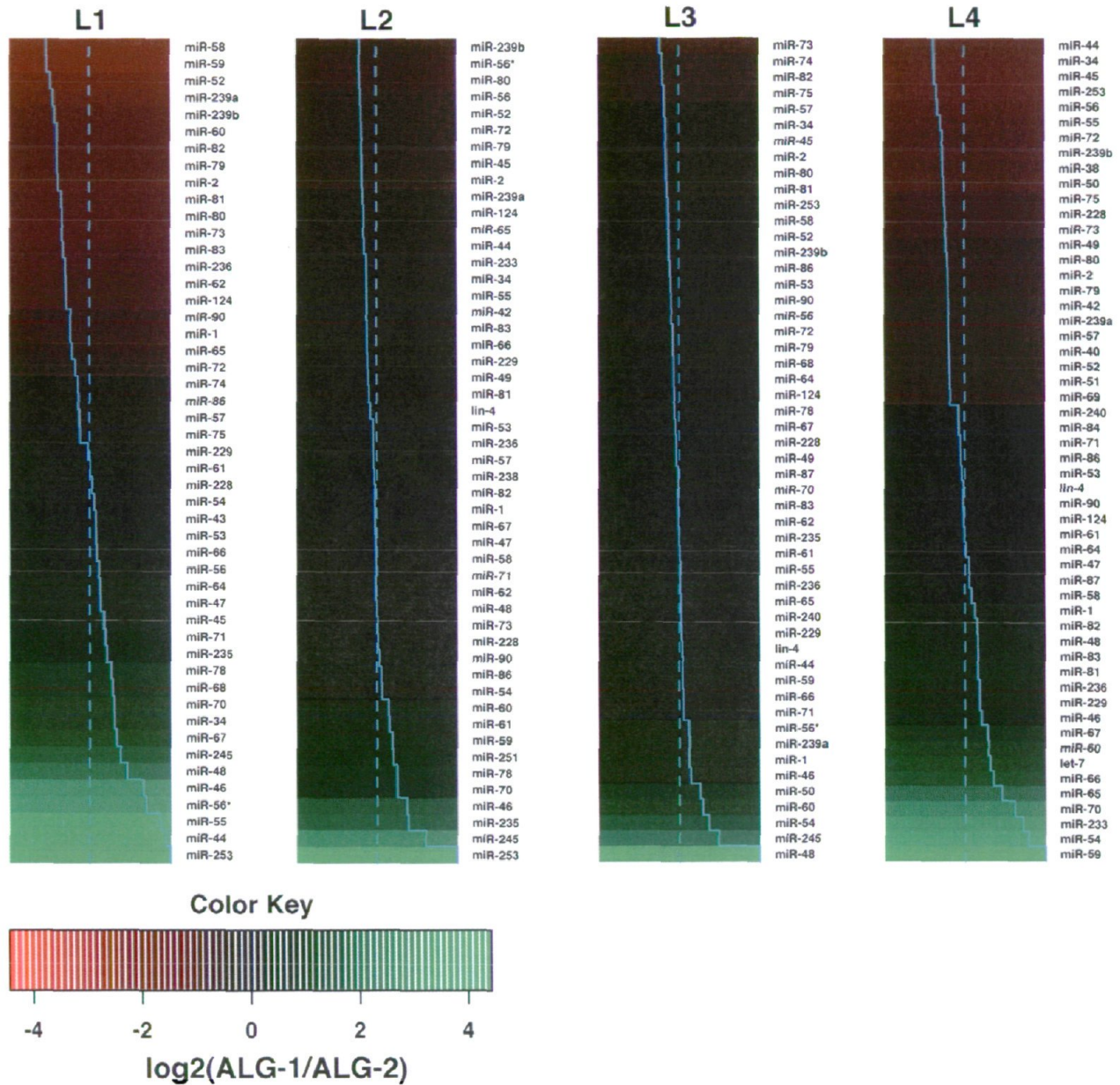


Figure 5. Relative microRNA association with ALG-1 and ALG-2. Heatmaps representing the ratios of ALG-1 to ALG-2 associated miRNAs at the larval stages indicated as estimated from miRNA microarrays (towards red: stronger association to ALG-2, towards green: stronger association to ALG-1). miRNA expression data were filtered for robustly expressed miRNAs. Ratios were \log_2 transformed, centered and normalized for each column. The distance of the solid blue line from the center of each color-cell is proportional to the ratio. Mean ratio indicated as dotted blue line. doi:10.1371/journal.pone.0033750.g005

functional differences. Multiple resemblances include high sequence homology, overlapping expression patterns, partially coincident sets of bound miRNAs, and their redundant requirement for embryonic development. However, single mutant of these genes lead to very distinct phenotypes and effects on the miRNA pathway during worm post-embryonic stages. The more penetrant defects seen in *alg-1* mutants do not correlate with differences in the relative abundance of ALG-1/2, as judged by western analysis using antibody against the conserved region of ALG-1/2 ([19]; unpublished observations).

The detailed analysis of the expression pattern of *alg-1* and *alg-2* demonstrates that ALG-1/2 proteins are overlapping in many tissues, but a specific expression pattern is observed in a subset of head neurons, pharynx and specific cells in the tail. The embryonic onset of expression differs and leads to a pattern that remained constant from the first larval stage to adults. The differences in the *alg-1/2* expression patterns may result in part from transcriptional differences. Genome-wide analysis of the transcription factor PHA-4 has found that it binds to the *alg-1* promoter, while no significant binding is detected in the promoter

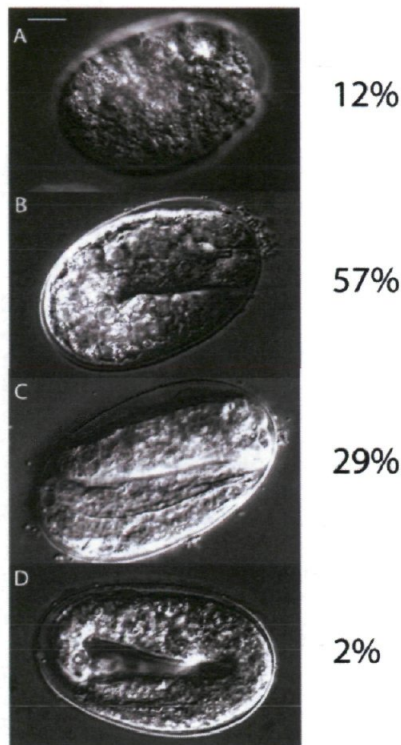


Figure 6. ALG-1 and ALG-2 are required for *C. elegans* embryonic development. Statistics of embryonic arrest at 15°C ($n=272$). Freshly laid eggs on petri dishes were examined after a period of 12 h. A major fraction of double mutant embryos arrest during the morphogenetic phase of development (B–D), mainly at the 2-fold stage (B).

doi:10.1371/journal.pone.0033750.g006

(2 kb upstream from start site) of *alg-2* [20]. Thus, PHA-4 and additional transcription factors may contribute to the specificity of the *alg-1/2* expression in certain tissues.

In agreement with the observed expression overlap, miRNA profiling during the worm larval stages showed that ALG-1/2 bind the studied set of miRNAs coincidentally although a preferential association is detected for some miRNAs. Similar miRNA-Argonaute associations have also been observed for human Argonautes in cultured cells [21]. This preferential association could arise in two ways, differential co-expression of Argonaute and miRNA in certain cells, or as result of molecular Argonaute-miRNA specificity. It should be noticed that observed preferential association of some miRNAs to ALG-1/2, does not constitute an exclusive association that would make specific miRNAs completely dependent on the presence of either ALG-1 or ALG-2.

In a first scenario, the co-expression of a specific Argonaute and miRNA could increase their relative association. The expression of many *C. elegans* miRNAs has been described [22,23,24] and ranges from highly specialized (*i.e.* *lxy-6*) to widely expressed. The presence of specific tissues where one of the *alg-1/2* is predominantly expressed, and the specialized expression seen in some miRNAs could dictate specific miRNA-ALG-1/2 interactions in certain cells or tissues. The correlation of miRNA and ALG-1/2 expression is subject to confounding effects given that the relative association we measured reflects the contribution of all the tissues where the miRNA is expressed. In few cases a correlation is straightforward, ALG-2 is predominantly expressed in neurons

of the head ganglia, and it associates preferentially with the miR-72 miRNA that is expressed only in the head neurons [22].

Alternatively, molecular specificity may explain preferential miRNA-Argonaute association. The identity of the 5' terminal nucleotide confers affinity on small RNAs for different plant Argonautes [25], and duplex mismatches sort out siRNA and miRNA in flies and *C. elegans* [26,27,28]. However, it is yet unknown what could determine the specificity of Argonaute proteins for particular miRNAs. The sequence and structure of miRNAs and their precursors molecules as well as Argonautes interactions with additional factors could potentially confer this specificity. This kind of features may potentially explain the relative association observed among ubiquitously expressed miRNAs such as miR-52 and miR-71 that are associated preferentially with ALG-2 and ALG-1, respectively.

Our observations also demonstrate that genetically, *alg-1/2* share functions during embryonic development. The embryonic lethality of the *alg-1/2* double mutant is not observed in single mutants of Dicer and Drosha, due to the fact that the maternal contribution of these enzymes of the microRNA pathway allows homozygous mutants to complete all developmental stages and become sterile adults [29,30]. In contrast, the embryonic lethality of the double mutant reveals that *alg-1/2* maternal contribution is insufficient to complete development, and thus zygotic expression is required. The *alg-1/2* maternal contribution [31] present in the double mutant, disallowed the examination of the ALG-1/2 role during early development. An early developmental role for specific miRNAs and associated Argonautes in the degradation of maternal transcripts at the maternal to zygotic transition has been documented in zebrafish [32] and the *X. laevis* [33], and could be explored in *C. elegans* by using RNAi. Considering that *alg-1/2* function in the miRNA pathway and that most miRNAs are not essential for development [34,35], the observed embryonic arrest may be the result of the combined loss of a specific set of miRNAs. To date, the absence of the complete *mir-35* and *mir-52* families has been reported as embryonic lethal. The loss of miR-35 family causes a slower development and arrest at the 2-fold to 3-fold stage [35], while the miR-52 family mutant displays unattachment of the pharynx at a late stage of embryonic development [36]. Identification of the miRNAs and targeted genes involved in the embryonic arrest remains open for future work.

