



**Die Rolle der nicht-kodierenden RNAs miR-26 und *Malat1*
bei der *in vitro* Differenzierung zu Neuronen**

**The role of the non-coding RNAs miR-26 and *Malat1*
during *in vitro* neuronal differentiation**

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

Vorgelegt von

Nina Was geb. Houben

geboren in

Düren, Deutschland

Würzburg, 2022

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: PD Dr. Matthias Becker

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Alsheimer

Gutachter: Prof. Dr. Utz Fischer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG	6
2 SUMMARY	8
3 EINLEITUNG	10
3.1 Embryonale Neurogenese	10
3.1.1 Genregulation während der Neurogenese	13
3.1.2 Signalwege der neuronalen Differenzierung	14
3.1.3 Regulation der neuronalen Genexpression durch den REST-Komplex	15
3.2 Nicht-kodierende RNAs	18
3.2.1 microRNAs	18
3.2.1.1 Posttranskriptionelle Regulation durch miRNAs	22
3.2.1.2 Funktionen von miRNAs in der Neurogenese	23
3.2.1.3 Die miR-26-Familie	25
3.2.1.4 Der REST-Komplex reguliert die Expression von miRNAs während er selbst durch miRNAs reguliert wird	26
3.2.2 lange nicht kodierende RNAs (lncRNAs)	27
3.2.2.1 Regulation der Genexpression durch lncRNAs	27
3.2.2.2 Die Funktion von lncRNAs in der Neurogenese	29
3.2.2.3 Die lncRNA Malat1	31
3.2.2.4 Die lncRNA Malat1 in der neuronalen Entwicklung	34
3.3 Ziel der Arbeit	35
4 MATERIAL UND METHODEN	36
4.1 Material	36
4.1.1 Zelllinien	36
4.1.2 Zellkulturmedien	36
4.1.3 Bakterien Stämme	38
4.1.4 Bakterienmedien	38
4.1.5 Puffer und Lösungen	39
4.1.6 Antikörper	39
4.1.7 DNA Oligonukleotide	40
4.1.7.1 DNA Oligonukleotide für Klonierungen von Luziferase-Reporter Assay-Plasmiden	40
4.1.7.2 DNA Oligonukleotide für die site directed Mutagenese	40
4.1.7.3 DNA Oligonukleotide zur Herstellung von single guide RNAs	41
4.1.7.4 Primer für die Genotypisierung von CRISPR/Cas9 knockout ES-Zelllinien	41
4.1.7.5 DNA-Oligonukleotide für die Analyse der CRISPR/Cas9 off-targets	41
4.1.7.6 Primer für die Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR	43
4.1.8 Primer zur Quantifizierung von microRNAs	44
4.1.9 Plasmide	44
4.1.10 Synthetische microRNAs (miR-Mimics)	44
4.1.11 Enzyme	45
4.1.12 Reagenzien	45
4.1.13 Kommerzielle Kits	45
4.1.14 Geräte	46
4.1.15 Software	46

4.2 Methoden	47
4.2.1 Zellkultur	47
4.2.1.1 Passagieren von Zellen	47
4.2.1.2 Auftauen und Kryokonservierung von Zellen	47
4.2.1.3 Beschichtung von Zellkulturplastik und Deckgläsern	47
4.2.1.4 Kultivierung von R1 ES-Zellen	48
4.2.1.5 Bestimmung der kumulativen Populationsverdopplung von ES-Zellen	48
4.2.1.6 Neuronale Differenzierung von ES-Zellen	48
4.2.1.7 Immunhistochemische Färbung von adhärennten Zellen	50
4.2.1.8 Transfektion	50
4.2.1.9 BrdU-Markierung	51
4.2.1.10 Nachweis der Seneszenz-assoziierten (SA) β -Galaktosidase Aktivität	51
4.2.2 Molekularbiologische Methoden	52
4.2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	52
4.2.2.2 Hitzeschocktransformation von kompetenten Bakterien	52
4.2.2.3 Isolation von Plasmid DNA im Mini-Präparationsformat	52
4.2.2.4 Isolation von Plasmid DNA im Maxi-Präparationsformat	53
4.2.2.5 Restriktionsverdau	53
4.2.2.6 Agarosegelelektrophorese	53
4.2.2.7 Oligonukleotid Annealing	53
4.2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten	54
4.2.2.9 Site directed mutagenesis	54
4.2.2.10 RNA Isolation	54
4.2.2.11 cDNA Synthese	55
4.2.2.12 Quantitative real-time-PCR zum Nachweis spezifischer Transkripte und microRNAs	55
4.2.2.13 Isolation genomischer DNA aus ES-Zellen	56
4.2.2.14 Endpunkt PCR zur Überprüfung der CRISPR/Cas9-vermittelten Deletionen	57
4.2.2.15 Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten	57
4.2.2.16 Western Blot	57
4.2.2.17 Kolonie-PCR	58
4.2.2.18 Luziferase-Reporter Assay	58
5 ERGEBNISSE	59
5.1 miR-26 reguliert die neuronale Genexpression durch direkte Interaktion mit Komponenten des REST-Komplexes	59
5.1.1 REST und CTDSP2 sind direkte Ziele der miR-26 Familie	59
5.1.2 Generierung von ES-Zellen mit Rest oder Ctdsp2 miR-26 Zielsequenz <i>Deletionen</i>	63
5.1.3 Einfluss der miR-26 Zielsequenz-Deletion in den 3'UTRs von <i>Rest</i> bzw. <i>Ctdsp2</i> auf die Genexpression von <i>Rest</i> / <i>Ctdsp</i>	67
5.1.4 Die Deletion der miR-26 Zielsequenz in <i>Rest</i> führt zu einer verminderten Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu Neuronen	69
5.1.5 Die Expression neuronaler miRNAs wird durch miR-26-vermittelte Rest-Regulation kontrolliert	71
5.2 Die Rolle von <i>Malat1</i> als potentieller Regulator der miR-26 während der Neurogenese	74
5.2.1 <i>Malat1</i> wird während der neuronalen Differenzierung hochreguliert	74
5.2.2 Deletion von <i>Malat1</i> im Genom embryonaler Stammzellen	75
5.2.3 Der Verlust von <i>Malat1</i> hat keinen Einfluss auf die Proliferation und den pluripotenten Status von ES-Zellen	78
5.2.4 Der KO von <i>Malat1</i> führt zu einer starken Beeinträchtigung der neuronalen Differenzierung	79
5.2.5 Erhöhte Expression von Zellzyklusinhibitoren und verminderte Proliferation neuronaler Vorläuferzellen in <i>Malat1</i> KO-Kulturen	81
5.2.6 Der Verlust von <i>Malat1</i> führt zu erhöhter Expression der miR-26 und der miR-26 Wirtsgene	84
5.2.7 Einfluss von miR-26 auf die Expression von Zellzyklusinhibitoren in Wt- und <i>Malat1</i> KO-Kulturen	87
5.2.8 Deletion von <i>Malat1</i> in miR-26 <i>knockout</i> ES-Zellen	88

5.2.9 Die Expression von Zellzyklusinhibitoren in differenzierenden <i>Malat1</i> /miR-26 KO-Kulturen ist gegenüber differenzierenden <i>Malat1</i> KO-Kulturen reduziert	91
5.2.10 Der gleichzeitige Verlust von miR-26 und <i>Malat1</i> bringt die Proliferationsrate neuronaler Vorläuferzellen zurück auf Wt Niveau	92
5.2.11 Der Verlust von <i>Malat1</i> führt zu erhöhter Expression seneszenz-assoziiierter miRNAs der neuronalen <i>in vitro</i> Differenzierung	98
5.2.12 Der gleichzeitige Verlust von miR-26 und <i>Malat1</i> führt zu einer beschleunigten neuronalen Differenzierung	99
5.2.13 Der Verlust von <i>Malat1</i> hat keinen Einfluss auf die Expression von <i>Rest</i>	104
6 DISKUSSION	106
6.1 <i>Rest</i> und <i>Ctdsp2</i> werden direkt durch miR-26 reguliert	107
6.2 Regulation von <i>Rest</i> durch miR-26 ist essentiell für die neuronale Differenzierung	109
6.3 Der Verlust von <i>Malat1</i> beeinträchtigt die neuronale Differenzierung	111
6.4 <i>Malat1</i> ist nicht direkt an der Prozessierung der miR-26 beteiligt	112
6.5 <i>Malat1</i> und miR-26 haben gegenteilige Effekte auf die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen	113
6.6 Seneszenz, die Rolle von <i>Malat1</i> und miRNAs	114
6.7 Auswirkungen des Verlustes von <i>Malat1</i> auf die neuronale Differenzierung	115
7 APPENDIX	117
8 LITERATURVERZEICHNIS	119
9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	138
10 TABELLENVERZEICHNIS	139
11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	140
12 PUBLIKATIONEN	145
13 DANKSAGUNGEN	146
14 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	147

1 Zusammenfassung

Während der embryonalen Neurogenese spielt die Repression neuraler Gene in nicht neuronalen Zellen, sowie in neuronalen Vorläuferzellen durch den REST (*repressor element silencing transcription factor*)-Komplex eine wichtige Rolle. Durch die schrittweise Inaktivierung dieses Komplexes im Verlauf der Differenzierung werden neurale Genexpressionsprogramme gesteuert. Zusätzlich kommt bei der Kontrolle der räumlichen und zeitlichen Regulation der Genexpression während der Neurogenese verschiedenen miRNAs eine wichtige Rolle zu. So konnte in vorangegangenen Arbeiten im Zebrafischen gezeigt werden, dass miR-26b die Transkription eines wichtigen Effektorproteins des REST-Komplexes, CTDSP2 (*C-terminal domain small phosphatases*), während der Neurogenese negativ reguliert. Da darüber hinaus die miR-26 Repression zu einer stark verminderten neuronalen Differenzierung führte, kommt diesem regulatorischen Schaltkreis eine zentrale Rolle bei der Neurogenese im Zebrafisch zu. Die zusammen mit ihren *Ctdsp*-Wirtsgenen koexprimierte miR-26 Familie liegt in Vertebraten evolutionär hoch konserviert vor. Analog zum Zebrafisch konnte im murinen *in vitro* ES-Zell Differenzierungssystem gezeigt werden, dass miR-26 die Expression von *Ctdsp2* reprimiert. Weiterhin konnte in diesem System gezeigt werden, dass auch *Rest* ein miR-26 Zielgen ist und dass der Verlust der miR-26 zu einem Arrest der differenzierenden Zellen im neuronalen Vorläuferstadium führt. Zusammengenommen deuten diese vorangegangenen Arbeiten auf eine zentrale Rolle der miR-26 während der Neurogenese hin.

Die hier vorgestellte Arbeit zielte zunächst darauf ab die Regulation des REST-Komplexes durch die miR-26 auf molekularer Ebene besser zu verstehen. Der Verlust der miR-26 Bindestelle in der *Ctdsp2* mRNA führte zu einer erhöhten *Ctdsp2* Expression, beeinflusste aber nicht die terminale Differenzierung zu Neuronen. Im Gegensatz hierzu führte der Verlust der miR-26 Bindestelle in der *Rest* mRNA zu einem Arrest der Differenzierung im neuronalen Vorläuferzellstadium. Zellen in denen die miR-26 Bindestelle in *Rest* deletiert war, zeigten zudem, genau wie miR-26 knockout (KO) Zellen, eine erhöhte Expression von REST-Komplex Komponenten, sowie eine verringerte Expression von REST-regulierten miRNAs. Zusammengenommen weisen diese Daten daraufhin, dass während der Neurogenese im Säugersystem die Inaktivierung von *Rest* durch miR-26 für die Maturierung von Neuronen eine zentrale Rolle spielt.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag auf der Regulation der miR-26 Expression während der Neurogenese. Vorangegangene Arbeiten in nicht-neuronalen Zelltypen identifizierten die lnc (*long-non-coding*) RNA *Malat1* als eine ce (*competitive endogenous*) RNA der miR-26. Um

den Einfluss von *Malat1* auf die miR-26 Expression während der Neurogenese zu untersuchen, wurde zunächst mittels CRISPR/Cas9 der vollständige *Malat1*-Lokus in ESCs deletiert. Der Verlust von *Malat1* führte zu einer erhöhten Expression der miR-26 Familienmitglieder sowie deren *Ctdsp*-Wirtsgene. Weiterhin war die Proliferation von *Malat1* KO neuronalen Vorläuferzellen stark vermindert, was mit einer Erhöhung der Frequenz seneszenten Zellen einherging. Durch die Inaktivierung von miR-26 in differenzierenden *Malat1* KO ESCs konnte dieser proliferative Phänotyp aufgehoben werden. Darüber hinaus konnte eine verstärkte neuronale Differenzierung dieser Zellen beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass neben der Regulation des REST-Komplexes durch miR-26 auch die Kontrolle des Zellzyklus über die *Malat1*-vermittelte Regulation der miR-26 in neuronalen Vorläuferzellen einen kritischen Schritt bei der Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu maturen Neuronen darstellt.

2 Summary

During embryonic neurogenesis, repression of neural genes in non-neural cells, as well as in neural progenitor cells by the REST (*repressor element silencing transcription factor*) complex, plays an important role. The gradual inactivation of this complex during differentiation controls neural gene expression programs. In addition, different miRNAs play important roles in controlling the spatial and temporal regulation of gene expression during neurogenesis. For example, previous work in zebrafish demonstrated that miR-26b negatively regulates the transcription of a key effector protein of the REST complex, CTDSP2 (*C-terminal domain small phosphatases*), during neurogenesis. Since miR-26 repression also resulted in severely reduced neuronal differentiation, this regulatory circuit plays a central role in zebrafish neurogenesis.

The miR-26 family, co-expressed with its *Ctdsp* host genes, is evolutionarily highly conserved in vertebrates. Analogous to zebrafish, miR-26 was shown to repress *Ctdsp2* expression in a murine *in vitro* ESC differentiation system. Furthermore, in this system, it was shown that *Rest* is also a miR-26 target and that loss of miR-26 leads to arrest of differentiating cells at the neuronal progenitor stage. Taken together, these previous analyses suggest a central role for miR-26 during neurogenesis.

The work presented here first aimed to better understand the regulation of the REST complex by miR-26 at the molecular level. Loss of the miR-26 binding site in *Ctdsp2* mRNA increased *Ctdsp2* expression but did not affect terminal differentiation into neurons. In contrast, loss of the miR-26 binding site in the *Rest* mRNA resulted in arrest of differentiation at the neural progenitor cell stage. Cells in which the miR-26 binding site was deleted in *Rest* also showed increased expression of REST complex components, as well as decreased expression of REST-regulated miRNAs, just like miR-26 knockout (KO) cells. Taken together, these data indicate that during mammalian neurogenesis, inactivation of REST by miR-26 plays a central role in the maturation of mammalian neurons.

Another focus of this work was on the regulation of miR-26 expression during neurogenesis. Previous analyses in non-neuronal cell types identified the lnc(long-non-coding)RNA *Malat1* as a ce(competitive endogenous)RNA of miR-26. To investigate the effect of *Malat1* on miR-26 expression during neurogenesis, the complete *Malat1* locus was deleted in ESCs using CRISPR/Cas9. Loss of *Malat1* resulted in increased expression of miR-26 family members as well as their *Ctdsp* host genes. Furthermore, proliferation of *Malat1* KO neural progenitor cells was greatly reduced, which was accompanied by an increase in the frequency of senescent cells.

Inactivation of miR-26 in differentiating Malat1 KO ESCs abrogated this proliferative phenotype. In addition, increased neuronal differentiation of these cells was observed.

In conclusion, these data demonstrate that in addition to regulation of the REST complex by miR-26, cell cycle control via *Malat1*-mediated regulation of miR-26 in neuronal progenitor cells is a critical step for the differentiation of neuronal progenitor cells into mature neurons.

3 Einleitung

3.1 Embryonale Neurogenese

Die Entwicklung von Vertebraten beginnt mit der Befruchtung einer Eizelle durch ein Spermium. Dabei bildet sich die Zygote. Die Zygote hat das Potential alle Zelltypen zu bilden, aus denen der ausgewachsene Organismus besteht. Während der weiteren Embryonalentwicklung entsteht im Blastozystenstadium die innere Zellmasse (*inner cell mass*, ICM) aus der die Zellen der drei Keimblätter (Ekto-, Ento- und Mesoderm) sowie die Gameten hervorgehen. Aus dem die Blastozyste umschließenden Throphoektoderm entsteht extraembryonales Gewebe, das unter anderem den embryonalen Teil der Plazenta bildet [1]. Die Zellen der ICM können isoliert und *in vitro* kultiviert werden. Diese Zellen werden als embryonale Stammzellen (ES-Zellen) bezeichnet. Abbildung 1 zeigt, dass ES-Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung haben sowie das Potential besitzen Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Entoderm und Mesoderm) sowie Keimbahnzellen zu bilden [2]. Aufgrund dieser Fähigkeiten werden ES-Zellen als pluripotent bezeichnet. Aus den Zellen des Entoderms bilden sich die Lunge und andere innere Organe. Aus den Zellen des Mesoderms bilden sich Muskeln, das Skelettsystem sowie das Blutssystem und aus den Zellen des Ektoderms bilden sich neben dem zentralen Nervensystem (ZNS) unter anderem auch Haut- und Pigmentzellen.

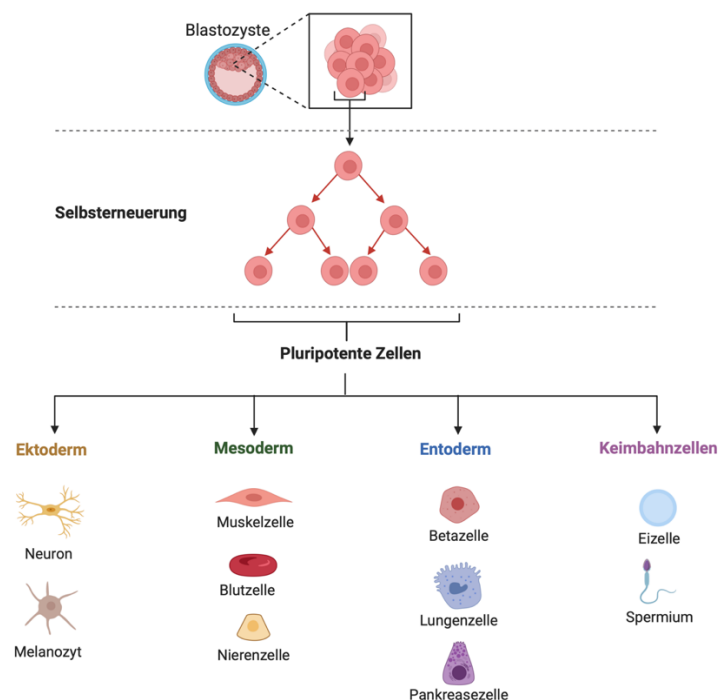


Abbildung 1 Embryonale Stammzellen sind pluripotent

ES-Zellen entstammen der inneren Zellmasse einer Blastozyste. Sie haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können zu ektodermalen, mesodermalen, entodermalen sowie Keimbahnzellen differenzieren.

Während der Bildung der drei Keimblätter im Embryo wird die neuronale Differenzierung des Ektoderms durch Signale des axialen Mesoderms (Notochord) induziert. Dabei formieren die neuroektodermalen Zellen die Neuralplatte, aus der sich in einem als Neurulation bezeichneten Prozess das Gehirn und das Rückenmark bilden [3]. Dieser Prozess der Neurulation ist in Vertebraten hochkonserviert und markiert den Beginn der Bildung des ZNS. Während der Neurulation kommt es zu einer Einstülpung der Neuralplatte, wodurch das Neuralrohr entsteht. Die neuroektodermalen Zellen, welche bei der Formierung des Neuralrohrs aufeinandertreffen, schnüren das Neuralrohr ab und bilden die unter der Epidermis liegende Neuralleiste [4]. Nach der vollständigen Schließung des Neuralrohrs beginnt die Bildung des Gehirns und des Rückenmarks. Die Zellen der Neuralleiste bilden periphere Neurone und Gliazellen sowie eine große Anzahl weiterer Zelltypen [5]. Der Ablauf der Neurulation ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

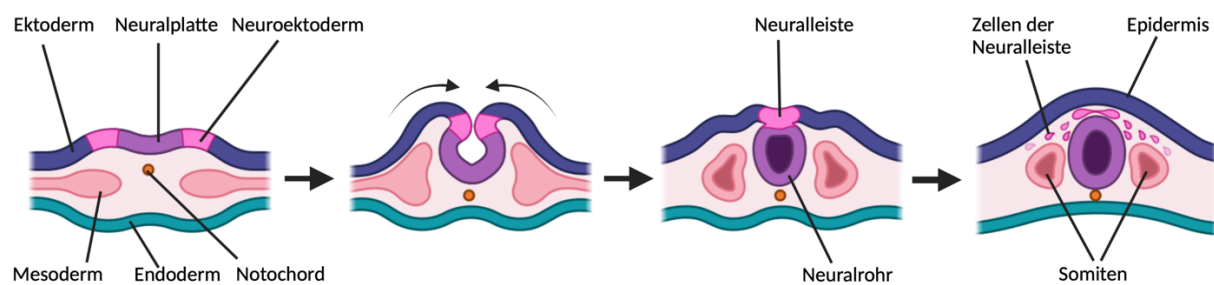


Abbildung 2 Neurulation in Vertebraten

Schematische Darstellung des Ablaufes der Neurulation. Die Neuralplatte bildet sich aus dem Ektoderm und stülpt sich durch Signale des Notochords entlang der dorsalen Achse ein. Die Zellen des Neuroektoderms verschmelzen miteinander, wobei es zur Abschnürung und vollständigen Bildung des Neuralrohrs kommt. Die Zellen der Neuralleiste verteilen sich und bilden später das periphere Nervensystem, während sich aus dem Neuralrohr Gehirn und das Rückenmark entwickeln. Die verbliebenen ektodermalen Zellen bilden im Anschluss die Epidermis aus.

Das zentrale Nervensystem besteht aus Neuronen, die für die Informationsweiterleitung mittels elektrischer Impulse zuständig sind, sowie aus Astrozyten und aus Oligodendrozyten (im folgendem zusammengefasst zu Gliazellen). Astrozyten sind für die Versorgung der Neurone mit Nährstoffen zuständig, indem sie Kontakt zu den Blutgefäßen herstellen. Oligodendrozyten sorgen durch die Ausbildung einer Myelinscheide für eine schnellere Weiterleitung axonaler Signale. Mit dem Beginn der Neurogenese im Neuralrohr verlieren die neuroepithelialen Zellen auf molekularer Ebene einige ihrer epithelialen Eigenschaften (z.B. *Tight Junctions*) und es bilden sich neurogene Vorläuferzellen, die als radiale Gliazellen (RGCs) bezeichnet werden [6]. Aus RGCs entstehen wiederum determinierte Vorläuferzellen (*intermediate progenitors*). Diese sind in ihrem Differenzierungspotential soweit eingeschränkt, dass sie sich nicht mehr

selbst erneuern können und entweder den Ursprung zweier Neurone oder zweier Gliazellen bilden. Die Abläufe der frühen Neurogenese sind in Abbildung 3A schematisch zusammengefasst. Sowohl neuroepitheliale Zellen als auch RGCs expandieren zunächst durch symmetrische Zellteilung. Während des Einsetzens der Neurogenese kommt es neben der symmetrischen Teilung, die dem Erhalt der RGC-Population dient, auch zur asymmetrischen Zellteilung. Dabei entstehen aus einer sich teilenden Zelle zwei unterschiedliche Tochterzellen. Die Kontrolle zwischen symmetrischer und asymmetrischer Zellteilung von neuroepithelialen Zellen und RGCs hängt von extrinsischen und intrinsischen Faktoren ab, und sie ist von zentraler Bedeutung für die Entwicklung des ZNS [7] (Abb. 3B).

