



**Die *micro*RNA-26 Familie kontrolliert über den REST-Komplex ein
für die Neurogenese essentielles regulatorisches RNA Netzwerk**

**The *micro*RNA-26 family controls a regulatory RNA network which
is essential for neurogenesis via the REST-complex**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Mark Sauer

aus Zweibrücken

Würzburg, Februar 2019

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Erstgutachter: PD Dr. Matthias Becker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ricardo Benavente

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum zwischen August 2014 und Februar 2019 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Albrecht Müller am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg angefertigt.

Zusammenfassung

In einem sich entwickelnden multizellulären Organismus ist die räumlich-zeitliche Regulation der Genexpression von entscheidender Bedeutung für die Bildung, Identität und Funktion von Zellen. Der REST (*repressor element silencing transcription factor*) Komplex spielt bei der neuronalen Differenzierung und bei der Aufrechterhaltung des neuronalen Status eine essentielle Rolle, indem er in nicht neuronalen Zellen und neuronalen Vorläufern die Expression neuronaler Gene unterdrückt, in deren Promotorregion eine RE1 (*repressor element 1*) Erkennungssequenz vorhanden ist. Während der neuronalen Differenzierung wird der REST-Komplex schrittweise inaktiviert, was zur Einleitung eines neuronalen Genexpression-Programms führt. Es wird daher angenommen, dass die Inhibierung des REST-Komplexes ein essentieller Vorgang der Neurogenese ist. Wichtige Bestandteile für die transkriptionell repressive Funktion des REST-Komplexes sind kleine Phosphatasen (CTDSP = *C-terminal domain small phosphatases*), welche die Polymerase-II-Aktivität an Zielgenen inhibieren. Im Zebrafisch wurde gezeigt, dass *ctdsp2* durch die miR-26b negativ reguliert wird. Alle miR-26 Familienmitglieder sind in Vertebraten evolutionär konserviert und in Introns von *Ctdsp* Genen kodiert. Sie sind in der Lage, die Expression ihres eigenen Wirtsgens mittels einer autoregulatorischen Rückkopplungsschleife zu regulieren.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde als Modellsystem für die Neurogenese ein neuronales Differenzierungssystem, welches auf murinen, embryonalen Stammzellen (ESCs) aufbaut, eingesetzt. Zur funktionellen Analyse der miR-26 Familie wurden mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode verschiedene miR-26 *Knockout* (KO) ESC-Linien hergestellt. Hierbei wurden die Sequenzen der einzelnen Familienmitglieder und der gesamten miR-26 Familie im Genom von Wildtyp (Wt) ESCs deletiert. Diese miR-26-defizienten ESC-Linien behielten ihre Pluripotenz und zeigten keinen Phänotyp hinsichtlich Proliferation, Morphologie und Identität der Zellen während der Differenzierung bis zum neuronalen Vorläuferzellstadium (NPCs, engl.: *neural progenitor cells*). Jedoch führte die Deletion sowohl der gesamten miR-26 Familie als auch einzelner Mitglieder bei der terminalen Differenzierung zu einem spezifischen Entwicklungsstillstand im NPC Stadium und infolgedessen zu einer starken Reduktion der Anzahl von Neuronen und Astroglia. Die Transkriptom-Analyse der differenzierten miR-26-KO ESCs mittels RNA-Seq zeigte, dass die Expression von Genen die mit der Neurogenese und der neuronalen Differenzierung, aber auch der Gliogenese assoziiert sind, herunterreguliert war. Die

Abwesenheit der miR-26 Familie führte außerdem zu einer selektiven Reduzierung bestimmter miRNAs (REST-miRs), die einerseits die Expression von REST-Komplex Komponenten unterdrücken können, und andererseits selbst unter dessen transkriptioneller Kontrolle stehen. Zu diesem REST-miR Netzwerk gehören einige miRNAs (miR-9, miR-124, miR-132 und miR-218), die wichtige Funktionen bei verschiedenen Prozessen der neuronalen Entwicklung haben. Weiterhin führte der miR-26-KO zu einer Derepression der Proteinlevel von REST und CTDSP2 während der terminalen Differenzierung. Funktionelle Analysen mit miRNA mimics zeigten, dass erhöhte miR-26 Level zu einer Hochregulation von REST-miRs führen. Weitere Experimente, die darauf zielten, die Hierarchie des REST-miR Netzwerks aufzuklären zeigten, dass die miR-26 Familie stromaufwärts die REST-miR Expression reguliert. Zusammengefasst weisen die in dieser Arbeit gezeigten Daten darauf hin, dass die miR-26 Familie als Initiator der schrittweisen Inaktivierung des REST-Komplexes eine zentrale Rolle bei der Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu postmitotischen Neuronen spielt.

Summary

The spatio-temporal control of gene expression in a developing multicellular organism is a key determinant for the formation, cellular identity and function of cells. The REST (repressor element silencing transcription factor) complex plays a crucial role in the process of neuronal differentiation and the maintenance of the neuronal status by suppressing neuronal genes which contain a RE1 (repressor element 1) recognition sequence within their promoter region in non-neuronal cells or in neural progenitors. During neuronal differentiation, the REST complex is gradually inactivated, leading to the initiation of a neuronal gene expression program. It is therefore assumed that the regulation of the REST complex is an essential component for the initiation of neurogenesis. Critical effector proteins of the REST complex are small phosphatases (CTDSPs = C-terminal domain small phosphatases), which reduces the polymerase II activity on target genes. In zebrafish it was shown that the REST complex-associated phosphatase *ctdsp2* is negatively regulated by miR-26b. All miR-26 family members are evolutionarily conserved in vertebrates and located in introns of *Ctdsp* genes. Furthermore the miR-26 family members repress their own host genes through an intrinsic autoregulatory negative feedback loop.

In this study, a murine embryonic stem cell (ESC) -based neural differentiation paradigm was used as a model system for neurogenesis. To analyze the function of the miR-26 family, the CRISPR/Cas9 technology was employed to generate various miR-26 knockout (KO) ESC lines, with deletions of individual family members and the entire miR-26 family in the genome of ESCs. These miR-26-deficient ESCs retained their pluripotency and did not show altered proliferation, morphology, or cell identity during neural differentiation up to the neural progenitor cell (NPC) stage. However, deletion of the entire miR-26 family as well as of single members disrupted the terminal differentiation and led to a specific developmental arrest at the NPC stage and consequently a strong reduction of neuron and astroglia cell frequencies. Global gene expression analyses in differentiated miR-26-KO ESCs further revealed that genes, which are associated with neurogenesis, neuronal differentiation, but also gliogenesis, were downregulated. The absence of the miR-26 family resulted in the selective reduction of a specific set of miRNAs (REST-miRs), which on the one hand suppress the expression of REST complex components and on the other hand are themselves under the transcriptional control of the REST complex. Among others, several miRNAs (miR-9,

miR-124, miR-132 and miR-218), which play an important role in various processes of neuronal development, belong to this REST-miR network. Moreover, the miR-26-KO led to the derepression of REST and CTDSP2 protein levels during terminal differentiation. Functional analyses with miRNA mimics showed that increased miR-26 levels resulted in an upregulation of REST-miRs. Further experiments aimed at elucidating the hierarchy of REST-miR regulation revealed that the miR-26 family act upstream to regulate REST-miR expression and presumably has an initial function in the regulation of this network. Taken together, the data presented in this work suggest that the miR-26 family act as an initiator for the stepwise inactivation of the REST complex during neural differentiation. Therefore, these findings are consistent with the notion that the miR-26 family represents a central regulator for neural progenitor cell differentiation into postmitotic neurons.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	iii
Inhaltsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Neurogenese in Vertebraten	1
1.2 Regulation der Genexpression während der Neurogenese.....	5
1.2.1 NPC Mikroumgebung	5
1.2.2 Modifikation des Chromatins.....	6
1.2.3 Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression	7
1.2.4 Signalwege	7
1.2.5 Transkriptionsfaktoren	10
1.2.6 Repression der neuronalen Genexpression durch REST	11
1.3 miRNAs: post-transkriptionelle Regulatoren der Genexpression	14
1.3.1 miRNA Biogenese	15
1.3.2 Zielerkennung und Wirkmechanismus von miRNAs	18
1.3.3 miRNAs: essentielle Regulatoren der Neurogenese	20
1.4 Die miR-26 Familie	22
1.5 Zielsetzung und experimentelle Strategie	25
2 Materialien und Methoden	27
2.1 Materialien.....	27
2.1.1 Zelllinien	27
2.1.2 Zellkultur-Medien für die neuronale Differenzierung	27
2.1.3 Bakterienstämme.....	29
2.1.4 Bakterienkultur Medien	29
2.1.5 Reagenzien	30
2.1.6 Puffer und Lösungen	30
2.1.7 Antikörper	31
2.1.8 Synthetische miRNA mimics	32
2.1.9 Plasmide	32
2.1.10 Kommerzielle Kits	32
2.1.11 Enzyme, Antibiotika, Reagenzien zur Oberflächenbeschichtung.....	33

2.1.12	Oligonukleotide	33
2.1.12.1	Primer qRT-PCR zur Quantifizierung von miRNAs.....	34
2.1.12.2	Zielsequenzen und Oligonukleotide zum Klonieren der sgRNA	35
2.1.13	Geräte.....	36
2.1.14	Software.....	36
2.2	Methoden	37
2.2.1	Zellkultur	37
2.2.1.1	Passagieren von Zellen	37
2.2.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	37
2.2.1.3	Beschichtung von Zellkulturplastik und Deckgläsern.....	37
2.2.1.4	ESC Kultur.....	38
2.2.1.5	Neurale Differenzierung von ESCs	38
2.2.1.6	EB Differenzierung in Hanging Drops	39
2.2.1.7	Quantifizierung der Zellkulturen	39
2.2.2	Immunhistochemie	40
2.2.2.1	Immunhistochemische Färbungen von Monolayer-Zellkulturen	40
2.2.2.2	Messung der Neuritendichte und des Axonwachstums	41
2.2.3	Durchflusszytometrie.....	42
2.2.3.1	Zellzyklusanalyse	42
2.2.3.2	Analyse der apoptotischen Zellen.....	42
2.2.4	Generierung und Validierung der miR-26-KO ESC-Linien.....	43
2.2.5	miR-mimic Experimente	44
2.2.6	Molekularbiologische Methoden.....	44
2.2.6.1	Herstellung kompetenter Bakterien-Stämme.....	44
2.2.6.2	Transformation von kompetenten Bakterien-Stämmen.....	45
2.2.6.3	Isolation von Plasmid-DNA	45
2.2.6.4	Quantitative und qualitative Analyse von Nukleinsäuren	46
2.2.6.5	Restriktionsverdau	46
2.2.6.6	Oligonukleotid Annealing	47
2.2.6.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	47
2.2.6.8	RNA Extraktion	47
2.2.6.9	cDNA Synthese	48
2.2.6.10	Extraktion genomischer DNA	49
2.2.6.11	PCR-Analyse zum Nachweis spezifischer Transkripte, miRs und CRISPR/Cas9-Deletionen.....	49
2.2.6.12	Kolonie-PCR.....	51
2.2.6.13	SDS-PAGE und Western Blot.....	51

2.2.7	Transkriptom Analyse / RNA-Seq	52
2.2.8	Bioinformatische Analyse	53
2.2.9	Statistische Auswertung	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Aufbau eines neuronalen Differenzierungssystems für murine ES Zellen als Modell für die Neurogenese	54
3.2	Expressionsmuster der miR-26 Familie und der <i>Ctdsp</i> Wirtsgenfamilie während der neuronalen Differenzierung und der embryonalen Neurogenese im murinen Gehirn	58
3.3	Herstellung und Validierung der miR-26 <i>knockout</i> ES-Zelllinien	61
3.4	Die Deletion der miR-26 Familie zeigt keine Auswirkung auf die Differenzierung zu NPCs	67
3.5	miR-26-KO NPCs besitzen ein reduziertes neuronales und astrogliales Differenzierungspotential	70
3.5.1	Einfluss des miR-26-KOs auf die Neuritendichte und die Axonlänge ...	73
3.6	Ein Großteil der miR-26-KO Zellen bleiben unter neuronalen Differenzierungsbedingungen in einem neuronalen Vorläuferstadium	75
3.7	Die Deletion der miR-26 führt zu einem erhöhten Anteil an Zellen in der S/G ₂ /M-Phase an Tag 15 der Differenzierung	78
3.8	Globale Genexpressionsanalyse der d15 miR-26-KO Zellkulturen	79
3.8.1	Die Deletion der miR-26 Familie führt zu einer globalen, negativen Regulation neuraler Transkripte	79
3.8.2	miRNA-Transkriptom Analyse der d15 miR-26-KO Zellkulturen	84
3.8.3	Identifikation von REST-regulierten miRNAs	85
3.8.4	Herunterregulierung von REST-miRs in d15 miR-26-KO Zellkulturen	87
3.8.5	REST-miRs besitzen mehrere Zielstellen in der mRNA von REST- Komplex Komponenten	88
3.9	Die miR-26 Familie reguliert den REST-Komplex über die Repression von REST und CTDSP2	90
3.10	Die miR-26 als initialer Regulator eines REST-miR Netzwerks während der Neurogenese	92
3.11	Mögliche Regulation des WNT-Signalwegs durch die miR-26 Familie	95
4	Diskussion	96

4.1	Neurale Differenzierung von ESCs als Modellsystem für die Neurogenese in Vertebraten.....	97
4.2	Korrelation der Expression der miR-26 Familie und deren <i>Ctdsp</i> Wirtsgenfamilie.....	98
4.3	Unterschiedliche Funktionen der miR-26a und miR-26b während der Neurogenese.....	101
4.4	Die miR-26 Familie spielt eine Rolle in späteren Stadien der neurogenen Differenzierung	104
4.4.1	Analyse der Vitalität in miR-26-KO Zellen	106
4.4.2	Globale Analyse der Genexpression in miR-26-KO Zellen.....	107
4.4.3	Erhöhte Frequenzen von proliferierenden neuralen Vorläuferzellen in miR-26-KO Zellkulturen	108
4.5	Die miR-26 Familie reguliert den REST-Komplex	110
4.6	Modell zur Rolle der miR-26 Familie während der Neurogenese in Vertebraten.....	112
5	Appendix	115
6	Literaturverzeichnis.....	125
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	141
8	Abkürzungsverzeichnis.....	144
9	Veröffentlichungen	148
	Danksagungen	149
	Eidesstattliche Erklärung.....	150

1 Einleitung

1.1 Neurogenese in Vertebraten

Unter dem Begriff Neurogenese versteht man allgemein die Bildung von Nervenzellen (Neuronen) aus bestimmten Stamm- bzw. Vorläuferzellen, wobei hier zwischen der Neurogenese während der Embryonalentwicklung (embryonale Neurogenese) und der Neurogenese nach der Geburt (adulte Neurogenese) unterschieden wird. Lange Zeit war ein zentrales Dogma der Neurobiologie, dass neue Neurone im adulten Organismus nicht entstehen können. Heute gilt es jedoch als bewiesen, dass die Neurogenese im Gehirn von adulten Säugetieren in mindestens zwei spezifischen Hirnregionen bestehen bleibt: in der subventrikulären Zone (SVZ) der lateralen Ventrikel und der subgranulären Zone (SGV) des Gyrus dentatus. In dieser Arbeit lag das Hauptaugenmerk jedoch zum Großteil auf Aspekten, welche die embryonale Neurogenese betreffen, insbesondere in Vertebraten.

Während der Entwicklung von Vertebraten entstehen eine Vielzahl von Zelltypen und Geweben aus einer einzigen befruchteten Eizelle. Eines dieser Gewebe, das zentrale Nervensystem (ZNS), ist das mit Abstand komplexeste Organ. Seine Entwicklung ist entscheidend für das Überleben und Verhalten. Das ZNS enthält hunderte verschiedener neuronaler Subtypen und Milliarden einzelner Neurone und Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten), die sich während der embryonalen und postnatalen Neuro- und Gliogenese aus Vorläuferzellen entwickeln. Die Zellen des Nervensystems entstehen dabei aus dem ektodermalen Keimblatt. Aus dem Ektoderm bilden sich die drei Hauptderivate, das Oberflächen-Ektoderm (Epidermis), die Neuralleiste und das Neuralrohr (**Abb. 1a**). Aus dem Neuralrohr entwickelt sich wiederum das ZNS mit Gehirn und Rückenmark. Während der frühen Entwicklung eines Vertebraten-Embryos wird die neurale Differenzierung im Ektoderm durch Botenstoffe von Zellen des darunter liegenden axialen Mesoderms, der Chorda dorsalis (auch Notochord genannt) und von Zellen des pharyngealen Endoderms im Kopfbereich, induziert. Aus diesem frühen neuroektodermalen Gewebe entsteht die Neuralplatte, aus der sich letztendlich das ZNS entwickelt. Zur Bildung des Neuralrohrs vertieft sich die Neuralplatte und bildet die Neuralrinne. Die Zellreihen an der Neuralleiste verschieben sich ineinander, verschmelzen miteinander und schnüren die Neuralrinne ab. Aus dem Kopfende (anterior) des Neuralrohres entwickelt sich das Gehirn, das kaudale Ende bildet das

Rückenmark. Der Hohlraum des Neuralrohres bildet später das Ventrikelsystem des ZNS. Das Neuralrohr besteht dabei aus einer Schicht von Neuroepithelzellen (NECs). Mit der Bildung des primitiven Neuroepithels im Neuralrohr beginnt in der Maus die Entwicklung des zentralen Nervensystems am embryonalen Tag E9. Der Vorgang der Bildung des Neuralrohres wird als Neurulation bezeichnet und die einzelnen Schritte sind in **Abb. 1b** schematisch dargestellt.

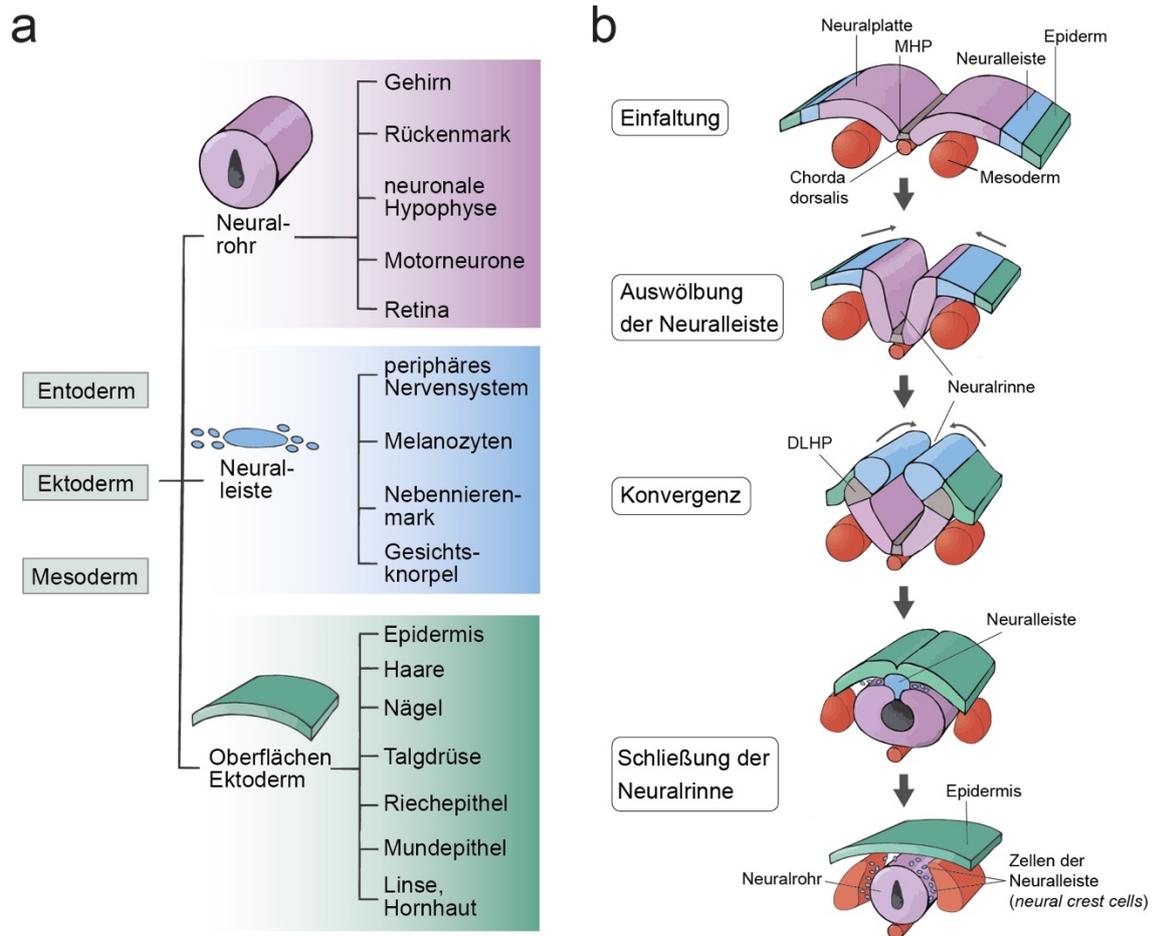


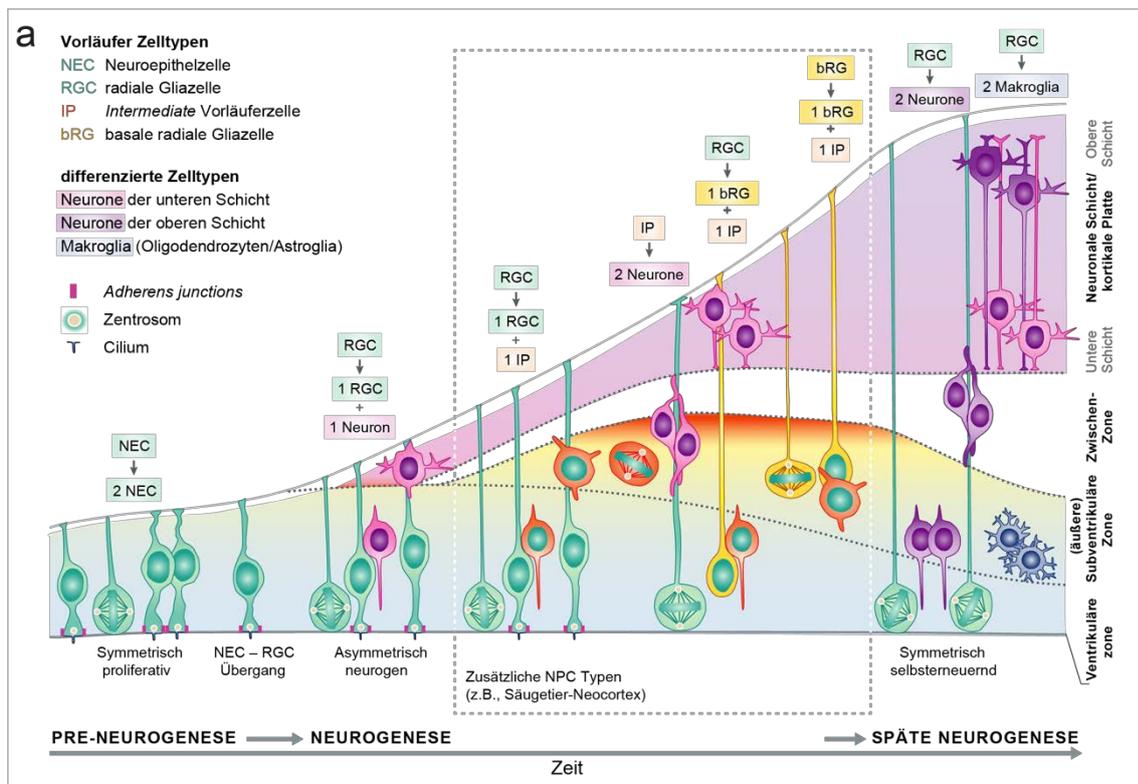
Abbildung 1: Entwicklung der verschiedenen Gewebe aus dem Ektoderm von Vertebraten.

(a) Darstellung der Hauptdomänen und Gewebe, die sich aus dem Ektoderm entwickeln. **(b)** schematische Darstellung der primären Neurulation in Vertebraten. Neuroektodermales Gewebe, gebildet aus dem Ektoderm, verdickt sich zur Neuralplatte. Die Neuralleiste grenzt das Epiderm gegen die Neuralplatte ab. Die Faltung beginnt am medialen Gelenkpunkt (MHP; engl.: *medial hinge point*), wo die Zellen an der Chorda dorsalis verankert sind. Die Neuralplatte stülpt sich entlang einer dorsalen Längsachse nach innen ein und bildet eine Neuralrinne. Die sogenannte Konvergenz der neuralen Falte findet statt, sobald sich die Zellen des dorsolateralen Gelenkpunkts (DLHP, engl.: *dorsolateral hinge point*) keilförmig anordnen und die Epidermiszellen in Richtung Mitte drängen. Die Schließung der Neuralrinne trennt die Neuralleiste von der Epidermis. Die Zellen der Neuralleiste (*neural crest cells*) differenzieren und bilden einen großen Anteil des peripheren Nervensystems. Aus dem Neuralrohr entwickelt sich das zentrale Nervensystem.

Zu Beginn der Neurogenese wechseln die Neuroepithelzellen ihre Identität und bilden neurale Vorläuferzellen (engl.: *neural progenitor cells*, NPCs) (oft bezeichnet als radiale Gliazellen, engl.: *radial glia cells*, RGCs). Aus diesen RGCs bilden sich alle neuronalen Zellen (NCs) und in der späteren Entwicklung Gliazellen. **Abb. 2a** zeigt eine schematische Übersicht der sich bildenden Zellen und Schichten während der Neurogenese am Beispiel des ZNS von Vertebraten. Die Neurone haben dabei die grundlegende Funktion des Erhalts und der Weiterleitung von Informationen über elektrische Impulse. Zwei andere Zelltypen ektodermalen Ursprungs, die sich aus NPCs bilden, sind Astrozyten und Oligodendrozyten und werden unter dem Oberbegriff Gliazellen oder Makroglia zusammengefasst. Ihre Aufgabe besteht darin, Neurone in ihrer Funktion zu unterstützen. Astrozyten fungieren dabei im Wesentlichen als Stützzellen und versorgen durch den Kontakt zu Blutgefäßen die Neurone mit Nährstoffen. Oligodendrozyten umhüllen die Axone der Nervenzelle mit einer Myelinscheide um sie elektrisch zu isolieren und so die Effizienz der Signalweiterleitung innerhalb des Nervensystems zu erhöhen. Die Bildung von Neuronen und Makroglia kann direkt oder, wie oft in höheren Vertebraten, indirekt über das Zwischenstadium sekundärer Vorläuferzellen (engl.: *intermediate progenitors*, IPs) erfolgen. IPs bilden sich im entwickelnden zerebralen Kortex und sind in ihrem Differenzierungspotential weiter eingeschränkt. Die RGCs teilen sich zunächst symmetrisch, um ihr Reservoir an Zellen zu vergrößern, und wechseln zu Beginn der Neurogenese zu einer asymmetrisch neurogenen Zellteilung (**Abb. 2b**). Schlussendlich teilen sich die RGCs neurogen symmetrisch um zwei postmitotische neuronale Zellen hervorzubringen. Dieser Prozess umfasst verschiedene Mechanismen, an denen sowohl intrinsische als auch extrinsische Faktoren beteiligt sind. Das richtige Verhältnis von symmetrisch proliferativ zu asymmetrisch neurogener Zellteilung ist während der neuronalen Entwicklung von entscheidender Bedeutung und muss streng reguliert werden.

Die Komponenten des Nervensystems – die verschiedenen Subtypen von Neuronen, von Makroglia, von Sinneszellen und auch von Muskeln – entstehen an weit verstreut liegenden Orten im Embryo und sind anfangs ohne Verbindung zueinander [1]. In der ersten Phase der neuronalen Entwicklung werden Neurone gebildet, deren spezifische Eigenschaften gemäß Zeit und Ort ihrer Entstehung unter den Einfluss induktiver Signale und genregulierender Mechanismen zugewiesen werden. In der nächsten Phase erfolgt eine Morphogenese, die nur im Nervensystem zu finden ist: Axone und Dendriten wachsen entlang bestimmter Routen, die durch spezielle „Wegweiser-moleküle“ (engl.:

guidance molecules) wie Netrine, Slits, Ephrine, Semaphorine und Zelladhäsionsmoleküle festgelegt werden. Damit wird ein provisorisches, aber gut geordnetes Netzwerk von Verbindungen zwischen den verschiedenen, getrennten Teilen des Nervensystems gebildet. In der dritten und letzten Phase, die sich bis in das Erwachsenenalter hinein fortsetzt, werden die Verbindungen durch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Neuronen justiert und verfeinert, die von den elektrischen Signalen abhängen, die zwischen ihnen ausgetauscht werden. Eine Umfangreiche Übersicht zur Neurogenese in Vertebraten zeigen Paridaen, Huttner, Götz, Taverna, Martynoga und Kollegen [2-5].



b Arten der Zellteilung während der Neurogenese



Abbildung 2: Schematische Übersicht der Neurogenese im embryonalen ZNS von Vertebraten. (a) Übersicht der verschiedenen Zelltypen, die sich während der Neurogenese im ZNS von Vertebraten aus dem Neuroepithel entwickeln. Schematische Darstellung der räumlichen Anordnung der sich bildenden Zellen im ZNS. Die Haupttypen von NPCs mit ihren Nachkommen werden durch unterschiedliche Farben markiert. Zusätzliche NPC-Typen, die typischerweise im Neocortex von Säugetieren vorkommen, sind in der gestrichelten Box angegeben. Zu beachten ist, dass nur einige der möglichen Tochterzelltypen dargestellt sind. (Quelle: übersetzt nach Paridaen & Huttner [2] mit Erlaubnis von John Wiley and Sons (Lizenznummer: 4514791211294)) (b) Schematische Darstellung der verschiedenen Arten der Zellteilung während der Neurogenese.

1.2 Regulation der Genexpression während der Neurogenese

Während der Entwicklung eines Organismus entstehen aus einer befruchteten Eizelle mehr als zweihundert verschiedene Zelltypen, die sich in ihrer Morphologie und ihrer Funktion unterscheiden. All diese Zelltypen besitzen den identischen Satz von kodierenden Genen. Die unterschiedlichen Zellfunktionen werden unter anderem dadurch ermöglicht, dass Gene auf dem Weg zu einem funktionellen Protein auf unterschiedliche Art und Weise reguliert werden. Während der neuronalen Entwicklung müssen Zellen präzise und umfassende Anpassungen im Genexpressionsprofil vornehmen, um in einer zeitlich und räumlich korrekten Art und Weise zu neuronalen Zellen zu differenzieren. Die Regulation des Zellschicksals und die Spezifikation von Tochterzellen ist abhängig von verschiedenen Mechanismen zur Kontrolle der Genexpression. Diese Mechanismen umfassen die Regulation durch Transkriptionsfaktoren, die Modifikation des Chromatins, die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression, die Regulation der lokalen Umgebung von neuronalen Vorläuferzellen (NPC Mikroumgebung) und die extrazelluläre Signalgebung. **Abb. 3** zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Mechanismen zur Regulation der Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen während der Neurogenese, die in den folgenden Unterkapiteln näher erläutert werden.

1.2.1 NPC Mikroumgebung

Zahlreiche Faktoren im näheren Umfeld, dem sogenannten *Microenvironment* von neuronalen Vorläuferzellen spielen während der Neurogenese eine essentielle Rolle. An der ventrikulären Oberfläche des sich entwickelnden Nervensystems befinden sich mehrere EZM (Extrazellulärmatrix) -Moleküle wie Laminin und Syndecan1, die über Integrinrezeptoren die apikale Adhäsion und Proliferation von NPCs regulieren können [6, 7]. Weiterhin können Signalmoleküle wie IGFs, FGFs, SHH, BMPs und WNTs (Signalwege, die wichtig für die Neurogenese sind, werden in Kapitel 1.2.4 detaillierter beschrieben) aus der ventrikulären Flüssigkeit (Zerebrospinalflüssigkeit) die Funktionen von neuronalen Vorläuferzellen beeinflussen (Überblick siehe [8]). Ein anderer wichtiger Faktor, der über die Hirnhäute des sich entwickelnden ZNS einwirkt, ist Retinsäure. Retinsäure entsteht durch Oxidation aus Retinol und ist essentiell für das Umschalten der NPCs von symmetrisch proliferativer zu asymmetrisch neurogener Zellteilung beim

Beginn der Neurogenese [9]. Weiterhin aktiviert Retinsäure die Expression von proneuronalen Genen, die unter anderem wichtig für die Differenzierung und die normale neuronale Entwicklung von Vertebraten sind (Zusammenfassung siehe [10]). Neben Signalen von der apikalen und basalen Seite, haben auch Faktoren aus dem sich entwickelnden Neuralrohr wichtige Effekte auf NPCs. So sind zum Beispiel Blutgefäße in der Nähe von IPs wichtig für die korrekte Strukturierung während der Neurogenese und regulieren die Proliferation von IPs [11]. Neurone aus anderen Bereichen des Gehirns können während der Neurogenese die Proliferation von Vorläuferzellen steuern, durch Signale, welche die Neurone an NPCs weitergeben [12]. Auch nicht neuronale Zellen wie Mikroglia, die schon während der Neurogenese vorhanden sind, zeigen einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der NPC-Population und spielen so eine wichtige Rolle bei der Regulation der Neurogenese [13, 14].

1.2.2 Modifikation des Chromatins

In der publizierten Literatur des letzten Jahrzehnts finden sich vermehrt Belege eines starken Einflusses von Chromatinmodifikationen, wie DNA-Methylierung und Histon Modifikationen, auf die Kontrolle der zeitlich- und räumlich-abhängigen Genexpression während der Neurogenese, insbesondere beim Umschalten von neuronaler zu einer glialen Differenzierung. NPCs in einem frühen Stadium zeigen eine hohe Expression von Chromatinregulatoren. Ein Beispiel für solche Regulatoren sind HMG Proteine, welche direkt oder indirekt über Methyltransferasen wie EZH2 den Chromatinstatus regulieren [15]. Die Regulation des Chromatinstatus führt dazu, dass das Chromatin im Frühstadium von NPCs zugänglicher, bzw. weniger kondensiert ist als in späteren Stadien [16]. Sowohl eine globale Chromatin-Kondensation als auch die Modifikationen von bestimmten Genen spielen beim Übergang von Neuron-produzierenden zu Gliazellen-produzierenden NPCs eine besondere Rolle [17]. Als Beispiel ist hier die DNA-Methylierung von glialen Genen wie *Gfap* zu nennen, die ein frühzeitiges Umschalten der Neurogenese zur Gliogenese verhindert [18]. In späteren Stadien der Neurogenese dagegen werden proneurale Gene wie *Neurog1* durch die Aktivität von Polycomb Proteinen unterdrückt [17].

1.2.3 Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression

Die alternative Prozessierung von pre-mRNAs führt zur Generierung unterschiedlicher Proteine aus einem primären Transkript. Das alternative Spleißen von RNA spielt generell bei der Differenzierung während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle, aber auch speziell bei der Neurogenese ist es ein wichtiger Regulationsmechanismus [19]. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass das RNA-bindende Protein PTBP2 die Expression von spezifisch in adultem Gewebe vorkommenden Spleißvarianten hemmt und die Deletion von *Ptbp2* eine frühzeitige neuronale Entwicklung induziert [20]. Ein anderes RNA-bindendes Protein, RBFOX3, vermittelt das alternative Spleißen von *Numb*, ein wichtiger Regulator der NOTCH Signalübertragung, der die neuronale Differenzierung vorantreiben kann [21]. Es gibt aber auch Belege für die Einflussnahme von langen nicht kodierende RNAs (lncRNAs) auf die posttranskriptionelle Regulation während der Neurogenese (Übersicht siehe [22]). Die lncRNA Rmst reguliert die Neurogenese im Mittelhirn durch die Interaktion mit SOX2 [23]. Diese Interaktion ist essentiell für die Bindung von SOX2 an Promotorregionen und das Aktivieren von proneuralen Zielgenen wie *Ascl* und *Neurog1*. In RGCs, die auf eine neurogene Zellteilung umschalten, werden verschiedene lncRNAs wie *Miat* exprimiert, welche das Verhältnis von Proliferation und Differenzierung dieser Zellen regulieren [24].

Einen großen Einfluss auf die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression haben micro-RNAs (kurz miRNAs oder miRs). Die Biogenese, die Zielfindung und der Wirkmechanismus von miRNAs, aber auch ihren Einfluss auf die Neurogenese werden in Kapitel 1.3 ausführlich beschrieben.

1.2.4 Signalwege

Eine große Rolle bei der Regulation der Neurogenese spielen extrinsische Signale, die generell über vier für die Neurogenese wichtigen Signalwege ausgelöst werden. Zu diesen Signalwegen gehören der NOTCH-, WNT/ β -Catenin-, Sonic hedgehog- (SHH) und fibroblast growth factor- (FGF) Signalweg. Extrazelluläre Signalmoleküle binden an membrangebundene Rezeptoren und lösen so intrazelluläre Signalkaskaden aus, die schließlich zur Regulation neuronaler Genexpressionsprogramme führen.

Der **NOTCH** Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der embryonalen und adulten Neurogenese [25]. Die NOTCH Liganden Delta oder Jagged aktivieren den NOTCH Rezeptor, was zur Freisetzung der intrazellulären Rezeptordomäne führt, welche

die Transkription von *Hes* Genen vermittelt. HES Proteine wiederum unterdrücken die Expression von proneuralen Genen wie z.B. *Neurog2* und *Ascl* und halten die Zelle somit in einem proliferativ aktiven Zustand. In RGCs des sich entwickelnden Mauskortex oszilliert die Expression von *Hes1* in RGCs aufgrund einer autoinhibitorischen Rückkopplungsschleife und induziert so eine Schwankung in der Expression von *Delta* und *Neurog2* [26]. Es wird davon ausgegangen, dass durch diese Expressions-Schwankungen von *Hes1* die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung in RGCs reguliert wird. Sowohl im sich entwickelnden Zebrafisch als auch im Telencephalon der Maus wurde gezeigt, dass bei der asymmetrischen Zellteilung von RGCs die Tochterzelle mit einem stärkeren NOTCH-Signal eine RGC bleibt, während die Tochterzellen mit einem schwächeren NOTCH-Signal eine hohe Expression von *Delta* und anderen proneuralen Genen zeigt. Außerdem initiiert das schwächere Notch-Signal in diesen Tochterzellen eine Ablösung von der ventrikulären Oberfläche und die neurale Differenzierung [26-28].

Die kanonische **WNT/β-Catenin** Signalgebung ist wichtig für die Strukturierung des sich entwickelnden Gehirns und für die Regulation der Proliferation und Differenzierung während der Gehirnentwicklung [29]. Nach der Bindung von WNT-Liganden an ihre Frizzled/LRP5/6-Rezeptoren, akkumuliert β-Catenin im Cytoplasma von wo aus es in den Nukleus wandert. Dort vermittelt β-Catenin die neuronale Genexpression über die Aktivierung der LEF/TCF Transkriptionsfaktoren. Ohne die WNT-Signalgebung, wird β-Catenin durch einen Degradationskomplex, bestehend aus APC, Axin und den beiden Kinasen CK1α und GSK-3, abgebaut. Sobald aber WNT-Liganden an Frizzled/LRP5/6-Rezeptoren binden, zerfällt dieser Degradationskomplex. Die WNT/β-Catenin Signalaktivität spielt eine duale Rolle während der Neurogenese. Zum einen führt die konstitutive Aktivierung der WNT-Signals zu einer Expansion der verschiedenen neuronalen Vorläuferpopulationen [30], während zum anderen die Hemmung der WNT-Signalgebung zu einem vorzeitigen Austritt des Zellzyklus und zu einer Abnahme des Vorläuferpools führt [31, 32]. Die WNT-Signalgebung hält somit während der frühen Phase der Neurogenese die symmetrische Zellteilung von NPCs aufrecht und hemmt die Bildung von IPs [33, 34]. Für die Umstellung zu einer asymmetrischen Zellteilung und der Differenzierung ist eine Herunterregulation der WNT-Signalgebung erforderlich [33, 35]. In einem anderen räumlich-zeitlichen Kontext konnte jedoch auch gezeigt werden, dass ein aktives WNT-Signal die neuronale Differenzierung induziert. Im *Xenopus*-Vorderhirn ist eine Umstellung auf ein aktives WNT-Signal erforderlich, um die

neuronale Differenzierung zu initiieren, während die Hemmung des WNT/ β -Catenin Signalweges während der frühen Neurogenese für die Entwicklung des Vorderhirns wichtig ist [36]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass während der Neurogenese, die Aktivität des WNT/ β -Catenin Signals auch die Bildung von IPs und die neuronale Differenzierung von NPCs in Vertebraten über die Hochregulation der proneuralen Gene *Neurog1* und *N-myc* fördern kann [33, 37-39]. *N-myc* hemmt die Aktivität des Notch-Rezeptors und fördert so die neuronale Differenzierung. Auch führte in OLIG1-positiven Vorläuferzellen des Vorderhirns, die gewöhnlich zu Oligodendrozyten differenzieren, ein aktives WNT-Signal zu einem neuronalen Schicksal dieser Zellen, während die Differenzierung zu Gliazellen unterdrückt wurde [40].

Die **Sonic Hedgehog (SHH)** Signalkaskade ist essentiell für die normale dorso-ventrale Strukturierung des Vertebraten ZNS. Die SHH Signalweiterleitung wird durch die Bindung des SHH Liganden an den *Patched* (PTCH)-Rezeptor aktiviert, gefolgt von einer Signalweiterleitung ins Zellinnere durch das membranständige Protein *Smoothed* (SMO). Dadurch wird die proteolytische Spaltung des GLI-Proteins verhindert und GLI kann als transkriptioneller Aktivator im Zellkern die Genexpression steuern. Ohne SHH werden die GLI Proteine dephosphoriliert und agieren als transkriptionelle Repressoren. Zusätzlich zu der Funktion bei der Strukturierung des Nervensystems, besitzt SHH sowohl eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus von RGCs, als auch bei der Bildung von IPs [41]. Während der Neurogenese verringert sich das SHH Signal, während sich die Aktivität des GLI3 Repressors verstärkt. Dies ist notwendig für die Bildung von IPs und für die neuronale Differenzierung [42]. Saade und Kollegen [43] veröffentlichten ein mathematisches Modell für die Neurogenese im Rückenmark, um zu zeigen, dass die Abnahme des SHH Signals das Umschalten von symmetrisch proliferativer und asymmetrisch selbsterneuernder zu symmetrisch neurogener Zellteilung über die Veränderung der RGC Zellzyklus-Kinetik vermittelt. Im sich entwickelnden Neokortex fördert die SHH-Signalgebung die symmetrisch proliferative Zellteilung von RGCs durch die Transkription des NOTCH Transkriptionsfaktors HES1 [44]. Dies zeigt, dass eine signifikante Überschneidung zwischen den verschiedenen Signalwegen während der Regulation der Proliferation und Differenzierung von RGCs besteht. Ein ähnliches Zusammenspiel zwischen Signalwegen wurde auch zwischen FGF und NOTCH beobachtet.

FGFs sind wichtig für die anterior-posterior Strukturierung des Gehirns und für die Expansion von RGCs über die symmetrische Zellteilung durch die nachgeschaltete

Aktivierung der HES1-vermittelten Transkription [45]. Mitglieder der FGF-Familie wirken in den frühesten Stadien der Embryonalentwicklung um Vorläuferzellen zu erhalten und ihr Wachstum, ihre Differenzierung, ihr Überleben und ihre Strukturierung zu vermitteln. FGF-Rezeptoren sind wichtig für die Aufrechterhaltung neuraler Stammzellen und ein aktivierter Rezeptor führt zu einer erhöhten Anzahl von gebildeten Neuronen [46]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei älteren Mäusen ein aktivierter FGF-Rezeptor den altersbedingten Rückgang der Neurogenese umkehren und auf ein, bei jungen Mäusen gefundenes Niveau, anheben kann [47].

1.2.5 Transkriptionsfaktoren

Die oben genannten Signalwege beruhen auf gradientenbildenden Morphogenen, die für die korrekte Embryogenese und Strukturierung des ZNS essentiell sind. Diese Strukturierung führt zur regionalen Expression von Transkriptionsfaktoren, die NPCs über die spezifische Initiation der Genexpression dazu bringen, spezifische Zelltypen während der Neurogenese zu bilden [5]. Ein Beispiel für einen essentiellen Transkriptionsfaktor der Neurogenese ist der Transkriptionsfaktor PAX6, der in vielen Regionen des ZNS exprimiert ist [48]. Zusätzlich zur Regulierung der regionalen Strukturierung des ZNS fördert PAX6 die Proliferation über die Orientierung des Spindelapparats in NPCs, aber auch das Vorantreiben der Neurogenese durch die Induktion von proneuronalen Genen wie den Transkriptionsfaktoren *Neurog2* oder *NeuroD1* [49, 50]. Ein weiterer essentieller Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselrolle bei der transkriptionellen Repression während der Neurogenese einnimmt, ist der *repressor element 1 silencing transcription factor* (REST) (siehe unten, Kapitel 1.2.6).

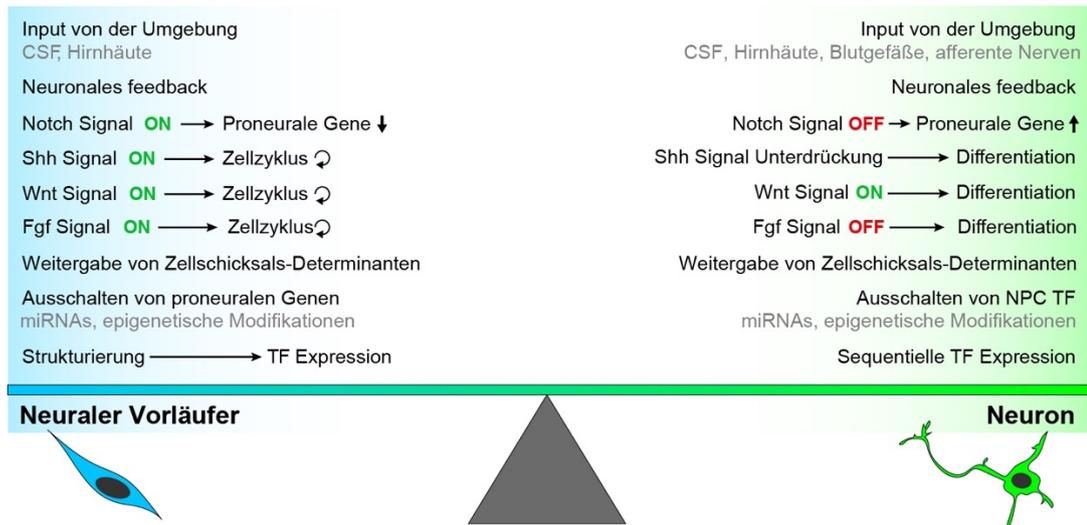


Abbildung 3: Balance zwischen NPC Proliferation und Differenzierung.

Schematische Darstellung der verschiedenen extrazellulären und intrazellulären Faktoren und Mechanismen zur Regulation des Gleichgewichts zwischen Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen und der Differenzierung zu Neuronen. TF, Transkriptionsfaktor.

1.2.6 Repression der neuronalen Genexpression durch REST

Für die Neurogenese ist es wichtig, dass die Transkription proneuronale Gene streng reguliert wird. Wie schon im vorherigen Kapitel beschrieben, wird die neurale Differenzierung und die Regulation des differenzierten Zustands durch Transkriptionsfaktoren, und die durch diese Faktoren rekrutierten Proteine, gesteuert. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Repression der Neuron-spezifischen Genexpression vermittelt, ist REST. REST ist auch unter dem Namen NRSF (*Neuron Restrictive Silencer Factor*) bekannt. REST wird hauptsächlich in nicht neuronalem Gewebe und in nicht neuronalen Zellen exprimiert, in denen das Protein die Expression neuronaler Gene über verschiedene Ko-Faktoren unterdrückt. In undifferenzierten neuronalen Vorläuferzellen wird REST exprimiert, um die vorzeitige Expression des neuronalen Phänotyps während der Neurogenese zu verhindern [51, 52]. Mit einer fortschreitenden neuronalen Differenzierung nimmt die Expression von REST immer weiter ab. Die ersten Studien über die reprimierende Funktion von REST wurden am REST-regulierten Gen *Synapsin1* durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein inverses Verhältnis der Expression von REST und *Synapsin1* [53]. REST besteht aus 1096 Aminosäuren und enthält 8 Zinkfingerdomänen am N-terminalen Bereich und eine Zinkfingerdomäne am C-terminalen Bereich. Dabei vermitteln die N-terminalen Zinkfingerdomänen die DNA-Bindung von REST. Weiterhin besitzt REST zwei Interaktionsdomänen für Ko-Repressoren, eine im N- und eine im C-terminalen Bereich.

REST bindet an eine 21-23bp lange DNA Sequenz, die als NRSE (*neuron restrictive silencer element*) oder *repressor element 1* (RE1) bezeichnet wird und die in der Promotorregion von vielen neuronalen Genen vorhanden ist. Die REST-Bindestelle wurde ursprünglich in der 5'-Region der Gene *Scg10* und *Nav1.2* entdeckt [54]. Nachfolgende Studien identifizierten die Sequenz der REST-Bindestelle, die folgendermaßen lautet: NNCAGCACCNNGCACAGNNNC [55-57]. Bei mehr als 6 Abweichungen von dieser Konsensussequenz kann REST nicht mehr an Zielgene binden [57]. Bruce und Kollegen [55] konnten im Genom von Mäusen und im Menschen etwa 1900 Gene identifizieren, die eine RE1 Sequenz besitzen. REST kann direkt an diese Sequenz binden und wirkt dabei als Ankerpunkt für die Bildung eines Proteinkomplexes. Dieser Proteinkomplex bedient sich verschiedener Mechanismen, um die Transkription von Zielgenen zu unterdrücken. Einerseits kann die Repression der Transkription von Zielgenen über die Remodellierung und Modifizierung von Chromatin erfolgen (Zusammenfassung siehe [58]). REST kann hierfür zwei Ko-Repressoren binden, CoREST und SIN3A [59, 60]. An der N-terminalen Interaktionsdomäne von REST kann das Protein SIN3A binden, welches die Histon Deacetylasen HDAC1/2 [61] und die Chromatin Remodellierungs-Proteine RBBAP46/48 [62] (auch als RBBP4/7 bekannt) als Bindungspartner rekrutieren kann. An der C-terminalen Interaktionsdomäne von REST kann CoREST als Ko-Repressor binden. CoREST kann wiederum mit der Histon Deacetylase HDAC1/2 [63], dem Chromatin-Remodellierungs-Protein BRG1 [64], der HistonDemethylase LSD1 [65], dem Methyl-CPG-Bindungsprotein MECP2 [51, 63] und der Histon Methyltransferase G9a [66] interagieren. Darüber hinaus wurde REST schon mit einer Reihe anderer regulatorischer Kofaktoren in Verbindung gebracht, zu denen DNA-Methyltransferasen (DNMTs), zusätzliche Methyl-CpG-Bindungsproteine (MBDs), Chromatin-Remodellierungs-Enzyme, das Chromodomain Y-Chromosom Familienmitglied CDYL [67], die transkriptionellen RNA-Polymerase-II-Mediator-Untereinheiten Med19 und Med26 [68], der NADH-Bindungsfaktor CTBP [69] und der Transkriptionsfaktor SP3 [67] gehören. Diese Ko-Repressoren von REST ändern in der Nähe der RE1 Bindungsstelle den Acetylierungs- und Methylierungszustand von Histonen und haben so Einfluss darauf, ob das Chromatin in einer offenen, zugänglichen oder geschlossenen, unzugänglichen Konfiguration vorliegt und regulieren so die Transkription von Zielgenen [58].

Eine andere Möglichkeit, neben der Remodellierung und Modifizierung von Chromatin, ist die direkte Repression des Transkriptionsapparats von RE1-regulierten Genen durch

die Desphosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II (Pol II) Aktivität durch eine Familie von kleinen Phosphatasen (CTDSPs (*c-terminal domain small phosphatases*), auch oft SCPs genannt). Die CTD der großen Untereinheit der Pol II besteht aus mehreren Aminosäure Heptad-Wiederholungen (YS₂PTS₅PS₇), die eine Andockstation für Proteine darstellen, welche die Transkription regulieren können. Durch die Änderung des Modifikationsmusters (Phosphorylierung, Isomerisierung) dieser repetitiven Sequenzen wird die Polymerase durch die verschiedenen Stadien der Transkription geführt (Initiation, Elongation, Termination und RNA Prozessierung) [70]. Die effiziente Initiation der Transkription ist abhängig von der Phosphorylierung des Serin5-Aminosäurerests, welche hauptsächlich von der Kinase-Aktivität von CDK7 abhängt [71]. Die REST-assoziierten CTDSPs wirken diesem Ereignis entgegen, indem sie den Serin5-Aminosäurerest dephosphorylieren und damit die Transkription inhibieren [70, 72, 73]. In **Abb. 4** ist der Aufbau des REST Komplexes und die Wirkung auf REST-regulierte Gene schematisch dargestellt. REST ist ein entscheidender Faktor bei der Regulation der neuronalen Genexpression in nicht-neuronalen Zellen. Um die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu neuronalen Zellen zu induzieren, ist daher die allmähliche Inaktivierung des REST-Komplexes und die Aktivierung des neuronalen Genexpressions-Programms erforderlich [72]. Der Prozess der Inaktivierung von REST wird auf verschiedenen Ebenen geregelt, einschließlich des gezielten proteolytischen Abbaus der Ko-Repressoren. Publierte Studien deuten darauf hin, dass dabei auch kleine regulatorische nicht codierende RNAs eine entscheidende Rolle spielen können [74-77].

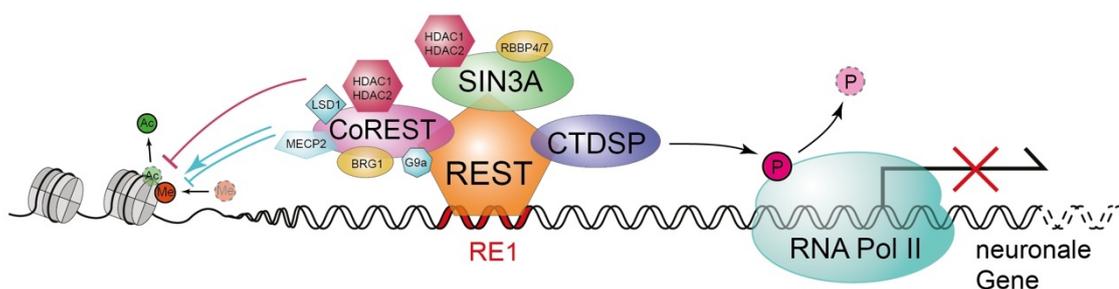


Abbildung 4: Aufbau des REST-Komplex und seine Wirkung auf Zielgene.

Schematische Darstellung des REST-Komplexes mit den Hauptkomponenten (Mitte), die von REST für die Repression der neuronalen Genexpression rekrutiert werden. Der REST-Komplex wirkt auf Gene mit einer RE1-Bindungssequenz. Die auf der linken Seite schematisch dargestellten Einflüsse zeigen die langfristige Hemmung der Genexpression über die Modifizierung von Histonen oder der Veränderung der Chromatin Konformation. Auf der rechten Seite ist die Inhibition der Transkription von RE1-Genen durch die CTDPSP Familie über die Dephosphorylierung der CTD der großen Untereinheit der RNA Pol II schematisch dargestellt. (Quelle: mit freundlicher Genehmigung von Thomas Ziegenhals [78])

1.3 miRNAs: post-transkriptionelle Regulatoren der Genexpression

Neben den im vorigen Kapitel vorgestellten Mechanismen zur Regulation der Transkription von Genen, ist einer der wichtigsten posttranskriptionellen regulatorischen Mechanismen, die RNA interference (RNAi). Bei ihrer Entdeckung 1998 konnten Fire und Mello [79] zeigen, dass die Einführung kleiner doppelsträngiger RNA in *C. elegans* die Expression von Genen durch einen antisense Mechanismus beeinflussen. Heute weiß man, dass drei kleine nicht kodierende RNA Familien für die native RNAi verantwortlich sind, small interfering RNAs (siRNAs), miRNAs und die Keimbahn-spezifischen piwi RNAs (piRNAs). Dabei stellen die ~22 Nukleotide (nt) langen miRNAs eine wichtige Klasse von regulierenden, nicht kodierenden RNAs dar, die in der Lage sind, die Ziel-mRNA Expression posttranskriptionell zu steuern. Heute sind miRNAs als Regulatoren bekannt, die eine wichtige Rolle bei grundsätzlich allen physiologischen Prozessen spielen. Ihre Fehlregulation ist für eine Vielzahl an Funktionsstörungen und Krankheiten verantwortlich [80, 81]. Mittlerweile konnten 3055 mature miRNAs im menschlichen Genom identifiziert werden (**Abb. 5**), von denen jede miRNA eine ganze Reihe verschiedener Zielgene (manche miRNAs hunderte [82, 83]) regulieren kann. Es wird davon ausgegangen, dass ein Drittel aller Gene im Genom durch miRNAs reguliert werden [84].

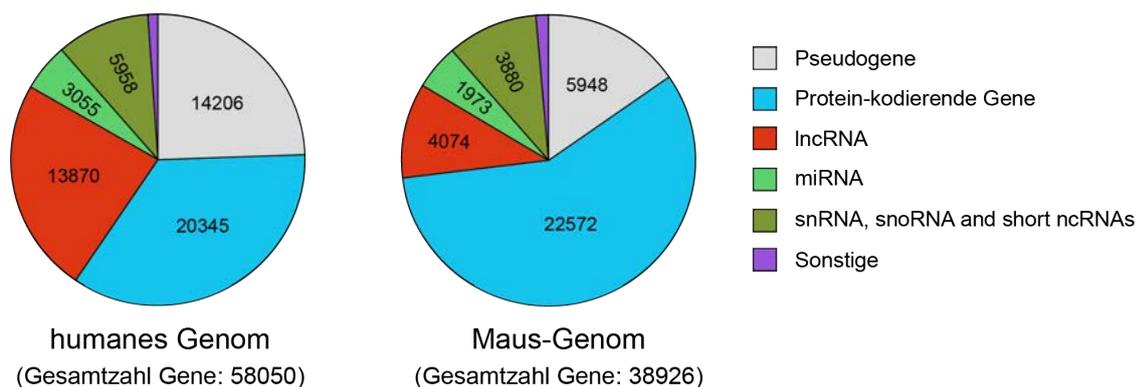


Abbildung 5: Annotation des menschlichen und murinen Genoms.