Beside *C. elegans*, mutants of the miRNA Argonautes in mammals and *Drosophila* also display embryonic lethality. Ago2 knockout mice display early mesoderm defects [37,38], as well as mid-gestational death due to placental defects [7,39]. Similarly, ago1 and ago2 are together essential for the establishment of segment polarity in flies [40]. Some of these essential developmental roles of the miRNA pathway during animal development may reflect a common requirement of the pathway for the proper differentiation and function of certain tissues. Along this line, our data demonstrate the requirement of *alg-1/2* during the morphogenetic phase of embryonic development, manifested through the predominant arrest at the 2-fold stage, where worms are unable to complete the elongation process. For the most part, the epidermal and muscle tissues of the double mutant embryos are properly specified and epidermal adherens junctions presumably normal. In contrast, the epidermal-muscle attachment structures are mildly but frequently affected. The defects most likely stem from epidermal fibrous organelle or muscle defects. Since both the elongation defects and fibrous organelle staining defects were less severe than those observed in core fibrous organelle mutants, we do not think that ALG-1 and ALG-2, hence that miRNAs, are essential for the production of a core fibrous organelle component. We recently established that muscle contractions are required to

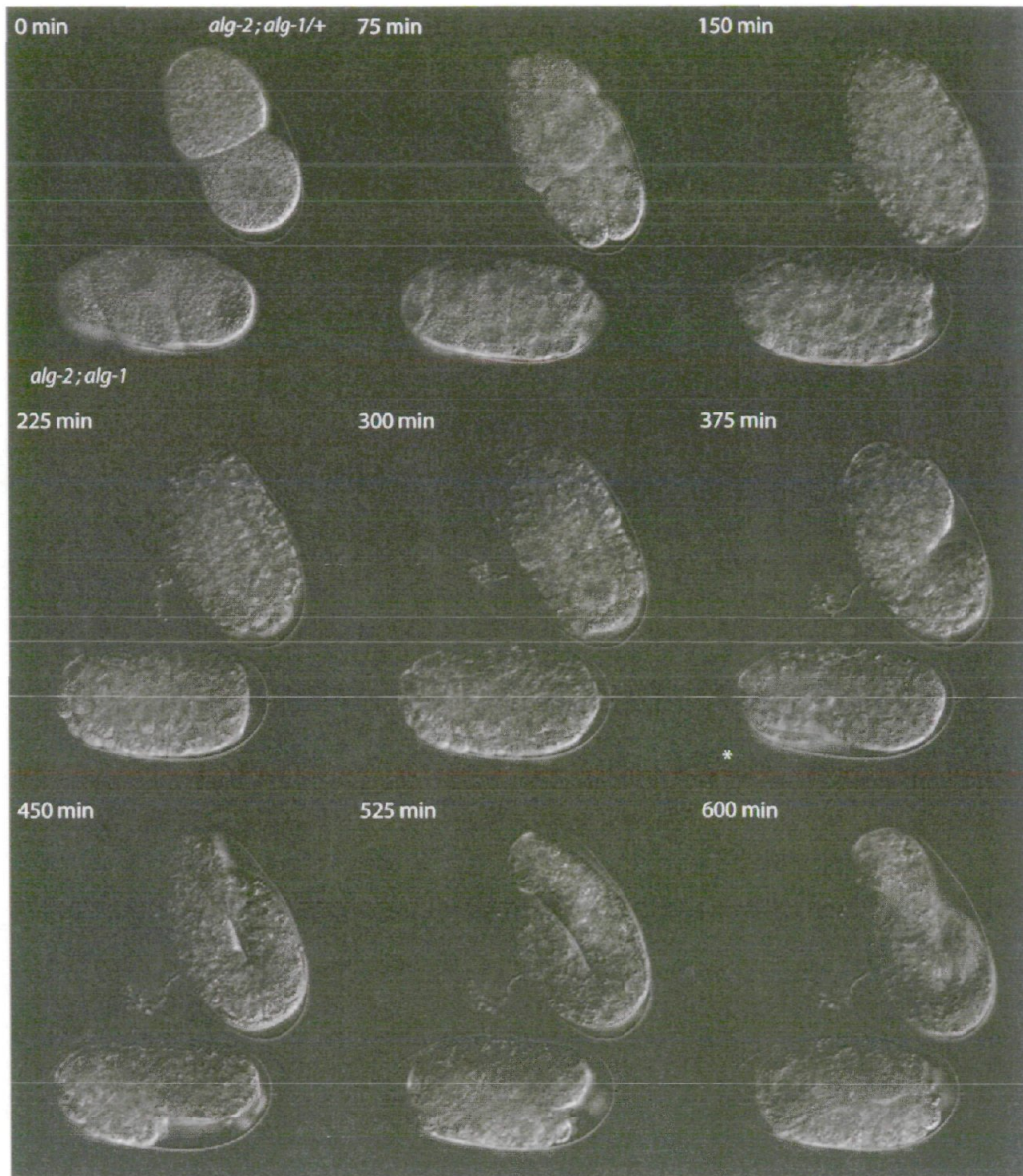


Figure 7. Developmental timing of double *alg-1/2* mutant and siblings. Time-lapse microscopy of *C. elegans* embryos. Both embryos proceed through development at similar rates until the morphogenetic phase (375 min) were the *alg-2(ok304); alg-1(gk214)* double mutant arrest (asterisk). Viable siblings were able to proceed development normally. The double mutant embryos are not paralyzed and are able to twitch (see Movie S1). doi:10.1371/journal.pone.0033750.g007

pattern hemidesmosomes and promote epidermal morphogenesis [41]. Hence, one or more miRNAs might contribute either to some aspect of muscle differentiation and/or contractility, or within the epidermis to relay the muscle-to-epidermis mechanical signal, possibly in a feedback loop. Future experiments should help clarify among those possibilities.

Materials and Methods

Culture conditions and general methods

Worms were cultured in standard conditions [42]. All experiments were performed at 20°C unless otherwise noted.

Transgenic strains

The following transgenic strains were generated by microinjecting mix of plasmids and UV integrated as described in [43,44]:

MJS13: *alg-1(gk214)* In[*alg-1p::rfp::alg-1::alg-1 3' UTR* ; *alg-2p::gfp::alg-2::alg-2 3' UTR* ; pRF4]

MJS18: *alg-2(ok304)* In[*alg-1p::gfp::alg-1::alg-1 3' UTR* ; *alg-2p::rfp::alg-2::alg-2 3' UTR* ; pRF4]

MJS46: *alg-1(gk214)* In[*alg-1p::alg-1::alg-1 3' UTR* ; pRF4]

MJS26: *alg-2(ok304)* In[*alg-2p::gfp::alg-2::alg-2 3' UTR* ; pRF4]

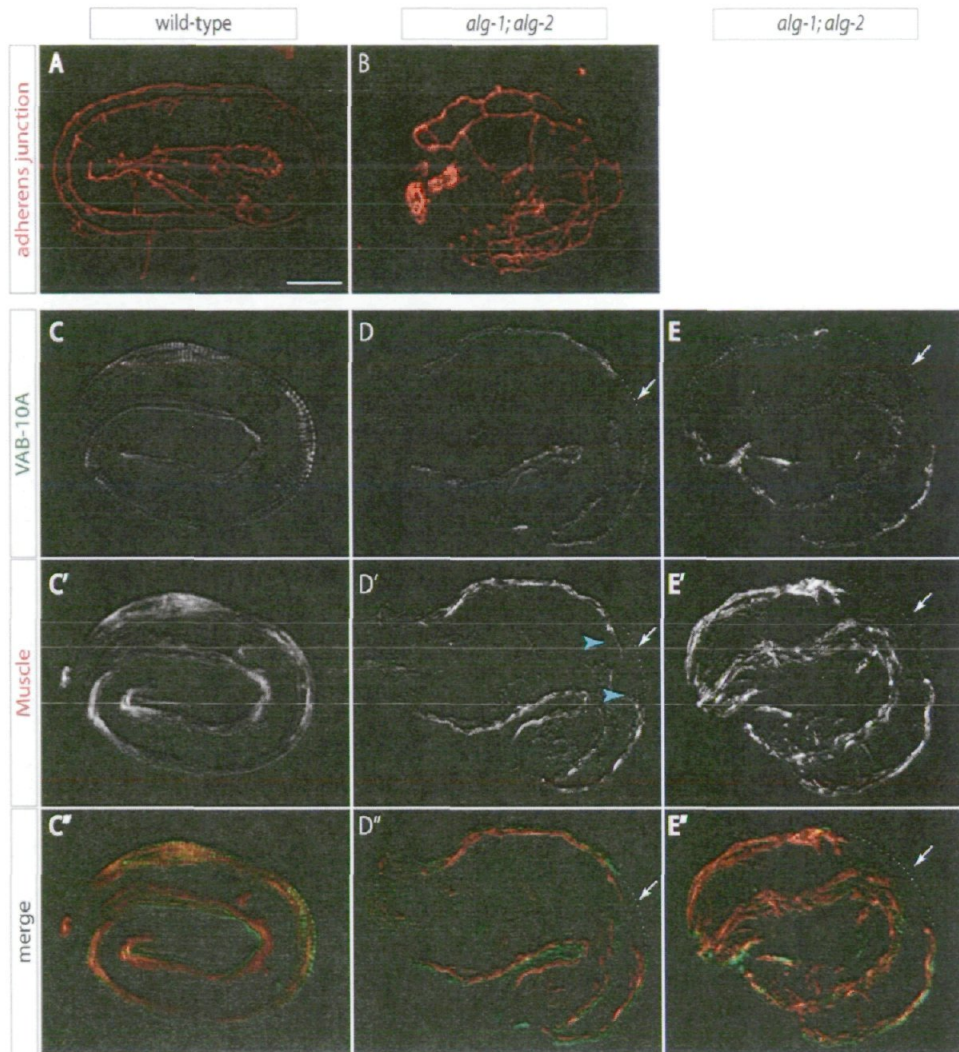


Figure 8. ALG-1/2 function is required to maintain muscles and the epidermis. (A–B) Embryos collected between 6–8 hours post egg-laying at 25°C and stained with the antibodies MH27 (adherens junction). The *alg-1; alg-2* mutant embryo did not progress beyond the two-fold stage, yet has grossly normal junctions. (C–E) Embryos collected between 6–8 hours post egg-laying at 25°C and stained with the antibodies 4F2 (VAB-10A; C–E) and NE8/4C6 (muscle; C'–E'); merge picture (C''–E''). Arrow, are where the fibrous organelle (D–E) and muscle (D'–E') pattern is partially interrupted; in addition, muscles do not closely follow the body wall in this area (they should be closer to the blue dotted line; see blue arrowheads). Embryos did not elongate beyond the two-fold stage.
doi:10.1371/journal.pone.0033750.g008

Microscopy

Worms were examined mounted on agar pads using a Zeiss axioimager M1 microscope.

Time-lapse recordings were done using the AxioVision (Release 4.8) software at 1 minute interval during 600 minutes.

Immunostainings

For embryo stainings, heterozygous *alg-2(ok304); alg-1(gk214)/unc-84(e1410)* mothers were propagated at 25°C (non-permissive for *unc-84*) and allowed to lay eggs for 2-hour intervals. Embryos were collected, fixed and immuno-stained with mAb MH27 (DSHB, University of Iowa; recognizing AJM-1) and polyclonal LIN-26 antibodies (epidermal nuclei; Labouesse et al, 1996), or with the mAb NE8-4C6 (muscle marker; Schnabel, 1995) and polyclonal 4F2 antibodies (against VAB-10A; Boshier et al, 2003)

as described elsewhere (Boshier et al, 2003). The NE8/4C6 monoclonal antibody was provided by the Medical Research Council. Stacks of images every 0.3 μm were captured using a confocal microscope (Leica SP2 AOBS RS); generally 10 confocal sections were projected using ImageJ and then processed using Adobe Photoshop.

For whole worm staining, mix-staged worms were collected and washed extensively several times with M9 buffer and staining was performed as by [45]. Fixed and permeabilized animals were incubated overnight at 4°C with purified rabbit anti-ALG-1 antibody (1:100) and probed with Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1:500) (Molecular Probes) as secondary antibody for 4 hours at room temperature. Images were captured using Zeiss motorized Axioplan 2 microscope at 630× with an AxioCam MRm camera and AxioVision acquisition software.