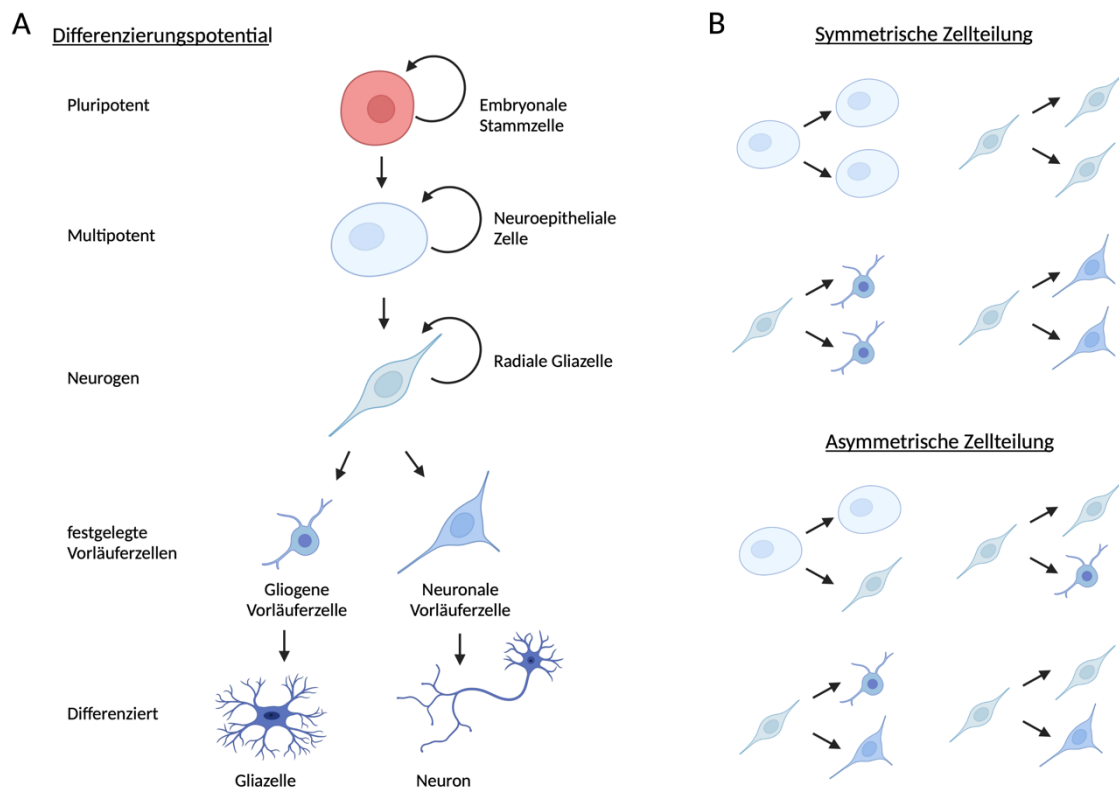


Abbildung 3 Differenzierungsschritte während der embryonalen Neurogenese

A) Ablauf der Differenzierungsschritte und der unterschiedlichen Zelltypen, die sich während der embryonalen Neurogenese entwickeln. B) Schematische Darstellung der Symmetrischen (Oben) und Asymmetrischen (Unten) Zellteilung von neuroepithelialen Zellen und radialen Gliazellen während der Neurogenese.

3.1.1 Genregulation während der Neurogenese

Die Regulation der Genexpression durch proneuronale Transkriptionsfaktoren (TF) spielt während der embryonalen Neurogenese eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und regionalen Strukturierung des ZNS. Ein für die regionale Strukturierung entscheidender TF ist Pax6. Dieser wird unter anderem im Prosencephalon, in der Retina sowie im Metencephalon exprimiert [8]. Außerdem fördert Pax6 die Proliferation von RGCs [9] und die Expression neuronaler Gene wie Neurog2, Hes1 und Ascl1 [10]. Der TF Neurog2 spielt eine essentielle Rolle bei der Entwicklung des Gyrus dentatus, einer Struktur im Hippocampus. Der Verlust von Neurog2 in Mäusen führt zu veränderter Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen in diesem Gehirnbereich [11]. Einige Mitglieder der Gruppe der bHLH (*basic helix-loop-helix*) TFs spielen eine wichtige Rolle während der neuronalen Entwicklung. Die Familienmitglieder der *Hes* Gene gehören zu dieser Gruppe. Ihre Inaktivierung führt zu einer Hochregulation proneuronaler Gene, einer beschleunigten Differenzierung und Defekten in verschiedenen Bereichen des Gehirns [12-14]. Ein weiteres Mitglied der bHLH TFs ist Ascl1. Dieser TF kontrolliert die Proliferation und Spezifikation von neuronalen Vorläuferzellen sowie die Differenzierung und das Neuritenwachstum [15]. Neben der Kontrolle der Neurogenese durch die Expression von Transkriptionsfaktoren, spielt auch die Kontrolle der Genexpression durch epigenetische Modifikationen eine wichtige Rolle. In frühen neuronalen Vorläuferzellen kann eine erhöhte Expression von epigenetischen Regulatoren wie den HMG (*high mobility group*) Proteinen [16] oder der Methyltransferase EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) [17] beobachtet werden. In späteren Stadien neuronaler Vorläuferzellen kommt es zu einer globalen Kondensation des Chromatins, die eine Voraussetzung für die vermehrte Produktion von Gliazellen in der späteren Neurogenese darstellt [18, 19]. Ein weiterer essentieller Repressionskomplex, der sowohl als transkriptioneller als auch als epigenetischer Regulator Einfluss auf die Genexpression während der Neurogenese nimmt, ist der REST-Komplex. Auf den Aufbau und die Wirkungsweise des REST-Komplexes wird in Kapitel 3.1.3 genauer eingegangen.

3.1.2 Signalwege der neuronalen Differenzierung

Die Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung der Stammzellpopulationen des sich entwickelnden Nervensystems unterliegt strikter zeitlicher und räumlicher Kontrolle. Dies erfolgt über extrinsische Signale, die über die NOTCH-, WNT-, *sonic hedgehog*- (SHH) und *fibroblast growth factor*- (FGF) Signalwege in das Zellinnere geleitet werden und so neurale Genexpressionsprogramme induzieren.

Der NOTCH-Rezeptor und seine Liganden DELTA-like (*Dll1*) und JAGGED sind Transmembranproteine mit großen extrazellulären Domänen. Die Bindung eines NOTCH-Liganden einer benachbarten Zelle an den NOTCH-Rezeptor führt zum proteolytischem Verdau des NOTCH-Rezeptors. Die proteolytisch abgespaltene intrazelluläre Domäne transloziert dann in den Nukleus [20] und aktiviert die Transkription von Genen der *Hes*-Familie. Hohe *Hes*-Expressionslevel sind mit einer verringerten Expression der proneuralen Gene *Ascl1*, *Neurogenin1-3* und *Dll1* und einer Arretierung von Zellen im Stammzellstatus assoziiert [13]. Durch die Repression von *Dll1* können benachbarten Zellen über die extrazellulären NOTCH-Rezeptoren nicht mehr an ihre Liganden binden. Dies führt in diesen Zellen wiederum zu einer erhöhten Expression proneuraler Gene sowie *Dll1*. Durch diesen autoinhibitorischen Feedbackmechanismus kann über die Regulation des NOTCH-Signalwegs die Balance zwischen undifferenzierten und differenzierenden Zellen aufrecht erhalten werden [21].

Auch die Signalübertragung durch den WNT-Signalweg findet über transmembranrezeptorenvermittelte Signalweiterleitung statt. Nach Bindung der WNT Proteine an ihre Transmembranrezeptoren Frizzled/LRP5/LRP6 kommt es zur Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma und dessen Translokation in den Nukleus [22]. β -Catenin interagiert mit den Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie, wodurch die Genexpression verschiedener Zielgene reguliert wird. Während der frühen Neurogenese fördert der WNT-Signalweg die symmetrische Teilung von RGCs und verhindert eine zu frühe Bildung von neuronalen Vorläuferzellen [23]. Im späteren Verlauf der Neurogenese fördert der WNT-Signalweg hingegen die Bildung neuraler Vorläuferzellen und damit die neuronale Differenzierung durch Hochregulation von N-myc [24, 25]. Dabei wird über N-myc der NOTCH-Signalweg reprimiert [26]. Die genauen Funktionen des WNT-Signalwegs in verschiedenen Stadien der Neurogenese sind noch nicht geklärt, jedoch zeigen Mäuse, die eine stabile Form des β -Catenins in neuronalen Vorläuferzellen exprimieren, vergrößerte Gehirne [27]. Dies lässt darauf

schließen, dass auch der WNT-Signalweg eine entscheidende Rolle für die Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung während der Neurogenese spielt.

Die Signalweiterleitung des SHH-Signalwegs erfolgt über die Bindung von SHH, Indian-Hedgehog (Ihh) oder Desert-Hedgehog (Dhh) an den *Patched*-Rezeptor, wodurch es zur Derepression des G-Protein gekoppelten Rezeptors SMO kommt. Das aktivierte SMO Protein dient als Transkriptionsaktivator. In der Abwesenheit von SHH wirkt GLI als transkriptioneller Repressor. Die GLI-vermittelte Regulation der Genexpression durch SHH ist essentiell für die dorso-ventrale Strukturierung des ZNS [28], die Kontrolle des Zellzyklus der RGCs [29] sowie für die Bildung von neuronalen Vorläuferzellen [30].

Die Familie der FGF-Proteine besteht aus 22 Familienmitgliedern, von denen 18 als Liganden an die 4 Transmembran-Tyrosinkinase-Rezeptoren FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 binden können. Im Anschluss an die Bindung erfolgt die Modulation der Genexpression über den RAS/MAPK-, den PI₃K/AKT- sowie über den PLC_γ-Signalweg [31]. Während der embryonalen Neurogenese kommt es zur transkriptionellen Hochregulation von HES1 und infolge dessen zur symmetrischen Zellteilung von RGCs [31]. Außerdem spielt die Signalweiterleitung über die FGF-Rezeptoren eine wichtige Rolle für die Selbsterneuerung und Differenzierung von neuronalen Stammzellen [32].

3.1.3 Regulation der neuronalen Genexpression durch den REST-Komplex

Die vorhergehenden Kapitel unterstreichen die Bedeutung des Zusammenspiels verschiedener Faktoren bei der Kontrolle der Genexpression während der Bildung des ZNS. Ein weiterer Faktor, der eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Expression neuronaler Gene spielt, ist der *RE1 Silencing Transcription factor* (REST)-Komplex. Die Kernkomponente dieses Komplexes ist das DNA-bindende Protein REST, das auch *Neuron Restrictiv Silencer Factor* (NRSF) genannt wird. Das REST Protein kann durch 8 N-terminale Zinkfingerproteine mit der DNA interagieren sowie durch Interaktionsdomänen am N- und C-Terminus weitere Kofaktoren an die DNA rekrutieren [33]. Die 21-23 bp lange Bindestelle für REST in der DNA wird als *repressor element 1* (RE1) Sequenz bezeichnet (NNCAGCACCNNGCACAGNNNC) [34, 35]. Bruce *et al.* konnten bei genom-weiten Analysen 1892 RE1 Sequenzen im humanen Genom und 1894 RE1- Sequenzen im Mausgenom identifizieren [36]. Jedoch konnten weitere Studien zeigen, dass ein Drittel der im humanen Genom identifizierten RE1 Sequenzen evolutionär nur zwischen Menschen und Primaten konserviert sind. Dies deutet auf eine starke positive

Selektion von REST Zielsequenzen während der Evolution hin [37]. Bindet REST an die RE-1 Sequenz, kommt es zur Rekrutierung weiterer Faktoren, die zusammen den Transkriptions-reprimierenden REST-Komplex bilden. CoREST bindet als Korepressor die C-terminale Domäne von REST [38]. Die Bindung von CoREST ermöglicht die Bindung weiterer Faktoren an den Komplex. Dazu gehören die Histon-Deacetylase 1/2 (HDAC1/2) [39], die Histon-Demethylase LSD1[40], die Chromatin remodelierende ATPase BRG1[41], das *methyl-CpG-binding protein 2* (MECP2) [39] sowie die Histon-Methyltransferase G9A [42]. An der N-terminalen Domäne von REST bindet SIN3A [43] und weitere Faktoren. Durch SIN3A wird ebenfalls HDAC1/2 rekrutiert [44]. Außerdem interagieren die Histon-bindenden Proteine RBBP4/7 mit SIN3A [45]. Diese durch CoREST und SIN3A assoziierten Faktoren tragen zu einer Deacetylierung und gleichzeitiger Methylierung der umgebenden Histone und somit zur transkriptionellen Inhibition bei [46].

Neben der transkriptionellen Inhibition durch Chromatin-modifizierende Faktoren vermittelt der REST-Komplex auch die direkte Inhibition der Transkriptionsmaschinerie über die Modifikation der RNA Polymerase II (Pol II). In diesem Kontext spielen Proteine aus der Familie der *c-terminal domain small phosphatases* (CTDSPs) eine wichtige Rolle [47]. REST-gebundene CTDSPs können durch Dephosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA Pol II die Transkription direkt inhibieren [48]. Abbildung 4 zeigt schematisch den Aufbau des REST-Komplexes und dessen Wirkung auf die neuronale Genexpression.

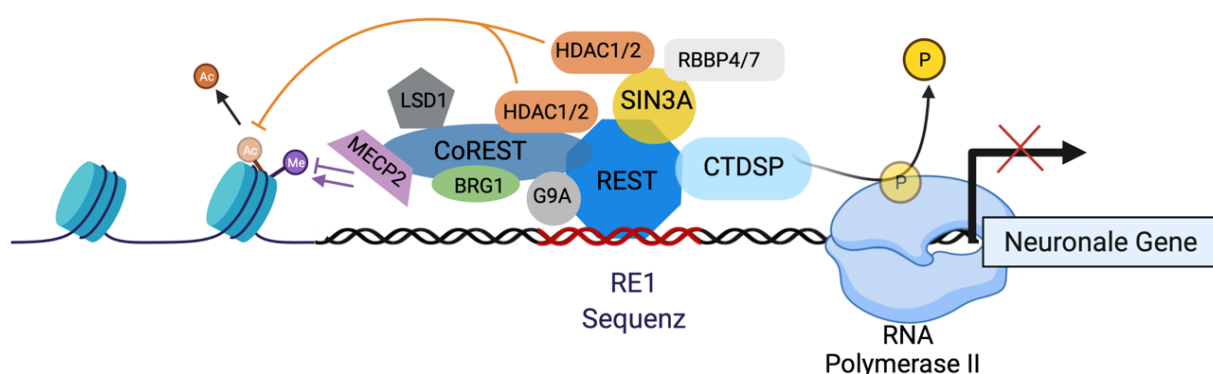


Abbildung 4 Der REST-Komplex verhindert die Expression neuronaler Gene

Aufbau und Wirkweise des REST-Komplexes auf neuronale Gene. Der REST-Komplex besteht aus dem Hauptfaktor REST und seinen Komplexpartnern. Durch die Bindung von REST an die RE1 Sequenz beeinflusst der Komplex das umliegende Chromatin. Durch die Modifikation von Histonen und Änderungen der Chromatin Konformation kommt es zur epigenetischen Hemmung der Genexpression (links). Außerdem inhibiert der Kofaktor CTDSP die Transkription durch Dephosphorylierung der RNA Polymerase II direkt (rechts).

Die *in silico* Analysen der Zielgene, die eine RE1-Sequenz in ihren regulatorischen Bereichen enthalten, zeigten, dass 40% der vorhergesagten Zielgene im ZNS exprimiert werden [36]. REST wird in nicht-neuronalen Zelltypen exprimiert und unterdrückt dort die Expression neuronaler Gene. Der Verlust von REST in Mäusen führt zur einer 100%igen Letalitätsrate am embryonalen Tag E11,5. Bei genauerer Betrachtung dieser Embryos konnte die Expression von neuronalen Genen in nicht-neuronalem Gewebe beobachtet werden [49]. REST ist in ES-Zellen sehr hoch exprimiert. Der Verlust von REST führt allerdings nicht zu einem Verlust der Pluripotenz oder der Selbsterneuerung von ES-Zellen [50]. Während der embryonalen als auch der adulten Neurogenese ermöglicht die Inaktivierung von REST die Expression neuronaler Gene [51, 52].

Die Initiierung des neuronalen Genexpressionsprogramms kann durch Inaktivierung von REST auf mehreren Ebenen stattfinden. Die Serin/Threonin Kinase Casein Kinase-1 (CK1) phosphoryliert REST am C-Terminus und initiiert so den Abbau von REST über Ubiquitinierung [53]. Auch die Phosphorylierung der C-Terminalen Domäne von REST durch ERK1/2 führt zum proteasomalen Abbau von REST [54]. Zudem konnte in Studien zur Autophagie bei Alzheimer Erkrankungen eine Translokation von REST ins Zytoplasma und anschließend in Autophagosome beobachtet werden [55]. Ob dies auch während der embryonalen Neurogenese geschieht, wurde noch nicht untersucht. Inzwischen konnte auch die posttranskriptionelle Regulation von REST über kleine nicht-kodierende RNAs in verschiedenen Studien belegt werden. Darauf wird in Kapitel 3.2.1.4 genauer eingegangen.

3.2 Nicht-kodierende RNAs

Neben der transkriptionellen Kontrolle der Genexpression durch verschiedene Chromatin-interagierende Faktoren kann die Genexpression auch auf posttranskriptioneller Ebene unterschiedlichen regulatorischen Mechanismen unterliegen. Diese Mechanismen werden häufig durch nicht-kodierende RNAs (ncRNAs) vermittelt. Als eine der Ersten ncRNAs wurde 1992 die in Menschen 17 kb lange *XIST* RNA beschrieben. *XIST* spielt eine Rolle bei der Inaktivierung des X-Chromosoms [56]. 1993 konnten Lee und Kollegen 22 und 61 Nukleotid (nt) lange RNA Transkripte in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) identifizieren welche durch eine antisense-Interaktion mit einer mRNA diese regulierten [57]. In der Folge wurden ncRNAs anhand ihrer Größe in *small* ncRNAs die kleiner als 200 nt sind und lange nicht kodierende RNAs (*long non coding RNAs*, lncRNAs) die größer als 200 nt sind unterteilt. Heute wird die Gruppe der *small* ncRNAs in drei Familien unterteilt: *Small interfering RNA* (siRNA), *microRNA* (miRNA) und *piwi RNA* (piRNA). Sie sind für native RNA Interferenzen (RNAi) verantwortlich. Dabei ist das Vorkommen der piRNAs jedoch auf keimbahn-spezifische Zellen limitiert [58].

3.2.1 microRNAs

miRNA sind kurze nicht-kodierende RNA Fragmente. Seit ihrer Entdeckung vor 20 Jahren konnten sowohl in Pflanzen als auch in Tieren tausende genomische DNA-Sequenzen identifiziert werden, die eine miRNA kodieren [59, 60]. Sie treten entweder als einzelne miRNA oder als Cluster hintereinander kodierter miRNAs auf [61]. In Säugetieren sind miRNAs hauptsächlich in intronischen Genregionen zu finden, sie können aber auch in exonischen Genbereichen kodiert sein [62]. Exonisch- oder intronisch-kodierte miRNAs werden meist zusammen mit dem Wirtsgen kotranskribiert [63]. Im Gegensatz dazu dominieren in *C. elegans* vor allem miRNAs, die unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehen [64] (siehe Abb. 5).

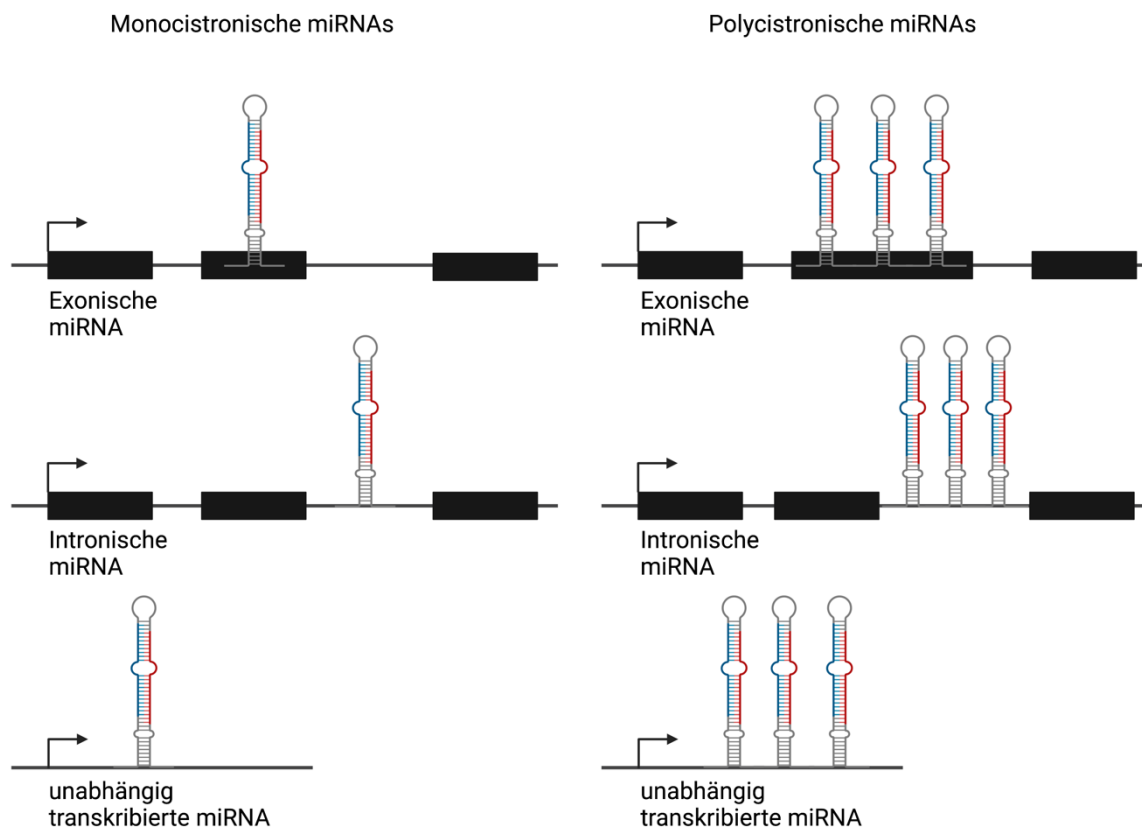


Abbildung 5 Genomische Organisation von miRNAs

miRNAs können alleine (monocistronisch) oder als Cluster mehrerer miRNAs (polycistronisch) in den Introns oder Exons eines Gens kodiert sein. Sie können aber auch unabhängig durch einen eigenen Promotor reguliert werden.

Das primäre Transkript einer miRNA (pri-miRNA) wird in den meisten Fällen durch Polymerase II transkribiert, am 5' Ende mit einer 7-Methylguanosisin-Cap versehen und am 3' Ende polyadenyliert [65, 66]. Die Größe einer pri-miRNA kann zwischen hundert und tausend Nukleotiden variieren [67, 68]. Nach der Transkription faltet sich die pri-miRNA in ihre charakteristische *hairpin structure* (Haarnadelstruktur) bestehend aus einer terminalen Schleife, einem 33-35 nt langen Stamm- und einzelsträngigen RNA-Segmenten am 3' und 5' Ende (siehe Abb. 6).

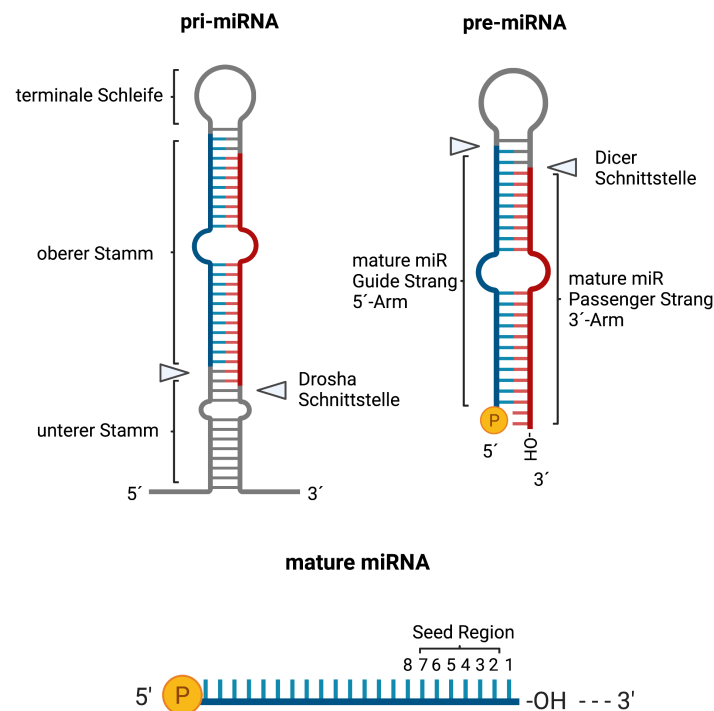


Abbildung 6 Aufbau von pri-, pre- und maturer miRNA

miRNAs werden in drei Stufen prozessiert. Die bei der Transkription entstehende pri-miRNA ist in das untere Stamm-Segment, das obere Stamm-Segment sowie die terminale Schleife eingeteilt. Zwischen dem unteren und dem oberen Stamm-Segment ist die DROSHA Schnittstelle lokalisiert. Nach der Prozessierung durch DROSHA an dieser Stelle entsteht die pre-miRNA. Diese ist durch einen 2 nt langen Überhang am 3' Ende charakterisiert. Die Abspaltung der terminalen Schleifenstruktur erfolgt durch DICER. Im Anschluss liegt eine miRNA Duplex vor, deren *Guide Strang* (hier in blau) als mature miRNA bezeichnet wird. Die *Seed Region*, die für die spezifische Erkennung von Ziel-mRNAs verantwortlich ist, liegt zwischen den Nucleotiden 2-7.