Schematische Darstellung der Verteilung von Protein-kodierenden und nicht Protein-kodierenden Genen. Gezeigt sind die Gesamtzahl an Genen im humanen Genom und Maus-Genom und ihre Verteilung im Kreisdiagramm. Die Gene wurden in sechs verschiedene Kategorien unterteilt: Pseudogene, kodierende Gene, lncRNAs, miRNAs, snRNAs, snoRNAs, kurze ncRNAs und Sonstige. Quelle: GENCODE (Version 25), (<http://www.genencodegenes.org>)

1.3.1 miRNA Biogenese

MiRNAs werden als primäre Transkripte (primäre-microRNA oder kurz pri-miR), meist von der RNA-Polymerase II synthetisiert, mit einem 7-Methylguanosin-Cap am 5'-Ende versehen und am 3'-Ende polyadenyliert. In manchen Fällen kann eine pri-miRNA aber auch über die RNA-Polymerase III transkribiert werden [85, 86]. miRNA-Gene sind entweder unabhängige Transkriptionseinheiten, so genannte *intergenic* miRNAs, oder befinden sich in kodierenden Genen, hauptsächlich innerhalb der Introns ihres Wirtsgens (intronische miRNAs). Intronische miRNAs treten häufig in Clustern unter der Kontrolle eines eigenen Promoters auf, der die Expression eines langen Primärtranskriptes steuert, welches mehrere miRNAs beinhaltet. Diese geclusterten und koexprimierten miRNAs sind häufig funktionell miteinander verbunden und teilen ein ähnliches Repertoire von Ziel-mRNAs. Ein gutes Beispiel ist das miR-290/295-Cluster. Dieses miRNA-Cluster wird spezifisch in ESCs exprimiert, enthält sechs verschiedene miRs, welche die gleichen Ziel-mRNAs besitzen und in ihrer Funktion redundant zu sein scheinen [87, 88]. Nach der Transkription unterliegen pri-miRNAs einer speziellen Art von Prozessierung. Zunächst faltet sich die pri-miRNA in die charakteristische Stamm-Schleifenstruktur (engl.: *stem-loop structure*, oft auch als *hairpin structure* (Haarnadel-Struktur) beschrieben). Die typische pri-miR besitzt eine Länge von ~1 kb und enthält eine apikale Schleife, einen Stamm von 33-35 bp und einzelsträngige RNA-Segmente an den 3'- und 5'-Enden (siehe **Abb. 6b**). Im Nukleus wird die pri-miRNA durch den Mikroprozessorkomplex, bestehend aus Drosha und Pasha (auch als DGCR8 bezeichnet, engl.: *DiGeorge Syndrome critical Region 8*), prozessiert. Die RNase Typ III Drosha wirkt dabei als ein „molekularer Maßstab“ („...11-bp-measuring ruler activity of Drosha.“ [89]), welcher die korrekte Spaltstelle an der Basis des pri-miRNA Stamms 11 nt von der basalen Verbindungsstelle erkennt [90]. Zwei DGCR8 Moleküle binden am apikalen Teil des Stamms und interagieren mit Drosha, um die korrekte und effiziente Prozessierung der miRNA zu gewährleisten [91, 92]. Die Spaltung durch den Mikroprozessorkomplex bringt eine ~60 nt lange, Stamm-Schleifen-strukturierte precursor (pre) miRNA mit einem charakteristischen 2 nt Überhang am 3'-Ende hervor [93], die dann durch das Ran-GTP-gebundene Protein XPO5 (Exportin5) ins Zytosol exportiert wird. Exportin5 erkennt dabei nur pre-miRNAs mit den charakteristischen 2 nt Überhang am 3'-Ende, was dafür sorgt, dass nur die richtig verarbeiteten miRNA-Zwischenprodukte ins Zytosol transportiert werden. Neben diesem kanonischen Reifungsschritt der pri-miRNA gibt es auch eine kleine Anzahl an pri-miRNAs, so genannte mirtrons, die unabhängig von

Drosha prozessiert werden können [94, 95]. Diese mirtrons werden durch Splicing-Ereignisse erzeugt, die zur Produktion einer funktionellen pre-miRNA führen (siehe **Abb. 6a** oben, rosa gestrichelter Kreis). Nach dem Transport der pre-miRNA in das Zytosol wird das Ran-gebundene GTP hydrolysiert, was zur Freisetzung der pre-miRNA und zur Dissoziation des Protein/pre-miRNA-Komplex führt [96, 97]. Die terminale Schleifenstruktur der pre-miRNAs wird nun im Zytosol durch das RNase III Enzym Dicer abgespalten, um einen RNA-Duplex zu erhalten [98, 99]. Dabei ist der 3' Übergang, der über die Spaltung von Drosha entstanden ist, wichtig für die Bindung von Dicer. Die zwei C-terminalen RNase III Domänen von Dicer formen intramolekular ein pseudo-Dimer und bilden das katalytische Zentrum von Dicer, ähnlich wie bei Drosha. Bei der Abspaltung generiert Dicer einen 2 nt Überhang am 3'-Ende [100]. Die so generierte doppelsträngige RNA-Duplex Struktur besteht aus der maturen funktionellen miRNA (auch Guide-Strang genannt) und einem sogenannten *star-* oder *passenger* Strang (mit * gekennzeichnet, beispielhaft: miR-9* = miR-9-3p). In den meisten Fällen wird entweder aus dem 3'-Strang oder dem 5'-Strang (bezeichnet als 3p- oder 5p-Arm) die reife funktionelle miRNA gebildet [101-103]. In seltenen Fällen werden auch beide Arme oder sogar Sequenzen aus der Schleifenstruktur verwendet [75, 104]. Sobald die miRNA korrekt prozessiert wurde, lagert sie sich mit einer Reihe von Proteinen zu einem Komplex namens RISC (RNA-induzierter Stilllegungskomplex, engl. *RNA-induced silencing complex*) zusammen. Die Hauptkomponenten von RISC sind Mitglieder der Argonaute Familie (AGO), welche die pre-miRNA binden [105, 106]. Abhängig von der thermodynamischen Stabilität der 5'-Enden werden der funktionelle *guide*-Strang und der *passenger*-Strang selektiert. Der Strang mit der am 5'-Ende geringeren Stabilität bleibt als *guide*-Strang auf dem Komplex gebunden, während der komplementäre *passenger*-Strang von Ago freigegeben wird und umgehend degradiert [107, 108]. **Abb. 6a** zeigt die grafische Zusammenfassung der miRNA Biogenese. Argonaute Proteine bilden eine hochkonservierte Klasse von RNA-bindenden Proteinen (RBPs) [109] und besitzen vier charakteristische Domänen: die N-terminale, PAZ, MID und eine C-terminale PIWI Domäne [110]. Die PAZ Domäne bindet dabei das 3'-Ende des *guide*-Strangs [110-112]. Die MID Domäne enthält eine Bindungstasche, durch die das 5'-Ende der miRNA durch Stapelwechselwirkungen (engl.: *stacking interactions*) und Wasserstoffbrückenbindungen verankert wird [113]. Die PIWI Domäne besitzt die enzymatische Aktivität, die die Ziel-mRNA Spaltung vermitteln kann, wenn eine hohe Komplementarität der miRNA zu ihrer Ziel-mRNA vorhanden ist [109, 114]. Das Säugetier-Genom enthält vier verschiedene AGO Paraloge, AGO1-4, von denen AGO2

das einzige Protein ist, das eine enzymatische „Slicer-Aktivität“ besitzt und Ziel-mRNAs spalten kann.

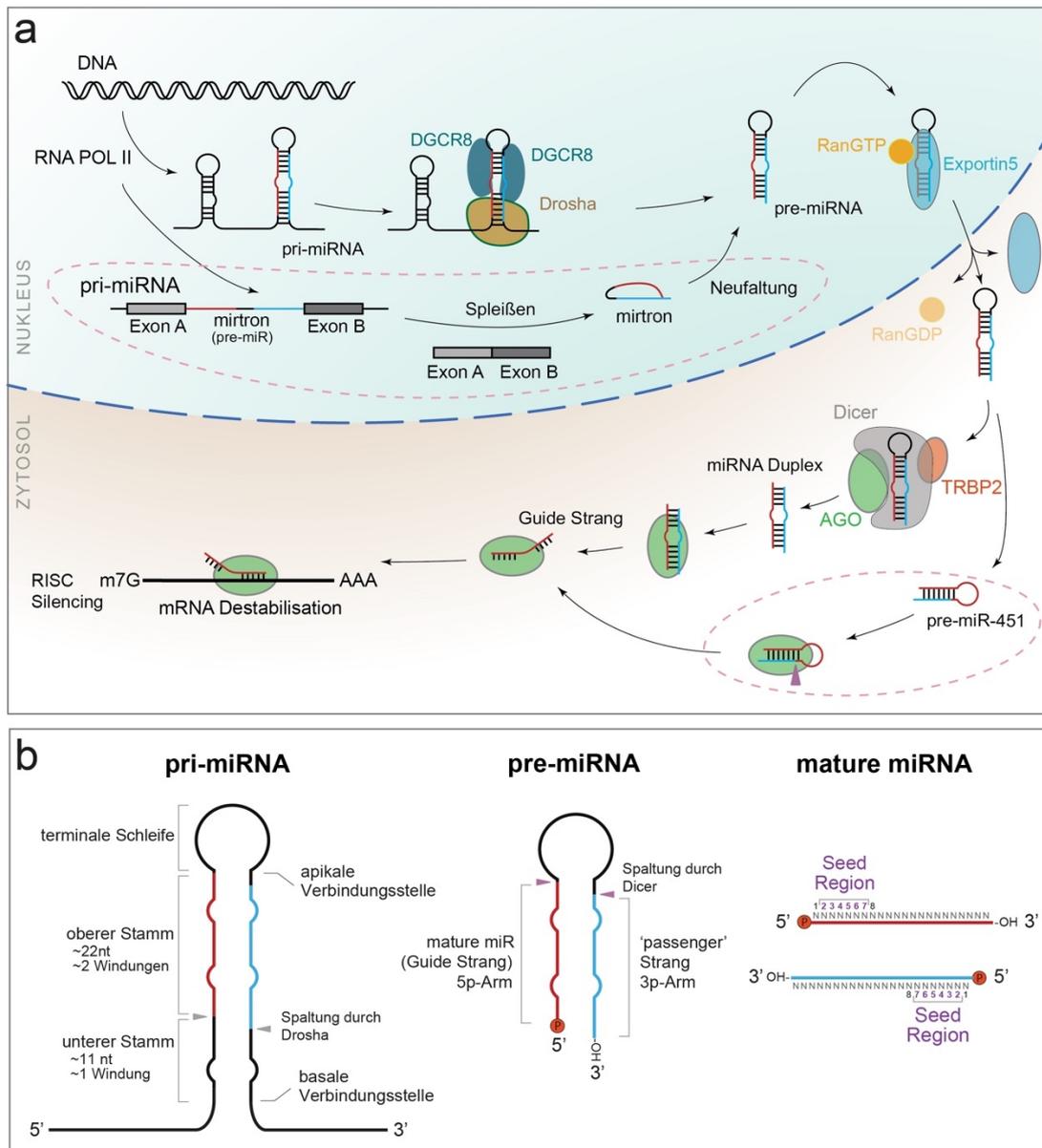


Abbildung 6: Biogenese und Prozessierung von miRNAs.

(a) Darstellung der miRNA Biogenese. In Vertebraten wird das primäre miRNA-Transkript (pri-miRNA) schrittweise durch Nukleasen wie Drosha, DGCR8 und Dicer zu einer murenen miRNA prozessiert und über den Exportin5 / Ran-Komplex aus dem Kern exportiert. Ein Strang des miRNA-Duplex wird auf AGO geladen (Guide Strang, rot) und bildet RISC, der zur Destabilisierung und Translationshemmung der Ziel-mRNA führt. Abseits der kanonischen miRNA Biogenese, gibt es eine Drosha-unabhängige Prozessierung (gestrichelter rosa Kreis unten, beispielhaft gezeigt für die miR-451), bei der die pre-miRNA als Nebenprodukt des Spleißens entsteht. Detaillierte Beschreibung siehe Text (b) Die verschiedenen Stadien der miRNA Prozessierung. Die pri-miRNA (links) ausgehend von der Basalseite, mit dem unteren und oberen Stamm, der Drosha Schnittstelle dazwischen (graue Pfeile), der terminalen Schleife mit einem Überhang von 2 nt am 3'-Ende, etwa 11 nt von der basalen Verbindungsstelle. Die Dicer-Spaltung der pre-miRNA (Mitte) erfolgt zwischen der terminalen Schleife und dem oberen Stamm (lila Pfeilspitzen). Der mature miRNA-Duplex (rechts) mit ‚guide‘ (rot) und ‚passenger‘ (blau) Strang und der jeweiligen Seed Region (lila) von Nucleotid 2-7. (Quelle: Abbildung modifiziert nach Ziegenhals [78])

1.3.2 Zielerkennung und Wirkmechanismus von miRNAs

Sobald sich RISC mit der murenen miRNA gebildet hat, kann er mit seinen Ziel-mRNAs im Zytosol binden, die eine komplementäre Nukleotidsequenz aufweisen. In Tieren erstreckt sich die Basenpaarung der miRNA mit komplementären Regionen in der 3'UTR der Ziel-mRNA typischerweise über sechs oder sieben Nukleotidpaare, den Nukleotiden 2-7 oder 2-8 der miRNA (**Abb. 6b**). Diese sogenannte „Seed Region“ ist essentiell für die Zielbindung und bestimmt die Spezifität einer miRNA [115]. AGO Proteine ordnen dabei die Seed Region der miRNA in einer günstigen Konformation an, um sie für die Basenpaarung vorzubereiten. Dies führt zu einer stark erhöhten Affinität der miRNAs für ihre Ziel-mRNA und ermöglicht AGO, mRNAs effizient nach Zielstellen zu „scannen“ [116-118]. Die miRNA-vermittelte Spaltung der Ziel-mRNA, die bei einer vollständigen Basenpaarung auftreten kann, fehlt bei Tieren fast vollständig. Die Mehrheit der miRNA Zielbindungen passiert über die Seed-Region und einer Basenpaarung von 6-8 nt, klassifiziert als 6mer, 7mer oder 8mer Zielsequenz-Paarung [119]. Jedoch findet man eher selten 6mer Basenpaarungen oder auch unvollständige Seed-Region Bindungen [115]. Da nur transient, sind diese beiden letztgenannten Arten der Bindung zwischen miRNA und Ziel-mRNA in den meisten Fällen zu schwach, um die Expression der Ziel-mRNA zu regulieren [117]. Broughton und Kollegen zeigten jedoch, dass dieses einfache Modell der Repression durch miRNAs in Abhängigkeit von der Basenpaarung mit der Seed Region erweitert werden muss und dass die Paarung alleine mit der Seed Region nicht immer für die funktionelle Zielwechselwirkung ausreicht [120].

Sobald die miRNA stabil an die mRNA gebunden ist, rekrutiert AGO eine von drei TNRC6 Familienmitglieder, oft als GW182 beschrieben (auf Grund der Masse von 182 kDa und N-terminalen Glycin(G) – Tryptophan (W) Repeats). Die GW-Repeats von GW182 vermitteln die Interaktion mit AGO [121]. Die Rekrutierung von GW182 ist erforderlich, um die Ziel-mRNA Stummschaltung zu induzieren. Ein *knockdown* von GW182 führte zu einer Beeinträchtigung der miRNA Funktion [122, 123] und das künstliche Anbinden eines GW182 Proteins an mRNAs führte zu einer starken Repression [124, 125]. Sobald GW182 zu einer Ziel-mRNA rekrutiert wurde, dient das Protein als Interaktionsplattform für eine Vielzahl von Proteinen, die für den Abbau und die Translationshemmung von Ziel-mRNAs benötigt werden (**Abb. 7**). GW182 bindet unabhängig die zwei wichtigsten zellulären mRNA Deadenylierungskomplexe, PAN2/PAN3 und CCR4/NOT/CAF1, die zu Deadenylierung, gefolgt vom Decapping und sofortigem 5' zu 3' Decay führen [126, 127]. Darüber hinaus interagiert GW182 direkt

mit dem poly-A bindenden Protein PAPBC über seine C-terminale Region, um die Deadenylierung der Ziel-mRNA zu vermitteln [128].

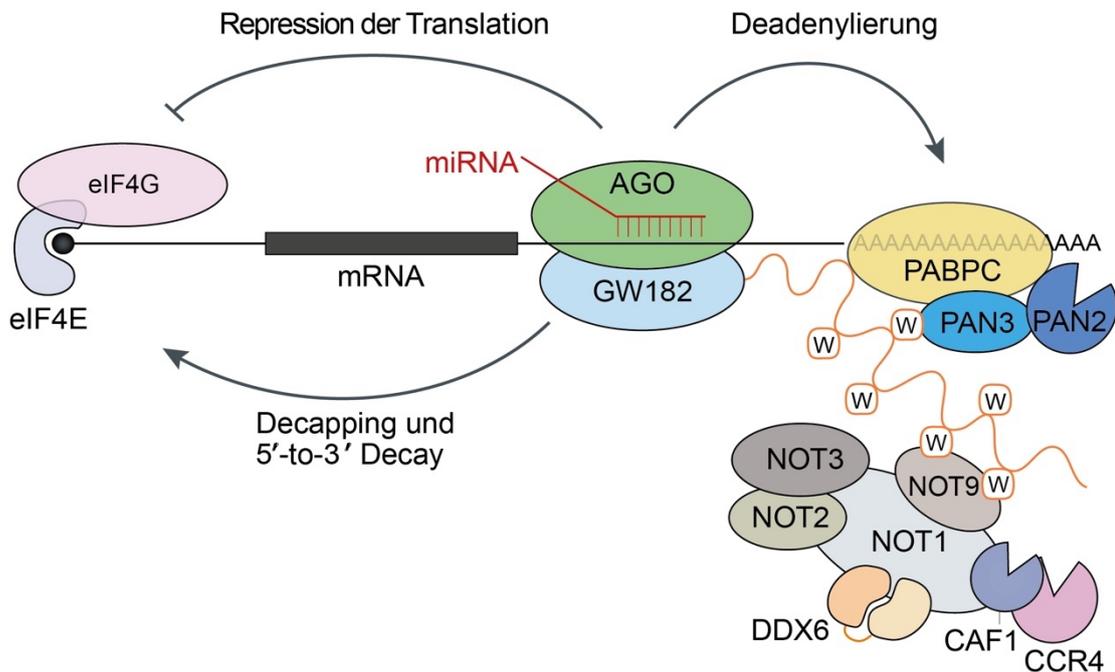


Abbildung 7: Überblick der miRNA-vermittelten Repression von Zielgenen.

Schematische Darstellung der beteiligten Proteine und Mechanismen beim miRNA-vermittelten Gen-Silencing. RISC kann direkt die Ziel mRNA mittels endonukleolytischer Spaltung durch AGO2 degradieren oder als Plattform für die Rekrutierung weiterer Adapterproteine wie GW182 dienen. Diese sind in der Lage, die Deadenylierung des Poly (A)-Schwanzes mit nachfolgendem exonukleolytischem Abbau zu induzieren und eine effiziente Translation zu hemmen. Genaue Beschreibung siehe Text.

Abseits der indirekten Effekte auf die Proteinsynthese über die Deadenylierung können miRNAs die Translation auch direkt hemmen. Da miRNAs sich gemeinsam mit aktiv translatierenden Poly-Ribosomen (Polysomen) in Saccharosegradienten ablagern, schlugen frühere Studien ein Modell vor, in dem miRNAs nach Einleitung der Translation wirken [129]. Experimente mit viralen internen Ribosomeneintrittsstellen (IRES) unterstützen diese These der miRNA-vermittelten Repression ohne Einleitung einer eukaryotischen Translation, was auf eine Funktion nach dem Zusammenbau von 80S-Ribosomen hindeutet. Entgegen dieser Ansicht konnte eine Reihe von Veröffentlichungen mit zellulären und *in vitro* Modellen zeigen, dass miRNAs den Initiationschritt der mRNA Translation hemmen [130-132]. Inwieweit miRNAs durch die Verringerung der Transkriptlevel oder durch die Hemmung der Translation wirken, bleibt eine offene Frage. Quantitative Proteomik, zusammen mit Transkriptomanalysen

mittels Mikroarrays konnten zeigen, dass die Mehrheit der Gene mit reduzierter Proteinexpression auch reduzierte mRNA Level aufweist [82, 83]. Globale *ribosom-profiling* Analysen lieferten weitere Einblicke [133]. Hier konnte gezeigt werden, dass ein Großteil ($\geq 84\%$) der verringerten Proteinproduktion, hervorgerufen durch miRNAs, in HeLa-Zellen (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) auf einer Verringerung der mRNA-Level beruhen, und dass die Destabilisierung der Ziel-mRNAs der vorwiegende Grund für einen verringerten Protein *Output* ist. Weiterhin zeigte das Ribosomenprofil in Zebrafischembryonen, dass die miR-430, die während des maternal-zygotischen Übergangs exprimiert wird, zunächst die Translation reguliert, bevor der Mechanismus der mRNA-Degradierung eintritt [134]. Die vereinfachte Ansicht, dass ein Mechanismus den anderen dominiert, ist daher fraglich. Es ist vielmehr anzunehmen, dass die verschiedenen Mechanismen der Genregulation durch miRNAs abhängig vom zellulären Kontext und sogar zwischen verschiedenen miRNAs- und mRNA-Spezies variieren [82].

1.3.3 miRNAs: essentielle Regulatoren der Neurogenese

Die Initiierung eines spezifischen Genexpressionsprogramms ist essentiell für die Neurogenese in Vertebraten. Abgesehen von den verschiedenen, in Kapitel 1.2 beschriebenen, Mechanismen zur Regulation der Genexpression stützen eine ganze Reihe an Daten die Vorstellung, dass miRNAs eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Nervensystems und während der Neurogenese spielen. Frühe Expressionsanalysen zeigten ein räumlich-zeitliches und zellspezifisches miRNA Expressionsmuster im Gehirn und implizieren Funktionen dieser kleinen nicht kodierenden RNAs im ZNS [135-138]. Die Expression von einigen miRNAs, wie miR-9, miR-124a, miR-124b und miR-135 ist Gehirn-spezifisch. Andere miRNAs wie let-7, miR-9*, miR-125a, miR-125b und miR-128 sind im Gehirn angereichert. Um zu untersuchen, welche Rolle miRNAs während der embryonalen Entwicklung spielen, konzentrierten sich frühe Studien auf die globale Deletion von miRNAs über Schlüsselkomponenten der miRNA-Biogenese. Der *knockout* von Dicer im Zebrafisch führte zur Bildung eines defekten Neuralrohrs, und infolgedessen zu einer verringerten Ventrikelgröße und zum Verlust der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze [139]. Diese Studie lieferte den ersten *in vivo* Beweis dafür, dass miRNAs entscheidend für die Gehirnentwicklung sind. Die globale Deletion von miRNAs in Mäusen, über eine Mutation in *Ago2* oder *Dicer1*, führte zur embryonalen Letalität in der frühen Entwicklung [98, 140]. Weitere Erkenntnisse wurden durch

Studien erzielt, in denen die Dicer-Aktivität in bestimmten neuronalen Zelltypen konditionell inhibiert wurde. Dies führte zu verschiedenen Defekten in der neuronalen Entwicklung, wie zu einer erhöhten kortikalen Apoptose, einer Verringerung der Kortexgröße, vergrößerter lateraler Ventrikel, einer ausgeprägten Astrogliose, veränderter dendritischer Reifung, kleinerer Nervenzellen und postnataler Letalität [141-144]. Diese *loss-of-function* Studien zeigen die Bedeutung von miRNAs für eine normale neuronale Entwicklung.

Zwei miRNAs, die eine entscheidende Rolle während der Neurogenese spielen, sind die miR-124 und die miR-9. Die miR-124 ist sowohl in Vertebraten als auch nicht-Vertebraten die am häufigsten vorkommende miRNA im embryonalen und adulten ZNS [135]. Das zeitliche Expressionsmuster der miR-124 legt nahe, dass sie eine wichtige Funktion während der neuronalen Entwicklung hat [145, 146]. Die Überexpression der miR-124 in kultivierten nicht neuronalen Zellen erhöhte die Expression von neuronalen Genen und inhibierte nicht neuronale Gene [147, 148]. Diese Genregulation durch die miR-124 ist während der frühen embryonalen Neurogenese erforderlich, um sicherzustellen, dass die Differenzierung zum richtigen Zeitpunkt erfolgt und die entsprechend benötigte Anzahl von Neuronen generiert wird. *Gain-* und *loss-of-function* Studien legen nahe, dass die miR-124 das Fortschreiten der neuronalen Differenzierung reguliert, indem sie die Expression von *Sox9* unterdrückt [149]. SOX9 ist ein Transkriptionsfaktor, der den multipotenten Zustand von NSCs (engl.: *neural stem cells*, neurale Stammzellen) aufrechterhält und die neuronale Differenzierung hemmen kann. Weiterhin wird die miR-124 Transkription durch den REST-Komplex reprimiert. Interessant in diesem Kontext ist, dass die miR-124 selbst die REST-Komplexkomponenten der CTDSP Familie reprimieren kann und dabei eine selbstverstärkende regulatorische Schleife mit REST bildet [74]. Auch die miR-9 ist an dieser Regulation beteiligt, da sie auch transkriptionell durch REST inhibiert wird und direkt die Transkription von REST und seinem Ko-Repressor CoREST inhibieren kann [75]. Dies weist auf eine potentielle funktionale Überschneidung dieser beiden miRNAs hin. Eine zusätzliche Rückkopplungsschleife basiert auf der miR-9 und dem Transkriptionsfaktor TLX. Bekannt als wesentlicher Regulator der Proliferation neuronaler Stammzellen bzw. NPCs [150], wird TLX durch die miR-9 bei der neuronalen Differenzierung gehemmt. TLX wiederum ist in der Lage, die miR-9 in NPCs transkriptionell zu unterdrücken, wodurch eine weitere sich selbst verstärkende Rückkopplungsschleife gebildet wird [151]. Aufgrund der vielen verschiedenen Aspekte,

welche die miR-124 und die miR-9 kontrollieren, können sie als post-transkriptionelle Master-Regulatoren der neuronalen Differenzierung bezeichnet werden. Dies wird weiter durch die Tatsache untermauert, dass alleine durch die Ko-Expression dieser beiden miRNAs somatischen Zellen (humane Fibroblasten) zu funktionellen Neuronen umprogrammiert werden können [152, 153].

1.4 Die miR-26 Familie

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, können miRNAs bezüglich ihrer genomischen Lokalisation klassifiziert werden und sind entweder in unabhängigen miRNA-Genen oder in Introns von Protein-kodierenden Genen kodiert. Die miR-26 Familie ist Teil der zweiten miRNA Klasse, der intronischen miRNAs [154] (siehe auch Appendix **Abb. 30**). Die miR-26 Familie ist in Vertebraten konserviert und besteht aus den primären Transkripten miR-26a1, miR-26a2 und miR-26b, welche in Introns ihrer Wirtsgene (*Ctdsp1,2,l*) auf Chromosomen 3, 12 und 2 lokalisiert sind. Die reifen miRNAs (*guide-Strang*), die aus der pri-miR-26a1 und pri-miR-26a2 entstehen, besitzen identische Sequenzen und werden als miR-26a zusammengefasst. Die pri-miR-26b wird prozessiert zur maturen miR-26b. Des Weiteren besitzen die maturen miR-26a und miR-26b eine identische Seed Sequenz (siehe Appendix **Abb. 30**), die wichtig für die Bindung mit der Ziel-mRNA ist. Monteys und Kollegen haben in einer großen bioinformatischen Studie gezeigt, dass die humanen miR-26a1, miR-26a2 und miR-26b keine eigene Promotorsequenz besitzen [86]. Weiterhin werden die miR-26 Familienmitglieder zusammen mit ihren Wirtsgenen (*Ctdsp1,2,l*) als ein Transkript koexprimiert [154-156]. Das Expressionsmuster der miR-26 Familie wurde bisher nicht im Detail analysiert, es gibt jedoch einzelne Studien, welche die Expression in verschiedenen Zellen und Geweben in verschiedenen Spezies untersucht haben. Wie ein Großteil der miRNAs wird die miR-26a und die miR-26b nicht in humanen und murinen ESCs exprimiert [88, 157], sie werden aber während verschiedener Differenzierungsprozesse hochreguliert. Es konnte in Maus und Mensch-ESC-basierten neuronalen Differenzierungssystemen durch miRNA Screenings gezeigt werden, dass die miR-26a, in neuronalen Zellen nach dem NPC-Stadium hochreguliert wird [145, 158]. In Gehirnen von Mäusen am embryonalen Tag E12 bis zum postnatalen Stadium P14 konnte eine konstante Akkumulation der miR-26 detektiert werden, mit einer Erhöhung der Expression von E12 bis E15 [159]. Ferner wurde im Zebrafisch gezeigt, dass die Expression der miR-26a und miR-26b erst ab dem

Beginn der Neurogenese (24 Std. nach der Befruchtung) startet [137, 160, 161]. In adulten Zebrafischen konnte über die Visualisierung der miR-26a und miR-26b durch *in situ* Hybridisierungen gezeigt werden, dass die miR-26a und miR-26b ubiquitär exprimiert sind, mit einer höheren Expression im Kopf, Rückenmark und in Neuromastzellen [137]. In der adulten Maus ist die miR-26 ubiquitär exprimiert, mit neuraler Anreicherung der miR-26a im Cerebellum und im Hippocampus [135, 155] und einer Anreicherungen der miR-26b im Kortex, im Cerebellum und in der Leber [135]. In erwachsenen Menschen ist die miR-26b ubiquitär im gesamten Gehirn exprimiert, mit höherer Anreicherung im Rückenmark und Cerebellum [162]. Eine Gewebe-spezifische Analyse der miR-26 Expression im Menschen (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas>, [162]) zeigt, dass die höchste Expression der miR-26a und miR-26b in Haut, Gehirn, Muskel, Nerven, Rückenmark und Knochen zu finden ist (Appendix **Abb. 31**). In einer Gewebe- und Zelltyp-spezifischen Analyse der murinen miR-26a und miR-26b (Fantom5 Mouse microRNA Expression Atlas: <http://fantom.gsc.riken.jp>, [163]) zeigte sich die höchste Expression in glatten Muskelzellen und im Cerebellum, aber auch für die miR-26 in B- und T-Lymphozyten, im Vergleich zu der niedrigsten Expression in ESCs (Appendix **Abb. 32**). Ein *knockdown* der miR-26b im Zebrafisch führte zu einer stark reduzierten Anzahl an gebildeten sekundären Motorneurone im Rückenmark, aber hatte keinen Effekt auf neurale Vorläuferzellen [160]. Andere Studien zeigten erste Hinweise für eine neurogene Rolle der miR-26 speziell beim Neuritenwachstum [164], der axonalen Regeneration [165] und der Aufrechterhaltung der Langzeitpotenzierung [166].

Zusammengenommen zeigen die Daten aus der Literatur, dass die miR-26 Familie vorwiegend in neuronalem Gewebe und neuronalen Zellen exprimiert ist und während der neuronalen Differenzierung hochreguliert ist. In diesem Kontext konnten Dill und Kollegen zeigen, dass die miR-26b Biogenese durch einen noch unbekanntem Mechanismus bis zum Eintritt der Neurogenese im Zebrafisch pausiert wird, da die pre-miR-26b ab der Befruchtung, die mature miR-26b aber erst nach 24 Stunden detektiert werden konnte [160].

Wie die meisten miRNAs hat auch die miR-26 Familie Hunderte von *in silico* prognostizierten Zielgenen (im Maus Genom gibt es 840 Transkripte mit 953 vorhergesagte, konservierte Zielstellen für die miR-26a und miR-26b, basierend auf der TargetScan Datenbank, Version 7.2). Bisher wurden jedoch nur wenige dieser prognostizierten Zielgene experimentell validiert.

Ein großer Teil der bisher validierten miR-26 Zielgene lassen sich grob in 2 Klassen einteilen, Onkogene bzw. negative Regulatoren der Zelldifferenzierung und Tumorsuppressorgene bzw. positive Regulatoren der Zelldifferenzierung. Die erste Klasse umfasst Gene wie das Polycomb-Protein *Ezh2* [167-170], die Cycline D2, D3 und E2 [168, 171, 172], die Cyclooxygenase-2 (*Cox2*) [173], der Lymphoid Enhancer Factor 1 (*Lef1*) [174], der Östrogen Rezeptor 1 (*Esr1*) [175] oder der Ephrin type-A Tyrosin-Kinase Rezeptor 2 (*Epha2*) [176]. Ein weiterer positiver Regulator der Zelldifferenzierung, der Teil des REST Komplexes ist, validiertes Zielgen und gleichzeitig Wirtsgen der miR-26a2, ist *Ctdsp2*. REST rekrutiert Mitglieder der CTDSP Familie zu neuronalen Genen, wodurch diese Gene in nicht-neuronalen Zellen reprimiert werden [72] (siehe auch Kapitel 1.1.2). CTDSPs spielen auch eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus. So konnte gezeigt werden, dass CTDSP2 die Proliferation von neuronalen Vorläufern im Kortex der Maus verstärkt [177], und dass die CTDSP Familie in verschiedenen Zelllinien die Zellzyklus Progression regulieren kann [178, 179]. Beispiele für Tumorsuppressorgene sind das Phosphatase- und Tensin-Homolog (*Pten*) [180, 181], Mitglieder der *Smad*-Familie (*Smad1* und *Smad4*) [182-184], das Ringfingerprotein 6 (RNF6) [185] oder die teilweise als Tumorsuppressor agierende Glykogensynthase-Kinase 3 (*Gsk3 β*) [165, 186, 187]. Diese validierten Targetgene der miR-26 Familie und die Ergebnisse aus diesen Studien lassen darauf schließen, dass diese miRNA Familie eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellzyklus bzw. der Zellproliferation und dadurch auch bei der Differenzierung spielt.

1.5 Zielsetzung und experimentelle Strategie

MicroRNAs haben hochspezifische Expressionsmuster und grundlegende Funktionen in der neuronalen Entwicklung von Säugetieren (für einen Überblick siehe [188-191]). In früheren Studien wurde gezeigt, dass die miR-26 Familie, bestehend aus pri-miR-26a1, -miR-26a2 und -miR-26b, die zu reifen miR-26a und miR-26b prozessiert werden, vermehrt in neuronalen Geweben und Zelllinien exprimiert ist. Das Expressionsmuster und die experimentell validierten Zielgene der miR-26 Familie lassen auf eine Rolle in der neuronalen Entwicklung schließen. In Übereinstimmung mit einer Funktion der miR-26 Familie bei der Neurogenese führte der miR-26b *knockdown* in Zebrafischembryonen zu einer verringerten Anzahl differenzierter spinaler Motorneurone. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung der pre-miR-26b bis zum Start der Neurogenese im Zebrafisch blockiert wird [160, 192]. Jedoch ist bisher nur wenig über die Funktionen der einzelnen miR-26 Familienmitglieder während der Differenzierung zu neuronalen Zelltypen aus Vorläuferzellen von höheren Wirbeltieren bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktionen der miR-26 Familie während der murinen Neurogenese zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden murine, pluripotente ESCs in einem neuronalen Differenzierungssystem eingesetzt, welches hinsichtlich Zellmorphologiekriterien und Expressionsprofilen etablierter zellulärer und molekularer Marker, als ein geeignetes Modellsystem für die Neurogenese in einem sich entwickelnden Organismus gilt [193-195]. Um einen besseren Einblick in die spezifischen Funktionen der miR-26 Familie und deren Einfluss auf die Neurogenese zu gewinnen, wurden in dieser Studie folgende experimentelle Ansätze durchgeführt:

- Etablierung eines murinen ESC-basierten neuronalen Differenzierungssystems.
- Analyse des Expressionsmusters der miR-26 Familie und ihrer Wirtsgene (*Ctdspl1,2,l*) während der neuronalen Differenzierung muriner ESCs und während der embryonalen Entwicklung im Mausgehirn.
- Herstellung verschiedener miR-26 *knockout* ES-Zelllinien, durch die Deletion einzelner Mitglieder und der kompletten miR-26 Familie mittels der CRISPR/Cas9 Technologie.
- Analyse des zellulären und molekularen Phänotyps während der neuronalen Differenzierung der miR-26-KO ES-Zelllinien.

- Globale Analyse von Genexpressionsänderungen (mRNA und miRNA) in neural differenzierenden miR-26-KO Zellkulturen mittels RNA-Seq Analysen.
- Charakterisierung eines molekularen Wirkmechanismus, durch den die Mitglieder der miR-26 Familie Einfluss auf das neuronale Genexpressionsprogramm und auf die neuronale Entwicklung nehmen.

Die aus dieser Arbeit gewonnenen Daten zielen darauf ab, einen tieferen Einblick in die Funktionsweise der miR-26 Familie während der Neurogenese und weitere Einblicke in die molekularen Mechanismen während der Entwicklung von pluripotenten embryonalen Stammzellen bis hin zu funktionellen postmitotischen Neuronen zu erhalten.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Stamm	Genetischer Background	Genotyp	Herkunft
R1 wt	129/Sv X 129/Sv	Wildtyp	AG Müller, Würzburg
CCC3 #32, #48	129/Sv X 129/Sv	miR-26b Deletion	In dieser Arbeit hergestellt
CCC9A #7, #35	129/Sv X 129/Sv	miR-26a1 + miR-26a2 Deletion	In dieser Arbeit hergestellt
CCC9B #22, #55	129/Sv X 129/Sv	miR-26a1 + miR-26a2 + miR-26b Deletion	In dieser Arbeit hergestellt
HEK293T	humane embryonale Nierenzellen	-	ATCC
MEF	Isoliert aus E14.5 Mausembryonen	-	Eigene Herstellung

2.1.2 Zellkultur-Medien für die neuronale Differenzierung

Reagenz	Volumen	Konz.	Cat. No.	Hersteller
ESC Medium				
DMEM High Glucose	500 ml	-	D-5796	Sigma
FCS (getestet für ESCs)	93,75 ml	15 %	-	Bio & Sell
L-Glutamat	6,25 ml	2 mM	G-7513	Sigma
Penicillin /Streptomycin	6,25 ml	10000 U/ml /10 mg/ml	P-4333	Sigma
Lif konditioniertes Medium	1,2 ml	-	-	Eigene Herstellung
Nicht essentielle Aminosäuren	6,25 ml	1 x	M-7145	Sigma
Natrium-Pyruvat	6,25 ml	1 mM	S8636	Sigma
β-Mercaptoethanol (14,3 M)	6,25 ml	0,1 mM	M-3148	Sigma
(7μL β-Merc. in 10ml Hepes)	(filtering)	10 mM	83264	Sigma

EB Medium				
DMEM High Glucose	500 ml	-	D-5796	Sigma
FCS	58,8 ml	10 %	-	Bio & Sell
L-Glutamat	5,88 ml	2 mM	G-7513	Sigma
Penicillin /Streptomycin	5,88 ml	10000 U/ml /10 mg/ml	P-4333	Sigma
Nicht essentielle Aminosäuren	5,88 ml	1 x	M-7145	Sigma
Natrium-Pyruvat	5,88 ml	1 mM	S8636	Sigma
β-Mercaptoethanol (14,3 M) (7µL β-Merc. in 10ml Hepes)	5,88 ml	0,1 mM 10 mM	M-3148 83264	Sigma Sigma
ITS-Medium				
DMEM/Ham's F12	500 ml	-	D-8437	Sigma
L-Glutamat	5 ml	2 mM	G-7513	Sigma
Penicillin /Streptomycin	5 ml	10000 U/ml /10 mg/ml	P-4333	Sigma
Insulin	0,5 ml	5 µg/ml	I-6634	Sigma
Transferrin	2,5 ml	50 µg/ml	T1147	Sigma
Natrium-Selenit	50 µl	30 nM	S-5261	Sigma
N2 Medium				
DMEM/Ham's F12	250 ml	-	D-8437	Sigma
L-Glutamat	2,5 ml	2 mM	G-7513	Sigma
Penicillin /Streptomycin	2,5 ml	10000 U/ml /10 mg/ml	P-4333	Sigma
Insulin	1,25 ml	25 µg/ml	I-6634	Sigma
Transferrin	1,25 ml	50 µg/ml	T1147	Sigma
Sodium selenite	25 µl	30 nM	S-5261	Sigma
Putrescin	250 µl	100 nM	P-5261	Sigma
Progesteron	250 µl	20 nM	P-8783	Sigma
BSA	1,25 ml	50 µg/ml	A-9418	Sigma

Neurobasalmedium				
Neurobasalmedium	250 ml	-	21103-049	Gibco
L-Glutamat	2,5 ml	2 mM	G-7513	Sigma
Penicillin /Streptomycin	2,5 ml	10000 U/ml /10 mg/ml	P-4333	Sigma
B27 supplement	5 ml	1×	17504001	Thermo Fisher

2.1.3 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
E. Coli DH5 α	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r $_{k}^{-}$, m $_{k}^{+}$) phoA supE44 λ^{-} thi-1 gyrA96 relA1 λ^{-}	Invitrogen
E. Coli Stb13	F-mcrB mrrhsdS20(r $_{B}^{-}$, m $_{B}^{-}$) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str R) xyl-5 λ^{-} leumtl-1	Thermo Scientific

2.1.4 Bakterienkultur Medien

Medium	Rezept
Luria broth (LB)	1,0% (w/v) Trypton (10 g/l), 1,0% (w/v) NaCl (10 g/l), 0,5% (w/v) Hefeextrakt (5 g/l)
Super Optimal Broth (SOB)	0,5 % (w/v) Hefeextrakt (5 g/l), 2 % (w/v) Trypton (20 g/l), 10 mM NaCl (0,6 g/l), 2,5 mM KCl (0,2 g/l), 10 mM MgCl, 10 mM MgSO $_4$
SOC	SOB Medium + 20 mM Glukose

Selektionsmedien für Bakterienkulturen für Plasmid-Präparationen wurden durch die Zugabe von Antibiotika (100 μ g/ml Ampicillin) zu den Bakterienkultur-Medien hergestellt. Die Herstellung von Agarplatten erfolgte durch Zugabe von 2% (w/v) Agar zum LB Medium. Nach dem Autoklavieren wurde die Agar / LB Medium auf 45 °C im Wasserbad abgekühlt, Antibiotika wurden zugegeben und das Medium wurde in Petrischalen gegossen.

2.1.5 Reagenzien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien wurden von Merck, BD Biosciences, Sigma-Aldrich, Thermo Scientific und Roth erworben. Verbrauchsmaterialien und Zellkulturplastik wurden über Hartenstein, Macherey-Nagel, Eppendorf, Sarstedt, Satorius stedim und Greiner bezogen. Wasser wurde einer TKA-Reinstwasseraufbereitungsanlage entnommen und wird im folgenden H₂O dest. genannt.

2.1.6 Puffer und Lösungen

Lösung	Rezept
6X DNA Ladepuffer	30% (v/v) Glycerol, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylene cyanol
10X Tris/Borat/EDTA (TBE)	89mM Tris-HCl pH 8.3, 89mM Borsäure, 2mM Na ₂ EDTA
10X Tris/Acetic acid/EDTA (TAE)	89mM Tris-HCl, 2mM Na ₂ EDTA, mit Essigsäure auf pH 8.0
10X Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	1,4M NaCl, 27mM KCl, 100mM Na ₂ HPO ₄ , 18mM KH ₂ PO ₄
10X Lämmli	125mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% (v/v) Glycerol, 4% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 5% (w/v) β-Mercaptoethanol
Stripping-Lösung	0,2N NaOH
WB-Trenngel	10-14% Acrylamid, 375mM Tris, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,05% TEMED, H ₂ O dest.
WB-Sammelgel	4,5% Acrylamid, 125mM Tris, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,05% TEMED, H ₂ O dest.
Proteinase K Resuspensionspuffer	25mM Tris-HCl pH 8, 10mM CaCl ₂ , 50% Glycerol
FACS Puffer	1× PBS, 0,3% BSA, pH 7.4
Tris/EDTA/NaCl/SDS (TENS)	10 mM Tris-HCl, pH 8,01 mM EDTA, pH 8.0, 0,1 N NaOH, 0,5% SDS
10 ml Antikörperlösung (in PBS)	2% Ziegenserum, 1% Rinderserumalbumin (BSA), 0,1% TritonX-100, 0,05% Tween20
1:5 PORN Lösung	0,5mg/mL Poly-DL-Ornithin (P8638, Sigma-Aldrich) in Boratpuffer (150mM, pH 8.3 mit NaOH)

Mikrotubuli-Stabilisierungs-Puffer (MSP)	80mM PIPES, pH 6.8, 1mM MgCl ₂ , 5mM EGTA, 0,5% TritonX-100
TBF1 Puffer	100mM RbCl, 30mM KAc, 50mM MnCl ₂ , 10mM CaCl ₂ , 15% (v/v) Glycerin, pH 5.
TBF2 Puffer	10mM Na-MOPS, pH 7, 75mM CaCl, 10mM KaCl, 15% (v/v) Glycerin pH 7
Oligo Annealing Puffer	10mM Tris pH7.5, 50mM NaCl, 1mM EDTA

2.1.7 Antikörper

Antikörper und Spezies	Verdünnung	Katalog Nr.	Hersteller
Erstantikörper für Immunfärbungen			
Sox2 rb	IF, 1:500	ab97959	Abcam
Tau5 ms	IF, 1:1000	ab80579	Abcam
Map2 rb	IF, 1:1000	ab32454	Abcam
Gfap rb	IF, 1:1000	ab7260	Abcam
Tubb3	IF, 1:2000	MAB1195	R&D Systems
Nestin ms	IF, 1:1000	556309	Pharmigen
Msi1 rb	IF, 1:2000	ab52865	Abcam
Zweitantikörper für Immunfärbungen			
anti-Mouse Cy3 gt	IF, 1:200	AP130C	Merck
anti-Rabbit Cy2 gt	IF, 1:200	AP132J	Merck
anti-Rat Cy2t gt	IF, 1:200	AP202J	Chemicon
Antikörper für Western Plots			
Rest rb	WB, 1:500	ab21635	Abcam
CoRest rb	WB, 1:1000	Ab32631	Abcam
Ctdsp2 rb	WB, 1:1000	PA5-21624	Invitrogen
Sin3a rb	WB, 1:2000	PA1-870	Invitrogen
Gapdh ms	WB, 1:500	MAB374	Merck
anti-rabbit HRP gt	WB, 1:2000	32460	Thermo Scientific
Anti-mouse HRP gt	WB, 1:1000	32430	Thermo Scientific

2.1.8 Synthetische miRNA mimics

miRNA	Katalog Nr.	Hersteller
Cel-MiR-67-3p	CN-001000-01-05	Dharmacon
mmu-MiR-26a-5p	C-310519-07-0002	Dharmacon
mmu- miR-26b-5p	C-310520-07-0002	Dharmacon
mmu-miR-124-3p	C-310391-05-0002	Dharmacon
mmu-miR-9-5p	C-310402-07-0005	Dharmacon

2.1.9 Plasmide

Plasmid	Antibiotika-Resistenz	Herkunft
pX335-U6- Chimeric_BB-CBh- hSpCas9n(D10A)	Ampicillin, Puromycin	Addgene, ID: #42335
pUC19	Ampicillin	Addgene, ID: #50005

2.1.10 Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific (K1622)
2x Absolute SybrGreen Mix	Thermo Scientific (AB1159)
PeqGold RNAPure	PeqLab (732-3312)
PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Scientific (K210007)
PE AnnexinV Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences (559763)
miRScript II RT Kit	Qiagen (218161)
miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen (218073)
SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (A9281)
Mouse ES Cell Nucleofector Kit	Lonza (VAPH-1001)

2.1.11 Enzyme, Antibiotika, Reagenzien zur Oberflächenbeschichtung

Reagenz	Hersteller
DNaseI	Fermentas
RNase	Fermentas
Reverse Transkriptase M-MLV	Invitrogen
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich
Super Taq Polymerase	HT Biotechnology
OneTaq DNA Polymerase	NEB
Restriktionsenzyme	NEB/Fermentas
T4 DNA Ligase	NEB
Puromycin	Thermo Scientific
Ampicillin	Thermo Scientific
Kanamycin	Thermo Scientific
Poly-DL-Ornithin	Sigma-Aldrich
Laminin	Sigma-Aldrich
Fibronectin	Sigma-Aldrich

2.1.12 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei Eurofins MWG Operon als Standard-Aufreinigung entsalzt erworben.

Name	Sequence (5' → 3')
Primer qRT-PCR zur Quantifizierung von mRNA	
<i>Ctdsp1 F</i>	CCCAGTCCAGTACCTGCTTC
<i>Ctdsp1 R</i>	CATCTATCTCCACCGGGATG
<i>Ctdsp2 F</i>	GGAAGGGACCTGAGGAAAAC
<i>Ctdsp2 R</i>	CCTCGAAGACTGGAATCAGG
<i>CtdspL F</i>	GTTGAAATCGACGGAACCAT
<i>CtdspL R</i>	GCCAAGCTGGCAGTAAAGAG
<i>Gapdh F</i>	TGGAGAAACCTGCCAAGTATG
<i>Gapdh R</i>	TCATACCAGGAAATGAGCTTGA
<i>Msi1 F</i>	TAAAGTGCTGGCGCAATCG
<i>Msi1 R</i>	TCTTCGTCCGAGTGACCATCT
<i>Nanog F</i>	TCTTCCTGGTCCCCACAG TTT
<i>Nanog R</i>	GCAAGAATAGTTCTCGGGATGAA

<i>Ncam1 F</i>	ACCACCGTCACCACTAACTCT
<i>Ncam1 R</i>	TGGGGCAATACTGGAGGTCA
<i>Neurod1 F</i>	ATGACCAAATCATAACAGCGAGAG
<i>Neurod1 R</i>	CCAGCGACACTGAGTCCTG
<i>Neurog1 F</i>	CCAGCGACACTGAGTCCTG
<i>Neurog1 R</i>	CGGGCCATAGGTGAAGTCTT
<i>Oct3/4 F</i>	CCGTGAAGTTGGAGAAGGTG
<i>Oct3/4 R</i>	GAAGCGACAGATGGTGGTCT
<i>p16^{Ink4A} F</i>	GTACCCCGATTTCAGGTGATG
<i>p16^{Ink4A} R</i>	GGAGAAGGTAGTGGGGTCCT
<i>p19^{ARF} F</i>	GCTCTGGCTTTCGTGAACAT
<i>p19^{ARF} R</i>	CGAATCTGCACCGTAGTTGA
<i>p21^{Cip} F</i>	ACATCTCAGGGCCGAAAAC
<i>p21^{Cip} R</i>	GGCACTTCAGGGTTTTCTCTT
<i>P53 F</i>	GTCACAGCACATGACGGAGG
<i>P53 R</i>	TCTTCCAGATACTCGGGATAC
<i>Pax6 F</i>	TACCAGTGTCTACCAGCCAAT
<i>Pax6 R</i>	TGCACGAGTATGAGGAGGTCT
<i>Rex1 F</i>	GGCCAGTCCAGAATACCAGA
<i>Rex1 R</i>	GAACTCGCTTCCAGAACCTG
<i>Rpl4 F</i>	TTGGGTTGTATTCCTCTGCG
<i>Rpl4 R</i>	CAGACCAGTGCTGAGTCTTGG
<i>Sox2 F</i>	GCGGAGTGGAACCTTTTGTCC
<i>Sox2 R</i>	CGGGAAGCGTGTACTTATCCTT
<i>Tubb3 F</i>	TTCTGGTGGACTTGGAACCT
<i>Tubb3 R</i>	CGCACGACATCTAGGACTGA

Primer Endpunkt-PCR zur Genotypisierung der miR-26-KOs

miR-26b del F	GTCTTGTGCAGCCCTCTTTC
miR-26b del R	GCTTAGGGGTGATCCACAAA
miR-26a1 del F	GCGCTGGTTGTTGTGTCTAA
miR-26a1 del R	CAGTGAGAGAAGCCCTGGAG
miR-26a2 del F	CATAGACTGGGTGGCGAGTT
miR-26a2 del R	GTTTTCTCAGGTCCCTTCC

2.1.12.1 Primer qRT-PCR zur Quantifizierung von miRNAs

Name	Katalog Nr.	Hersteller
snRNA U6	MS00033740	Qiagen
mmu-pre-miR-26a1	MP00005243	Qiagen
mmu-pre-miR-26a2	MP00005250	Qiagen
mmu-pre-miR-26b	MP00005257	Qiagen

mmu-miR-26a-5p	MS00032613	Qiagen
mmu-miR-26b	MS00001344	Qiagen
mmu-miR-9-5p	MS00012873	Qiagen
mmu-miR-124-3p	MS00029211	Qiagen
mmu-miR-218-3p	MS00006118	Qiagen
mmu-miR-132-3p	MS00001561	Qiagen
mmu-miR-135a-5p	MS00011130	Qiagen

2.1.12.2 Zielsequenzen und Oligonukleotide zum Klonieren der sgRNA

Name	sgRNA Sequenz (5' – 3'), PAM Sequenz unterstrichen
<i>miR-26b 5'A Target</i> <i>miR26b 5'A F</i> <i>miR26b 5'A R</i>	<u>GAATTACTTGA</u>ACTGGGT<u>CCCCGG</u> CACCGAATTACTTGA <u>ACTGGGTCC</u> AAACGGACCCAGTTCAAGTAATTC
<i>miR-26b 3'B Target</i> <i>miR26b 3'B F</i> <i>miR26b 3'B R</i>	<u>TTCTCCATTACTTGGCTCGGGG</u> CACCGTTCTCCATTACTTGGCTCGG AAACCCGAGCCAAGTAATGGAGAAC
<i>miR-26a1 5'A Target</i> <i>miR26a1 5'A F</i> <i>miR26a1 5'A R</i>	<u>CTGCACTCCGGACGTGCTTGTGG</u> CACCGCTGCACTCCGGACGTGCTTG AAACCAAGCACGTCCGGAGTGCAGC
<i>miR-26a1 5'B Target</i> <i>miR26a1 5'B F</i> <i>miR26a1 5'B R</i>	<u>TCTTTGGCAGTAGACACCCCGGG</u> CACCGTCTTTGGCAGTAGACACCCC AAACGGGGTGTCTACTGCCAAAGAC
<i>miR-26a1 3'A Target</i> <i>miR26a1 3'A F</i> <i>miR26a1 3'A R</i>	<u>CAAGCTTGGCTACAGGCAAAGGG</u> CACCGCAAGCTTGGCTACAGGCAAAA AAACTTTGCCTGTAGCCAAGCTTGC
<i>miR-26a1 3'B Target</i> <i>miR26a1 3'B F</i> <i>miR26a1 3'B R</i>	<u>TCCCGGAGACTCAGGACCGGAGG</u> CACCGTCCCGGAGACTCAGGACCGG AAACCCGGTCTGAGTCTCCGGGAC
<i>miR-26a2 5'A Target</i> <i>miR-26a2 5'A F</i> <i>miR-26a2 5'A R</i>	<u>CGGCTTGTGTAGGTCCCATCTGG</u> CACCGCGGCTTGTGTAGGTCCCATC AAACGATGGGACCTACACAAGCCGC
<i>miR-26a2 5'B Target</i> <i>miR-26a2 5'B F</i> <i>miR-26a2 5'B R</i>	<u>CTGCTGGAATCCCGTACAGAAGG</u> CACCGCTGCTGGAATCCCGTACAGA AAACTCTGTACGGGATTCCAGCAGC
<i>miR-26a2 3'A Target</i> <i>miR-26a2 3'A F</i> <i>miR-26a2 3'A R</i>	<u>TGGACGGACACAGCCTATCCTGG</u> CACCGTGGACGGACACAGCCTATCC AAACGGATAGGCTGTGTCCGTCCAC

miR-26a2 3'B Target
miR-26a2 3'B F
miR-26a2 5'B R

TCTTGATTACTTGTTTCTGGAGG
CACCGTCTTGATTACTTGTTTCTGG
AAACCCAGAAACAAGTAATCAAGAC

2.1.13 Geräte

Gerät	Verwendung	Hersteller
FACS Canto I	FACS Analyse	BD
Light Cycler 480 II	qRT-PCR Analyse	Roche
Cell culture microscope EVOS	Phasenkontrast Mikroskopie	Life Technologies
Laser scanning microscope (LSM 780)	Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie	Zeiss
Qubit Fluorometer	Photometrische Messung von RNA und DNA	Invitrogen
Chemidoc XRS low light imager	Gel Bildgebung	Biorad
Incubator Heracell 150	Brutschrank Zellkultur	Thermo Scientific
Mastercycler Nexus 2	PCR Cycler	Eppendorf

2.1.14 Software

Software	Verwendung	Hersteller
ImageJ with NeuroJ Plugin	Immunfluoreszenz Bildanalyse	NIH
FlowJo	FACS Datenanalyse	Tree Star, Inc.
FACS DIVA	FACS Datenanalyse	BD
Light Cycler 480 Software	qRT-PCR Analyse	Roche
ModFit LT	Zellzyklus Analyse	Verity software house
geNORM	Housekeeper Test	Biogazelle
Photoshop CC 2017	Bildprozessierung	Adobe
Illustrator CC 2017	Bearbeitung der Abbildungen	Adobe
SnapGene	Klonierungs-Management	GSL Biotech LLC
Integrative genomics viewer	Visualisierung RNA-Seq Daten	Broad Institute
ZEN black software	Mikroskop Software	Zeiss

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zelltypen in dieser Arbeit wurden in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.1.1 Passagieren von Zellen

Zum Passagieren wurden adhären Zellen mit 1× PBS gewaschen und anschließend für 5 min bei 37°C im Brutschrank mit 0,25%igem Trypsin/EDTA inkubiert. Die Trypsin Aktivität wurde anschließend mit frischem FCS-haltigen Medium abgestoppt und die Zellsuspension in Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (90 g, 5 min), das Medium abgenommen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Je nach Verwendung und gewünschter Zellzahl wurde die Zellsuspension mit Medium verdünnt und unter Zelltyp-spezifischen Bedingungen kultiviert.

2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung von Zellen wurden diese wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben gewaschen, trypsiniert und abzentrifugiert. Das Zellpellet, bestehend aus je 1×10⁶ Zellen pro Ansatz, wurde mit 1 ml des Einfriermediums (90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden in einer Gefriereinheit auf -80°C gekühlt. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad aufgewärmt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 2 ml Zelltyp-spezifischem, frischem Medium in 15 ml Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation wurde das DMSO-haltige Medium abgenommen und das Zellpellet wieder in frischem Medium resuspendiert und unter Zelltyp-spezifischen Bedingungen kultiviert.

2.2.1.3 Beschichtung von Zellkulturplastik und Deckgläsern

Für die ESC Kultur wurden Gewebekultur-Schalen (6 cm oder 10 cm) mit 0,1 % Gelatine in 1× PBS für mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert. Für die Kultivierung von NPCs ab Tag 9 der Differenzierung wurden Gewebekulturschalen oder Deckgläser in 24-Well Platten mit Poly-DL-Ornithin und Laminin beschichtet. Die Deckgläser wurden in

100%igen Ethanol gewaschen und auf Whatman Papier getrocknet. Die Oberflächen der Gewebekulturschalen oder Deckgläser wurden über Nacht bei 37°C mit PORN-Lösung (0,1 mg/mL Poly-DL-Ornithin Endkonzentration) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die beschichteten Platten zweimal mit H₂O dest. gewaschen und anschließend mit Laminin (L2020, Sigma-Aldrich) (2 µg/mL in PBS) für mindestens 2 Std. vor dem Ausplattieren der NPCs beschichtet. Die so beschichteten Gewebekulturschalen und Deckgläser wurden nicht länger als 1 Woche verwendet.

2.2.1.4 ESC Kultur

Die R1 ESCs (129 / Sv x 129Sv) wurden auf Gelatine-beschichteten Gewebekulturschalen kultiviert. Das ESC-Medium (siehe Kapitel 2.1.2) wurde täglich gewechselt, die ESCs wurden jeden zweiten Tag gesplittet und in einer Dichte von 12,5 x 10³ Zellen/cm² ausplattiert. Hierfür wurden die ESCs wie in Kapitel 2.2.1.1 passagiert.