MicroRNA array profiling in ALG-1 and ALG-2 complexes

The transgenic animals expressing integrated arrays of either ALG-1 or GFP::ALG-2 tagged protein were harvested at specific development stages corresponding to four different larval transitions and total protein lysates were prepared as described previously [12]. Protein lysates prepared from *alg-1* (*gk214*) and for wild-type N2 animals were used as controls for ALG-1 and GFP::ALG-2, respectively. Immunoprecipitations were performed by preclearing 4 mg of total protein with 20 μ l of protein-G magnetic beads (invitrogen) for 1 h at 4°C. The cleared lysates were then incubated for 2 h at 4°C with 20 μ l of protein-G magnetic beads conjugated with either 5 μ g of affinity-purified polyclonal anti-ALG-1 antibody [14] or with the monoclonal antibody anti-AFP 3E6 (QBiogene). The beads were then washed three times with ice-cold lysis buffer containing 1% of Superasin (Roche). 90% of the purified beads were used for total RNA extraction performed as described in [46]. The remaining 10% of beads were boiled in SDS loading buffer and protein resolved by SDS-PAGE on an 8% gel. To detect ALG-1 and GFP-tagged ALG-2, the membranes were incubated overnight at 4°C with either affinity-purified polyclonal anti-ALG-1 diluted 1:5000 or a mouse monoclonal anti-GFP (Roche) diluted 1:2000 in TBST-milk solution, incubated 1 h at room temperature with either anti-rabbit (ALG-1) or anti-mouse (GFP-ALG-2) HRP-conjugated secondary antibody and then visualized by Western Lightening ECL Kit (Perkin Elmer).

RNA molecules extracted from ALG-1 and ALG-2 complexes were then subjected to size selection and purified small RNAs were used for miRNA array profilings as performed in [47]. All miRNA expression data have been submitted to the Gene Expression Omnibus (GEO) with accession number GSE35505 (for microarray platform used).

Supporting Information

Figure S1 ALG-1 and ALG-2 expression profiles. GFP::ALG-2 and RFP::ALG-1 expression in body neurons (BN), seam cells (SC), excretory system cell (X), uterine cells lining the uterine cavity (U) and gonadal sheet cells (GS). Scale bar 20 μ m. (TIF)

References

- Hutvagner G, Simard MJ (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 22–32.
- Ding SW, Voinnet O (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130: 413–426.
- Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 79: 351–379.
- Siomi MC, Saito K, Siomi H (2008) How selfish retrotransposons are silenced in *Drosophila* germline and somatic cells. *FEBS Lett* 582: 2473–2478.
- Klattenhoff C, Theurkauf W (2008) Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development* 135: 3–9.
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, et al. (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106: 23–34.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, et al. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305: 1437–1441.
- Su H, Trombly MI, Chen J, Wang X (2009) Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes Dev* 23: 304–317.
- Forstemann K, Horwich MD, Wee L, Tomari Y, Zamore PD (2007) *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. *Cell* 130: 287–297.
- Conine CC, Batista PJ, Gu W, Claycomb JM, Chaves DA, et al. (2010) Argonautes ALG-3 and ALG-4 are required for spermatogenesis-specific 26G-RNAs and thermotolerant sperm in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3588–3593.
- Iwasaki S, Kawamata T, Tomari Y (2009) *Drosophila* argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol Cell* 34: 58–67.

Figure S2 ALG-1 and ALG-2 expression profiles. GFP::ALG-2 and RFP::ALG-1 expression in head hypodermal cell (HH), tail hypodermal cells and tail neurons (TH, TN), body muscle cells (BM) and larval P cells whose lineage contribute to the neurons and body hypodermis (BH). Scale bar 20 μ m. (TIF)

Figure S3 Immunostaining of ALG-1 in adult *C. elegans* hermaphrodites. Staining with polyclonal antibody against ALG-1 of head organs. (A) A specific signal is detected in the pharynx of wild-type animals. (B) Staining of control *alg-1* (*gk214*) animal. (TIF)

Figure S4 Detection of ALG-1 and GFP::ALG-2 in purified complexes. Detection of ALG-1 (A) and GFP::ALG-2 (B) by Western blot analysis found in the immunopurified (IP) complexes from each developmental stage used for microRNA microarrays. 50 μ g of the total protein (in) were run as controls. (TIF)

Movie S1 Time-lapse analysis of the *alg-2(ok304); alg-1(gk214)/+* embryos. Movie from the time-lapse microscopy shown in Figure 7. The double mutant *alg-2; alg-1* embryo is located at the bottom. (MP4)

Acknowledgments

We would like to thank members of our laboratories for comments on the manuscript. We would also like to thank Eric Paquet for bioinformatics advice, the DNA microarray platform of the Infectious Disease Research Centre (CHUL/CHUQ) as well as Dr Barbara Papadopoulou and Marie-Jeanne Fiola for their help and advice in making the arrays. Some nematode strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by the NIH National Center for Research Resources (NCRR).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AVR GJ JA ML SIAB EAM MJS. Performed the experiments: AVR GJ JA ML SIAB ELR. Analyzed the data: AVR GJ JA ML SIAB EAM MJS. Wrote the paper: AVR JA ML EAM MJS.

22. Martinez NJ, Ow MC, Reece-Hoyes JS, Barrasa MI, Ambros VR, et al. (2008) Genome-scale spatiotemporal analysis of *Caenorhabditis elegans* microRNA promoter activity. *Genome Res* 18: 2005–2015.
23. Isik M, Korswagen HC, Berezikov E (2010) Expression patterns of intronic microRNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Silence* 1: 5.
24. Johnston RJ, Hobert O (2003) A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 426: 845–849.
25. Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, et al. (2008) Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133: 116–127.
26. Steiner FA, Hoogstrate SW, Okihara KL, Thijssen KL, Ketting RF, et al. (2007) Structural features of small RNA precursors determine Argonaute loading in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Struct Mol Biol* 14: 927–933.
27. Jannot G, Boisvert ME, Banville IH, Simard MJ (2008) Two molecular features contribute to the Argonaute specificity for the microRNA and RNAi pathways in *C. elegans*. *RNA* 14: 829–835.
28. Tomari Y, Du T, Zamore PD (2007) Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* 130: 299–308.
29. Knight SW, Bass BL (2001) A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293: 2269–2271.
30. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432: 231–235.
31. Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF (2006) The *Caenorhabditis elegans* Argonautes ALG-1 and ALG-2: almost identical yet different. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 189–194.
32. Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, et al. (2006) Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312: 75–79.
33. Lund E, Liu M, Hartley RS, Sheets MD, Dahlberg JE (2009) Deadenylation of maternal mRNAs mediated by miR-427 in *Xenopus laevis* embryos. *RNA* 15: 2351–2363.
34. Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Abbott AL, Lau NC, Hellman AB, et al. (2007) Most *Caenorhabditis elegans* microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS Genet* 3: e215.
35. Alvarez-Saavedra E, Horvitz HR (2010) Many families of *C. elegans* microRNAs are not essential for development or viability. *Curr Biol* 20: 367–373.
36. Shaw WR, Armisen J, Lehrbach NJ, Miska EA (2010) The conserved miR-51 microRNA family is redundantly required for embryonic development and pharynx attachment in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 185: 897–905.
37. Morita S, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T, et al. (2007) One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics* 89: 687–696.
38. Alisch RS, Jin P, Epstein M, Caspary T, Warren ST (2007) Argonaute2 is essential for mammalian gastrulation and proper mesoderm formation. *PLoS Genet* 3: e227.
39. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ (2010) A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465: 584–589.
40. Meyer WJ, Schreiber S, Guo Y, Volkmann T, Welte MA, et al. (2006) Overlapping functions of argonaute proteins in patterning and morphogenesis of *Drosophila* embryos. *PLoS Genet* 2: e134.
41. Zhang H, Landmann F, Zahreddine H, Rodriguez D, Koch M, et al. (2011) A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis. *Nature* 471: 99–103.
42. Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71–94.
43. Mello C, Fire A (1995) DNA transformation. *Methods in Cell Biology* 48: 451–482.
44. Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V (1991) Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *Embo J* 10: 3959–3970.
45. Bettinger JC, Lee K, Rougvie AE (1996) Stage-specific accumulation of the terminal differentiation factor LIN-29 during *Caenorhabditis elegans* development. *Development* 122: 2517–2527.
46. Hutvagner G, Simard MJ, Mello CC, Zamore PD (2004) Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2: E98.
47. Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, et al. (2004) Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* 5: R68.

Polypyrimidine Tract Binding Protein (hnRNP I) Is Possibly a Conserved Modulator of miRNA-Mediated Gene Regulation

Bart Engels¹, Guillaume Jannot², Judit Remenyi¹, Martin J. Simard², György Hutvagner^{1,3*}

1 Wellcome Trust Centre for Gene Regulation and Expression, College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, United Kingdom, **2** Laval University Cancer Research Centre, Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), Québec City, Québec, Canada, **3** Centre for Health Technologies, University of Technology, Sydney, Sydney, Australia

Abstract

MiRNAs can regulate gene expression through versatile mechanisms that result in increased or decreased expression of the targeted mRNA and it could effect the expression of thousands of protein in a particular cell. An increasing body of evidence suggest that miRNAs action can be modulated by proteins that bind to the same 3'UTRs that are targeted by miRNAs, suggesting that other factors apart from miRNAs and their target sites determine miRNA-modulation of gene expression. We applied an affinity purification protocol using biotinylated *let-7* miRNA inhibitor to isolate proteins that are involved in *let-7* mediated gene regulation that resulted in an affinity purification of Polypyrimidine Tract Binding protein (PTB). Here we show that PTB interacts with miRNAs and human Argonaute 2 (hAgo2) through RNA as well as identified potential mammalian cellular targets that are co-regulated by PTB and hAgo2. In addition, using genetic approach, we have demonstrated that PTB genetically interacts with *Caenorhabditis elegans let-7* indicating a conserved role for PTB in miRNA-mediated gene regulation.

Citation: Engels B, Jannot G, Remenyi J, Simard MJ, Hutvagner G (2012) Polypyrimidine Tract Binding Protein (hnRNP I) Is Possibly a Conserved Modulator of miRNA-Mediated Gene Regulation. PLoS ONE 7(3): e33144. doi:10.1371/journal.pone.0033144

Editor: John J. Rossi, Beckman Research Institute of the City of Hope, United States of America

Received: September 18, 2010; **Accepted:** February 10, 2012; **Published:** March 9, 2012

Copyright: © 2012 Engels et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The work has been funded by the Wellcome Trust and European Framework 6 SIROCCO consortium fund (G.H.) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (M.J.S.). G.H. is a Wellcome Trust CD fellow and M.J.S. is a CIHR New Investigator. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: gyorgy.hutvagner@uts.edu.au

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are conserved key regulators of gene expression. They mainly repress protein translation via seemingly distinct mechanisms (reviewed in: [1]) however; recently they were also shown to be involved in enhancing translation at specific cellular environment [2]. miRNAs are essential for proper development in diverse organisms, they are involved in many disease including cancer. Furthermore, in mammals miRNAs alter the expression of thousands of proteins suggesting that they are also responsible for regulating the protein homeostasis in cells by fine-tuning the proteome [3,4]. miRNAs are incorporated into the RNA induced silencing complex (RISC), in which the core protein an Argonaute family member (reviewed in: [5]). These complexes pair with their targets through the seed sequences that span from 2nd to the 8th nucleotide of the 5' end of a miRNA. There are increasing amount of evidence that other RNA binding proteins are also involved in modulating miRNA-mediated gene expression at the effector step. HuR, an AU-rich element (ARE) binding protein, was demonstrated to relieve the miR-122 mediated CAT-1 repression in human hepatocarcinoma cells upon amino acid starvation [6]. Another RNA binding protein Dnd1 was shown to protect miR-430 targeted mRNAs in zebrafish primordial cells and miR-372 targeted mRNAs in human cells derived from germ line through binding to U-rich regions (URR) located in the miRNA targeted mRNA regions [7]. CRD-BP (IMP-1) attenuates

miR-183-mediated gene silencing by preventing the association of Ago2 complexes with the regulated 3' UTR [8]. Furthermore, the affinity purification of a range of RNA binding proteins that have functions in diverse step of RNA biogenesis, transport and RNA translation. Indeed, UPF1 and RBM4 (both associated with hAgo2 and hAgo1) have already been demonstrated to be required for miRNA-mediated gene silencing [9,10]. Some of these co-factors identified by proteomics could also modulate miRNA-mediated gene expression in a target or miRNA specific manners since RNA was shown to mediate many of these interactions [10].