Der komplexe Mechanismus der miRNA-Prozessierung ist in Abbildung 7 gezeigt. Nach der Transkription der pri-miRNA bindet ein Enzymkomplex aus DROSHA und DGCR8 (*DiGeorge Syndrome critical Region 8*) am Stamm-Segment [69, 70]. Die katalytische Einheit dieses Mikroprozessorkomplexes ist die Ribonuklease (RNase) Typ III DROSHA [71]. Diese hat zwei RNase Domänen, welche das miRNA-Stamm-Segment mit ~11 nt Abstand von der basalen Verbindungsstelle entfernt schneiden [72]. DROSHA bildet mit zwei DGCR8 Proteinen einen heterotrimeren Komplex, bei dem DGCR8 an die RNase III Domäne des DROSHA Proteins bindet [73, 74]. Durch Bindung von DGCR8 an den apikalen Teil des Stamm-Segments wird der Mikroprozessorkomplex an die pri-miRNA gebunden, um eine korrekte und effiziente Prozessierung zu erlangen [75, 76]. Der Mikroprozessorkomplex ist essentiell für die Generierung der meisten miRNAs. Der Verlust von DGCR8 oder DROSHA in Mäusen führt zur embryonalen Letalität [77, 78]. Verlust einer Kopie des DGCR8 Gens auf dem humanen Chromosom 22 ist mit dem DiGeorge Syndrom assoziiert [79]. Im Mausmodell

konnte gezeigt werden, dass der monoallelische Verlust von DGCR8 zu einer veränderten Prozessierung spezifischer miRNAs und einer verminderten Anzahl kortikaler Neurone sowie Abweichungen kognitiver Funktionen führt [80, 81]. Die Prozessierung durch den Mikroprozessorkomplex resultiert in einer ~60 nt langen precursor (pre)-miRNA mit einem 2 nt langen Überhang am 3'Ende, der wichtig für den nächsten Schritt, den Export in das Zytoplasma, ist [82]. Dieser Export erfolgt nach Bindung der pre-miRNA an das nukleare Exportprotein XPO5 (Exportin5). XPO5 bindet bevorzugt pre-miRNAs an dem 2 nt langem 3' Überhang sowie dem doppelsträngigen Stamm-Segment [82]. GTP (Guanosintriphosphat) Hydrolyse am XPO5 Kofaktor Ran führt zur Freisetzung der pre-miRNA in das Zytoplasma [83]. XPO5 inaktivierende-Mutationen in verschiedenen humanen Tumoren führen aber nur zur Herabregulierung einiger miRNAs [84]. Auch die Deletion von XPO5 in humanen Zellen beeinflusst nicht den Export aller miRNAs [85]. Insgesamt weisen diese Befunde auf weitere Export-Mechanismen für pre-miRNAs hin. So konnte inzwischen auch XPO1 (Exportin1) als pre-miRNA Exportfaktor identifiziert werden [86]. Im Zytoplasma wird die pre-miRNA durch das RNase III Enzym DICER weiter prozessiert. Dabei schneiden die beiden C-terminalen RNase III Domänen von DICER die miRNA am 3' und 5' Ende nah an der terminalen Schleife und generieren dabei einen 21-23 nt langen RNA-Duplex [87, 88]. DICER wird für die Maturierung der meisten miRNAs benötigt [85]. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Mäuse, denen DICER fehlt, nicht überlebensfähig sind [89]. Ein wichtiger DICER-Kofaktor ist das *HIV-1 TAR RNA binding protein* (TRBP), welches DICER stabilisiert, die Größe der RNA-Duplex beeinflusst und für die Auswahl des *guide*-Strangs verantwortlich ist [90-92]. Während der Maturierung durch DICER wird der funktionelle *guide*-Strang der miRNA durch ein Mitglied der Argonaute-Familie (AGO) gebunden. Als *guide*-Strang wird der Strang ausgewählt, der eine geringere Stabilität am 5'Ende aufweist [93]. Außerdem ist dieser purinreich und weist ein 5'Uracil auf [94]. Der komplementäre *passenger*-Strang wird im weiteren Verlauf abgebaut. Neben AGO binden weitere Proteine, die zusammen den RISC (*RNA-induced silencing complex*)-Komplex bilden [95].

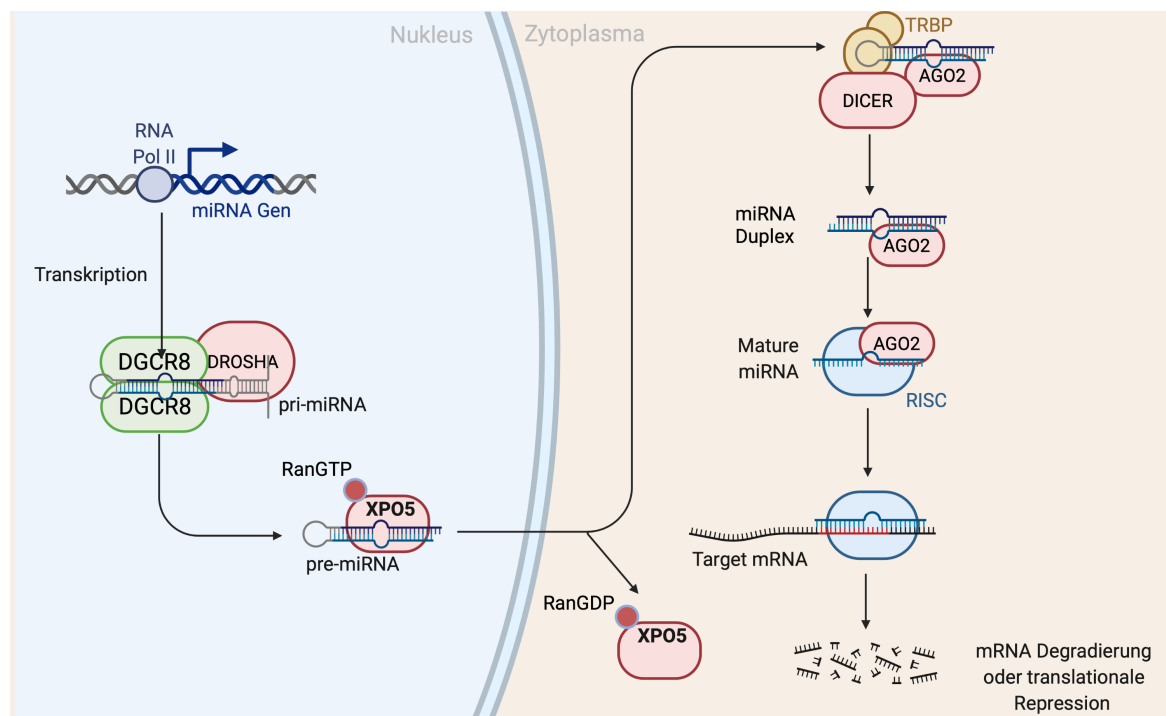


Abbildung 7 Biogenese von miRNAs

Bei der Transkription wird zunächst ein primäres miRNA-Transkript (pri-miRNA) hergestellt, das durch die Nukleasen DROSHA und DGCR8 zu einer etwa 65 nt langen Vorläufer miRNA (pre-miRNA) im Zellkern prozessiert wird. Die pre-miRNA wird durch den XPO5/Ran Komplex in das Zytoplasma exportiert. Hier kommt es zu einem weiteren Prozessierungsschritt durch DICER. Dabei entsteht eine miRNA Duplex, von der ein Strang im RISC-Komplex durch AGO gebunden ist. Der RISC-Komplex ist verantwortlich für die Degradierung oder die translationale Repression der Ziel-mRNA.

3.2.1.1 Posttranskriptionelle Regulation durch miRNAs

Nach der Bildung des RISC-Komplexes kann dieser an mRNAs im Zytosol binden. Die in AGO geladene miRNA ist dabei für die Erkennung von Zielsequenzen, die meist in den 3'-UTRs der mRNAs liegen [96, 97], über die Nucleotide 2-7 verantwortlich. Dieser für die Erkennung der Zielsequenz essentielle Teil der miRNA wird Seed-Region genannt. Bei der Bindung von AGO an die miRNA wird diese so positioniert, dass sie in einer Konformation vorliegt, die die Bindung an Zielsequenzen erleichtert. Spezifische miRNA Bindungen werden initial von AGO über die Komplementarität von Nucleotid 2-4 identifiziert. Bei Komplementarität dieses Bereiches kommt es dann zu einer stabilen Bindung an die mRNA mittels Nucleotid 2-8 [98]. miRNAs können als 6mer, 7mer oder 8mer an ihre Zielsequenz binden. Diese Einteilung wird wie folgt klassifiziert: als 6mer kommt es zur exklusiven Bindung in der Seed Region von Nucleotid 2-7, als 7mer kommt es zur Bindung entweder von Nucleotid 2-8 (7mer-m8) oder durch ein A an Position 1 der Zielsequenz von den Nucleotiden 1-7 (7mer-A1) und als 8mer zur Bindung an den Nucleotiden 1-8 [99]. Jedoch ist nicht alleine die Komplementarität in der

Seed Region für eine stabile Interaktion zwischen miRNA und mRNA relevant, sondern auch Sequenzen die sich 3' und 5' der Seed Region befinden [100]. Um die Ziel-mRNA zu regulieren, werden weitere Faktoren benötigt. Dazu binden GW182 Proteine direkt an AGO und rekrutieren weitere Faktoren, die zur translationalen Inhibition bzw. zum Abbau der mRNA führen [95]. Zu diesen Faktoren gehören die mRNA-Deadenylierungskomplexe PAN2/PAN3 [101] sowie CCR4/NOT1/CAF1 [102], die durch ihre Exonukleaseaktivität zum Abbau des Poly-A-Tails führen. Diese sind aber nicht direkt an AGO gebunden, sondern an das Poly-A-bindende PABPC Protein [103]. GW182 konkurriert mit eIF4G (*eukaryotic initiation factor 4G*) um die Bindung zu PABPC, wodurch die Translationseffizienz verringert wird [104]. Nach der Deadenylierung wird die 5'-Cap durch das *decapping protein 2* (DCP2) entfernt und es kommt zum 5'-3' Exonuklease-vermitteltem Abbau der mRNA durch XRN1 (*Xenopus nodal related-1*) [105].

3.2.1.2 Funktionen von miRNAs in der Neurogenese

Sowohl für die embryonale als auch für die adulte Neurogenese ist die Regulation der Genexpression durch miRNAs unverzichtbar. Dass miRNAs eine essentielle Bedeutung in der Neurogenese zukommt, konnte schon 2008 in einem Maussystem gezeigt werden, bei dem in NSCs des Telencephalons *Dicer* konditionell deletiert wurde. Dies führte zu einer Beeinträchtigung der Differenzierung und zu neuronaler Apoptose [106]. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *Dicer* zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung zu verschiedenen Phänotypen wie z.B. einer reduzierten Vorläuferzell-Frequenz, einem verändertem Migrationsverhalten von Vorläuferzellen im Cortex oder zu einer dünneren Großhirnrinde führte [107]. Zusammengenommen deuten diese Daten sowohl auf eine zeitliche als auch auf eine zelltypspezifische Regulation der Genexpression durch miRNAs während der Neurogenese hin. Darüber hinaus untermauern Studien, bei denen eine globale Deletion von miRNAs durch Mutation oder Deletion von *Ago2* oder *Dicer* erreicht wurde, die Bedeutung von miRNAs in der Neurogenese [108-110].

Die zuvor genannten Studien bilden einen Verlust der globalen miRNA Regulation ab. Zudem wurde inzwischen in vielen Studien die Bedeutung spezifischer miRNAs für die Neurogenese untersucht. Abbildung 8 zeigt wie individuelle miRNAs die Neurogenese in verschiedenen Stadien beeinflussen können. So verringert die Überexpression von miR-9 die Proliferation von NSCs und induziert die Differenzierung [110] durch die Regulierung mehrerer

Transkriptionsfaktoren [111]. miR-92b limitiert die Anzahl von intermediären kortikalen Vorläuferzellen [112]. Der miRNA Cluster miR-106-25 (miR-106, miR-93 und miR-25) reguliert die Proliferation von adulten neuronalen Stammzellen und Vorläuferzellen [113]. Die miR-137 reguliert in adulten NSCs die Proliferation und die Expression der Histon-Methyltransferase EZH2 [114]. Außerdem reguliert sie die Maturierung von Neuronen durch Bindung an die Ubiquitin Ligase MIB1 (*mind bomb-1*) [115]. miR-184 fördert die Proliferation aber inhibiert die Differenzierung von adulten NSCs durch Regulation von Numbl-like [116]. Der miR-379-410 Cluster enthält 38 verschiedene miRNAs, die die Neurogenese auf unterschiedlichen Ebenen regulieren [117]. Die miRNA let-7b reguliert die Selbsterneuerungskapazität von NSCs in fötalen und juvenilen Mäusen durch die Regulation der p16^{INK4A} und p19^{ARF} über HMGA2 [118]. Über PCMI reguliert die miR-128 die Proliferation und die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen im sich entwickelnden Cortex [119]. Für die terminale Differenzierung von olfaktorischen Neuronen sind die miRNAs der miR-200 Familie essentiell [120]. Untersuchungen im Hippocampus von Mäusen konnten weiterhin zeigen, dass die zeitlich und örtlich beschränkte Expression von miR-132 für die Integration von neu entstanden Neuronen entscheidend ist [121].

Da viele miRNAs temporal und lokal unterschiedliche Expressionmuster aufweisen kommt es hier zu hoch komplexen regulatorischen Einflüssen auf die Genexpression. Der Einfluss von miRNAs auf die Neurogenese konnte noch nicht vollständig aufgeschlüsselt werden. Die hier aufgeführten Beispiele zeigen nur einen kleinen Ausschnitt der bisher verstandenen Regulation.

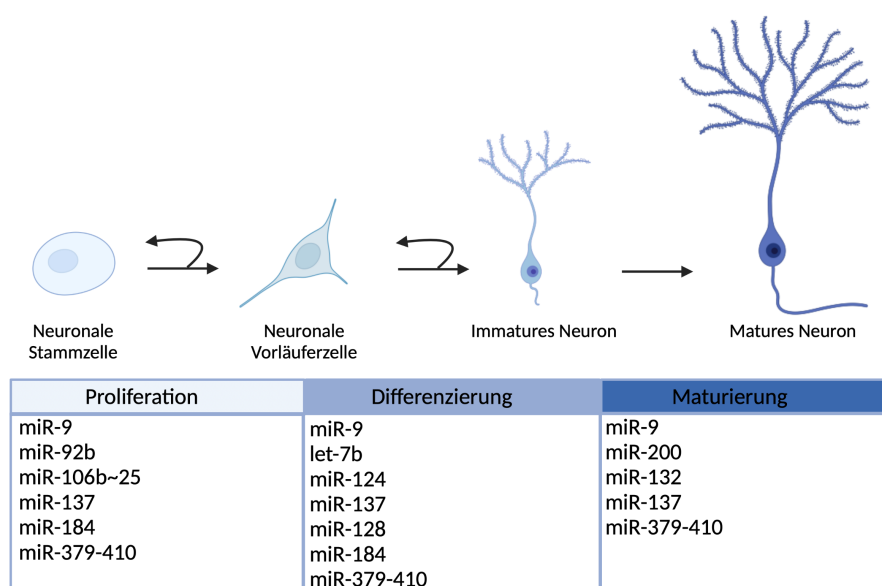


Abbildung 8 Regulation der Neurogenese durch miRNAs

Neuronale Stammzellen können sich selbst erneuern oder zu neuronalen Vorläuferzellen differenzieren. Aus diesen entstehen im ersten Schritt immature Neurone, die weiter zu matten Neuronen ausdifferenzieren. miRNAs beeinflussen die Proliferation, die Differenzierung sowie die Maturierung dieser Zelltypen. Modifiziert nach [122].

3.2.1.3 Die miR-26-Familie

Die Familie der microRNA-26 besteht aus drei Isoformen: miR-26a-1, miR-26a-2 und miR-26b. Diese sind monocistronisch in den Introns der CTDSP-Familie kodiert. Die Mitglieder der miR-26 Familie haben keinen eigenen Promotor, sondern werden zusammen mit ihren Wirtsgenen kotranskribiert [123]. Aus den pre-miR-26a1 und pre-miR-26a2 Sequenzen wird die mature miR-26a prozessiert, welche sich nur in zwei Nukleotiden von der maturen miR-26b Sequenz unterscheidet. Jedoch ist die für die Ziel-mRNA Erkennung entscheidende *Seed* Region von miR-26a und von miR-26b identisch und auch in Wirbeltieren hochkonserviert (Abb. 9). Bisher konnte gezeigt werden, dass die Expression der miR-26 Familie unter anderem in Verbindung mit der Regulierung des Zellzyklus [124-127], der Axon Regeneration [128], der Adipozyten Differenzierung [129], sowie Erkrankungen wie Alzheimer Demenz [130] oder Krebs steht. Auffällig ist, dass in Verbindung mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen eine Herabregulation von miR-26 beschrieben wurde, während im Vergleich zu gesundem Gewebe in Gliomen eine Hochregulation von miR-26 [131] beobachtet wurde. Bei Blasen Tumoren [132], bei Brusttumoren [133], bei anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen [134], bei Rhabdomyosarkomen [135], bei Leberzellkarzinomen [136], bei Darmkarzinomen [137] und bei Plattenepithelkarzinomen [138] konnte hingegen eine Herabregulation von miR-26 beobachtet werden.

Die miR-26 wird in embryonalen Stammzellen nicht exprimiert, die Expression steigt während der neuronalen Differenzierung in embryonalen Stammzellen [139] und in Zellen der embryonalen Karzinomzelllinie P19 [140] an. Ein Anstieg der miR-26 Expression während der Embryonalentwicklung wurde sowohl im Zebrafisch [141] als auch in der Maus gezeigt [139, 142]. Dill *et al.* konnten in Zebrafischen zeigen, dass die pre-miR-26 schon ab der Befruchtung exprimiert, jedoch bis zum Beginn der Neurogenese nicht weiter zur maturen miR-26 prozessiert werden [141]. Diese Beobachtungen konnten auch in einem murinen neuronalen *in vitro* Differenzierungssystem durch Sauer *et al.* bestätigt werden [139, 142]. Sauer *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass der Verlust der miR-26 keinen Einfluss auf die Selbsterneuerung oder den pluripotenten Status von murinen embryonalen Stammzellen hatte. Im Gegensatz dazu war jedoch die terminale Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu maturen Neuronen nach Deletion der miR-26 Familie stark beeinträchtigt [139, 142].

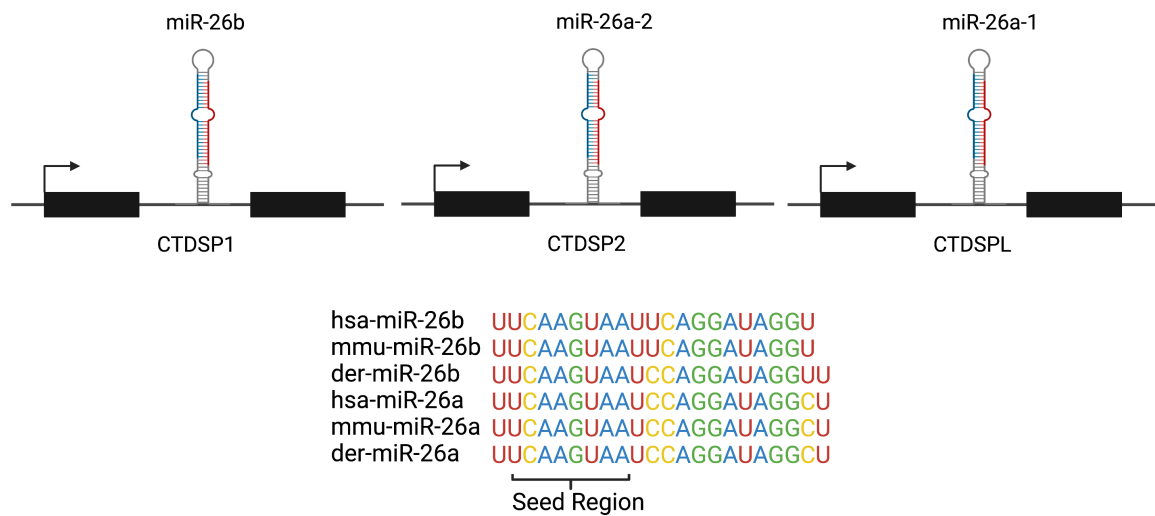


Abbildung 9 Genomische Lokalisation der miR-26 Familien Mitglieder in Maus und ihre Homologie in Vertebraten

Oben: Schematische Darstellung der genomischen Lokalisation der miR-26 Familien Mitglieder in ihren Wirtsgenen. Unten: Sequenzhomologievergleich der mRNAs der miR-26 Familien Mitglieder in *Homo sapiens* (hsa), *Mus musculus* (mmu) und *Danio rerio* (der).

3.2.1.4 Der REST-Komplex reguliert die Expression von miRNAs während er selbst durch miRNAs reguliert wird

In den letzten Jahren konnte in unabhängigen Publikationen gezeigt werden, dass sowohl die Regulierung von REST durch miRNAs als auch die Regulierung von miRNAs durch REST eine wichtige Rolle bei der Initiation neuronaler Genexpression zukommt. So konnten 16 miRNA Gene identifiziert werden, die eine RE1 Sequenz bis zu 25 kb *upstream* ihres Promotors aufweisen und deren Transkription potentiell durch REST reguliert werden kann [143].

Tabelle 1 miRNAs mit einer RE1 Sequenz bis zu 25 kb upstream von ihrem Promotor
 (Modifiziert nach Wu *et al.* 2006 [143])

miRNAs
miR-124a-1, miR-124a-2, miR-124a-3
miR-9-1, miR-9-3
miR-132
miR-212
miR-29a, miR-29b-1
miR-135b
miR-153-1
miR-346
miR-218-2
miR-139
miR-95
miR-455

Für einige dieser miRNAs konnte eine Interaktion mit dem REST-Komplex gezeigt werden. So reguliert miR-9 *CoRest* und *Rest* [144], während REST miR-9 Expression, während der Proliferation von NSCs durch Bindung an dessen Promotor inhibiert. Während der Differenzierung wird die Bindung von REST an den miR-9-2 Promotor durch CREB (*cAMP responsive element-binding*) inhibiert [145]. Auch die miR-124 reguliert *Rest* direkt [146]. Umgekehrt wird die Expression der miR-124 durch REST inhibiert [147]. Ebenfalls wird *Ctdsp1* als Teil des REST-Komplexes durch miR-124 reguliert [146]. Weiterhin reguliert miR-29a *Rest* direkt [148].

Neben der Kernkomponente REST werden auch Kofaktoren dieses Komplexes durch miRNAs reguliert. miR-137 reguliert LSD1 und kontrolliert so die Dynamik zwischen NSC Proliferation und neuronaler Differenzierung [149]. Die miR-20 reprimiert die *Rest* Expression während der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen [150]. Weiterhin regulieren die miRNAs miR-132 und miR-212 den REST-Kofaktor MeCP2 direkt [151, 152].

Die Bedeutung von miRNAs für die neuronale Differenzierung konnte auch durch die Konversion von Fibroblasten in induzierte Neurone durch Überexpression der miR-9 und miR-124 und die damit einhergehende REST-Reprimierung gezeigt werden [153]. Auch bei der Generierung induzierter Neurone aus Fibroblasten durch die Reprimierung von REST, kommt es zu einer Hochregulation der miR-9 und miR-124 [154].

3.2.2 lange nicht kodierende RNAs (lncRNAs)

Durch *in silico* Analysen konnten im humanen Genom 17.952 und im Maus Genom 13.197 für lncRNAs kodierende Gene identifiziert werden. lncRNA-Gene weisen meist Promotor- und Enhancersequenzen auf und werden meist durch die RNA Polymerase II transkribiert. Zudem werden die meisten lncRNAs gecapped, polyadenyliert sowie gespleißt [155]. Von den bisher identifizierten lncRNAs konnten jedoch für mehr als 80% nur eine sehr geringe Transkript-Menge in Zellen nachgewiesen werden. Zudem ist die Transkription vieler lncRNAs auf bestimmte Zelltypen oder spezifische embryonale Entwicklungsstadien limitiert [156].