2.2.1.5 Neurale Differenzierung von ESCs

Basierend auf dem Protokoll von Bibel und Kollegen [196] und dem Protokoll aus der Veröffentlichung von Wolber und Kollegen [193] wurde in dieser Arbeit ein Maus ESC Differenzierungssystem eingesetzt. Dieses neurale Differenzierungssystem ermöglicht innerhalb von 9 Tagen *ex vivo* die Differenzierung von pluripotenten murinen ESCs zu NPCs. Die NPCs konnten nach weiteren 6 Tagen zu Neuronen und Gliazellen differenziert werden. Dieses Differenzierungssystem bietet hinsichtlich der Zellmorphologie sowie Expressionsprofilen etablierter zellulärer und molekularer Marker ein geeignetes Modell für die Neurogenese in der Maus (Differenzierungsschema siehe **Abb. 8**)

Zur EB Differenzierung wurden 3×10⁶ ESCs in 10 ml EB-Medium auf 10 cm Petrischalen ausplattiert und 5 Tage lang in Suspensionskultur ohne LIF gehalten. Ein Medienwechsel erfolgte an Tag 2 und Tag 4 der Differenzierung. Hierfür wurde die EB Zellsuspension in 50 ml Röhrchen transferiert, die EBs wurden etwa 5 min zum Absinken stehen gelassen, anschließend wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die EBs in frischem Medium resuspendiert. Um die EBs adhären zu lassen, wurden die Suspensionskulturen an Tag 5 auf Gewebekulturschalen übertragen und in serumfreiem neuralen Selektions-Medium (ITS Medium) mit 5 µg/ml Fibronectin und 5 µM Retinsäure kultiviert. Nach 4 Tagen (Tag 9 der Differenzierung) wurden die Zellen trypsiniert, mit Hilfe eines 70 µm-Zellsiebs (BD Bioscience) vereinzelt und auf Poly-DL-Ornithin- und Laminin-

beschichteten (siehe Kapitel 2.2.13) Gewebekulturschalen oder Deckgläsern in serumfreiem N2-Medium ausplattiert (0.6×10^6 Zellen/cm²). Das Medium wurde 2 und 24 Std. nach dem Ausplattieren gewechselt. Zur neuronalen Differenzierung wurden die gebildeten NPCs 2 Tage nach dem Ausplattieren (Tag 11 der Differenzierung) in Neurobasalmedium kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Zellen wurden bis zu Tag 15 der Differenzierung in Kultur gehalten.

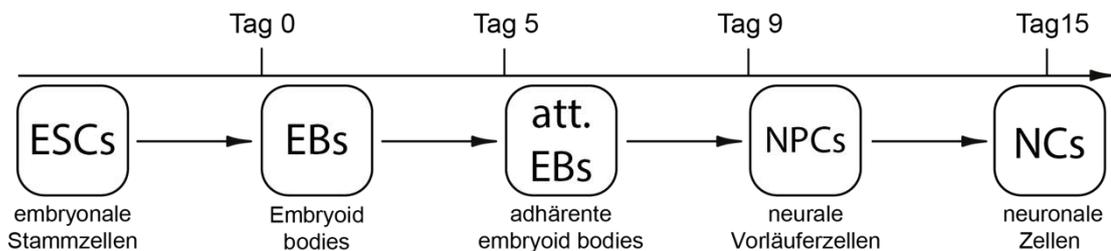


Abbildung 8: Schema der neuronalen Differenzierung von murinen ESCs.

Zeitliche Übersicht des neuronalen *in vitro* ESC-Differenzierungsmodells. ESCs werden vereinzelt und bilden in Suspensionskultur EBs ohne die Zugabe von LIF (*leukemia inhibitory factor*) (ab Tag 0). An Tag 5 der Differenzierung werden die EBs auf Gewebekulturschalen adhärenziert (att. EBs). Am neunten Tag werden die Zellen aus der att. EB-Kultur vereinzelt und auf Polyornithin/Laminin beschichteten Gewebekulturschalen überführt. Die NPC Kulturen wurden dann zu neuronalen und glialen Zellen differenziert (ab Tag 15). Die Zeitskala zeigt den Zeitpunkt des Beginns der verschiedenen Zellkulturbedingungen/Stadien der Differenzierung.

2.2.1.6 EB Differenzierung in Hanging Drops

Zur Quantifizierung der Größe der EBs in Wt und miR-26-KO Zellkulturen wurden EBs in Hanging Drops differenziert, um eine einheitliche Zellzahl als Ausgangspunkt der Differenzierung zu gewährleisten. Hierfür wurde die ES Zellsuspension ($1,2 \times 10^4$ Zellen/ml EB Medium) tropfenweise (1000 Zellen/30 µl Tropfen) mit einer Multipipette auf die Innenseite des Deckels einer 15 cm Gewebekulturschale pipettiert. Der Boden der Schale wurde dabei mit 7 ml $1 \times$ PBS gefüllt um eine Austrocknung zu vermeiden. Zwei Tage nach dem Ausplattieren wurden mikroskopische Phasenkontrast-Aufnahmen der EBs erstellt und der Umfang einzelner EBs mit Hilfe der Software ImageJ gemessen und daraus die Fläche der EBs bestimmt.

2.2.1.7 Quantifizierung der Zellkulturen

Zur Analyse kumulativer Populationsverdopplungen (CPD, *cumulative population doublings*) wurden $12,5 \times 10^3$ Zellen/cm² in 6 cm Gelatine-beschichtete Gewebekulturschalen ausgesät. Nach 48 Std. wurden die Zellen passagiert und die Gesamtanzahl lebender Zellen wurde durch Trypanblaufärbung in einer Neubauer

Zählkammer bestimmt. Nachfolgend wurden $12,5 \times 10^3$ Zellen/cm² erneut ausgesät und für insgesamt 4 Passagen kultiviert. Die Populationsverdopplungen (PD) bei jedem Durchgang wurden gemäß der folgenden Gleichung bestimmt: $x = \log_{10} [\log_{10} (N_1) - \log_{10} (N_0)]$ wobei N_1 = Zellzahl ausgesät, N_0 = Zellerntezahl und x = PD. PD-Werte wurden mit den entsprechenden PD-Werten aus dem vorangehenden Tag addiert, um die Kumulation (CPD-Werte) zu berechnen. Um Zellzahlen in EB Kulturen zu bestimmen wurden 1×10^6 ESCs auf 10 cm Petrischalen kultiviert. Zum Vereinzeln und zur Quantifizierung der Zellzahlen am 2. und am 4. Tag der Differenzierung wurden die EB Suspensionskulturen in 15 ml Röhrchen überführt, mit 1x PBS gewaschen und mit 1ml Trypsin vereinzelt. Die Anzahl an lebenden Zellen wurde durch Trypanblau Färbung bestimmt.

2.2.2 Immunhistochemie

2.2.2.1 Immunhistochemische Färbungen von Monolayer-Zellkulturen

Auf Deckgläser kultivierte Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen und in 3,7% PFA (AppliChem) / 1x PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Deckgläser mit den fixierten Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die Proben konnten so eine Woche bei 4°C gelagert werden, bevor sie gefärbt wurden. Zur Immunfärbung der Zellen wurden diese zunächst permeabilisiert und blockiert in einer Blocklösung mit 0,1% Triton X-100, 0,1% Tween-20, 1% Rinderserumalbumin (BSA) und 2% Ziegen Serum in 1x PBS für 30 min. Die Proben wurden anschließend mit primären Antikörpern, die in der Blocklösung entsprechend verdünnt wurden, über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben dreimal in 1x PBS gewaschen. Hierfür wurden 3 Bechergläser bereitgestellt und die Deckgläschen darin nacheinander gewaschen. Cyanin 2 (Cy2) - oder Cyanin 3 (Cy3) -markierte anti-Maus-, anti-Kaninchen- oder anti-Ratte- Sekundärantikörper wurden in der Blockierungslösung entsprechend verdünnt und die Proben damit 2 Std. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Proben wieder dreimal gewaschen. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) wurde zur Färbung der Zellkerne verwendet und die Proben mit einer 1:50 Verdünnung von DAPI in 1x PBS für 5 min inkubiert. Die Proben wurden auf einen Tropfen mit Einbettmedium (ProLong Gold Antifade-Reagenz (Life Technologies)) auf Objektträger gelegt und mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (LSM780, Carl Zeiss) analysiert. Die Bilder wurden mit der ZEN Imaging Software (Carl Zeiss) erstellt und

weiterverarbeitet. Die Quantifizierungen der positiv-markierten Zellen wurden mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware ImageJ (NIH) durchgeführt. Die Anzahl an Marker⁺ Zellen wurden ausgezählt und im Verhältnis zur Anzahl an DAPI-gefärbte Zellen (= 100%) gesetzt. Zur Quantifikation der Frequenzen von Marker⁺ Zellen wurden 20 zufällige Bildausschnitte (850 × 850 µm) von jedem Experiment analysiert.

2.2.2.2 Messung der Neuritendichte und des Axonwachstums

Zur Messung der Neuritendichte wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben kultiviert, an Tag 15 der Differenzierung fixiert und anschließend gegen Tubb3 gefärbt. Von den angefärbten Zellkulturen wurden mikroskopische Bilder angefertigt und jeweils 20 zufällige Bildausschnitte (850 × 850 µm) wurden von jedem Experiment analysiert. Mit Hilfe der ImageJ Software wurde ein Raster über die Bildausschnitte gelegt (siehe **Abb. 9**) und die Schnittpunkte von Neuriten mit diesem Raster ausgezählt. Gleichzeitig wurden auch die mit DAPI angefärbten Zellkerne gezählt. Daraus wurden die Schnittpunkte pro Zelle errechnet um somit eine Aussage über die Dichte der Neuriten in den differenzierten Zellkulturen treffen zu können.

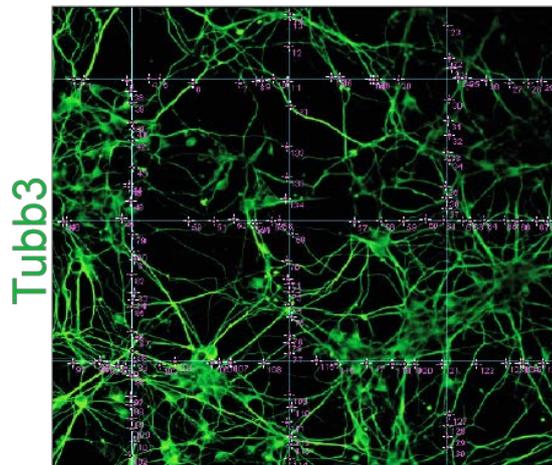


Abbildung 9: Repräsentativer Bildausschnitt einer Analyse der Neuritendichte.

Ausschnitt einer Tubb3-Färbung (grün) von neuronalen Zellen (Tag 15) mit überlagertem Raster und Markierungen der detektierten Schnittpunkte der Neuriten mit diesem Raster (lila).

Zur Messung der Länge der neuronalen Ausläufer einzelner Neurone wurden an Tag 9 der Differenzierung die Zellen mit einer geringeren Zelldichte auf Poly-Ornithin- und Laminin beschichtete Deckgläser ausgesät ($0,2 \times 10^6$ Zellen/cm²). Diese Zellen wurden drei Tage nach dem Ausplattieren (Tag 12 der Differenzierung) fixiert und gegen Tubb3 gefärbt. Zur Messung wurden jeweils 20 zufällige Bildausschnitte (850 × 850 µm) von jedem Experiment analysiert. Mit Hilfe des ImageJ-Plugin NeuroJ wurden in diesen 20

Immunfluoreszenzaufnahmen die Länge aller neuraler Ausläufer pro Neuron bestimmt. Dabei galt als Bedingung, dass die Neurone mit ihren Ausläufern vollständig in den Bildabschnitten dargestellt sind und kein Kontakt zu anderen Zellen besteht. Bei dieser Messung wurde unterschieden zwischen der Neuritenlänge im Durchschnitt und der maximalen Länge pro Bildausschnitt.

2.2.3 Durchflusszytometrie

FACS Analysen wurden mit einem Durchflusszytometer (FACS Canto I, BD) unter Benutzung der FACS Diva Software (BD) durchgeführt. Ein Gate wurde auf FSC (Forward Scatter) und SSC (Sideward Scatter) gelegt, um Zelltrümmer und Zellcluster zu eliminieren.

2.2.3.1 Zellzyklusanalyse

Für die Analyse der Zellzyklusphasen-Verteilung wurden Propidiumiodid (PI) Färbungen von Einzelzellsuspensionen durchgeführt. Es wurden 2×10^5 Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, permeabilisiert (70% EtOH, 30 min, -20°C) und 30 min bei 37°C im Wasserbad mit $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Propidiumiodid und $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNase vor der FACS-Analyse inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss sofort für die FACS Analyse verwendet. Die Auswertung der Zellzyklusphasen-Verteilung erfolgte mit Hilfe der ModFit Software (Verity Software House).

2.2.3.2 Analyse der apoptotischen Zellen

Der Anteil von apoptotischen Zellen wurden durch einen PE AnnexinV Apoptose Detection Kit I (BD Biosciences) bestimmt. Die Färbung der Zellen wurde entsprechend nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. In toten Zellen, bei denen die Plasmamembran zerstört ist, kann Propidiumjodid an DNA-Fragmente binden. Durch FITC-markiertes AnnexinV kann die Bindung an Phosphatidylserin sichtbar gemacht werden. Bei der Initiation der Apoptose stülpt sich Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran auf die Aussenseite. Bei der FACS-Analyse wurde die Gesamtpopulation in 4 verschiedene Sub-Populationen unterteilt: vitale Zellen (PI/AnnexinV^{-/-}), frühe apoptotische Zellen (PI/AnnexinV^{-/+}), späte apoptotische/nekrotische Zellen (PI/AnnexinV^{+/+}) und tote Zellen (PI/AnnexinV^{+/-}).

2.2.4 Generierung und Validierung der miR-26-KO ESC-Linien

Für die Deletion der miR-26 Familie in ESCs wurde die CRISPR/Cas9-Methode angewendet. Die Zielsequenzen für die Guide-RNAs (im weiteren als sgRNA = *single guide* RNA bezeichnet) wurden so ausgewählt, dass sie einem 5'-NGG-Protospacer-benachbartem Motiv (PAM Sequenz) vorrausgehen und eine größtmögliche Zielspezifität aufweisen. Die sgRNAs wurden mit Hilfe des CRISPR-Design Tools (Zhang Lab, MIT, <http://crispr.mit.edu> [197]) entworfen. Weiterhin wurden die sgRNAs für die miR-26-Deletionen so entworfen, dass die benachbarten Ctdsp-Exone und Spleiß-Signale unberührt blieben. Zielsequenzen und Oligonukleotidsequenzen sind in Kapitel 2.1.12.2 aufgeführt. Die sgRNA Oligonukleotide (4sgRNAs pro Deletion) wurden annealt und in den BbsI-linearisierten CRIPR/Cas9-Nikase-Vektor pX335-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9n (D10A) (Addgene ID # 42335) kloniert. Dieser Vektor kodiert zusätzlich für eine Endonuklease (Cas9), die nur eine aktive Nuklease Domäne besitzt und deshalb spezifisch Einzelstrangbrüche in der DNA verursacht. Zuerst wurden genomische miR-26b-Sequenzen in Wt R1 ESCs durch Transfektion eines pX335-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9n (D10A) -Vektors, der die miR-26b-spezifische sgRNAs exprimiert, deletiert. Die Transfektion der ESCs erfolgte über Elektroporation unter Verwendung des Amaxa Nukleofektor Kits. Die Sequenz des miR-26b-Locus erlaubte es, dass zwei sgRNAs ausreichten, um die miR-26b-codierende Sequenz zu deletieren. In ähnlicher Weise wurden pX335-U6-Chimäre_BB-CBh-hSpCas9n (D10A) -Vektoren, die für miR-26a1- oder 26a2-Zielstellen spezifische sgRNAs exprimieren, in Wt R1-ESCs transfiziert. Um ESCs mit einer Deletion der kompletten miR-26 Familie zu generieren, wurde ein ESC-Klon mit einer homozygoten miR-26b-Deletion mit Vektoren transfiziert, die miR-26a1- und 26a2-sgRNAs exprimieren. Die ESC Kolonien, die unter Puromycin-Selektion wuchsen, wurden einzeln herausgepickt und genotypisiert. Im ersten Schritt der Genotypisierung wurde eine Endpunkt-PCR mit Primern, die die miR-26-Kodierungsbereich abdecken, durchgeführt. Die einzelnen Banden im Agarose-Gel wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert. Der finale Schritt bei der Validierung des miR-26-KOs war die Analyse der pre-miR-26 Expression über eine qRT-PCR. Zusätzlich wurden die Top 5 der vorausberechnete Off-Target Bindungsstellen exemplarisch für jede miR-26b-sgRNA (4 Stück) durch PCR mit genomischer DNA und anschließender Sequenzierung der PCR Produkte analysiert. Im letzten Schritt wurde die Integrität der Ctdsp Hostgene und ihre Transkription mit Hilfe der RNA-Seq Daten der miR-26-KO ESCs nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden die Reads über die Ctdsp

Loci von Wt und allen miR-26-KO ESCs mit Hilfe des *Open-Source* Genombrowsers Integrative-Genomics-Viewer (NIH) nach Anomalien untersucht. Für die weiteren Analysen in dieser Arbeit wurden zwei validierte und unabhängige miR-26-KO ESC Klone verwendet.

2.2.5 miR-mimic Experimente

Für gain-of-function Studien wurden synthetische doppelsträngige RNA-Oligonukleotide (miR-mimics) verwendet (alle von Dharmacon, GE Healthcare, siehe Kapitel 2.1.8). Für die Transfektion mit miR-mimics wurden NPCs auf Polyornithin- und Laminin-beschichteten 6-Well-Platten oder Deckgläser in 24-Well-Platten ausplattiert. 3 Std. nach dem Ausplattieren der NPCs wurde das Medium abgesaugt und gegen Antibiotika-freies Medium mit 50 nM der jeweiligen miR-mimics und Lipofectamine 2000 (Thermo Scientific) als Transfektionsreagenz ausgetauscht. Für qRT-PCR-Analysen wurden RNA Proben 72 Std. nach der Transfektion extrahiert. Für funktionelle Analysen durch immunhistochemische Färbungen wurden die Zellkulturen 6 Tage nach der Transfektion (Tag 15 der Differenzierung) fixiert und mit spezifischen Markern gefärbt. Um unspezifische Effekte von miR-mimics zu erfassen, wurde eine Kontroll miR mimic verwendet. Dieses Kontroll-miR-mimic basiert auf der maturen *C. elegans* miR-67 und hat eine minimale Sequenzidentität mit miRs in der Maus.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 Herstellung kompetenter Bakterien-Stämme

Für die Generierung kompetenter *Escherichia coli* (*E. coli*) - Stämme für die DNA-Transformation wurden (Bakterienstämme siehe Materialien) 5 mL antibiotikafreies LB Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und im Schüttler bei etwa 180 rpm und 37°C über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde am nächsten Tag 1:100 verdünnt (2 ml ÜN-Kultur in 198 ml antibiotikafreies LB-Medium ergänzt mit 2% 1M MgSO₄ und 1% 1M KCl). Die Bakterien wurden dann in diesem Medium bei 37°C im Schüttler inkubiert bis ein OD₆₀₀ - Wert von 0,5 erreicht wurde. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C ausgeführt. Die Bakterien wurden für 10 min auf Eis abgekühlt und danach in 50 ml Falcons transferiert. Die Lösung wurde zentrifugiert und das entstandene Bakterienpellet wurde in TFB1 Puffer (15 mL pro 50 mL Kulturvolumen) resuspendiert, danach

zentrifugiert und in TFB2 Puffer (2 mL pro 50 mL Kulturvolumen) resuspendiert. Um die Bakterien für einen längeren Zeitraum zu nutzen wurden sie in 100 µL Aliquots mit Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C gelagert. Die Fähigkeit der hergestellten Bakterienstämme frei vorhandene DNA aufzunehmen, wurde durch die Transformation eines Standard Plasmids mit Ampicillin-Resistenz (pUC19) und die Quantifizierung der Bakterienkolonien auf der ausgestrichenen Agar Platte mit Antibiotikum geprüft.

2.2.6.2 Transformation von kompetenten Bakterien-Stämmen

Zum Einbringen und somit Vervielfältigen von Plasmid-DNA in *E. coli* Bakterien wurde die DNA durch Hitzeschocktransformation eingebracht. Die Bakterien wurden für 5 min auf Eis aufgetaut und 5-10 µL des Ligationsansatzes wurden hinzugefügt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 30 min zurück auf Eis gestellt. Nach der Inkubation wurden die Bakterien bei 42 °C einem Hitzeschock für 90 s ausgesetzt. Sofort danach wurde 1 ml eiskaltes SOC Medium zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann bei 37 °C für 1 Std. auf dem Schüttler inkubiert (1000 rpm). 10% und 90% der Bakterienlösung wurden dann auf Agar Platten mit passendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37° im Brutschrank inkubiert.

2.2.6.3 Isolation von Plasmid-DNA

Um die Bakterienkolonien auf korrekte Transformation der Plasmid-DNA zu prüfen, wurden Minipräparationen der Plasmid-DNA durchgeführt. Dazu wurden 5 mL LB Medium mit Antibiotikum mit Einzelkolonien der Agarplatte angeimpft und bei 180 rpm 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde aus 2 mL der Bakteriensuspension die Plasmid-DNA wie folgt isoliert:

- Bakteriensuspension im Reaktionsgefäß zentrifugieren (6000g, 6 min)
- Überstand abkippen, aber etwa 100 µl im Reaktionsgefäß lassen
- 300 µl TENS-Puffer und RNase hinzufügen (1µl/100µl), gründlich vortexen
- Reaktionsgefäß für 10min auf Eis legen
- 150 µl Natriumacetat (3 M, pH 5.3) hinzugeben, vortexen
- für 10 min bei 15000 g zentrifugieren
- Überstand in frisches Reaktionsgefäß geben, welches 900 µl 100% EtOH (bei -20°C vorgekühlt) enthält
- für 30 min bei 20°C inkubieren, 5 min bei 15000g zentrifugieren
- Überstand verwerfen und DNA-Pellet einmal mit 500 µl 70% EtOH waschen
- für 5 min bei 15000g zentrifugieren, DNA-Pellet 10 min trocknen lassen
- DNA-Pellet in 20-50 µl TE Puffer (je nach zu erwarteter DNA-Menge) lösen

Für die Maxi-Präparation von Plasmid-DNA wurde die Übernacht-Kultur 1:1000 in 200-300 ml antibiotikahaltigem LB Medium verdünnt und über Nacht bei 180 rpm und 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Die Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde in TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.2.6.4 Quantitative und qualitative Analyse von Nukleinsäuren

2.2.6.4.1 Photometrische Bestimmung

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurden mittels UV-Vis Spektroskopie in einem Photometer (Eppendorf) bestimmt. Dabei wurde die optische Dichte (OD) bei 260 und 280 nm bestimmt und die Masse an Nukleinsäuren in den Proben. Das Verhältnis zwischen OD 260 und OD 280 (A_{260} / A_{280}) gibt Informationen über die Reinheit einer Probe. Für reine Nukleinsäuren sollte dieser Wert zwischen 1,8 und 2 liegen. Bei RNA-Extrakten kann er auch zwischen 1,6 und 2 liegen.

2.2.6.4.2 Agarose Gelelektrophorese

Die Auftrennung und die qualitative Analyse von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe der Agarose Gelelektrophorese durchgeführt. Das Agarosegel mit einer Konzentration von 0,5-2% (w/v) (abhängig von der zu erwarteten Größe der Nukleinsäuren) wurde durch Aufkochen der Agarose in 1× TBE hergestellt. Zum Nachweis der RNA und DNA bzw. zum Anfärben dieser wurde 0,2 µg/mL Ethidiumbromid zur Lösung vor dem Gießen des Gels hinzugegeben. Als Längenstandard wurde der 1 kb Ladder (Peqlab) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei 120–200 mA mit TBE als Laufpuffer. Nach der erfolgreichen Auftrennung der Nukleinsäuren, wurde das Agarosegel in der Geldokumentationseinheit unter UV-Licht analysiert und abgelichtet. Für die Aufreinigungen wurden die gewünschten Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) vom Agarosegel getrennt.

2.2.6.5 Restriktionsverdau

Zur Klonierung wurden DNA-Fragmente (100-500 ng) und Plasmidvektoren (1-10 µg) durch Restriktionsendonukleasen hydrolysiert (Thermo Scientific, NEB). Der Verdau wurde in dem vom Hersteller empfohlenen Puffern mit 1-5 U des Enzyms für 1,5 - 3h bei

37°C durchgeführt, abhängig von der enzymatischen Aktivität und DNA-Menge. Die verdaute DNA wurde dann mittels Gelelektrophorese kontrolliert und wie oben beschrieben aufgereinigt.

2.2.6.6 Oligonukleotid Annealing

Die Oligonukleotide für den Einbau in den pX335 Vektor als sgRNA wurden zunächst in der richtigen Orientierung zusammengefügt. Hierfür wurde folgender Ansatz verwendet:

100 µM Sense Oligo	1 µl
100 µM Antisense Oligo	1 µl
T4 Ligase Puffer (NEB)	1 µl
H ₂ O	7 µl
<hr/>	
	10 µl

Der Reaktionsansatz wurde im Wasserbad bei mindestens 95°C für 2 bis 3 Std. langsam bis auf Raumtemperatur abgekühlt.

2.2.6.7 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente und durch Restriktionsverdau linearisierte Vektoren wurden mit Hilfe der T4-Ligase (NEB) in NEB Ligase Puffer mit ATP über Nacht bei 16°C oder 1 Std. bei Raumtemperatur ligiert im Verhältnis 1: 1, 1: 3 oder 1: 5 (Plasmid: Insert) mit 100 ng Plasmid. Zur Berechnung wurde das NEB-Online-Tool verwendet. (<http://nebiocalculator.neb.com/#!/main>). Um das Ausmaß der Vektor-Religation zu erfassen wurde ein Kontrollansatz ohne Insert in jeder Reaktion mit einbezogen. Die Ligationsreaktion wurde anschließend in kompetente E. coli wie oben beschrieben transformiert.

2.2.6.8 RNA Extraktion

Zur Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellen oder aus Geweben wurde das peqGOLD RNA Pure Reagenz (Peqlab) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die RNA Konzentration und Qualität der RNA wurde anschließend photometrisch oder über Gelelektrophorese bestimmt (siehe Kapitel 2.2.6.4).

2.2.6.9 cDNA Synthese

Für die Synthese der cDNA aus Gesamt-RNA zur Verwendung als Template für die Genexpressionsanalyse wurde die RNA revers transkribiert. Hierzu wurden Random Hexamer Primer und die M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen) verwendet. Die cDNA Synthese erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

Reagens	Menge	Temperatur	Zeit
Verdau genomischer DNA		Verdau genomischer DNA	
RNA	1 µg	37°C	30 min
10x DNase Puffer	1 µL		
200U/µl DNaseI	1 µL		
H2O	x µl		
	10 µl		
Verdau Abstoppen und Annealing		Verdau Abstoppen und Annealing	
50 mM EDTA	1 µl	65°C	10 min
Random Hex Primer	1 µl	65°C	5 min
cDNA Synthese		cDNA Synthese	
10mM dNTPs	2 µL	25°C	5 min
5x FS Puffer	4 µL	37°C	60 min
0,1 M DTT	2 µL	70°C	5 min
M-MLV RT Enzym	0,6 µL	-20°C	∞
H2O	0,4 µL		
	21 µl		

Zur Expressionsanalyse von Vorläufer-miRs und maturen miRs wurde aus der extrahierten Gesamt-RNA mit dem miSCRIPT II RT Kit (Qiagen) cDNA nach Herstellerprotokoll synthetisiert. Der Reaktionsansatz von 20 µl cDNA wurde vor der Verwendung in der qRT-PCR als Template 1:200 mit H₂O dest. verdünnt.

2.2.6.10 Extraktion genomischer DNA

Zur Extraktion genomischer DNA wurden die Proben mit 1% Proteinase K in Lyse-Puffer über Nacht rotierend bei 56°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben in zwei Schritten mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend mit Isopropanol bei 4°C gefällt. Nach zwei Waschschritten mit 70% Ethanol wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, in H₂O dest. gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.6.11 PCR-Analyse zum Nachweis spezifischer Transkripte, miRs und CRISPR/Cas9-Deletionen

Zur Analyse der Genexpression mittels *real-time*-PCR (qRT-PCR) wurde die extrahierte RNA wie oben beschrieben in cDNA umgeschrieben. Die Reaktionen wurden unter Verwendung des Absolute qPCR SYBR Green qRT-PCR-Mix (Thermo Scientific) durchgeführt. Alle verwendeten Primer sind in Kapitel 2.1.12 aufgeführt. Primer für die qRT-PCR wurden so entworfen, dass die amplifizierte Sequenz Exon-überspannend ist, das Primerpaar annähernd die gleichen Schmelztemperaturen besitzen, keine Primerdimerbildung oder Sekundärstrukturen (Loopbildungen) entstehen können und die Amplikon Länge 90-200 bp beträgt. Die Spezifität der Primerpaare wurde mit Hilfe von NCBI Blast gegen das Maus RefSeq Transkriptom überprüft. Die optimale Annealing-Temperatur für neue Primerpaare wurde durch eine Gradienten-PCR ermittelt. Die Proben wurden nach dem folgenden Rezept pipettiert und die Reaktion mit folgenden Einstellungen im LightCycler480II (Roche) durchgeführt:

		Temperatur	Zeit	Zyklen
		95°C	15 min	
cDNA als Template	1 µl	95°C	10 s	45x
10 µM Sense Primer	2,5 µl	55-60°C	20 s	
10 µM Antisense Primer	2,5 µl	72°C	30 s	
2x SybrGreen Mix	10 µl	80°C	20 s	
H ₂ O	4 µl	50°C	1 min	
		65-95°C	0,5°C/5 s	
		40°C	∞	

Die Expressionslevel von Vorläufer-miRs und maturen miRs wurden mit dem miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) in Kombination mit dem miSCRIPT Primer Assay (Qiagen) nach Herstellervorgaben analysiert. Als Template für die qRT-PCR wurden 2 µl der verdünnten cDNA verwendet. Bei allen Proben für die Genexpressionsanalyse mittels

qRT-PCR wurden Triplikate pipettiert. Die Bestimmung der relativen Expressionslevel der mRNAs und miRs erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode. Der Zyklusschwellenwert ($C_t = cycle\ threshold$), als Ergebnis der qRT-PCR, ist definiert als die Anzahl an Zyklen die nötig sind, um einen Fluoreszenz-Schwellenwert zu überschreiten. Der C_t -Wert eines Referenzgens (R) wurde von dem Zielgen (Z) C_t -Wert subtrahiert. Der so errechnete ΔC_t -Wert der Kontroll-Kondition (K) wurde dann vom ΔC_t -Wert der Probe subtrahiert und in einen linearen *fold change* konvertiert (siehe Formel 1.2.6.11).

$$\Delta C_t(Z) = C_t(Z) - C_t(R)$$

$$\Delta\Delta C_t(T) = \Delta C_t(T) - \Delta C_t(K) \quad (1.2.6.11.)$$

$$Normalisierte\ Zielgenexpression = 2^{-\Delta\Delta C_t(Z)}$$

Mit Hilfe der GeNorm Software [198] wurden verschiedene potentielle Housekeeper- oder Referenzgene überprüft und zur Normalisierung ausgewählt. Unter 6 getesteten Referenzgenen (*Gapdh*, β -*Actin*, *Rpl4*, *Rpl6*, *Hprt1*, *Rps29*) wurde *Gapdh* als passendes Gen zur Normalisierung der Expressionslevel über verschiedene Zeiträume der Differenzierung und *Rpl4* optimal zur Untersuchung von Expressionslevel in ESCs ermittelt. Zur Normalisierung von Vorläufer- und muren miRNA-Expressionsniveaus wurden U6 snRNA-spezifische Primer (Qiagen) verwendet.

Um die Cas9-vermittelten Deletionen der miR-26 zu bestätigen, wurden Endpunkt-PCR Analysen mit genomischer DNA, gewonnen von den ESC Einzelklonen, durchgeführt. Primer wurden so entworfen, dass sie außerhalb der potentiell deletierten miR-26 Sequenz binden. Die Bedingungen für die Amplifikation genomischer DNA zur Validierung des miR-26-KO sind im Folgenden dargestellt.

		Temperatur	Zeit	Zyklen
gDNA als Template	1 μ l	94°C	5 min	
10 μ M Sense Primer	2,5 μ l	94°C	30 s	
10 μ M Antisense Primer	2,5 μ l	54°C	1 min	35x
OneTaq-Polymerase	10 μ l	72°C	1 min	
H ₂ O	4 μ l	72°C	5 min	
	20 μ l	4°C	∞	

2.2.6.12 Kolonie-PCR

Um möglichst einfach in einem großen Ansatz Bakterienkolonien auf eine erfolgreiche Transformation zu prüfen wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Im Folgenden werden das Rezept und Protokoll der PCR dargestellt:

		Temperatur	Zeit	Zyklen
10x Super Taq Puffer	5 μ l	95°C	5 min	
2 mM dNTPs	1 μ l	95°C	30 s	
Sense Primer	1 μ l	60°C	30 s	36x
Antisense Primer	1 μ l	72°C	1 min	
Super Taq Polymerase	0,1 μ l	72°C	10 min	
H ₂ O	41,9 μ l	4°C	∞	
	50 μ l			

Zu diesem Ansatz wurde mit einer Pipettenspitze je eine Bakterienkolonie von der Übernachtskultur auf der Agarplatte als Template genommen und als letzten Schritt im PCR Reaktionsgefäß resuspendiert und als Backup auf eine gekennzeichnete Raster-Agarplatte ausgestrichen.

2.2.6.13 SDS-PAGE und Western Blot

Zur relativen Quantifizierung von Proteinleveln wurden die Proteine von Zellextrakten zunächst durch eine Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE) der Größe nach aufgetrennt und anschließend im Western Blot Verfahren auf eine Membran überführt. Hierfür wurden zunächst Einzelzellsuspensionen zweimal mit 1× PBS gewaschen und in 2x Lämmli Puffer aufgenommen. 1×10^6 Zellen wurden in 120 μ l 2 x Lämmli Puffer aufgenommen, durch eine 21er Kanüle geschert (mindestens 10-mal) und für 10 min bei 95°C gekocht. Die Proteine wurden auf 8–15%igen SDS-Gelen (abhängig von der zu erwartenden Bandengröße) bei 60 mA der Größe nach aufgetrennt und nach der Elektrophorese auf Nitrozellulosemembranen geplottet. Hierfür wurde eine Spannung von 0,8 mA / cm² (300 mA) angelegt. Die Membranen wurden in PBST (0,05% Tween²⁰) mit 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur für 30 min blockiert. Anschließend wurden die Proben über Nacht mit primären Antikörpern (alle verwendeten Antikörper sind in Kapitel 2.1.7 beschrieben) in der Blockierlösung bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3x mit PBST gewaschen und danach mit sekundären Antikörpern (RT, 1 h) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBST wurden die Membranen mit einem HRP (*horseradish peroxidase*) -gekoppelten Zweitantikörper

bedeckt (RT, 5 min). Die Chemilumineszenz wurde unter einer Geldokumentationseinheit (Chemidoc XRS-Imager, BioRad) visualisiert. Die Quantifizierung der Intensität der Proteinbanden erfolgte relativ zur Intensität der GAPDH Banden mit Hilfe der ImageJ-Software. Für die wiederholte Inkubation mit mehreren Antikörpern wurden die Membranen mit Hilfe einer Abstreiflösung (0,2 M NaOH, RT, 20 min) von Antikörpern befreit und danach 3x mit PBST gewaschen.

2.2.7 Transkriptom Analyse / RNA-Seq

Die Gesamt-RNA zweier unabhängiger Klone der KO-Zelllinien KO^{26b}, dKO^{26a1/a2}, tKO^{26b/a1/a2} und Wt Zellen (je zwei biologische Replikate von ESCs und NCs (Tag 15)) wurden wie in Kapitel 2.2.6.8 beschrieben isoliert. Die RNA-Sequenzierung wurde in der Arbeitsgruppe von Markus Hafner durchgeführt (NIH, Bethesda, USA) und wird im folgenden Abschnitt nur kurz beschrieben.

Für die Transkriptom Analyse wurden lange RNAs mit poly(A)-Schwanz (mRNAs als auch lange nicht codierende RNAs) sequenziert. Die rRNA (ribosomale RNA) wurde unter Verwendung des Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Illumina) entfernt und es wurden cDNA-Bibliotheken mit Hilfe des Next Ultra Directional RNA Library Prep Kit (NEB) erstellt. Sequenzierte Transkript Reads wurden mit dem Mausgenom (GRCm38 / mm10) mittels TopHat [199] abgeglichen. *Cufflinks* und *Cuffdiffs* wurden verwendet um die differenzielle Genexpression zu bestimmen [199].

In einem weiteren Durchsatz wurden kleine RNAs sequenziert. Hierfür wurde ein 3' barcodierter Adapter mit Hilfe der verkürzten T4 RNA Ligase (K227Q, NEB) ligiert. Anschließend wurden ligierte RNAs gepoolt, über eine SDS-PAGE der Größe nach getrennt, gefolgt von der Zugabe eines 5'- Adapters über die T4 RNA Ligase. Die RNA wurde unter Verwendung von Superscript III (Invitrogen) revers transkribiert und cDNA wurde über eine PCR mit der Taq-Polymerase (Takara) und einem Barcode-spezifischen Primer amplifiziert. Die PCR-Produkte mit einem Adapter wurden dann der Größe nach auf einem 2,5%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des Qia-Quick Gelextraktions Kit aufgereinigt. Die cDNA wurde dann über Illumina-Technologie sequenziert [200]. Die Ergebnisse wurden mit der murinen miRNA-Annotationsdatenbank (www.miRBase.org) unter Verwendung des Burrow-Wheeler-Aligner abgeglichen und jedes miRNA Profil wurde auf relative Sequenz Reads normalisiert [201].

2.2.8 Bioinformatische Analyse

Für das Abgleichen von Gensequenzen für die Validierung der miR-26 KO Zelllinien wurde als Referenzsequenz die UCSC Genom Browser Datenbank (GRCm38 / mm10) verwendet. Venn-Diagramme wurden mit dem Online-Tool <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> erstellt. Die finale Visualisierung der Venn-Diagramme wurde mit dem Open-Source-Tool eulerApe durchgeführt [202]. Die Analyse von differentiell exprimierten Genen kategorisiert über *GO-Terms*, wurde mit Hilfe der Online-Schnittstelle des Gen-Ontologie-Konsortiums (<http://geneontology.org/>) durchgeführt, die auf dem PANTHER-Klassifizierungssystem (Version 14.0, April 2018) basiert [203, 204]. Zur Vorhersage der miRNA Nukleinsäurefaltung wurde die Online-Software "mfold web server" (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>, [205]) verwendet. Alle Informationen über miRs und deren Sequenz, die in dieser Arbeit genutzt wurden, wurden aus der letzten veröffentlichten Online-Datenbank miRBase entnommen (<http://mirbase.org/>, Release 22, März 2018) [206]. Für die miRNA-Target Analyse wurde die Online-Datenbank Target Scan (http://www.targetscan.org/mmu_71/, Version 7.2, Juni 2016) verwendet. Für die KEGG Pathway Analyse der Zielgene der miR-26 wurde die Online-Datenbank miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2>, [207, 208]) genutzt. Humane und murine Gewebe- und zellspezifische Expressionsdaten wurden aus den Datenbanken human miRNA TissueAtlas (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas>, [162]) und Fantom5 Mouse microRNA Expression Atlas (<http://fantom.gsc.riken.jp>, [163]) entnommen.

2.2.9 Statistische Auswertung

Falls nicht anders angegeben, stellen alle Fehlerbalken in den Abbildungen Standardabweichungen (SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar. Zum Vergleich der Datensätze von zwei Gruppen und deren möglicher signifikanter Abweichung voneinander wurde der *Student's t-Test* durchgeführt. Dabei wurden folgende Konfidenzintervalle festgelegt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Aufbau eines neuronalen Differenzierungssystems für murine ES Zellen als Modell für die Neurogenese

Um die Rolle der miR-26 Familienmitglieder während der Neurogenese zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein murines, ESC-basiertes, neuronales Differenzierungssystem eingesetzt. ESCs, die aus der inneren Zellmasse von Säugetier-Blastozysten gewonnen werden, sind pluripotent und dann fähig, sich *in vitro* und *in vivo* in alle Arten von somatischen Zelltypen zu differenzieren [209, 210]. Das verwendete murine ESC Differenzierungssystem ermöglicht *ex vivo*, unter bestimmten Zellkulturbedingungen, die Differenzierung von ESCs in neuronale und gliale Zelltypen innerhalb von 15 Tagen. Wie schon von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt wurde, kann solch ein ESC Differenzierungssystem basierend auf verschiedenen morphologischen, molekularen und funktionellen Kriterien als Modell der Säuger-Neurogenese herangezogen werden [193, 194, 196, 211].

Morpholino-basierte *knockdown* Strategien im Zebrafisch zeigten bereits erste Belege für eine Rolle der miR-26b während der neuronalen Entwicklung [160]. Aus diesen Studien lassen sich zwar Erkenntnisse der Vorgänge in einem sich entwickelnden Organismus während der Neurogenese in niederen Vertebraten gewinnen, jedoch ist es kein optimales System für detaillierte Studien der verschiedenen spezifischen neuronalen Entwicklungsebenen in Säugetieren bzw. zur Untersuchung der molekularen Mechanismen und Signalwege, die während dieser Entwicklungsebenen durch die miR-26 Familie beeinflusst werden.

Zur neuronalen Differenzierung in der Zellkultur wurden zunächst aus ESCs in Suspensionskultur in LIF-freien Medium embryoide Körperchen (engl.: *embryoid bodies*, EBs) gebildet. Nach 5 Tagen in Suspensionskultur wurden die EBs auf Gewebekulturschalen in serumfreiem Medium mit Retinsäure adhärent kultiviert. Durch diese Zellkulturbedingungen konnten nach 10 Tagen NPCs generiert werden. Nach weiteren 5 Tagen (Tag 15 der Differenzierung) konnten diese NPCs in Neurobasalmedium zu neuronalen und glialen Zelltypen differenziert werden (detaillierte

Beschreibung des Differenzierungsprotokolls siehe Kapitel 2.2.1.5). **Abb. 10a** zeigt eine schematische Übersicht der Differenzierung mit Zeitskala. Zur Vereinfachung werden die Zellkulturen in den verschiedenen Stadien der Differenzierung nach folgender Nomenklatur in dieser Arbeit beschrieben: NPCs / d10 Zellen = Zellkulturen an Tag 10 der Differenzierung in denen sich vorwiegend neurale Vorläuferzellen befinden; NCs / d15 Zellen = Zellkulturen an Tag 15 der Differenzierung die sich vorwiegend aus Neuronen zusammensetzt. Die Veränderungen der Zellmorphologie in den einzelnen Stadien der Differenzierungen sind durch repräsentative Phasenkontrastbilder der Zellkulturen in **Abb. 10b** dargestellt.

Wie in **Abb. 10c** gezeigt, wurden zur Charakterisierung der differenzierten Zelltypen Immunfärbungen gegen verschiedene zelluläre Marker durchgeführt. ESCs wurden mit Antikörpern gegen die „core pluripotency“ (Kernpluripotenz-) Transkriptionsfaktoren OCT4 und SOX2 angefärbt. Annähernd 100% der ESCs zeigten eine zellkernspezifische doppelt-positive Färbung für diese Marker (**Abb. 10c**, links). Zum Nachweis von NPCs an Tag 10 der Differenzierung wurden die Zellkulturen mit Antikörpern gegen NESTIN und SOX2 angefärbt. Die Ko-Expression dieser beiden zellulären Marker ist spezifisch für neurale Vorläuferzellen und neurale Stammzellen. Die Immunfärbungen in **Abb. 10c** zeigen, dass ein Großteil der Zellen an Tag 10 diese neuronalen Vorläufermarker exprimieren. Im rechten Teil der **Abb. 10c** ist der immunhistochemische Nachweis der neuronalen Differenzierung an Tag 15 anhand der Markerproteine TUBB3, TAU, MAP2, die spezifisch im Zytoskelett von postmitotischen Neuronen zu finden sind, und dem Astroglia-spezifischem Marker GFAP gezeigt. In den d15 Kulturen befinden sich Zellen, welche die typische Morphologie von Neuronen mit einem relativ kleinen Perikaryon (Zellkörper) und langen bzw. vielen verästelten Zellfortsätzen (Axone und Dendriten) zeigen. Ebenfalls sind sternförmig verzweigte GFAP-exprimierende, astrogliale Zelltypen nachweisbar. Zudem wurde die Genexpression von verschiedenen ESC-Markern in ESCs, d10 und d15 Zellen mittels qRT-PCR analysiert (**Abb. 10d**). Wie zu erwarten, nimmt die Expression der Kern-Pluripotenzgene *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* und *Rex1* während der neuronalen Differenzierung ab. Dagegen ist die stärkste Expression von *Msi1* und *Pax6*, als wichtige Transkriptionsfaktoren neuronaler Vorläuferzellen, in d10 NPCs im Vergleich zur Expression in ESCs und in NCs zu finden. Gleichermaßen verhält sich die Expression von *Nestin*, einem Intermediärfilament das üblicherweise transient in differenzierenden Zellen im frühen Stadium der Entwicklung des ZNS, jedoch nicht in ausdifferenzierten maturen/postmitotischen Neuronen exprimiert ist. Die Expression von

zwei entscheidenden transkriptionellen Regulatoren der Neurogenese, *Neurog1* und *Neurod1*, war in NCs hochreguliert, ebenso wie die Expression der Markergene *Map2* und *Tubb3*, *Ncam*, die mit dem neuronalen Zytoskelett assoziiert sind. Darüber hinaus war die Expression von *Gfap*, in den d15 Zellkulturen erhöht.

Zusammenfassend konnten durch diese zellulären und molekularen Analysen mit Zellen aus verschiedenen Stadien des neuralen ESC-Differenzierungssystems die neuronale und gliale Identität der *in vitro* differenzierten Zellen gezeigt werden und somit ein Modell für die Säuger-Neurogenese *in vitro* etabliert werden.

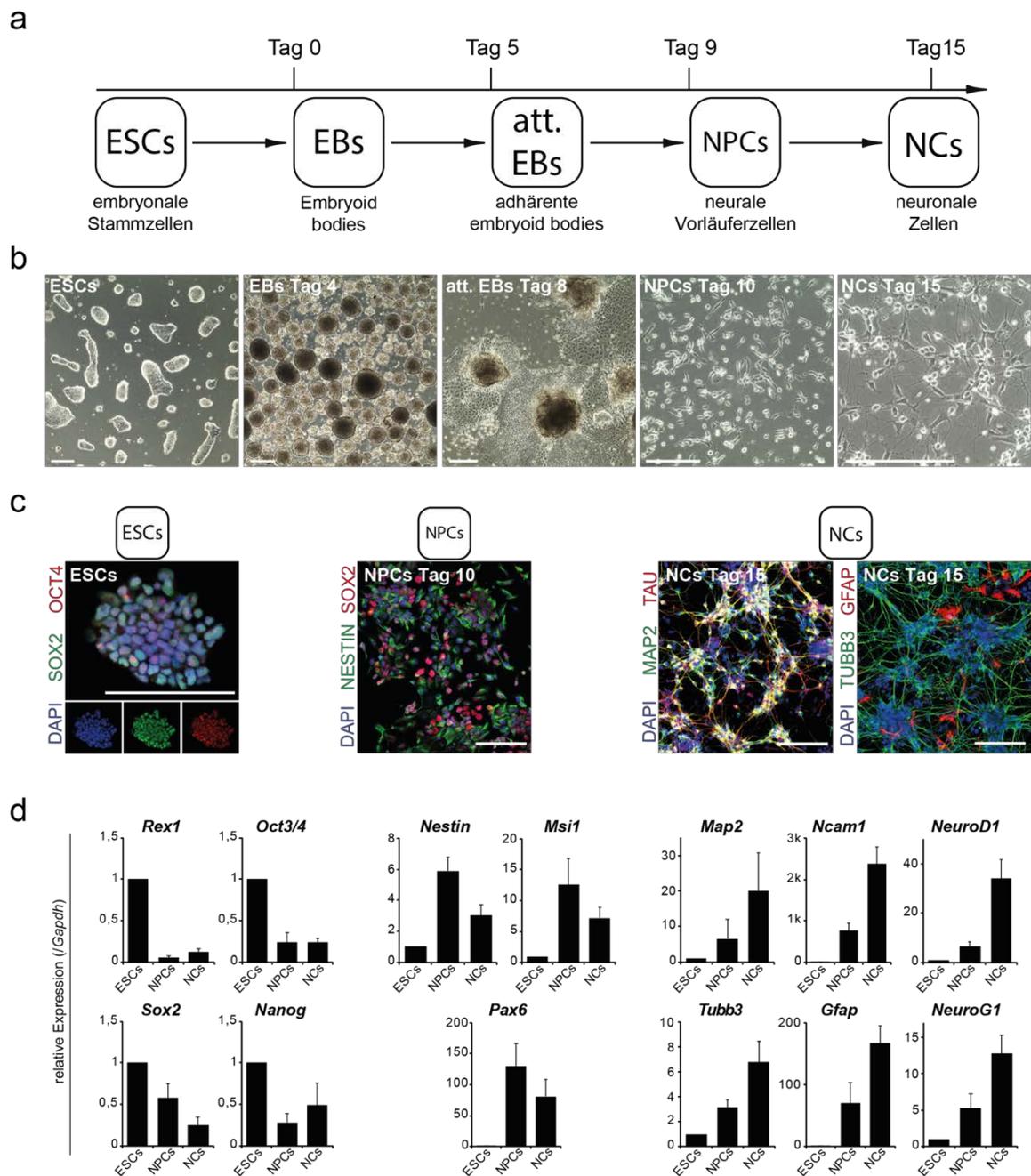


Abbildung 10: Charakterisierung der Zellen während der Differenzierung muriner Wt ESCs. (a) Schema der einzelnen neuralen Differenzierungsstadien. Die Zeitskala zeigt den Zeitpunkt des Beginns und die Dauer der verschiedenen Zellkulturbedingungen/Stadien während der Differenzierung. (b) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen der einzelnen Differenzierungsstadien. Maßstab: 250 μ m. (c) Repräsentative Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen gegen Marker für ESCs (OCT4, SOX2), neurale Vorläuferzellen (NESTIN, SOX2), postmitotische Neurone (TAU, MAP2, TUBB3) und Astroglia (GFAP). Zur Visualisierung der Zellkerne wurden diese mit DAPI gefärbt. Maßstab: 100 μ m. (d) Expression verschiedener Markergene für pluripotente Zellen (links), neurale Vorläuferzellen (Mitte), neuronale und gliale -Zellen (rechts) jeweils in ESC-, NPC- und NC-Kulturen (qRT-PCR). Die Genexpression wurde über die Expression von *Gapdh* normiert und die Expression in ESCs als Referenzwert für die relative Expression auf ‚1‘ gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten von 3 unabhängigen Differenzierungen (n = 3).

3.2 Expressionsmuster der miR-26 Familie und der *Ctdsp* Wirtsgenfamilie während der neuralen Differenzierung und der embryonalen Neurogenese im murinen Gehirn

Um die Rolle der miR-26 Familie während der Neurogenese zu untersuchen war es zunächst wichtig, das Expressionsmusters der miR-26 Familie und deren Wirtsgen *Ctdsp* während der neuralen Differenzierung von ESCs und während der embryonalen Neurogenese in der Maus zu analysieren. Zudem sollte geprüft werden, ob die miR-26b vermittelte *ctdsp2* Rückkopplungs-Schleife, die im Zebrafisch identifiziert wurde [160, 192], auch während der neuralen Differenzierung von murinen ESCs beobachtet werden kann. In diesem Kontext wurde zunächst eine bioinformatische Analyse der Sequenz und der genomischen Lokalisation der miR-26-Familienmitglieder durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die miR-26 Familie nur in Vertebraten gefunden werden kann, und dass die Sequenzen der maturen miR-26 Familienmitglieder in allen Vertebraten hoch konserviert sind (Appendix **Abb. 30a**) und dass alle miR-26 Familienmitglieder in Introns der *Ctdsp* Genfamilie codiert sind (Appendix **Abb. 30b**).

Zur Expressionsanalyse der miR-26 Familienmitglieder und ihrer Wirtsgene wurden RNA-Proben von Zellkulturen an verschiedenen Zeitpunkten der neuralen Differenzierung (ESCs, d10, d15), von embryonalen Mausgehirnen in verschiedenen Stadien der Entwicklung (E9.5, E11.5, E13.5, E15.5, E18.5) sowie von adulten Mausgehirnen (1-1,5 Jahre, männlich und weiblich) extrahiert. Die Expression der miR-26 Familienmitglieder und der *Ctdsp* Homologe wurden dann in einer qRT-PCR analysiert. Zusätzlich wurde mit Hilfe der eigenen Expressionsdaten aus der Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierungen (RNA-Seq) (genaue Beschreibung siehe Kapitel 2.2.7 und 3.8) von RNA-Proben aus ESC und d15 Kulturen der prozentuale Anteil der miR-26a und miR-26b an der Gesamtheit sequenzierter miRs berechnet. Dadurch konnten die Expressionsniveaus der beiden miR-26 Familienmitglieder in ESC und d15 Kulturen verglichen werden, um Erkenntnisse über die Veränderung der miR-26 Expression zwischen Anfangs- und Endpunkt der neuralen Differenzierung zu gewinnen. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass auf Grund der starken Sequenzhomologie der maturen miR-26a und miR-26b in der qRT-PCR Analyse die Expression der beiden miRs

nicht unterschieden werden konnte und in dieser Arbeit nur die Summe der Expression quantifiziert wurde.

Die qRT-PCR Analysen von Zellkulturen an verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung zeigen, dass die Expression der precursor miR-26a1, a2, b in d10 Kulturen im Vergleich zur Expression in d15 Kulturen sich nicht merklich verändert oder geringer ausfällt. Dies legt nahe, dass die Prozessierung der pre-miR-26 bis zum NPC Stadium der Differenzierung gehemmt wird, da sich die Expression der maturen miR-26 in ESCs und NPCs auf gleichem Niveau befinden, jedoch in NCs um den Faktor 2,5 ansteigt (**Abb. 11a**, links). Dies ist ein erster Hinweis auf eine verspätete Reifung der miR-26 Familie während der Differenzierung, wie sie in ähnlicher Weise für die pre-miR-26b schon im Zebrafisch gezeigt wurde [160]. Für alle Homologe von *Ctdsp* konnte eine Zunahme der Expressions-Level während der Differenzierung von ESCs zu NPCs festgestellt werden. Im Vergleich hierzu beobachtet man in ausdifferenzierten NC Kulturen eine um den Faktor 2,5 verminderte Expression von *Ctdsp1,2,1* gegenüber der NPC Kulturen (**Abb. 11a**, rechts). Ein ähnliches Expressionsmuster der precursor und maturen miR-26 und allen *Ctdsp* Homologen ist in Gehirnen von Mausembryonen während der embryonalen Neurogenese (Mausgehirne von E9.5 bis adult verglichen mit Zellkulturen von d0 bis d15) zu beobachten (**Abb. 11c**). Die Ergebnisse der RNA-Seq in **Abb. 11b** bestätigen die neuronale Spezifität der miR-26 Familie, da die Expression der maturen miR-26a und b während der Differenzierung von ESCs zu NCs um den Faktor 8 ansteigt. In dieser Analyse ist auch zu erkennen, dass die miR-26a etwa dreimal höher exprimiert ist als die miR-26b, sowohl in ESCs als auch in NCs. Die qRT-PCR Analyse von Gehirnen aus Mausembryonen zeigen, dass die Expression der pre-miR-26a ab Tag E11.5 (die pre-miR-26b ab Tag 13.5) relativ konstant bleibt oder geringfügig abnimmt, die Expressions-Level der maturen miR-26 hingegen aber immer weiter ansteigen. Dies legt nahe, dass die pre-miR-26a1 und a2 während der neuralen Entwicklung erst ab Tag E11.5, bzw. die miR-26b ab Tag E13.5, in einem höheren Maße prozessiert wird, da die Expressionslevel der pre-miRs nach diesem Entwicklungsstadium bis Tag E18.5 und auch im adulten Mausgehirn nur noch unwesentlich abnehmen. Das Verhältnis von precursor zu maturer miRNA weist auf eine vermehrte Prozessierung der precursor miRs während der neuralen Entwicklung ab Tag E11.5, bzw. E13.5 hin (**Abb. 11c**, links). In **Abb. 11c** (Mitte) ist zu erkennen, dass die Expression der maturen miR-26 im Gehirn von Mausembryonen vom Entwicklungsstadium E9.5 bis E18.5 anstieg, mit einer 6-fach höheren Expression in E18.5 Embryonen im Vergleich zu E8.5 Embryonen. Parallel

hierzu wurde auch die Expression von *Ctdsp1,2,l* in embryonalen Mausgehirnen während der verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht (**Abb. 11c**, rechts). Zunächst stieg die Expression aller *Ctdsp* Homologe um etwa das 3-fache in E13.5 Embryonen und danach sank die Expression bis zum Stadium E18.5 wieder auf das Niveau von E9.5 Embryonen. Zusammengefasst zeigen diese Expressionsanalysen eine zeitliche und Zelltyp-spezifische Expression der miR-26 Familienmitglieder und deren Wirtsgene *Ctdsp1,2,l*. Von NPCs zu NCs oder in Gehirnen von Mausembryonen von Tag E13.5 bis E18.5 und im adulten Mausgehirn steigt die Expression der pre-miR-26a1/a2/b nicht merklich an, jedoch konnte eine deutliche Erhöhung der Expression der maturen miR-26 und eine verringerte Expression aller *Ctdsp* Homologe sowohl in diesen Stadien der Differenzierung, als auch in embryonalen Mausgehirnen, festgestellt werden. Das Muster der Expressionslevel der pre-miR-26a1/a1/b, der maturen miR-26 und der Wirtsgene *Ctdsp1,2,l* während der neuralen ESC-Differenzierung und während der embryonalen Entwicklung im Mausgehirn sind zudem vergleichbar mit dem Expressionsmuster im sich entwickelnden Zebrafisch [160]. Zudem ist der Anstieg der Expression der maturen miR-26 während der neuralen Differenzierung invers korreliert mit der Expression von *Ctdsp1,2,l*.

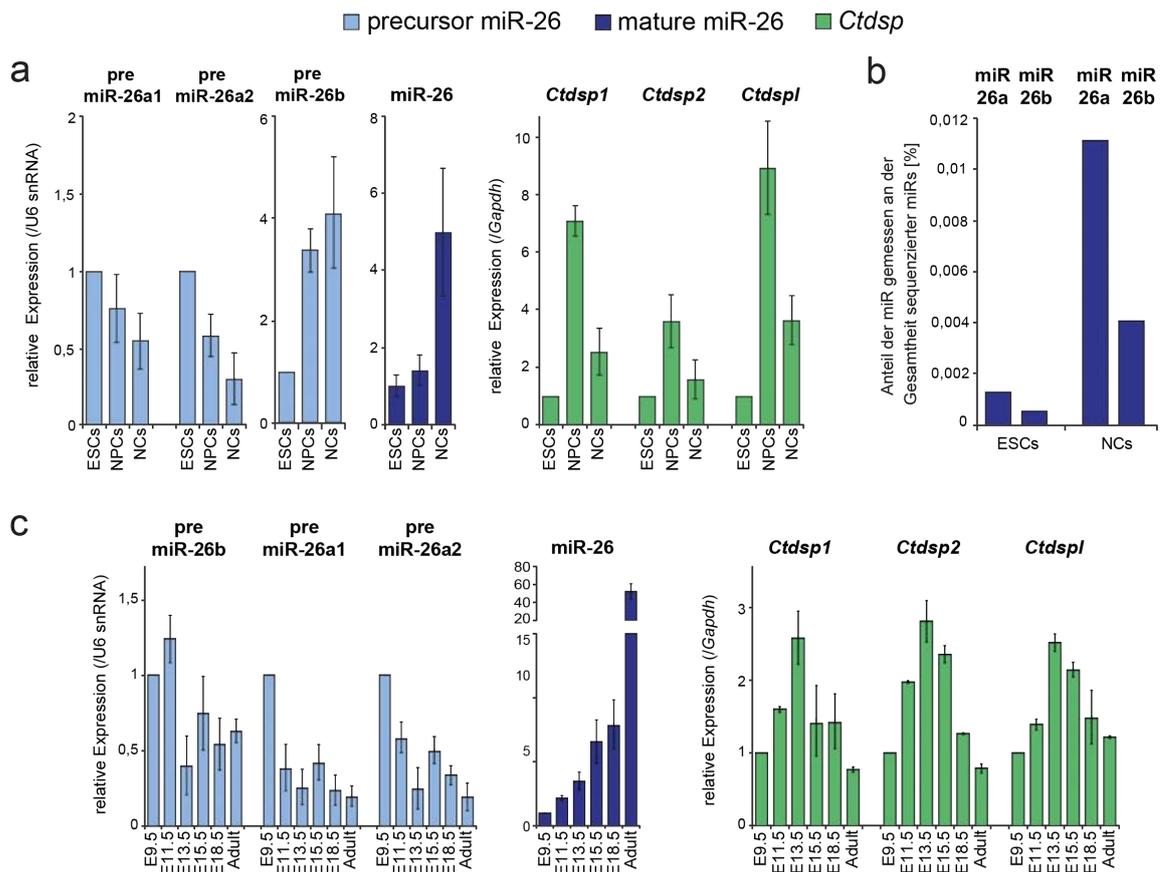


Abbildung 11: Expression der miR-26 Familie und *Ctdsp1,2,l* während der neuralen Differenzierung von murinen ESCs und der embryonalen Neurogenese im Mausgehirn.