Polypyrimidine Tract Binding protein (PTB), or hnRNP I, is a shuttling RNA binding protein that recognizes short pyrimidine rich sequences and it is involved in the regulation of a wide variety of RNA-dependent biological processes (reviewed in [11]). PTB is a negative and positive regulator of alternative splicing and it regulates its own splicing [12,13,14,15,16,17]. PTB could also bind to the 3'UTR of mRNAs and this interaction was shown to be important to regulate mRNA transport and the stability of certain mRNAs [18,19,20,21,22]. PTB is a key factor in Internal Ribosomal Entry Site (IRES) mediated translation initiation of viral (reviewed in [23]) and cellular mRNAs via its association with the 5'UTRs of these mRNAs [24,25,26]. PTB has four RNA recognition motif (RRM) domains and all are capable of binding RNAs [27]. An important structural feature of its interaction with RNA is that RRM3 and 4 form a stably packed "back-to-back"

didomain, necessitating looping of a stretch of at least 12 nt of RNA between the two pyrimidine motifs recognized by RRM3 and 4 [28] [29]. PTB could execute some of its diverse functions by acting as a RNA chaperone and restructuring the RNA so as to either mask, or promote the accessibility of, binding sites for other effector proteins or miRNAs [30]. Interestingly, expression of both PTB and its paralogue nPTB are regulated by miRNAs during neuronal and muscle differentiation, and PTB also regulates expression of its paralogues via splicing [31,32,33]. Moreover, PTB can be affinity purified with the conserved loop sequence of the hsa-miRNA-101-1, suggesting a potential role in the regulation of the processing of this miRNA family [34].

Here we have shown that PTB is in complex with human Ago2 and miRNAs. We have also identified potential mRNAs that are co-regulated by PTB and Ago2 post-transcriptionally in human cells. Furthermore, a genetic interaction observed between *C. elegans* PTB and *let-7* miRNA supports a conserved function of PTB in modulating miRNA-mediated gene regulation.

Results

Affinity purification of PTB using biotinylated 2'-O-Methyl *let-7* inhibitor

Inhibitors of miRNAs are widely used *in vitro* and *in vivo* in diverse cells and organisms for investigating miRNA functions and characterizing miRNA-target interactions [35,36,37]. These efficient and specific inhibitors are usually modified RNase resistant oligonucleotides with a perfect complementary to their target miRNAs. A 2'-O-Methyl containing oligonucleotide inhibitor that interferes with *let-7* function in human cells and *C. elegans* has already been reported (Fig. 1A) [36]. In addition, a biotin tagged version of this oligo pulls down constituents of miRNA complexes [36,38]. We asked if we could use this approach to purify additional proteins associated with the *let-7* programmed miRNA induced silencing complex (miRISC) in human cells. First, we tested if we could detect *let-7* and human Ago2, the components of the *let-7* programmed minimal RISC, in the bound fraction purified with the biotinylated *let-7* complementary oligo from HeLa cell lysates. The affinity purification showed that both Ago2 and *let-7* were bound to the *let-7* specific oligo but they were not detectable in the bound fraction of the affinity purification carried out with a non-specific 2'-O-Methyl oligo (Fig. 1B). Next, we carried out scaled-up affinity purifications to identify proteins that bound specifically along with *let-7* and the *let-7* associated RNPs. We found several proteins that co-purified with the *let-7* complementary oligo, but the only protein that we identified in at least two independent affinity purifications was PTB (Fig. 1C, the two panels show the result of the two independent affinity purifications).

PTB binding to the *let-7* complementary oligo is sensitive to mutations in the *let-7* seed complementary sequence

Since PTB is an abundant RNA binding protein, we asked whether binding of the protein to the column depends on characteristics of the miRNA-target interactions or if it is a non-specific interaction with the 2'-O-methyl RNA column. MiRNAs bind their target through the seed sequence; we therefore mutated two nucleotides in the *let-7* oligo that pair with the seed sequence of members of the *let-7* miRNA family (Fig. 1A). We first tested this oligo in miRNA inhibitory study in human cells to see if we were able to abrogate its influence of miRNA-mediated gene regulation. We co-transfected the control, the *let-7* complementary, and the *let-7* seed mismatched oligos into HeLa cells together with a luciferase reporter plasmid that carried a portion of the 3'UTR of

the human HMGA2, which contains four bona fide *let-7* target sites [39,40]. As expected, the *let-7* complementary oligo enhanced the expression of the reporter plasmid significantly by inhibiting the miRNA function (Fig. 2A). On the other hand, the *let-7* mismatched oligo did not show any significant effect on the expression of the *let-7* reporter suggesting that the mutated oligo no longer interferes with miRNA action (Fig. 2A). Next we used the seed mismatched oligo in affinity purification experiments to see how its affinity to the component of the *let-7* programmed miRISC and PTB is affected. Quantification of bound *let-7* showed that the seed mismatched oligo bound only half the amount of *let-7* that was affinity purified with the *let-7* complementary oligo (Fig. 2B). In addition, the introduced seed mismatches significantly reduced the oligo affinity to Ago2 and PTB (Fig. 2C and D). We noticed that the oligo we are using for affinity purification contains a canonical PTB binding motif UCUUC (Fig. 1A). To determine whether the interaction between PTB and the oligo is mediated by this motif, we generated a new oligo with two mutations in the putative PTB binding site (Fig. 1A: PTB(-) oligo). Affinity purification with this oligo showed similar levels of bound Ago2, PTB and *let-7*, indicating that our purification was indeed dependent upon the *let-7* binding and thus specific (Fig. 2C).

PTB interacts with the miRNA programmed RISCs in an RNA dependent manner

To confirm the association between PTB and the *let-7* programmed RISC, we first carried out immunoprecipitation experiments with antibodies raised against PTB. We showed that PTB immunoprecipitates with Ago2 (Fig. 3A upper panel) and the mature *let-7* miRNA (Fig. 3A lower panel). In order to test if this interaction is specific, we repeated this experiment using different lysis protocols (Figure S1A and B) and antibodies that recognizes different epitopes of PTB (Figure S1C). In all cases, we could detect Ago2 and *let-7* specifically associated with the PTB bound fractions. Next, we transfected HeLa cells with a GFP::PTB fusion plasmid in parallel with plasmid only expressing GFP and we carried out immunoprecipitation with a GFP specific antibody. We found that Ago2 and *let-7* co-immunoprecipitate with the GFP::PTB but not with GFP alone (Fig. 3B). Finally, we generated U2OS cells constitutively expressing GFP::PTB and repeated the immunoprecipitation. This experiment again showed that *let-7* specifically associated with PTB (Fig. 3C). Finally, we carried out co-fractionation experiment and observed that a substantial fraction of *let-7* co-fractionates with PTB (Figure S2).

Next we asked whether other miRNAs are associated with PTB or its association is specific to *let-7*. When we re-hybridized the RNAs derived from PTB IPs with a probe detecting miR-21, we observed its presence in the PTB containing bound fractions (Figure S3A and B). This data suggest that PTB interacts with diverse miRISCs and it may have a more general role in miRNA-mediated gene regulation.

Next we tested whether PTB binds to RISC solely via protein-protein interaction or if its binding is mediated by RNA. When we RNase treated the bound fraction of the immunoprecipitated PTB we observed that the majority of Ago2 was released from the bead suggesting that PTB is primarily associated with miRNA complexes via RNAs (Figure 3D).

Knocking down PTB in HeLa cells results in the upregulation of nPTB, the neuron specific homologue of PTB, that has similar function in the regulation of splicing in HeLa cells [32]. Therefore, we tested if the depletion of PTB could induce nPTB expression and whether nPTB could bind to miRNA complexes. As previously observed, when PTB expression was inhibited with

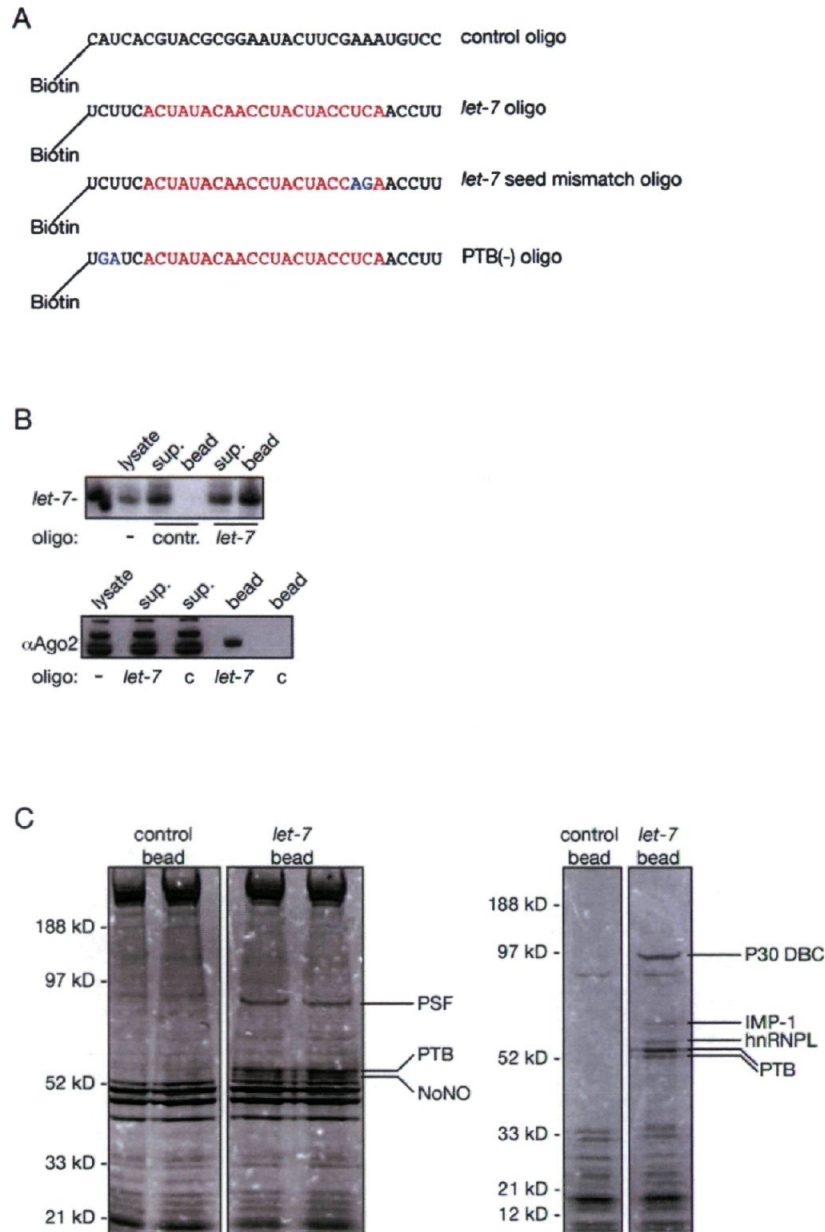


Figure 1. Affinity purification of *let-7* associated complexes. (A) Biotinylated 2'-O-methylated oligos used in this study. Sequences highlighted with red are complementary to *let-7a*. Blue nucleotides indicate changes generated from the original *let-7* oligo. (B) Northern hybridization (top panel) and Western blot (bottom panel) show that *let-7* oligo specifically purifies *let-7* miRNA and hAgo2 protein. sup.: supernatant; c and cont.: control oligo. (C) Proteins co-purify with *let-7* oligo. Right and left panels show the results of the independent affinity purifications. Proteins that are specifically pulled down with the *let-7* oligo are labeled next to the stained gels.
 doi:10.1371/journal.pone.0033144.g001

siRNA we also detected a marked increase in nPTB expression [31,32,33] (Fig. 4A). We also showed that the XR tagged nPTB co-immunoprecipitates with *let-7* (Fig. 4B). This data suggests that the PTB paralogues might have redundant functions in miRNA-mediated gene regulation.