3.2.2.1 Regulation der Genexpression durch lncRNAs

Durch genomweite Analysen von RNA-DNA Interaktionen konnten viele Interaktionen von lncRNAs mit DNA nachgewiesen werden [157-159]. Die Bindung von lncRNAs an die DNA kann die Genexpression durch verschiedene Mechanismen beeinflussen. Diese sind in

Abbildung 10 schematisch zusammengefasst. Durch die Assoziation mit der negativ geladenen RNA kann es zu einer Lockerung des Chromatins kommen, was die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder Enhancern ermöglicht [160]. Durch die Sequestrierung von Transkriptionsfaktoren können lncRNAs Genexpression inhibieren. So reguliert die lncRNA *PANDA* die Expression von Apoptose-vermittelnden Genen durch Sequestrierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B [161]. Neben Transkriptionsfaktoren können jedoch auch andere genregulatorische Komponenten wie miRNAs und Spleißfaktoren durch lncRNAs sequestriert werden und auf diese Weise die Genexpression auf weiteren Ebenen beeinflussen. So reguliert die lncRNA *Neat1* während der Adipogenese die Spleißung der PPAR γ mRNA [162]. Einige lncRNAs enthalten mehrere komplementäre Bindestellen für miRNAs und können deshalb als kompetitive endogene RNA wirken (engl.: *competitive endogenous RNA*; ceRNA). Durch ihre Fähigkeit miRNAs kompetitiv zu binden und zu sequestrieren werden in Folge meist mehrere miRNA Zielgene dereprimiert. So reguliert die lncRNA *LincND* die Expression von Notch1 und Notch2 durch Sequestrierung der miR-143 im sich entwickelnden Neocortex [163]. Des Weiteren können lncRNAs auch als Guides für RNA-bindende Proteine dienen, welche Chromatin-Modifikationen vermitteln. Einer der am besten untersuchten Mechanismen ist die Inaktivierung des X-Chromosoms durch die lncRNA *Xist*. *Xist* rekrutiert die Polycomb-Komplexe PRC1 und PRC2 während der Inaktivierung des X-Chromosoms und vermittelt so die Methylierung von Histon H3 an Lysin27 [164]. lncRNAs zeichnen sich durch das Vorhandensein unterschiedlicher Domänen aus, mit denen RNA-bindende Proteine interagieren können. Unter anderem können lncRNAs so auch als Gerüstfaktoren für chromatin-modifizierende Proteine dienen. Zum Beispiel bindet die lncRNA *HOTAIR* sowohl den Polycomb-Komplex PRC2 als auch den REST-Komplex über LSD2 und reguliert so die Transkription unterschiedlicher Gene auf verschiedenen Ebenen [165].

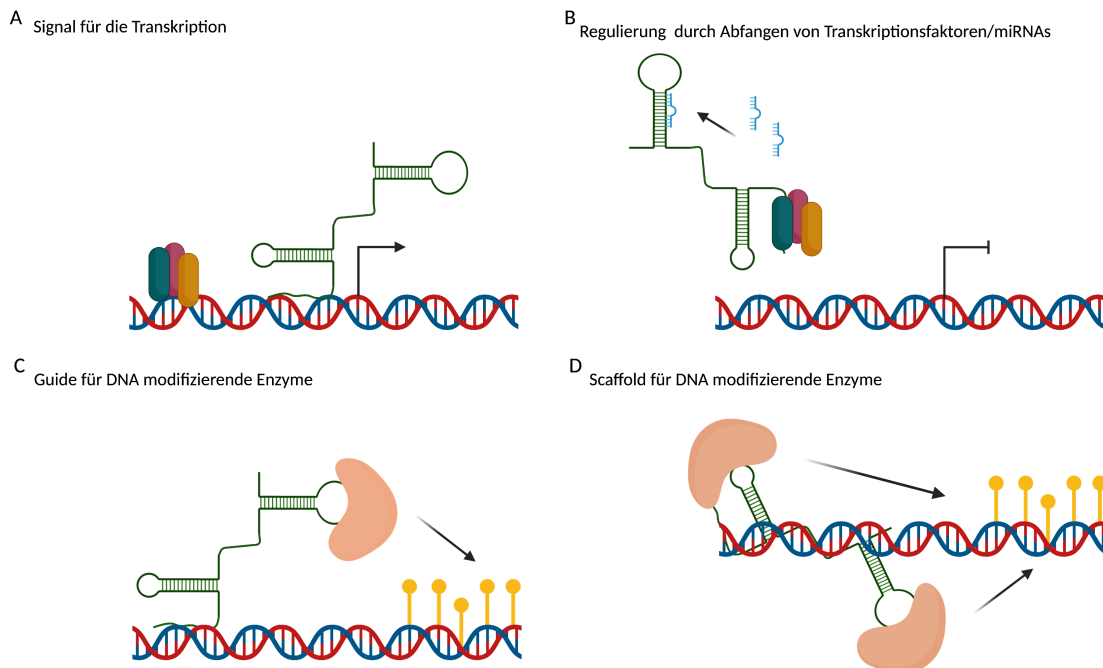


Abbildung 10 Regulation der Genexpression durch lncRNAs

A) lncRNAs dienen nach Bindung an genomische DNA in Gen-regulatorischen Sequenzen als Markierung für Transkriptionsfaktoren. Auf diese Weise kann sowohl transkriptionelle Aktivierung als auch Reprimierung vermittelt werden. B) lncRNAs können Transkriptionsfaktoren oder miRNA sequestrieren und so deren Bindung an ihre Zielsequenzen verhindern. C) lncRNAs können als Guide für DNA modifizierende Enzyme zu ihren Zielgenen dienen. D) lncRNAs können als Scaffold für mehrere Proteine (z.B. Histon-modifizierende Enzyme) dienen und diese in eine räumliche Nähe zueinander und ihrem Zielgen bringen. Abbildung modifiziert nach [166].

3.2.2.2 Die Funktion von lncRNAs in der Neurogenese

Die Regulation der Genexpression während der Neurogenese wird durch lncRNAs stark beeinflusst. Die Bedeutung von lncRNAs für die Neurogenese wird durch Untersuchungen von Derrien *et al.* gestützt. Hier konnte gezeigt werden, dass ungefähr 40% der im humanen Genom kodierten lncRNAs spezifische Expressionsmuster im Gehirn aufweisen [167]. Einige dieser lncRNAs wurden inzwischen untersucht und es konnten spezifische Funktionen in verschiedenen Zelltypen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Neurogenese gezeigt werden. Abbildung 11 fasst die Rolle verschiedener lncRNAs in unterschiedlichen Stadien der Neurogenese zusammen. Die Kontrolle der Proliferation von neuronalen Stammzellen ist essentiell für die Aufrechterhaltung des Stammzellpools und für die Bereitstellung von Zellen, die im Anschluss die Differenzierung durchlaufen. Durch Überexpression des Antisense Transkriptes des *Fgf2* Locus kommt es zur Destabilisierung der *Fgf2* mRNA und zur Inhibition der Proliferation [168]. Der Verlust von *Linc-Brn1b* führt zu einer verringerten Anzahl von Vorläuferzellen. Jedoch ist dieser Verlust auf den sich entwickelnden Cortex begrenzt [169].

Die lncRNA *Pinky* ist für die Proliferation von NSCs essentiell, da der Verlust von *Pinky* zur Differenzierung und damit zum Verlust der NSC Population führt [170]. Der Verlust der lncRNA *Peril* in Mäusen ist letal und führt zu einer Veränderung der Expression von Zellzyklusgenen sowie Signalwegen, die für die Aufrechterhaltung neuronaler Stammzellen verantwortlich sind [171]. Auch die Zellidentität während der Differenzierung wird durch lncRNAs reguliert. So spielt *Six3OS* eine essentielle Rolle bei der Entwicklung der Retina durch Regulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors SIX3 [172]. Die lncRNA *RMST* ist für das Gleichgewicht zwischen neuronaler Differenzierung und Gliogenese durch Interaktion mit SOX2 verantwortlich. Der Verlust von *RMST* führt zu vermehrter Gliogenese, während die *RMST* Überexpression die neuronale Differenzierung fördert [173]. Auch die Induktion der Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen steht unter der Kontrolle von lncRNAs. Die lncRNA *Paupar* reguliert die Transkription von Pax6 und der Verlust von *Paupar* induziert die Differenzierung zu Neuronen [174]. Der Verlust der lncRNA *Evf2* führt zu einem sehr spezifischen Verlust von GABAnergen Interneuronen im postnatalen Gehirn durch die fehlende Rekrutierung von DLX und MECP2 [175]. Auch das Neutrophin BDNF wird als Antisense-Transkript abgelesen. Der Verlust dieses Antisense-Transkripts führt zu verstärkter Neurogenese, Neuriten-Wachstum und -Maturierung [176]. Die lncRNA *Miat* gehört zu den Transkripten mit den höchsten Expressionsleveln während der Entwicklung des ZNS und der Verlust von *Miat* führt zu vermehrter Proliferation und verringerter Differenzierung von Vorläuferzellen im sich entwickelnden Cortex [177]. *HOTAIRMI* reguliert die neuronale Differenzierung durch epigenetische Regulation von Neurogenin2 [178]. Die lncRNA *Neat1* moduliert den WNT-Signalweg über miR-124 während der Differenzierung von Rückenmarksvorläuferzellen und fördert deren Differenzierung [179]. Inzwischen konnten auch einige lncRNAs identifiziert werden, die bei der Maturierung zu einem funktionellen, murenen Neuron entscheidende Rollen spielen. Die lncRNA *Dali* reguliert z.B. die Maturierung von Neuronen durch Regulation neuronaler Differenzierungsgene über den Transkriptionsfaktor Pou3f3 [180]. Die Rolle der lncRNA *Malat1* während der Neurogenese wird im nächsten Kapitel behandelt.

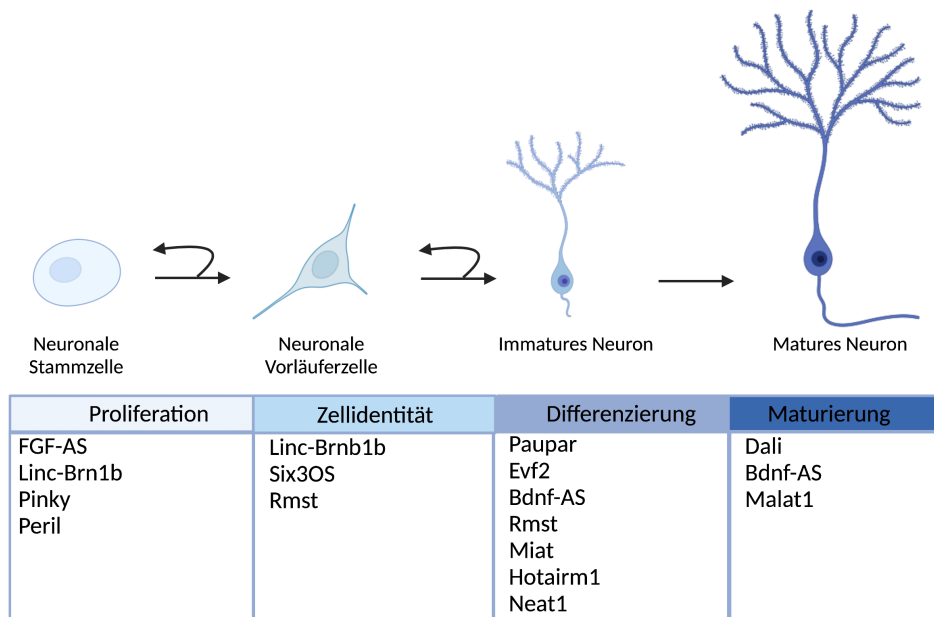


Abbildung 11 LncRNAs regulieren die Neurogenese auf verschiedenen Ebenen

Neuronale Stammzellen können sich selbst erneuern oder zu neuronalen Vorläuferzellen differenzieren. Aus diesen entstehen im ersten Schritt immature Neurone, die weiter zu murenen Neuronen ausdifferenzieren. lncRNAs beeinflussen die Proliferation, die Differenzierung sowie die Maturierung dieser Zellen. Abbildung modifiziert nach [181].

3.2.2.3 Die lncRNA *Malat1*

Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 (Malat1) wurde initial in Tumoren von Patienten mit metastasierenden nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen identifiziert [182]. Im Maus Genom ist *Malat1* als ein 6,7 knt langes Gen kodiert und wird von der RNA PolymeraseII transkribiert [183]. *Malat1* ist ubiquitär in allen Geweben sehr hoch exprimiert und weist Transkriptionslevel auf, die vergleichbar mit denen von konstitutiv exprimierten Genen (*housekeeping genes*) wie β -Aktin sind [184]. *Malat1* wird als langes Transkript abgelesen und in weiteren Schritten prozessiert (Abb. 12). Das primäre *Malat1* Transkript bildet am 3'Ende eine 61 Nukleotide lange tRNA-ähnliche Struktur aus, die als *Malat1-associated small cytoplasmic RNA (mascRNA)* bezeichnet wird. Diese wird zunächst durch RNAseP vom primären Transkript abgespalten, um anschließend durch RNAseZ weiter prozessiert und dann ins Zytoplasma exportiert zu werden [183]. Die Funktion dieser mascRNA ist noch nicht vollständig verstanden. Jedoch zeigten Studien, bei denen die Triplex-Bildung durch Mutationen verhindert wurde, dass diese zur Degradierung von *Malat1* sowie dem Verlust der Akkumulation im Zellkern führen [185]. Das bei der Prozessierung von *Malat1* entstandene *Malat1* Transkript wird nach der Prozessierung nicht polyadenyliert, es weist jedoch einen genomisch kodierten PolyA-reichen Bereich auf, der das Transkript vor Degradierung schützt

[186]. Das *Malat1* Transkript ist in *Nuclear Speckles*, also Bereiche, in denen pre-mRNA Spleißing Faktoren sowie einige Transkriptionsfaktoren angereicht sind, lokalisiert [187]. Der Verlust von *Malat1* führt jedoch nicht zu einer Veränderung bei der Bildung oder der Anzahl der *Nuclear Speckels* [184].

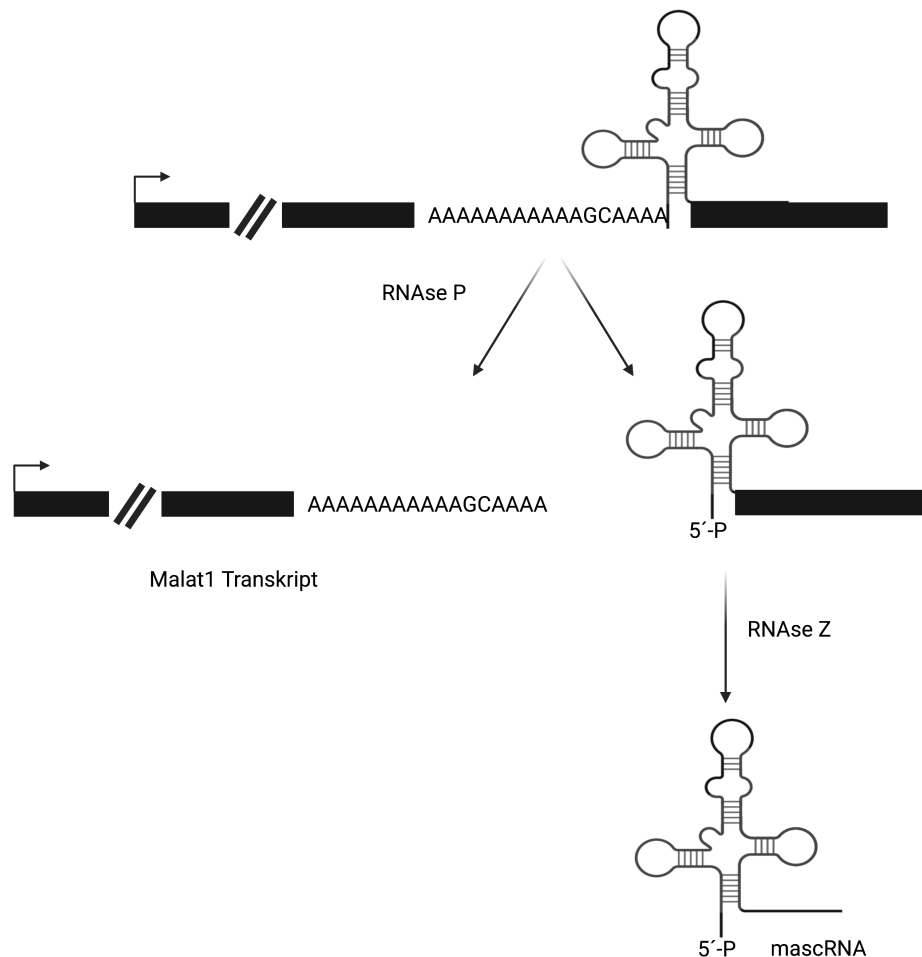


Abbildung 12 Prozessierung des primären *Malat1* Transkripts

Malat1 steht unter der Kontrolle eines eigenen Promotors. Das primäre Transkript weist eine tRNA ähnliche Schleifenstruktur auf, die mascRNA genannt wird. Diese mascRNA wird durch RNase P vom 3' Ende des *Malat1* Transkript abgespalten. Durch Abspaltung des 3' Endes durch RNase Z entsteht die mature mascRNA. Abbildung modifiziert nach [188].

Bisher konnten *Malat1* verschiedene Funktionen zugeordnet werden, welche jedoch stark von der untersuchten physiologischen Situation abhängen. Neben der initial gefundenen Assoziation von *Malat1* mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen wurde eine Rolle von *Malat1* in verschiedenen Tumorerkrankungen nachgewiesen. Entsprechend wurde die Funktion von *Malat1* auf molekularer Ebene in unterschiedlichen Tumor-Modellsystemen untersucht. Dabei zeigte sich, dass *Malat1* häufig mit Tumor-Zellwachstum und -Proliferation assoziiert ist [189-191]. In drei unabhängigen *Malat1 knockout* Mauslinien konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Malat1* nicht die normale Entwicklung und Physiologie von Mäusen

beeinträchtigt [184, 192, 193]. Bei der Durchführung von *in vitro* Studien in verschiedenen Modellsystemen konnten jedoch vielfältige Funktionen und *knockout* Phänotypen für *Malat1* beschrieben werden. Dass diese Phänotypen *in vivo* nicht zu beobachten sind, deutet darauf hin, dass unter normalen physiologischen Bedingungen die *Malat1*-Funktion durch redundante Faktoren kompensiert werden kann. Dies wurde auch für die Funktion anderer Gene beschrieben [194, 195].

Analysen von *Malat1 knockout* Zelllinien zeigten verändertes pre-mRNA Spleißing [196-199]. Außerdem konnte durch *in vivo* Studien gezeigt werden, dass *Malat1* die Transkription bestimmter Gene durch Chromatin-Bindung reguliert [200]. Weiterhin wurde die Bindung von *Malat1* an eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wie LTBP3 [201], FOXO1 [202] und PC2 [203] in *in vitro* Studien nachgewiesen. Zudem konnte die Sequestrierung verschiedener miRNAs durch *Malat1* in einer Reihe von Studien belegt werden. Jedoch gibt es auch Belege dafür, dass auch *Malat1*-Level durch unterschiedliche miRNAs reguliert werden kann. Die Ergebnisse einiger dieser Studien sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2 Interaktionen zwischen *Malat1* und miRNAs

miRNA	Mechanismus	Modell	Literatur
hsa-miR-125b	miRNA-Zielerkennung	Entwicklung von Blasenkrebs	[204]
mmu-miR-101b	ceRNA	Leberfibrose	[205]
hsa-miR-376a	ceRNA	Entwicklung von Osteosarkomen	[206]
hsa-miR-200	ceRNA	Endometriose, Lungenkrebs	[207, 208]
mmu-miR-200	ceRNA	Clear-Cell-Sarkoma	[209]
hsa-miR-9	miRNA-Zielerkennung	Hodgkin Lymphom, Glioblastom	[210]
hsa-miR-34	ceRNA	Melanom, Osteoporose	[211, 212]
mmu-miR-181c	ceRNA	Entzündung nach Schlaganfall	[213]
hsa-miR-181a	ceRNA	Leberfibrose	[214]
hsa-miR-508	ceRNA	Kolorektales Karzinom	[215]
hsa-miR-339	miRNA-Zielerkennung	Brustkrebs	[216]
hsa-miR-144	ceRNA	Epitheliale Linsenzellen	[217]
hsa-miR-126	ceRNA	Kolorektales Karzinom	[218]
hsa-miR-124	ceRNA	Parkinson	[219]
rno-miR-154	ceRNA	Neuropathie	[220]
mmu-miR-141	ceRNA	Kardiomyopathie	[221]
hsa-miR-423	miRNA-Zielerkennung	Prostatakrebs	[222]
hsa-miR-26a/b	miRNA-Zielerkennung	Brustkrebs	[223]
hsa-miR-613	ceRNA	Glioblastom	[224]
hsa-miR-34a	ceRNA	Melanom	[225]
hsa-miR-485	ceRNA	Osteosarkom	[226]
hsa-miR-202	ceRNA	Lungenmetastasen	[227]

3.2.2.4 Die lncRNA *Malat1* in der neuronalen Entwicklung

Malat1 ist in neuronalen Geweben und Neuronen hoch exprimiert. Auch wenn *in vivo* Studien bisher keine Belege für einen Einfluss von *Malat1* auf die neuronale Entwicklung zeigten, deuten einige *in vitro* Studien auf eine *Malat1* Funktion in der Entwicklung von Neuronen hin. So führt der Verlust von *Malat1* in kultivierten, hippocampalen Neuronen zu einer verringerten synaptischen Dichte durch Herabregulation von Neurologin1 sowie SynCAM1 [228]. Bei der *in vitro* Differenzierung der Neuroblastoma-Zelllinie N2a führte der Verlust von *Malat1* zu einem verringertem Neuritenwachstum, sowie zum Zelltod durch Inhibierung des ERK/MAPK Signalwegs [229]. In einem zellulären Modell der Alzheimer Erkrankung konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Malat1* zur Apoptose und zu vermindertem Neuritenwachstum von Neuronen führt, während die Überexpression von *Malat1* den gegenteiligen Effekt zeigte [230]. Zudem konnten *Malat1* neuroprotektive Funktionen bei der Reperusionsverletzung des Rückenmarks [231] sowie entzündungshemmende Funktionen bei weiteren neurodegenerativen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose zugeordnet werden [232].

3.3 Ziel der Arbeit

In vorhergehenden Arbeiten wurde gezeigt, dass die miR-26 eine kritische Rolle bei der Entwicklung von Neuronen im Zebrafisch spielt [141]. Bei der *in vitro* Differenzierung von Neuronen aus murinen ES-Zellen kommt es durch den Verlust der miR-26 Familie zu einer Akkumulation neuronaler Vorläuferzellen, die nicht zu murenen Neuronen ausdifferenzieren. Zudem konnte eine Verbindung zur Regulation der neuronalen Genexpression durch den REST-Komplex beobachtet werden [142].