(a) Genexpression von precursor und maturaer miR-26a1/a2/b und *Ctdsp1,2,l* in ESCs (Tag 0), NPCs (Tag 10) und NCs (Tag 15) (qRT-PCR). (b) Quantifizierung der miR-26a und miR-26b Expression in ESCs und in NCs, berechnet anhand der prozentualen Anteile dieser miRs bzw. der Menge an Transkript-Reads an der Gesamtheit sequenzierter miRs in der RNA-Seq Analyse. (c) Genexpression von precursor und maturaer miR-26a1/a2/b sowie *Ctdsp1,2,l* im Gehirn von Mausembryonen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien sowie im adulten Mausgehirn (qRT-PCR). Die Genexpression wurde normiert über die Expression von U6 snRNA (für miR-26) und *Gapdh* (für *Ctdsp*). In a und c sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Differenzierungen (n = 3) sowie von mindestens 3 verschiedenen Mausembryogehirnen aus verschiedenen trächtigen Weibchen (n = 3) gezeigt. In b sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Differenzierung gezeigt (n=4).

3.3 Herstellung und Validierung der miR-26 *knockout* ES-Zelllinien

Um ein besseres Verständnis über die spezifischen Funktionen der miR-26-Familienmitglieder während der Neurogenese zu erhalten wurden in dieser Arbeit „*Loss of Function*“-Studien durchgeführt. Zur Generierung von verschiedenen miR-26 *knockout* (KO) ES-Zelllinien, bzw. der Deletion der miR-26 Loci im Genom von ESCs wurde die CRISPR/Cas9-Methode verwendet (zur Veranschaulichung der verschiedenen

generierten miR-26-KO ES-Zelllinien siehe **Abb. 12a**). Zu diesem Zweck wurde der CRIPR/Cas9-Nikase-Vektor pX335-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9n (D10A) (Addgene ID # 42335) zur Herstellung der miR-26-KO ESCs gewählt, der eine mutierte Cas9 Endonuklease codiert (auch bekannt als Cas9 DNA-Nickase) und einen DNA-Einzelstrangbruch verursacht. Dies hat den Vorteil der erhöhten Spezifität durch die Notwendigkeit von zwei gegenüberliegenden Cas9 Nickasen für einen erfolgreichen Doppelstrangbruch. Es wurden homozygote klonale ESC-Linien mit einer miR-26b Deletion (KO^{26b}), ESC-Linien mit der Deletion der beiden miR-26a1 und 26a2 (dKO^{26a1/a2}) und ESC-Linien mit der Deletion aller miR-26 Familienmitglieder hergestellt (tKO^{26b/a1/a2}). Um tKO^{26b/a1/a2} ESC-Linien zu erzeugen, wurde ein miR-26b KO ESC Klon (CCC3#48) als Ausgang benutzt um dann die genomischen Sequenzen der miR-26a1 und miR-26a2 zu deletieren. Die miR-26-KO ESC-Klone wurden zum Zwecke der Archivierung nummeriert (Beispiel: CCC3#48 = CRISPR Cas Clone, 3 ist eine laborinterne Nummerierung der hergestellten KO ESC-Linien, #48 ist die Nummerierung der ESC-Klone innerhalb einer KO-ESC-Linie). Für eine detaillierte Beschreibung zur Herstellung der miR-26-KO Zelllinien siehe Methodenteil, Kapitel 2.2.4. Die ESCs wurden nach der Transfektion selektiert und genotypisiert. Zur Genotypisierung wurde die genomische DNA von Wt ESCs und potentiellen miR-26-KO ESC-Klonen in einer PCR mit Primern, die den miR-26 codierenden Bereich abdecken, analysiert. Etwa ein Drittel aller analysierten ESC-Klone zeigte eine wildtypische miR-26 Sequenz, ein Drittel eine heterozygote Deletion der miR-26 Sequenz, und ein weiteres Drittel eine homozygote Deletion der miR-26 Sequenzen. Anhand der Anzahl und des spezifischen Laufverhaltens der PCR Produkte im Agarosegel bei der elektrophoretischen Auftrennung ist dies zu erkennen, wie in **Abb. 12b** für je zwei homozygote miR-26-KO-Klone gezeigt. Für die weitere Charakterisierung und Validierung wurden je zwei unabhängige ESC-Klone je KO-Typ (KO^{26b}, dKO^{26a1/a2}, tKO^{26b/a1/a2}) ausgewählt und verwendet. Die Ergebnisse der Validierung sind in **Abb. 12b-d** zusammengefasst. Die Produkte der miR-26-spezifischen PCR aus unterschiedlichen KO ESC-Klonen wurde jeweils aufgereinigt und sequenziert. Wie in **Abb. 12c** gezeigt, war nicht bei allen Klonen die komplette miRNA-Sequenz aus dem Genom herausgeschnitten. Es ist aber davon auszugehen, dass die Deletion aller miR-26 Familienmitglieder zu einer Zerstörung der sekundären Stammschleifen-Struktur der primären miRNA führt. Somit kann der Mikroprozessor-Komplex bestehend aus der RNase Drosha und zwei DGCR8 Proteinen diese nicht erkennen und weiter prozessieren und es entsteht keine funktionsfähige reife miRNA. Zur weiteren Verifizierung der miR-26-KOs wurde die Expression der pre-miR-

26 in den unterschiedlichen KO-Klonen via qRT-PCR analysiert (**Abb. 12d**). Diese Expressionsanalyse zeigt, dass die pre-miRNAs in den jeweiligen miR-26-KO ESCs nicht exprimiert werden und bestätigt den KO der jeweiligen miRNA in den ESC-Linien.

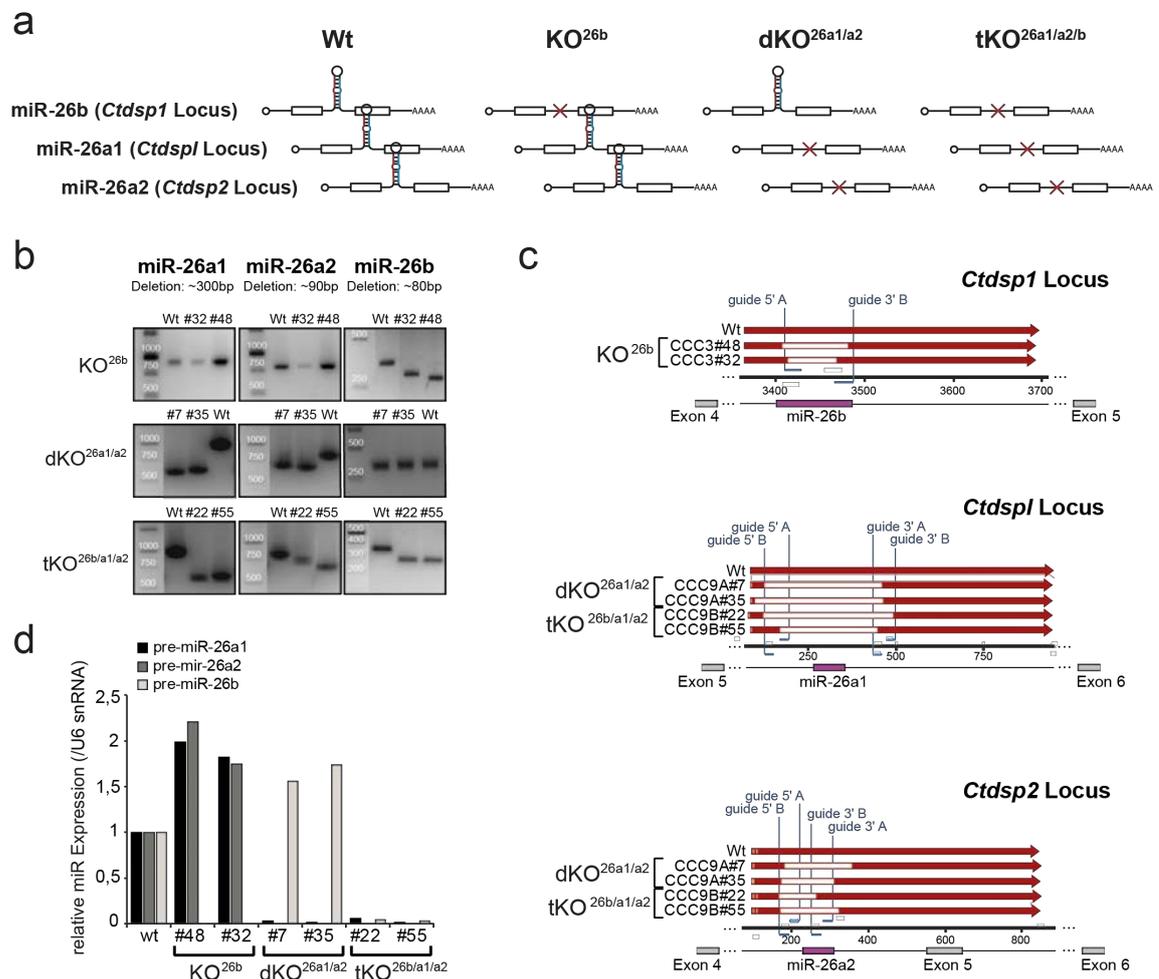


Abbildung 12: Validierung der generierten miR-26-KO ES-Zelllinien.

(a) Schematisches Schaubild der miR-26-KO ES-Zelllinien. Gezeigt sind die *Ctdsp*-Loci und die intronisch kodierten miR-26 Familienmitglieder sowie die deletierten miR-26 Sequenzen (rote Kreuze). (b) Gelbild der PCR-Produkte aus der miR-26b, -a1 und -a2 spezifischen PCR-Analyse mit genomischer DNA von Wt ESCs und von je zwei miR-26-KO ESC-Klonen. (c) Alignment der Gensequenzen von miR-26-KO ESC-Klonen und Wt ESCs. Gezeigt sind Teile der *Ctdsp1,2,1* Loci und die Position der miR-26b, miR-26a1, miR-26a2 Sequenzen (lila Balken) in den Introns Ihrer Wirtsgene. Die Positionen der komplementären Sequenzen der sgRNAs für die Cas9-Nickase Deletion sind in blau eingezeichnet. Übereinstimmungen in der Nukleotid-Sequenz der KO Klone werden über durchgehende rote Balken dargestellt und ein Fehlen bzw. eine Deletion durch offene Bereiche. (d) qRT-PCR-Analyse spezifisch für die precursor miRs 26a1, a2 und b unter Verwendung von RNA-Proben aus Wt und von miR-26-KO ESCs (Expression normiert über die U6 snRNA).

Die bei der Deletion der miR-26 Familie, speziell die bei miR-26a1 und 26a2 Deletion, herausgeschnittene Sequenz im Genom reichte geringfügig über die eigentliche miR Sequenz hinaus, bedingt durch die Notwendigkeit einer PAM-Sequenz, als notwendige

Bindestelle für Cas9. Somit hätten auch potentiell Spleißsignale in der Sequenz von *Ctdsp* Introns gestört werden können. Aus diesem Grund wurden die einzelnen miR-26-KO ESC-Klone auf die Integrität ihrer Wirtsgene (*Ctdsp1,2,l*) mit Hilfe der generierten RNA-Seq Daten (genaue Beschreibung siehe Kapitel 2.2.7 und 3.8) untersucht. Bei dieser Analyse zeigte sich keine Veränderung in den einzelnen miR-26-KO ESC-Klonen im Vergleich zu Wt ESCs (**Abb. 13**), bis auf einen KO^{26b} ESC-Klon. Die miR-26-umgebenden *Ctdsp* Exone 4 und 5 zeigten bei diesem ESC-Klon sehr viel weniger Reads. Dieser Klon wurde deshalb von weiteren Analysen ausgeschlossen (CCC3#29, nicht gezeigt) und durch einen neuen validierter Klon ersetzt (CCC3#32, Validierung siehe **Abb. 12**). Für die weiteren Analysen innerhalb dieser Arbeit wurden zwei unabhängige ESC-Klone für jede homozygote miR-26 Deletion (KO^{26b}: CCC3#32/#48; dKO^{26a1/a2}: CCC9A#7/#35; tKO^{26b/a1/a2}: CCC9B#22/#55) verwendet.

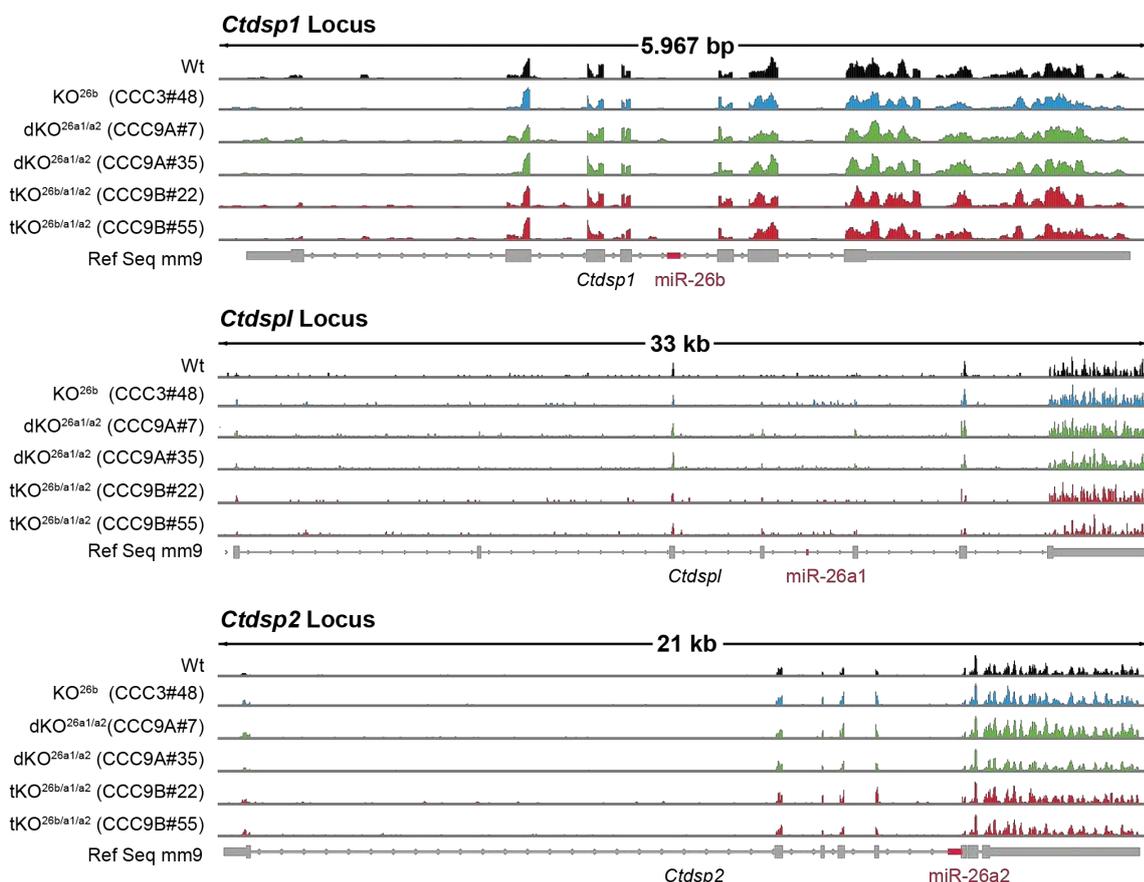


Abbildung 13: Quantifizierung der Transkript-Reads von *Ctdsp* Loci in miR-26-KO ES Zelllinien.

Transkript-Reads von *Ctdsp1*-, *CtdspL*- und *Ctdsp2*-Loci unter Verwendung der RNA-Seq-Daten von Wt-ESCs und der verschiedenen miR-26-KO ESC-Linien (farblich kodiert: Wt = schwarz, KO^{26b} = blau, dKO^{26a1/a2} = grün, tKO^{26b/a1/a2} = rot). Unterhalb der Transkript-Reads ist jeweils in grau die Referenzsequenz mit der genomischen Organisation der *Ctdsp* Loci, der Intron-Exon Struktur und der intronisch kodierten miR-26 (rot) gezeigt.

Zur Kontrolle der Spezifität sgRNAs wurden die Top 4 vorausberechneten, potentiellen Off-Target Bindestellen der sgRNAs im Genom (siehe Tabelle **Abb. 14b**) für den miR-26b-KO auf Mutationen überprüft. Nur eine Off-Target Bindestelle (Guide 5'A #2) befand sich dabei in einem codierenden Bereich des Genoms. Weiterhin sind in allen potentiellen Off-Target Bindestellen mindestens 3 *Missmatches* mit der sgRNA Sequenz vorhanden. In **Abb. 14a** ist der *Ctdsp1* Locus mit Intron-Exon Struktur, der intronisch kodierten miR-26b, den Bindestellen der sgRNA und der Nickase-Schnittstelle schematische dargestellt. Für die experimentelle Überprüfung von möglichen Off-Target Effekten wurden PCRs mit genomischer DNA von Wt und einem miR-26b-KO ESC-Klon (CCC3#48) spezifisch für die Off-Target Bindestellen durchgeführt. Die PCR Produkte wurden anschließend sequenziert und die Sequenzen mit der Sequenz im Wt und mit der Referenz Sequenz (Ref-Seq mm9, NCBI) abgeglichen. Dabei zeigte sich eine 100%ige Sequenz-Übereinstimmung aller potentieller sgRNA Off-Target Bindestellen in den miR-26b-KO ESCs in Vergleich zu Wt ESCs (**Abb. 14c**). Dies zeigt, dass durch die Deletion der miR-26b über die CRISPR/Cas9-Methode keine Veränderungen im Genom der ESC-Linie auf Grund von Off-Target Effekten festgestellt wurde.

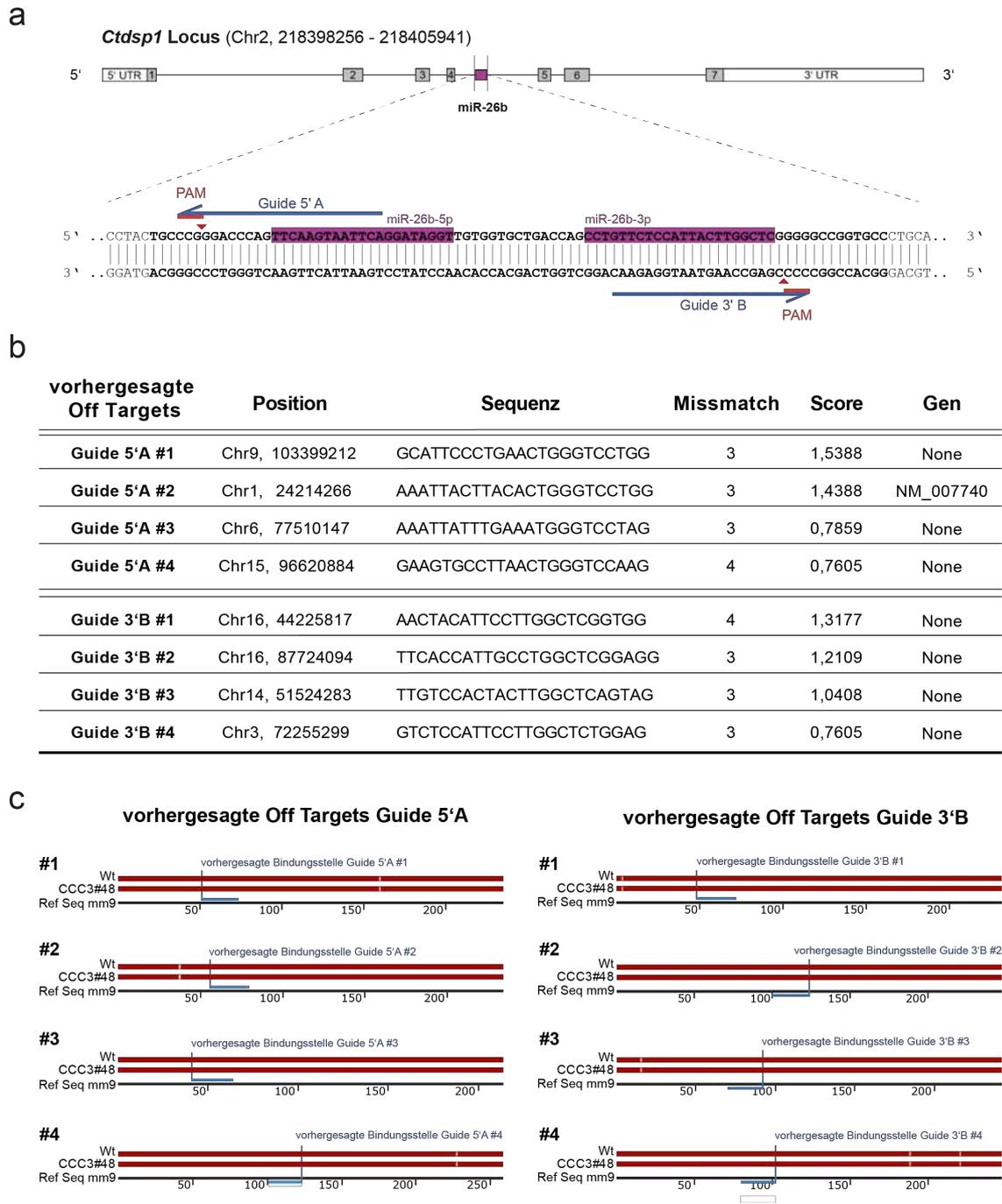


Abbildung 14: Analyse der potentiellen Off-Target Stellen in miR-26b KO ES Zelllinien.
(a) Schematische Darstellung des Ctdsp1 Locus mit der intronischen miR-26b zwischen Exon 4 und 5 (lila)(oben). Gezeigt ist auch ein Sequenzausschnitt der beiden miR-26 Transkripte (lila), die Bindungsstellen für die Guides (blaue Pfeile) mit PAM Sequenzen und die Schnittstelle der Cas9 Nickase (roter Pfeil). **(b)** Tabelle mit den vorausberechneten potentiellen Off Target Sequenzen für Guide 5'A und Guide 3'B aus dem CRISPR Design Web-Tool (<http://crispr.mit.edu/>). **(c)** Alignment der Sequenzen der PCR-Produkten aus genomischer DNA von Wt ESCs und miR-26b KO ESC Klon verglichen mit der Referenzsequenz (Ref Seq mm9) im Bereich der potentiellen Bindungsstellen der Guide RNAs (blau).

3.4 Die Deletion der miR-26 Familie zeigt keine Auswirkung auf die Differenzierung zu NPCs

Für eine erste Analyse eines potenziellen Phänotyps wurden die miR-26-KO ESCs zu NPCs differenziert. Untersucht wurden hierbei die Morphologie der Zellen in den einzelnen Differenzierungsstadien, die Proliferation in ESC und EB Kulturen, die Expression von Pluripotenz-assoziierten Genen in ESCs mittels qRT-PCR und die Expression von neuronalen Vorläufermarkern in NPCs mittels immunhistochemischer Fluoreszenzfärbungen.

Verglichen mit den Wt ESC-Kolonien, bildeten alle miR-26-KO ESC-Linien Kolonien mit ESC typischer Morphologie. Auch in den folgenden Stadien der Differenzierung bis hin zu NPCs (EBs, att. EBs, NPCs) konnte keine auffällige Veränderung der zellulären Morphologie, hervorgerufen durch die miR-26 Deletion, festgestellt werden (**Abb. 15a**). Zur Untersuchung der Proliferation von Wt bzw. miR-26-KO ESCs wurden die ESCs 8 Tage lang in Kultur gehalten, wobei sie jeden zweiten Tag gesplittet, gezählt und wieder in einer Zelldichte von $12,5 \times 10^3$ Zellen/cm² ausgesät wurden. Zur Quantifizierung wurden kumulative Populationsverdopplungszahlen (*cumulative population doublings* = CPD) an Tag 2, 4, 6 und 8 ermittelt (**Abb. 15b**). Bei dieser Untersuchung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Wt und miR-26-KO ESC-Kulturen festgestellt werden. Auch die Expression der Pluripotenzmarker *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* und *Rex1* blieb in den miR-26-KO ESCs unverändert auf dem gleichen Level wie in Wt ESCs (**Abb. 15c**). Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die miR-26 Deletion einen Einfluss auf die EB-Formierung hat. Zu diesem Zweck wurden Zellzahlen, Morphologie und Größe der EBs zu unterschiedlichen Zeitpunkten der EB Kultur bestimmt. Die EBs wurden an Tag 2 und 4 der Differenzierung vereinzelt und Zellzahlen bestimmt (**Abb. 15d**). Diese Quantifizierung zeigt, dass eine Verdopplung der Zellzahl in den EB Kulturen 2 Tage nach dem Ausplattieren der ESCs sowohl in Wt als auch in miR-26-KO Kulturen gemessen werden konnte. Am 4. Tag der EB Kultur stieg die Zellzahl um den Faktor 3 von anfangs ausgesäten 2 Mio. auf etwa 6 Mio. Zellen. Die dKO^{26a1/a2} EB Kulturen zeigten leicht niedrigere Zellzahlen, jedoch stellt dies keine signifikante Veränderung im Vergleich zum Wt dar. Bezüglich der Morphologie und Größe der gebildeten EBs waren keine Veränderungen durch die Deletion sowohl einzelner Mitglieder als auch der kompletten miR-26 Familie nachweisbar (**Abb. 15a**). Um das Wachstum und die Größe der EBs genauer zu ermitteln, wurde eine definierte Menge ESCs in hängenden Tropfen

differenziert. An Tag 2 der Kultivierung der ESCs in hängenden Tropfen wurden mikroskopische Aufnahmen erstellt und die eingenommene Fläche durch die EBs auf diesen Phasenkontrastbildern errechnet. Auch in dieser Analyse konnte keine Veränderung, hervorgerufen durch die Deletion der miR-26 Familienmitglieder, ermittelt werden (**Abb. 15e**). Im nächsten Schritt wurden NPCs an Tag 10 der Differenzierung gegen die neuralen Vorläufermarkern SOX2, NESTIN und MSI1 angefärbt (**Abb. 15a**, rechte Spalte). Bei der Quantifizierung dieser Immunfärbungen zeigten sich sowohl in den Wt als auch in den verschiedenen miR-26-KO Kulturen etwa 60% der Zellen positiv für diese Marker (**Abb. 15f**).

Aufgrund dieser ersten Untersuchungen zur Morphologie, Proliferation und Markerexpression in den miR-26-KO Zelllinien während der frühen neuralen Differenzierung konnte gezeigt werden, dass sowohl die Deletion einzelner miR-26-Familienmitglieder als auch die Deletion der gesamten miR-26 Familie keinen Einfluss auf die Differenzierung von ESCs zu neuralen Vorläuferzellen hat.

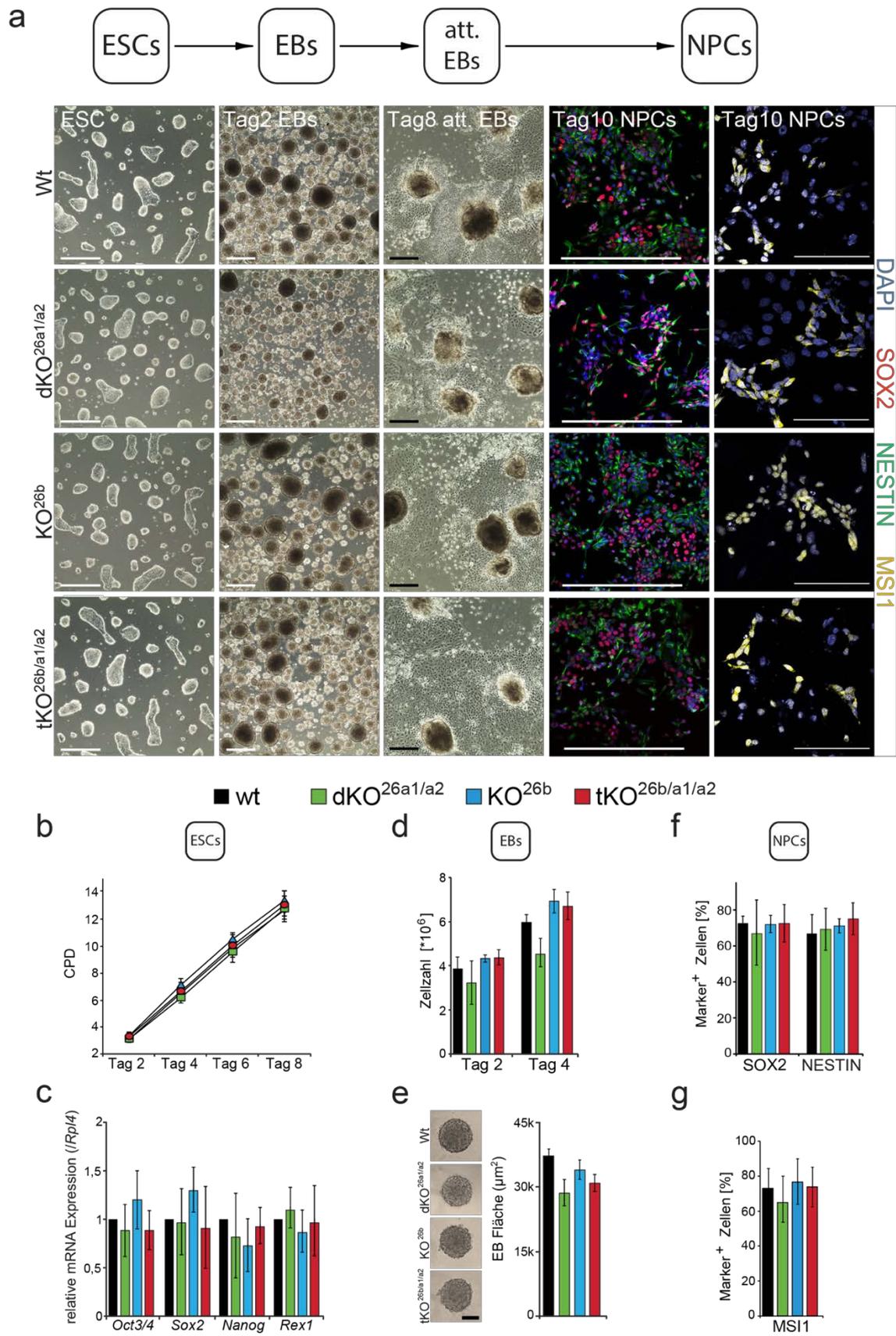


Abbildung 15: Morphologie, Proliferation und Expression verschiedener Marker in miR-26-KO Zellkulturen bis zum NPC Stadium.

(a) Repräsentative Phasenkontrastbilder von Wt und miR-26-KO Zellkulturen, welche die morphologischen Veränderungen während der neuralen Differenzierung von ESCs über EBs zu adhären EBs und NPCs zeigen. In den beiden letzten rechten Spalten sind SOX2-, NESTIN- und MSI1-spezifische Immunfärbungen von NPC Zellkulturen zu sehen. (b) Quantifizierung der kumulativen Populationsverdopplungen (CPD) von Wt und miR-26-KO ESCs. ($n \geq 3$) (c) Expression der Pluripotenzmarkergene *Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog* und *Rex1* in Wt und miR-26-KO ESCs (qRT-PCR, $n = 3$). (d) Quantifizierung der Zellzahlen in Wt und miR-26-KO EB Suspensionskulturen an Tag 2 und 4 der Differenzierung. ($n = 2$) (e) Messung und Quantifizierung der Fläche der EBs an Tag 2 der Kultur in hängenden Tropfen (je 1000 Zellen / 30 μ L Medium) ($n = 2$). (f,g) Quantifizierung des Anteils SOX2⁺, NESTIN⁺ und MSI1⁺ Zellen in Wt und miR-26-KO NPC Kulturen an Tag 10 ($n \geq 3$), Maßstabsbalken: NESTIN/SOX2 Färbung: 250 μ m; MSI1 Färbung: 100 μ m.

3.5 miR-26-KO NPCs besitzen ein reduziertes neuronales und astrogliales Differenzierungspotential

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass die miR-26-KO ESCs zu NPCs differenzieren können. Der nächste Schritt war die Differenzierung dieser NPCs zu neuronalen und glialen Zellen zu analysieren. Wt NPCs differenzierten, unter den definierten neuronalen Differenzierungsbedingungen, nach 15 Tagen in Kultur zu Zellen mit charakteristisch neuronaler Morphologie. Diese Zellen zeigten sich zum Großteil in der Immunfärbung positiv für TUBB3 und MAP2, beides typische Marker für postmitotische Neurone. Einige Zellen zeigten ebenso die Expression des Astroglia-spezifischen Markers GFAP an (**Abb. 16a**, obere Bildreihe). Hingegen bildeten sich in den miR-26-KO Zellkulturen zum selben Zeitpunkt der Differenzierung nur sehr wenige Zellen mit neuronaler Morphologie (**Abb. 16a**). Weiterhin konnte nur für wenige vereinzelte Zellen in der Immunfärbung ein positives Signal für die neuronalen Marker TUBB3 (tKO^{26b/a1/a2}: $4,55 \pm 2,24\%$) und MAP2 (tKO^{26b/a1/a2}: $3,39 \pm 1,25\%$) im Vergleich zum Wildtyp (TUBB3: $55,27 \pm 5,05\%$; MAP2: $43,34 \pm 5,53\%$) detektiert werden (Quantifizierung **Abb. 16b**). Der direkte Vergleich von dKO^{26a1/a2} und KO^{26b} NCs zeigte, dass die Deletion der miR-26a1 und 26a2 den größeren und im Vergleich zu KO^{26b} signifikanten Unterschied beim Anteil der neuronalen Zellen ausmachte (TUBB3: dKO^{26a1/a2}: $8,97 \pm 7,426\%$, KO^{26b}: $18,95 \pm 7,36\%$; MAP2: dKO^{26a1/a2}: $1,96 \pm 0,91\%$, KO^{26b}: $15,66 \pm 9,43\%$). Darüber hinaus konnte in allen differenzierten miR-26-KO Zelllinien eine reduzierte Frequenz von Gfap⁺ Zellen beobachtet werden (Wt: $2,27 \pm 0,92\%$; tKO^{26b/a1/a2}: $0,46 \pm 0,20\%$) (**Abb. 16a,b**).

Um klonale Effekte auszuschließen wurde ein Rescue Experiment durchgeführt (schematische Darstellung siehe **Abb. 16c**). Hierfür wurden tKO^{26b/a1/a2} NPCs an Tag 9

der Differenzierung mit miR-26 mimics transfiziert. miRNA mimics sind doppelsträngige Oligonukleotide, die nach Transfektion die Funktionen reifer endogener miRNAs übernehmen. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden, wie in **Abb. 16c** gezeigt, die Expressionslevel der miR-26 nach der Transfektion mittels qRT-PCR analysiert. Die Analysen ergaben eine um das 165,93-fach ($\pm 41,10$) erhöhte Level der miR-26a nach Transfektion der miR-26a mimics und ein um das 95,76-fach ($\pm 22,30$) erhöhte Level der miR-26b nach Transfektion der miR-26b mimics. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die in der qRT-PCR nachgewiesene Überexpression nicht der Anzahl der miR mimics entspricht, die auf RISC geladen werden und aktiv die Proteinexpression hemmen [212]. Die Expressionsdaten zeigen also lediglich die erfolgreiche Transfektion der miR mimics. Die Funktionalität dieser miR-26 mimics wurde jedoch zusätzlich durch die Herunterregulation der Ziel mRNA von *Ctdsp* nachgewiesen (siehe **Abb. 25b**). Die mit miR-26 mimics transfizierten Zellkulturen wurden an Tag 15 der Differenzierung (6 Tage nach der Transfektion) fixiert, gegen den neuronalen Marker TUBB3 gefärbt und der Anteil der positiven Zellen wurde quantifiziert. Zur Kontrolle wurden Wt und tKO^{26b/a1/a2} NPCs mit *C. elegans* miR-67 mimics (ctrl mimics) transfiziert, die eine minimale Sequenzidentität mit miRNAs in der Maus besitzt und identisch zu den miRNA mimics entworfen wurde. Zusätzlich wurden als „positiv“ Kontrolle miR-124 mimics verwendet, da die miR-124 die am häufigsten vorkommende miRNA im Gehirn ist und eine essentielle miRNA für die neuronale Differenzierung darstellt [149, 152, 213]. **Abb. 16d,e** zeigt die Ergebnisse dieser Analyse. Bei der Quantifizierung der TUBB3⁺ Zellen konnte durch die Transfektion von tKO^{26b/a1/a2} NPCs mit miR-26 mimics der KO-Phänotyp gerettet werden. In tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen, die mit miR-26 mimics transfiziert wurden, konnten erhöhte Frequenzen von postmitotischen Neuronen quantifiziert werden im Vergleich zu tKO^{26b/a1/a2} Kulturen, die mit ctrl mimics transfiziert wurden. Diese transfizierten tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen zeigten annähernd ähnliche Frequenzen von postmitotischen Neuronen wie sie in Wt Kulturen zu finden waren.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Deletion sowohl der kompletten miR-26 Familie als auch einzelner Mitglieder die neurale Differenzierung stark beeinflusst, da der KO dieser miR-26 Familie zu einer signifikanten Reduktion der neuronalen und glialen Zellen in diesem Differenzierungssystem führt. Diese funktionellen Analysen lassen vermuten, dass die miR-26 für die neuronale Entwicklung ein essentieller Faktor darstellt. Bemerkenswert ist, dass obwohl Sie sich nur in zwei Nukleotiden unterscheiden und eine identische Seed Sequenz besitzen, die Deletion von

entweder miR-26b oder die Deletion von miR-26a1 und -26a2 bereits ausreichend ist, um die Differenzierung von NPCs zu NCs zu inhibieren, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Außerdem zeigen diese Daten, dass die noch vorhandenen miR-26 Level in KO^{26b} und in dKO^{26a1/a2} Zellkulturen diesen Effekt auf die neuronale Differenzierung nicht kompensieren können (Abb. 16a,b).

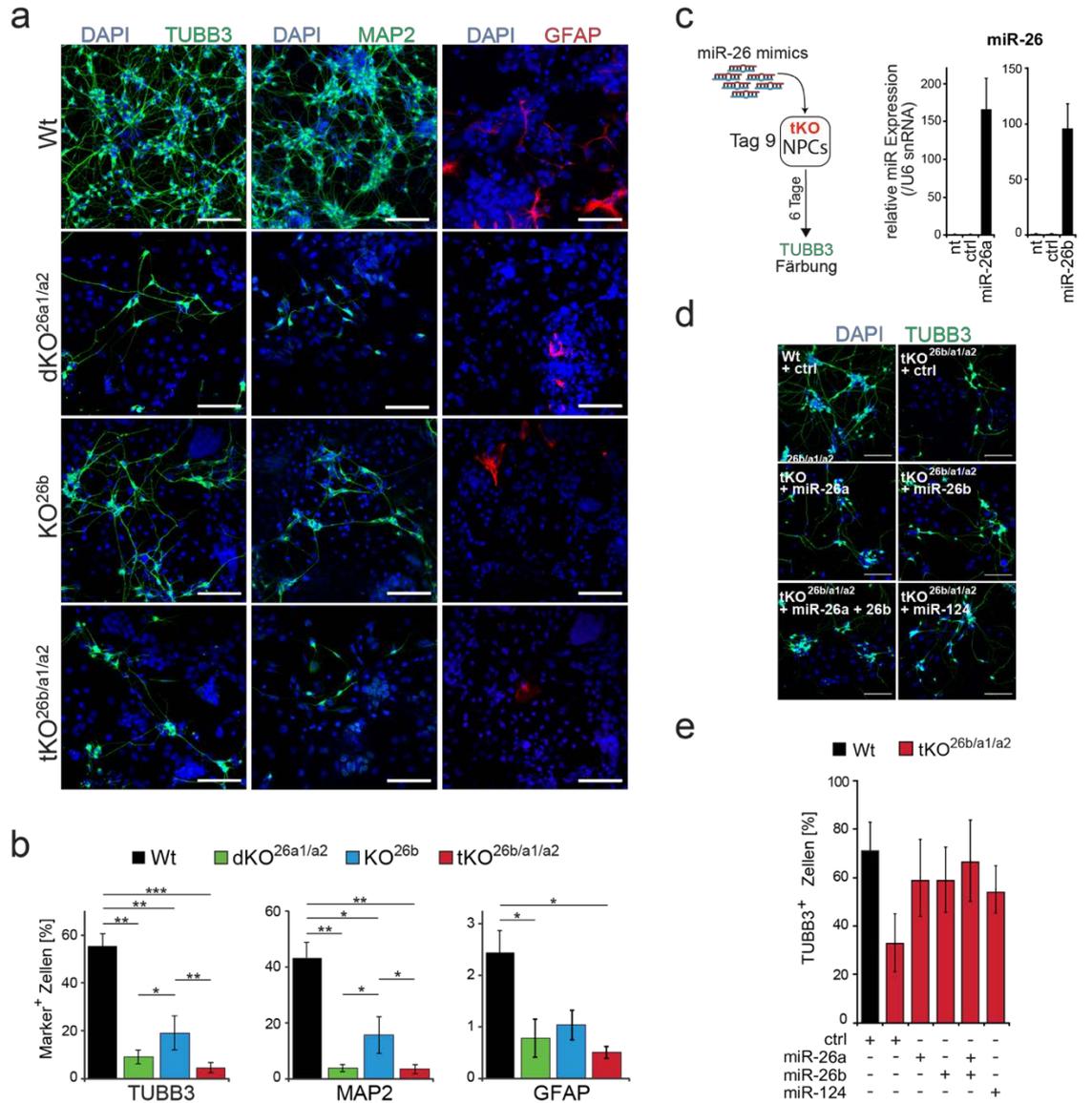


Abbildung 16: Immunfärbung der Wt und miR-26-KO Zellkulturen nach der Differenzierung. (a) Repräsentative Immunfärbung von d15 Wt und miR-26-KO Kulturen. (b) Quantifizierung der Zellzahlen, die ein positives Signal für die neuronalen (TUBB3, MAP2) oder dem glialen (GFAP) Marker zeigen (n ≥ 3). (c) schematische Veranschaulichung des Rescue Experiments mit miRNA mimics (links). Expression der miR-26 72 Std. nach der Transfektion mit miRNA mimics (rechts, qRT-PCR). Als Kontrolle diente die Expression in nicht transfizierten (nt) Zellen und Zellen, die mit ctrl-mimics transfiziert wurden. (d) Repräsentative Immunfärbung gegen TUBB3 von Wt und tKO^{26b/a1/a2} d15 Kulturen (Tag 15), 6 Tage nach der Transfektion mit miR-26a, miR-26b, miR26a und miR26b, miR124 oder ctrl-mimics. (e) Quantifizierung von TUBB3⁺ Zellen [%] in den Zellkulturen, transfiziert mit miR mimics (n = 2). Maßstabsbalken: 100 µm, zwei-seitiger t-test *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,005.

3.5.1 Einfluss des miR-26-KOs auf die Neuritendichte und die Axonlänge

Um den Einfluss der Deletion der miR-26 Familie auf die Neuritendichte und das Axonwachstum der wenigen Neurone in den differenzierten miR-26-KO Zellkulturen zu analysieren, wurden genauere morphologische Untersuchungen der Neurone durchgeführt. Zunächst wurde die Neuritendichte in d15 Wt und miR-26-KO Zellkulturen mittels einer Rasteranalyse untersucht (**Abb. 17a**). Hierfür wurden Bildausschnitte von TUBB3 Immunfärbungen (aus **Abb. 16a**) verwendet, mit einem Raster überlagert, die Schnittpunkte der neuronalen Ausläufer mit dem Linien im Raster quantifiziert und zur Normierung mit der Anzahl an Zellen in diesen Bildausschnitten verrechnet. Die quantifizierten Schnittpunkte von Neuriten pro Zelle (DAPI gefärbte Zellkerne) in Wt und miR-26-KO Kulturen wurden dann verglichen (detaillierte Beschreibung der Analyse siehe Kapitel 2.2.2.2). Bei dieser Analyse zeigte sich eine deutlich geringere Neuritendichte in den miR-26-KO Zellkulturen verglichen mit Wt Zellkulturen. Wie im voran gegangenen Kapitel ist der größte Effekt bei den Zellkulturen von dKO^{26a1/a2} und tKO^{26b/a1/a2} zu beobachten. Die Analysen von Wt Zellkulturen zeigte pro Zelle etwa 0,74 Raster-Schnittpunkte, wohingegen in tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen nur etwa 0,06 Schnittpunkte pro Zelle quantifiziert werden konnten.

Die Untersuchung der Neuritendichte lässt allerdings keine Aussagen über das Axonwachstum einzelner Neurone in den miR-26-KO Zellkulturen zu. Zur Analyse des Axonlänge einzelner Neurone, abgeleitet von Wt oder miR-26-KO ESCs wurde an Tag 9 der Differenzierung nur ein Drittel der normalerweise für die Differenzierung verwendeten Zellzahl ausgesät. Drei Tage nach dem Ausplattieren der NPCs (Tag 12) wurden die Neurone mit Antikörper gegen TUBB3 gefärbt. Somit wurde eine lokale Ansammlung von Zellen vermieden und die Länge der Axone einzelner Neurone ohne Kontakt zu anderen Zellen konnte gemessen werden. Bei dieser Analyse stellte sich nur ein relativ kleiner Unterschied in der Axonlänge von Wt verglichen mit miR-26-KO Neuronen heraus. Wie in **Abb. 17b** zu erkennen, bildeten die Neurone in Wt Zellkulturen innerhalb von 3 Tagen Axone mit einer durchschnittlichen Länge von $126,69 \pm 25,28 \mu\text{m}$ und einer maximalen Länge von $348,75 \pm 86,94 \mu\text{m}$. Die wenigen Neurone in den tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen bildeten neuronale Ausläufer mit einer durchschnittlichen Länge von $82,04 \pm 30,23 \mu\text{m}$ und einer maximalen Länge von $164,74 \pm 65,65 \mu\text{m}$.

Zusammengefasst konnte bei dieser Analyse eine starke Reduktion der Neuritendichte in allen miR-26-KO Zellkulturen festgestellt werden. Bei der Betrachtung der einzelnen Neurone, die trotz der Abwesenheit der miR-26 Familie differenzieren konnten, wurden in Anbetracht des starken Phänotyps jedoch nur eine geringe Auswirkung auf die Länge der Axone gemessen. Die differenzierten, einzelnen TUBB3⁺ Zellen und deren Axone in den miR-26-KO Neuronen zeigten keine auffälligen morphologischen Veränderungen verglichen mit den Wt Neuronen.

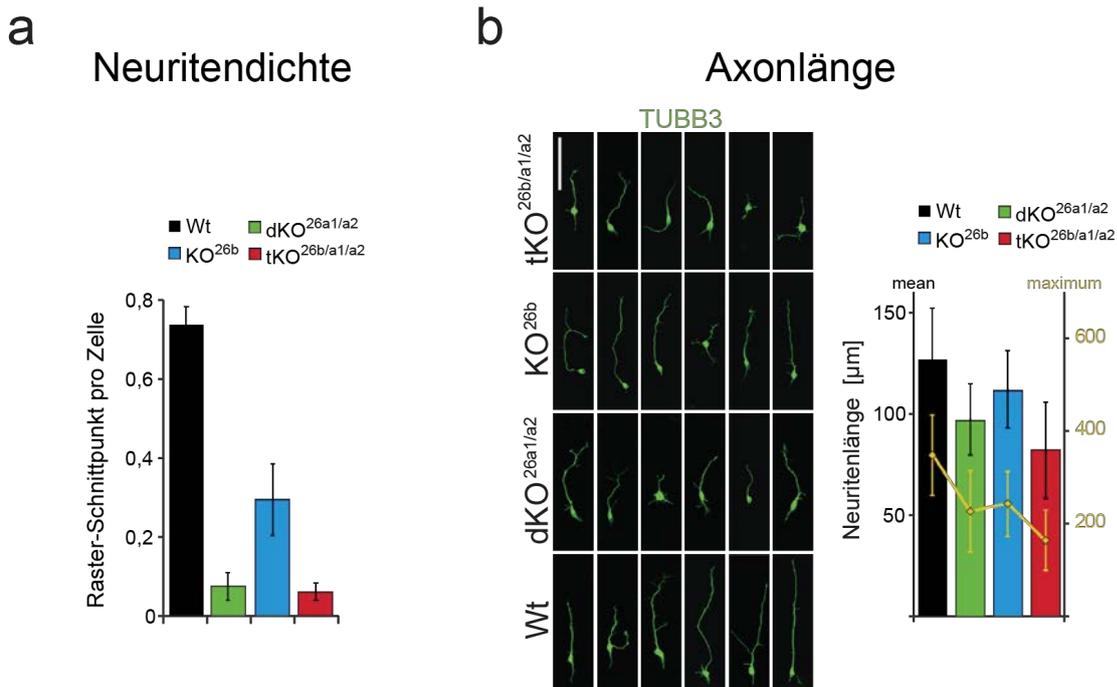


Abbildung 17: Analyse der Neuritendichte und Axonlänge von Wt und miR-26-KO Neuronen. (a) Quantifizierung der Neuritendichte von Wt und miR-26-KO Zellkulturen an Tag 15 der Differenzierung, gemessen über die Schnittpunkte der Neuriten mit einem gesetztes Raster pro Zelle (n = 2). (b) Repräsentative Aufnahmen von einzelnen Neuronen in Wt und miR-26-KO Zellkulturen, gefärbt gegen Tubb3 drei Tage nach dem ausplattieren der Zellen an Tag 9 (links, Maßstabsbalken = 100 µm). Quantifizierung der Axonlänge im Mittel und der maximalen Axonlänge von Wt und miR-26-KO Neuronen (rechts, n = 2).

3.6 Ein Großteil der miR-26-KO Zellen bleiben unter neuronalen Differenzierungsbedingungen in einem neuralen Vorläuferstadium

Die Analysen in Kapitel 3.5 zeigten eine starke Reduktion von Neuronen und Astroglia in miR-26-KO Kulturen im Vergleich zu Wt Kulturen nach der Differenzierung. Im nächsten Schritt sollte die Frage beantwortet werden, was mit den Zellen in den miR-26-KO Kulturen passiert, die nicht zu Neuronen bzw. zu Gliazellen differenzieren und welche Identität diese Zellen besitzen. Drei mögliche Szenarien wurden dabei näher betrachtet.

Erstens könnte während der Differenzierung durch eine erhöhte Apoptoserate oder eine geringere Zellviabilität in den miR-26-KO Zellkulturen die Zellzahl abnehmen und somit die Anzahl der für die terminale Differenzierung zur Verfügung stehenden Zellen reduziert sein. Zweitens könnten die miR-26-KO Zellen in andere, nicht neurale Zelltypen differenzieren. Drittens könnte durch eine Blockierung der terminalen Differenzierung ein Großteil der miR-26-KO Zellen in einem neuralen Vorläuferstadium arretiert bleiben.

Um das erste Szenario zu überprüfen und die Zellviabilität zu analysieren, wurde eine Färbung der Zellen mit Propidium-Jodid und Annexin V durchgeführt. Hierfür wurden Wt und miR-26-KO Zellkulturen an Tag 10, Tag 12 und Tag 15 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie die Anzahl an apoptotischen und toten Zellen bestimmt. Bei dieser Analyse war zu keinem der analysierten Zeitpunkte während der Differenzierung ein signifikanter Unterschied zwischen den Wt und miR-26-KO Zellkulturen zu erkennen (**Abb. 18a,b**). Weiterhin konnte durch die Quantifizierung der Zellzahl in tKO^{26b/a1/a2} und Wt Zellkulturen nach der Differenzierung (Daten nicht gezeigt) keine Verringerung, sondern eine Steigerung der Zelldichte in den tKO^{26b/a1/a2} Kulturen ermittelt werden. Durch diese Analysen konnte gezeigt werden, dass die Deletion der miR-26 Familie nicht zu einer verringerten Zellzahl oder einer erhöhten Anzahl an apoptotischen oder toten Zellen während der neuronalen Differenzierung führt.

Um zu untersuchen, ob die miR-26-KO Zellen zu nicht neuronalen Zelltypen differenzieren, wurden die RNA-Seq Ergebnisse von Wt und miR-26-KO Zellkulturen (genaue Beschreibung siehe Kapitel 2.2.7 und 3.8) untersucht. In dieser Analyse der differenziell exprimierten Gene in den miR-26-KO Zellkulturen im Vergleich zum Wt konnte keine

offensichtliche Tendenz zur Verschiebung der Zellidentität festgestellt werden. Somit konnte dieses Szenario vernachlässigt werden (siehe Kapitel 3.8 *GO-Term* Analyse).

Um das dritte Szenario, die Blockierung der Differenzierung, zu untersuchen wurden Färbungen gegen die neurale Vorläufermarker SOX2, NESTIN und MSI1 von d15 Wt und miR-26-KO Kulturen durchgeführt. In **Abb. 18c** ist gezeigt, dass es in d15 Wt Kulturen vereinzelt Zellen gibt, die durch die Immunfärbung als neurale Vorläufer charakterisiert werden konnten. Jedoch ist in den d15 miR-26-KO Zellkulturen, besonders in dKO^{26a1/a2} und tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen zu erkennen, dass sich größere Zellansammlungen bilden, die positiv für SOX2 und NESTIN sind (**Abb. 18c**). Außerdem unterscheiden sich die Zellen in miR-26-KO Kulturen im Vergleich zum Wt auch in ihrer Morphologie und Größe des Zellkerns. Dies weist auf ein vermehrtes Vorhandensein proliferierender neuraler Vorläuferzellen in den miR-26-KO Kulturen hin. Die Quantifizierung der Immunfärbungen zeigt einen signifikant höheren Anteil an Zellen, positiv für SOX2 (Wt: 10,56 ± 3,58%; tKO^{26b/a1/a2}: 25,95 ± 12,29%), NESTIN (Wt: 15,29 ± 4,99%; tKO^{26b/a1/a2}: 21,75 ± 5,84%) und MSI1 (Wt: 45,69 ± 7,15%; tKO^{26b/a1/a2}: 78,88 ± 4,13%), in den d15 miR-26-KO Zellkulturen im Vergleich zum Wt (**Abb. 18d**). Insgesamt zeigen die Daten eine erhöhte Frequenz an NPCs in den d15 miR-26-KO Zellkulturen im Vergleich zum Wt.

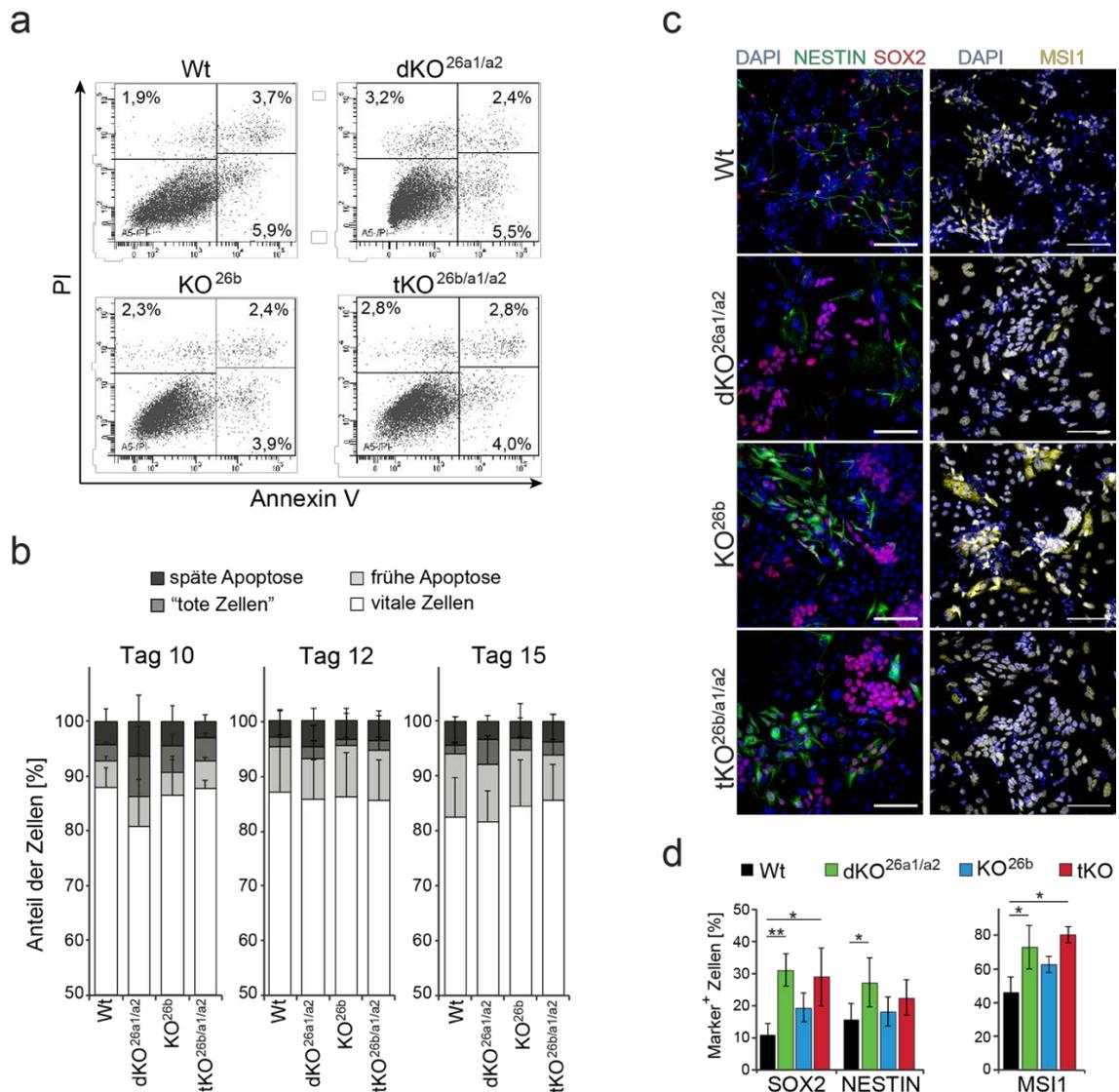


Abbildung 18: Analyse der Zellviabilität an verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung und Immunfärbungen von neuronalen Vorläuferzellen in d15 Wt und miR-26-KO Zellkulturen.