PTB alters Argonaute 2 association of human mRNAs

After establishing the connection between PTB and the miRNA loaded RISC, we went to look for mRNAs that are regulated by

miRNAs to determine whether PTB could modulate this interaction. We hypothesized that if PTB and miRNAs are involved in the regulation of mRNAs then knock-down of PTB should affect the association of the miRNA-targeted mRNAs with miRISC. Spellman and colleagues reported a 2D DiGE proteomics analysis that identified proteomic changes in response to PTB knock-down in HeLa cells [32]. While many of the observed changes in protein expression were explained by PTB-dependent alternative splicing, some of the up and down-regulated

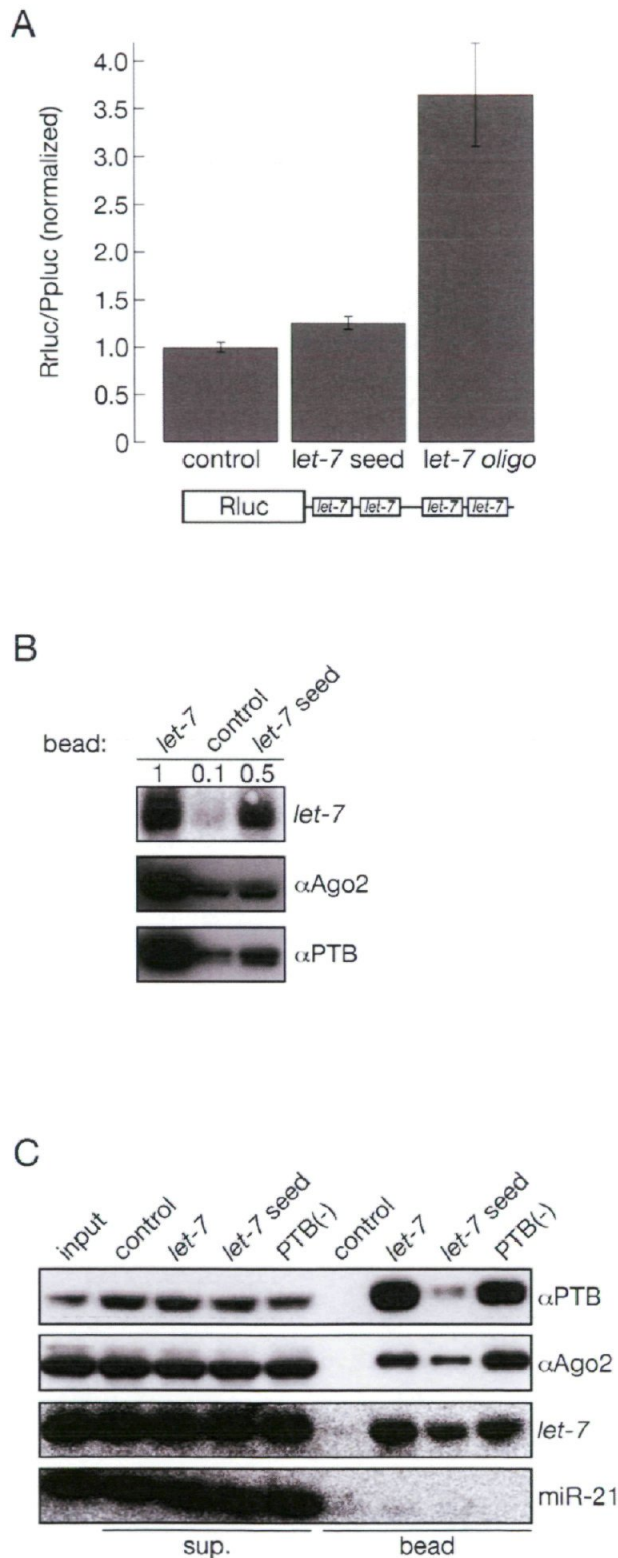


Figure 2. PTB association with the *let-7* bead depends of the *let-7* seed complementary sequences. (A) *let-7* seed mutant oligo could not inhibit *let-7* mediated gene repression. Renilla luciferase expressing plasmid containing a part of the 3' UTR of human HMGA2

that carries four *let-7* target sites were transfected into HeLa cells together with Firefly expressing plasmid, as internal control, and the indicated 2'-O-methyl oligos. The graph shows the result of the dual-luciferase assay normalized to the control oligo. The error bars represent the standard error of three experiments. (B) *let-7*, hAgo2 and PTB are sensitive to the presence of the seed sequence of the *let-7* oligo. The quantity of *let-7* miRNA associated with the indicated oligos was quantified using Northern hybridization and normalized to the amount of miRNA pulled down with the wild-type *let-7* oligo. The presences of hAgo2 and PTB on the indicated beads were monitored by Western hybridization. (C) PTB association with the *let-7* column does not depend on the presence of the canonical PTB site in the oligo. Affinity purifications were carried out with the indicated oligos and the association of miRNAs, hAgo2 and PTB with these oligos was monitored by Northern hybridization and Western blotting. sup.: supernatant. doi:10.1371/journal.pone.0033144.g002

proteins could not be explained by such events. The mRNAs of these proteins are potential candidates for co-regulation by PTB and miRNAs.

We therefore knocked down PTB and nPTB expression in HeLa cells in triplicates and immunoprecipitated Ago2 from the cells transfected with the control and PTB/nPTB siRNAs (Figure 5A). We next purified RNAs from the Ago2 immunoprecipitates and subjected them to q-PCR using primers that specifically amplify ten candidate mRNAs chosen from the result of the 2D DiGE proteomics. Then, we quantified the changes in the relative abundance (normalized with the level of GAPDH mRNA) of the selected mRNAs in the Ago2 IPs derived from the PTB/nPTB knock down samples by comparing them to the Ago2 IPs were carried out from the control siRNA transfected cells. We also measured the level of the selected mRNAs in total RNAs isolated from the control and PTB/nPTB knock cells. We observed that knocking down PTB/nPTB does not have significant affect on the steady state mRNA levels for most of the selected putative targets (Figure 5B–F). In the case of five putative targets, we found significant differences in the change of the levels of mRNAs associated with Ago2 after PTB/nPTB knock down suggesting that these mRNAs are co-regulated by PTB and miRNAs post-transcriptionally. In four cases (ECH1, CPS1, P4HB, EFHD2) the relative mRNA levels were decreased in the Ago2 IP after PTB/nPTB knock down, indicating that PTB promotes miRNA binding (Figure 5B–E). These cases are consistent with the preceding observations of an association between PTB and Ago2. In contrast, PTB depletion resulted in an increase of RAD23B mRNA in the Ago2 immunoprecipitates, indicating that in this case PTB antagonizes the miRNA-mediated gene regulation of RAD23B (Figure 5F). The majority of these five mRNAs have conserved miRNA target sites predicted by Targetscan (<http://www.targetscan.org>) and/or PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de>) corresponding to miRNAs are expressed in HeLa cells [41]. Also, Rad23B was shown to be targeted by miRNAs in hypoxia [42]. The only exception is ECH1 that only contains non-conserved predicted miRNA target sites. Also, 4 out of 5 potential PTB/miRNA targets (CPS1, EFHD2, P4HB and RAD23) were identified to bind to PTB using PTB iCLIP experiments (J. Ule personal communication) [17].

PTB modulates *let-7* mediated gene silencing in *C. elegans*

In order to test if the functional interaction between PTB and miRNAs are conserved, we decided to test this interaction in animals using the nematode *Caenorhabditis elegans*. Since *let-7* loss-of-function is lethal [43], we used a *C. elegans* strain that carries a thermosensitive (ts) allele of the *let-7* gene (*(let-7(n2853))*; [43]. We can therefore test if the *C. elegans* ortholog of the human PTB gene

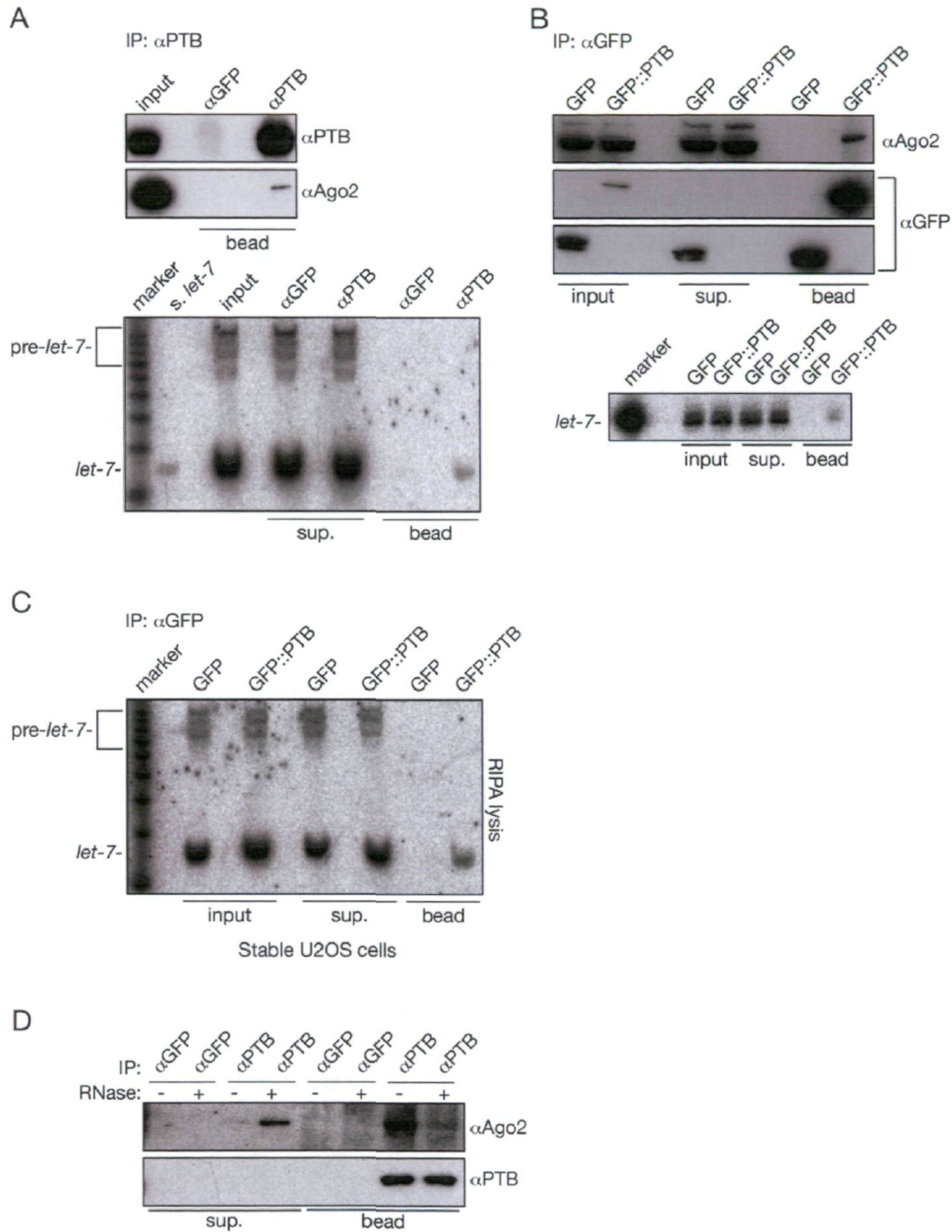


Figure 3. PTB is associated with hAgo2 and *let-7* miRNA. Endogenous PTB in HeLa cells (A), PTB fused with GFP in HeLa cells (B) and stably expressed GFP::PTB in U2OS cells (C) co-purify with endogenous hAgo2 and *let-7*. Immunoprecipitations (IP) were carried out with the indicated antibodies. The bound fractions were assayed for hAgo2 and PTB with western blotting (top panels) and for *let-7* with Northern hybridization (bottom panels). (D) PTB association with Ago2 is mediated by RNA. IPs were carried out with antibodies against GFP and PTB. The parts of the bound fraction were subjected to RNase treatment and the supernatants of the RNase treated beads and the remaining bound fractions were assayed for hAgo2 and PTB by Western blotting.
doi:10.1371/journal.pone.0033144.g003