Ein Ziel dieser Arbeit war es die direkte Regulation von REST-Komplex Komponenten durch miR-26 während der murinen embryonalen Neurogenese nachzuweisen. Dazu sollten die folgenden Analysen und Experimente durchgeführt werden:

- *In silico* Analyse der REST-Komplex Komponenten auf miR-26 Zielsequenzen
- Luziferase-Reporter-Assays zur Identifizierung von REST-Komplex Komponenten, die direkt durch die miR-26 reguliert werden
- Generierung von ES-Zelllinien mit miR-26 Zielsequenz *knockouts* in endogenen REST-Komplex Komponenten mittels CRISPR/Cas9
- Analyse der zellulären und molekularen Konsequenzen des Verlustes der miR-26 Zielsequenzen in REST-Komplex Komponenten durch Verwendung eines ES-Zell basierendem *in vitro* Differenzierungssystems

Die Expressionsmuster der miR-26 Familie lassen darauf schließen, dass die Maturierung der miR-26 sowohl bei der embryonalen Entwicklung im Zebrafisch als auch der Maus bis zum Beginn der Neurogenese inhibiert ist [141, 142]. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es Faktoren zu identifizieren und zu analysieren, die für die verspätete Maturierung der miR-26 während der embryonalen Entwicklung verantwortlich sein könnten. Dazu sollten folgende Analysen und Experimente durchgeführt werden:

- Generierung von ES-Zelllinien mit *knockouts* von Faktoren, die eine potentielle regulatorische Funktion auf die miR-26 Familie haben, mittels CRISPR/Cas9
- Analyse der zellulären und molekularen Konsequenzen dieser *knockouts*, mit Fokus auf die miR-26 Familie durch Verwendung eines ES-Zell basierendem *in vitro* Differenzierungssystems

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Genetischer Hintergrund	Genotyp	Herkunft
R1 ES-Zellen	129/Sv X 129/Sv	Wildtyp	AG Müller, Würzburg
miR-26 tKO R1 ES-Zellen	129/Sv X 129/Sv	miR-26a1 + miR-26a2 + miR-26b Deletion	Dr. Mark Sauer AG Müller, Würzburg
Ctdsp2 ts KO R1 ES-Zellen	129/Sv X 129/Sv	Deletion der miR-26 Zielsequenz in der 3'UTR von Ctdsp2	In dieser Arbeit hergestellt
Rest ts KO R1 ES-Zellen	129/Sv X 129/Sv	Deletion der miR-26 Zielsequenz in der 3'UTR von Rest	In dieser Arbeit hergestellt
Malat1 KO R1 ES-Zellen	129/Sv X 129/Sv	Malat1 Deletion	In dieser Arbeit hergestellt
miR-26/Malat1 KO R1 ES-Zellen	129/Sv X 129/Sv	miR-26a1 + miR-26a2 + miR-26b + Malat1 Deletion	Aus miR-26 tKO R1 ES-Zellen in dieser Arbeit hergestellt
Hek293T	Humane embryonale Nierenzellen	Wildtyp	ATCC
MEF	Isoliert aus E13,5 Mausembryonen	Wildtyp	Eigene Herstellung

4.1.2 Zellkulturmedien

ES-Zell Medium:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration	Hersteller	Cat. Nummer
DMEM High Glucose	500 ml		Sigma	D-5796
FCS	93,75 ml	15%	Bio&Sell/ Serana	
Penicillin/Streptomycin	6,25 ml	10000 U/ml /10 mg/ml	Sigma	P-4333
L-Glutamat	6,25 ml	2 mM	Sigma	G-7513
Nicht-essentielle Aminosäuren	6,25 ml	1x	Sigma	M-7145
Natrium-Pyruvat	6,25 ml	1 mM	Sigma	S-8636
β-Mercaptoethanol (14,3M)	4,375 µl in 6,25 ml HEPES	0,1 mM 10 mM	Sigma	M-3148 83264
LIF konditioniertes Medium	625 µl	-	Eigene Herstellung	

EB Medium:

Reagenz	Volumen	End-konzentration	Hersteller	Cat. Nummer
DMEM High Glucose	500 ml		Sigma	D-5796
FCS	58,8 ml	15%	Bio&Sell/ Serana	
Penicillin/Streptomycin	5,88 ml	10000 U/ml /10 mg/ml	Sigma	P-4333
L-Glutamat	5,88 ml	2 mM	Sigma	G-7513
Nicht-essentielle Aminosäuren	5,88 ml	1x	Sigma	M-7145
Natrium-Pyruvat	5,88 ml	1 mM	Sigma	S-8636
β-Mercaptoethanol (14,3M)	4,12 µl in 5,88 ml HEPES	0,1 mM 10 mM	Sigma	M-3148 83264

ITS Medium:

Reagenz	Volumen	End-konzentration	Hersteller	Cat. Nummer
DMEM/Ham´s F12	500 ml		Sigma	D-8437
L-Glutamat	5 ml	2 mM	Sigma	G-7513
Penicillin/Streptomycin	5 ml	10000 U/ml /10 mg/ml	Sigma	P-4333
Insulin	0,5 ml	5 µg/ml	Sigma	I-6634
Transferrin	2,5 ml	50 µg/ml	Sigma	T1147
Natrium-Selenit	50 µl	30 nM	Sigma	S-5261

N2 Medium:

Reagenz	Volumen	End-konzentration	Hersteller	Cat. Nummer
DMEM/Ham´s F12	250 ml		Sigma	D-8437
L-Glutamat	2,5 ml	2 mM	Sigma	G-7513
Penicillin/Streptomycin	2,5 ml	10000 U/ml /10 mg/ml	Sigma	P-4333
Insulin	1,25 ml	25 µg/ml	Sigma	I-6634
Transferrin	1,25 ml	50 µg/ml	Sigma	T1147
Natrium-Selenit	25 µl	20 nM	Sigma	S-5261
Putrescin	250 µl	100 nM	Sigma	P-5261
Progesteron	250 µl	20 nM	Sigma	P8783
BSA	1,25 ml	50 µg/ml	Sigma	A-9418

Neurobasal Medium:

Reagenz	Volumen	End-konzentration	Hersteller	Cat. Nummer
Neurobasalmedium	250 ml		Gibco	21103-49
L-Glutamat	2,5 ml	2 mM	Sigma	G-7513
Penicillin/Streptomycin	2,5 ml	10000 U/ml /10 mg/ml	Sigma	P-4333
B27 Supplement	5 ml	1x	ThermoFisher	17504001

MEF/293T-Medium:

Reagenz	Volumen	End-konzentration	Hersteller	Cat. Nummer
DMEM low Glucose	500 ml		Sigma	D5546
FCS	50 ml	10%	ThermoFisher	
Penicillin/Streptomycin	6,25 ml	10000 U/ml /10 mg/ml	Sigma	P-4333
L-Glutamat	6,25 ml	2 mM	Sigma	G-7513
Natrium-Pyruvat	6,25 ml	1 mM	Sigma	S-8636

4.1.3 Bakterien Stämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. Coli</i> 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
<i>E. Coli</i> Stbl3	F ⁻ mcrB mrrhsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str ^R) xyl-5 λ ⁻ leumtl-1	Thermo Scientific
<i>E. Coli</i> Top 10	Kanamycin/ Neomycin	Prof. Wulczyn, Charite Berlin

4.1.4 Bakterienmedien

Medium	Zusammensetzung
Luria Broth (LB)	1% (w/v) Trypton (10 g/l), 1% (w/v) NaCl (10 g/l), 0,5% Hefeextrakt (5 g/l)
Super Optimal Broth (SOB)	2% (w/v) Trypton (20 g/l), 0,5% Hefeextrakt (5 g/l), 10 mM NaCl (0,6 g/l), 2,5 mM KCl (0,2g/l), 10 mM MgSO ₄
SOC	SOB Medium, 20 mM Glucose

Zur Herstellung von LB-Agar Selektions-Platten wurden 2% (w/v) Agarose in LB-Medium gegeben. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden 100 μ g/ml Ampicilin oder Kanamycin in dem noch flüssigen Medium suspendiert. Anschließend wurde das Medium in sterile Petrischalen gegossen. Die Petrischalen wurden bei 4°C gelagert.

Zur Selektion von Bakterien in LB-Medium wurden für Mini- und Maxi-DNA Präparationen ebenfalls 100 μ g/ml Ampicillin oder Kanamycin verwendet.

4.1.5 Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
6x DNA Ladepuffer	30% (v/v) Glycerol, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylene Cyanol
10x Tris/Borat/EDTA Puffer (TBE)	89 mM Tris-HCl, 2 mM Na ₂ EDTA, pH 8.0 mit Essigsäure eingestellt
CCMB80 Puffer	10 mM KOAc pH 7.0, 80 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 20 mM MnCl ₂ ·4H ₂ O, 10 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 10% Glycerol, pH 6.4 mit HCl
Lysepuffer	10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1 M EDTA, 0,5% (w/v) SDS
10x Lämmli Puffer	125 mM Tris-HCl, 20% (v/v) Glycerol, 4% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 5% (w/v) β-Mercaptoethanol, pH 6.8
Western Blot Trenngel	12% Acrylamid, 375 mM Tris, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,05% TEMED, H ₂ O
Western Blot Sammelgel	4,5% Acrylamid, 125 mM Tris, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,05% TEMED, H ₂ O
10xTrisgepufferte Salzlösung (TBS)	0,5 M Tris HCl pH 7.6, 1,5 M NaCl
Stripping Puffer	0,2 N NaOH
10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄
ProteinaseK Puffer Blockierung	25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM CaCl ₂ , 50% Glycerol 2% Ziegenserum, 1% Rinderserumalbumin (BSA), 0,1% TritonX-100, 0,05% Tween20 in 1x PBS
0,1 mg/ml Poly-DL-Ornithinlösung	0,5 mg/ml Poly-DL-Ornithin in Boratpuffer (150 mM Borsäure, pH 8.3 mit NaOH) lösen und 1:5 in H ₂ O verdünnen

4.1.6 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Cat. Nummer	Hersteller
Sox2 rb	IF, 1:500	ab97959	Abcam
Tubb3 ms	IF, 1:500	MAB1195	R&D Systems
Nestin ms	IF, 1:500	556309	BD Pharmigen
BrdU ms	IF, 1:1000	5292S	Cell Signaling
P16 ^{INK4A} rb	IF, 1:250	PA5-20379	Thermo Fisher
anti-Mouse Cy3 gt	IF, 1:200	AP130C	Merck
Anti-Rabbit Cy2 gt	IF, 1:200	AP510J	Merck
anti-Rat Cy2t gt	IF, 1:200	AP202J	Chemicon
GAPDH ms	WB, 1:1000	MAB374	Merck
H3 ms	WB, 1:2000	ab1791	Abcam
H3K27me3 ms	WB, 1:1000	C15410069	Diagenode
EZH2 ms	WB, 1:1000	C15410039	Diagenode
pEZH2 (Thr345) rb	WB, 1:500	PA5-11457	Thermo Fisher
REST rb	WB, 1:500	07-579	Sigma Aldrich
Ctdsp2 rb	WB, 1:1000	PA5-21624	Thermo Fisher

4.1.7 DNA Oligonukleotide

4.1.7.1 DNA Oligonukleotide für Klonierungen von Luziferase-Reporter Assay-Plasmiden

Name	Sequenz (5'-3')
Rest 3'UTR F	GATCCTCGAGCTGAGCCTCGGCAGAAGC
Rest 3'UTR R	GATCGCGGCCGCATGTTTAACTTATCCTACACAATCTTGACC
Ctdsp2 3'UTR F	GATCCTCGAGCCCATGGGTCCCTAATTAAAGAAGTTG
Ctdsp2 3'UTR R	GATCCTCGAGTGGTTGTCCCAAGTGTGCTGATCGCGGCCGCCA GACTCTTAATGGCATCCTACAG
CoRest 3'UTR F	GATCCTCGAGAACTGTTGGTAGCTTTGAACACTTG
CoRest 3'UTR R	GATCGCGGCCGCCTATGGACATTCACCACAATGACTGT

4.1.7.2 DNA Oligonukleotide für die *site directed* Mutagenese

Klein geschriebene Buchstaben zeigen Mutationsstellen.

Name	Sequenz (5'-3')
Rest mut 3'UTR F	ATTGGCTTAGTAAATatCTtaGAGAATTTGCCTGCTT
Rest mut 3'UTR R	AAAGCAGGCAAATTCTctAAGatATTTACTAAGCCAAT
Rest 2. mut 3'UTR F	CTAGTAACTAGTGGTAAcaTTagAATGGTAGCATTCTTTACAGC
Rest 2. mut 3'UTR R	GCTGTAAAGAATGCTACCATTctAAtgTTACCACTAGTTACTAG
Ctdsp2 mut 3'UTR F	TTGTTGTATTCAAAAcaTTagACTGTAGGATGCCATT
Ctdsp2 mut 3'UTR R	AATGGCATCCTACAGTctAAtgTTTTGAATACAACAA
CoRest mut 3'UTR F	CACGTAAGCACCTGTatCTTagATATTGTGTTGACCGG
CoRest mut 3'UTR R	CCGGTCAACACAATATctAAGatACAGGTGCTTACGTG

4.1.7.3 DNA Oligonukleotide zur Herstellung von *single guide* RNAs

Name	Sequenz (5'-3')
CTDSP2-miR-26 ts A F	CACCGTATCAAATCATGAAGCAAGG
CTDSP2-miR-26 ts A R	AAACCCTTGCTTCATGATTTGATAC
CTDSP2-miR-26 ts B F	CACCGTATTCAAAAACCTTGAACCTGT
CTDSP2-miR-26 ts B R	AAACACAGTTCAAGTTTTTGAATAC
REST- miR-26 ts 3' A F	CACCGTCCTCTTACATTAACTCCCG
REST- miR-26 ts 3' A R	AAACCGGGAGTTAATGTAAGAGGAC
REST- miR-26 ts 3' B F	CACCGAGCTCGTGCAGGCAGGTGCA
REST- miR-26 ts 3' B R	AAACTGCACCTGCCTGCACGAGCTC
REST- miR-26 ts 5' A F	CACCGGTAACCTAATTTATATAAAGC
REST- miR-26 ts 5' A R	AAACGCTTTATATAAATTAAGTTAC
REST- miR-26 ts 5' B F	CACCGGAAAAAAAAAAGAGATTTTAAT
REST- miR-26 ts 5' B R	AAACATTAATAATCTCTTTTTTTTC
Malat1 3' A F	CACCGGTACCACTTCCCATTCTTA
Malat1 3' A R	AAACTAAGGAATGGGAAGTGGTAC
Malat1 3' B F	CACCGGCGACCATGCTTGCACACAC
Malat1 3' B R	AAACGTGTGGTGC AAGCATGGTCG
Malat1 5' A F	CACCGGGAGGGTACTAGGTTCCGG
Malat1 5' A R	AAACCCGGAACCTAGTAACCCTCC
Malat1 5' B F	CACCGGAGCGCCGGTATTTATTGCAA
Malat1 5' B R	AAACTTGCAATAAATACCGGCGCT

4.1.7.4 Primer für die Genotypisierung von CRISPR/Cas9 *knockout* ES-Zelllinien

Name	Sequenz (5'-3')
miR-26ts-CTDSP2 F	AACTGCCCTGCACCATAAGC
miR-26ts-CTDSP2 R	TGGCATCCTACAGTTCAAGTTTT
miR-26ts-REST F	CCTCGGCAGAAGCACCG
miR-26ts-REST R	CTGTTTCAGGGGAAGGGAGATTA
Malat1 DNA F	TGTGACGCGACTGGAGTATG
Malat1 DNA R	CTGGATTCTCTGGCCCCTTG
Malat1 KO F	AAGCTGAAGCTGTGGGAAAGCC
Malat1 KO R	TGTGCTGAGCCCCTTTGAACTG

4.1.7.5 DNA-Oligonukleotide für die Analyse der CRISPR/Cas9 off-targets

Name	Sequenz (5'-3')
CTDSP2- ts off A1 F	GGCCTTTTGAAAGACAGTTAGCA
CTDSP2- ts off A1 R	TCAGAACAGATGGTGGACACA
CTDSP2- ts off A2 F	GAACTCCTGTAGCTGGTTTGGT
CTDSP2- ts off A2 R	GGCATAGTTTTGTCTACCACCTG
CTDSP2- ts off A3 F	CTGTCTTGCTGGTCAGGTCA
CTDSP2- ts off A3 R	ACCCCAAAGAAATGCTGCAC
CTDSP2- ts off B1 F	CCCCTCATCTCCTCCTGTGA
CTDSP2- ts off B1 R	CTCTTCTACCCCTCCCTCC
CTDSP2- ts off B2 F	CAGTCTCCTGGTCCACACTG
CTDSP2- ts off B2 R	TGCTTAGAAAGCCACAGGGG
CTDSP2- ts off B3 F	TTCCCATCAAGTCCTCCTCCTAT
CTDSP2- ts off B3 R	ACCCAGCTGTAAGTTCCCCTT

REST- ts off 3' A1 F	TGGGCGGAGTGATACAGAGA
REST- ts off 3' A1 R	AGGAAGTAAAAGCTCCCGGC
REST- ts off 3' A2 F	CTCAGGTCCTCTGCTGGTTG
REST- ts off 3' A2 R	TGCTTCCCTTCCCTAGACTGA
REST- ts off 3' A3 F	TCTGTCTTGGGATTGGGCAC
REST- ts off 3' A3 R	TGTGGTGGAGAAACCGCTAC
REST- ts off 3' B1 F	GGGGTTATCAATGTGAGCCCTA
REST- ts off 3' B1 R	GCCACTGTTGTGATGGAATGAC
REST- ts off 3' B2 F	GTATTGCAAGGGAAAGCCGC
REST- ts off 3' B2 R	GGCTCAGAACGGTTTGTCTTA
REST- ts off 3' B3 F	CATTCACGGATGGGTGGCTA
REST- ts off 3' B3 R	GGAGGCCTTGACACACAAGA
REST- ts off 5' A1 F	CTCGCAACGTTTCCAACGAA
REST- ts off 5' A1 R	CAACACGGCAACTGGCTTAC
REST- ts off 5' A2 F	GCCCTTTGCAAACAAGCCTA
REST- ts off 5' A2 R	AACAAACGCAAGAGGTGAGC
REST- ts off 5' A3 F	TGTTGGGAGTGGGCATGTTA
REST- ts off 5' A3 R	TGGTCCTCCTACCCCCATTT
REST- ts off 5' B1 F	CAGTGCTGCAAGGCAAATGT
REST- ts off 5' B1 R	AACATGACATTCCCCACCCC
REST- ts off 5' B2 F	ATCCCCCAACCCCTGCTTAG
REST- ts off 5' B2 R	GTCACCAAATTCCTAGAATGAAGCA
REST- ts off 5' B3 F	AACGGAGTAAATTTGCACGCC
REST- ts off 5' B3 R	AAAAGGAACACAGTGGCCGTC
Malat1 off 3' A1 F	GTGTCTTGCACGGAATCACC
Malat1 off 3' A1 R	GTGAACGGGGCGAACAGATTG
Malat1 off 3' A2 F	GAGCCCTTGGTAGCCCTAGT
Malat1 off 3' A2 R	AGATCCCTGAGAACATTGGCA
Malat1 off 3' A3 F	TCCCACCGTTTGTGTCTCAC
Malat1 off 3' A3 R	TCCAACCTCTGCTCCTTGCTG
Malat1 off 3' B1 F	GCTAAGACTCCCGAGATGCC
Malat1 off 3' B1 R	TCCTCCTGATTTGCAACCCC
Malat1 off 3' B2 F	AGACTTGAAGCTACTTGGGTGG
Malat1 off 3' B2 R	CAGGGTGAAGGAGGGATAAG
Malat1 off 3' B3 F	ACGAGTGGCATGCACAGTTA
Malat1 off 3' B3 R	TTCCTTACCCTCCGCTAGA
Malat1 off 5' A1 F	GAAGCAACAGGTTGTGTGTCC
Malat1 off 5' A1 R	GCTCTCAGACAAGCGACAGA
Malat1 off 5' A2 F	CAAACACGGCCTGATGGTTTC
Malat1 off 5' A2 R	GTTACGCTTGGCTTCTGTAGG
Malat1 off 5' A3 F	CTCTCAACAACCCTGACCAGT
Malat1 off 5' A3 R	TTTCTCCATTGAGGTTCCCTTCTG
Malat1 off 5' B1 F	GGTCTGGCGAGATGGGTTAG
Malat1 off 5' B1 R	GGTCAGTATTGCCAGGGGAG
Malat1 off 5' B2 F	CTCAGTGCATTTGTGTTGAGAGAG
Malat1 off 5' B2 R	TGGAAAGAACCAGATGTCACTCTC
Malat1 off 5' B3 F	GAAGCCACATCTTTTCGGGC
Malat1 off 5' B3 R	CTGCCTGGCCTCTAGCTTTC

4.1.7.6 Primer für die Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR

Name	Sequenz (5'-3')
Gapdh F	TGGAGAAACCTGCCAAGTATG
Gapdh R	TCATACCAGGAAATGAGCTTGA
Oct4 F	CCGTGAAGTTGGAGAAGGTG
Oct4 R	GAAGCGACAGATGGTGGTCT
Sox2 F	GCGGAGTGGAAACTTTTGTCC
Sox2 R	CGGGAAGCGTGTACTTATCCTT
Nanog F	TCTTCCTGGTCCCCACAGTTT
Nanog R	GCAAGAATAGTTCTCGGGATGAA
Rex1 F	GGCCAGTCCAGAATACCAGA
Rex1 R	GAACTCGCTTCCAGAACCTG
Ctdsp1 F	CCCAGTCCAGTACCTGCTTC
Ctdsp1 R	CATCTATCTCCACCGGGATG
Ctdsp2 F	GGAAGGGACCTGAGGAAAAC
Ctdsp2 R	CCTCGAAGACTGGAATCAGG
CtdspL F	GTTGAAATCGACGGAACCAT
CtdspL R	GCCAAGCTGGCAGTAAAGAG
Rest F	CATGGCCTTAACCAACGACAT
Rest R	CGACCAGGTAATCGCAGCAG
P16 ^{Ink4A} F	GTACCCCGATTTCAGGTGATG
P16 ^{Ink4A} R	GGAGAAGGTAGTGGGGTCTCT
P19 ^{ARF} F	GCTCTGGCTTTCGTGAACAT
P19 ^{ARF} R	CGAATCTGCACCGTAGTTGA
P21 ^{Cip} F	ACATCTCAGGGCCGAAAAC
P21 ^{Cip} R	GGCACTTCAGGGTTTTCTCTT
Malat1 F	TGTGACGCGACTGGAGTATG
Malat1 R	CAAAGGGACTCGGCTCCAAT
Neurod1 F	ATGACCAAATCATACAGCGAGAG
Neurod1 R	CCAGCGACACTGAGTCCTG
Neurog1 F	CCAGCGACACTGAGTCCTG
Neurog1 R	CGGGCCATAGGTGAAGTCTT
Ncam1 F	ACCACCGTCACCACTAACTCT
Ncam1 R	TGGGGCAATACTGGAGGTCA
Musashi1 F	TAAAGTGCTGGCGCAATCG
Musashi R	TCTTCGTCCGAGTGACCATCT
Map2 F	CTCCATCTCTTCAGCACGAC
Map2 R	CAGGGGTGATTGCAGTTGAT
Pax6 F	TACCAGTGTCTACCAGCCAAT
Pax6 R	TGCACGAGTATGAGGAGGTCT
Tubb3 F	TTCTGGTGGACTTGGAACTT
Tubb3 R	CGCACGACATCTAGGACTGA
NeuN F	GTAGAGGGACGGAAAATTGAGG
NeuN R	GTGGGGTAGGGGAACTGG

4.1.8 Primer zur Quantifizierung von microRNAs

microRNA	Hersteller	Cat. Nummer
snRNA U6	Qiagen	MS00033740
mmu-pre-miR-26a1	Qiagen	MP00005243
mmu-pre-miR-26a2	Qiagen	MP00005250
mmu-pre-miR-26b	Qiagen	MP00005257
mmu-miR-26-a-5P	Qiagen	MS00032613
mmu-miR-26b	Qiagen	MS00001344
mmu-miR-9-5P	Qiagen	MS00012873
mmu-miR-124-3P	Qiagen	MS00029211
mmu-miR-218-3P	Qiagen	MS00006118
mmu-miR-132-3P	Qiagen	MS00001561
mmu-miR-322-5p	Qiagen	MS00029218
mmu-miR-181a-5p	Qiagen	MS00011263
mmu-miR-210-5p	Qiagen	MS00024556

4.1.9 Plasmide

Plasmid	Antibiotika	Herkunft
PX335-U6-Chimeric_BBCBh-hSpCas9n (D10A)	Ampicillin Puromycin	Addgene; ID: #42335
psiCheck2	Ampicillin	Promega, Cat. Nummer: C8021

4.1.10 Synthetische microRNAs (miR-Mimics)

miR-mimic	Sequenz 5'-3'	Hersteller	Cat. Nummer
Negative Control#3	UUAAAGCUACCAAC CGGUUCA	Dharmacon	CN-003000-01-05
Negative Control#1	UCACAACCUCCUAG AAAGAGUAGA	Dharmacon	CN-001000-01-05
Mmu-miR-26a-5P	UUCAAGUAAUCCAG GAUAGGCU	Dharmacon	C-310519-07-0002
Mmu-miR-26b-5P	UUCAAGUAAUUCAG GAUAGGC	Dharmacon	C-310520-07-0002
Mmu-miR-124-3P	UAAGGCACGCGGUG AAUGCC	Dharmacon	C-310391-05-0002
Hairpin Inhibitor negativ Control #1	-	Dharmacon	IN-001005-01
Hairpin Inhibitor mmu-miR-26a-5P	-	Dharmacon	IH-310519-08-0002
Hairpin Inhibitor mmu-miR-26b-5P	-	Dharmacon	IH-310520-08-002

4.1.11 Enzyme

Enzym	Hersteller	Cat. Nummer
Q5 Polymerase	NEB	M0491S
Taq Polymerase	Genaxxon	M3043.0000
Trypsin-EDTA	Sigma Aldrich	59417
RNase	Sigma Aldrich	R5503
ProteinaseK	AppliChem	A3830
T4 DNA Ligase	NEB	M0202S
Restriktionsenzyme	NEB/Thermo Fisher	

4.1.12 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
DAPI	Sigma Aldrich
PBS	Sigma Aldrich
Laminin	Sigma Aldrich
DMSO	AppliChem
Ziegenserum	Merck
Ampicillin	Sigma Aldrich
Puromycin	Thermo Fisher
Trypanblau	Sigma Aldrich
Amersham ECL Select Western Blot Detection Reagent	GE Healthcare
SuperSignal West Atto ultimate sensitivity chemiluminescent substrate	Thermo Fisher
Agarose	Sigma Aldrich
ImmuMount	Thermo Scientific
Kernechtrot-Aluminiumsulfat Lösung	Carl Roth
Poly-DL- Ornithin	Sigma Aldrich

4.1.13 Kommerzielle Kits

	Hersteller	Cat. Nummer
PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Fisher	K210007
PegGOLD RNA Pure	PeqLab	30-101
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher	K1622
miScript II RT Kit	Qiagen	218161
miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen	218073
SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega	A9281
Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega	E1910
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene	200518
Amaxa Mouse ES Cell Nucleofector Kit	Lonza	VAPH-1001
Alkaline Phosphatase Kit	Merck	SCR004
RNAzol RT	Sigma Aldrich	R4533

4.1.14 Geräte

Gerät	Hersteller	Verwendung
Light Cycler 480 II	Roche	qRT-PCR Analyse
Mastercycler Nexus 2	Eppendorf	Eppendorf
Laser scanning microscope (LSM 780)	Zeiss	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie
Chemidox XRS low light imager	Biorad	Bildgebung
Cell culture microscope Evos	Life Technologies	Phasenkontrastmikroskopie
Evos XL Core	Life Technologies	Phasenkontrastmikroskopie
Heracell 150	Thermo Fisher	Brutschrank

4.1.15 Software

Software	Hersteller	Verwendung
Image J	NIH	Analyse Immunfluoreszenzen, Quantifizierung Western Blots
Photoshop 2020	Adobe	Bildprozessierung
Illustrator 2020	Adobe	Erstellen von Ergebnisabbildungen
SnapGene	GDL Biotech LLC	Klonierung, Allignment
TargetScan	Whitehead Institute for Biomedical Research	<i>In silico</i> Analyse von miRNA Zielsequenzen
Biorender	Biorender	Erstellen von Abbildungen der Einleitung
DIANA Lnc-base	University of Thessaly, Pasteur Institute	<i>In silico</i> Analyse von miR-26 Bindestellen in <i>Malat1</i>

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

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

4.2.1.1 Passagieren von Zellen

Das Passagieren erfolgte bei allen Zelltypen auf die gleiche hier beschriebene Weise. Die adhärennten Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen und 3-5 Minuten mit 0,25% Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Trypsinreaktion mit FCS-enthaltendem Medium abgestoppt und die Zellsuspension in ein steriles 15 ml Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 90 g, 5 min wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Je nach Verwendung und gewünschter Zellzahl wurden die Zellen in Medium verdünnt, auf frischen Kulturschalen ausplattiert und weiter kultiviert.