(a) Repräsentative Dotplots der PI/AnnexinV Färbung in Wt- und miR-26-KO NCs (Tag 15), analysiert mittels Durchflusszytometrie. Die Gesamtpopulation wurde in 4 verschiedene Sub-Populationen unterteilt: vitale Zellen (links unten, PI/AnnexinV^{-/-}), frühe Apoptotische Zellen (rechts unten, PI/AnnexinV^{-/+}), späte apoptotische Zellen (rechts oben, PI/AnnexinV^{+/-}) und tote Zellen (links oben, PI/AnnexinV^{+/+}). **(b)** Quantifizierung der PI/AnnexinV Färbung an Tag 10, 12 und 15, jeweils 3 unabhängige Differenzierungen (n = 3). **(c)** Repräsentative Immunfärbungen von Zellkulturen an Tag 15 der Differenzierung gefärbt gegen die neuronalen Vorläufermarker NESTIN, SOX2 und MSI1. Maßstabsbalken: 100 μ m. **(d)** Quantifizierung von Marker⁺ Zellen (n \geq 3). Zwei-seitiger t-test *: p \leq 0,05.

3.7 Die Deletion der miR-26 führt zu einem erhöhten Anteil an Zellen in der S/G₂/M-Phase an Tag 15 der Differenzierung

In Kapitel 3.6 wurden im Vergleich zu Wt Zellkulturen in den miR-26-KO Kulturen höhere Frequenzen von NPCs gezeigt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der Verlust der miR-26 zu einem Differenzierungsdefizit spezifisch im neuronalen Vorläuferstadium führt und die miR-26-KO Zellen anstatt zu differenzieren, in einem proliferierenden Vorläuferstadium arretiert sind. Um diese These weiter zu untermauern, wurden Zellzyklus Analysen an Tag 15 der Differenzierung durchgeführt und zusätzlich die Expression von Regulatoren des Zellzyklus analysiert.

Die qRT-PCR Analyse in **Abb. 19a** zeigt die Expression der Zellzyklus Regulatoren p16^{Ink4A}, p19^{Arf}, p21^{Cip1} und p53. In allen miR-26-KO Zellkulturen ist eine signifikant niedrigere Expression von p16^{Ink4A}, p19^{Arf}, p21^{Cip1} im Vergleich zu den Wt Zellkulturen an Tag 15 der Differenzierung zu erkennen. Diese Beobachtung lässt möglicherweise auf eine verringerte Hemmung von CDKs schließen, die dazu führt, dass der Zellzyklus beim Übergang von der G₁- zur S-Phase nicht mehr im selben Maße wie in Wt Zellen aufgehalten wird [214, 215]. Um diese Annahme zu prüfen wurden PI-Färbungen mit Wt und tKO^{26b/a1/a2} Zellen an Tag 15 durchgeführt und mittels Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil an Zellen in der G₀/G₁-Phase und S/G₂/M-Phase ermittelt. Die Analyse der Zellzyklusphasenverteilungen in tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen zeigte, im Vergleich zu Wt Zellkulturen, signifikant erhöhte Frequenzen von Zellen in S/G₂/M-Phase und weniger Zellen in G₀/G₁-Phase des Zellzyklus (**Abb. 19b**).

Die Zellzyklus Analysen zeigen, dass die Zellen in den miR-26-KO Zellkulturen nicht auf Grund von veränderter Zellviabilität oder Differenzierung in andere Zelltypen in ihrer Fähigkeit zur Differenzierung in neuronale und glialen Zellen beeinträchtigt sind. Es stellte sich vielmehr heraus, dass die Zellen auf Grund des miR-26 Defizits in einem neuronalen Vorläuferstadium arretiert sind und ein vermehrter Anteil der d15 miR-26-KO Zellen sich in einem proliferativen Zustand befindet, möglicherweise auch auf Grund einer nicht vorhandenen Hemmung am Übergang von G₁ zur S-Phase. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine entscheidende Rolle der miR-26 Familie während der terminalen Differenzierung von neuronalen Vorläufern zu postmitotischen reifen Neuronen.

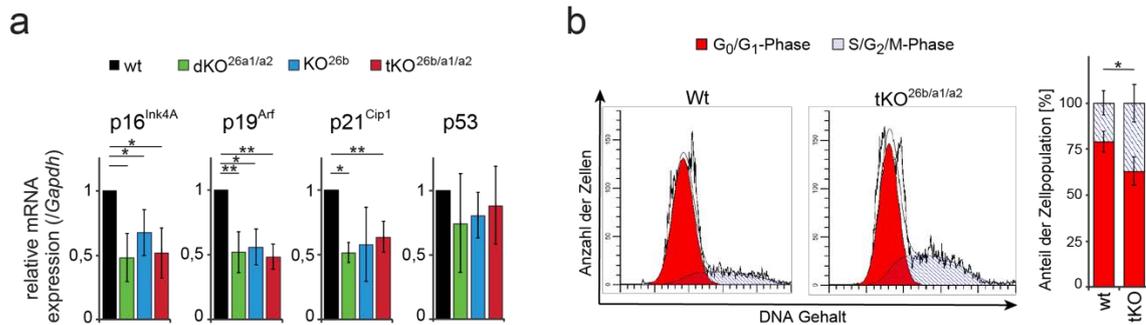


Abbildung 19: Zellzyklus Analyse der differenzierten Wt und miR-26-KO Zellen.

(a) Expressionsanalyse von p16^{Ink4A}, p19^{Arf}, p21^{Cip1} und p53 in d15 Wt und miR-26-KO Zellkulturen (qRT-PC). Zur Normalisierung der Genexpression wurde *Gapdh* verwendet (n = 4). (b) PI Färbung von differenzierten Wt und tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen an Tag 15 der Differenzierung. Repräsentative FACS-Plots von Wt und tKO^{26b/a1/a2} (links), ausgewertet mit der Zellzyklus-Analysesoftware ModFit LT Version 5.0 (Verity Software House). Quantifizierung der prozentualen Anteile von Zellen in der G₁/G₀- und S/G₂/M-Phase (rechts, n = 3). Zwei-seitiger t-test *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01

3.8 Globale Genexpressionsanalyse der d15 miR-26-KO Zellkulturen

Um auf molekularer Ebene zu untersuchen, wie die miR-26 Familie die neurale Differenzierung beeinflusst und um eine Erklärung für den Differenzierungsblock in den miR-26-KO Zellkulturen zu finden, wurden globale Genexpressionsprofile von d15 Wt, dKO^{26a1/a2}, KO^{26b} und tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen mittels RNA-Sequenzierungen erstellt.

Die bioinformatische Analyse der RNA-Seq Daten wurde in enger Zusammenarbeit mit Thomas Ziegenhals durchgeführt (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Utz Fischer, Universität Würzburg). Ergebnisse, die Teil der Dissertation von T. Ziegenhals sind, wurden markiert und in dieser Arbeit eingebettet, um die gesammelten Daten innerhalb dieses gemeinsamen Forschungsprojekts vollständig und besser verständlich für den Leser darzustellen. Im Appendix sind die individuellen Beiträge zu den einzelnen Abbildungen in einer Tabelle dargestellt (**Tab. 2**).

3.8.1 Die Deletion der miR-26 Familie führt zu einer globalen, negativen Regulation neuraler Transkripte

Zunächst wurden global die differentiell exprimierten Gene in den d15 miR-26-KO Zellkulturen im Vergleich zu den d15 Wt Zellkulturen betrachtet. Bei dieser Analyse wurden etwa die gleiche Anzahl an hochregulierten und herunterregulierten Genen in

dKO^{26a1/a2} (hoch: 11573, runter: 11443), KO^{26b} (hoch: 11508, runter: 11697) und tKO^{26b/a1/a2} (hoch: 12599, runter: 10778) bezogen auf den Wt beobachtet. Für weitere Untersuchungen wurden nur Transkripte betrachtet, die mindestens 2-fach hoch- bzw. herunterreguliert waren (**Abb. 20a**, rote und grüne Bereiche des Plots). Diese Auswertung ergab die größte Anzahl an regulierten Transkripten in den dKO^{26a1/a2} Zellkulturen (hoch: 1346, runter: 2307), während der KO^{26b} (hoch: 550, runter: 439) und der tKO^{26b/a1/a2} (hoch: 943, runter: 543) eine geringere Anzahl an regulierten Transkripten auswies (siehe Kreisdiagramme **Abb. 20a**). Durch das Klassifizieren der regulierten Gene über eine *Gene Ontology Term* Analyse (*GO-Term* Analyse) sollte herausgefunden werden, ob die regulierten Transkripte in den miR-26-KO Zellkulturen mit bestimmten übergeordneten biologischen Prozessen assoziiert waren (**Abb. 20b**). Eine ausführliche Liste der *GO-Terms* mit Angaben zur Analyse, Anzahl der geclusterten Gene jedes Terms und p-Werte sind im Appendix **Tab. 3,4,5,6** zusammengefasst. Bei der *GO-Term* Analyse zeigte sich für keine der d15 miR-26-KO Zelllinien ein offensichtlicher Zusammenhang bei der Gruppierung von hochregulierten Genen bis auf einige *GO-Terms* in KO^{26b} Zellen, die Muskelgewebe-assoziiert sind (KO^{26b}: *muscle system process*, *muscle contraction*, *muscle tissue development*, *striated muscle contraction*, *striated muscle tissue development*). Die *GO-Term* Analyse von Genen mit einer reduzierten Expression in d15 miR-26-KO Zellen zeigte dagegen in allen d15 miR-26-KO Zelllinien eine starke Tendenz für biologische Prozesse, die vorwiegend in neuronalen Gewebe, bei der Neurogenese und bei der Differenzierung eine Rolle spielen (dKO^{26a1/a2}: 10 von 25, KO^{26b}: 4 von 25, tKO^{26b/a1/a2}: 7 von 25; rot hervorgehoben in **Abb. 20b**). Weiterhin wurde in den d15 miR-26-KO Zellen eine Herunterregulierung von Genen, die in vielen Entwicklungs-assoziierte *GO-Terms* geclustert werden, beobachtet. Als Beispiele sind hier zu nennen die *GO-Terms* *developmental process*, *multicellular organism development*, *positive regulation of developmental process* und *cellular developmental process*.

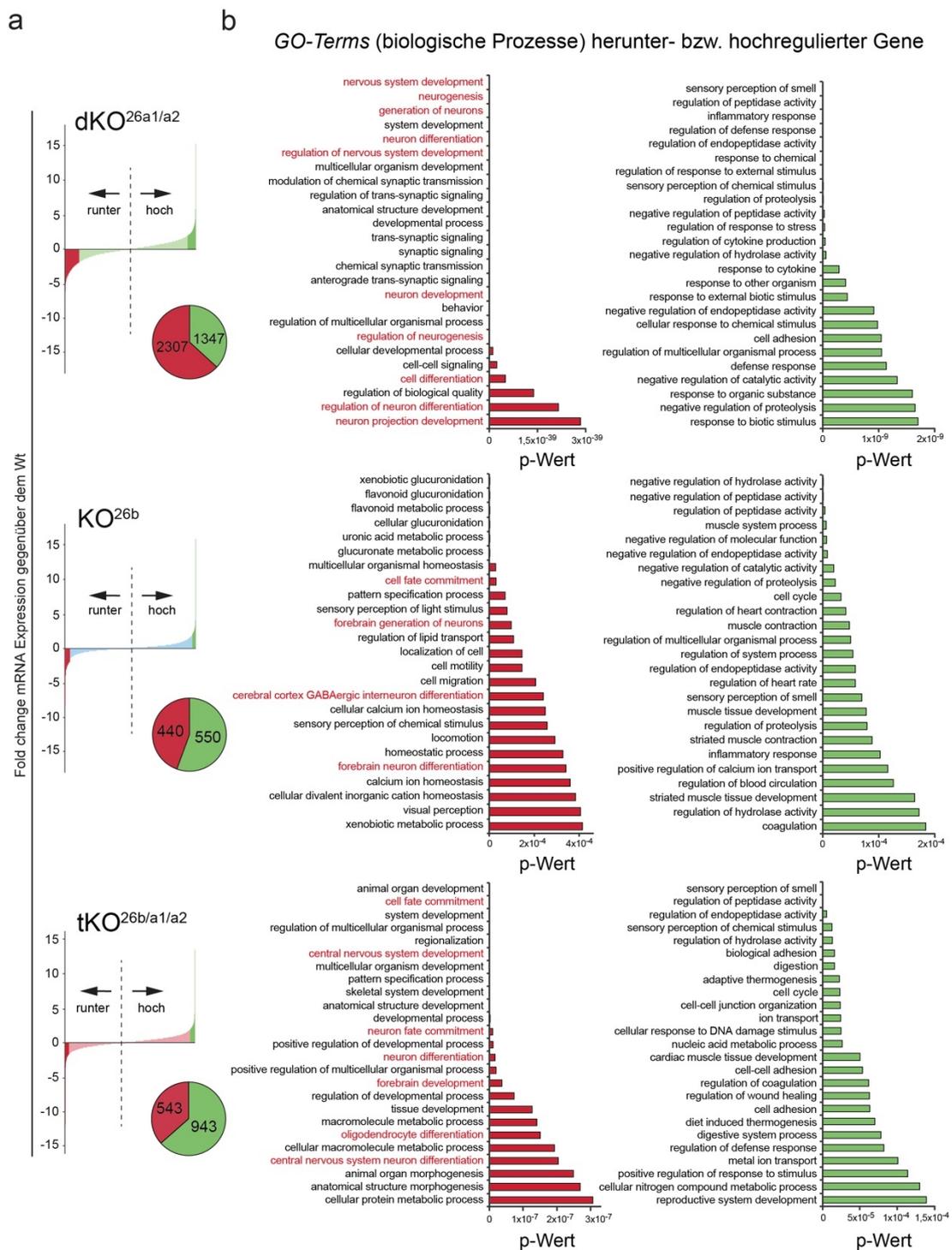


Abbildung 20: Globale Genexpressionsanalyse und GO-Term Klassifizierung der differenziell exprimierten Gene in d15 miR-26-KO Zellen.

(a) Diagramm der hoch- bzw. herunterregulierten Gene in d15 dKO^{26a1/a2}, KO^{26b} und tKO^{26b/a1/a2} Kulturen verglichen mit Wt Kulturen. Gene die mindestens 2-fach herunterreguliert waren, sind im Plot rot markiert und mindestens 2-fach hochregulierte Gene in grün gekennzeichnet. Die Kreisdiagramme zeigen den Anteil und die Anzahl an mindestens 2-fach herunterregulierten (rot) und hochregulierten Genen (grün). (b) Analyse der Top 25 GO-Terms, bzw. Gruppierung der differenziell exprimierten Gene in übergeordnete biologische Prozesse (sortiert nach absteigender Signifikanz [p-Wert]) der mindestens 2-fach herunter- (links, rot) bzw. hochregulierten Gene in dKO^{26a1/a2}, KO^{26b} und tKO^{26b/a1/a2} Kulturen an Tag 15. GO-Terms die mit der Neurogenese, dem ZNS oder Differenzierung assoziiert werden, sind hierbei rot markiert.

Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob ein ähnlicher Satz an Transkripten in den einzelnen miR-26-KO Zelllinien (dKO^{26a1/a2}, KO^{26b} und tKO^{26b/a1/a2}) betroffen ist. Hierfür wurden die regulierten Gene in den einzelnen KO Zelllinien in einem Venn Diagramm dargestellt. Das Diagramm veranschaulicht, dass die Schnittmenge der differenziell exprimierten Gene in dKO^{26a1/a2}, KO^{26b} und tKO^{26b/a1/a2} klein ist (62 Gene überlappend herunterreguliert, 281 Gene überlappend hochreguliert), während die Anzahl der Gene, die nur in einer der miR-26-KO Zelllinien Veränderungen zeigen, relativ hoch ist (**Abb. 21a**). Dieses Ergebnis ist überraschend, da alle miR-26-KO Zelllinien während der Differenzierung von NPCs zu NCs einen ähnlichen Phänotyp zeigten (Kapitel 3.5, 3.6) und die miR-26a und miR-26b identische Seed Sequenzen besitzen. Die *GO-Term* Analyse (**Abb. 21b**, siehe auch Appendix **Tab. 6**) von den 281 gemeinsam in allen miR-26-KO Zelllinien hochregulierten Genen konnte keinen offensichtlichen Zusammenhang zwischen den betroffenen biologischen Prozessen aufzeigen. Im Kontrast dazu konnten die 62 gemeinsam herunterregulierten Gene in 13 von insgesamt 20 *GO-Terms* geclustert werden, die vorwiegend mit Prozessen assoziiert sind, die bei der neuronalen Differenzierung, der neuronalen Entwicklung, aber auch der Gliogenese eine Rolle spielen (rot markiert in **Abb. 21b**). Die RNA-Seq Analyse wurde durchgeführt, um die Anzahl an Transkripten am Endpunkt der neuronalen Differenzierung (Tag 15) auf globaler Ebene zu erfassen. Um die globalen RNA-Seq Daten zu verifizieren wurde die Expression einzelner wichtiger neuronaler Marker (*Tubb3*, *Neurod1*, *Neurog1* und *Ncam1*), die auch bei der RNA-Seq Analyse in d15 tKO^{26b/a1/a2} Zellen herunterreguliert waren, mittels qRT-PCR Analysen von RNA Proben aus ESCs, d10 und d15 Wt bzw. tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen, überprüft. Wie in **Abb. 21c** gezeigt, waren alle vier neuronalen Markergene am höchsten in d15 Wt Kulturen exprimiert. Im Vergleich zu Wt Kulturen war die Expression der neuronalen Markergene in d15 tKO^{26b/a1/a2} Kulturen signifikant niedriger. Neben den neuronalen Markern wurden in der qRT-PCR Analyse auch Markergene für neurale Vorläuferzellen (*Msi1* und *Pax6*) untersucht. Die Expressionslevel dieser Markergene war in d10 Wt Kulturen auf vergleichbarem Niveau in tKO^{26b/a1/a2} Kulturen. Dies bestätigt, dass beide Zelllinien zu NPCs differenzieren können. Eine Abnahme dieser NPC-Marker als Signatur der Bildung von neuronalen Zellen zeigten nur d15 Wt Kulturen, während die Expression in den d15 tKO^{26b/a1/a2} Zellen im Vergleich zu d10 tKO^{26b/a1/a2} Zellen unverändert blieb.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der RNA-Seq Analysen und der qRT-PCR Analyse der Expression einzelner Markergene während der Differenzierung von Wt und

miR-26-KO Zellkulturen, dass die Deletion sowohl der einzelnen miR-26 Familienmitglieder als auch der gesamten miR-26 Familie die Expression von neuronalen Genen während der Differenzierung negativ beeinflusst. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit dem neuronalen Differenzierungsdefekt der miR-26-KO Zellkulturen aus den funktionellen Untersuchungen (siehe Kapitel 3.5 und **Abb. 16**). Darüber hinaus zeigen diese Analysen, dass d15 tKO^{26b/a1/a2} Zellen sehr ähnliche Expressionslevel wie Wt NPCs (d10) besitzen, dies gilt sowohl für die analysierte Expression von neuronalen Markergenen als auch für die Expression neuraler Vorläufermarker (vergleiche d10 Wt mit d15 tKO^{26b/a1/a2} **Abb. 21c**). Diese Beobachtung spiegeln die in Kapitel 3.6 beschriebene Blockierung der terminalen Differenzierung in den d15 miR-26-KO Zellkulturen wieder und bestätigen diese Ergebnisse auf transkriptioneller Ebene.

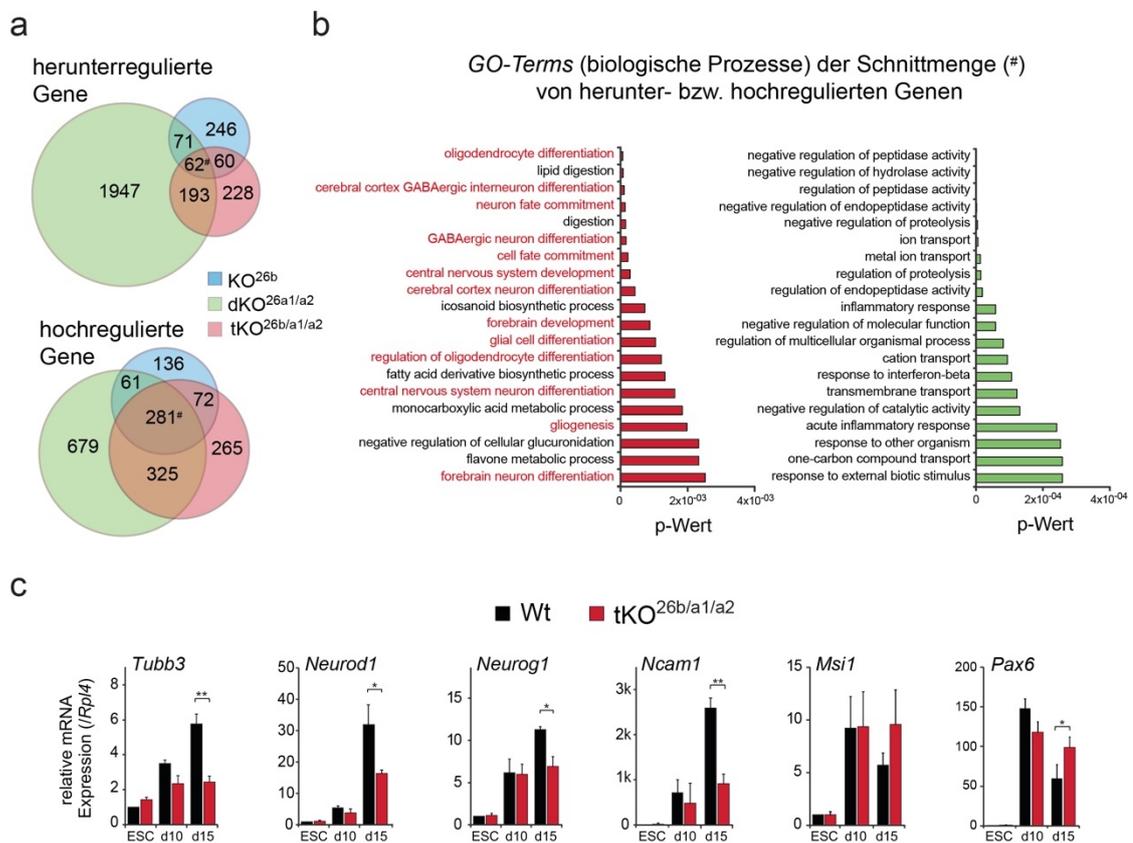


Abbildung 21: Schnittmenge der differenziell exprimierten Gene in den einzelnen d15 miR-26-KO Zelllinien und Expressionsanalysen von neuronalen- und neuralen Vorläufer-Markern.

(a) Venn-Diagramm, welches die Schnittmenge von mindestens 2-fach herunter- und hochregulierten Genen zwischen dKO^{26a1/a2}, KO^{26b} und tKO^{26b/a1/a2} Kulturen an Tag 15 zeigt (Schnittmenge mit # gekennzeichnet). (b) GO-Term Analyse (biologische Prozesse) der gemeinsam in allen d15 miR-26-KO Zellen herunterregulierten (rot, 62*) und hochregulierten (grün, 281*) Gene. GO-Terms die mit der Neurogenese, dem ZNS oder Differenzierung assoziiert werden, wurden rot markiert. (c) Expressionsanalyse von neuronalen Markergenen (*Tubb3*, *Neurod1*, *Neurog1*, *Ncam1*) und Vorläufermarker (*Msi1*, *Pax6*) in Wt und tKO^{26b/a1/a2} ESCs, d10 und d15 Zellen mittels qRT-PCR (n = 3). Zweiseitiger t-test *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01.

3.8.2 miRNA-Transkriptom Analyse der d15 miR-26-KO Zellkulturen

Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, findet in miR-26-defizienten Zellen eine globale negative Regulierung neuronaler Gene statt. Daran angeknüpft stellte sich die Frage über welchen Signalweg diese Fehlregulation hervorgerufen wird. Der REST-Komplex wurde beschrieben als ein Master Regulator der Neurogenese [216] indem er potentiell die Transkription von mehr als 1900 neuronalen Genen über die Bindung an RE1 Motive unterdrückt [55]. *Ctdsp* als Wirtsgen der miR-26 ist selbst ein Ko-Repressor von REST und als Teil des REST-Komplexes ein wichtiger transkriptioneller Regulator der neuronalen Genexpression. Darüber hinaus wurde im Zebrafisch gezeigt, dass die miR-26b ihr eigenes Wirtsgen *ctdsp2* reprimiert [160, 192]. Auf Grundlage dieser Publikation wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Veränderung der Aktivität des REST-Komplexes, insbesondere die Aktivität seines Ko-Repressors CTDSP, ein Grund für den in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Phänotyp der miR-26-KO Zellen sein könnte. Der REST-Komplex reguliert nicht nur die Expression neuronaler Gene, er kann auch die Expression von nicht-kodierenden Transkripten unterdrücken, wie zum Beispiel lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs) oder miRs [217, 218]. Aus diesem Grund wurden auch nicht codierende RNAs in d15 Wt und miR-26-KO Zellkulturen sequenziert (hierfür wurden die selben RNA Proben wie für die RNA-Seq Analyse aus dem vorigen Kapitel verwendet) und nach differenziell exprimierten miRs (Schwellenwert von > 20%) analysiert. In **Abb. 22** sind die globalen Effekte auf das miRNA Transkriptom in d15 dKO^{26a1/a2}, KO^{26b} und tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen dargestellt. Dabei zeigte sich, dass in allen miR-26-KO Zelllinien im Vergleich zum Wt ein Großteil der miRNAs (65,6% im tKO^{26b/a1/a2}) hochreguliert war (dKO^{26a1/a2}: 193 runter, 422 hoch; KO^{26b}: 186 runter, 420 hoch; tKO^{26b/a1/a2}: 216 runter, 412 hoch) (siehe Kreisdiagramme in **Abb. 22a**). Auch bei der Analyse der differenziell exprimierten miRNAs wurde untersucht, ob bei den einzelnen miR-26-KO Zelllinien eine Überlappung besteht. Im Venn Diagramm in **Abb. 22b** ist gezeigt, dass 40,10% aller herunterregulierten und miRNAs und 64,04% der hochregulierten miRNAs eine Schnittmenge bilden und in allen d15 miR-26-KO Zelllinien differentiell exprimiert werden. Folglich lässt sich in allen miR-26-KO Zelllinien an Tag 15 der Differenzierung eine hohe Übereinstimmung der differenziell exprimierten miRs im Vergleich zu d15 Wt Zellen feststellen.

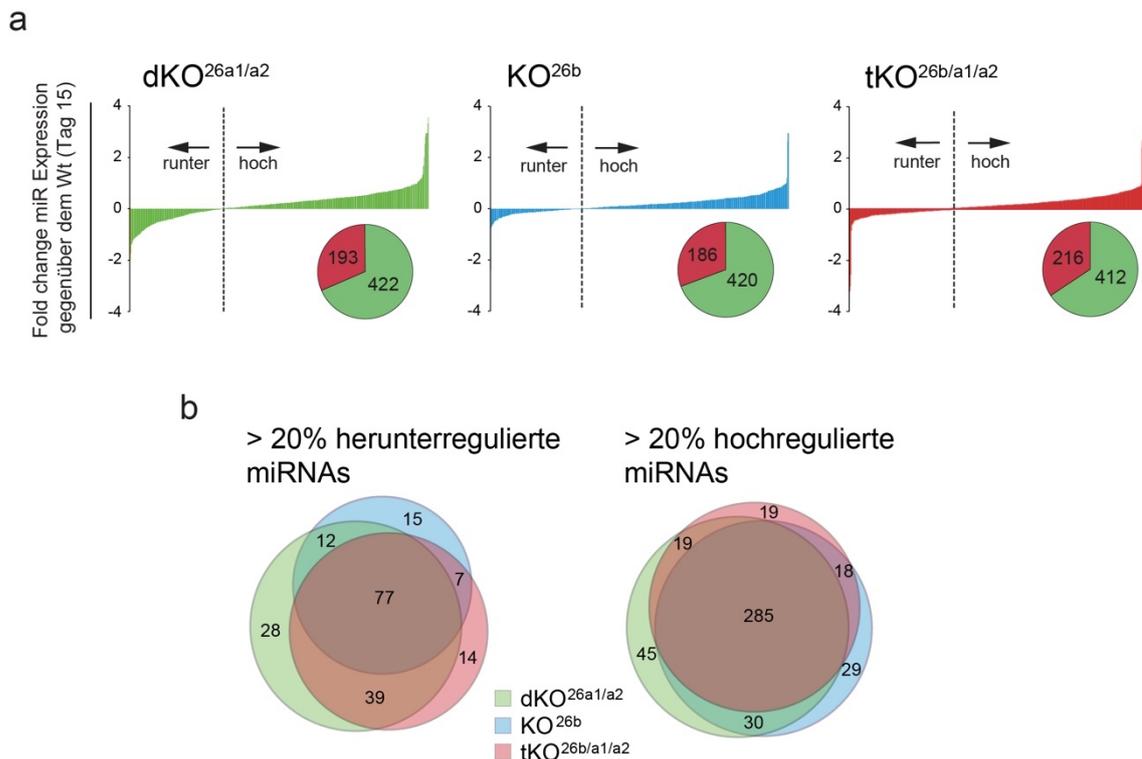


Abbildung 22: Auswirkung der miR-26 Deletion auf das miRNA Transkriptom

(a) Diagramm aller hoch- bzw. herunterregulierten miRNAs in KO^{26b} , $dKO^{26a1/a2}$ und $tKO^{26b/a1/a2}$ Kulturen verglichen mit Wt Kulturen an Tag 15. Kreisdiagramme zeigen den Anteil und die Anzahl an herunterregulierten (rot) und hochregulierten miRs (grün). (b) Venn-Diagramm, welches die Schnittmenge von mindestens 20% hoch- bzw. herunterregulierten miRNAs in $dKO^{26a1/a2}$, KO^{26b} und $tKO^{26b/a1/a2}$ Kulturen an Tag 15 zeigt.

3.8.3 Identifikation von REST-regulierten miRNAs

Um die Hypothese, dass der Differenzierungsblock in den miR-26-KO Zellkulturen durch eine veränderte Aktivität des REST-Komplexes hervorgerufen wird zu überprüfen, wurde im nächsten Schritt nach miRNAs gesucht, die möglicherweise durch REST reguliert sind. **Tab. 1** zeigt das Ergebnis dieses Screens und listet miRNAs, die potentiell durch den REST-Komplex reguliert werden können. Für ihre Bestimmung wurde die genomische Sequenz in der Nähe der miRNA in einem Fenster von bis zu 20 kb in 3'- und 5'-Richtung untersucht. Mit dieser Analyse wurden rund 40 miRs mit einer RE1 Sequenz in der näheren genomischen Region identifiziert. Für 14 dieser 40 miRs ist eine REST-Bindung durch Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) in der Literatur beschrieben [218-220] (in **Tab. 1** grau schattiert). Die Expression dieser 14 miRs (REST-miRs) wurde innerhalb dieses Projekts weiter analysiert.

Tabelle 1: Liste der miRNAs, die potentiell durch den REST-Komplex reguliert werden.

Nachweis der Regulation: RE1: vorausberechnete Ziel-miRs von REST durch die RE1-Sequenz Analyse in einem Fenster von 20 kb vor- und nach der miRNA-Sequenz. ChIP: validierte Bindung der miR-26 mit REST ermittelt durch Chromatin Immunopräzipitation (grau schattiert); Referenzen für den Nachweis sind jeweils in der dritten Spalte angegeben. (Zusammenstellung und bioinformatische Analyse durch Thomas Ziegenhals)

miRNA	Nachweis	Referenz	miRNA	Nachweis	Referenz
miR-7-2	RE1	[221]	miR-218	RE1, ChIP	[218, 220]
miR-7-3	RE1	[221]	miR-328	RE1	[221]
miR-9	RE1, ChIP	[218, 220]	miR-330	RE1, ChIP	[220]
miR-9*	RE1, ChIP	[75]	miR-346	RE1, ChIP	[218, 220]
miR-29a	RE1, ChIP	[218]	miR-375	RE1	[221]
miR-29b	RE1, ChIP	[218, 220]	miR-422a	RE1	[221]
miR-95	RE1	[218]	miR-455	RE1	[218]
miR-124	RE1, ChIP	[219]	miR-602	RE1	[221]
miR-129-2	RE1	[221]	miR-637	RE1	[221]
miR-132	RE1, ChIP	[218, 220]	miR-940	RE1	[221]
miR-135	RE1, ChIP	[218, 220]	miR-1179	RE1	[219]
miR-137	RE1	[221]	miR-1208	RE1	[221]
miR-139	RE1, ChIP	[218, 220]	miR-1224	RE1	[221]
miR-146b	RE1	[221]	miR-1249	RE1	[221]
miR-147	RE1	[221]	miR-1253	RE1	[221]
miR-153	RE1	[218]	miR-1255	RE1	[221]
miR-184	RE1	[221]	miR-1257	RE1	[221]
miR-203	RE1, ChIP	[220]	miR-1267	RE1	[221]
miR-204	RE1, ChIP	[220, 221]	miR-1301	RE1	[221]
miR-212	RE1, ChIP	[218] [221]			

3.8.4 Herunterregulierung von REST-miRs in d15 miR-26-KO Zellkulturen

Im nächsten Schritt wurde die Expression der REST-miRs mit Hilfe der RNA-Seq Daten und mittels qRT-PCR in miR-26-KO im Vergleich zu Wt Zellkulturen untersucht. Die globale Analyse der miR Expression in d15 Zellen zeigte, dass alle REST-miRs bis auf die miR-29 Familie in dKO^{26a1/a2}, KO^{26b} und tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen herunterreguliert waren (**Abb. 23a**). Im Gegensatz dazu war die Mehrheit (66%) aller differenziell exprimierten miRs in den dKO^{26a1/a2}, KO^{26b} und tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen stärker exprimiert (**Abb. 22a**), was eine gewisse Spezifität für diese REST-miRs anzeigt.

Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurden qRT-PCR Analysen spezifisch für die miR-124 und miR-9 in Wt (schwarz) und tKO^{26b/a1/a2} (rot) während der Differenzierung in ESCs, d10- und d15-Zellen durchgeführt (**Abb. 23b**). Dabei zeigte sich in tKO^{26b/a1/a2} d15-Zellen eine signifikant verringerte Expression dieser beiden REST-miRs im Vergleich zum Wt. Dies bestätigt direkt die Erkenntnisse der small RNA-Seq. Zudem konnten sehr ähnliche miR-9 Expressionslevel in tKO^{26b/a1/a2} an Tag 15 und Wt an Tag 10 beobachtet werden, was den Differenzierungsstillstand im NPC Stadium in den miR-26-KO Zellkulturen widerspiegelt.

Zusammengefasst zeigen die Analysen in miR-26-KO Zellen an Tag 15, dass eine große Deckungsgleichheit der differenziell exprimierten miRNAs in dKO^{26a1/a2}, KO^{26b} und tKO^{26b/a1/a2} besteht. Die bioinformatische Analyse der mRNA Zielstellen für REST-miRs ergab, dass der REST-Komplex selbst unter der Regulation dieser validierten REST-miRs steht. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass alle diese REST-miRs, außer der miR-29 Familie, als Folge der miR-26 Deletion herunterreguliert wurden obwohl die Mehrheit aller sequenzierten miRNAs in den miR-26-KO NCs eine erhöhte Expression aufwiesen.

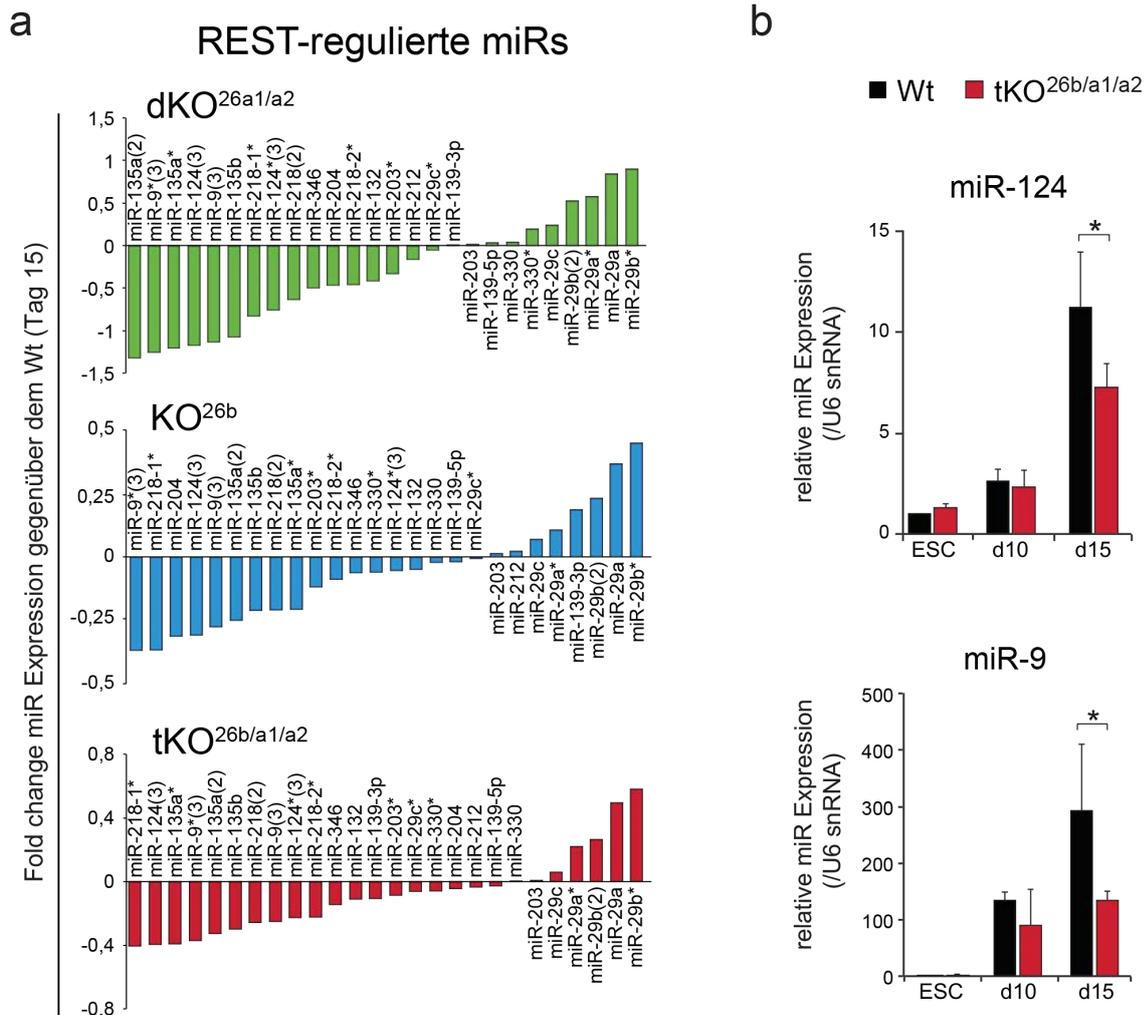


Abbildung 23: Expressionsanalyse der REST-regulierten miRs in miR-26-KO Zellen. (a) Diagramm der relativen Expression von REST-miR Familienmitgliedern in d15 KO^{26b}, dKO^{26a1/a2} und tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen verglichen mit Wt Kulturen. (b) qRT-PCR Analyse der Expression der miR-124 und miR-9 in Wt und tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen an Tag 0 (ESCs), Tag 10, Tag 15 (n = 3), (Expression normiert über die U6 snRNA), zweiseitiger t-test *: p ≤ 0,05.

3.8.5 REST-miRs besitzen mehrere Zielstellen in der mRNA von REST-Komplex Komponenten

Viele der REST-miRs spielen eine zentrale Rolle während der neuronalen Entwicklung [188-190]. Die miR-9 und miR-124 zum Beispiel spielen eine wichtige Rolle für eine normale neuronale Entwicklung [222]. So konnte gezeigt werden, dass alleine die gemeinsame Überexpression der miR-9 und der miR-124 ausreicht, um somatische Zellen in Neurone umzuprogrammieren [152]. Ihre Expression wird durch Bindung des REST-Komplexes reguliert. Gleichzeitig besitzen die miR-9 und die miR-124 aber auch Target-Stellen in mindestens 4 Mitgliedern des REST-Komplexes und können dadurch

die Aktivität des REST-Komplexes negativ beeinflussen, was zu einer negativen Rückkopplungsschleife führen könnte [74, 75, 219].

Um zu testen, ob die anderen REST-miRs potentiell negative Rückkopplungsschleifen mit dem REST-Komplex bilden können, wurden *in silico* Target-Scans für alle 14 REST-miRs mit Hilfe des Online-Tools TargetScan (Version 7.2) durchgeführt und die 3' UTR der mRNA von REST-Komplex assoziierten Proteinen analysiert. Es stellte sich heraus, dass alle 14 REST-miRs potentielle Ziel-Stellen in der 3' UTR von mindestens 2 Komponenten des REST-Komplexes besitzen (für eine schematische Darstellung siehe **Abb. 24**). Nur die RNA-Transkripte der REST-Komplex assoziierten Proteine HDAC1/2 und LSD1 haben keine Ziel-Stellen für diese REST-miRs. HDAC1/2 und LSD1 besitzen jedoch verschiedene Funktionen bei der REST-unabhängigen Chromatin Remodellierung und sind auch in anderen Proteinkomplexen präsent [223-226]. Diese bioinformatische Auswertung von Target-Stellen legt nahe, dass der REST-Komplex nicht nur eine spezifische Gruppe von miRNAs auf der Ebene der Transkription negativ regulieren kann. Darüber hinaus ist der Komplex selbst Ziel einer negativen Regulierung durch REST-miRs. Diese Daten lassen vermuten, dass bei einer Inhibierung des REST-Komplexes bzw. seiner Aktivität auf Zielgene die Level der REST-Komplex assoziierten Proteine während der neuronalen Differenzierung nach und nach in einer Art Selbstregulierungs-Mechanismus herunterreguliert werden.

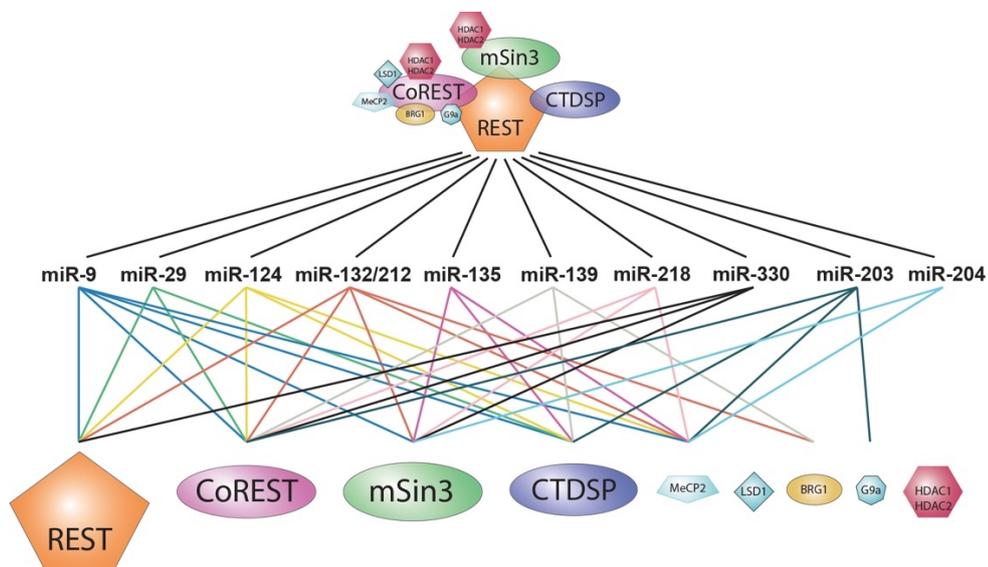


Abbildung 24: Potentielle REST-miR/REST Rückkopplungsschleife.

Der REST-Komplex kann die Expression der geeigneten miRs (REST-miRs) reprimieren. Alle diese miRs haben selbst potentielle Zielstellen in der 3'UTR von mehreren Mitgliedern des REST Komplexes. Die farbigen Linien von den miRNAs zu den einzelnen Komplex Mitgliedern zeigen vorausberechnete, in Vertebraten konservierte miR Zielstellen. (Darstellung und bioinformatische Analyse von Thomas Ziegenhals)

3.9 Die miR-26 Familie reguliert den REST-Komplex über die Repression von REST und CTDSP2

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Deletion der miR-26 eine verringerte Expression der REST-miRs hervorruft, sollte abschließend die Frage geklärt werden, über welchen Signalweg die miR-26-Familienmitglieder ihre Wirkung auf die Genexpression in neuronalen Zellen ausüben. Die voran gegangenen Ergebnisse lassen vermuten, dass die Auswirkung auf das neuronale Genexpressionprogramm zumindest zu einem Großteil über die Aktivität des REST-Komplexes reguliert wird, insbesondere über dessen Ko-Repressor CTDSP. Dies ist darin begründet, dass zum einen der REST-Komplex ein wichtiger Transkriptionsregulator für die Neurogenese ist und zum anderen die miR-26 mit der Regulation von CTDSP während der neuronalen Entwicklung in Verbindung gebracht wird [160]. Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob die Inaktivierung der miR-26 Familie die Expression von *Ctdsp1,2,1* beeinflusst. Darüber hinaus sollten die Proteinlevel von REST-Komplex Mitgliedern während der neuronalen Differenzierung untersucht werden, um diese Hypothese zu stützen. Zunächst wurde hierfür die Expression von *Ctdsp1,2,1* in ESCs, d10 und d15 Wt und tKO^{26b/a1/a2} Zellen über qRT-PCR Analysen quantifiziert (**Abb. 25a**). Dabei zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expressionslevel aller *Ctdsp* Homologe in d15 tKO^{26b/a1/a2} Zellen im Vergleich zur Expression im Wt. Die Expression von *Ctdsp* in d15 tKO^{26b/a1/a2} Zellen ist zudem vergleichbar mit der Expression in Wt NPCs an Tag 10, was wiederum ein Indiz für den Entwicklungsstillstand dieser miR-26-defizienten Zellen im neuralen Vorläuferstadium ist. Um zu prüfen, ob *Ctdsp* einer Regulation durch die miR-26 unterliegt, wurden zusätzlich Experimente mit miR-26 mimics durchgeführt. Hierfür wurden Wt und tKO^{26b/a1/a2} NPCs an Tag 9 der Differenzierung mit miR-26 mimics transfiziert. 72 Std. nach der Transfektion wurde in diesen Zellen die *Ctdsp1,2,1* Expression analysiert. Als Kontrolle wurden Wt und tKO^{26b/a1/a2} NPCs mit *C. elegans* miR-67 mimics (ctrl) transfiziert, die eine minimalste Sequenzidentität mit miRNAs in der Maus besitzt und identisch zu den miRNA mimics entworfen wurden. Als zusätzliche Kontrolle wurden die NPCs mit miR-124 mimics transfiziert, da in der 3'UTR von *Ctdsp1,2,1* auch Target Stellen für diese miR (5 in der 3'UTR von *Ctdsp1*, 2 in der 3'UTR von *Ctdsp2*, 2 in der 3'UTR von *Ctdsp1*, siehe Appendix **Abb. 33**) vorliegen. Weiterhin wurde die Bindung und negative Regulation von *Ctdsp* durch die miR-124 auch schon experimentell gezeigt [74] und diente somit als positiv Kontrolle. In **Abb. 25b** ist die

relative Expression der *Ctdsp* Homologe in den transfizierten NPCs 72 Std. nach der Transfektion zu sehen. Sowohl in Wt als auch in tKO^{26b/a1/a2} Zellen ist eine teils signifikante Reduktion der Expression von *Ctdsp* auf Grund der miR-26 mimics zu erkennen. Die miR-124 mimics führten zu einer ähnlichen Reduktion der Expression. Dabei wird die Reduktion gleichermaßen durch die miR-26a und die miR-26b mimics hervorgerufen. Diese Ergebnisse zeigen eine negative Regulation der miR-26 auf sein eigenes Wirtsgen in diesen Zellen.

Um den Einfluss auf die Proteinlevel von REST, CoREST, SIN3a und CTDSP2 in Wt und tKO^{26b/a1/a2} Zellen an verschiedenen Tagen der Differenzierung (ESCs, Tag 8, Tag 10, Tag 12, Tag 15) zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dabei ist keine signifikante Veränderung der Protein-Level von SIN3a und CoREST in differenzierenden tKO^{26b/a1/a2} Zellen im Vergleich zum Wt zu erkennen. Die Protein-Niveaus von REST nahmen bei der Differenzierung von Wt ESC zu NPCs ab und blieben bis zur Bildung von NC auf einem niedrigen Niveau (**Abb. 25c,d**). Interessanterweise blieb der REST Proteinlevel von tKO^{26b/a1/a2} Zellen im Vergleich zu Wt Zellen während der neuralen Differenzierung von ESCs relativ konstant, mit signifikanten Unterschieden zwischen Wt und tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen an Tag 10, Tag 12 und Tag 15 der Differenzierung. Auch die CTDSP2 Proteinexpression in tKO^{26b/a1/a2} an Tag 12 und Tag 15 war signifikant erhöht im Vergleich zur Expression in Wt Zellen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.8.4, welche eine globale Herunterregulierung der REST-miRs in den d15 miR-26-KO Zellkulturen zeigten. Dies weist darauf hin, dass der Verlust von miR-26 eine Derepression bzw. eine Hochregulation von REST und CTDSP2 in NPCs und in späteren Stadien zur Folge hat und liefert eine mögliche Erklärung für die beobachtete Repression des neuronalen Genexpressionsprogramms in miR-26-defizienten Zellkulturen während der Differenzierung.

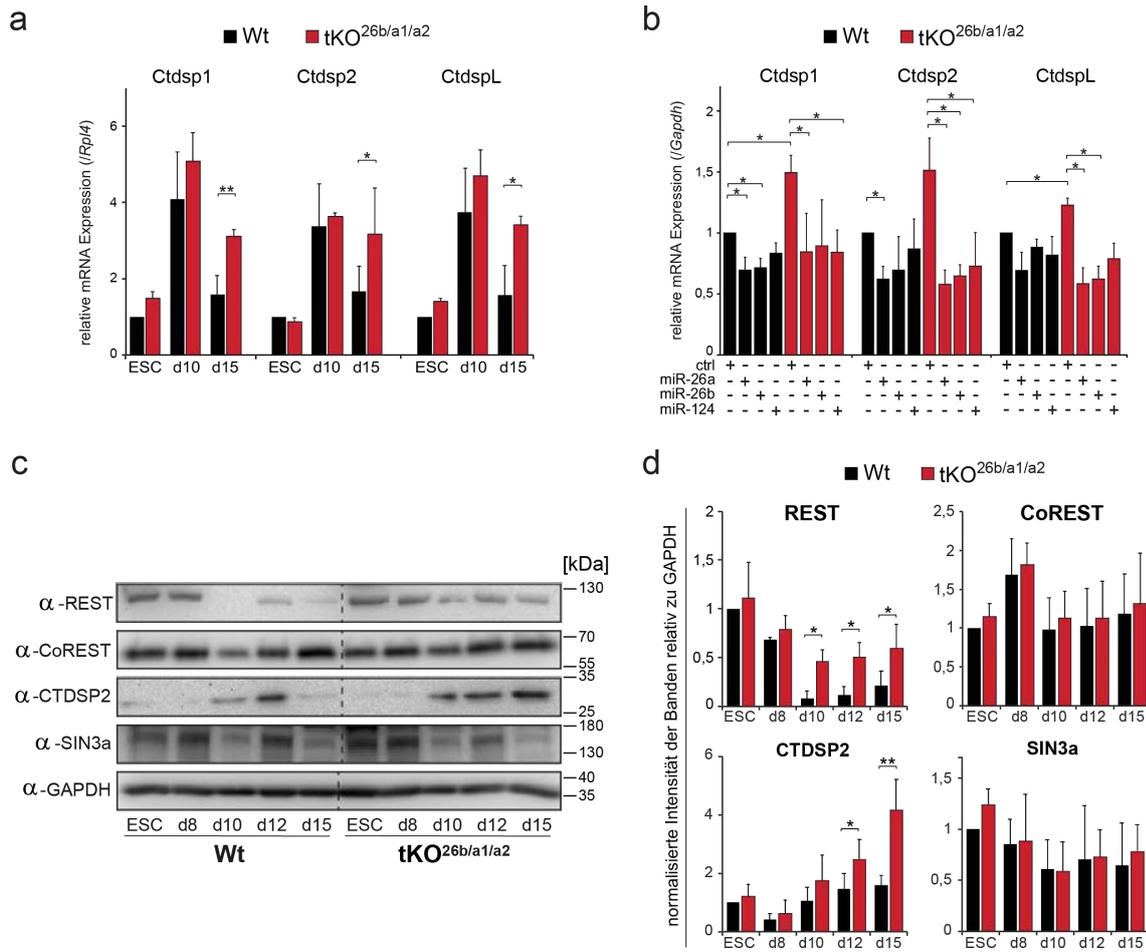


Abbildung 25: Einfluss der miR-26 Familie auf die REST-Komplex Komponenten. (a) Expressionsanalyse von *Ctdsp1,2,l* in Wt und tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen während der Differenzierung (qRT-PCR, n = 4). (b) qRT-PCR Analyse der *Ctdsp1,2,l* Expression in Wt (schwarz) und tKO^{26b/a1/a2} (rot) Zellkulturen 72 Std. nach der Transfektion mit miRNA mimics (ctrl, miR-26a, 26b, 124 mimics) (qRT-PCR, n ≥ 4). (c) Repräsentative Western-Plots von Wt und tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen an verschiedenen Tagen der Differenzierung (Tag 0, 8, 10,12, und 15) mit Antikörpern gegen die REST Komplex assoziierten Proteine REST, CoREST, SIN3a und CTDSP2. (d) Quantifizierung der Western-Blots über die Intensität der Banden, dargestellt im Balkendiagramm. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet (n = 3), zweiseitiger t-test *: p ≤ 0,05, **: p ≤ 0,01.

3.10 Die miR-26 als initialer Regulator eines REST-miR Netzwerks während der Neurogenese

Im Gegensatz zu allen validierten REST-miRs, gibt es keinen Hinweis für die Regulation der miR-26a und miR-26b durch den REST Komplex, da es keine RE1 Sequenz innerhalb des miR-26 codierenden Bereichs im Genom oder in der Nähe der *Ctdsp1,2,l* Promotoren gibt. Dies lässt vermuten, dass die miR-26 eine initiale, REST-unabhängige Rolle während der Neurogenese einnimmt. Weiterhin impliziert dies, dass die miR-26 die Expression von REST-miRs kontrollieren kann, aber nicht umgekehrt. Um dies zu testen,

wurden Wt und tKO^{26b/a1/a2} an Tag 9 der Differenzierung mit miR-26 mimics transfiziert und nach 72 Std. die Expression von 5 REST-miRs (miR-9, -124, -218, -132 und -135a) mittels qRT-PCR gemessen (schematische Übersicht des Experiments siehe **Abb. 26a**). Wie in **Abb. 26b** gezeigt, führte die Transfektion mit miR-26 mimics zu signifikant erhöhten Expressionsleveln von 5 der 6 gemessenen REST-miRs sowohl in Wt als auch in tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen. Die Expression der miR-132 blieb unverändert bzw. nicht signifikant hochreguliert. Außerdem konnte kein nennenswerter Unterschied zwischen der Expression der REST-miRs in Zellen detektiert werden, die entweder mit miR-26a- oder miR-26b mimics transfiziert wurden, was auf eine ähnliche Funktion der beiden Mitglieder der miR-26 Familie, zumindest auf der Ebene der REST-miR Regulation, schließen lässt. Während die Expressionslevel der REST-miRs in tKO^{26b/a1/a2} Zellen im Vergleich zu Wt Zellen reduziert waren, konnte die Transfektion von miR-26-mimics diesen Effekt kompensieren. Die miR-26 zeigt dabei einen starken Einfluss auf die Expressionslevel der REST-miR, höchstwahrscheinlich über die Regulation der Komponenten des REST-Komplex.

Schließlich sollte geprüft werden, ob die miR-26 durch die Überexpression der REST-miRs-124 und -9 mittels miRNA mimics durch einen ähnlichen Mechanismus beeinflusst werden kann, oder ob die miR-26 möglicherweise in der frühen Phase der Neurogenese eine wichtige Rolle spielt, indem sie das notwendige neuronale Genexpressionsprogramm über die Repression des REST-Komplexes initiiert. Basierend auf dieser Annahme sollten REST-miRs wie die miR-9 und miR-124 keinen Einfluss auf die Expressionsniveaus der miR-26 haben. Um dies zu untersuchen, wurden Wt NPCs mit miR-124 und miR-9 mimics transfiziert und die Expression von miR-26a, miR-26b, miR-124, miR-9, miR-218, miR-132 und miR-135a durch eine qRT-PCR Analyse quantifiziert. Im Gegensatz zur miR-26, deren Überexpression ausreicht, um die Level der REST-miRs zu erhöhen (**Abb. 26b**), zeigte die Transfektion von miR-9 und miR-124 mimics keinen Einfluss auf die Expression der miR-26a und miR-26b (**Abb. 26c**). Die Transfektion der miR-9 und miR-124 mimics führte hingegen zur signifikanten Erhöhung der Expressionslevel der anderen REST-miRs (miRs-9, -124, -218 und -135a).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Mitglieder der miR-26-Familie die Expression von REST-miRs über die Repression von REST-Komplex Komponenten beeinflussen. Jedoch werden die Mitglieder der miR-26 Familie selbst nicht durch die REST-miRs-9 und -124 beeinflusst, was auf eine übergeordnete Rolle der miR-26 in dieser Signalkaskade schließen lässt. Dies ist ein erster Beleg dafür, dass die Mitglieder

der miR-26 Familie als frühe Regulatoren der Neurogenese in Vertebraten fungieren, indem sie neuronale REST-miRs und REST-regulierte neuronale Gene direkt oder indirekt über die Repression des REST-Komplexes regulieren können.