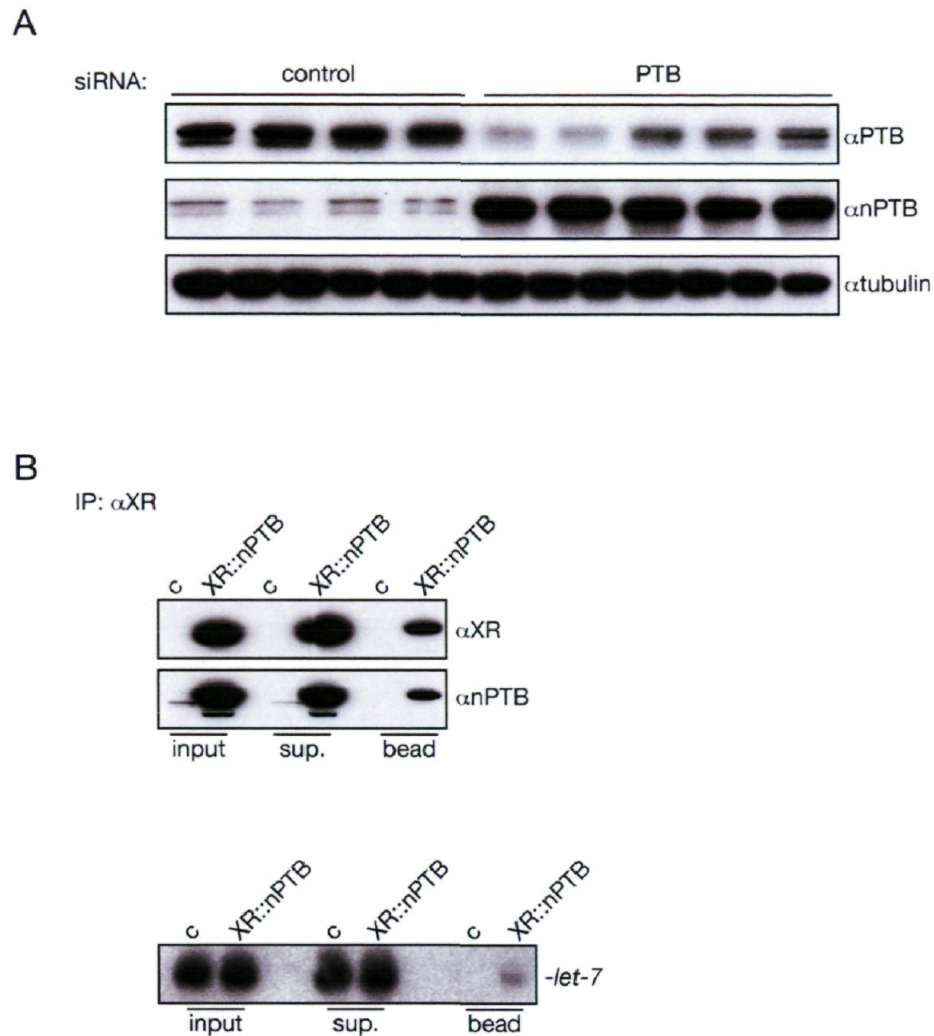


Figure 4. nPTB could also be associated with miRISC. (A) The knock down of PTB results in the increase of nPTB expression in HeLa cells. PTB was knock down with specific siRNA and PTB and nPTB levels were monitored with Western blotting. Tubulin was used as a loading control. *: non-specific hybridization visualized by the nPTB antibody. (B) nPTB is associated with miRNA. XR tagged nPTB was overexpressed and IP was carried out with antibody recognizing XR. The efficiency of the IP was checked with Western blotting using XR and nPTB antibodies. RNA was purified from the immunoprecipitates and assayed for the presence of *let-7* using Northern blotting. c: empty bead. doi:10.1371/journal.pone.0033144.g004

called *ptb-1* contributes to *let-7*-mediated gene regulation in animals. While *ptb-1(gk113)* animals has no obvious phenotype, the loss of *ptb-1* in *let-7ts* animals enhanced the observed phenotype (the double mutant population has twice as much sterile animals than the *let-7ts* animals: Figure 6A). Since we did not observe change in the steady state level of *let-7* in the double mutant (Figure 6B), we concluded that PTB is likely required for miRNA-mediated gene silencing at the effector step.

Taken together, our data suggest that like observed in humans, *C. elegans* PTB is working in collaboration with *let-7* miRNA to regulate *let-7*-specific gene.

Discussion

We have affinity purified PTB with biotinylated miRNA complementary oligonucleotides and showed that PTB/nPTB associate with the miRISC in an RNA dependent manner. This

observation suggests that the interruption of the miRNA and the target mRNA with complementary miRNA oligonucleotides does not necessarily results in the full dissociation of the miRISC and the targeted RNA. It is plausible that the dissociated miRISC is still associated with the targeted mRNA via its binding to the rest of the regulatory complex and/or nearby co-regulatory miRISC and PTB/nPTB also bind to these RNAs.

There is increasing amount of evidence that RNA binding proteins that bind to the 3'UTRs of mRNAs have important roles in regulating miRNA-mediated gene expression. HuR has been shown to relieve the attenuation of gene expression mediated by a specific miRNA in specific cells as a consequence of amino acid starvation [6]. Dnd1, a developmentally regulated RNA binding protein modulates functions of several miRNAs in vertebrates by binding to U-rich sequences of the 3'UTRs and inhibiting the accessibility of miRNA target sites of a subset of mRNAs [7]. It was also demonstrated that IMP-1 binds to the 3'UTR of the

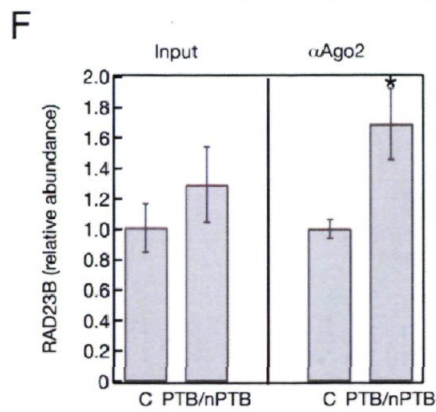
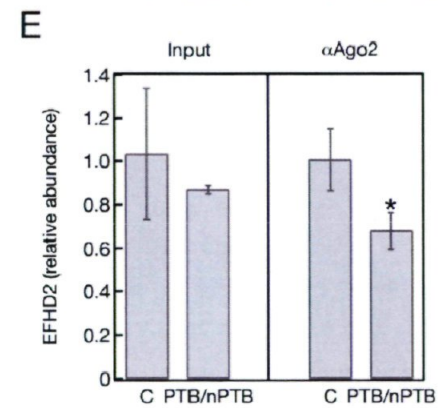
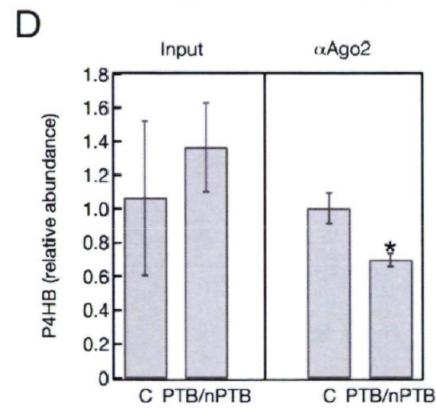
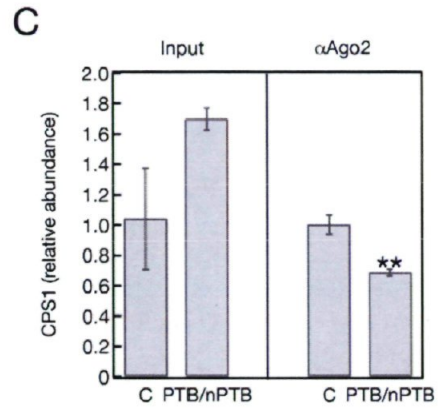
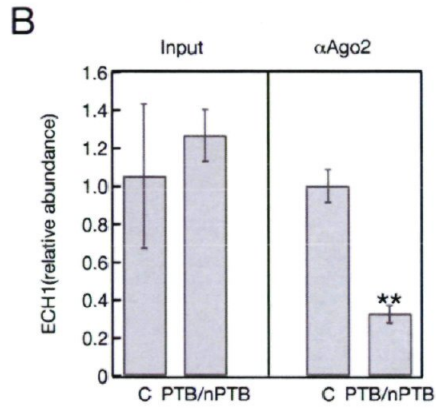
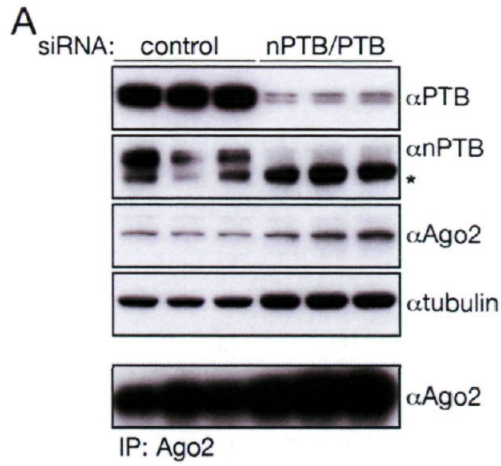


Figure 5. PTB alters Ago2 association of mRNAs in HeLa cells. (A) PTB and nPTB was simultaneously knocked down in triplicates in HeLa cells and Ago2 was immunoprecipitated from control and PTB/nPTB siRNA transfected cells. PTB, nPTB, Ago2 expression was followed by Western hybridization. Tubulin was used as loading control. *: non-specific band detected with the nPTB antibody. (B–F) q-PCR analysis of mRNAs which association with Ago2 is modulated by PTB. RNAs were isolated from control and PTB/nPTB siRNA transfected cells and from Ago2 IPs obtained from the same cells. RNAs were quantified and normalized with GAPDH RNA. The data show the relative abundance of the normalized RNAs compared to the control siRNA transfected cells and the Ago2 IP from the same cells. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments (A). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0033144.g005