4.2.1.2 Auftauen und Kryokonservierung von Zellen

Die Zellsuspension in einem Kryoröhrchen wurde bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde dann in 9 ml warmen Medium aufgenommen und in ein steriles 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in warmem Medium resuspendiert und die Zellen in Kulturschalen überführt.

Zur Lagerung der Zellen mittels Kryokonservierung wurden diese wie in Kapitel 4.2.1.1 beschrieben von der Zellkulturschale abgelöst. Nach der Zentrifugation wurden 0,5-1x10⁶ Zellen in 1 ml Einfriermedium (90% (v/v) FCS; 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einen mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter gestellt und auf -80°C gekühlt. Nach 1-2 Tagen in -80°C konnten die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff zur längerfristigen Lagerung überführt werden.

4.2.1.3 Beschichtung von Zellkulturplastik und Deckglässern

Zur Kultivierung von ES-Zellen wurden Gewebekulturschalen oder Well-Platten mit 0,1% Gelatine in PBS für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert.

Zur Kultivierung von NPCs (*Neuronal precursor cells* / Neuronale Vorläuferzellen) während der neuronalen Differenzierung wurden Deckgläser über Nacht in 1 M HCl inkubiert. Die Deckgläser wurden anschließend zweimal mit ddH₂O und zweimal mit 100% EtOH gewaschen. Nach vollständiger Trocknung der Deckgläser wurden diese über Nacht bei 37°C

in einer 0,1 mg/ml Poly-DL-Ornithin Lösung inkubiert. Auch auf Gewebekulturschalen wurden über Nacht mit 0,1 mg/ml Poly-DL-Ornithin Lösung bei 37°C vorbehandelt. Am nächsten Tag wurden die Poly-DL-Ornithinlösung abgenommen und die Deckgläser sowie Gewebekulturschalen zweimal mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde eine Lamininlösung (2 µg/ml auf Gewebekulturschalen, 4 µg/ml auf Deckgläsern) für mindestens 3 Stunden vor dem Ausplattieren der NPCs aufgetragen.

4.2.1.4 Kultivierung von R1 ES-Zellen

R1 ES-Zellen wurden in einer Dichte von $3,9 \times 10^3$ – $4,5 \times 10^3$ Zellen/cm² auf, wie in Kapitel 4.2.1.3 beschrieben, zuvor beschichteten Gewebekulturschalen ausplattiert. Das ESC Medium (siehe Kapitel 4.1.3) wurde jeden Tag vollständig durch frisches Medium ersetzt. ES-Zellen wurden jeden zweiten bis dritten Tag wie in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben passagiert.

4.2.1.5 Bestimmung der kumulativen Populationsverdopplung von ES-Zellen

Um die kumulative Populationsverdopplung (CPD, *cumulative population doublings*) der ES-Zellen zu bestimmen, wurden $3,9 \times 10^3$ Zellen/cm² auf einer Gelatine beschichteten 6 cm Gewebekulturschale ausplattiert. 48 Stunden nach dem Ausplattieren wurden die Zellen passagiert und die Anzahl der lebenden Zellen mittels Trypanblaufärbung in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Anschließend wurden erneut $3,9 \times 10^3$ Zellen/cm² ausplattiert. Die Zellen wurden auf diese Weise für 4 Passagen kultiviert. Aus der folgenden Gleichung wurde nach jeder Passage die Populationsverdopplung errechnet: $x = \log_{10} [\log_{10}(d_0) - \log_{10}(d_2)]$ wobei d₀ der Anzahl der ausgesäten Zellen und d₂ der Zellzahl nach 48 Stunden entspricht. Durch Addition der zuvor erhaltenen Populationsverdopplungswerte wurde die kumulative Populationsverdopplung bestimmt.

4.2.1.6 Neuronale Differenzierung von ES-Zellen

Die neuronale Differenzierung wurde nach dem von Sauer *et al.* [139, 142] etablierten Protokoll durchgeführt. Dieses Protokoll, basiert auf Protokollen von Wolber *et al.* [233] und Bibel *et al.* [234]. Es ermöglicht die *in vitro* Differenzierung von pluripotenten murinen ES-Zellen zu neuronalen Vorläufer Zellen (NPCs), welche dann weiter zu Neuronen differenziert werden können. Abbildung 13 zeigt schematisch den Ablauf des neuronalen Differenzierungsprotokolls. Aus ES Zellen wurden in Suspensionskultur bis Tag 5 *Embryoid*

bodies (EBs) gebildet. Diese wurden dann, unter Zugabe von Retinsäure und Fibronectin, in die adhärenente Kultur überführt und weitere 4 Tage unter diesen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden an Tag 9 der Differenzierung vereinzelt und neu ausplattiert. Die so erhaltenen Zellen wiesen an Tag 10 der Differenzierung charakteristische Eigenschaften neuronaler Vorläuferzellen auf. Nach weiteren 5 Tagen hatte sich ein Dichtes Netzwerk an Neuriten der ausdifferenzierten Zellen gebildet.

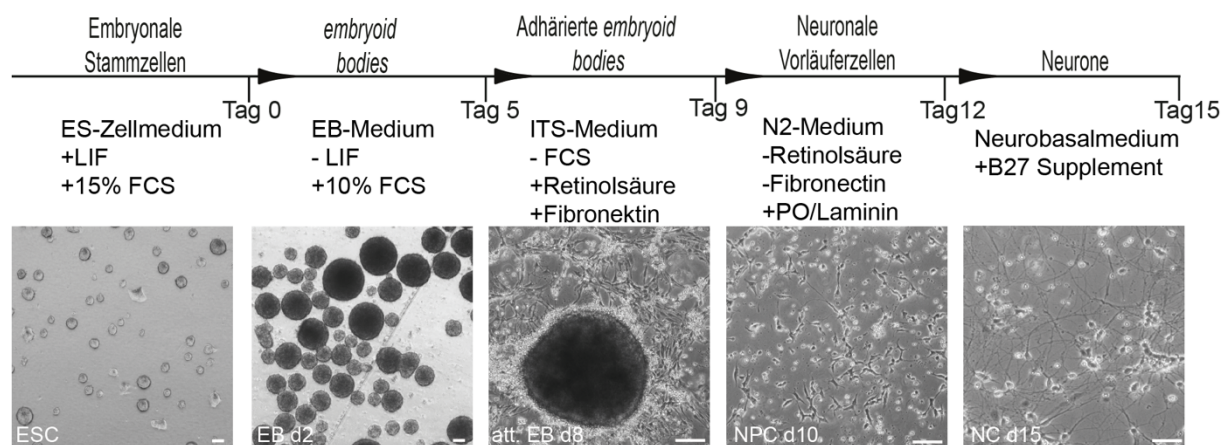


Abbildung 13 Neuronale Differenzierung aus ES-Zellen

Schematische Abbildung des in dieser Arbeit verwendeten ES-Zell basierendem neuronalem Differenzierungssystem. Zu sehen sind repräsentative Phasenkontrastaufnahmen der unterschiedlichen Stadien der Differenzierung sowie die Zeitpunkte, zu denen die Kulturbedingungen verändert wurden. Maßstab: 100 μm

Zu Beginn der Differenzierung wurden 3×10^6 ES-Zellen in 10 ml EB-Medium in 10 cm Petrischalen ausplattiert. Am 2. und am 4. Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Dazu wurde das Medium vollständig in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nachdem sich nach einigen Minuten alle *embryoid bodies* (EBs) abgesetzt hatten, wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. An Tag 5 der Differenzierung wurde dieser Vorgang wiederholt. Allerdings wurde das Medium dabei durch ein neuronales Selektionsmedium ersetzt (ITS-Medium dem frisch 5 $\mu\text{g/ml}$ Fibronectin sowie 5 μM Retinsäure zugegeben wurden) und die Zellen auf 10 cm Gewebekulturschalen ausplattiert. An Tag 7 erfolgte ein Mediumwechsel bei den nun adhärenenten EBs. Am 9. Tag der Differenzierung wurden die Zellen gewaschen, trypsiniert und in einer Dichte von $0,6 \times 10^6$ Zellen/ cm^2 auf Poly-DL-Ornithin und Laminin beschichteten Gewebekulturschalen oder Deckgläsern (siehe Kapitel 4.2.1.3) in N2-Medium ausplattiert. Das Medium wurde 3 Stunden und 24 Stunden nach dem Umsetzen der Zellen gewechselt. Ab Tag 11 der Differenzierung wurden die entstandenen NPCs in Neurobasal-Medium kultiviert. Es erfolgte ein weiterer Mediumwechsel an Tag 13 der Differenzierung.

4.2.1.7 Immunhistochemische Färbung von adhärenenten Zellen

Für die immunhistochemische Färbung von Zellen wurden diese, wie in Kapitel 4.2.1.6 beschrieben, auf Deckgläsern kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend zur Fixierung 20 Minuten mit 3,7% PFA in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden das PFA von den Zellen entfernt und diese dreimal mit PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten in einer dunklen, feuchten Kammer. Zur Permeabilisierung und Blockierung wurden die Zellen mit einer Blockierlösung, für die 0,1% Triton X-100, 0,1% Tween-20, 1% Rinderserumalbumin (BSA) und 2% Ziegenserum in PBS verdünnt werden, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die primären Antikörper in Blockierlösung verdünnt und über Nacht bei 4°C auf den Zellen inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser dreimal durch Eintauchen in PBS gewaschen. Als sekundäre Antikörper wurden Cyanin 2 (Cy2)- oder Cyanin 3 (Cy3)- markierte anti-Maus, anti-Kaninchen oder anti-Ratte Antikörper in Blockierlösung verdünnt und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf den Deckgläsern inkubiert. Im Anschluss wurden die Deckgläser wieder dreimal in PBS gewaschen. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 1:50 in PBS verdünnt und 5 Minuten auf den Deckgläsern inkubiert und anschließend wieder dreimal in PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden mit einem Tropfen ImmuMount (Fisher Scientific) eingebettet und über Nacht im Kühlschrank zum Aushärten gelagert. Die Proben wurden mit einem konfokalen Mikroskop (LSM780, Carl Zeiss) analysiert. Die Bilder wurden mit der ZEN Imaging Software (Carl Zeiss) erstellt. Zur Quantifizierung der Marker-positiven (+) Zellen wurde ImageJ (NIH) verwendet. Die Anzahl der Marker-+ Zellen wurde ausgezählt und das Verhältnis zur totalen Zellzahl (DAPI gefärbte Zellkerne) gesetzt. Für die Quantifizierung wurden 10 zufällige Bildausschnitte (850 μ M x 850 μ M) je Experiment ausgewertet. Zur Messung der Neuritendichte wurde mit Hilfe von ImageJ ein Raster über die Bilder gelegt und die Schnittpunkte der Neuriten mit dem Raster gezählt. Diese wurden mit der Anzahl der Zellen (DAPI gefärbte Zellkerne) verrechnet, um die Schnittpunkte pro Zelle zu bestimmen.

4.2.1.8 Transfektion

Für die Transfektion von miR-*Mimics* und Luziferase-Reporter-Konstrukte in HEK293T Zellen wurde Lipofectamin 2000 (ThermoFisher) nach Herstellerangaben verwendet. Das Protokoll in Kürze: HEK293T Zellen wurden am Vortag auf 24-Well Platten in Antibiotikafreiem Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurde pro 24-Well 0,8 μ g Plasmid DNA und 50 nM miR-*Mimics* mit 2 μ l Lipofectamin für die Transfektion verwendet. 6 Stunden nach der Transfektion erfolgte

ein Mediumwechsel. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zur Durchführung eines Luziferase-Reporter Assays geerntet.

Für die Transfektion von NPCs an Tag 9 der Differenzierung mit miR-*Mimics* und miR-Inhibitoren wurden NPCs auf 6-Well Platten ausgesät und 3 Stunden nach dem Ausplattieren das Medium gewechselt. Anschließend wurden je Transfektionsansatz 50 nM der *Mimics* oder Inhibitoren zusammen mit 7,5 µl TransIT-X2 (Mirus) in 250 µl Medium resuspendiert und auf die Zellen gegeben. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Zur weiteren Analyse wurden die Zellen 72 Stunden nach der Transfektion lysiert.

4.2.1.9 BrdU-Markierung

An Tag 10 oder Tag 12 der neuronalen Differenzierung wurde das entsprechende Kulturmedium gegen dasselbe Medium ausgetauscht, dem 10 µM Bromdesoxyuridine (BrdU) zugesetzt wurden. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und anschließend fixiert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 3,7% PFA in PBS 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Hydrolyse der DNA wurden die Zellen im Anschluss 30 Minuten in 1,5 M HCl inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS konnte BrdU immunhistochemisch gefärbt (siehe Kapitel 4.2.1.7) werden.

4.2.1.10 Nachweis der Seneszenz-assoziierten (SA) β-Galaktosidase Aktivität

Der Nachweis der SA β-Galaktosidase Aktivität erfolgte nach der von Debacq-Chainiaux *et al.* [235] publizierten Methode. Das Protokoll in Kürze: Die Zellen wurden an Tag 10 oder an Tag 12 der neuronalen Differenzierung zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden dann zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, anschließend wurden 0,5 ml Färbelösung (40 mM Zitronensäure/ Natriumphosphat Puffer pH 6, 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(II)-trihydrate, 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III), 150 mM Natriumchlorid, 0,2 mM Magnesiumchloridhexahydrate, 1 mg/ml X-Gal (20 mg/ml in N,N-Dimethylformamide) alle Reagenzien: Sigma Aldrich) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit der Färbelösung 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Färbelösung abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Kernechtrot-Ammoniumsulfatlösung (Carl Roth) für 15 Minuten gefärbt und zweimal mit

PBS gewaschen. Die gefärbten Präparate wurden mittels digitaler Lichtmikroskopie dokumentiert und ausgewertet (Evos XL Core Mikroskop).

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Herstellung chemischer kompetenter *E.coli* Stable3 Zellen wurde eine Variante der von Hanahan *et al.* [236] publizierten Methode verwendet. Dazu wurde eine Übernachtskultur in 250 ml SOB Medium angeimpft und bei Raumtemperatur und 180 rpm im Bakterienbrutschrank kultiviert. Die Kultur wurde bis zu einer OD von 0.3 inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend bei 3000 rpm und 4°C 10 Minuten abzentrifugiert und in 80 ml eiskaltem CCMB80 Puffer resuspendiert. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen wieder abzentrifugiert und die Zellen in 10 ml CCMB80 Puffer resuspendiert. 50 µl der Zellsuspension wurden zur OD Bestimmung mit 200 µl SOB Medium vermischt. Die Zellsuspension wurde mit CCMB80 Puffer so verdünnt, dass bei dieser Messung die OD zwischen 1-1.5 lag. Dann wurden 50 µl Zellsuspension aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.2.2 Hitzeschocktransformation von kompetenten Bakterien

Zur Transformation chemisch kompetenter Bakterien wurden diese auf Eis aufgetaut und entweder 5 µl Ligationsansatz oder 100 ng Plasmid DNA zugegeben. Die Bakterien/DNA Suspension wurde vorsichtig gemischt und anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte ein Hitzeschock von 42°C für 30 Sekunden im Heizblock. Danach wurden die Zellen zunächst 5 Minuten auf Eis inkubiert, danach mit 450 µl SOC-Medium vermischt und eine Stunde bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Zuletzt wurden die Bakterien auf Agarplatten, die ein dem Vektor entsprechendes Selektionsantibiotikum enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.2.3 Isolation von Plasmid DNA im Mini-Präparationsformat

Zur Isolation von Plasmid DNA aus Bakterien im Mini-Präparationsformat wurde das Prinzip der alkalischen Lyse verwendet. Dazu wurden Bakterien aus 1,5 ml Übernachtskultur abzentrifugiert und in 150 µl Lösung 1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, 50 µg RNase) resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zugabe von 150 µl Lösung II (0,2 N NaOH, 1% (w/v) SDS) und 30-sekündiger Inkubation lysiert. Die Neutralisation

erfolgte durch Zugabe von 150 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat, pH 5.2). Anschließend wurden die Proben 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Den Proben wurden zwei Tropfen Chloroform zugesetzt, gemischt und anschließend 5 Minuten mit 13.000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit 1 ml 100%igem Ethanol vermischt und die DNA 30 Minuten bei -20°C gefällt. Die Proben wurden 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, dann einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen und das Pellet anschließend in Wasser aufgenommen.

4.2.2.4 Isolation von Plasmid DNA im Maxi-Präparationsformat

Die Isolation von Plasmid DNA aus Bakterien im Maxi-Präparationsformat erfolgte mit dem PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben.

4.2.2.5 Restriktionsverdau

Zur Herstellung von Plasmiden wurden DNA-Fragmente und Plasmidvektoren durch Restriktionsverdau geschnitten. Dazu wurden Puffer und Enzyme von Thermo Fisher oder NEB verwendet. Für den Verdau wurden 1-5 U des Enzyms in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 1-3 Stunden bei 37°C zusammen mit der DNA inkubiert. Die verdaute DNA wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und aufgereinigt.

4.2.2.6 Agarosegelelektrophorese

DNA wurde zur Analyse elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Dazu wurden 0,5-1,5%ige Agarosegele in 1x TBE Puffer mit 0,7 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Beladung des Gels mit 100-120 mA in 1x TBE als Laufpuffer. Als Größenstandard wurde entweder der GeneRuler 1 kb Ladder oder der GeneRuler1 kb plus Ladder (beide Thermo Scientific) verwendet. Die DNA wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung in der Geldokumentationseinheit unter UV-Licht visualisiert. Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurden die gewünschten Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mit dem SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

4.2.2.7 Oligonukleotid Annealing

Zur Klonierung von sgRNA (*single guide* RNA) wurden die Oligonukleotide vor dem Einbau in den Vektor pX335 annealt. Hierfür wurde folgender Ansatz verwendet:

100 μ M Sense Oligo	1 μ l
100 μ M Antisense Oligo	1 μ l
10x T4 Ligase Buffer NEB	1 μ l
H ₂ O	7 μ l
Σ	10 μ l

Die Reaktionsgefäße wurden zusätzlich mit Parafilm verschlossen, in einen Behälter mit 95°C heißem Wasser gegeben und über einen Zeitraum von 2-3 Stunden im Wasser auf Raumtemperatur abgekühlt. Die annealten Oligonukleotide wurden anschließend direkt in einen mit BbsI verdauten Vektor ligiert.

4.2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-Fragmenten wurde die T4 Ligase (NEB) in T4 Ligase Puffer mit ATP (NEB) nach Herstellerangaben verwendet. Die Ligationen wurden im Vektor/Insert-Verhältnis 1:3 oder 1:5 für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C durchgeführt. Um Religationen auszuschließen, wurde für jede Ligation eine Kontrollreaktion ohne Zugabe von Insert durchgeführt. Die Ligation wurde anschließend, wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, in kompetente *E.coli* transformiert.

4.2.2.9 Site directed mutagenesis

Das Einfügen gerichteter Punktmutationen wurde mit dem *QuickChange Site-Directed Mutagenesis* Kit (Stratagene) nach Herstellerangaben mittels PCR durchgeführt. Dabei wurden die gewünschten Mutationen in den Primern angelegt. Die Primer wurden so designt, dass 4 Basenpaare in den gewünschten miRNA Zielsequenz ausgetauscht wurden. Nach der Amplifizierung des eingesetzten Plamids, wurde das Ursprungsplasmid durch Verdau mit 1 U DpnI für 1 Stunde bei 37°C entfernt. Der Ansatz wurde im Anschluss gleich in kompetente Bakterien transformiert und entstandene Kolonien mittels Kolonie PCR untersucht.

4.2.2.10 RNA Isolation

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen oder Geweben wurde PqGold RNA Pure (Pqgold) oder RNazol RT (Sigma Aldrich) nach Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration der RNA wurde nach der Isolation photometrisch mit dem Eppendorf Photometer bestimmt.

4.2.2.11 cDNA Synthese

Zur Herstellung von cDNA wurden die zuvor extrahierte Gesamt-RNA mittels der M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) reversen Transkriptase revers transkribiert. Die Reaktion wurde mit den Komponenten des *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher) unter Verwendung des Random Hexamer Primers (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Protokoll in Kürze:

	Menge	Temperatur	Zeit
Verdau genomischer DNA		Verdau genomischer DNA	
RNA	1 µg	37°C	30 min
10x DNase Puffer	1 µl		
200 U/µl DNaseI	1 µl		
DEPC H ₂ O	x µl		
	10 µl		

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 50 mM EDTA und Inkubation bei 65°C für 10 Minuten abgebrochen. Im Anschluss wurde 1 µl Random Hexamer Primer zugegeben und dieser für 5 Minuten bei 65°C annealt. Danach erfolgte die cDNA Synthese nach folgendem Schema:

cDNA Synthese		cDNA Synthese	
10 mM 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
DEPC H ₂ O	0,4 µl		
M-MLV RT Enzym	0,6 µl		

cDNA für die Expressionsanalysen von Vorläufer- und maturen miRs wurden aus Gesamt-RNA Extrakten mit dem miSCRIPT II RT Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben synthetisiert.

4.2.2.12 Quantitative real-time-PCR zum Nachweis spezifischer Transkripte und microRNAs

Zur Analyse der Genexpression durch quantitative real-time-PCR (qRT-PCR) wurde cDNA verwendet. Die verwendeten Primer sind in Kapitel 4.1.7.6 aufgelistet und wurden so designt, dass die amplifizierte Sequenz Exon-überspannend liegt, das Primerpaar ähnliche Schmelztemperaturen besitzt, sowie ein Produkt mit einer Größe von 90-200 bp entsteht. Die

Primer wurden mit dem NCBI Primer Blast Programm designt und auf ihre Spezifität geprüft. Die optimale Annealing Temperatur wurden vor der Verwendung in der qRT-PCR mittels Gradienten-PCR ermittelt. Die PCR Reaktion wurde nach folgendem Schema pipettiert und die PCR-Reaktion mit den folgenden Einstellungen an einem LigthCycler480II (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
55-64°C	20 s			10 µM Antisense Primer 2,5 µl
72°C	30 s			2x GreenMasterMix 10 µl
80°C	20 s			H ₂ O 4 µl
50°C	1 min			20 µl
65-95°C	0,5°C/5 s			
40°C	∞			

Zur Bestimmung von Expressionslevel maturer und Vorläufer-miRs wurde cDNA mit dem miSCRIPT II RT Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben synthetisiert. Die qRT-PCR wurde ebenfalls nach Herstellerangaben mit dem GreenMasterMix (Genaxxon) den in 4.1.8 gelisteten Primer Assays (Qiagen) und 2 µl cDNA an einem LigthCycler480II (Roche) durchgeführt.

Zur Bestimmung der relativen Expressionslevel von mRNAs und miRNAs wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode angewandt. Zyklusschwellenwerte (*Ct-values*) wurden auf GAPDH oder RNU6 normalisiert.