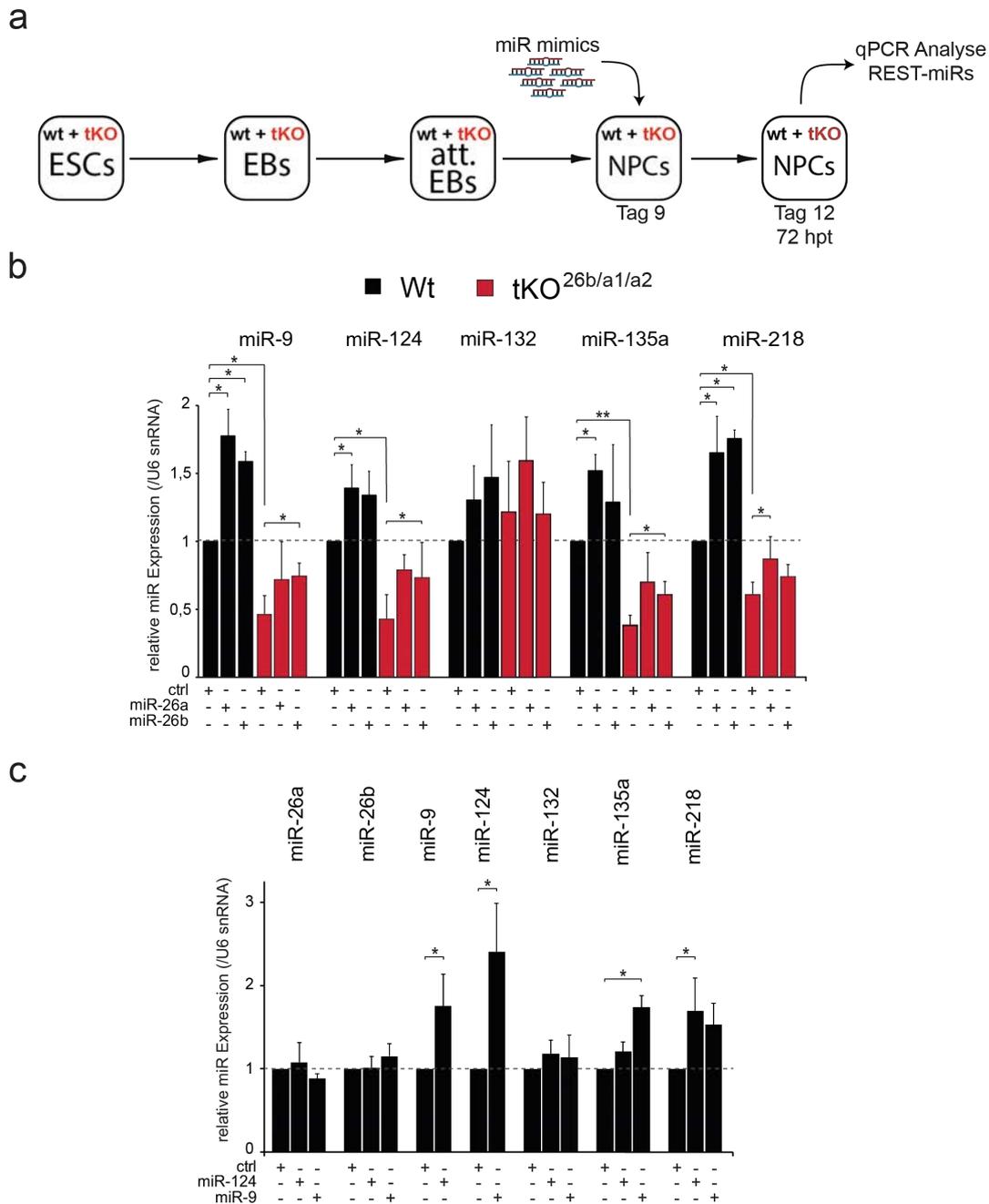


Abbildung 26: Einfluss der miR-26 Familie auf REST-regulierte miRs.

(a) Schaubild der experimentellen Herangehensweise. NPCs werden an Tag 9 der neuronalen Differenzierung mit miRNA-mimics transfiziert und 72 Std. nach der Transfektion die miRNA Expression mittels qRT-PCR analysiert. (b) Expression der REST-regulierten miRs-9, -124, -132, -135a, -218, analysiert 72 Std. nach der Transfektion von d9 Wt und tKO^{26b/a1/a2} NPCs mit miR-26a, miR-26b und Kontroll-mimics (qRT-PCR, n ≥ 3). (c) Expressionsanalyse der miRs-26a, -26b, -9, -124, -132, -135a, -218 nach der Transfektion von d9 Wt und tKO^{26b/a1/a2} NPCs mit miR-124, miR-9 und Kontroll mimics (qRT-PCR, n ≥ 3, Expression normiert über die U6 snRNA), zweiseitiger t-test *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01.

3.11 Mögliche Regulation des WNT-Signalwegs durch die miR-26 Familie

Die Hemmung der neuronalen Differenzierung auf Grund der miR-26 Deletion könnte abseits von REST auch indirekt über andere Signalwege erreicht werden. MiRNAs können tausende von Zielgenen regulieren und somit ist davon auszugehen, dass die miR-26 Familie auch auf andere Signalwege, die während der Neurogenese wichtig sind, einen Einfluss hat. Um in größerem Umfang die potentiellen Zielgene der miR-26 und die Einordnung dieser in Signalwegen zu durchleuchten, wurde *in silico* eine KEGG Pathway Analyse der potentiellen Zielgene der miR-26a und miR-26b durchgeführt (Appendix **Abb. 34a**). Diese Analyse zeigte, dass die miR-26a und miR-26b Zielgene regulieren können, die bei sehr unterschiedlichen Signalwegen eine Rolle spielen. Unter den Top 10 finden sich auch Signalwege, die mit Krebserkrankungen assoziiert sind (*Pathways in cancer*, *Pancreatic cancer*, *Renal cell carcinoma*), die wichtig für die axonale Wegfindung sind (*Axon guidance*), die eine Rolle bei der Endozytose (*Endocytosis*) und bei der Proteolyse (*Ubiquitin mediated proteolysis*) spielen. Ein Signalweg auf dieser Liste, der WNT-Signalweg, der an vierter Stelle steht, ist durch seine Verbindung zur REST-Funktion von besonderem Interesse. Der WNT-Signalweg ist evolutionär konserviert und reguliert wichtige Aspekte wie die Bestimmung des Zellschicksals, der Zellmigration, der Zellpolarität und die neurale Strukturierung während der Embryonalentwicklung [227]. Die Analyse der WNT-Signalweg-assoziierten Targetgene für die miR-26 in den unterschiedlichen miR-26-KOs zeigte, dass die Anzahl der hoch- bzw. herunterregulierten Gene dieser Gruppe von 137 Genen etwa gleich war (Appendix **Abb. 34b**). In einer Arbeit von Johnson und Kollegen [228] wurde eine Transkriptom-Weite Analyse des transkriptionellen Netzwerks von REST in Maus ESCs und NSCs (Appendix **Abb. 34c**) durchgeführt, die einen Satz REST-regulierter WNT-Signalweg-assoziiierter Gene hervorbrachte. Die Analyse unserer RNA-Seq Daten der von Johnson und Kollegen identifizierten Gene in d15 Wt und miR-26-KO Zellkulturen zeigte, dass ein Großteil der Gene in den einzelnen miR-26-KOs (15/23 im dKO^{26a1/a2}, 17/23 im KO^{26b}, 18/23 im tKO^{26b/a1/a2}) hochreguliert war (Appendix **Abb. 34d**). Da in den d15 miR-26-KO Zellen im Vergleich zum Wt die Proteinlevel von REST sehr viel höher sind, könnte dies ein erster Hinweis auf einen indirekten Einfluss der miR-26 auf den WNT-Signalweg sein, der über die REST-Aktivität vermittelt wird.

4 Diskussion

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Rolle die miR-26 Familie während der Neurogenese spielt. Weiterhin sollte ein tieferer Einblick in die Funktionsweise der miR-26 Familie und den sich dahinter verbergenden molekularen Mechanismen während der Differenzierung pluripotenter embryonaler Stammzellen bis hin zu einem funktionellen postmitotischen Neuron gewonnen werden. In der vorgelegten Arbeit wurde zur Untersuchung der Funktion der miR-26 Familie ein murines ESC-basiertes neurales Differenzierungssystem als Modell für die Neurogenese eingesetzt. Anhand von qRT-PCR Analysen und RNA-Hochdurchsatzsequenzierungen konnte das Expressionsprofil der miR-26 Familie und seines Wirtsgens CTDSP während der neuralen Differenzierung von ESCs und der embryonalen Entwicklung im Mausgehirn zwischen den Entwicklungsstadien E9.5 bis E18.5 und im adulten Gehirn erstellt werden. Durch das „Herausschneiden“ der Sequenzen einzelner miR-26 Familienmitglieder und der gesamten miR-26 Familie mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode im Genom von ESCs, konnte der Einfluss dieser miR Familie auf die neurale Differenzierung untersucht werden. Die miR-26-*Knockout* ESC-Linien waren in der Lage, im gleichen Umfang wie Wt ES Zelllinien, neurale Vorläuferzellen zu bilden. Allerdings war durch das Ausschalten der miR-26 die Differenzierung dieser Vorläuferzellen in Neuronen und Astroglia stark eingeschränkt. Überraschenderweise war die individuelle Deletion von entweder miR-26a oder -26b alleine ausreichend, um die Differenzierung zu Neuronen und Astroglia zu blockieren, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die einzelnen miR-26 Mitglieder essentielle, nicht kompensierbare Funktionen während der Neurogenese haben. Zudem konnte durch Analysen der Vitalität der miR-26-KO Zellen und differenziell exprimierter Gene ausgeschlossen werden, dass diese Reduktion von Neuronen und Astroglia in den miR-26-KO Kulturen auf der erhöhten Apoptose oder der Differenzierung in Zelltypen nicht neuraler Identität beruht. Vielmehr zeigten Immunfärbungen und Zellzyklusanalysen eine erhöhte Anzahl an proliferierenden neuralen Vorläuferzellen in den miR-26-KO Zellkulturen, was auf einen spezifischen Entwicklungsstillstand dieser Zellen in einem neuralen Vorläufer-Stadium hinweist. Durch globale Genexpressionsanalysen und mittels qRT-PCR Analysen der miR-26-KO Zellkulturen konnte dieser starke Phänotyp auf transkriptioneller Ebene bestätigt werden. Bei dieser Analyse zeigte sich eine starke Reduktion der Expression neural-assoziiierter Gene. Letztlich konnte ein molekularer Mechanismus aufgedeckt werden, bei dem die

miR-26 Familie als initialer Faktor eines selbstverstärkenden Netzwerks von neuronalen, REST-regulierten miRs identifiziert werden konnte. Hierbei spielt die miR-26 Familie eine zentrale Rolle bei der schrittweisen Inaktivierung des REST-Komplexes, um das neuronale Genexpressionsprogramm zu initiieren. In den folgenden Kapiteln sollen diese Ergebnisse im Detail diskutiert werden.

4.1 Neurale Differenzierung von ESCs als Modellsystem für die Neurogenese in Vertebraten

Um die Rolle der miR-26 Familie während der Neurogenese genauer untersuchen zu können, wurde als Modellsystem ein murines ESC-basiertes neuronales Differenzierungssystem verwendet. Dieses Modellsystem ermöglicht eine systematische Analyse der Protein- und Genexpression in einzelnen Entwicklungsstadien (ESCs, EBs, NPCs, NCs) während der Differenzierung zu neuronalen Zellen. Weiterhin erlaubt dieses Modellsystem die genetische Manipulation durch Methoden wie der RNA-Interferenz oder CRISPR/Cas.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Differenzierung über EBs als geeigneter Ansatz gewählt. EBs bieten den Vorteil einer dreidimensionalen Struktur, die eine Zell-Zell-Wechselwirkung verstärkt, welche für bestimmte Entwicklungsprogramme wichtig sein können. EBs ähneln in ihrer Morphologie und ihren Genexpressionsprofilen frühen postimplantierten Embryonen. Die Zellen innerhalb dieser EBs können zu Zellen aller drei Keimblätter differenzieren [229]. Daher imitiert dieser Ansatz die Embryonalentwicklung besser als eine Differenzierung von adhärennten Zellen in einer Monolayer Kultur. Eines der größten Probleme bei der Generierung von Neuronen aus ESCs ist die zelluläre Heterogenität [230]. Typischerweise bestehen ESC-abgeleitete neuronale Zellkulturen aus einer Vielzahl von neuronalen Subtypen sowie nicht-neuronalen Zellen. Das in dieser Arbeit verwendete Differenzierungsprotokoll erzeugte nach 15 Tagen eine Zellpopulation, die sich aus etwa 60% TUBB3-positiver postmitotischer Neurone, 2-3% GFAP-positiver Astroglia und etwa 15% SOX2 und NESTIN-positiver neuraler Vorläuferzellen zusammensetzte. Das Gehirn einer Maus besteht zu etwa 65% aus neuronalen und zu etwa 35% aus nicht neuronalen Zelltypen [231]. Im menschlichen Gehirn findet sich ein Verhältnis von neuronalen zu nicht neuronalen Zellen von etwa 1:1 (Überblick siehe [232]). Da das Ziel dieser Arbeit aber primär die Aufklärung der

Funktion der miR-26 Familie während der Genese von Neuronen umfasste, spielte die relative Frequenz von Gliazellen oder anderen nicht neuronalen Zellen, die mit Hilfe dieses Differenzierungssystem generiert werden können, für diese Arbeit nur eine untergeordnete Rolle. Darüber hinaus spiegeln die 60% postmitotische Neurone, die über dieses ESC-Differenzierungssystem generiert werden, die Situation im adulten Gehirn der Maus wider.

Das in dieser Arbeit verwendete neurale Differenzierungsprotokoll sollte außerdem zwei Grundvoraussetzungen erfüllen: zum einen sollte zur Differenzierung möglichst auf die Zugabe von Signalproteinen und Wachstumsfaktoren verzichtet werden, um eine mögliche Kompensation des miR-26-KO Phänotyps durch äußere Faktoren zu minimieren. Viele Differenzierungsprotokolle basieren auf der Zugabe von Wachstumsfaktoren wie etwa EGF, FGF-2 und TGF- α [233, 234], NGF [235-237] oder SHH und FGF-8 [238], die das Vermehren der neuronalen Vorläuferzellen begünstigt, die neuronale Differenzierung allgemein oder in bestimmte neuronale Subtypen fördert. Es sollte zur Differenzierung jedoch nur auf Retinsäure als Faktor zur Unterstützung der ektodermalen Differenzierung zurückgegriffen werden. Retinsäure ist ein Metabolit von Vitamin A und aktiviert eine große Anzahl an Genen, die für die Ausbildung des neuronalen Phänotyps verantwortlich sind. Die Zugabe von Retinsäure in der Zellkultur führt zu einer „Kaudalisierung“ der Zellidentität und fördert die Differenzierung von ESCs zu Neuronen, die in Ihrer Morphologie und dem Genexpressionsprofil Zellen aus dem Rückenmark ähnlich sind, insbesondere Motorneurone [239-241]. Um jedoch die genaue Zellidentität der Neurone in den d15 Zellkulturen zu bestimmen, müssten diese gegen spezifische Marker (für GABAerge, dopaminerge, glutamaterge, serotonerge, cholinerge Neurone) gefärbt oder die Genexpression dieser Markergene quantifiziert werden. Zum anderen sollte dieses Protokoll leicht nachzubilden sein und reproduzierbare Ergebnisse ermöglichen. Für die festgelegten Kriterien stellte sich das in dieser Arbeit eingesetzte neurale Differenzierungssystem als geeignetes Mittel heraus.

4.2 Korrelation der Expression der miR-26 Familie und deren *Ctdsp* Wirtsgenfamilie

In vorangegangenen Studien wurde die Expression der miR-26 Familie und *Ctdsp* schon in verschiedenen Modellorganismen beschrieben. Mitglieder der miR-26 Familie werden

präferentiell in neuronalen Geweben exprimiert. Es konnte in Maus und Mensch-ESC-basierten neuronalen Differenzierungssystemen durch miRNA Screenings bereits gezeigt werden, dass die miR-26 in neuronalen Zellen nach dem NPC-Stadium hochreguliert wird [145, 158]. Außerdem ist aus der Literatur bekannt, dass die miR-26 nicht in ESCs exprimiert wird [88, 157, 183]. In Gehirnen von Mäusen konnte eine relativ konstante Akkumulation der miR-26 von Tag E12 bis P14 detektiert werden [159]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in kultivierten primären Astrozyten und Neuronen aus E17 Embryogehirnen die Expression der miR-26 generell nach drei Wochen in Kultur ansteigt und auch in Astrozyten stärker exprimiert ist als in Neuronen [159]. Ferner wurde im Zebrafisch gezeigt, dass die Expression der miR-26 erst ab dem Beginn der Neurogenese (24 Std. nach der Befruchtung) startet [137, 160, 161]. Durch in situ Hybridisierungen im adulten Zebrafisch wurde gezeigt, dass die miR-26a und miR-26b ubiquitär exprimiert ist, mit einer höheren Expression im Kopf, Rückenmark und in Neuromastzellen [137]. In der adulten Maus ist die miR-26 ubiquitär exprimiert mit neuraler Anreicherung der miR-26a in Cerebellum und Hippocampus [135, 155] und Anreicherungen der miR-26b im Kortex, Cerebellum und Leber [135]. In adulten Menschen ist die miR-26b ubiquitär im gesamten Gehirn exprimiert mit höherer Anreicherung im Rückenmark und Cerebellum [162]. Die Gewebespezifische Analyse der miR-26 Expression im Menschen (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas>, [162]) zeigt, dass die höchste Expression der miR-26a und miR-26b in Haut, Gehirn, Muskel, Nerven, Rückenmark und Knochen zu finden sind (Appendix **Abb. 31**). Diese Expressionsdaten, die aus der Literatur bekannt sind, belegen die neurale Assoziation der miR-26 Familie in Vertebraten und deuten auf eine Rolle dieser miRNA Familie während der Neurogenese hin.

Die in dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR und RNA-Seq Analysen an verschiedenen Tagen der neuronalen Differenzierung von ESCs und während der embryonalen Neurogenese in der Maus zeigen ein entgegengesetztes Expressionsmuster der precursor und maturen miR-26 Familienmitglieder. Während der Differenzierung von NPCs zu NCs als auch während der Entwicklung im Mausgehirn ab dem Beginn der Neurogenese stagniert die Expression der pre-miR-26, im Gegensatz zur maturen miR-26, deren Expression sich etwa um das 5-fache erhöht. Das Expressionsniveau der drei *Ctdsp* Homologe war in NCs im Vergleich zum Expressionsniveau in NPCs stark herunterreguliert. Das Expressionsniveau im E18.5 Mausgehirn im Vergleich zu E13.5 Mausgehirn zeigte dabei das gleiche Muster. Hierbei ist zu erwähnen, dass die miR-26 keinen eigenen Promotor besitzt und mit seinem Wirtsgen zusammen transkribiert wird

[86]. Im Hinblick darauf deutet das entgegengesetzte Expressionsmuster der miR-26 und *Ctdsp* Familie (siehe Abb. 27) auf eine verzögerte oder blockierte Prozessierung der pre-miR-26 hin. Sowohl die Überexpression der miR-26a und miR-26b mittels miRNA mimics als auch die Deletion der miR-26 Familie zeigte die Reprimierung von *Ctdsp1,2,l*. Diese Reprimierung, ob direkt oder zusätzlich indirekt über weitere Repressionsmechanismen, ist aber erst nach dem NPC Stadium zu beobachten. Dieses Phänomen wurde schon im Zebrafisch von Dill und Kollegen gezeigt [160]. In der Arbeit von Dill und Kollegen wurde die Expression der pre-miR-26b und der reifen miR-26b im sich entwickelnden Zebrafisch durch Northern Blots von 1-Zell-Stadium bis zum 4. Tag nach der Befruchtung gemessen. Dabei zeigten sich konstante Level der pre-miR-26b über den analysierten Zeitraum. Interessanterweise war die mature miR-26 erst 24 Std. nach der Befruchtung, zum Zeitpunkt des Beginns der Neurogenese, detektierbar. Bisher sind nur einige wenige miRNAs bekannt, deren Reifung post-transkriptionell, gewebe-spezifisch und in definierten Entwicklungsstadien kontrolliert wird [138, 242-246]. Ein gutes Beispiel für die Gewebe-spezifische Regulation der miRNA Biogenese ist die miR-138 [242]. Die pre-miR-138 ist in fast allen Geweben im Mausembryo exprimiert, jedoch ist die mature miR-138 ausschließlich im ZNS und in der Leber zu finden, da ihre Reifung in anderen Geweben blockiert wird. Die Konservierung der miR-26 Familie in Vertebraten lässt vermuten, dass während der neuralen Entwicklung im Mausembryo in ähnlicher Weise eine blockierte Reifung der pre-miR-26 stattfindet.

Auch auf Proteinebene ist der Einfluss der Deletion der miR-26 Familie auf CTDSP2 ab Tag 10 der Differenzierung zu erkennen. Die direkte posttranskriptionelle Regulation von *ctdsp2* konnte schon im Zebrafisch durch die Injektion von synthetischen miR-26 mimics und über ein Reporter-Assay nachgewiesen werden [160]. In Vertebraten besitzt *Ctdsp2* in der 3'UTR Region zwei potentielle Zielstellen für die miR-26a und b (ein 7mer-m8, ein 7mer-A1, TargetScan Version 7.2). Die Homologe *Ctdsp1* und *Ctdspl* weisen zwar keine potentiellen Zielstellen für die miR-26 auf, jedoch existieren für die miR-124 mehrere Zielstellen in der 3'UTR der drei *Ctdsp* Homologe und es wurde bereits gezeigt, dass die miR-124 die *Ctdsp* Expression direkt unterdrücken kann [74]. In der hier vorgestellten Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression aller *Ctdsp* Homologe nach der Überexpression der miR-124 signifikant abnahm. Weiter zeigte sich in der Expressionsanalyse von tKO^{26a1/a2/b} NCs eine signifikante Verringerung der miR-124 Expression und infolge dessen auch, vermutlich als sekundärer Effekt, eine Erhöhung der *Ctdsp* Expression. Dies erklärt, warum alle *Ctdsp* Homologe durch die Deletion oder

Zugabe der miR-26 signifikant beeinflusst werden können. Zusammengefasst zeigen die in dieser Arbeit gesammelten Daten eine starke Regulation des Wirtsgens *Ctdsp* durch die intronisch codierte miR-26 Familie, ob direkt oder indirekt über die Hochregulation der miR-124 oder andere Repressionsmechanismen, bleibt zu untersuchen. Weiterhin lassen diese Daten vermuten, dass die pre-miR-26-Prozessierung bis zum neuronalen Vorläuferstadium auch im Mausmodell unterdrückt wird.

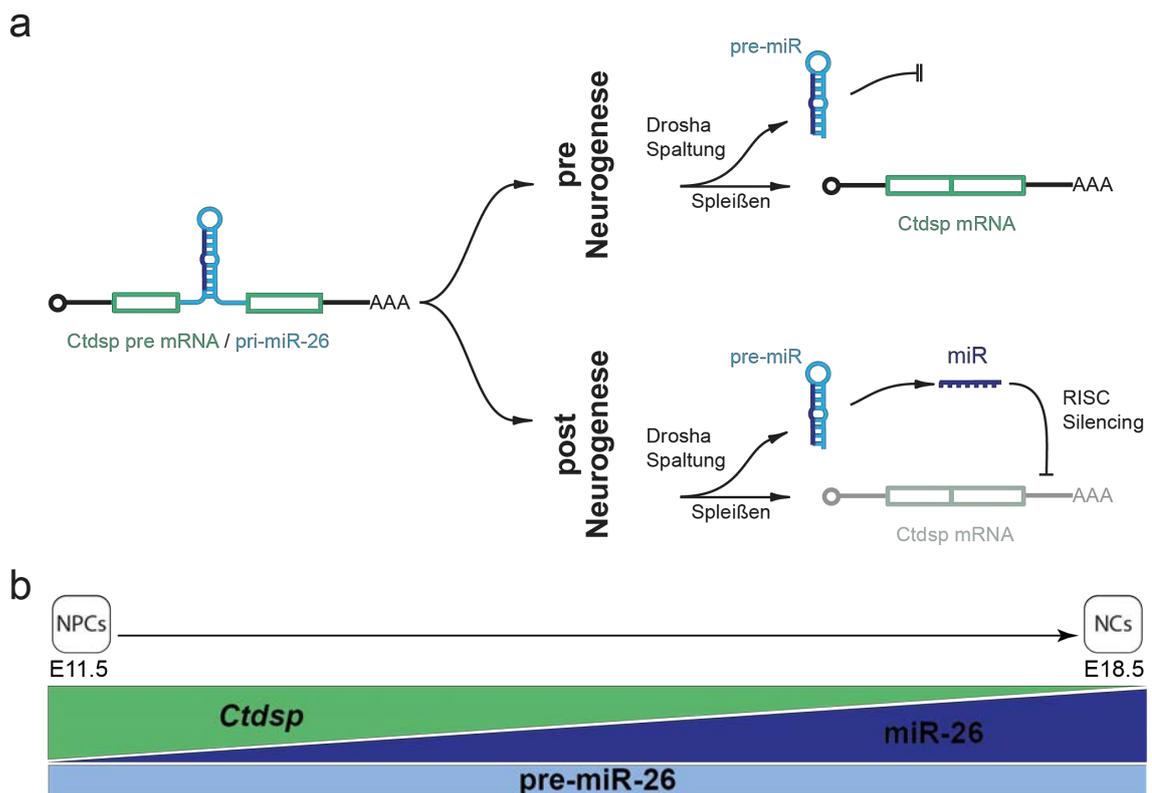


Abbildung 27: posttranskriptionelle Regulation von *Ctdsp* durch intronisch codierte miRNA.

(a) Schaubild der miR-26 Prozessierung und der Regulation seines Wirtsgens *Ctdsp* während der Neurogenese (modifiziert nach [160],[247]). (b) Schematische Darstellung zur Korrelation des Expressionsmusters von *Ctdsp*, precursor und maturer miR-26 in differenzierenden NPCs und im Gehirn von Mausembryonen von Tag E11.5 bis Tag E18.5 (siehe auch Han et al., 2012 [192]).

4.3 Unterschiedliche Funktionen der miR-26a und miR-26b während der Neurogenese

Die phylogenetische Analyse der miR-26 Familie (Appendix **Abb. 30a**) zeigt, dass diese miRNA Familie nur in Vertebraten zu finden ist, die miR-26a und 26b in den einzelnen analysierten Spezies sich nur in 2 Nukleotiden unterscheiden, und dass die Sequenz der Seed Region in allen Vertebraten identisch ist. Weiterhin sind nicht nur die miRNA

Sequenzen konserviert, auch ihre Lokalisation in Wirtsgenen. Alle miR-26 Familienmitglieder sind in Introns von *Ctdsp* Homologen codiert (Appendix **Abb. 30b**). Es ist auf Grund der Sequenzhomologie zwischen den miR-26 Familienmitgliedern und der Konservierung in Vertebraten anzunehmen, dass diese miRNA Familie ähnliche Funktionen in den verschiedenen Vertebraten Spezies erfüllt.

Eine Erkenntnis aus dieser Arbeit ist jedoch, dass der Phänotyp des dKO^{26a1/a2} der in NC Kulturen zu beobachten war, drastischer war, als der von KO^{26b} NC Kulturen in Bezug auf die neuronale Differenzierung und die Expression neuronaler Gene. Die Anzahl an Neuronen, die sich in differenzierten KO^{26b} Zellkulturen bildeten, ist signifikant höher als die Frequenz an Neuronen in dKO^{26a1/a2} Zellkulturen. Eine Erklärung hierfür könnte das 3-fach höhere Expressionsniveau der miR-26a gegenüber der miR-26b sein. Dies würde bedeuten, dass die unterschiedlich starken Auswirkungen der Deletion der miR-26a und miR-26b auf einen Dosis-abhängigen Effekt zurückzuführen sind, die miR-26a und die miR-26b gleiche Funktionen erfüllen, die gleichen Zielgene und damit die gleichen Signalwege beeinflussen und nur die Menge der reifen miR-26a/b in der Zelle ausschlaggebend ist. Die Ergebnisse, die aus der Transfektion von tKO^{26b/a1/a2} NPCs mit miR-26a- oder 26b-mimics hervorgehen, stützen dieses Argument. Beide miRNA mimics zeigten eine ähnliche Effizienz, die Expression von *Ctdsp* und REST-miRs, sowie die Anzahl an postmitotischen Neuronen wieder auf annähernd Wt Niveau zu bringen. MiRNA mimics werden zwar auf RISC geladen, um wie endogene miRNAs die Proteinexpression auf Zielgenen zu unterdrücken, sind aber künstlich hergestellte Biomoleküle, die in Ihrer Funktionsweise und chemischen Zusammensetzung aber von endogenen miRNAs abweichen können.

Entgegengesetzt zu der Erklärung über einen dosis-abhängigen Effekt, zeigten die einzelnen Deletionen von entweder miR-26b oder miR-26a1/a2 alleine schon einen starken Phänotyp, der nicht durch die verbleibende miR-26 in den Einzel-miR-26-KOs kompensiert werden konnte. Das Fehlen einer Kompensation ist deshalb überraschend, da wie oben beschrieben, sich die Sequenzen der maturen miR-26b und miR-26a nur in zwei Nukleotiden unterscheiden und ihre Seed Sequenzen auch Spezies-übergreifend identisch sind. Theoretisch sollten die miR-26a und miR-26b also auch einen identischen oder sehr ähnlichen Satz an Zielgenen besitzen, deren Translation sie unterdrücken können. Jedoch zeigt die Zusammenstellung differenziell exprimierter Gene in den verschiedenen miR-26-KO Zelllinien entgegen den Erwartungen nur geringe Überschneidungen bei den herunterregulierten und hochregulierten Genen zwischen d15

dKO^{26a1/a2}, KO^{26b} und tKO^{26b/a1/a2} Kulturen. Dies könnte bedeuten, dass die miR-26a und miR-26b andere Zielgene regulieren können und dadurch auch voneinander abweichende Funktionen erfüllen könnten. Diesbezüglich wurde anhand der let-7-Familie schon demonstriert, dass die Bindung mit der Seed Region von Ziel-mRNAs für die post-transkriptionelle Regulation der Zielgene alleine nicht ausschlaggebend sein muss. Obwohl die Seed Sequenzen der einzelnen let-7 Familienmitglieder identisch sind, konnte gezeigt werden, dass die einzelnen let-7-Familienmitglieder einen unterschiedlichen Satz an Zielgenen binden und regulieren können [120]. Wäre dies bei der miR-26 Familie auch der Fall, könnten die einzelnen Mitglieder spezifische nicht-redundante Funktionen für die fein abgestimmte Genregulation während der Neurogenese erfüllen. Ein weiteres Argument, das diese Annahme stützen könnte, sind die unterschiedlichen vorausberechneten Sekundärstrukturen der precursor miR-26a1, 26a2 und 26b (siehe Appendix **Abb. 30c**). Insbesondere die unterschiedliche Sekundärstruktur der terminalen Schleife (terminal loop) der pri- und pre-miR unter den miR-26 Familienmitgliedern könnte dabei eine Rolle spielen, da eine ganze Reihe von RNA bindenden Proteinen die miRNA-Reifung auf der Ebene der Drosha- und Dicer-Spaltung durch die Bindung an die terminale Schleifenstruktur regulieren können [248]. Die unterschiedliche Sekundärstruktur und auch die abweichende Sequenz der pre-miR könnte eine Bindung unterschiedlicher miRNA bindender Proteine ermöglichen, die wiederum nicht-redundante Funktionen vermitteln könnten. Alternativ könnten die miR-26a und miR-26b ein unterschiedliches Gewebe-spezifisches oder Zelltyp-spezifisches, vom Entwicklungsstadium abhängiges Expressionsmuster besitzen. In **Abb. 31** im Appendix ist die Gewebe-spezifische Expression der miR-26a und miR-26b im Menschen dargestellt. Hier erkennt man einige Unterschiede zwischen miR-26a und 26b. Zum Beispiel ist die Expression in verschiedenen Bereichen des Gehirns und im Rückenmark für die miR-26a sehr ausgeprägt im Vergleich zur Expression der miR-26b. Auch die Expressionsanalysen von murinem Gewebe und Zellkulturen (Appendix **Abb. 32**) zeigen einige Unterschiede in der Expression der miR-26a und miR-26b, wenngleich diese Analysen keine sehr große Diversität zeigen. Um eine mögliche sich unterscheidende Funktion der einzelnen miR-26 Familienmitglieder zu überprüfen, müssten weitere detailliertere Analysen in der Maus in verschiedenen Geweben z.B. mittels *in situ* Hybridisierungen in einem sich entwickelnden Embryo mit hoher zeitlicher Auflösung durchgeführt werden. Ein anderer Ansatz um mögliche miR-26a- bzw. miR-26b-spezifische Funktionen zu adressieren, könnte ein sogenanntes Swapping-Experiment darstellen. Hier würde z.B. auf genomischer Ebene in ESCs die miR-26a mit

der miR-26b Sequenz gegeneinander ausgetauscht und anschließend der Phänotyp im neuronalen Differenzierungssystem analysiert werden.

4.4 Die miR-26 Familie spielt eine Rolle in späteren Stadien der neurogenen Differenzierung

Die in Kapitel 3.4 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Deletion der miR-26 Familie weder einen Einfluss auf die Morphologie oder die Proliferation von undifferenzierten ESCs oder EBs hatte, noch die Differenzierung zu NPCs beeinflusste. Jedoch gab es eine kleine Abweichung, wenn auch nicht signifikant, in der EB Zellzahl bei der Differenzierung von dKO^{26a1/a2}. Diese Beobachtung ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht zu erklären und benötigt detailliertere Untersuchungen der Zellen in diesem Stadium der Differenzierung um einen Einfluss der miR-26a Deletion nachweisen zu können. Die Expressionsdaten der muren miR-26 zeigen, dass die Expression im neuronalen Differenzierungssystem erst nach dem NPC-Stadium drastisch anstieg. Darüber hinaus wird die miR-26 wie im Kapitel 4.2 beschrieben vermutlich durch einen noch nicht bekannten Faktor in ihrer Biogenese blockiert. Im Gehirn von Mausembryonen ist ein deutlicher Anstieg der Expression der muren miR-26 von Stadium E9.5 bis E18.5 zu erkennen. Dies lässt auf eine Funktion der miR-26 erst in späteren Stadien der neuronalen Entwicklung schließen. Zwischen Wt und miR-26-KO Zellkulturen konnten keine Unterschiede bei den Frequenzen der neuronalen Vorläuferzellen (durch die Färbung von SOX2, NESTIN und MSI1) in NPC Kulturen an Tag 10 detektiert werden. Analog hierzu zeigten Studien im Zebrafisch, dass der *knockdown* der miR-26 durch Morpholino Injektionen keinen Effekt auf die NPC Population im Rückenmark von Zebrafischembryonen hatte [160]. Im ESC Differenzierungssystem zeigte die Deletion der miR-26 Familie keine Auswirkungen auf die Genexpression von neuronalen Vorläufermarkern (*Msi1*, *Pax6*) und neuronalen Markern (*Tubb3*, *Neurod1*, *Neurog1*, *Ncam1*) in NPCs. Die gesammelten Daten lassen vermuten, dass die miR-26 Familie erst in einem späteren Stadium der neuronalen Differenzierung in Vertebraten eine Rolle spielt.

Die weitere Differenzierung der NPCs zu neuronalen und glialen Zelltypen war jedoch in allen miR-26-KO Zelllinien stark eingeschränkt. Sogar die einzelne Deletion der miR-26a1/a2 oder miR-26b zeigte eine starke Reduktion der Anzahl an Neuronen und Astroglia in differenzierten Zellkulturen. Dieser eindeutige Phänotyp der tKO^{26b/a1/a2}

Zelllinien (von etwa 55% Neurone im Wt auf etwa 5% Neurone), ausgelöst durch die Deletion nur einer miRNA Familie, war bemerkenswert. Durch das Wiedereinbringen der miR-26 in tKO^{26b/a1/a2} NPCs mit Hilfe von miR-26 mimics konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Neuronen auf annähernd Wt Niveau wiederhergestellt werden konnte. Dies belegt, dass der Differenzierungs-Phänotyp durch den *knockout* der miR-26 Familie ausgelöst wurde. Durch die RNA-Seq Analyse und die *GO-Term*-Klassifizierung der differenziell exprimierten Gene in den miR-26-KO Kulturen konnte auf molekularer Ebene der Phänotyp bestätigt werden. Diese globale Genexpressionsanalyse zeigte, dass viele herunterregulierte Gene in miR-26-KO Zellen sich in *GO-Terms* für biologische Prozesse clustern lassen, die in neuralem Gewebe, bei der Differenzierung und während der Neurogenese eine Rolle spielen. Auch die Analyse der gemeinsam in allen miR-26-KO Bedingungen herunterregulierten Gene, obgleich ihre Überschneidung eher gering ausfiel, konnten in 13 von 20 Fällen *GO-Terms* für zugeordnet werden, die assoziiert sind mit der Neurogenese, der neuralen Entwicklung und der neuralen Differenzierung. Die Repression auf die globale Expression von neuronalen Genen durch die Deletion der miR-26 Familie konnte durch qPCR-Analysen von neuronalen Markern bestätigt werden.

Die Quantifizierung neuronalen Ausläufer in den miR-26-KO Zellkulturen zeigte eine starke Reduktion der Neuritendichte. Dies ist bezüglich der Reduktion von Neuronen auf 5% in tKO^{26b/a1/a1} Kulturen zu erwarten. Die Untersuchung von einzelnen Neuronen, die sich trotz der Deletion der miR-26 Familie entwickeln konnten, zeigte jedoch nur geringe und nicht signifikante Auswirkungen auf die Axonlänge. Weiterhin konnten keine Unterschiede in der Morphologie der Neuriten zwischen Wt und miR-26-KO Neuronen festgestellt werden. In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigen Dill und Kollegen [160], dass auch in 60 Std. alten Zebrafischembryos der *knockdown* der miR-26b über Morpholino-Injektionen zu einer starken Reduktion von sekundären Motoneuronen im Rückenmark führte. Jedoch entwickelten sich die übrig gebliebenen Motoneuronen normal und es wurden kaum merkliche Einflüsse auf die Morphologie und Wegfindung der axonalen Faszikel beobachtet.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass eine neurale Vorläuferzelle für die Differenzierung bzw. den Übergang zu einer weiter determinierten, neuronalen Zelle an einem spezifischen Zeitpunkt während der Differenzierung ein bestimmtes Expressionslevel der miR-26 benötigt. Die wenigen Zellen, die ohne den Einfluss der miR-26 Familie über dieses Übergangsstadium hinaus differenzieren können, waren trotzdem in der Lage über irgendeine Art der Kompensation, zu postmitotischen

Neuronen zu differenzieren und Axone auszubilden. Dies würde erklären, warum trotz der miR-26 Deletion, sich einige Zellen zu Neuronen differenzieren lassen und das axonale Wachstum dieser Neurone nur sehr geringfügig gehemmt ist.

Es stellte sich weiterhin die Frage, was mit den Zellen in den miR-26-KO Kulturen passiert, die nicht zu Neuronen differenzieren. In Kapitel 3.6 wurden drei hypothetisch mögliche Szenarien aufgestellt und überprüft. In den folgenden Absätzen werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen diskutiert.

4.4.1 Analyse der Vitalität in miR-26-KO Zellen

Frühere Studien zeigen einen Einfluss der miR-26 Familie auf die Apoptose. Untersuchungen mit hepatozellulären Karzinomzelllinien zeigten, dass die miR-26 die Autophagie über *Ulk1* inhibiert [249] und die Apoptose fördert [250, 251]. Außerdem konnte in Multiplen Myelomen gezeigt werden, dass die miR-26b als Tumorsupressor über die direkte negative Regulation von *Jag1* die Apoptose von Tumorzellen beschleunigt [252]. In einer humanen Osteosarkomazelllinie führte die Transfektion von miR-26b mimics zu einem arretierten Zellzyklus, und zur Induktion der Apoptose über die Herunterregulierung von *Pfkfb3* [253]. Weiterhin induzierte die miR-26a in Brustkrebszellen die Apoptose über direkte Regulation von *Mtdh* und *Ezh2* [170]. Die Überexpression der miR-26b in primären postmitotischen Neuronen führte zu einem Phänotyp, der in ähnlicher Weise auch bei Patienten mit Alzheimer Krankheit beobachtet wurde. Die erhöhten miR-26b Level führten zu einer verstärkten Tau-Phosphorylierung, zum apoptotischen Zelltod und einer verringerten Zellviabilität der Neurone [254]. Alle diese Studien zeigen eine verstärkte Apoptose durch die Erhöhung der miR-26-Level.

Um zu untersuchen, ob die Deletion der miR-26 die Viabilität der Zellen während der Differenzierung beeinflusst, wurde die Frequenz an apoptotischen Zellen in den miR-26-KO Zellkulturen untersucht. Bei diesen Analysen konnten zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung eine Änderung des Verhältnisses an vitalen, apoptotischen und toten Zellen in den miR-26-KO Zellkulturen im Vergleich zum Wt festgestellt werden. Die Deletion der miR-26 in ESCs zeigte also keinen Effekt auf die Apoptose während der neuralen Differenzierung. Allerdings wurde ein Großteil der vorangegangenen Studien, die einen Einfluss der miR-26 auf die Apoptose zeigten, mit verschiedenen immortalisierten Krebszellen durchgeführt. Weiterhin waren dies zumeist *Gain-of-Function* Studien, in denen miRNA mimics verwendet wurden. In dieser Arbeit wurde

eine Analyse der Apoptose nur in den miR-26-KO und Wt Zellkulturen durchgeführt. Jedoch wäre es interessant im ESC-Differenzierungssystem eine Überexpression der miR-26 durch mimics oder durch ein stabile eingebautes Konstrukt und dann diese Zellen zu analysieren um einen möglichen Effekt auf die Vitalität der Zellen zu untersuchen. Jedoch konnte dieses Szenario als Erklärung für die Hemmung der neuronalen Differenzierung in miR-26-KO Zellen durch die Analysen in dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

4.4.2 Globale Analyse der Genexpression in miR-26-KO Zellen

Um auf transkriptioneller Ebene den Phänotyp, hervorgerufen durch die Deletion der miR-26 Familie zu untersuchen, wurden RNA-Seq Analysen durchgeführt. Durch die Klassifizierung der herunter- und hochregulierten Gene sollte geprüft werden, ob die Zellen in den miR-26-KO Kulturen eine andere, möglicherweise nicht neurale, Zellidentität annehmen. Die *GO-Term* Analyse der unterschiedlich exprimierten Gene in allen differenzierten miR-26-KO Zelllinien zeigen für herunterregulierte Gene eine gemeinsame Tendenz. Dabei sind vor allem Gene, die in *GO-Terms* klassifiziert werden, welche mit Prozessen während der neuralen Differenzierung und im Nervensystem assoziiert sind, herunterreguliert. Die Klassifizierung der hochregulierten Gene in *GO-Terms* zeigte nur bei d15 KO^{26b} Zellen eine Tendenz zu biologischen Prozessen, die in Muskelgewebe eine Rolle spielen (4 von 25 *GO-Terms*). Ansonsten konnte keine offensichtliche Tendenz zu einem zusammenhängenden biologischen Prozess oder zu einem bestimmten Zelltyp festgestellt werden. Um diesen Kontext der Hochregulation der Muskelgewebe-assoziierten Gene in KO^{26b} Zellen zu erschließen, müssten detailliertere Analysen durchgeführt werden um eine mögliche Differenzierung der miR-26-KO Zelllinien in diese Richtung zu untersuchen.

Die qRT-PCR Analysen bestätigten die Erkenntnisse aus der RNA-Seq Analyse. Die neuronalen Marker, darunter zwei der Schlüsselregulatoren der Neurogenese in Vertebraten (*NeuroG1*, *NeuroD1*) [255-259], ein Strukturprotein für postmitotischen Neuronen (*Tubb3*) und das neuronale Zelladhäsionsmolekül *Ncam1*, waren alle in tKO^{26a1/a2/b} NCs herunterreguliert. Vielmehr spiegelte das Expressionsmuster in d15 tKO^{26a1/a2/b} Zellkulturen das Expressionsmuster in d10 Wt Zellkulturen wider. Dies zeigt, dass die miR-26-KO Zellen nach 15 Tagen unter neuronalen Differenzierungsbedingungen in ihrer Identität, zumindest auf transkriptioneller Ebene, Wt NPCs an Tag 10 sehr ähnlich sind. Weiterhin war die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren *Msi1*, *Pax6*, spezifischen

Marker für neurale Vorläuferzellen, in tKO^{26a1/a2/b} Zellkulturen an Tag 15 der Differenzierung hochreguliert und auf einem ähnlichen Expressionslevel wie in d10 Wt Zellkulturen. Diese Transkriptom-Analysen zeigen zusammengefasst, dass die Zellen in ihrer molekularen Identität auf der neuralen Linie bleiben, aber zugleich in ihrer Identität den neuronalen Vorläuferzellen im Wt auf transkriptioneller Ebene sehr ähnlich sind.

4.4.3 Erhöhte Frequenzen von proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen in miR-26-KO Zellkulturen

Um die nicht zu postmitotischen Neuronen differenzierten Zellen in den miR-26-KO Kulturen weiter zu charakterisieren, wurden die Frequenzen von neuronalen Vorläufermarkern auch in miR-26-KO Zellen an Tag 15 der Differenzierung quantifiziert. Dabei konnten signifikant höhere Frequenzen an Msi1-, Nestin- und Sox2-positiven Zellen in allen miR-26-KO Zelllinien beobachtet werden. Die Morphologie dieser KO Zellen unterschied sich auch von der Morphologie der Zellen in den Wt Kulturen. Die Zellen in den miR-26-KO Kulturen bildeten größere Cluster an Zellen, was vermuten lässt, dass diese Zellen sich weiterhin teilten. Dies bedeutet möglicherweise, dass ein Großteil der Zellen ohne den Einfluss der miR-26 auch unter neuronalen Differenzierungsbedingungen in einem neuronalen Vorläuferstadium oder einem weiteren intermediären Differenzierungszustand festgehalten werden und nicht zu postmitotischen Neuronen differenzieren.

Die Morphologie und die Immunfärbungen der miR-26-KO Zellkulturen lässt vermuten, dass es sich bei diesen Zellen um proliferierende neurale Vorläuferzellen handelt. Für einige miRNAs konnte gezeigt werden, dass diese die Zellproliferation kontrollieren können indem sie negative und positive Regulatoren des Zellzyklus-Apparats ausschalten. Eine differenzielle Expression von miRNAs kann daher sowohl zum Zellzyklus-Wiedereintritt und zur Tumorgenese oder zum ungeplanten Zellzyklus-Austritt führen [260].

In tKO^{26b/a1/a2} Kulturen an Tag 15 konnte eine erhöhte Zellzahl, die sich in der M/G₂/S-Phase des Zellzyklus befanden, detektiert werden. Weiterhin konnte eine reduzierte Expression der Zellzyklusinhibitoren p16^{Ink4A}, p19^{Arf} und p21^{Cip1} in miR-26-KO-Zellen nachgewiesen werden, was auf eine verstärkte Progression des Zellzyklus in diesen Zellen hinweist. Diese Zellzyklus Analyse zeigte jedoch nur die Zellzyklus-Phasenverteilung der gesamten Zellpopulation in miR-26-KO Zellkulturen und nicht

spezifisch die Zellzyklus-Phasenverteilung der NPC Population. Um spezifische Untersuchungen der NPC-Population durchzuführen, müsste diese Zellpopulation z.B. mittels Durchflusszytometrie selektiert und analysiert werden. Jedoch gibt es zunehmend Hinweise auf eine Rolle der miR-26 Familie bei der Zelldifferenzierung und dem Austritt aus dem Zellzyklus. Die Auswirkungen auf die Progression des Zellzyklus in den miR-26-KO Zellen im Vergleich zu Wt Zellen decken sich mit früheren Studien, bei denen die Überexpression der miR-26 die Zellproliferation durch Hemmung des G1/S-Phasen-Übergangs und die Expression von c-myc, Cyclin D2, Cyclin D3, Cyclin E2, CDK4 und CDK6 unterdrückte [171, 172]. Gleichzeitig konnte schon gezeigt werden, dass die Überexpression der miR-26 zu einer erhöhten Expression der CDK Inhibitoren p14^{arf} und p21^{cip1} über EZH2 führt [168]. In ähnlicher Weise wurde ein G1/S-Übergangsblock nach der Überexpression der miRs 26a/b in Krebs-Zelllinien durch die Aktivierung des pRb Proteins beschrieben [179]. Da die miR-26 Familie schon in vielen Veröffentlichungen mit der Regulation des Zellzyklus in Verbindung gebracht wurde, ist es nicht überraschend, dass diese miR-Familie auch in verschiedenen Tumoren differenziell exprimiert wird. Die miR-26 wurde schon oft als Tumorsupressor beschrieben und ist herunterreguliert in T- und B-Zell Lymphomen [169, 261], Leberkarzinomen [171, 172], Nasenrachenkrebszellen [168, 173], Brustkrebs-Gewebe und -zelllinien [170], Lungenkrebs-Gewebe [262], Burkitt-Lymphom-Gewebe [169], Gallengangskarzinom-Gewebe [187], Melanomen [263], Hypophysentumor-Gewebe [181] und Blasen-tumor-Gewebe [264]. Hierbei ist erwähnenswert, dass im Gegensatz dazu die miR-26a in Gliomen hochreguliert ist und die Gliomagenese über die negative Regulation des Tumorsuppressors PTEN fördert [176, 180, 265]. Diese Beobachtung steht in deutlichem Kontrast zu der antiproliferativen Wirkung der miR-26 in anderen Krebsarten und spiegelt möglicherweise gewebespezifische Unterschiede in der Funktion der miR-26 Familie wider. Auch der Einfluss von *Ctdsp*, als Wirtsgen der miR-26 Familie, auf den Zellzyklus wurde schon gezeigt. Die Überexpression von *Ctdsp1* in Hühner-Neuroepithelzellen störte den Austritt aus dem Zellzyklus und induzierte eine starke Proliferation der Zellen [74]. Die Überexpression von *Ctdsp2* im Kortex von Mausembryonen führte zur positiven Regulation der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen [177]. Zhang und Kollegen zeigten in dieser Studie, dass die miR-26 im zerebralen Cortex von Mausembryonen, ähnlich wie ihr Wirtsgen *Ctdsp2*, positiv die Proliferation von neuronalen Vorläufern über die Kontrolle der Zellzyklus-Progression regulieren kann. Dies zeigt eine neue Sichtweise der Funktion der miR-26, die im

Gegensatz zu den Ergebnissen aus meiner Arbeit und der vieler anderer Arbeitsgruppen einen positiven Effekt der miR-26 auf die Zellzyklus Progression zeigt. Da die neuronale Zellpopulation in dem hier vorgestellten ESC-Differenzierungssystem nach 15 Tagen sich aber aller Wahrscheinlichkeit nach zum Großteil aus spinalen Motorneuronen zusammensetzt (siehe Kapitel 4.1.), könnte die Arbeit von Zhang und Kollegen in Zusammenhang mit den Ergebnissen meiner Arbeit einen Hinweis auf eine gewebespezifische Funktion der miR-26 liefern. Der Großteil der Daten aus der Literatur zusammen mit den Ergebnissen aus meiner Arbeit legt jedoch nahe, dass die miR-26 Familie den Zellzyklus-Austritt und die Differenzierung, insbesondere in neurale Subtypen, steuert.

In dieser Arbeit konnte mit einem ESC-basierten neuronalen Differenzierungssystem gezeigt werden, dass durch das Fehlen der miR-26 eine Subpopulation von sich weiter teilenden Vorläuferzellen mit neuraler Identität entsteht, deren Differenzierung gehemmt wird (schematische Darstellung in **Abb. 28**). Die Deletion der miR-26 zeigte dabei keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen während der neuralen Differenzierung. Zusammengefasst lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die miR-26 wichtig für den Zellzyklusarrest ist und somit eine wichtige Funktion beim Beginn der Differenzierung zu postmitotischen Neuronen besitzt.

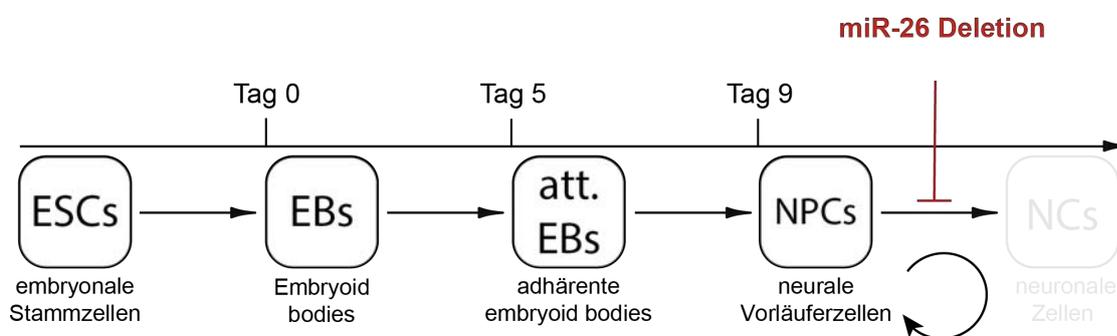


Abbildung 28: Schematische Darstellung des Differenzierungs-Arrests in miR-26-KO Zellen

4.5 Die miR-26 Familie reguliert den REST-Komplex

REST unterdrückt die neuronale Genexpression und verhindert die Differenzierung von pluripotenten ESCs zu maturen Neuronen [51]. Die Deletion der miR-26 Familie hatte weder einen Einfluss auf undifferenzierte ESCs noch auf die Differenzierung von ESC zu NPCs. Bis zu diesem Stadium konnte auch kein Einfluss des miR-26-KOs auf die Expression von REST- und *Ctdsp1,2,1* beobachtet werden. Jedoch zeigte sich bei der

Genexpressionsanalyse von *Ctdsp1,2,1* sowie den Western-Blot Analysen von REST und CTDSP2 in tKO^{26b/a1/a2} Zellen ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Wt ab Tag 10 der Differenzierung. Die Hemmung der Differenzierung in den miR-26-KO Zellkulturen lässt auf Funktionen der miR-26-Familie in spezifischen Entwicklungsstadien schließen, entweder über die direkte oder indirekte Regulation der REST-Komplex Aktivität. Die *small* RNA-Seq von miR-26-KO Kulturen unterstützen dabei ein REST-Komplex abhängiges Szenario. Beobachtet wurde hier eine Herunterregulation aller miRs in tKO^{26b/a1/a2} Zellkulturen, deren Expression direkt unter REST-Kontrolle steht, während die Mehrheit (etwa 2/3) aller miRs hochreguliert war. Die einzige REST-miR Familie, deren Expression in allen miR-26-KO NCs erhöht war, ist die miR-29 Familie. Über diese miR Familie ist noch nicht viel bekannt, sie reguliert Zielgene mit sehr unterschiedlichen Funktion die durch fünf zelluläre Prozesse klassifiziert werden können (Apoptose, Zellproliferation, Differenzierung, Immunantwort, Extrazellulärmatrix) [266]. Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf eine Regulation der neuronalen REST-miRs durch die miR-26 Familie, über die Unterdrückung der REST Aktivität während der neuronalen Differenzierung hin.

Vier der am stärksten herunterregulierten REST-miRs (miR-124, -9, -218, -132) in den d15 miR-26-KO Kulturen, sind wichtige Regulatoren der Neurogenese und spezifisch im sich entwickelnden und adulten Nervensystem von Vertebraten hoch exprimiert [135, 267-269]. Yoo und Kollegen konnten in einem interessanten Experiment zeigen, dass die Induktion der REST-regulierten miR-124 und -9 ausreichend ist, um humane Fibroblasten zu Neuronen umzuprogrammieren [152]. Dies demonstriert, wie essentiell alleine diese zwei miRNAs für die Neurogenese sind. Eine miR-124 und -9-spezifischen qRT-PCR Analyse während der neuralen Differenzierung (ESCs, NPCs und NCs) konnte eine signifikant verringerte Expression dieser miRs in tKO^{26b/a1/a2} NCs bestätigen. Parallel dazu führte die Transfektion von miR-26 mimics zu einer erhöhten Expression von REST-regulierten miRs (miR-9, miR-124, miR-218 und miR-135a). Interessanterweise besitzen alle diese REST-miRs, die in miR-26-KO Zellen herunterreguliert und in miR-26 mimics transfizierten Zellen hochreguliert sind, auch potentielle Zielstellen in mehreren mRNAs von REST-Komplex-Mitgliedern. Dies weist auf eine mögliche Rückkopplung zwischen dem REST-Komplex und REST-miRs hin. Die Beobachtung, dass die Transfektion von miR-124 und -9 mimics in NPCs nicht zu einer erhöhten miR-26-Expression führte zeigte außerdem, dass die miR-26 Familie nicht unter der Regulation von REST-miRs steht und

vermutlich sogar als initialer Faktor zum Verstärken dieser REST/REST-miR Rückkopplungsschleife während der Neurogenese agiert.

Der Beweis für eine direkte Bindung und Regulation der einzelnen REST Komponenten durch die miR-26 in der Maus steht noch aus. Die Regulation der REST-Aktivität über die miR-26 könnte auch durch vorgeschaltete Signalwege erreicht werden. Jedoch wurde die Herunterregulation von REST und CTDSP2 durch die Überexpression von entweder miR-26a oder miR-26b schon in Mauszelllinien gezeigt [270]. In dieser Arbeit von Lambert und Kollegen wurde weiterhin durch ein Luciferase Assay die direkte Bindung von REST und miR-26b gezeigt. Für *Ctdsp2* wurde zumindest schon in Zebrafischembryonen für die miR-26b durch ein Reporter Assay eine direkte Bindung gezeigt [160]. Auf Grund der hohen Konservierung der miR-26 Familie in Vertebraten ist davon auszugehen, dass dieser molekulare Mechanismus parallel auch in der Maus aufzufinden ist.

MiRNAs sind in der Lage tausende von Zielgenen zu regulieren. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Regulation des REST-Komplexes durch die miR-26 Familie gelegt, da die gesammelten Ergebnisse einen starken Hinweis auf eine direkte Regulation des REST-Komplexes durch die miR-26 und somit eine mögliche Erklärung für den drastischen Phänotyp des miR-26-KOs liefern. Die bioinformatischen Analysen und die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Beeinflussung des REST-Komplexes durch die miR-26 möglicherweise nur einen Teil der molekularen Signalkaskade darstellt, die durch miR-26 Familie während der neuralen Entwicklung initiiert wird. Es ist wahrscheinlich, dass die miR-26 Familie auch auf andere Signalwege, die während der Neurogenese wichtig sind, einen Einfluss hat. Eine KEGG Pathway Analyse zeigte, dass die miR-26 Familie Zielgene regulieren kann, die bei sehr unterschiedlichen Signalwegen, unter anderem der WNT-Signalweg, eine Rolle spielen.

4.6 Modell zur Rolle der miR-26 Familie während der Neurogenese in Vertebraten

Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen und den bereits veröffentlichten Ergebnissen über die miR-26 Familie und der *Ctdsp* Wirtsgene, über den REST-Komplex und die REST-miRs, wurde ein Modell für die Rolle der miR-26 während der Neurogenese erstellt (**Abb. 29**). Dieses Modell beschreibt schematisch die

gesammelten Erkenntnisse aus dieser Arbeit und der publizierten Literatur, insbesondere den Einfluss der miR-26 auf die Aktivität des REST Komplexes. In undifferenzierten ESCs, hemmt der REST-Komplex die Expression neuronaler Gene und miRs durch Bindung an RE1-Sequenzen innerhalb der Promotor Region von neuronalen Genen. Ab dem NPC Stadium beginnt die Prozessierung der miR-26-Familienmitglieder. Die miR-26-Familienmitglieder können dann die Expression von CTDSP und REST reprimieren und damit die Unterdrückung von REST-regulierten neuronalen Genen und miRNAs aufheben. Folglich werden auch REST-regulierte neuronale miRs stärker exprimiert und unterdrücken ihrerseits in einer negativen Rückkopplungsschleife die Komponenten des REST Komplexes. In neural differenzierten miR-26-KO Zellen fehlt der initiale Schritt der Hemmung von CTDSP und REST durch die miR-26 und damit der REST-Komplex Aktivität (**Abb. 29**, unten). Dies führt zu einer fortlaufenden Hemmung von neuronalen Genen und neuronalen miRs die durch den REST Komplex reguliert werden. Durch die Aufrechterhaltung der REST-Komplex Aktivität kommt es nicht zur Einleitung des spezifischen neuronalen Genexpressionsprogramms wie in Wt Zellen und damit zu einer starken Verminderung des Differenzierungspotentials. Schlussendlich führt dies zu einer Blockade der neuronalen Differenzierung im NPC Stadium und zur erhöhten Anzahl an proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen in den miR-26-KO Zellkulturen.