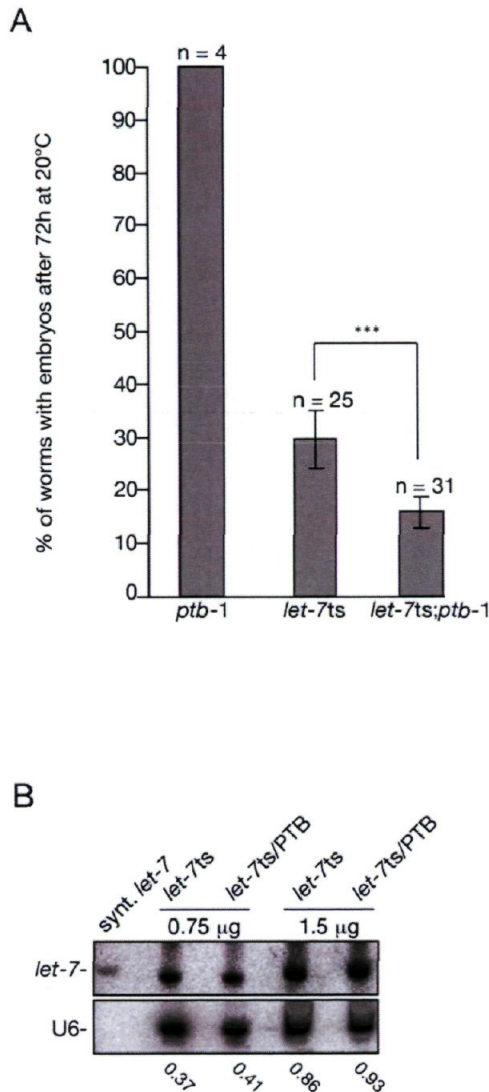


Figure 6. PTB and *let-7* miRNA contribute together to regulate gene expression in *C. elegans*. (A) Synchronized L1 animals were placed at semi-permissive temperature (20°C) and adult animals were scored after seventieth-two hours. The animal sterility observed in the population is caused by either a vulval bursting at the L4-adult transition or by a severe gonadal defect. Error bars represent the 95% confidence interval from independent experiments (n) where between 20 and 40 animals have been scored. ***: $p < 0.0001$ (B) *let-7* level remained unchanged in the *let-7ts/ptb-1* animals. RNAs were purified from the indicated genotypes and probed for *let-7* and U6 RNAs. The amount of RNA was used for Northern blotting is indicated on the top of the panel and the U6/*let-7* ratios are presented at the bottom of the panel. doi:10.1371/journal.pone.0033144.g006

β TrCP1 mRNA and it prevents miR-183-mediated repression [8]. The affinity purification with human recombinant Argonaute proteins revealed that many RNA binding proteins with functions in diverse steps of mRNA maturation, transport, mRNA stabilization and translation co-purify with hAgo1 and hAgo2. Among them, RBM4 and UPF1 were shown to be required for miRNA-mediated gene regulation [9] [10] The depletion of these two proteins resulted in similar effect that we observed in PTB/nPTB knock down in HeLa cells in the majority of the cases. What could be the mechanism by which PTB is involved in miRNA-mediated gene regulation?

Apart from its function as a regulator in splicing PTB has been demonstrated to participate in a wide range of cytoplasmic event by binding to mRNAs (recently reviewed in [11]). PTB is a well-characterized IRES-*trans*-acting-factor (ITAF) that involved in regulating the translation of viral and cellular IRES containing RNAs by binding to the IRES elements in their 5'UTR [24,25,26]. PTB also can regulate gene expression by binding to elements in the 3'UTR. For instance, PTB has been demonstrated to stabilize certain mRNAs such as insulin, VEGF, iNOS, CD154, PGK2, also via binding to the 3'UTR of these messages [18,19,20,21,22]. However, it is very likely that PTB has additional yet uncharacterized functions in the cytoplasm because immunoprecipitation of the cytoplasmic PTB fraction followed by microarray profiling in HeLa cells showed that more than 1600 mRNAs are enriched in the PTB purified complex suggesting a more general role for PTB in the cytoplasm [44]. Interestingly, this study also revealed that the PTB associated transcriptome consist of mRNAs that have significantly longer 3'UTRs which is also a characteristic of miRNA regulated transcripts [45]. In addition, PTB sites have been shown to be enriched in the 3' UTRs and the coding regions that are also frequently targeted by miRNAs [44,45]. Moreover, many of the changes in protein expression that occur in HeLa cells upon knock-down of PTB and nPTB cannot be explained by changes in alternative splicing of their mRNAs. [32].

PTB binds to short stretches of pyrimidine-rich sequences with its four RRM domains, and this binding could either directly obstruct binding of other proteins or indirectly facilitate or prevent the binding of other proteins to the RNA by modulating the RNA structure. This restructuring capability of PTB was suggested to be crucial in IRES initiated translation in which PTB creates loops that is necessary to the association of the 40S ribosome. Similar conformational changes, mediated by PTB binding, were implicated in preventing the binding of splicing factors or proteins that destabilize mRNAs. We hypothesize that PTB act as an auxiliary factor that facilitates miRNA-mediated gene regulation by restructuring mRNAs to provide optimal target accessibility for miRNAs. PTB co-immunoprecipitation with miRISCs is mediated by RNA (Fig. 3D) suggesting that PTB could bind first to the miRNA targeted mRNA, thereby promoting an accessible target site conformation for miRISC binding. A similar mechanism has been proposed in the case of hUPF1 since its helicase domain was shown to be required for miRNA-mediated gene regulation [9].

The existence of PTB-like factors has already been envisaged since in some cases the target recognition of miRNAs do not fully

agree with the established principles that are the basis of computational approaches that predict miRNA target sites [46,47,48]. Furthermore, detailed analysis of the interaction between *C. elegans* miRNA *lys-6* and its mRNA target *cog-1* revealed the importance of the general context of the 3'UTR in miRNA-mediated gene regulation and suggested that miRNA target interactions should be investigated case by case [47]. In vitro studies however: concluded that siRNA loaded RISCs do not need auxiliary factors for target scanning and cleavage if the thermodynamic properties of the siRNA target sites are favorable [49]. Using short target sequences the authors showed that siRNA loaded RISCs could efficiently cleave the target RNA if the target site is less structured. However, miRNA targeted mRNAs characteristically have long 3'UTRs and in this context it is very likely that RNA binding proteins, like PTB, are required to provide such an open structure for efficient targeting [45]. Our genetic experiments in *C. elegans* suggest that at normal miRNA level PTB may be dispensable but when the miRNA level is limited, PTB is required for efficient miRNA-mediated gene regulation probably by providing a structure that is more accessible for targeting.

Materials and Methods

Oligonucleotides, siRNAs

Biotinylated 2'-O-Methyl oligos were purchased from Dharmacon.

let-7 complementary oligo:

5'-biotin-UCUUCACUAUACAACCUACUACCUCAACCUU-3',

let-7 seed mismatched oligo:

5'-biotin-UCUUCACUAUACAACCUACUACGAGAACCUU-3'

PTB(-) oligo:

5'-biotin-UGAUCACUAUACAACCUACUACCUCAACCUU-3'

control oligo:

5'-biotin-CAUCACGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUCC-3'

siRNAs to knock down PTB and nPTB expression were purchased from Dharmacon (On target plus, catalog numbers J-003528-06, 07, 08 and 09 and J-021323-09, 10, 11, and 12 respectively) and were used as an equimolar mixture. For simultaneous PTB and nPTB knock down the equimolar mixtures of PTB and nPTB siRNAs were used in a 2:1 ratio. As a negative control unrelated siRNA was used: 5'-AGGUAGUGUAAUCGCCUUGTT-3', 5'-CAAGGCGAUUACACUACCUU-3'.

DNA oligo (Sigma) to detect *C. elegans* U6 RNA: 5'-AATTTT-GCGTGTTCATCCCTTGCACA-3'.

RNA oligonucleotides to detect human and *C. elegans let-7* in Northern hybridization: 5'-UAUACAACCUACUACCUCAUU-3', to detect human miR-21: 5'-UCAACAUCAGUCUGAUAA-GCUA-3' synthetic *let-7a*: 5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGU-3' and RNA to detect tRNA-Ile: 5'-UGGUGCCCGUA-CGGGAUCGA-3' were purchased from Dharmacon and MWG. Decade 10 bp RNA marker (Ambion) was used as additional size marker.

Antibodies and Western blotting

Primary antibodies were used in this study to detect human PTB: mouse monoclonal Ab (SH54) NA63 (Calbiochem), goat polyclonal Ab sc-16547 (SantaCruz), mouse mAb BB7 (gift from Chris W. Smith, Cambridge, [50]). For detecting human Ago2: rat monoclonal 11A9 (gift from Gunter Meister, [51]), mouse monoclonal Ab 4F9, sc-53521 (SantaCruz). To detect GFP:

mouse monoclonal Ab (Roche). To detect human tubulin: mouse monoclonal Ab DM1A (Sigma). Secondary antibodies were peroxidase conjugated (Jackson Immuno Research). Western blotting was performed by following standard protocols, using gel cassettes (Invitrogen) or the NuPage system (Invitrogen). Proteins were electroblotted and detected either with Thermo Scientific Supersignal West Chemoluminescent substrate or with Millipore Immobilon Western chemoluminescent HRP substrate.

Plasmids

The following plasmids were used in this study: PTB::GFP, XR::nPTB (gifts from Chris Smith), pEGFP (Clontech). Firefly luciferase: PGL2. Renilla luciferase reporter constructs: pRL-TK H2-H5: Renilla luciferase that containing four *let-7* target sites in the 3'UTR in the context of the part of HMGA2 3'UTR, pRL-TK ΔH2-ΔH5: same as H2-H5 only the seed sequences complementary sites of the *let-7* were mutagenized at second and third nucleotides.

Cell culture, transfection and cell lysis

Stable GFP and GFP::PTB expressing cell lines were generated by transfection of U2OS (gift from S. Rocha WT centre for GRE, Dundee University) cells with Effectene (Qiagen) and selection using 400 μg/ml of G418. Single colonies were picked after limited trypsinisation and checked for expression by immunofluorescence and Western blotting.

Transfections were performed with Effectene (Qiagen), Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and oligofectamine (Invitrogen) and Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturers instructions.

The following cell lysis protocols were used in this study: NP40: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, RIPA: 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, Polysome buffer: 0.5% NP40 alternative, 130 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2.5 mM DTT. Mammalian Cell lysis buffer (MCLB): 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 1.25 μl/ml beta mercaptoethanol and 0.9 g/ml sucrose All buffers were supplemented with Complete protease inhibitor (Roche) and RNasin (Promega).

Affinity purifications with biotinylated 2'-O-Methyl oligonucleotides

Ten to fifteen 10 cm dishes of HeLa cells (gift from A. I. Lamond laboratory, WT Centre for GRE, Dundee University), (~80–90% confluent) were lysed in NP40 lysis buffer. 25 μl streptavidin magnetic beads (Dynal, Invitrogen) were equilibrated with 2× Binding buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 2.0 M NaCl) by washing the beads with three times. Beads were resuspended in 100 μl 1× Binding buffer and 100 pMol biotinylated 2'-O-Methyl oligonucleotides were added and incubated for two hours in the cold room with gentle agitation. After incubation the beads were washed three times with 1× Binding buffer and two times with lysis buffer. 500–1000 μl lysate were added and incubated on 37°C for one hour. The beads were washed three times with lysis buffer and resuspended in 50 μl lysis buffer. RNA was isolated with 2× PK buffer (200 mM Tris pH 7.5, 25 mM EDTA, 300 mM NaCl, 2% SDS, 2 μg/μl proteinase K) followed by phenol extraction and ethanol precipitation and monitored with Northern hybridization. For protein assay the washed beads were boiled with the SDS loading dye and the eluate was subjected to Western blotting.