4.2.2.13 Isolation genomischer DNA aus ES-Zellen

Zur Isolierung genomischer DNA wurden Zellen durch Zentrifugation (100 g, 5 min) pelletiert, mit 1xPBS gewaschen und in 500 µl Lysispuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1% Proteinase K wurden die Proben mindestens 16 h bei 56°C und 700 rpm im Schüttelheizblock lysiert. Anschließend wurde 1% RNase zugegeben und die Proben für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach folgten zwei Extraktionsschritte mit je 500 µl Phenol-Chloroform und die Präzipitation mit dem zweifachen Proben-Volumen 100% EtOH bei -20°C. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C pelletiert, zweimal mit 70% EtOH gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde dann in Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

4.2.2.14 Endpunkt PCR zur Überprüfung der CRISPR/Cas9-vermittelten Deletionen

Um CRISPR/Cas9 vermittelte Deletionen in ES-Zellen zu überprüfen, wurden Endpunkt PCR Analysen mit genomischer DNA durchgeführt. Für die PCR wurden Primer entworfen, die außerhalb der zu deletierenden Sequenz hybridisieren und eine Amplifikation nur erfolgte, wenn die Deletion des gewünschten Bereiches erfolgt war. Zur Kontrolle wurden außerdem Primer verwendet, die in dem zu deletierenden Bereich hybridisieren. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen fand mit diesen Primern nur eine Amplifikation von Allelen statt, bei denen keine Deletion des fraglichen Bereiches erfolgt war. Mit Hilfe dieser beiden unterschiedlichen Primerpaaren war es möglich heterozygote und homozygote Deletionen zu unterscheiden. Die Bedingungen für die Endpunktanalyse sind im Folgendem aufgeführt:

gDNA	1 μ l	Temperatur	Zeit	Zyklen
Buffer E	2,5 μ l	94°C	5 min	
10 mM dNTPs	0,5 μ l	94°C	30 s	
10 μ M Sense Primer	2,5 μ l	60-64°C	1 min	35x
10 μ M Antisense Primer	2,5 μ l	72°C	1 min	
Taq-Polymerase	0,25 μ l	72°C	5 min	
H ₂ O	15,75 μ l	4°C	∞	
	25 μ l			

4.2.2.15 Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Sequenzierungen von Plasmiden und PCR-Produkten wurde von den Firmen Eurofins oder Microsynth durchgeführt.

4.2.2.16 Western Blot

Für den Nachweis von Proteinen wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurden Zellen trypsinisiert und gezählt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, das Pellet mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/100 μ l 2x Lämmli Puffer aufgenommen und mit Hilfe einer 21er Kanüle lysiert. Im Anschluss wurden die Proben für 10 Minuten bei 95°C aufgekocht. Für die Auftrennung der Proteine wurden 12%ige SDS-Gele verwendet und die Proteine bei 60 mA der Größe nach aufgetrennt.

Nach erfolgreicher Auftrennung der Proteine wurden diese mit 300 mA für 2 Stunden auf eine Membran aus Nitrozellulose geplottet. Die Membran wurde anschließend mit 5% Milchpulver, 0,05% Tween-20 in TBS 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert gefolgt von der Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 10 Minuten in TBS-T gewaschen, gefolgt von der Inkubation mit dem sekundären HRP (*Horseradish peroxidase*)-gekoppelten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren 10-minütigen Waschschritten mit TBS-T wurde die Membran mit einem Western Blot Nachweis-Reagenz bedeckt und 5 Minuten im Dunklen inkubiert. Die entstandene Chemilumineszenz wurde mit der Geldokumentationseinheit Chemidoc XRS-Imager (BioRad) aufgenommen. Zur Quantifizierung wurde mit Hilfe der ImageJ-Software (NIH) die Bandenintensität ermittelt und gegen ein Referenzprotein (GAPDH) verrechnet.

4.2.2.17 Kolonie-PCR

Um Bakterienkolonien auf eine erfolgreiche Transformation zu testen, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Dafür wurde ein PCR-Ansatz pipettiert und in dem Ansatz eine gepickte Bakterienkolonie resuspendiert. Außerdem wurde diese Bakterienkolonie auf eine Agarplatte überführt, damit später mit dem jeweiligen Bakterienklon weitergearbeitet werden konnte.

4.2.2.18 Luziferase-Reporter Assay

Luziferase-Reporter Assays wurden mit dem *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Luziferase-Aktivität wurde mit dem *GloMax Luminometer* (Promega) gemessen. Zur Bestimmung der relativen Luziferase-Aktivität wurde die *Firefly*-Luziferase-Aktivität auf die *Renilla*-Luziferase-Aktivität normalisiert.

5 Ergebnisse

5.1 miR-26 reguliert die neuronale Genexpression durch direkte Interaktion mit Komponenten des REST-Komplexes

5.1.1 REST und CTDSP2 sind direkte Ziele der miR-26 Familie

In Vorarbeiten von Dr. Mark Sauer [142] konnte gezeigt werden, dass die miR-26 ein entscheidender Faktor für die terminale Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu Neuronen ist. Weitere globale RNA Analysen deuten auf eine direkte Regulation der Neurogenese über den REST-Komplex hin. Um die potentielle posttranskriptionelle Regulation von REST-Komplex Komponenten durch miR-26 zu untersuchen, wurde zunächst eine *in silico* Analyse der miR-26 Zielsequenzen in der 3'untranslatierten Region (3'UTR) von REST-Komplex Komponenten durchgeführt. Diese Analyse ergab, dass in der 3'UTR von *Ctdsp2* und *CoRest* je eine miR-26 Zielsequenz vorhanden ist. Diese miR-26 Zielsequenzen liegen in Vertebraten hochkonserviert vor. In der *Rest* 3'UTR konnten zwei miR-26 Zielsequenzen identifiziert werden, von denen nur eine hochkonserviert in Vertebraten vorkommt. Abbildung 14 zeigt einen Sequenzvergleich der vorhergesagten miR-26a Zielsequenzen in *Mus musculus* (mmu), *Homo sapien* (hsa) sowie *Rattus norvegicus* (rno). Hier wird die hohe Konservierung dieser Zielsequenzen deutlich. Durch die hohe Sequenzübereinstimmung innerhalb der miR-26 Familie können die für die miR-26a vorhergesagten Zielsequenzen auch als Zielsequenzen für miR-26b angenommen werden.

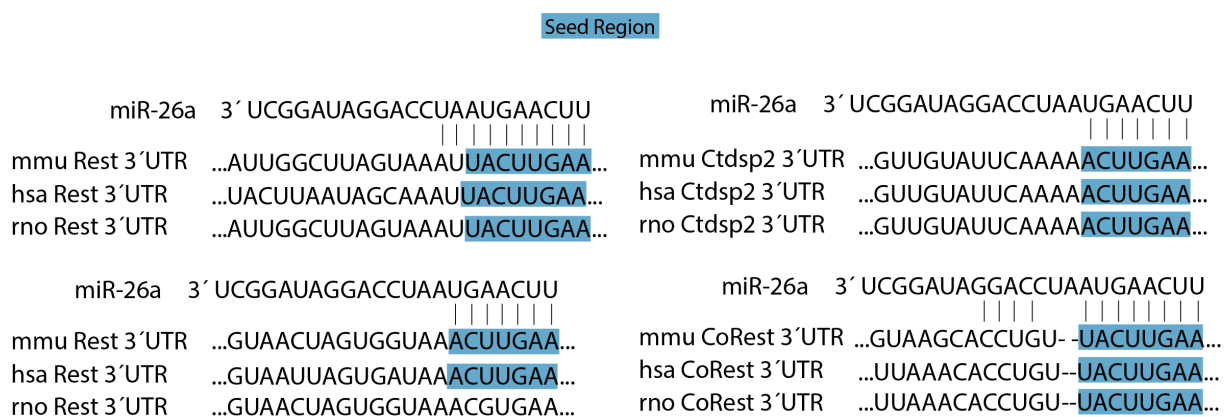


Abbildung 14 *In silico* Analyse der miR-26 Zielsequenzen in den 3'UTRs von REST-Komplex Komponenten

Vorhersage von miR-26 Zielsequenzen am Beispiel der miR-26a mittels TargetScan [237]. Die miR-26 Seed Regionen sind blau markiert. (mmu: *Mus musculus*; hsa: *Homo sapiens*; rno: *Rattus norvegicus*)

Um zu untersuchen, ob die *in silico* als mögliche miR-26 Ziele identifizierten REST-Komponenten direkt von miR-26 angesteuert werden, wurden Luziferase-Reporter-Studien durchgeführt. Hierfür wurden zunächst Fragmente der zu untersuchenden 3'UTRs, die die miR-26 Zielsequenzen enthielten, in den Luziferase-Reporter-Gen-Vektor psiCheck2 (Promega) kloniert. Das Schema (Abb. 15 A) zeigt die Position der inserierten 3'UTRs im Vektorkontext. Das Prinzip des Assays beruht auf der Kotranskription einer 3'UTR mit der daran fusionierten *Renilla*-Luziferase. Eine miR-vermittelte Repression der 3'UTR wird im Assay durch eine gegenüber der negativ-Kontrolle verminderten Luziferase-Aktivität gemessen. Eine *Firefly*-Luziferase, die unter der Kontrolle eines unabhängigen Promotors steht, wurde zur Normalisierung der Luziferase-Aktivitäten verwendet. Um zu überprüfen, ob eine Veränderung der Luziferase-Aktivität spezifisch auf die Interaktion der kotransfizierten miR-26 *Mimics* zurückzuführen war, wurden Konstrukte mit Basenaustauschen in der Seed Region der putativen miR-26 Zielsequenzen in den 3'UTRs generiert. Die Luziferase-Reporter-Konstrukte wurden zusammen mit negativ-Kontroll-*Mimics* (Cel-miR-75-3P), sowie miR-26a, miR-26b, miR-9 oder miR-124 *Mimics* in HEK293T Zellen transfiziert. Dabei dienten miR-9 und miR-124 als positiv-Kontrollen, da die Regulation von REST-Komplex Komponenten durch diese miRNAs schon gezeigt wurden [144, 146]. Zudem enthielten die verwendeten Abschnitte der 3'UTRs der REST-Komplex Komponenten miR-9 oder miR-124 Bindestellen.

Abbildung 15 B zeigt, dass nach Transfektion von miR-26a, von miR-26b und von miR-124 *Mimics* die Luziferase-Aktivität des REST-3'UTR Luziferase-Reporters gegenüber der Kontrolle um etwa 55% reduziert war. Die Luziferase-Aktivität nach Transfektion eines Konstruktes mit mutierter 8mer-miR-26 Zielsequenz war nach Kotransfektion mit miR-26 *Mimics* nicht signifikant von der Aktivität der mit negativ-Kontroll *Mimics* transfizierten Proben unterschieden. Im Gegensatz hierzu zeigte sich nach Kotransfektion dieses mutierten Konstruktes mit miR-124 *Mimics* eine signifikant verminderte Luziferase-Aktivität. Das Konstrukt, bei dem die 7mer-miR-26 Zielsequenz mutiert war, zeigte im Vergleich zur unmutierten Variante keine Unterschiede. Hieraus lässt sich schließen, dass miR-26 die *Rest* mRNA über spezifische Bindung der 8mer-Zielsequenz, aber nicht über Bindung an die weniger konservierte 7-mer Zielsequenz, reguliert.

Nach Kotransfektion von miR-26a, von miR-26b und von miR-9 *Mimics* mit dem 3'UTR *Ctdsp2*-Reporterkonstrukt, zeigte sich auch hier eine gegenüber der negativ-Kontrolle verminderte Luziferase-Aktivität (ca. 60% des Kontrollniveaus). Nach Kotransfektion eines Reporter-Konstrukts mit mutierter miR-26 Zielsequenz wurde keine signifikante Reduktion der

Luziferase-Aktivität gegenüber der negativ-Kontrolle gemessen, während nach Kotransfektion dieses mutierten Konstruktes mit miR-9 *Mimics* die Luziferase-Aktivität signifikant reduziert war. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch *Ctdsp2* direkt über miR-26 reguliert wird.

Die Kotransfektion von miR-26a, von miR-26b und von miR-124 *Mimics* mit dem 3'UTR *CoRest*-Reporterkonstrukt ergab gegenüber der negativ-Kontrolle eine Reduktion der Luziferase-Aktivität auf etwa 80%. Die Kotransfektion des mutierten Konstruktes mit miR-26 *Mimics* ergab allerdings, dass auch hier die Luziferase-Aktivität ca. 80% des Niveaus der negativ-Kontrolle erreichte. Dies deutet nicht auf eine direkte Regulation der *CoRest* mRNA durch miR-26 hin, sondern lässt vermuten, dass es sich hierbei um einen indirekten Effekt handelt. Diese Ergebnisse zeigten, dass im Gegensatz zu der *Rest* 3'UTR und der *Ctdsp2* 3'UTR die *CoRest* 3'UTR kein direktes Ziel der miR-26 darstellt.

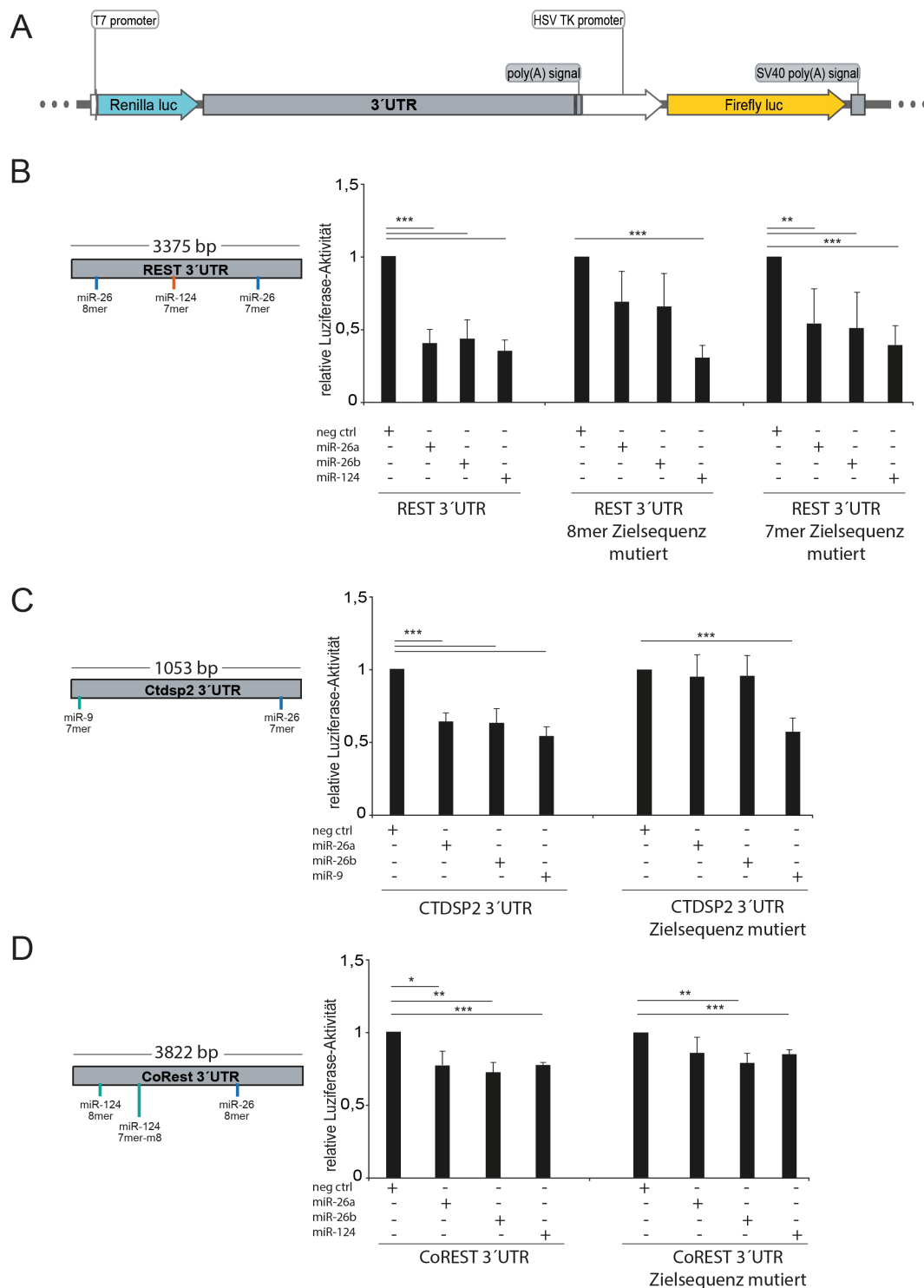


Abbildung 15 Validierung der miR-26 Zielsequenzen in Ctdsp2, Rest und CoRest mittels Luciferase-Reporter Assays

A) Schematische Darstellung des verwendeten Reportergenkonstruktes. Die *Renilla*-Luciferase wird zusammen mit der daran fusionierten miRNA-Zielsequenz enthaltenden 3'UTR transkribiert. Zur Normalisierung ist eine *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle eines unabhängigen Promotors in dem Konstrukt kodiert. B-D) Links: Schematische Darstellung des verwendeten Teils der 3'UTR von *Rest* (B), *Ctdsp2* (C) und *CoRest* (D) und die untersuchten miRNA Zielsequenzen. Rechts: Relative Luciferase-Aktivität nach Kotransfektion von Reportergenkonstrukten mit Wt oder mutierten miR-26 Zielsequenzen und den Kontroll-, miR-26a-, miR-26b-, miR-124 oder miR-9 *Mimics* in Hek293T Zellen. 24 h nach der Transfektion wurden die *Renilla*-Luciferase-Aktivitäten bestimmt und auf die *Firefly*-Luciferase-Aktivitäten normalisiert. n=5, einseitiger Anova-Test, *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,005.

5.1.2 Generierung von ES-Zellen mit *Rest* oder *Ctdsp2* miR-26 Zielsequenz *Deletionen*

Die mit HEK293T Zellen durchgeführten Reporteranalysen zeigten, dass die 3'UTRs von *Rest* und *Ctdsp2* potentiell direkte Ziele miR-26-vermittelter Regulation darstellten. Als nächstes sollte daher untersucht werden, ob die endogenen *Rest* und *Ctdsp2*-Transkripte miR-26 Ziele in undifferenzierten und differenzierenden ES-Zellen darstellen und ob sich hieraus Konsequenzen für die neurale ES-Zell-Differenzierung ergeben. Aus diesem Grund wurden ES-Zellen mit Deletionen der miR-26 Zielsequenz in der 3'UTR des endogenen *Rest* bzw. des endogenen *Ctdsp2* Gens mittels CRISPR/Cas9 hergestellt. Für die Herstellung dieser Zelllinien wurde ein CRISPR/Cas9-Nickase-Vektor verwendet, der ein Cas9 Protein mit mutierter RuvC Domäne kodiert. Diese Mutation führt zum Verlust einer Cas9 Nukleasedomäne, so dass das Enzym nur noch Einzelstrangbrüche, sogenannte *Nicks*, in die DNA einfügen kann. Ein Vorteil der Verwendung dieser Cas9-Nickase ist die erhöhte Spezifität, die hiermit erreicht werden kann, da zur Einführung eines Doppelstrangbruchs zwei Cas9-DNA-Nickasen an gegenüberliegenden *single guided* (sg)RNA-Bindesequenzen notwendig sind. Auf diese Weise kann die Frequenz an *Off-Target*-Mutationen deutlich verringert werden [238-240]. Durch Verwendung dieses Systems kann weiterhin eine höhere Deletions-Effizienz erreicht werden [241]. Für die Einführung von kleinen Deletionen mittels des Cas9-DNA-Nickase-Systems wird nur ein Paar von sgRNAs benötigt, welches gegenüberliegende Bindesequenzen auf der DNA benötigt, während für größere Deletionen zwei Paare von sgRNAs nötig sind.

Für die Deletion der miR-26 Zielsequenz in der 3'UTR von *Ctdsp2* wurden zwei sgRNAs und für die Deletion der miR-26 Zielsequenz in der *Rest* 3'UTR vier sgRNAs in WT R1 ES-Zellen eingebracht. Abbildung 16 A zeigt schematisch die Lage der 3'UTRs, sowie die Positionen der verwendeten sgRNAs. Die ES-Zellen wurden nach der Transfektion selektioniert und mittels genomischer PCR-Analysen genotypisiert. Für die Genotypisierung der *Ctdsp2* miR-26 Zielsequenz KOs (*Ctdsp2* ts KO) wurde einer der beiden PCR-Primer so entworfen, dass er in dem zu deletierenden Bereich hybridisierte. Somit sollte nach erfolgreicher Deletion der miR-26 Zielsequenz kein PCR-Produkt mehr entstehen. Da bei der Generierung des *Rest* miR-26 Zielsequenz KOs (*Rest* ts KO) auf Grund der Lage der sgRNA Bindestellen ein größerer Bereich (ca. 200 bp) deletiert wurde, wurden Primer 3' und 5' des deletierten Bereiches gewählt. Bei erfolgreicher Deletion der miR-26 Zielsequenz konnte somit ein um ungefähr 200 bp kleineres PCR-Produkt, im Vergleich zu dem PCR-Produkt aus WT-Proben, erwartet werden. Für die Analysen in dieser Arbeit wurden jeweils zwei unabhängige ES-Zellklone verwendet, um eine klonale Variabilität zu kontrollieren. Um eine Kontamination der Einzelzellklone mit

WT ES-Zellen auszuschließen wurde die Genotypisierungs-PCR nach einigen Passagen wiederholt. Die Ergebnisse der Genotypisierungs-PCR für die in dieser Arbeit verwendeten Klone (*Ctdsp2* ts KOs: CCC17#4, CCC17#19; *Rest* ts KOs: CCC18#68, CCC18#35) ist in Abbildung 16 B gezeigt. Außerdem wurden weitere genomische PCRs durchgeführt, bei denen jeweils ein größerer Bereich der 3'UTR inklusive der miR-26 Zielsequenz amplifiziert wurde. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert. Der Sequenzvergleich (Abb. 16 C) zeigte, dass sowohl in den *Ctdsp2* ts KOs als auch in den *Rest* ts KOs der Bereich der 3'UTR, der die miR-26 Zielsequenz enthielt, erfolgreich deletiert war. Eine direkte Regulation der *Ctdsp2*- und *Rest*-mRNA durch miR-26 sollte in diesen Zellen somit nicht mehr möglich sein.

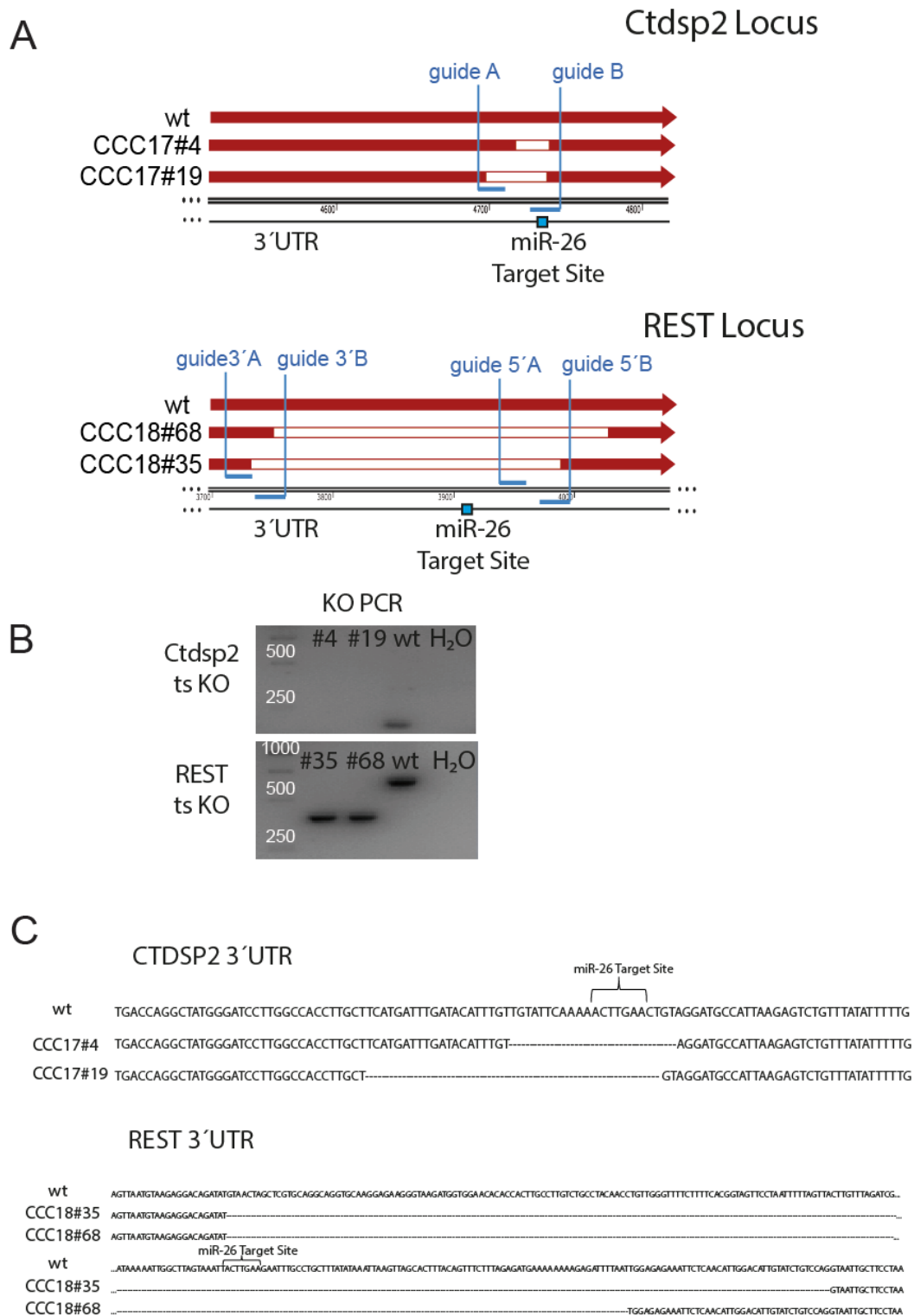


Abbildung 16 Generierung und Validierung der Ctdsp2 und Rest ts KO ES-Zelllinien

A) Schematische Darstellung der Bindestellen-Position (in blau) der verwendeten sgRNAs und der miR-26 Zielsequenz in der 3'UTR von *Ctdsp2* und *Rest*. Alignment der Wt, *Ctdsp2* ts KO oder *Rest* ts KO Gensequenzen mit dem jeweiligen chromosomalen Locus. B) Gelbild der PCR-Produkte der Genotypisierungs-PCRs der *Ctdsp2* und *Rest* ts KO nach Agarosegelelektrophorese. C) Alignements der genomischen Sequenzierungsergebnisse der *Ctdsp2* und *Rest* ts KO ES-Zelllinien mit der Wt Sequenz.