MiRNAs werden oft als *finetuner* der Genexpression beschrieben. Im Gegensatz zu dieser Sichtweise zeigen die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit, dass die miR-26 Familie eine essentielle, und potentiell initiale Rolle beim Übergang von Vorläuferzellen zu postmitotischen, funktionellen Neuronen während der Entwicklung in Vertebraten einnimmt. Um dies zu belegen, und die miR-26 Familie als initialen Auslöser der Neurogenese zu identifizieren, könnte die miR-26 in somatischen Zellen wie Fibroblasten überexprimiert werden, um zu analysieren ob sich unter bestimmten Zellkulturbedingungen diese Zellen zu Neuronen reprogrammieren lassen. Yoo und Kollegen [152] konnten zeigen, dass sich aus humanen, neonatalen Fibroblasten aus der Vorhaut, in denen die miR-9/9*, miR-124 und *Neurod2* überexprimiert wird, innerhalb von 4 Wochen Neurone bilden können (~50% MAP2-positive Zellen). Weiterhin konnten Drouin-Ouellet und Kollegen [271] zeigen, dass über den *knockdown* von REST adulte, dermale, humane Fibroblasten mit einer höheren Effizienz und Reinheit zu funktionellen Neuronen reprogrammiert werden können. Da die miR-26 in der Lage ist die REST-regulierten miRs-124 und -9/9* hochzuregulieren und REST zu reprimieren, könnte dies ein geeigneter experimenteller Ansatz sein, um diese Hypothese zu belegen. Diese

Analysen könnten dazu dienen das unten gezeigte Modell (**Abb. 29**) weiter zu validieren und die möglicherweise einzigartige Position, welche die miR-26 bei der neuronalen Differenzierung einnimmt, zu untermauern.

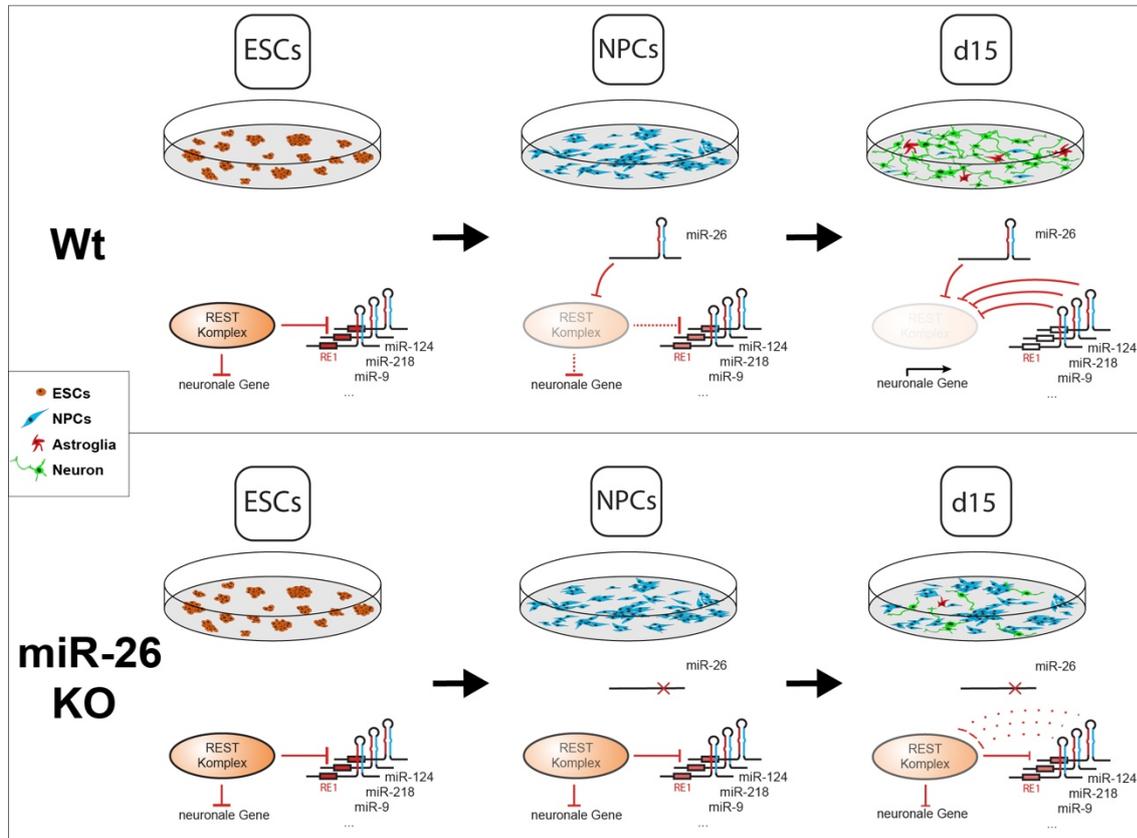


Abbildung 29: Rolle der miR-26 Familie während der Neurogenese im Modell.

Das Modell zeigt schematisch die Zellidentität der Wt (oberer Kasten) und miR-26-KO (unterer Kasten) Zellen während der neuronalen Differenzierung und den molekularen Mechanismus, mit der die miR-26 Familie Einfluss auf den REST-Komplex und auf REST-regulierten miRs nimmt. Dabei sind schematisch in Petrischalen jeweils in den oberen Panelen die Wt und miR-26-KO Zellen während der Differenzierung und in den unteren Panelen sind jeweils die zu Grunde liegenden molekularen Ereignisse in den Stadien der Differenzierung schematisch dargestellt.

5 Appendix

Diese Dissertation wurde im Rahmen des DFG-geförderten Projekts „The role of miR-26 family in neurogenesis“ im Schwerpunktprogramm SPP1738 und in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Utz Fischer, insbesondere in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Ziegenhals angefertigt. Die folgende Tabelle zeigt die individuellen Beiträge zu den Ergebnissen dieser Arbeit, die zum Teil auch in der Dissertation von Thomas Ziegenhals zu finden sind.

Tabelle 2: Individuell prozentuale Beiträge zu den finalen Abbildungen im Ergebnisteil dieser Dissertation von Mark Sauer (MS) und Thomas Ziegenhals (TZ).

Abbildungen	MS	TZ
Abbildung 20: Globale Genexpressionsanalyse und GO-Term Klassifizierung der differenziell exprimierten Gene in d15 miR-26-KO Zellen.	70	30
Abbildung 21: Schnittmenge der differenziell exprimierten Gene in den einzelnen d15 miR-26-KO Zelllinien und Expressionsanalysen von neuronalen- und neuronalen Vorläufer-Markern.	80	20
Abbildung 22: Auswirkung der miR-26 Deletion auf das miRNA Transkriptom	50	50
Abbildung 24: Potentielle REST-miR/REST Rückkopplungsschleife.	0	100
Abbildung 23: Expressionsanalyse der REST-regulierten miRs in miR-26-KO Zellen.	70	30

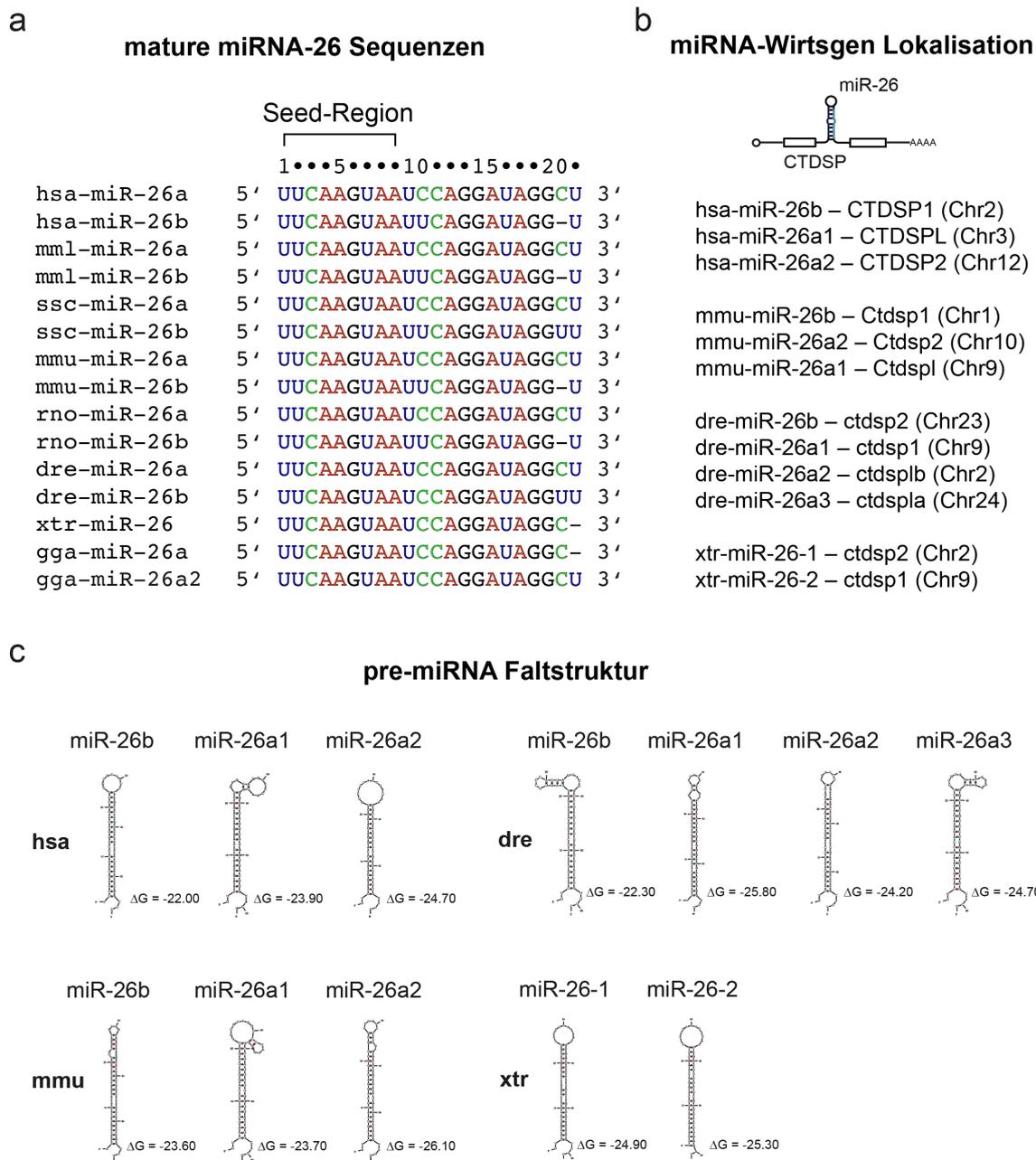


Abbildung 30: Konservierung der miR-26 Familie in Vertebraten.

(a) Vergleich der Gensequenzen der miR-26 Familienmitglieder in verschiedenen Spezies. Die Seed Regionen der miR-26 sind dabei gekennzeichnet. (hsa = *homo sapiens* = Mensch, mml = *macaca mulatta* = Rhesusaffe, ssc = *sus scrofa* = Wildschwein, mmu = *mus musculus* = Hausmaus, rno = *rattus norvegicus* = Wanderratte, dre = *danio rerio* = Zebrafisch, xtr = *xenopus tropicalis* = Krallenfrosch, gga = *gallus gallus* = Bankivahuhn). miRNA Sequenzen aus miRBase Sequence Database, Version 22. (b) Genomische Lokalisation der miR-26 Familienmitglieder in Introns ihrer Wirtsgene CTDSF in verschiedenen Spezies. (c) Potentielle pri-miRNA Stammschleifen-Faltstruktur der miR-26 Familienmitglieder in verschiedenen Spezies. Die freie Energie (ΔG) ist dabei für jede miRNA angegeben in der Einheit kcal/mol. Die RNA Faltstruktur wurde mit dem mfold Web Server berechnet (<http://unafold.rna.albany.edu> [205]).

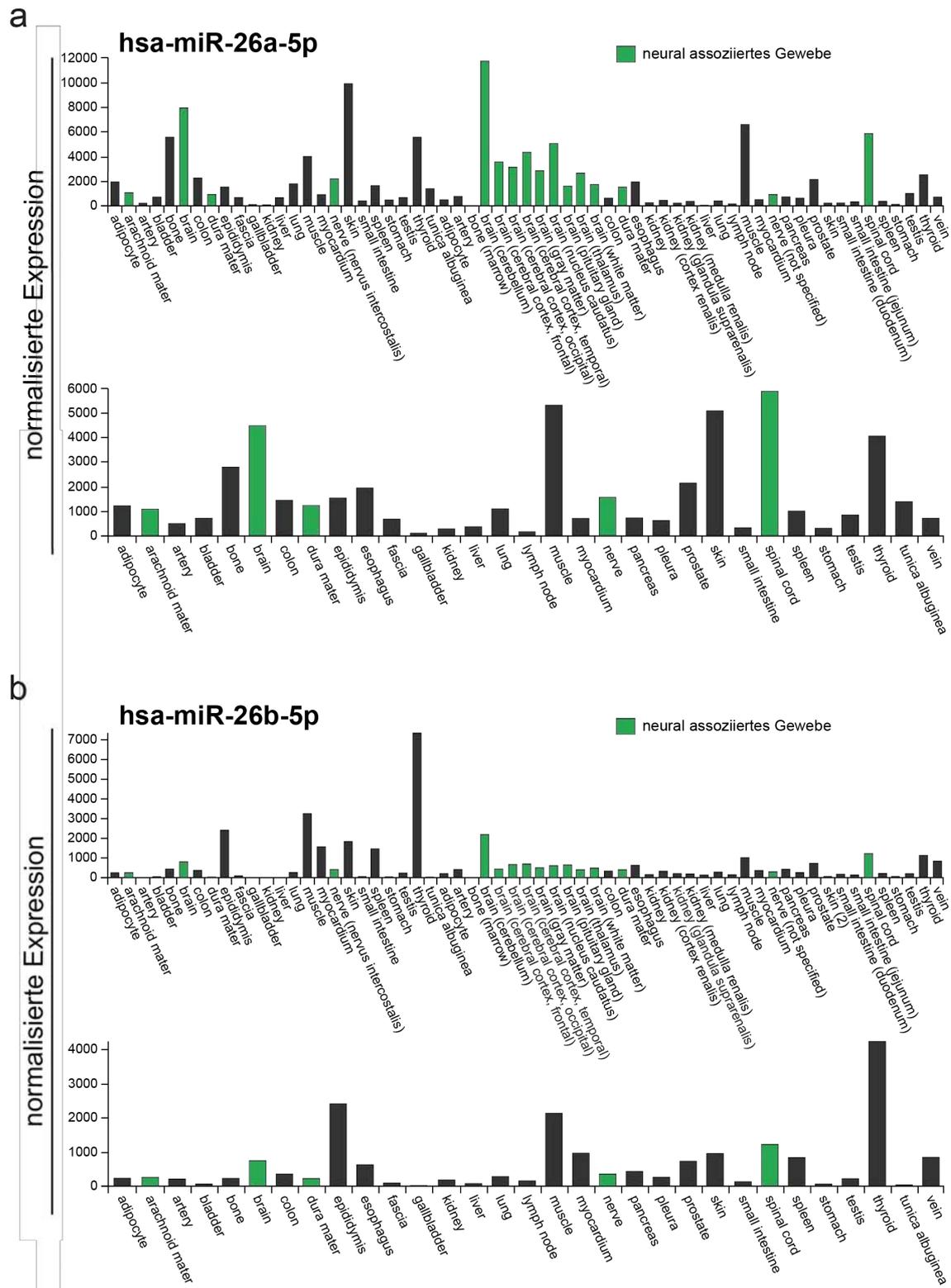
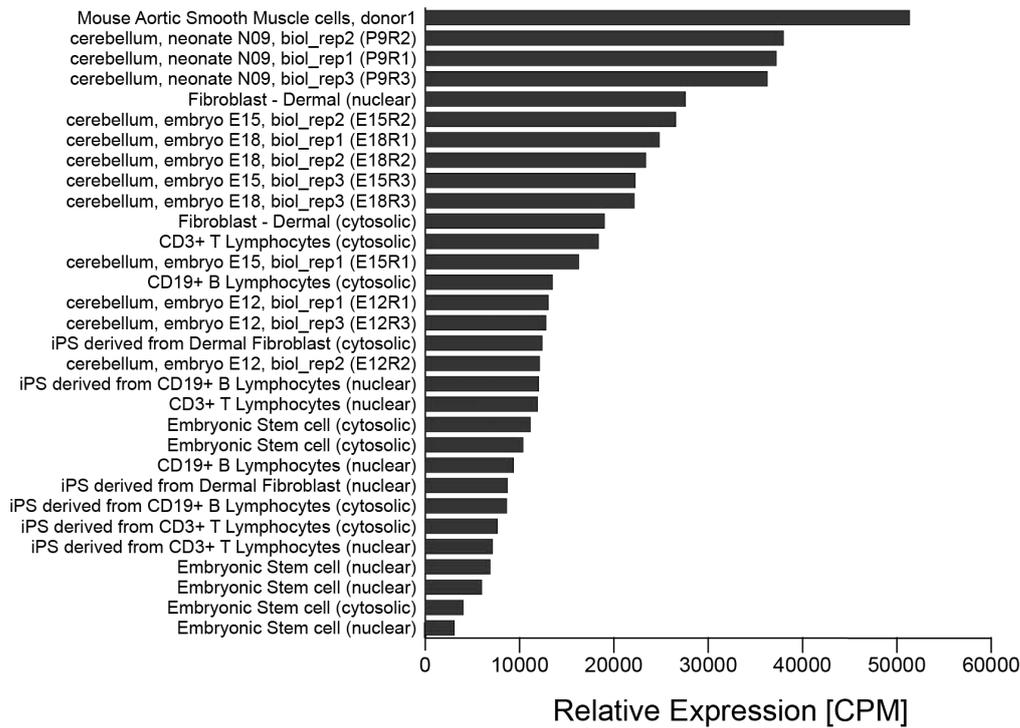


Abbildung 31: Expression endogener miR-26a und -26b in verschiedenen humanen Geweben. Gewebespezifische Expression der hsa-miR-26a (a) und hsa-miR-26b (b), bestimmt durch die miRNA Expression in 61 Gewebebiopsien von zwei Individuen. Oben sind jeweils die Expression in den 61 Gewebeproben gezeigt und unten die Reduzierung dieser Gewebeproben auf 31 Gewebekategorien. In grün ist neurale Gewebe gekennzeichnet (aus TissueAtlas: <https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas>, [162]).

a

mmu-miR-26a-5p



b

mmu-miR-26b-5p

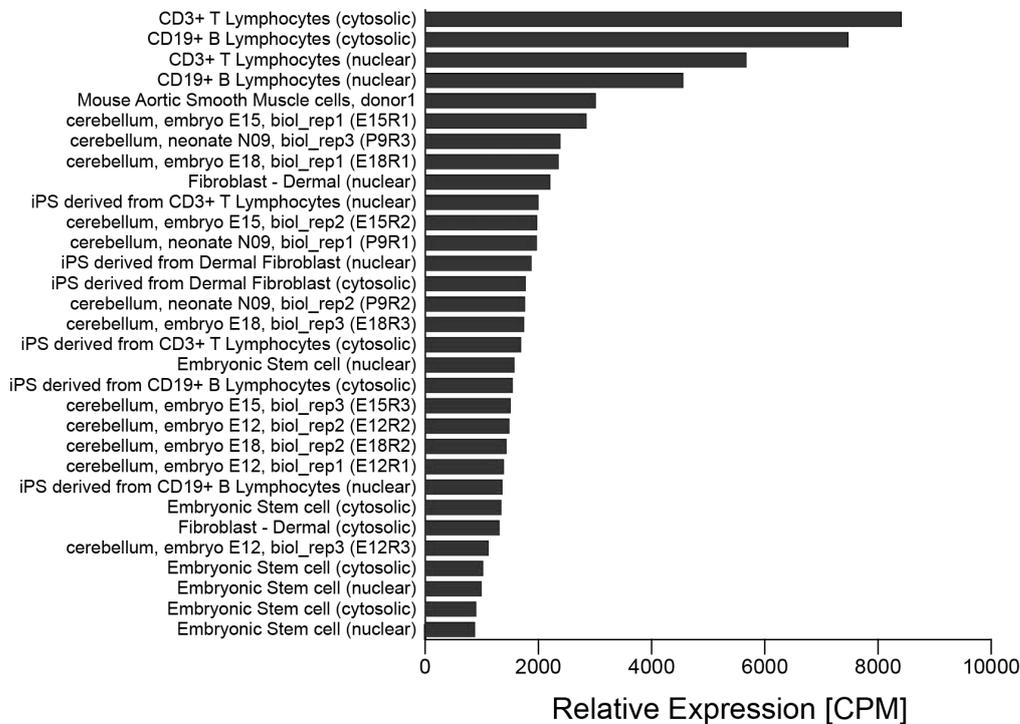


Abbildung 32: Expression endogenen miR-26a und -26b in verschiedenen murinen Geweben. Gewebe- und Zelltyp-spezifische relative Expression (CPM = Counts per million = Anzahl pro Million) der mmu-miR-26a (a) und mmu-miR-26b (b). (aus Fantom5 Mouse microRNA Expression Atlas: <http://fantom.gsc.riken.jp>, [163])

Potentielle Zielstellen in der 3'UTR von *Ctdsp1,2,l* für die miR-26 und die miR-124, TargetScan, Version 5.2

Ctdsp1 (ENST00000273062.2)

miR-124 (4 konservierte Zielstellen)

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match
Position 180-186 of <i>Ctdsp1</i> 3' UTR mmu-miR-124	5' ... UGGGCCCCUGUGCAGUGCCUUC ... 3' CCGUAAGUGGCGCACGGAAU 	7mer-m8
Position 397-403 of <i>Ctdsp1</i> 3' UTR mmu-miR-124	5' ... ACAGUGGACACCCAAGUGCCUUU ... 3' CCGUAAGUGGCG-CACGGAAU 	7mer-m8
Position 1026-1032 of <i>Ctdsp1</i> 3' UTR mmu-miR-124	5' ... AACCCAGAUUGAC--GUGCCUUC ... 3' CCGUAAGUGGCGCACGGAAU 	7mer-m8
Position 1347-1353 of <i>Ctdsp1</i> 3' UTR mmu-miR-124	5' ... GACCUUCCCAUUAAGUGCCUUC ... 3' CCGUAAGUGGCGCACGGAAU 	7mer-m8

miR-124 (1 schlecht konservierte Zielstelle)

Position 340-346 of <i>Ctdsp1</i> 3' UTR mmu-miR-124	5' ... GGUUUUGUCGCCCGUGCCUUG ... 3' CCGUAAGUGGCGCACGGAAU 	7mer-m8
---	---	---------

Ctdspl (ENST00000443503.2)

miR-124 (2 konservierte Zielstellen)

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match
Position 423-429 of <i>Ctdspl</i> 3' UTR mmu-miR-124	5' ... UUCCUACAGGAUGAAGUGCCUUU ... 3' CCGUAAGUGGCGCACGGAAU 	7mer-m8
Position 1932-1938 of <i>Ctdspl</i> 3' UTR mmu-miR-124	5' ... AAACCAGUCAUAGCUGCCUUA ... 3' CCGUAAGUGGCGCACGGAAU 	7mer-1A

miR-124 (1 schlecht konservierte Zielstelle)

Position 1564-1570 of <i>Ctdspl</i> 3' UTR mmu-miR-124	5' ... UUGUGUUGGCACCA-UGCCUUAAG ... 3' CCGUAAGUGGCGCACGGAAU 	7mer-1A
---	--	---------

Ctdsp2 (ENST00000398073.2)

miR-26 (1 konservierte Zielstelle)

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match
Position 3395-3401 of <i>Ctdsp2</i> 3' UTR mmu-miR-26b	5' ... UUGUUGUAUCAAACUUGAAC ... 3' UGGAUAGGACUUAUGAACUU 	7mer-1A
Position 3395-3401 of <i>Ctdsp2</i> 3' UTR mmu-miR-26a	5' ... UUGUUGUAUCAAACUUGAAC ... 3' UCGAUAGGACUUAUGAACUU 	7mer-1A

miR-26 (1 schlecht konservierte Zielstelle)

Position 1080-1086 of <i>Ctdsp2</i> 3' UTR mmu-miR-26a	5' ... CCAAGUGUUGCUCUACUUGAU ... 3' UCGAUAGGACUUAUGAACUU 	7mer-m8
Position 1080-1086 of <i>Ctdsp2</i> 3' UTR mmu-miR-26b	5' ... CCAAGUGUUGCUCUACUUGAU ... 3' UGGAUAGGACUUAUGAACUU 	7mer-m8

miR-124 (2 konservierte Zielstellen)

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match
Position 50-56 of <i>Ctdsp2</i> 3' UTR mmu-miR-124	5' ... GGACUCUCUACACUGGCCUUU ... 3' CCGUAAGUGGCGCACGGAAU 	7mer-m8
Position 1268-1274 of <i>Ctdsp2</i> 3' UTR mmu-miR-124	5' ... GGGCCUCCACUACUGCCUUA ... 3' CCGUAAGUGGCGC-ACGGAAU 	7mer-1A

Abbildung 33: Potentielle Zielstellen in der 3'UTR von *Ctdsp1,2,l* für die miR-26 und miR-124 Familie.

Dargestellt ist eine Analyse der Zielstellen in der mRNA von *Ctdsp1,2,l* für die miR-26 und miR124 Familie und ihre Konservierung (TargetScan, Version 5.2). In den Tabellen ist die Position der Bindestelle in der 3'UTR von *Ctdsp1,2,l*, die komplementäre Sequenz der miRNA und der *Ctdsp* mRNA und der Typ der Bindungsstelle gezeigt.

Tabelle 3: GO-Term Analyse von hoch- und runterregulierten Genen in d15 tKO^{26b/a1/a2} Zellen.

Liste von *GO-Terms* (biologische Prozesse) von hochregulierten (oben) und herunterregulierten (unten) Genen in d15 tKO^{26b/a1/a2} Zellen im Vergleich zu d15 Wt Zellen. Von links nach rechts: *GO-Term* Bezeichnung, die Anzahl aller Gene, die Anzahl an Genen die im tKO^{26b/a1/a2} differentiell exprimiert sind und in diesen *GO-Term* geclustert und die Signifikanz als p-Wert.

Analysis Type:	PANTHER Overrepresentation Test		
Annotation Version and Release Date:	GO Ontology database Released 2019-01-01		
Analyzed List:	tKO ^{26b/a1/a2} differentially expressed genes (Mus musculus)		
Reference List:	Mus musculus (all genes in database)		
Test Type:	FISHER		
Correction:	NONE		
	mmu - REFLIST	tKO up	tKO up
GO biological process complete	(22296)	(550)	(raw P-value)
sensory perception of smell (GO:0007608)	1121	4	3,86E-08
regulation of peptidase activity (GO:0052547)	403	29	0,000000788
regulation of endopeptidase activity (GO:0052548)	329	24	0,00000566
sensory perception of chemical stimulus (GO:0007606)	1219	9	0,0000127
regulation of hydrolase activity (GO:0051336)	971	48	0,0000131
biological adhesion (GO:0022610)	794	41	0,0000161
digestion (GO:0007586)	83	11	0,0000162
adaptive thermogenesis (GO:1990845)	19	6	0,0000227
cell cycle (GO:0007049)	1169	9	0,0000229
cell-cell junction organization (GO:0045216)	122	13	0,0000238
ion transport (GO:0006811)	1143	53	0,0000242
cellular response to DNA damage stimulus (GO:0006974)	654	2	0,000025
nucleic acid metabolic process (GO:0090304)	1771	19	0,0000263
cardiac muscle tissue development (GO:0048738)	193	16	0,0000502
cell-cell adhesion (GO:0098609)	381	24	0,0000533
regulation of coagulation (GO:0050818)	80	10	0,0000614
regulation of wound healing (GO:0061041)	135	13	0,0000626
cell adhesion (GO:0007155)	784	39	0,0000634
diet induced thermogenesis (GO:0002024)	14	5	0,0000698
digestive system process (GO:0022600)	66	9	0,0000779
regulation of defense response (GO:0031347)	590	32	0,0000823
metal ion transport (GO:0030001)	554	30	0,000101
positive regulation of response to stimulus (GO:0048584)	2257	85	0,000114
cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	2886	42	0,00013
reproductive system development (GO:0061458)	430	25	0,000139

	mmu - REFLIST	tKO down	tKO down
GO biological process complete	(22296)	(550)	(raw P-value)
animal organ development (GO:0048513)	2991	80	1,06E-12
cell fate commitment (GO:0045165)	254	22	1,53E-12
system development (GO:0048731)	4142	97	4,35E-12
regulation of multicellular organismal process (GO:0051239)	3116	79	2,26E-11
regionalization (GO:0003002)	344	23	6,38E-11
central nervous system development (GO:0007417)	807	35	6,53E-11
multicellular organism development (GO:0007275)	4705	102	8,26E-11
pattern specification process (GO:0007389)	442	25	2,59E-10
skeletal system development (GO:0001501)	478	25	1,2E-09
anatomical structure development (GO:0048856)	5070	104	1,2E-09
developmental process (GO:0032502)	5351	107	2,51E-09
neuron fate commitment (GO:0048663)	80	11	8,77E-09
positive regulation of developmental process (GO:0051094)	1502	45	1,02E-08
neuron differentiation (GO:0030182)	1005	35	1,63E-08
positive regulation of multicellular organismal process (GO:0051240)	1866	51	1,89E-08
forebrain development (GO:0030900)	371	20	3,65E-08
regulation of developmental process (GO:0050793)	2611	62	7,28E-08
tissue development (GO:0009888)	1620	45	0,000000126
macromolecule metabolic process (GO:0043170)	5038	26	0,000000141
oligodendrocyte differentiation (GO:0048709)	63	9	0,000000151
cellular macromolecule metabolic process (GO:0044260)	3956	17	0,000000193
central nervous system neuron differentiation (GO:0021953)	198	14	0,000000204
animal organ morphogenesis (GO:0009887)	973	32	0,000000248
anatomical structure morphogenesis (GO:0009653)	2144	53	0,000000269
cellular protein metabolic process (GO:0044267)	2853	9	0,000000306

Tabelle 4: GO-Term Analyse von hoch- und runterregulierten Genen in d15 dKO^{26a1/a2} Zellen.

Liste von *GO-Terms* (biologische Prozesse) von hochregulierten (oben) und herunterregulierten (unten) Genen in d15 dKO^{26a1/a2} Zellen im Vergleich zu d15 Wt Zellen. Von links nach rechts: *GO-Term* Bezeichnung, die Anzahl aller Gene, die Anzahl an Genen die im dKO^{26a1/a2} differentiell exprimiert sind und in diesen *GO-Term* geclustert und die Signifikanz als p-Wert.

Analysis Type:	PANTHER Overrepresentation Test		
Annotation Version and Release Date:	GO Ontology database Released 2019-01-01		
Analyzed List:	dKO ^{26a1/a2} differentially expressed genes (Mus musculus)		
Reference List:	Mus musculus (all genes in database)		
Test Type:	FISHER		
Correction:	NONE		
	mmu - REFLIST	dKO up	dKO up
	(22296)	(550)	(raw P-value)
GO biological process complete			
sensory perception of smell (GO:0007608)	1121	3	1,96E-15
regulation of peptidase activity (GO:0052547)	403	54	1,08E-13
inflammatory response (GO:0006954)	430	54	1,10E-12
regulation of defense response (GO:0031347)	590	65	1,17E-12
regulation of endopeptidase activity (GO:0052548)	329	45	6,80E-12
response to chemical (GO:0042221)	3377	211	9,25E-12
regulation of response to external stimulus (GO:0032101)	731	72	9,84E-12
sensory perception of chemical stimulus (GO:0007606)	1219	9	1,44E-11
regulation of proteolysis (GO:0030162)	689	69	1,71E-11
negative regulation of peptidase activity (GO:0010466)	241	37	2,75E-11
regulation of response to stress (GO:0080134)	1268	102	3,73E-11
regulation of cytokine production (GO:0001817)	645	65	4,13E-11
negative regulation of hydrolase activity (GO:0051346)	396	48	6,17E-11
response to cytokine (GO:0034097)	727	68	2,91E-10
response to other organism (GO:0051707)	1022	85	4,09E-10
response to external biotic stimulus (GO:0043207)	1024	85	4,37E-10
negative regulation of endopeptidase activity (GO:0010951)	176	29	9,11E-10
cellular response to chemical stimulus (GO:0070887)	2244	148	9,82E-10
cell adhesion (GO:0007155)	801	71	1,04E-09
regulation of multicellular organismal process (GO:0051239)	3116	190	1,05E-09
defense response (GO:0006952)	1299	99	1,14E-09
negative regulation of catalytic activity (GO:0043086)	672	63	1,33E-09
response to organic substance (GO:0010033)	2415	156	1,60E-09
negative regulation of proteolysis (GO:0045861)	339	41	1,65E-09
response to biotic stimulus (GO:0009607)	1047	85	1,70E-09

	mmu - REFLIST	dKO down	dKO down
	(22296)	(550)	(raw P-value)
GO biological process complete			
nervous system development (GO:0007399)	2190	444	1,12E-81
neurogenesis (GO:0022008)	1706	365	8,85E-71
generation of neurons (GO:0048699)	1605	352	2,17E-70
system development (GO:0048731)	4142	581	3,83E-56
neuron differentiation (GO:0030182)	1005	247	7,46E-56
regulation of nervous system development (GO:0051960)	1034	250	2,00E-55
multicellular organism development (GO:0007275)	4705	626	5,11E-54
modulation of chemical synaptic transmission (GO:0050804)	507	166	1,13E-50
regulation of trans-synaptic signaling (GO:0099177)	508	166	1,40E-50
anatomical structure development (GO:0048856)	5070	645	1,01E-49
developmental process (GO:0032502)	5351	663	8,65E-48
trans-synaptic signaling (GO:0099537)	359	136	2,71E-47
synaptic signaling (GO:0099536)	374	138	6,40E-47
chemical synaptic transmission (GO:0007268)	341	127	1,51E-43
anterograde trans-synaptic signaling (GO:0098916)	341	127	1,51E-43
neuron development (GO:0048666)	814	197	2,25E-43
behavior (GO:0007610)	661	175	8,09E-43
regulation of multicellular organismal process (GO:0051239)	3116	446	1,15E-42
regulation of neurogenesis (GO:0050767)	921	208	6,23E-42
cellular developmental process (GO:0048869)	3704	495	1,11E-40
cell-cell signaling (GO:0007267)	762	184	2,37E-40
cell differentiation (GO:0030154)	3616	485	5,03E-40
regulation of biological quality (GO:0065008)	3841	504	1,38E-39
regulation of neuron differentiation (GO:0045664)	754	181	2,15E-39
neuron projection development (GO:0031175)	667	169	2,85E-39

Tabelle 5: GO-Term Analyse von hoch- und runterregulierten Genen in d15 KO^{26b} Zellen.

Liste von *GO-Terms* (biologische Prozesse) von hochregulierten (oben) und herunterregulierten (unten) Genen in d15 KO^{26b}Zellen im Vergleich zu d15 Wt Zellen. Von links nach rechts: *GO-Term* Bezeichnung, die Anzahl aller Gene, die Anzahl an Genen die im KO^{26b} differentiell exprimiert sind und in diesen *GO-Term* geclustert und die Signifikanz als p-Wert.

Analysis Type:	PANTHER Overrepresentation Test		
Annotation Version and Release Date:	GO Ontology database Released 2019-01-01		
Analyzed List:	KO^{26b} differentially expressed genes (Mus musculus)		
Reference List:	Mus musculus (all genes in database)		
Test Type:	FISHER		
Correction:	NONE		
	mmu - REFLIST	26bKO up	26bKO up
GO biological process complete	(22296)	(550)	(raw P-value)
negative regulation of hydrolase activity (GO:0051346)	396	21	1,89E-07
negative regulation of peptidase activity (GO:0010466)	241	16	3,48E-07
regulation of peptidase activity (GO:0052547)	403	19	3,80E-06
muscle system process (GO:0003012)	233	14	5,65E-06
negative regulation of molecular function (GO:0044092)	991	32	6,79E-06
negative regulation of endopeptidase activity (GO:0010951)	176	12	8,02E-06
negative regulation of catalytic activity (GO:0043086)	672	24	1,95E-05
negative regulation of proteolysis (GO:0045861)	339	16	2,20E-05
cell cycle (GO:0007049)	1169	2	3,21E-05
regulation of heart contraction (GO:0008016)	176	11	4,07E-05
muscle contraction (GO:0006936)	179	11	4,71E-05
regulation of multicellular organismal process (GO:0051239)	3116	68	4,94E-05
regulation of system process (GO:0044057)	580	21	5,40E-05
regulation of endopeptidase activity (GO:0052548)	329	15	5,78E-05
regulation of heart rate (GO:0002027)	93	8	5,83E-05
sensory perception of smell (GO:0007608)	1121	2	6,93E-05
muscle tissue development (GO:0060537)	338	15	7,72E-05
regulation of proteolysis (GO:0030162)	689	23	7,88E-05
striated muscle contraction (GO:0006941)	99	8	8,78E-05
inflammatory response (GO:0006954)	430	17	1,02E-04
positive regulation of calcium ion transport (GO:0051928)	133	9	1,16E-04
regulation of blood circulation (GO:1903522)	237	12	1,26E-04
striated muscle tissue development (GO:0014706)	322	14	1,64E-04
regulation of hydrolase activity (GO:0051336)	971	28	1,72E-04
coagulation (GO:0050817)	111	8	1,84E-04

	mmu - REFLIST	26bKO down	26bKO down
GO biological process complete	(22296)	(550)	(raw P-value)
xenobiotic glucuronidation (GO:0052697)	9	5	1,04E-07
flavonoid glucuronidation (GO:0052696)	9	5	1,04E-07
flavonoid metabolic process (GO:0009812)	11	5	2,24E-07
cellular glucuronidation (GO:0052695)	12	5	3,15E-07
uronic acid metabolic process (GO:0006063)	13	5	4,33E-07
glucuronate metabolic process (GO:0019585)	13	5	4,33E-07
multicellular organismal homeostasis (GO:0048871)	301	12	2,80E-05
cell fate commitment (GO:0045165)	254	11	2,95E-05
pattern specification process (GO:0007389)	442	14	6,92E-05
sensory perception of light stimulus (GO:0050953)	146	8	7,83E-05
forebrain generation of neurons (GO:0021872)	76	6	9,66E-05
regulation of lipid transport (GO:0032368)	113	7	1,07E-04
localization of cell (GO:0051674)	933	21	1,45E-04
cell motility (GO:0048870)	933	21	1,45E-04
cell migration (GO:0016477)	818	19	2,06E-04
cerebral cortex GABAergic interneuron differentiation (GO:0021892)	11	3	2,41E-04
cellular calcium ion homeostasis (GO:0006874)	441	13	2,49E-04
sensory perception of chemical stimulus (GO:0007606)	1219	1	2,58E-04
locomotion (GO:0040011)	1123	23	2,91E-04
homeostatic process (GO:0042592)	1592	29	3,27E-04
forebrain neuron differentiation (GO:0021879)	62	5	3,41E-04
calcium ion homeostasis (GO:0055074)	459	13	3,60E-04
cellular divalent inorganic cation homeostasis (GO:0072503)	462	13	3,83E-04
visual perception (GO:0007601)	142	7	4,06E-04
xenobiotic metabolic process (GO:0006805)	101	6	4,14E-04

Tabelle 6: GO-Term Analyse von hoch- und runterregulierten Genen in allen d15 miR-26-KO Zelllinien.

Liste von *GO-Terms* (biologische Prozesse) von hochregulierten (oben) und herunterregulierten (unten) Genen in allen d15 miR-26-KO Zelllinien im Vergleich zu d15 Wt Zellen. Von links nach rechts: *GO-Term* Bezeichnung, die Anzahl aller Gene, die Anzahl an Genen die gemeinsam in allen d15 miR-26-KO Zelllinien differenziell exprimiert sind und in diesen *GO-Term* geclustert und die Signifikanz als p-Wert.

Analysis Type:	PANTHER Overrepresentation Test		
Annotation Version and Release Date:	GO Ontology database Released 2019-01-01		
Analyzed List:	Alle miR-26 KOs differentially expressed genes		
Reference List:	(Mus musculus)		
Test Type:	Mus musculus (all genes in database)		
Correction:	FISHER		
	NONE		
	mmu - REFLIST	Alle miR-26-	Alle miR-26-
	(22296)	KOs up (550)	KOs up (550)
GO biological process complete			
negative regulation of peptidase activity (GO:0010466)	241	13	1,36E-07
negative regulation of hydrolase activity (GO:0051346)	396	15	1,13E-06
regulation of peptidase activity (GO:0052547)	403	15	1,39E-06
negative regulation of endopeptidase activity (GO:0010951)	176	10	2,55E-06
negative regulation of proteolysis (GO:0045861)	339	13	5,27E-06
ion transport (GO:0006811)	1143	25	6,47E-06
metal ion transport (GO:0030001)	554	16	1,40E-05
regulation of proteolysis (GO:0030162)	689	18	1,50E-05
regulation of endopeptidase activity (GO:0052548)	329	12	1,98E-05
inflammatory response (GO:0006954)	430	13	5,87E-05
negative regulation of molecular function (GO:0044092)	991	21	5,90E-05
regulation of multicellular organismal process (GO:0051239)	3116	45	8,15E-05
cation transport (GO:0006812)	724	17	9,44E-05
response to interferon-beta (GO:0035456)	54	5	1,07E-04
transmembrane transport (GO:0055085)	890	19	1,23E-04
negative regulation of catalytic activity (GO:0043086)	672	16	1,31E-04
acute inflammatory response (GO:0002526)	65	5	2,41E-04
response to other organism (GO:0051707)	1022	20	2,52E-04
one-carbon compound transport (GO:0019755)	13	3	2,58E-04
response to external biotic stimulus (GO:0043207)	1024	20	2,58E-04
regulation of catalytic activity (GO:0050790)	1790	29	2,87E-04
response to external stimulus (GO:0009605)	1969	31	3,01E-04
response to bacterium (GO:0009617)	801	17	3,03E-04
diet induced thermogenesis (GO:0002024)	14	3	3,11E-04
coagulation (GO:0050817)	111	6	3,53E-04

	mmu -	Alle miR-26-	Alle miR-26-
	REFLIST	KOs down (550)	KOs down
	(22296)		(550)
GO biological process complete			
oligodendrocyte differentiation (GO:0048709)	63	3	6,11E-05
lipid digestion (GO:0044241)	9	2	7,13E-05
cerebral cortex GABAergic interneuron differentiation (GO:0021892)	11	2	1,01E-04
neuron fate commitment (GO:0048663)	80	3	1,21E-04
digestion (GO:0007586)	83	3	1,35E-04
GABAergic neuron differentiation (GO:0097154)	14	2	1,55E-04
cell fate commitment (GO:0045165)	254	4	2,13E-04
central nervous system development (GO:0007417)	807	6	2,82E-04
cerebral cortex neuron differentiation (GO:0021895)	24	2	4,17E-04
icosanoid biosynthetic process (GO:0046456)	32	2	7,15E-04
forebrain development (GO:0030900)	371	4	8,75E-04
glial cell differentiation (GO:0010001)	169	3	1,03E-03
regulation of oligodendrocyte differentiation (GO:0048713)	42	2	1,20E-03
fatty acid derivative biosynthetic process (GO:1901570)	44	2	1,31E-03
central nervous system neuron differentiation (GO:0021953)	198	3	1,61E-03
monocarboxylic acid metabolic process (GO:0032787)	455	4	1,84E-03
gliogenesis (GO:0042063)	213	3	1,97E-03
negative regulation of cellular glucuronidation (GO:2001030)	1	1	2,33E-03
flavone metabolic process (GO:0051552)	1	1	2,33E-03
forebrain neuron differentiation (GO:0021879)	62	2	2,52E-03
digestive system process (GO:0022600)	66	2	2,83E-03
diencephalon development (GO:0021536)	69	2	3,09E-03
negative regulation of intestinal cholesterol absorption (GO:0045796)	2	1	3,49E-03
globus pallidus development (GO:0021759)	2	1	3,49E-03
regulation of cellular glucuronidation (GO:2001029)	2	1	3,49E-03

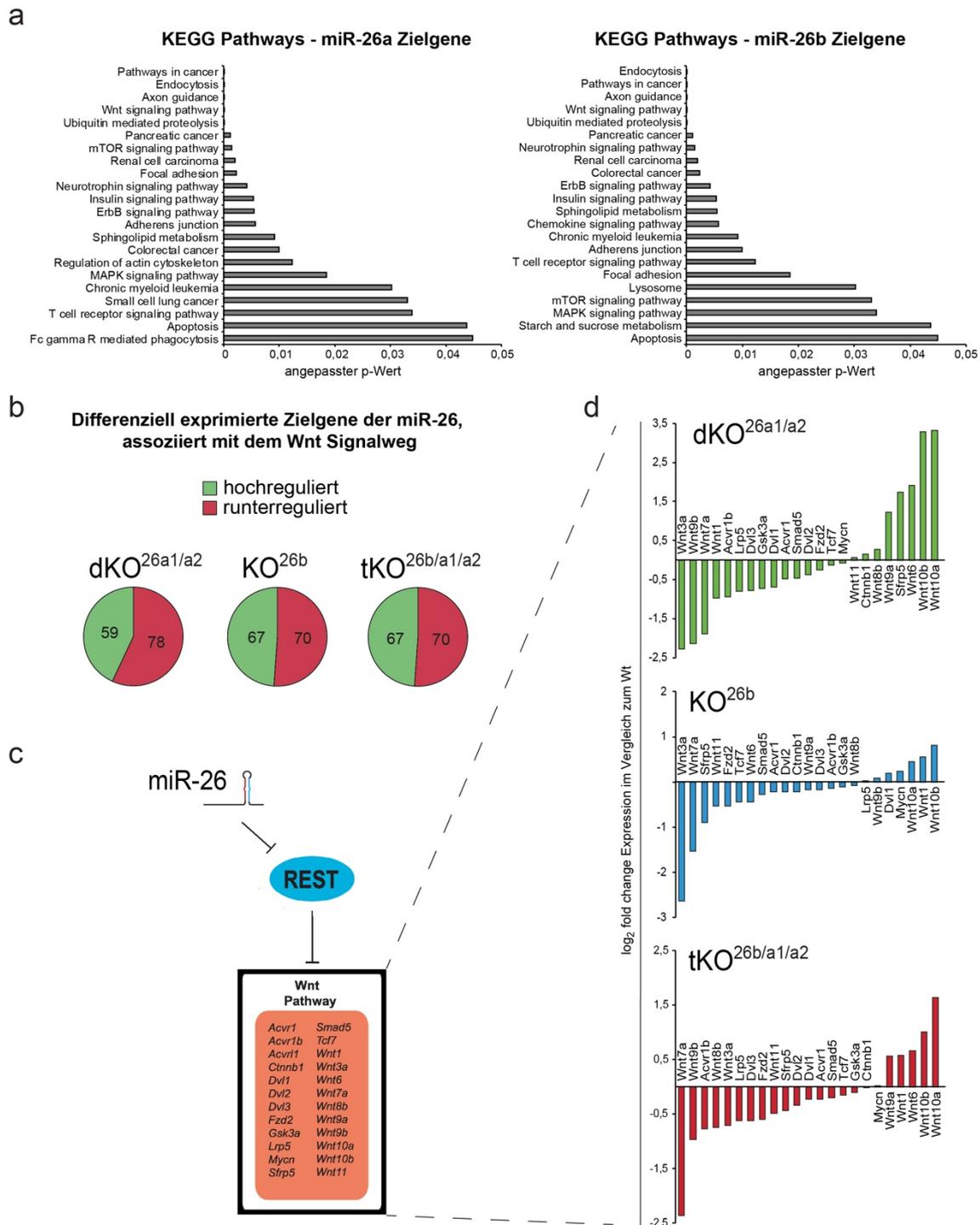


Abbildung 34: KEGG Pathway Analyse der miR-26a und miR-26b Zielgene und differenziell exprimierte Gene der REST-regulierten Wnt-assozierten Gene.

(a) Klassifizierung der miR-26a und miR-26b Zielgene in Signalwege (KEGG) unter einem angepassten p-Wert von 0,05. Für die Identifikation der Zielgene wurden 6 Targetsite Tools verwendet (miRWalk, miRDB, miRanda, RNAhybrid, PICTAR2, TargetScan). (b) Hoch- bzw. herunterregulierte Zielgene assoziiert mit dem Wnt-Signalweg (aus der KEGG Pathway Analyse) in den miR-26-KO NCs im Vergleich mit dem Wt NCs. (c) schematische Darstellung der Regulation von Genen des Wnt-Signalwegs durch REST und der miR-26 Familie (modifiziert nach Johnson et al. [228]). (d) Hoch- bzw. herunterregulierte Gene des Wnt-Signalwegs in dKO^{26a1/a2}, KO^{26b} und tKO^{26b/a1/a2} NC Kulturen verglichen mit Wt NC Kulturen (RNA-Seq Analysen).

6 Literaturverzeichnis

- [1] J.A. Alberts B., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Molekularbiologie der Zelle*, WILEY-VCH 2011.
- [2] J.T. Paridaen, W.B. Huttner, Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system, *EMBO Rep*, 15 (2014) 351-364.
- [3] M. Gotz, W.B. Huttner, The cell biology of neurogenesis, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (2005) 777-788.
- [4] E. Taverna, M. Gotz, W.B. Huttner, The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30 (2014) 465-502.
- [5] B. Martynoga, D. Drechsel, F. Guillemot, Molecular control of neurogenesis: a view from the mammalian cerebral cortex, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4 (2012).
- [6] Q. Wang, L. Yang, C. Alexander, S. Temple, The niche factor syndecan-1 regulates the maintenance and proliferation of neural progenitor cells during mammalian cortical development, *PLoS One*, 7 (2012) e42883.
- [7] K. Loulier, J.D. Lathia, V. Marthiens, J. Relucio, M.R. Mughal, S.C. Tang, T. Coksaygan, P.E. Hall, S. Chigurupati, B. Patton, H. Colognato, M.S. Rao, M.P. Mattson, T.F. Haydar, C. Ffrench-Constant, beta1 integrin maintains integrity of the embryonic neocortical stem cell niche, *PLoS Biol*, 7 (2009) e1000176.
- [8] M.K. Lehtinen, C.A. Walsh, Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27 (2011) 653-679.
- [9] J.A. Siegenthaler, A.M. Ashique, K. Zarbalis, K.P. Patterson, J.H. Hecht, M.A. Kane, A.E. Foliass, Y. Choe, S.R. May, T. Kume, J.L. Napoli, A.S. Peterson, S.J. Pleasure, Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation, *Cell*, 139 (2009) 597-609.
- [10] A. Janesick, S.C. Wu, B. Blumberg, Retinoic acid signaling and neuronal differentiation, *Cell Mol Life Sci*, 72 (2015) 1559-1576.
- [11] A. Javaherian, A. Kriegstein, A stem cell niche for intermediate progenitor cells of the embryonic cortex, *Cereb Cortex*, 19 Suppl 1 (2009) i70-77.
- [12] A. Teissier, R.R. Waclaw, A. Griveau, K. Campbell, A. Pierani, Tangentially migrating transient glutamatergic neurons control neurogenesis and maintenance of cerebral cortical progenitor pools, *Cereb Cortex*, 22 (2012) 403-416.
- [13] J.M. Antony, A. Paquin, S.L. Nutt, D.R. Kaplan, F.D. Miller, Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells, *J Neurosci Res*, 89 (2011) 286-298.
- [14] C.L. Cunningham, V. Martinez-Cerdeno, S.C. Noctor, Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex, *J Neurosci*, 33 (2013) 4216-4233.
- [15] J.D. Pereira, S.N. Sansom, J. Smith, M.W. Dobenecker, A. Tarakhovsky, F.J. Livesey, Ezh2, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (2010) 15957-15962.
- [16] Y. Kishi, Y. Fujii, Y. Hirabayashi, Y. Gotoh, HMGA regulates the global chromatin state and neurogenic potential in neocortical precursor cells, *Nat Neurosci*, 15 (2012) 1127-1133.
- [17] Y. Hirabayashi, N. Suzki, M. Tsuboi, T.A. Endo, T. Toyoda, J. Shinga, H. Koseki, M. Vidal, Y. Gotoh, Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition, *Neuron*, 63 (2009) 600-613.

- [18] G. Fan, K. Martinowich, M.H. Chin, F. He, S.D. Fouse, L. Hutnick, D. Hattori, W. Ge, Y. Shen, H. Wu, J. ten Hoeve, K. Shuai, Y.E. Sun, DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling, *Development*, 132 (2005) 3345-3356.
- [19] J.A. Calarco, M. Zhen, B.J. Blencowe, Networking in a global world: establishing functional connections between neural splicing regulators and their target transcripts, *RNA*, 17 (2011) 775-791.
- [20] D.D. Licatalosi, M. Yano, J.J. Fak, A. Mele, S.E. Grabinski, C. Zhang, R.B. Darnell, Ptbp2 represses adult-specific splicing to regulate the generation of neuronal precursors in the embryonic brain, *Genes Dev*, 26 (2012) 1626-1642.
- [21] K.K. Kim, J. Nam, Y.S. Mukoyama, S. Kawamoto, Rbfox3-regulated alternative splicing of Numb promotes neuronal differentiation during development, *J Cell Biol*, 200 (2013) 443-458.
- [22] A. Fatica, I. Bozzoni, Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development, *Nat Rev Genet*, 15 (2014) 7-21.
- [23] S.Y. Ng, G.K. Bogu, B.S. Soh, L.W. Stanton, The long noncoding RNA RMST interacts with SOX2 to regulate neurogenesis, *Mol Cell*, 51 (2013) 349-359.
- [24] J. Aprea, S. Prenninger, M. Dori, T. Ghosh, L.S. Monasor, E. Wessendorf, S. Zocher, S. Massalini, D. Alexopoulou, M. Lesche, A. Dahl, M. Groszer, M. Hiller, F. Calegari, Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment, *EMBO J*, 32 (2013) 3145-3160.
- [25] T. Pierfelice, L. Alberi, N. Gaiano, Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks, *Neuron*, 69 (2011) 840-855.
- [26] H. Shimojo, T. Ohtsuka, R. Kageyama, Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors, *Neuron*, 58 (2008) 52-64.
- [27] Z. Dong, N. Yang, S.Y. Yeo, A. Chitnis, S. Guo, Intralinear directional Notch signaling regulates self-renewal and differentiation of asymmetrically dividing radial glia, *Neuron*, 74 (2012) 65-78.
- [28] W. Ochiai, S. Nakatani, T. Takahara, M. Kainuma, M. Masaoka, S. Minobe, M. Namihira, K. Nakashima, A. Sakakibara, M. Ogawa, T. Miyata, Periventricular notch activation and asymmetric Ngn2 and Tbr2 expression in pair-generated neocortical daughter cells, *Mol Cell Neurosci*, 40 (2009) 225-233.
- [29] S.J. Harrison-Uy, S.J. Pleasure, Wnt signaling and forebrain development, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4 (2012) a008094.
- [30] A. Chenn, C.A. Walsh, Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors, *Science*, 297 (2002) 365-369.
- [31] C.J. Zhou, U. Borello, J.L. Rubenstein, S.J. Pleasure, Neuronal production and precursor proliferation defects in the neocortex of mice with loss of function in the canonical Wnt signaling pathway, *Neuroscience*, 142 (2006) 1119-1131.
- [32] G.J. Woodhead, C.A. Mutch, E.C. Olson, A. Chenn, Cell-autonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation, *J Neurosci*, 26 (2006) 12620-12630.
- [33] R.N. Munji, Y. Choe, G. Li, J.A. Siegenthaler, S.J. Pleasure, Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors, *J Neurosci*, 31 (2011) 1676-1687.
- [34] C.N. Wrobel, C.A. Mutch, S. Swaminathan, M.M. Taketo, A. Chenn, Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors, *Dev Biol*, 309 (2007) 285-297.

- [35] J. Poschl, D. Grammel, M.M. Dorostkar, H.A. Kretzschmar, U. Schuller, Constitutive activation of beta-catenin in neural progenitors results in disrupted proliferation and migration of neurons within the central nervous system, *Dev Biol*, 374 (2013) 319-332.
- [36] S. Zhang, J. Li, R. Lea, K. Vleminckx, E. Amaya, *Fezf2* promotes neuronal differentiation through localised activation of Wnt/beta-catenin signalling during forebrain development, *Development*, 141 (2014) 4794-4805.
- [37] S.X. Wu, S. Goebbels, K. Nakamura, K. Nakamura, K. Kometani, N. Minato, T. Kaneko, K.A. Nave, N. Tamamaki, Pyramidal neurons of upper cortical layers generated by NEX-positive progenitor cells in the subventricular zone, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (2005) 17172-17177.
- [38] Y. Hirabayashi, Y. Itoh, H. Tabata, K. Nakajima, T. Akiyama, N. Masuyama, Y. Gotoh, The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells, *Development*, 131 (2004) 2791-2801.
- [39] A. Kuwahara, Y. Hirabayashi, P.S. Knoepfler, M.M. Taketo, J. Sakai, T. Kodama, Y. Gotoh, Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex, *Development*, 137 (2010) 1035-1044.
- [40] J. Yang, X. Liu, X. Zhang, X. Zhao, Y. Pan, M. Qiu, S. Wu, G. Zhao, Y.Z. Wang, Predominant neuronal differentiation of Olig1⁺ neural progenitors in forebrain cortex biased by beta-catenin over-expression, *Neurosci Lett*, 622 (2016) 19-23.
- [41] Y. Shikata, T. Okada, M. Hashimoto, T. Ellis, D. Matsumaru, T. Shiroishi, M. Ogawa, B. Wainwright, J. Motoyama, *Ptch1*-mediated dosage-dependent action of Shh signaling regulates neural progenitor development at late gestational stages, *Dev Biol*, 349 (2011) 147-159.
- [42] H. Wang, G. Ge, Y. Uchida, B. Luu, S. Ahn, *Gli3* is required for maintenance and fate specification of cortical progenitors, *J Neurosci*, 31 (2011) 6440-6448.
- [43] M. Saade, I. Gutierrez-Vallejo, G. Le Dreau, M.A. Rabadan, D.G. Miguez, J. Buceta, E. Marti, Sonic hedgehog signaling switches the mode of division in the developing nervous system, *Cell Rep*, 4 (2013) 492-503.
- [44] R.K. Dave, T. Ellis, M.C. Toumpas, J.P. Robson, E. Julian, C. Adolphe, P.F. Bartlett, H.M. Cooper, B.A. Reynolds, B.J. Wainwright, Sonic hedgehog and notch signaling can cooperate to regulate neurogenic divisions of neocortical progenitors, *PLoS One*, 6 (2011) e14680.
- [45] B.G. Rash, H.D. Lim, J.J. Breunig, F.M. Vaccarino, FGF signaling expands embryonic cortical surface area by regulating Notch-dependent neurogenesis, *J Neurosci*, 31 (2011) 15604-15617.
- [46] D. Maric, A. Fiorio Pla, Y.H. Chang, J.L. Barker, Self-renewing and differentiating properties of cortical neural stem cells are selectively regulated by basic fibroblast growth factor (FGF) signaling via specific FGF receptors, *J Neurosci*, 27 (2007) 1836-1852.
- [47] W. Kang, J.M. Hebert, FGF Signaling Is Necessary for Neurogenesis in Young Mice and Sufficient to Reverse Its Decline in Old Mice, *J Neurosci*, 35 (2015) 10217-10223.
- [48] N. Osumi, H. Shinohara, K. Numayama-Tsuruta, M. Maekawa, Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator, *Stem Cells*, 26 (2008) 1663-1672.
- [49] S.N. Sansom, D.S. Griffiths, A. Faedo, D.J. Kleinjan, Y. Ruan, J. Smith, V. van Heyningen, J.L. Rubenstein, F.J. Livesey, The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis, *PLoS Genet*, 5 (2009) e1000511.