Immunoprecipitations

Antibodies were bound to Dynabeads protein G (Dyna, Invitrogen) and washed with lysis buffer. Cells were lysed with RIPA or MCLB buffers, incubated overnight with the bound antibodies and were washed with lysis buffers. RNA was isolated with 2× PK and proteins were eluted by boiling the bound fraction in SDS loading buffer and analyzed by Western blotting.

Gel filtration

Gel filtration was performed on an Akta Explorer machine using a Sepachryl-S300 column (Amersham) in a 4°C cabinet. Cells were lysed in: 50 mM Tris pH 7.9, 12.5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.015% NP40 and 150 mM KCl. Fractions were collected and RNA and protein were isolated with 2× PK buffer and monitored with Northern or Western blotting respectively. Low molecular weight marker (Amersham) was used to calibrate the elution profile. The quantity of *let-7* of the fractions was determined using 1 and 10 femtomole *let-7* standards run alongside the fractions on Northern blots.

Northern hybridizations

Standard Northern blotting for the detection of small RNAs were performed as described [52]. BasIP-MS-2040 imaging plates (Fujifilm) were scanned with FLA-5100 (Fuji) and the data were quantified using ImageGauge v4.21 software.

C. elegans protocol

The *ptb-1* (*gk113*) and *let-7ts* (*n2853*) strains were obtained from the *C. elegans* Gene Knockout Consortium. *C. elegans* experiments were performed at 20°C during the indicate time. For survival analysis, a population of *let-7ts* (*n2853*); *ptb-1* (*gk113*), *let-7ts* (*n2853*) and wild-type N2 animals were synchronized as L1 larvae, grow on plates and scored for % of survival adult animals with embryos after 72 hours at semi-permissive temperature (20°C).

Supporting Information

Figure S1 PTB co-purifies with the *let-7* loaded RISC. PTB association with the *let-7* loaded human RISC is maintained

References

- Hutvagner G, Simard MJ (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 22–32.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318: 1931–1934.
- Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, et al. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455: 64–71.
- Selbach M, Schwanhauser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, et al. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455: 58–63.
- Hock J, Meister G (2008) The Argonaute protein family. *Genome Biol* 9: 210.
- Bhattacharyya SN, Habermann R, Martini U, Closs EI, Filipowicz W (2006) Relief of microRNA-Mediated Translational Repression in Human Cells Subjected to Stress. *Cell* 125: 1111–1124.
- Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, Vrielink JA, Slanchev K, et al. (2007) RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* 131: 1273–1286.
- Elcheva I, Goswami S, Noubissi FK, Spiegelman VS (2009) CRD-BP protects the coding region of betaTrCP1 mRNA from miR-183-mediated degradation. *Mol Cell* 35: 240–246.
- Jin H, Suh MR, Han J, Yeom KH, Lee Y, et al. (2009) Human UPF1 participates in small RNA-induced mRNA downregulation. *Mol Cell Biol* 29: 5789–5799.
- Hock J, Weinmann L, Ender C, Rudel S, Kremmer E, et al. (2007) Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep* 8: 1052–1060.
- Sawicka K, Bushell M, Spriggs KA, Willis AE (2008) Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. *Biochem Soc Trans* 36: 641–647.
- Izquierdo JM, Majos N, Bonnal S, Martinez C, Castelo R, et al. (2005) Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol Cell* 19: 475–484.
- Lou H, Helfman DM, Gagel RF, Berget SM (1999) Polypyrimidine tract-binding protein positively regulates inclusion of an alternative 3'-terminal exon. *Mol Cell Biol* 19: 78–85.
- Wollerton MC, Gooding C, Wagner EJ, Garcia-Blanco MA, Smith CW (2004) Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Mol Cell* 13: 91–100.
- Shen H, Kan JL, Ghigna C, Biamonti G, Green MR (2004) A single polypyrimidine tract binding protein (PTB) binding site mediates splicing inhibition at mouse IgM exons M1 and M2. *Rna* 10: 787–794.
- Llorian M, Schwartz S, Clark TA, Hollander D, Tan LY, et al. (2010) Position-dependent alternative splicing activity revealed by global profiling of alternative splicing events regulated by PTB. *Nature structural & molecular biology* 17: 1114–1123.
- Xue Y, Zhou Y, Wu T, Zhu T, Ji X, et al. (2009) Genome-wide analysis of PTB-RNA interactions reveals a strategy used by the general splicing repressor to modulate exon inclusion or skipping. *Molecular cell* 36: 996–1006.
- Hamilton BJ, Genin A, Cron RQ, Rigby WF (2003) Delineation of a novel pathway that regulates CD154 (CD40 ligand) expression. *Mol Cell Biol* 23: 510–525.
- Xu M, Hecht NB (2007) Polypyrimidine tract binding protein 2 stabilizes phosphoglycerate kinase 2 mRNA in murine male germ cells by binding to its 3'UTR. *Biol Reprod* 76: 1025–1033.
- Tillmar L, Welsh N (2004) Glucose-induced binding of the polypyrimidine tract-binding protein (PTB) to the 3'-untranslated region of the insulin mRNA (ins-PRS) is inhibited by rapamycin. *Mol Cell Biochem* 260: 85–90.

by using different lysis protocols (A) and; using different antibodies of hAgo2 and PTB (B). The bound fractions of the PTB immunoprecipitates were assayed for hAgo2 and PTB with Western blotting (top panels) and for *let-7* with Northern hybridization (bottom panels). (C) GFP tagged PTB also immunoprecipitates endogenous hAgo2 (top panel) and *let-7* miRNA (bottom panel). (TIIF)

Figure S2 PTB and *let-7* co-fractionate in human cells.

Total cell lysate was fractionated through Sephacryl S-300 column. Every second fraction was subjected to RNA and protein isolation. *Let-7* and PTB was monitored with Northern hybridization and Western blotting respectively. (TIIF)

Figure S3 miR-21 is associated with PTB.

Endogenous PTB in HeLa cells (A), and stably expressed GFP::PTB in U2OS cells (B) co-purify with miR-21. Experiments were carried out as it was described at Figure 3. and the Northern hybridizations were repeated with radioactively labeled probe recognizing miR-21. (TIIF)

Acknowledgments

We would like to thank Chris W. Smith for providing the GFP::PTB and the XR::nPTB construct and the BB7 mouse monoclonal antibody recognizing the human PTB. We are also grateful to Gunter Meister for the rat monoclonal hAgo2 antibody. We are also extremely grateful to Chris W. Smith and Miriam Llorian to share proteomics data before publication and for the critical reading of the manuscript. Nematode strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by the National Institutes of Health National Center for Research Resources.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MS GH. Performed the experiments: BE JR GJ GH. Analyzed the data: MS GH. Wrote the paper: MS GH.

21. Coles LS, Bartley MA, Bert A, Hunter J, Polyak S, et al. (2004) A multi-protein complex containing cold shock domain (Y-box) and polypyrimidine tract binding proteins forms on the vascular endothelial growth factor mRNA. Potential role in mRNA stabilization. *Eur J Biochem* 271: 648–660.
22. Pautz A, Linker K, Hubrich T, Korhonen R, Altenhofer S, et al. (2006) The polypyrimidine tract-binding protein (PTB) is involved in the post-transcriptional regulation of a human inducible nitric oxide synthase expression. *J Biol Chem* 281: 32294–32302.
23. Balvay L, Lopez Lastra M, Sargueil B, Darlix JL, Ohlmann T (2007) Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* 5: 128–140.
24. Mitchell SA, Spriggs KA, Bushell M, Evans JR, Stoneley M, et al. (2005) Identification of a motif that mediates polypyrimidine tract-binding protein-dependent internal ribosome entry. *Genes Dev* 19: 1556–1571.
25. Pickering BM, Mitchell SA, Spriggs KA, Stoneley M, Willis AE (2004) Bag-1 internal ribosome entry segment activity is promoted by structural changes mediated by poly(rC) binding protein 1 and recruitment of polypyrimidine tract binding protein 1. *Mol Cell Biol* 24: 5595–5605.
26. Bushell M, Stoneley M, Kong YW, Hamilton TL, Spriggs KA, et al. (2006) Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated gene expression during apoptosis. *Mol Cell* 23: 401–412.
27. Auweter SD, Oberstrass FC, Allain FH (2007) Solving the structure of PTB in complex with pyrimidine tracts: an NMR study of protein-RNA complexes of weak affinities. *J Mol Biol* 367: 174–186.
28. Oberstrass FC, Auweter SD, Erat M, Hargous Y, Henning A, et al. (2005) Structure of PTB bound to RNA: specific binding and implications for splicing regulation. *Science* 309: 2054–2057.
29. Lamichhane R, Daubner GM, Thomas-Crusells J, Auweter SD, Manatschal C, et al. (2010) RNA looping by PTB: Evidence using FRET and NMR spectroscopy for a role in splicing repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 4105–4110.
30. Petoukhov MV, Monie TP, Allain FH, Matthews S, Curry S, et al. (2006) Conformation of polypyrimidine tract binding protein in solution. *Structure* 14: 1021–1027.
31. Boutz PL, Chawla G, Stoilov P, Black DL (2007) MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. *Genes Dev* 21: 71–84.
32. Spellman R, Llorian M, Smith CW (2007) Crossregulation and functional redundancy between the splicing regulator PTB and its paralogs nPTB and ROD1. *Mol Cell* 27: 420–434.
33. Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T (2007) The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 27: 435–448.
34. Michlewski G, Guil S, Semple CA, Caceres JF (2008) Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol Cell* 32: 383–393.
35. Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, Tuschl T (2004) Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *Rna* 10: 544–550.
36. Hutvagner G, Simard MJ, Mello CC, Zamore PD (2004) Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2: E98.
37. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, et al. (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438: 685–689.
38. Jannot G, Bajan S, Giguere NJ, Bouasker S, Banville IH, et al. (2011) The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and humans. *EMBO reports* 12: 581–586.
39. Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk JJ (2007) High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 6: 5.
40. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP (2007) Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 315: 1576–1579.
41. Cole C, Sobala A, Lu C, Thatcher SR, Bowman A, et al. (2009) Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *Rna*.
42. Crosby ME, Kulshreshtha R, Ivan M, Glazer PM (2009) MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress. *Cancer Res* 69: 1221–1229.
43. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, et al. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901–906.
44. Gama-Carvalho M, Barbosa-Morais NL, Brodsky AS, Silver PA, Carmo-Fonseca M (2006) Genome-wide identification of functionally distinct subsets of cellular mRNAs associated with two nucleocytoplasmic-shuttling mammalian splicing factors. *Genome Biol* 7: R113.
45. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, et al. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27: 91–105.
46. Didiano D, Hobert O (2006) Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol* 13: 849–851.
47. Didiano D, Hobert O (2008) Molecular architecture of a miRNA-regulated 3' UTR. *Rna* 14: 1297–1317.
48. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3: e85.
49. Ameres SL, Martinez J, Schroeder R (2007) Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell* 130: 101–112.
50. Chou MY, Underwood JG, Nikolic J, Luu MH, Black DL (2000) Multisite RNA binding and release of polypyrimidine tract binding protein during the regulation of c-src neural-specific splicing. *Mol Cell* 5: 949–957.
51. Rudel S, Flatley A, Weinmann L, Kremmer E, Meister G (2008) A multifunctional human Argonaute2-specific monoclonal antibody. *Rna* 14: 1244–1253.
52. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, et al. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293: 834–838.