- [50] S. Thakurela, N. Tiwari, S. Schick, A. Garding, R. Ivanek, B. Berninger, V.K. Tiwari, Mapping gene regulatory circuitry of Pax6 during neurogenesis, *Cell Discov*, 2 (2016) 15045.
- [51] N. Ballas, C. Grunseich, D.D. Lu, J.C. Speh, G. Mandel, REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis, *Cell*, 121 (2005) 645-657.
- [52] K. Palm, N. Belluardo, M. Metsis, T. Timmusk, Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene, *J Neurosci*, 18 (1998) 1280-1296.
- [53] M. Lietz, M. Hohl, G. Thiel, RE-1 silencing transcription factor (REST) regulates human synaptophysin gene transcription through an intronic sequence-specific DNA-binding site, *Eur J Biochem*, 270 (2003) 2-9.
- [54] C.J. Schoenherr, D.J. Anderson, Silencing is golden: negative regulation in the control of neuronal gene transcription, *Curr Opin Neurobiol*, 5 (1995) 566-571.
- [55] A.W. Bruce, I.J. Donaldson, I.C. Wood, S.A. Yerbury, M.I. Sadowski, M. Chapman, B. Gottgens, N.J. Buckley, Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (2004) 10458-10463.
- [56] A. Roopra, Y. Huang, R. Dingledine, Neurological disease: listening to gene silencers, *Mol Interv*, 1 (2001) 219-228.
- [57] C.J. Schoenherr, A.J. Paquette, D.J. Anderson, Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (1996) 9881-9886.
- [58] L. Ooi, I.C. Wood, Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST, *Nat Rev Genet*, 8 (2007) 544-554.
- [59] M.E. Andres, C. Burger, M.J. Peral-Rubio, E. Battaglioli, M.E. Anderson, J. Grimes, J. Dallman, N. Ballas, G. Mandel, CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (1999) 9873-9878.
- [60] J.A. Grimes, S.J. Nielsen, E. Battaglioli, E.A. Miska, J.C. Speh, D.L. Berry, F. Atouf, B.C. Holdener, G. Mandel, T. Kouzarides, The co-repressor mSin3A is a functional component of the REST-CoREST repressor complex, *J Biol Chem*, 275 (2000) 9461-9467.
- [61] Y. Huang, S.J. Myers, R. Dingledine, Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes, *Nat Neurosci*, 2 (1999) 867-872.
- [62] Y. Zhang, Z.W. Sun, R. Iratni, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. Hampsey, D. Reinberg, SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex, *Mol Cell*, 1 (1998) 1021-1031.
- [63] V.V. Lunyak, R. Burgess, G.G. Prefontaine, C. Nelson, S.H. Sze, J. Chenoweth, P. Schwartz, P.A. Pevzner, C. Glass, G. Mandel, M.G. Rosenfeld, Corepressor-dependent silencing of chromosomal regions encoding neuronal genes, *Science*, 298 (2002) 1747-1752.
- [64] E. Battaglioli, M.E. Andres, D.W. Rose, J.G. Chenoweth, M.G. Rosenfeld, M.E. Anderson, G. Mandel, REST repression of neuronal genes requires components of the hSWI.SNF complex, *J Biol Chem*, 277 (2002) 41038-41045.
- [65] M.G. Lee, C. Wynder, N. Cooch, R. Shiekhatar, An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation, *Nature*, 437 (2005) 432-435.
- [66] A. Roopra, R. Qazi, B. Schoenike, T.J. Daley, J.F. Morrison, Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes, *Mol Cell*, 14 (2004) 727-738.

- [67] C.S. Kim, H.S. Choi, C.K. Hwang, K.Y. Song, B.K. Lee, P.Y. Law, L.N. Wei, H.H. Loh, Evidence of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF) interaction with Sp3 and its synergic repression to the mu opioid receptor (MOR) gene, *Nucleic Acids Res*, 34 (2006) 6392-6403.
- [68] N. Ding, C. Tomomori-Sato, S. Sato, R.C. Conaway, J.W. Conaway, T.G. Boyer, MED19 and MED26 are synergistic functional targets of the RE1 silencing transcription factor in epigenetic silencing of neuronal gene expression, *J Biol Chem*, 284 (2009) 2648-2656.
- [69] M. Garriga-Canut, B. Schoenike, R. Qazi, K. Bergendahl, T.J. Daley, R.M. Pfender, J.F. Morrison, J. Ockuly, C. Stafstrom, T. Sutula, A. Roopra, 2-Deoxy-D-glucose reduces epilepsy progression by NRSF-CtBP-dependent metabolic regulation of chromatin structure, *Nat Neurosci*, 9 (2006) 1382-1387.
- [70] S. Egloff, S. Murphy, Cracking the RNA polymerase II CTD code, *Trends Genet*, 24 (2008) 280-288.
- [71] H.P. Phatnani, A.L. Greenleaf, Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD, *Genes Dev*, 20 (2006) 2922-2936.
- [72] M. Yeo, S.K. Lee, B. Lee, E.C. Ruiz, S.L. Pfaff, G.N. Gill, Small CTD phosphatases function in silencing neuronal gene expression, *Science*, 307 (2005) 596-600.
- [73] T. Oelgeschlager, Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control, *J Cell Physiol*, 190 (2002) 160-169.
- [74] J. Visvanathan, S. Lee, B. Lee, J.W. Lee, S.K. Lee, The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development, *Genes Dev*, 21 (2007) 744-749.
- [75] A.N. Packer, Y. Xing, S.Q. Harper, L. Jones, B.L. Davidson, The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease, *J Neurosci*, 28 (2008) 14341-14346.
- [76] S. Rockowitz, W.H. Lien, E. Pedrosa, G. Wei, M. Lin, K. Zhao, H.M. Lachman, E. Fuchs, D. Zheng, Comparison of REST cistromes across human cell types reveals common and context-specific functions, *PLoS Comput Biol*, 10 (2014) e1003671.
- [77] S.W. Lee, Y.M. Oh, Y.L. Lu, W.K. Kim, A.S. Yoo, MicroRNAs Overcome Cell Fate Barrier by Reducing EZH2-Controlled REST Stability during Neuronal Conversion of Human Adult Fibroblasts, *Dev Cell*, 46 (2018) 73-84 e77.
- [78] T. Ziegenhals, The role of the miR-26 family in neurogenesis, Graduate School of Life Sciences, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2017, pp. 122.
- [79] A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 391 (1998) 806-811.
- [80] Y. Li, K.V. Kowdley, MicroRNAs in common human diseases, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 10 (2012) 246-253.
- [81] J.T. Mendell, E.N. Olson, MicroRNAs in stress signaling and human disease, *Cell*, 148 (2012) 1172-1187.
- [82] M. Selbach, B. Schwanhaussner, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, N. Rajewsky, Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs, *Nature*, 455 (2008) 58-63.
- [83] D. Baek, J. Villen, C. Shin, F.D. Camargo, S.P. Gygi, D.P. Bartel, The impact of microRNAs on protein output, *Nature*, 455 (2008) 64-71.
- [84] S.M. Hammond, An overview of microRNAs, *Adv Drug Deliv Rev*, 87 (2015) 3-14.
- [85] G.M. Borchert, W. Lanier, B.L. Davidson, RNA polymerase III transcribes human microRNAs, *Nat Struct Mol Biol*, 13 (2006) 1097-1101.

- [86] A.M. Monteys, R.M. Spengler, J. Wan, L. Tecedor, K.A. Lennox, Y. Xing, B.L. Davidson, Structure and activity of putative intronic miRNA promoters, *RNA*, 16 (2010) 495-505.
- [87] C. Melton, R.L. Judson, R. Blelloch, Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells, *Nature*, 463 (2010) 621-626.
- [88] H.B. Houbaviy, M.F. Murray, P.A. Sharp, Embryonic stem cell-specific MicroRNAs, *Dev Cell*, 5 (2003) 351-358.
- [89] S.C. Kwon, T.A. Nguyen, Y.G. Choi, M.H. Jo, S. Hohng, V.N. Kim, J.S. Woo, Structure of Human DROSHA, *Cell*, 164 (2016) 81-90.
- [90] J. Han, Y. Lee, K.H. Yeom, J.W. Nam, I. Heo, J.K. Rhee, S.Y. Sohn, Y. Cho, B.T. Zhang, V.N. Kim, Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex, *Cell*, 125 (2006) 887-901.
- [91] T.A. Nguyen, M.H. Jo, Y.G. Choi, J. Park, S.C. Kwon, S. Hohng, V.N. Kim, J.S. Woo, Functional Anatomy of the Human Microprocessor, *Cell*, 161 (2015) 1374-1387.
- [92] J. Quick-Cleveland, J.P. Jacob, S.H. Weitz, G. Shoffner, R. Senturia, F. Guo, The DGCR8 RNA-binding heme domain recognizes primary microRNAs by clamping the hairpin, *Cell Rep*, 7 (2014) 1994-2005.
- [93] Y. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, V.N. Kim, The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing, *Nature*, 425 (2003) 415-419.
- [94] J.G. Ruby, C.H. Jan, D.P. Bartel, Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing, *Nature*, 448 (2007) 83-86.
- [95] K. Okamura, J.W. Hagen, H. Duan, D.M. Tyler, E.C. Lai, The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*, *Cell*, 130 (2007) 89-100.
- [96] R. Yi, Y. Qin, I.G. Macara, B.R. Cullen, Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs, *Genes Dev*, 17 (2003) 3011-3016.
- [97] M.T. Bohnsack, K. Czaplinski, D. Gorlich, Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs, *RNA*, 10 (2004) 185-191.
- [98] E. Bernstein, S.Y. Kim, M.A. Carmell, E.P. Murchison, H. Alcorn, M.Z. Li, A.A. Mills, S.J. Elledge, K.V. Anderson, G.J. Hannon, Dicer is essential for mouse development, *Nat Genet*, 35 (2003) 215-217.
- [99] I.J. Macrae, K. Zhou, F. Li, A. Repic, A.N. Brooks, W.Z. Cande, P.D. Adams, J.A. Doudna, Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer, *Science*, 311 (2006) 195-198.
- [100] H. Zhang, F.A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof, W. Filipowicz, Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III, *Cell*, 118 (2004) 57-68.
- [101] E. Bernstein, A.A. Caudy, S.M. Hammond, G.J. Hannon, Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference, *Nature*, 409 (2001) 363-366.
- [102] G. Hutvagner, J. McLachlan, A.E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl, P.D. Zamore, A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA, *Science*, 293 (2001) 834-838.
- [103] R.F. Ketting, S.E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G.J. Hannon, R.H. Plasterk, Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*, *Genes Dev*, 15 (2001) 2654-2659.
- [104] J. Winter, S. Link, D. Witzigmann, C. Hildenbrand, C. Previti, S. Diederichs, Loop-miRs: active microRNAs generated from single-stranded loop regions, *Nucleic Acids Res*, 41 (2013) 5503-5512.

- [105] Z. Mourelatos, J. Dostie, S. Paushkin, A. Sharma, B. Charroux, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann, G. Dreyfuss, miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs, *Genes Dev*, 16 (2002) 720-728.
- [106] S.M. Hammond, S. Boettcher, A.A. Caudy, R. Kobayashi, G.J. Hannon, Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi, *Science*, 293 (2001) 1146-1150.
- [107] A. Khvorova, A. Reynolds, S.D. Jayasena, Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias, *Cell*, 115 (2003) 209-216.
- [108] D.S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, P.D. Zamore, Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex, *Cell*, 115 (2003) 199-208.
- [109] G. Meister, M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, T. Tuschl, Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs, *Mol Cell*, 15 (2004) 185-197.
- [110] G. Hutvagner, M.J. Simard, Argonaute proteins: key players in RNA silencing, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (2008) 22-32.
- [111] A. Lingel, B. Simon, E. Izaurralde, M. Sattler, Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain, *Nat Struct Mol Biol*, 11 (2004) 576-577.
- [112] J.B. Ma, K. Ye, D.J. Patel, Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain, *Nature*, 429 (2004) 318-322.
- [113] F. Frank, N. Sonenberg, B. Nagar, Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2, *Nature*, 465 (2010) 818-822.
- [114] J. Martinez, T. Tuschl, RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease, *Genes Dev*, 18 (2004) 975-980.
- [115] D.P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 116 (2004) 281-297.
- [116] S.D. Chandradoss, N.T. Schirle, M. Szczepaniak, I.J. MacRae, C. Joo, A Dynamic Search Process Underlies MicroRNA Targeting, *Cell*, 162 (2015) 96-107.
- [117] W.E. Salomon, S.M. Jolly, M.J. Moore, P.D. Zamore, V. Serebrov, Single-Molecule Imaging Reveals that Argonaute Reshapes the Binding Properties of Its Nucleic Acid Guides, *Cell*, 162 (2015) 84-95.
- [118] J.S. Parker, E.A. Parizotto, M. Wang, S.M. Roe, D. Barford, Enhancement of the seed-target recognition step in RNA silencing by a PIWI/MID domain protein, *Mol Cell*, 33 (2009) 204-214.
- [119] D.P. Bartel, MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, 136 (2009) 215-233.
- [120] J.P. Broughton, M.T. Lovci, J.L. Huang, G.W. Yeo, A.E. Pasquinelli, Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity, *Mol Cell*, 64 (2016) 320-333.
- [121] K. Takimoto, M. Wakiyama, S. Yokoyama, Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression, *RNA*, 15 (2009) 1078-1089.
- [122] A. Jakymiw, S. Lian, T. Eystathiou, S. Li, M. Satoh, J.C. Hamel, M.J. Fritzler, E.K. Chan, Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference, *Nat Cell Biol*, 7 (2005) 1267-1274.
- [123] J. Liu, F.V. Rivas, J. Wohlschlegel, J.R. Yates, 3rd, R. Parker, G.J. Hannon, A role for the P-body component GW182 in microRNA function, *Nat Cell Biol*, 7 (2005) 1261-1266.
- [124] J.T. Zipprich, S. Bhattacharyya, H. Mathys, W. Filipowicz, Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression, *RNA*, 15 (2009) 781-793.

- [125] D. Lazzaretti, I. Tournier, E. Izaurralde, The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins, *RNA*, 15 (2009) 1059-1066.
- [126] J.E. Braun, E. Huntzinger, M. Fauser, E. Izaurralde, GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets, *Mol Cell*, 44 (2011) 120-133.
- [127] C.Y. Chen, D. Zheng, Z. Xia, A.B. Shyu, Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps, *Nat Struct Mol Biol*, 16 (2009) 1160-1166.
- [128] M.R. Fabian, G. Mathonnet, T. Sundermeier, H. Mathys, J.T. Zipprich, Y.V. Svitkin, F. Rivas, M. Jinek, J. Wohlschlegel, J.A. Doudna, C.Y. Chen, A.B. Shyu, J.R. Yates, 3rd, G.J. Hannon, W. Filipowicz, T.F. Duchaine, N. Sonenberg, Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation, *Mol Cell*, 35 (2009) 868-880.
- [129] S. Nottrott, M.J. Simard, J.D. Richter, Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes, *Nat Struct Mol Biol*, 13 (2006) 1108-1114.
- [130] X.C. Ding, H. Grosshans, Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins, *EMBO J*, 28 (2009) 213-222.
- [131] R.S. Pillai, C.G. Artus, W. Filipowicz, Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis, *RNA*, 10 (2004) 1518-1525.
- [132] D.T. Humphreys, B.J. Westman, D.I. Martin, T. Preiss, MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (2005) 16961-16966.
- [133] H. Guo, N.T. Ingolia, J.S. Weissman, D.P. Bartel, Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels, *Nature*, 466 (2010) 835-840.
- [134] A.A. Bazzini, M.T. Lee, A.J. Giraldez, Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish, *Science*, 336 (2012) 233-237.
- [135] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, T. Tuschl, Identification of tissue-specific microRNAs from mouse, *Curr Biol*, 12 (2002) 735-739.
- [136] L.F. Sempere, S. Freemantle, I. Pitha-Rowe, E. Moss, E. Dmitrovsky, V. Ambros, Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation, *Genome Biol*, 5 (2004) R13.
- [137] E. Wienholds, W.P. Kloosterman, E. Miska, E. Alvarez-Saavedra, E. Berezikov, E. de Bruijn, H.R. Horvitz, S. Kauppinen, R.H. Plasterk, MicroRNA expression in zebrafish embryonic development, *Science*, 309 (2005) 310-311.
- [138] F.G. Wulczyn, L. Smirnova, A. Rybak, C. Brandt, E. Kwidzinski, O. Ninnemann, M. Strehle, A. Seiler, S. Schumacher, R. Nitsch, Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification, *FASEB J*, 21 (2007) 415-426.
- [139] A.J. Giraldez, R.M. Cinalli, M.E. Glasner, A.J. Enright, J.M. Thomson, S. Baskerville, S.M. Hammond, D.P. Bartel, A.F. Schier, MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish, *Science*, 308 (2005) 833-838.
- [140] J. Liu, M.A. Carmell, F.V. Rivas, C.G. Marsden, J.M. Thomson, J.J. Song, S.M. Hammond, L. Joshua-Tor, G.J. Hannon, Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi, *Science*, 305 (2004) 1437-1441.
- [141] Y. Kawase-Koga, G. Otaegi, T. Sun, Different timings of Dicer deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system, *Dev Dyn*, 238 (2009) 2800-2812.

- [142] D. De Pietri Tonelli, J.N. Pulvers, C. Haffner, E.P. Murchison, G.J. Hannon, W.B. Huttner, miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex, *Development*, 135 (2008) 3911-3921.
- [143] T.H. Davis, T.L. Cuellar, S.M. Koch, A.J. Barker, B.D. Harfe, M.T. McManus, E.M. Ullian, Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus, *J Neurosci*, 28 (2008) 4322-4330.
- [144] T.L. Cuellar, T.H. Davis, P.T. Nelson, G.B. Loeb, B.D. Harfe, E. Ullian, M.T. McManus, Dicer loss in striatal neurons produces behavioral and neuroanatomical phenotypes in the absence of neurodegeneration, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (2008) 5614-5619.
- [145] A.M. Krichevsky, K.C. Sonntag, O. Isacson, K.S. Kosik, Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis, *Stem Cells*, 24 (2006) 857-864.
- [146] A.M. Krichevsky, K.S. King, C.P. Donahue, K. Khrapko, K.S. Kosik, A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development, *RNA*, 9 (2003) 1274-1281.
- [147] E.V. Makeyev, J. Zhang, M.A. Carrasco, T. Maniatis, The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing, *Mol Cell*, 27 (2007) 435-448.
- [148] L.P. Lim, N.C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J.M. Schelter, J. Castle, D.P. Bartel, P.S. Linsley, J.M. Johnson, Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs, *Nature*, 433 (2005) 769-773.
- [149] L.C. Cheng, E. Pastrana, M. Tavazoie, F. Doetsch, miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche, *Nat Neurosci*, 12 (2009) 399-408.
- [150] Y. Shi, D. Chichung Lie, P. Taupin, K. Nakashima, J. Ray, R.T. Yu, F.H. Gage, R.M. Evans, Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells, *Nature*, 427 (2004) 78-83.
- [151] C. Zhao, G. Sun, S. Li, Y. Shi, A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination, *Nat Struct Mol Biol*, 16 (2009) 365-371.
- [152] A.S. Yoo, A.X. Sun, L. Li, A. Shcheglovitov, T. Portmann, Y. Li, C. Lee-Messer, R.E. Dolmetsch, R.W. Tsien, G.R. Crabtree, MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons, *Nature*, 476 (2011) 228-231.
- [153] D.G. Abernathy, W.K. Kim, M.J. McCoy, A.M. Lake, R. Ouwenga, S.W. Lee, X. Xing, D. Li, H.J. Lee, R.O. Heuckeroth, J.D. Dougherty, T. Wang, A.S. Yoo, MicroRNAs Induce a Permissive Chromatin Environment that Enables Neuronal Subtype-Specific Reprogramming of Adult Human Fibroblasts, *Cell Stem Cell*, 21 (2017) 332-348 e339.
- [154] Y.K. Kim, V.N. Kim, Processing of intronic microRNAs, *EMBO J*, 26 (2007) 775-783.
- [155] M. Bak, A. Silahdaroglu, M. Moller, M. Christensen, M.F. Rath, B. Skryabin, N. Tommerup, S. Kauppinen, MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system, *RNA*, 14 (2008) 432-444.
- [156] M.H. Radfar, W. Wong, Q. Morris, Computational prediction of intronic microRNA targets using host gene expression reveals novel regulatory mechanisms, *PLoS One*, 6 (2011) e19312.
- [157] A. Rosa, F.M. Spagnoli, A.H. Brivanlou, The miR-430/427/302 family controls mesendodermal fate specification via species-specific target selection, *Dev Cell*, 16 (2009) 517-527.
- [158] V. Busskamp, N.E. Lewis, P. Guye, A.H. Ng, S.L. Shipman, S.M. Byrne, N.E. Sanjana, J. Murn, Y. Li, S. Li, M. Stadler, R. Weiss, G.M. Church, Rapid neurogenesis through transcriptional activation in human stem cells, *Mol Syst Biol*, 10 (2014) 760.

- [159] L. Smirnova, A. Grafe, A. Seiler, S. Schumacher, R. Nitsch, F.G. Wulczyn, Regulation of miRNA expression during neural cell specification, *Eur J Neurosci*, 21 (2005) 1469-1477.
- [160] H. Dill, B. Linder, A. Fehr, U. Fischer, Intronic miR-26b controls neuronal differentiation by repressing its host transcript, *ctdsp2*, *Genes Dev*, 26 (2012) 25-30.
- [161] P.Y. Chen, H. Manninga, K. Slanchev, M. Chien, J.J. Russo, J. Ju, R. Sheridan, B. John, D.S. Marks, D. Gaidatzis, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl, The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning, *Genes Dev*, 19 (2005) 1288-1293.
- [162] N. Ludwig, P. Leidinger, K. Becker, C. Backes, T. Fehlmann, C. Pallasch, S. Rheinheimer, B. Meder, C. Stahler, E. Meese, A. Keller, Distribution of miRNA expression across human tissues, *Nucleic Acids Res*, 44 (2016) 3865-3877.
- [163] D. de Rie, I. Abugessaisa, T. Alam, E. Arner, P. Arner, H. Ashoor, G. Astrom, M. Babina, N. Bertin, A.M. Burroughs, A.J. Carlisle, C.O. Daub, M. Detmar, R. Deviatiiarov, A. Fort, C. Gebhard, D. Goldowitz, S. Guhl, T.J. Ha, J. Harshbarger, A. Hasegawa, K. Hashimoto, M. Herlyn, P. Heutink, K.J. Hitchens, C.C. Hon, E. Huang, Y. Ishizu, C. Kai, T. Kasukawa, P. Klinken, T. Lassmann, C.H. Lecellier, W. Lee, M. Lizio, V. Makeev, A. Mathelier, Y.A. Medvedeva, N. Mejhert, C.J. Mungall, S. Noma, M. Ohshima, M. Okada-Hatakeyama, H. Persson, P. Rizzu, F. Roudnicky, P. Saetrom, H. Sato, J. Severin, J.W. Shin, R.K. Swoboda, H. Tarui, H. Toyoda, K. Vitting-Seerup, L. Winteringham, Y. Yamaguchi, K. Yasuzawa, M. Yoneda, N. Yumoto, S. Zabierowski, P.G. Zhang, C.A. Wells, K.M. Summers, H. Kawaji, A. Sandelin, M. Rehli, F. Consortium, Y. Hayashizaki, P. Carninci, A.R.R. Forrest, M.J.L. de Hoon, An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse, *Nat Biotechnol*, 35 (2017) 872-878.
- [164] C. Cui, G. Xu, J. Qiu, X. Fan, Up-regulation of miR-26a promotes neurite outgrowth and ameliorates apoptosis by inhibiting PTEN in bupivacaine injured mouse dorsal root ganglia, *Cell Biol Int*, 39 (2015) 933-942.
- [165] J.J. Jiang, C.M. Liu, B.Y. Zhang, X.W. Wang, M. Zhang, Saijilafu, S.R. Zhang, P. Hall, Y.W. Hu, F.Q. Zhou, MicroRNA-26a supports mammalian axon regeneration in vivo by suppressing GSK3beta expression, *Cell Death Dis*, 6 (2015) e1865.
- [166] Q.H. Gu, D. Yu, Z. Hu, X. Liu, Y. Yang, Y. Luo, J. Zhu, Z. Li, miR-26a and miR-384-5p are required for LTP maintenance and spine enlargement, *Nat Commun*, 6 (2015) 6789.
- [167] C.F. Wong, R.L. Tellam, MicroRNA-26a targets the histone methyltransferase Enhancer of Zeste homolog 2 during myogenesis, *J Biol Chem*, 283 (2008) 9836-9843.
- [168] J. Lu, M.L. He, L. Wang, Y. Chen, X. Liu, Q. Dong, Y.C. Chen, Y. Peng, K.T. Yao, H.F. Kung, X.P. Li, MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2, *Cancer Res*, 71 (2011) 225-233.
- [169] S. Sander, L. Bullinger, K. Klapproth, K. Fiedler, H.A. Kestler, T.F. Barth, P. Moller, S. Stilgenbauer, J.R. Pollack, T. Wirth, MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a, *Blood*, 112 (2008) 4202-4212.
- [170] B. Zhang, X.X. Liu, J.R. He, C.X. Zhou, M. Guo, M. He, M.F. Li, G.Q. Chen, Q. Zhao, Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2 in breast cancer, *Carcinogenesis*, 32 (2011) 2-9.
- [171] J. Kota, R.R. Chivukula, K.A. O'Donnell, E.A. Wentzel, C.L. Montgomery, H.W. Hwang, T.C. Chang, P. Vivekanandan, M. Torbenson, K.R. Clark, J.R. Mendell, J.T. Mendell, Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model, *Cell*, 137 (2009) 1005-1017.
- [172] L. Chen, J. Zheng, Y. Zhang, L. Yang, J. Wang, J. Ni, D. Cui, C. Yu, Z. Cai, Tumor-specific expression of microRNA-26a suppresses human hepatocellular carcinoma

- growth via cyclin-dependent and -independent pathways, *Mol Ther*, 19 (2011) 1521-1528.
- [173] Y. Ji, Y. He, L. Liu, X. Chong, miRNA-26b regulates the expression of cyclooxygenase-2 in desferrioxamine-treated CNE cells, *FEBS Lett*, 584 (2010) 961-967.
- [174] Z. Zhang, S. Florez, A. Gutierrez-Hartmann, J.F. Martin, B.A. Amendt, MicroRNAs regulate pituitary development, and microRNA 26b specifically targets lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1), which modulates pituitary transcription factor 1 (Pit-1) expression, *J Biol Chem*, 285 (2010) 34718-34728.
- [175] Q. Wang, C. Xu, Y. Zhao, Z. Xu, Y. Zhang, J. Jiang, B. Yan, D. Gu, M. Wu, Y. Wang, H. Liu, miR-26b-3p Regulates Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation by Targeting Estrogen Receptor, *Stem Cells Dev*, 25 (2016) 415-426.
- [176] N. Wu, X. Zhao, M. Liu, H. Liu, W. Yao, Y. Zhang, S. Cao, X. Lin, Role of microRNA-26b in glioma development and its mediated regulation on EphA2, *PLoS One*, 6 (2011) e16264.
- [177] H. Zhang, L. Zhang, T. Sun, Cohesive Regulation of Neural Progenitor Development by microRNA miR-26, Its Host Gene Ctdsp and Target Gene Emx2 in the Mouse Embryonic Cerebral Cortex, *Front Mol Neurosci*, 11 (2018) 44.
- [178] D.E. Kloet, P.E. Polderman, A. Eijkelenboom, L.M. Smits, M.H. van Triest, M.C. van den Berg, M.J. Groot Koerkamp, D. van Leenen, P. Lijnzaad, F.C. Holstege, B.M. Burgering, FOXO target gene CTDSP2 regulates cell cycle progression through Ras and p21(Cip1/Waf1), *Biochem J*, 469 (2015) 289-298.
- [179] Y. Zhu, Y. Lu, Q. Zhang, J.J. Liu, T.J. Li, J.R. Yang, C. Zeng, S.M. Zhuang, MicroRNA-26a/b and their host genes cooperate to inhibit the G1/S transition by activating the pRb protein, *Nucleic Acids Res*, 40 (2012) 4615-4625.
- [180] J.T. Huse, C. Brennan, D. Hambardzumyan, B. Wee, J. Pena, S.H. Rouhanifard, C. Sohn-Lee, C. le Sage, R. Agami, T. Tuschl, E.C. Holland, The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo, *Genes Dev*, 23 (2009) 1327-1337.
- [181] T. Palumbo, F.R. Faucz, M. Azevedo, P. Xekouki, D. Iliopoulos, C.A. Stratakis, Functional screen analysis reveals miR-26b and miR-128 as central regulators of pituitary somatomammotrophic tumor growth through activation of the PTEN-AKT pathway, *Oncogene*, 32 (2013) 1651-1659.
- [182] B.P. Lewis, I.H. Shih, M.W. Jones-Rhoades, D.P. Bartel, C.B. Burge, Prediction of mammalian microRNA targets, *Cell*, 115 (2003) 787-798.
- [183] N.J. Leeper, A. Raiesdana, Y. Kojima, H.J. Chun, J. Azuma, L. Maegdefessel, R.K. Kundu, T. Quertermous, P.S. Tsao, J.M. Spin, MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smooth muscle cell function, *J Cell Physiol*, 226 (2011) 1035-1043.
- [184] X. Su, L. Liao, Y. Shuai, H. Jing, S. Liu, H. Zhou, Y. Liu, Y. Jin, MiR-26a functions oppositely in osteogenic differentiation of BMSCs and ADSCs depending on distinct activation and roles of Wnt and BMP signaling pathway, *Cell Death Dis*, 6 (2015) e1851.
- [185] V.A. Gennarino, M. Sardiello, R. Avellino, N. Meola, V. Maselli, S. Anand, L. Cuttillo, A. Ballabio, S. Banfi, MicroRNA target prediction by expression analysis of host genes, *Genome Res*, 19 (2009) 481-490.
- [186] Z. Wang, Q. Xie, Z. Yu, H. Zhou, Y. Huang, X. Bi, Y. Wang, W. Shi, H. Sun, P. Gu, X. Fan, A regulatory loop containing miR-26a, GSK3beta and C/EBPalpha regulates the osteogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells, *Sci Rep*, 5 (2015) 15280.
- [187] J. Zhang, C. Han, T. Wu, MicroRNA-26a promotes cholangiocarcinoma growth by activating beta-catenin, *Gastroenterology*, 143 (2012) 246-256 e248.

- [188] R. Saba, G.M. Schratt, MicroRNAs in neuronal development, function and dysfunction, *Brain Res*, 1338 (2010) 3-13.
- [189] R. Fiore, G. Siegel, G. Schratt, MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease, *Biochim Biophys Acta*, 1779 (2008) 471-478.
- [190] C.T. Lee, T. Risom, W.M. Strauss, MicroRNAs in mammalian development, *Birth Defects Res C Embryo Today*, 78 (2006) 129-139.
- [191] A.X. Sun, G.R. Crabtree, A.S. Yoo, MicroRNAs: regulators of neuronal fate, *Curr Opin Cell Biol*, 25 (2013) 215-221.
- [192] J. Han, A.M. Denli, F.H. Gage, The enemy within: intronic miR-26b represses its host gene, *ctdsp2*, to regulate neurogenesis, *Genes Dev*, 26 (2012) 6-10.
- [193] W. Wolber, R. Ahmad, S.W. Choi, S. Eckardt, K.J. McLaughlin, J. Schmitt, C. Geis, M. Heckmann, A.L. Siren, A.M. Muller, Phenotype and Stability of Neural Differentiation of Androgenetic Murine ES Cell-Derived Neural Progenitor Cells, *Cell Med*, 5 (2013) 29-42.
- [194] M. Bibel, E. Lacroix, C. Klein, R. May-Nass, S. Perez-Alcala, J. Richter, K. Schrenk-Siemens, Embryonic stem cell-derived neurons as a novel cellular model system to study neurodegenerative and neuroregenerative processes in vitro, *J Stem Cells Regen Med*, 2 (2007) 62-63.
- [195] T. Barberi, P. Klivenyi, N.Y. Calingasan, H. Lee, H. Kawamata, K. Loonam, A.L. Perrier, J. Bruses, M.E. Rubio, N. Topf, V. Tabar, N.L. Harrison, M.F. Beal, M.A. Moore, L. Studer, Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice, *Nat Biotechnol*, 21 (2003) 1200-1207.
- [196] M. Bibel, J. Richter, E. Lacroix, Y.A. Barde, Generation of a defined and uniform population of CNS progenitors and neurons from mouse embryonic stem cells, *Nat Protoc*, 2 (2007) 1034-1043.
- [197] P.D. Hsu, D.A. Scott, J.A. Weinstein, F.A. Ran, S. Konermann, V. Agarwala, Y. Li, E.J. Fine, X. Wu, O. Shalem, T.J. Cradick, L.A. Marraffini, G. Bao, F. Zhang, DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases, *Nat Biotechnol*, 31 (2013) 827-832.
- [198] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol*, 3 (2002) RESEARCH0034.
- [199] C. Trapnell, A. Roberts, L. Goff, G. Pertea, D. Kim, D.R. Kelley, H. Pimentel, S.L. Salzberg, J.L. Rinn, L. Pachter, Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks, *Nat Protoc*, 7 (2012) 562-578.
- [200] M. Hafner, N. Renwick, T.A. Farazi, A. Mihailovic, J.T. Pena, T. Tuschl, Barcoded cDNA library preparation for small RNA profiling by next-generation sequencing, *Methods*, 58 (2012) 164-170.
- [201] T.A. Farazi, M. Brown, P. Morozov, J.J. Ten Hoeve, I.Z. Ben-Dov, V. Hovestadt, M. Hafner, N. Renwick, A. Mihailovic, L.F. Wessels, T. Tuschl, Bioinformatic analysis of barcoded cDNA libraries for small RNA profiling by next-generation sequencing, *Methods*, 58 (2012) 171-187.
- [202] L. Micallef, P. Rodgers, eulerAPE: drawing area-proportional 3-Venn diagrams using ellipses, *PLoS One*, 9 (2014) e101717.
- [203] C. The Gene Ontology, Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources, *Nucleic Acids Res*, 45 (2017) D331-D338.
- [204] H. Mi, X. Huang, A. Muruganujan, H. Tang, C. Mills, D. Kang, P.D. Thomas, PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements, *Nucleic Acids Res*, 45 (2017) D183-D189.

- [205] M. Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res*, 31 (2003) 3406-3415.
- [206] A. Kozomara, S. Griffiths-Jones, miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data, *Nucleic Acids Res*, 42 (2014) D68-73.
- [207] H. Dweep, N. Gretz, miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions, *Nat Methods*, 12 (2015) 697.
- [208] H. Dweep, C. Sticht, P. Pandey, N. Gretz, miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes, *J Biomed Inform*, 44 (2011) 839-847.
- [209] A. Bradley, M. Evans, M.H. Kaufman, E. Robertson, Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines, *Nature*, 309 (1984) 255-256.
- [210] M.J. Evans, M.H. Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, 292 (1981) 154-156.
- [211] T.C. Dinger, S. Eckardt, S.W. Choi, G. Camarero, S. Kurosaka, V. Hornich, K.J. McLaughlin, A.M. Muller, Androgenetic embryonic stem cells form neural progenitor cells in vivo and in vitro, *Stem Cells*, 26 (2008) 1474-1483.
- [212] H.Y. Jin, A. Gonzalez-Martin, A.V. Miletic, M. Lai, S. Knight, M. Sabouri-Ghomi, S.R. Head, M.S. Macauley, R.C. Rickert, C. Xiao, Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution, *Front Genet*, 6 (2015) 340.
- [213] X. Cao, S.L. Pfaff, F.H. Gage, A functional study of miR-124 in the developing neural tube, *Genes Dev*, 21 (2007) 531-536.
- [214] C.J. Sherr, J.M. Roberts, CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, *Genes Dev*, 13 (1999) 1501-1512.
- [215] S. Ortega, M. Malumbres, M. Barbacid, Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer, *Biochim Biophys Acta*, 1602 (2002) 73-87.
- [216] C.J. Schoenherr, D.J. Anderson, The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes, *Science*, 267 (1995) 1360-1363.
- [217] R.J. Johnston, O. Hobert, A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 426 (2003) 845-849.
- [218] J. Wu, X. Xie, Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression, *Genome Biol*, 7 (2006) R85.
- [219] C. Conaco, S. Otto, J.J. Han, G. Mandel, Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (2006) 2422-2427.
- [220] R. Johnson, C. Zuccato, N.D. Belyaev, D.J. Guest, E. Cattaneo, N.J. Buckley, A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease, *Neurobiol Dis*, 29 (2008) 438-445.
- [221] R. Johnson, N.J. Buckley, Gene dysregulation in Huntington's disease: REST, microRNAs and beyond, *Neuromolecular Med*, 11 (2009) 183-199.
- [222] A.S. Yoo, B.T. Staahl, L. Chen, G.R. Crabtree, MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development, *Nature*, 460 (2009) 642-646.
- [223] A. Janzer, S. Lim, F. Fronhoffs, N. Niazy, R. Buettner, J. Kirfel, Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and histone deacetylase 1 (HDAC1) synergistically repress proinflammatory cytokines and classical complement pathway components, *Biochem Biophys Res Commun*, 421 (2012) 665-670.
- [224] E. Metzger, M. Wissmann, N. Yin, J.M. Muller, R. Schneider, A.H. Peters, T. Gunther, R. Buettner, R. Schule, LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription, *Nature*, 437 (2005) 436-439.

- [225] N. Mosammaparast, Y. Shi, Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases, *Annu Rev Biochem*, 79 (2010) 155-179.
- [226] Y. Wang, H. Zhang, Y. Chen, Y. Sun, F. Yang, W. Yu, J. Liang, L. Sun, X. Yang, L. Shi, R. Li, Y. Li, Y. Zhang, Q. Li, X. Yi, Y. Shang, LSD1 is a subunit of the NuRD complex and targets the metastasis programs in breast cancer, *Cell*, 138 (2009) 660-672.
- [227] Y. Komiya, R. Habas, Wnt signal transduction pathways, *Organogenesis*, 4 (2008) 68-75.
- [228] R. Johnson, C.H. Teh, G. Kunarso, K.Y. Wong, G. Srinivasan, M.L. Cooper, M. Volta, S.S. Chan, L. Lipovich, S.M. Pollard, R.K. Karuturi, C.L. Wei, N.J. Buckley, L.W. Stanton, REST regulates distinct transcriptional networks in embryonic and neural stem cells, *PLoS Biol*, 6 (2008) e256.
- [229] J. Itskovitz-Eldor, M. Schuldiner, D. Karsenti, A. Eden, O. Yanuka, M. Amit, H. Soreq, N. Benvenisty, Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers, *Mol Med*, 6 (2000) 88-95.
- [230] J. Rathjen, P.D. Rathjen, Mouse ES cells: experimental exploitation of pluripotent differentiation potential, *Curr Opin Genet Dev*, 11 (2001) 587-594.
- [231] S. Herculano-Houzel, B. Mota, R. Lent, Cellular scaling rules for rodent brains, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (2006) 12138-12143.
- [232] C.S. von Bartheld, J. Bahney, S. Herculano-Houzel, The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting, *J Comp Neurol*, 524 (2016) 3865-3895.
- [233] J. Santa-Olalla, L. Covarrubias, Epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor-alpha (TGF-alpha), and basic fibroblast growth factor (bFGF) differentially influence neural precursor cells of mouse embryonic mesencephalon, *J Neurosci Res*, 42 (1995) 172-183.
- [234] B.A. Reynolds, S. Weiss, Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell, *Dev Biol*, 175 (1996) 1-13.
- [235] A.M. Wobus, R. Grosse, J. Schoneich, Specific effects of nerve growth factor on the differentiation pattern of mouse embryonic stem cells in vitro, *Biomed Biochim Acta*, 47 (1988) 965-973.
- [236] M. Schuldiner, R. Eiges, A. Eden, O. Yanuka, J. Itskovitz-Eldor, R.S. Goldstein, N. Benvenisty, Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells, *Brain Res*, 913 (2001) 201-205.
- [237] S. Levenberg, J.A. Burdick, T. Kraehenbuehl, R. Langer, Neurotrophin-induced differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymeric scaffolds, *Tissue Eng*, 11 (2005) 506-512.
- [238] S.H. Lee, N. Lumelsky, L. Studer, J.M. Auerbach, R.D. McKay, Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells, *Nat Biotechnol*, 18 (2000) 675-679.
- [239] Y. Okada, T. Shimazaki, G. Sobue, H. Okano, Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells, *Dev Biol*, 275 (2004) 124-142.
- [240] T. Wada, M. Honda, I. Minami, N. Tooi, Y. Amagai, N. Nakatsuji, K. Aiba, Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived from human and monkey embryonic stem cells, *PLoS One*, 4 (2009) e6722.
- [241] H. Wichterle, I. Lieberam, J.A. Porter, T.M. Jessell, Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons, *Cell*, 110 (2002) 385-397.

- [242] G. Obernosterer, P.J. Leuschner, M. Alenius, J. Martinez, Post-transcriptional regulation of microRNA expression, *RNA*, 12 (2006) 1161-1167.
- [243] J.M. Thomson, M. Newman, J.S. Parker, E.M. Morin-Kensicki, T. Wright, S.M. Hammond, Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer, *Genes Dev*, 20 (2006) 2202-2207.
- [244] G. Martello, L. Zacchigna, M. Inui, M. Montagner, M. Adorno, A. Mamidi, L. Morsut, S. Soligo, U. Tran, S. Dupont, M. Cordenonsi, O. Wessely, S. Piccolo, MicroRNA control of Nodal signalling, *Nature*, 449 (2007) 183-188.
- [245] I. Heo, M. Ha, J. Lim, M.J. Yoon, J.E. Park, S.C. Kwon, H. Chang, V.N. Kim, Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs, *Cell*, 151 (2012) 521-532.
- [246] H. Siomi, M.C. Siomi, Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals, *Mol Cell*, 38 (2010) 323-332.
- [247] T. Ziegenhals, The role of the miR-26 family in neurogenesis, Graduate School of Life Sciences, JMU Würzburg, 2017.
- [248] N.R. Choudhury, G. Michlewski, Terminal loop-mediated control of microRNA biogenesis, *Biochem Soc Trans*, 40 (2012) 789-793.
- [249] F. Jin, Y. Wang, M. Li, Y. Zhu, H. Liang, C. Wang, F. Wang, C.Y. Zhang, K. Zen, L. Li, MiR-26 enhances chemosensitivity and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through inhibiting autophagy, *Cell Death Dis*, 8 (2017) e2540.
- [250] C. Jiang, J. Long, B. Liu, X. Xie, M. Kuang, Mcl-1 Is a Novel Target of miR-26b That Is Associated with the Apoptosis Induced by TRAIL in HCC Cells, *Biomed Res Int*, 2015 (2015) 572738.
- [251] Y. Wang, B. Sun, H. Sun, X. Zhao, X. Wang, N. Zhao, Y. Zhang, Y. Li, Q. Gu, F. Liu, B. Shao, J. An, Regulation of proliferation, angiogenesis and apoptosis in hepatocellular carcinoma by miR-26b-5p, *Tumour Biol*, 37 (2016) 10965-10979.
- [252] C.M. Jia, Y.Y. Tian, L.N. Quan, L. Jiang, A.C. Liu, miR-26b-5p suppresses proliferation and promotes apoptosis in multiple myeloma cells by targeting JAG1, *Pathol Res Pract*, 214 (2018) 1388-1394.
- [253] J.Y. Du, L.F. Wang, Q. Wang, L.D. Yu, miR-26b inhibits proliferation, migration, invasion and apoptosis induction via the downregulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 driven glycolysis in osteosarcoma cells, *Oncol Rep*, 33 (2015) 1890-1898.
- [254] S. Absalon, D.M. Kochanek, V. Raghavan, A.M. Krichevsky, MiR-26b, upregulated in Alzheimer's disease, activates cell cycle entry, tau-phosphorylation, and apoptosis in postmitotic neurons, *J Neurosci*, 33 (2013) 14645-14659.
- [255] S. Seo, J.W. Lim, D. Yellajoshiyula, L.W. Chang, K.L. Kroll, Neurogenin and NeuroD direct transcriptional targets and their regulatory enhancers, *EMBO J*, 26 (2007) 5093-5108.
- [256] F. Nieber, T. Pieler, K.A. Henningfeld, Comparative expression analysis of the neurogenins in *Xenopus tropicalis* and *Xenopus laevis*, *Dev Dyn*, 238 (2009) 451-458.
- [257] L.A. D'Amico, D. Boujard, P. Coumailleau, The neurogenic factor NeuroD1 is expressed in post-mitotic cells during juvenile and adult *Xenopus* neurogenesis and not in progenitor or radial glial cells, *PLoS One*, 8 (2013) e66487.
- [258] Z. Gao, K. Ure, J.L. Ables, D.C. Lagace, K.A. Nave, S. Goebbels, A.J. Eisch, J. Hsieh, Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons, *Nat Neurosci*, 12 (2009) 1090-1092.

- [259] N. Bertrand, D.S. Castro, F. Guillemot, Proneural genes and the specification of neural cell types, *Nat Rev Neurosci*, 3 (2002) 517-530.
- [260] M.J. Bueno, M. Malumbres, MicroRNAs and the cell cycle, *Biochim Biophys Acta*, 1812 (2011) 592-601.
- [261] T.C. Chang, D. Yu, Y.S. Lee, E.A. Wentzel, D.E. Arking, K.M. West, C.V. Dang, A. Thomas-Tikhonenko, J.T. Mendell, Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis, *Nat Genet*, 40 (2008) 43-50.
- [262] X. Dang, A. Ma, L. Yang, H. Hu, B. Zhu, D. Shang, T. Chen, Y. Luo, MicroRNA-26a regulates tumorigenic properties of EZH2 in human lung carcinoma cells, *Cancer Genet*, 205 (2012) 113-123.
- [263] S.N. Reuland, S.M. Smith, L.T. Bemis, N.B. Goldstein, A.R. Almeida, K.A. Partyka, V.E. Marquez, Q. Zhang, D.A. Norris, Y.G. Shellman, MicroRNA-26a is strongly downregulated in melanoma and induces cell death through repression of silencer of death domains (SODD), *J Invest Dermatol*, 133 (2013) 1286-1293.
- [264] G. Wang, H. Zhang, H. He, W. Tong, B. Wang, G. Liao, Z. Chen, C. Du, Up-regulation of microRNA in bladder tumor tissue is not common, *Int Urol Nephrol*, 42 (2010) 95-102.
- [265] H. Kim, W. Huang, X. Jiang, B. Pennicooke, P.J. Park, M.D. Johnson, Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (2010) 2183-2188.
- [266] A.J. Kriegel, Y. Liu, Y. Fang, X. Ding, M. Liang, The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury, *Physiol Genomics*, 44 (2012) 237-244.
- [267] T. Mishima, Y. Mizuguchi, Y. Kawahigashi, T. Takizawa, T. Takizawa, RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS, *Brain Res*, 1131 (2007) 37-43.
- [268] H. Weng, C. Shen, G. Hirokawa, X. Ji, R. Takahashi, K. Shimada, C. Kishimoto, N. Iwai, Plasma miR-124 as a biomarker for cerebral infarction, *Biomed Res*, 32 (2011) 135-141.
- [269] N.D. Amin, G. Bai, J.R. Klug, D. Bonanomi, M.T. Pankratz, W.D. Gifford, C.A. Hinckley, M.J. Sternfeld, S.P. Driscoll, B. Dominguez, K.F. Lee, X. Jin, S.L. Pfaff, Loss of motoneuron-specific microRNA-218 causes systemic neuromuscular failure, *Science*, 350 (2015) 1525-1529.
- [270] M.P. Lambert, S. Terrone, G. Giraud, C. Benoit-Pilven, D. Cluet, V. Combaret, F. Mortreux, D. Auboeuf, C.F. Bourgeois, The RNA helicase DDX17 controls the transcriptional activity of REST and the expression of proneural microRNAs in neuronal differentiation, *Nucleic Acids Res*, 46 (2018) 7686-7700.
- [271] J. Drouin-Ouellet, S. Lau, P.L. Brattas, D. Rylander Ottosson, K. Piracs, D.A. Grassi, L.M. Collins, R. Vuono, A. Andersson Sjoland, G. Westergren-Thorsson, C. Graff, L. Minthon, H. Toresson, R.A. Barker, J. Jakobsson, M. Parmar, REST suppression mediates neural conversion of adult human fibroblasts via microRNA-dependent and -independent pathways, *EMBO Mol Med*, 9 (2017) 1117-1131.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung der verschiedenen Gewebe aus dem Ektoderm von Vertebraten.	2
Abbildung 2: Schematische Übersicht der Neurogenese im embryonalen ZNS von Vertebraten.	4
Abbildung 3: Balance zwischen NPC Proliferation und Differenzierung.....	11
Abbildung 4: Aufbau des REST-Komplex und seine Wirkung auf Zielgene.....	13
Abbildung 5: Annotation des menschlichen und murinen Genoms.....	14
Abbildung 6: Biogenese und Prozessierung von miRNAs.....	17
Abbildung 7: Überblick der miRNA-vermittelten Repression von Zielgenen.....	19
Abbildung 8: Schema der neuralen Differenzierung von murinen ESCs.....	39
Abbildung 9: Repräsentativer Bildausschnitt einer Analyse der Neuritendichte.....	41
Abbildung 10: Charakterisierung der Zellen während der Differenzierung muriner Wt ESCs.	57
Abbildung 11: Expression der miR-26 Familie und <i>Ctdsp1,2,1</i> während der neuralen Differenzierung von murinen ESCs und der embryonalen Neurogenese im Mausgehirn.	61
Abbildung 12: Validierung der generierten miR-26-KO ES-Zelllinien.....	63
Abbildung 13: Quantifizierung der Transkript-Reads von <i>Ctdsp</i> Loci in miR-26-KO ES Zelllinien.....	64
Abbildung 14: Analyse der potentiellen Off-Target Stellen in miR-26b KO ES Zelllinien.....	66
Abbildung 15: Morphologie, Proliferation und Expression verschiedener Marker in miR-26-KO Zellkulturen bis zum NPC Stadium.....	69
Abbildung 16: Immunfärbung der Wt und miR-26-KO Zellkulturen nach der Differenzierung.....	72
Abbildung 17: Analyse der Neuritendichte und Axonlänge von Wt und miR-26-KO Neuronen.....	74
Abbildung 18: Analyse der Zellviabilität an verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung und Immunfärbungen von neuralen Vorläuferzellen in d15 Wt und miR-26-KO Zellkulturen.	77
Abbildung 19: Zellzyklus Analyse der differenzierten Wt und miR-26-KO Zellen.....	79
Abbildung 20: Globale Genexpressionsanalyse und <i>GO-Term</i> Klassifizierung der differenziell exprimierten Gene in d15 miR-26-KO Zellen.	81

Abbildung 21: Schnittmenge der differenziell exprimierten Gene in den einzelnen d15 miR-26-KO Zelllinien und Expressionsanalysen von neuronalen- und neuronalen Vorläufer-Markern.	83
Abbildung 22: Auswirkung der miR-26 Deletion auf das miRNA Transkriptom.....	85
Tabelle 1: Liste der miRNAs, die potentiell durch den REST-Komplex reguliert werden.	86
Abbildung 23: Expressionsanalyse der REST-regulierten miRs in miR-26-KO Zellen.	88
Abbildung 24: Potentielle REST-miR/REST Rückkopplungsschleife.....	89
Abbildung 25: Einfluss der miR-26 Familie auf die REST-Komplex Komponenten. ...	92
Abbildung 26: Einfluss der miR-26 Familie auf REST-regulierte miRs.....	94
Abbildung 27: posttranskriptionelle Regulation von <i>Ctdsp</i> durch intronisch codierte miRNA.	101
Abbildung 28: Schematische Darstellung des Differenzierungs-Arrests in miR-26-KO Zellen.....	110
Abbildung 29: Rolle der miR-26 Familie während der Neurogenese im Modell.....	114
Tabelle 2: Individuell prozentuale Beiträge zu den finalen Abbildungen im Ergebnisteil dieser Dissertation von Mark Sauer (MS) und Thomas Ziegenhals (TZ).	115
Abbildung 30: Konservierung der miR-26 Familie in Vertebraten.	116
Abbildung 31: Expression endogener miR-26a und -26b in verschiedenen humanen Geweben.....	117
Abbildung 32: Expression endogenen miR-26a und -26b in verschiedenen murinen Geweben.....	118
Abbildung 33: Potentielle Zielstellen in der 3'UTR von <i>Ctdsp1,2,1</i> für die miR-26 und miR-124 Familie.	119
Tabelle 3: <i>GO-Term</i> Analyse von hoch- und runterregulierten Genen in d15 tKO ^{26b/a1/a2} Zellen.....	120
Tabelle 4: <i>GO-Term</i> Analyse von hoch- und runterregulierten Genen in d15 dKO ^{26a1/a2} Zellen.....	121
Tabelle 5: <i>GO-Term</i> Analyse von hoch- und runterregulierten Genen in d15 KO ^{26b} Zellen.....	122
Tabelle 6: <i>GO-Term</i> Analyse von hoch- und runterregulierten Genen in allen d15 miR-26-KO Zelllinien.	123

Abbildung 34: KEGG Pathway Analyse der miR-26a und miR-26b Zielgene und
differenziell exprimierte Gene der REST-regulierten Wnt-assoziierten
Gene.....124

8 Abkürzungsverzeichnis

Ascl1	<i>Achaete-scute homolog 1</i>
bHLH	basic helix-loop-helix
BLBP	brain lipid-binding protein
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BP	basal progenitor
bRG	basal radial glia
BSA	Rinderserumalbumin
CCR4	<i>C-C Motif Chemokine Receptor 4</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
coREST	REST Ko-Repressor
CPD	Kumulative Populationsverdopplungen
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CSF	cerebrospinal fluid (Zerebrospinalflüssigkeit)
CTDSP	<i>C-terminal domain small phosphatases</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i>
DLHP	<i>Dorsolateral hinge point</i> , dorsolateraler Gelenkpunkt
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EB	Embryoid body = embryonale Körperchen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESC	embryonale Stammzelle
Ezh2	<i>Enhancer of zeste 2</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchfluszytometrie)
FCS	fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GABA	<i>Gamma-Aminobutyric acid</i> = Gamma-Aminobuttersäure
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gfap	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GO-Term	<i>gene ontology term</i> = Gen Ontologie Begriff

HDAC1/2	Histondeacetylase 1 oder 2
HEK293T	<i>Human embryonic kidney cell line</i>
Hes	hairy/enhancer of split
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
ICM	<i>inner cell mass</i> , innere Zellmasse
IGF	insulin growth factor
IP	intermediate progenitor
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i> = interne ribosomale Eintrittsstelle
KD	<i>knockdown</i>
kDa	Kilo Dalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KO	<i>knockout</i>
Lef1	<i>Lymphoid Enhancer Binding Protein 1</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
lncRNA	long non-coding RNA
Lsd1	<i>Lysine Demethylase 1A</i>
Map2	<i>Microtubule Associated Protein 2</i>
MeCP2	<i>Methyl-CpG Binding Protein 2</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i> = muriner embryonaler Fibroblast
MHP	<i>Medial hinge point</i> , medialer Gelenkpunkt
Miat	<i>Myocardial Infarction Associated Transcript</i>
min.	Minuten
miR	microRNA
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
Myc	myelocytomatosis oncogene
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NC	neuronal cell
Ncam	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NEC	neuroepithelial cell
Neurod1	<i>neuronal differentiation 1</i>
Neurog1	Neurogenin 1
NPC	<i>neural progenitor cell</i> , neurale Vorläuferzelle
NSC	<i>neural stem cell</i> , neurale Stammzelle

OD	Optische Dichte
PAM	<i>Protospacer Adjacent motif</i> (sinngemäß: Vorabstandshalterangrenzendes Motiv)
Pan1/2	<i>Poly(A) specific Ribonuclease Subunit 1/2</i>
Pax6	<i>Paired box 5</i>
Pax6	<i>Paired Box 6</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> = Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD	Populationsverdopplungen
Pfkfb3	<i>6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3</i>
PORN	Poly-DL-Ornithin Lösung
pre-miR	precursor microRNA
pri-miR	primäre microRNA
Ptbp2	<i>Polypyrimidine Tract Binding Protein 2</i>
qRT-PCR	<i>quantitativ real time PCR</i> = quantitative Echtzeit PCR
Rbfox3	<i>RNA Binding Fox-1 Homolog 3</i>
RBP	<i>RNA binding protein</i> = RNA-bindendes Protein
RE1	<i>repressor element 1</i>
REST	<i>repressor element silencing transcription factor</i>
Rex1	<i>Reduced expression 1</i>
Rex1	<i>RNA Exonuclease 1 Homolog</i>
RGC	<i>radial glial cell</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> = RNA-induzierter Stilllegungskomplex
Rmst	<i>Rhabdomyosarcoma 2 Associated Transcript</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
RPL4	Ribosomales Protein L4
rpm	<i>rounds per minute</i> = Umdrehung pro Minute
SDS PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
sgRNA	single guide RNA
SGV	Subgranuläre Zone
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>

SOB medium	<i>Super optimal broth medium</i>
SOC medium	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
Std.	Stunden
SVZ	Subventrikuläre Zone
Tubb3	β-III-Tubulin
WNT	Zusammensetzung aus Wg für <i>Wingless</i> und <i>Int-1</i>
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
μL	Mikro-Liter
μm	Mikro-Meter
μM	Mikro-Mol

9 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit werden veröffentlicht in dem folgenden in folgendem Artikel:

Sauer M., Ziegenhals T., Houben N., Wang X., Hafner M., Becker M., Fischer U., Müller A.: *“The miR-26 family as an initial trigger for neurogenesis initiation through stepwise inactivation of the REST complex”*. (in preparation)

Danksagungen

Mit dem Einreichen dieser Dissertation endet eine lange Reise, auf der mich viele Menschen begleitet und unterstützt haben. An dieser Stelle möchte ich diesen Menschen meinen Dank aussprechen.

Mein außerordentlicher Dank gilt Prof. Dr. Albrecht Müller, für die Möglichkeit unter seiner Betreuung an diesem spannenden Projekt in seinem Labor arbeiten zu dürfen.

PD Dr. Matthias Becker, meinem Erstgutachter, danke ich für die wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Diskussionen, für sein stets offenes Ohr, die hilfreichen Ratschläge und für die Betreuung meiner Arbeit.

Prof. Dr. Utz Fischer möchte ich danken für die gute Kollaboration, Unterstützung innerhalb des Projekts und die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Ich danke Prof. Dr. Ricardo Benavente, der sich bereiterklärt hat als Zweitgutachter für diese Doktorarbeit zur Verfügung zu stehen.

Ein großes Dankeschön gilt Dr. Thomas Ziegenhals für die gute Zusammenarbeit und die wissenschaftliche Hilfestellung während der Arbeit an unserem gemeinsamen Projekt.

Zudem möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen der AG Müller bedanken, mit denen ich die letzten Jahre eine tolle Zeit verbracht habe. Ein großes Dankeschön gilt insbesondere Veronika Hornich, die eine sehr große Hilfe im Labor war und von der ich viel lernen durfte. Außerdem möchte ich Nina Houben, als meine Nachfolgerin in diesem Projekt, danken für ihre freundliche Unterstützung und die intensiven wissenschaftlichen Diskussionen.

Außerdem möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern herzlich danken, die mich in allen Lebenssituationen unterstützt haben und ohne die ich nicht die Person hätte werden können, die ich heute bin.

Ein besonderer Dank geht an meine Frau Sandra, die mit mir durch dick und dünn gegangen ist und die letzten Jahre, die durchaus sehr nervenaufreibend waren, gemeinsam mit mir durchgestanden hat und mich immer motiviert hat.

Eidesstattliche Erklärung

nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation “ Die *microRNA*-26 Familie kontrolliert über den REST-Komplex ein für die Neurogenese essentielles regulatorisches RNA Netzwerk“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “The *microRNA*-26 family controls a regulatory RNA network via the REST-Komplex which is essential for neurogenesis” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Ort, Datum/
Place, Date

Unterschrift/
Signature