Trotz der erhöhten Spezifität der verwendeten Cas9-DNA-Nickase kann es bei der Generierung von Deletionen zu *Off-Target* Mutationen kommen. Um dies weitgehend auszuschließen, wurden die in *silico* Top 3 priorisierten *Off-Target* Zielsequenzen für jede verwendete sgRNA überprüft. Die *Off-Target* Zielsequenzen wurden entsprechend der Sequenzhomologie zur sgRNA priorisiert (*Missmatch*). Für diese Analyse wurde für jede vorhergesagte genomische *Off-Target* Sequenz ein Primerpaar entworfen, das dann der spezifischen Amplifikation der fraglichen genomischen Region mittels PCR diente. Die generierten PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert und das Ergebnis der Sequenzierung mit der Referenzgenomsequenz (*Mus musculus* (mmu) GRCm39 des National Center for Biotechnology Information (NCBI)) verglichen. Alle in dieser Arbeit verwendeten ES-Zellklone wurden auf diese Weise analysiert. Abbildung 17 zeigt beispielhaft das Alignment der am höchsten priorisierten *Off-Target* Sequenz, der zur Generierung des *Ctdsp2* ts KOs verwendeten sgRNA Guide A. Das Ergebnis der dargestellten Sequenzanalyse zeigt, dass an der vorhergesagten sgRNA-Bindestelle keine Veränderung der genomischen Sequenz nach Expression der CRISPR/Cas9 Nickase in den Zellklonen CCC17#4 und CCC17#19 festgestellt werden konnte.

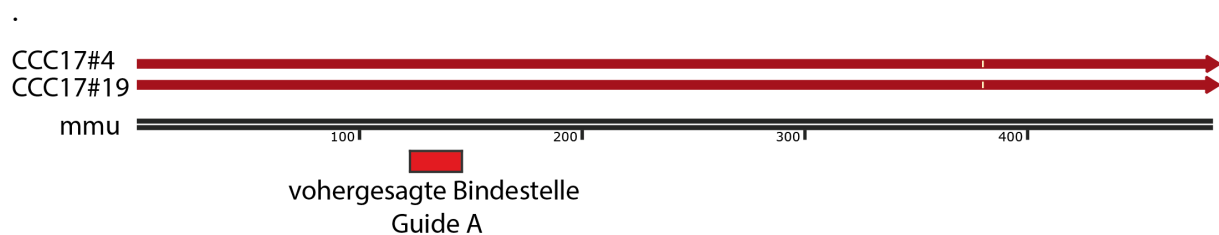


Abbildung 17 Repräsentative Abbildung der Analyse potentieller *Off-Target* Sequenzen im *Ctdsp2* ts KO
Alignment der Sequenzierungsergebnisse der PCR-Produkte der verwendeten *Ctdsp2* ts KO ES-Zellen (rote Pfeile) mit der Referenzsequenz *Mus musculus* (mmu) GRCm39 im Bereich der vorhergesagten Bindestelle der sgRNA (roter Balken).

Die potentiellen *Off-Target*-Sequenzen für die *Ctdsp2*-spezifischen und die *Rest*-spezifischen sgRNAs, die zur Generierung der jeweiligen miR-26 Zielsequenz KOs verwendet wurden, sind in Tabelle 3 bzw. Tabelle 4 (Appendix) aufgelistet. Die potentiellen *Off-Target*-Sequenzen weisen zwischen 2 und 3 *Missmatches* zu den sgRNA-Sequenzen auf. Nur eine *Off-Target*-Sequenz weist nur ein Nukleotid-Unterschied zu der verwendeten sgRNA Sequenz (REST-ts off 5'B2) auf. Hier ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zu sgRNA-vermittelten *Off-Target*-Mutationen kommt, am höchsten. Die Ergebnisse der Sequenzierungsanalysen der vorhergesagten *Off-Target*-Sequenzen sind in Tabelle 3 für die *Ctdsp2* ts KO ES-Zellklone zusammengefasst. Für die Ergebnisse der Rest ts KO ES-Zellklone siehe Appendix Tabelle 4. Es konnten in keinem der für diese Arbeit verwendeten Klonen eine Veränderung im Genom

nach Generierung der spezifischen *target site* Deletionen mittels des CRISPR/Cas9-Nickase Systems festgestellt werden.

Tabelle 3 Ergebnisse der *Off-Target* Analysen des *Ctdsp2* ts KOs

<i>Off-Target</i>	Sequenz (5' - 3')	Missmatch	Position	Gen-ID	Ergebnis
CTDSP2- ts off A1	TATCAAtATCATGAAG CAtGGTGG	2	Chr10, 127810425	19683	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
CTDSP2- ts off A2	gATCAAATCAgGAAG gAAGGTGG	3	Chr6, 41179650	21577	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
CTDSP2- ts off A3	gATtAAATCATGAAG CAAGaGGG	3	Chr15, 46588937	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
CTDSP2- ts off B1	TATTCAAAAAtTTGAc CTGTGGG	2	Chr7, 99722005	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
CTDSP2- ts off B2	TATcCAAAAActTGc ACTGTGGG	2	Chr1, 11241402	109294	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
CTDSP2- ts off B3	TAgTCAAACaCaTGA ACTGTGGG	3	Chr8, 86753850	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen

5.1.3 Einfluss der miR-26 Zielsequenz-Deletion in den 3'UTRs von *Rest* bzw. *Ctdsp2* auf die Genexpression von *Rest* / *Ctdsp*

Um die Bedeutung der miR-26-vermittelten Regulation von *Rest* und *Ctdsp2* während der neuronalen Differenzierung zu analysieren, wurden die *Ctdsp2* ts KO und *Rest* ts KO ES-Zellen nach dem von Dr. Mark Sauer im Labor Müller/Becker etablierten neuronalen Differenzierungssystem differenziert [142]. Folgt man diesem Differenzierungsprotokoll, so erhält man an Tag 10 (d10) der Differenzierung eine Zellpopulation die überwiegend aus NESTIN+, SOX2+, MSI1+ neuronale Vorläuferzellen besteht. Nach 5 weiteren Tagen (d15) der Differenzierung besteht die Kultur dann überwiegend aus TUBB3+ und MAP2+ Neuronen (für eine genaue Beschreibung des Differenzierungssystem siehe Kapitel 4.2.1.6 sowie [142]). Um die Konsequenz des Verlustes der miR-26 Zielsequenz in *Rest* bzw. *Ctdsp2* zu untersuchen, wurde die Expression von Mitgliedern der *Ctdsp*-Familie sowie von *Rest* mittels qRT-PCR in ES-Zellen, an Tag 10 und an Tag 15 in differenzierenden miR-26 ts KO Klonen untersucht. Die qRT-PCR Analysen in Abb. 18 A zeigen, dass der Verlust der miR-26 Zielsequenz in der 3'UTR von *Ctdsp2* an Tag 15 der Differenzierung zu einer Erhöhung des *Ctdsp2* mRNA Levels in *Ctdsp2* ts KO-Kulturen führte. In differenzierenden *Rest* ts KOs-Kulturen konnten erhöhte *Rest* mRNA Level an Tag 10 und Tag 15, im Vergleich zur Wt-Kultur detektiert werden. Zudem

konnte in diesen Zellen eine erhöhte Expression von *Ctdsp2* und *CtdspL* an Tag 15 der Differenzierung beobachtet werden.

Neben der RNA-Expression wurden zudem die Expression von REST und CTDSP2 auf Proteinebene in Wt- und in miR-26 ts KO-Kulturen an verschiedenen Tagen der Differenzierung (ES-Zellen, Tag 8, Tag 10, Tag 12 und Tag 15) mittels Western Blot analysiert. Diese Analysen (Abb. 18) ergaben, dass die Proteinlevel von CTDSP2 an Tag 15 der Differenzierung in miR-26 tKO-, in *Ctdsp2* ts KO- und in Rest ts KO-Kulturen erhöht waren. Die Proteinlevel von REST waren in miR-26 tKO-Kulturen an Tag 12 und Tag 15 deutlich erhöht. Weiterhin waren die REST Proteinlevel an Tag 15 in Rest ts KO-Kulturen erhöht.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Deletion der miR-26 Zielsequenz in *Ctdsp2* nur die Expression von *Ctdsp2* beeinflusste, während die Deletion der miR-26 Zielsequenz in *Rest* sowohl die Expression von *Rest* als auch die Expression von *Ctdsp2* und *CtdspL* beeinflusste.

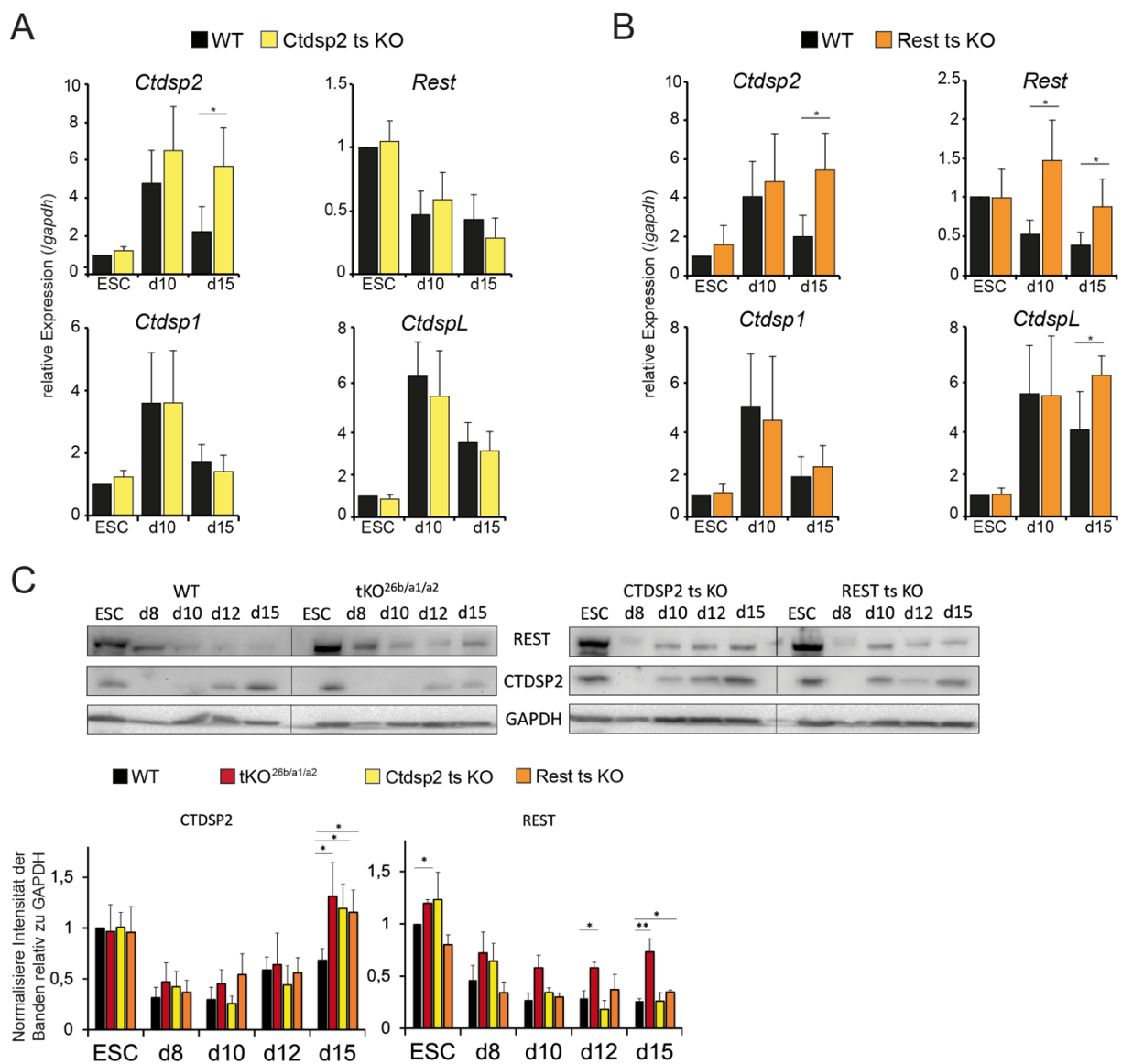


Abbildung 18 Analyse des Einflusses des Verlustes der miR-26 Zielsequenz in *Ctdsp2* und *Rest* auf die Expression der *Ctdsp*-Familie und *Rest*

A) qRT-PCR Analyse der *Ctdsp1, 2, L* und *Rest* Expression in Wt- und *Ctdsp2* ts KO-Kulturen in ES-Zellen, an d10 und an d15 der Differenzierung. n=5, einseitiger Anova-Test B) qRT-PCR Analyse der *Ctdsp1, 2, L* und *Rest* Expression in *Rest* ts KO-Kulturen in ES-Zellen, d10 und d15 der Differenzierung. n=5, einseitiger Anova-Test C) Oben: Repräsentative Western Blot Analyse von Proteinextrakten aus Wt-, miR-26tKO-, *Ctdsp2* ts KO- und *Rest* ts KO-Kulturen an d0, d8, d10, d12 und d15 der Differenzierung mit Antikörpern gegen REST, CTDSP2 und GAPDH. Unten: Photodensitometrische Auswertung der Bandenintensität relativ zur Intensität der GAPDH Banden. n=3, zweiseitiger t-Test, *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$.

5.1.4 Die Deletion der miR-26 Zielsequenz in *Rest* führt zu einer verminderten Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu Neuronen

Um zu analysieren, welchen Einfluss die Deletion der miR-26 Zielsequenz im endogenen *Ctdsp2* bzw. im endogenen *Rest* Locus auf die neuronale ES-Zelldifferenzierung hat, wurden die Zellen an Tag 15 der Differenzierung fixiert und mit Markern für maturaer Neurone

(TUBB3) sowie neuronalen Vorläufermarkern (NESTIN und SOX2) Immunfluoreszenzgefärbt. Die Frequenz der Marker+ Zellen wurde bestimmt und mit der Frequenz Marker+ Zellen in Wt-Kulturen und in miR-26 tKO-Kulturen [142] verglichen. Repräsentative Mikroskopieaufnahmen dieser Immunfluoreszenzpräparate sind in Abbildung 19 A gezeigt.

In vorhergehenden Analysen von Dr. Mark Sauer [142] konnte bei der neuronalen Differenzierung von miR-26 tKO ES-Zellen eine deutlich verringerte Frequenz maturer neuronaler Zellen sowie eine erhöhte Frequenz neuronaler Vorläuferzellen im Vergleich zu differenzierenden Wt ES-Zellen gezeigt werden. Die in der Arbeit von Dr. Mark Sauer durchgeführten Experimente zeigten eine verringerte Frequenz maturer Neurone (TUBB3: $4,55\% \pm 2,24\%$) und eine erhöhte Frequenz neuronaler Vorläuferzellen (NESTIN: $21,75\% \pm 5,84\%$; SOX2: $25,95\% \pm 12,29\%$) im Vergleich mit der Wt-Kultur (TUBB3: $55,27\% \pm 5,05\%$; NESTIN: $15,29\% \pm 4,99\%$; SOX2: $10,56\% \pm 3,58\%$). Auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass die Frequenz der TUBB3+ Zellen (TUBB3: $26,74\% \pm 10,09\%$) in miR-26 tKO-Kulturen signifikant niedriger und die Frequenz der NESTIN+ und SOX2+ Zellen (NESTIN: $56,92\% \pm 19,67\%$; SOX2: $42,3 \pm 10,33\%$) deutlich höher war als in den Wt-Kulturen (TUBB3: $64,89\% \pm 17,82\%$; NESTIN: $19,56\% \pm 8,27\%$; SOX2: $17,52\% \pm 10,66\%$) (Abb. 19 B). In *Ctdsp2* ts KO-Kulturen konnten hingegen keine Veränderungen der Frequenz TUBB3+ Zellen im Vergleich zu Wt-Kulturen ($54,24\% \pm 11,12\%$ vs. $64,89\% \pm 17,82\%$) beobachtet werden. Auch die Frequenz der neuronalen Vorläuferzellen war in *Ctdsp2* ts KO-Kulturen vergleichbar mit den Frequenzen in Wt-Kulturen (NESTIN: $31,73\% \pm 5,96\%$; SOX2: $26,26\% \pm 11,17\%$ vs. NESTIN: $19,56\% \pm 8,27\%$; SOX2: $17,52\% \pm 10,66\%$). In differenzierenden *Rest* ts KO-Kulturen konnte jedoch eine verminderte Frequenz an Zellen, die eine neuronale Morphologie aufwiesen sowie TUBB3 exprimieren an Tag 15 der Differenzierung nachgewiesen werden. Die Frequenz der TUBB3+ Zellen im *Rest* ts KO ($38,08\% \pm 12,03\%$) lag dabei deutlich unter der des Wt ($64,89\% \pm 17,82\%$). Außerdem konnten in den *REST* ts KO-Kulturen eine höhere Frequenz an neuronalen Vorläufermarkern exprimierenden Zellen (NESTIN: $50,62\% \pm 20,33\%$; SOX2: $37,05 \pm 15,78\%$) als in Wt-Kulturen (NESTIN: $19,56\% \pm 8,27\%$; SOX2: $17,52\% \pm 10,66\%$) festgestellt werden. Hier lassen sich Ähnlichkeiten zu dem Phänotyp des miR-26 tKOs beobachten. Vergleicht man die Frequenzen Marker+ Zellen des *Rest* ts KOs mit denen des miR-26 tKOs lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Die Deletion der miR-26 Zielsequenz in der 3' UTR von *Rest* führte somit zu einem Phänotyp, der eine deutliche Übereinstimmung mit dem Phänotyp des miR-26 tKO aufwies.

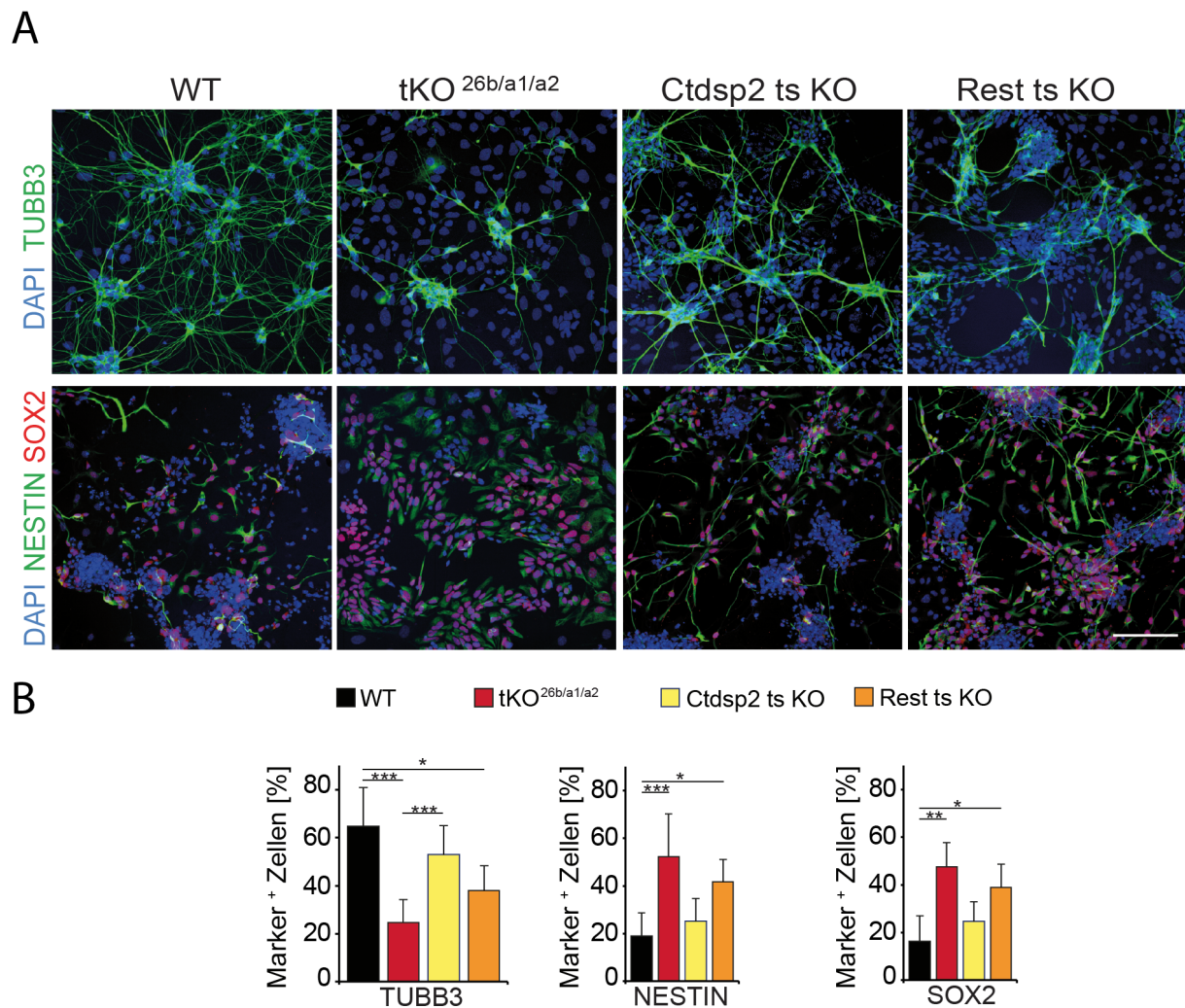


Abbildung 19 Immunfluoreszenzfärbung der Neurone und neuronalen Vorläuferzellen in Kulturen von Wt, miR-26 tKO, Ctdsp2 ts KO sowie Rest ts KO an Tag 15 der Differenzierung

A) Repräsentative Abbildungen der Immunfluoreszenzmikroskopie von TUBB3, NESTIN und SOX2 gefärbten Wt, miR-26 tKO, Ctdsp2 ts KO und Rest ts KO-Kulturen an d15 der Differenzierung. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: 100µm. B) Quantifizierung der Marker+ Zellen. n=3, einseitiger Anova-Test, *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$.

5.1.5 Die Expression neuronaler miRNAs wird durch miR-26-vermittelte Rest-Regulation kontrolliert

Durch im Zuge des Promotionsprojektes von Dr. Mark Sauer durchgeführte globale Sequenzierungsanalysen konnte gezeigt werden, dass der Verlust von miR-26 zu einer im Vergleich zu Wt reduzierten Expression von miRNAs führte, die *in silico* als REST-Ziele identifiziert wurden (REST-miRs) [142]. Um zu überprüfen, ob es auch durch den Verlust der miR-26 Zielsequenz im endogenen *Rest* zu einer Reduktion der Expression dieser REST-miRs kommt, wurden qRT-PCR miR-Expressions-Analysen für ein Subset maturer REST-miRs (miR-124, miR-9, miR-135a und miR-218) in ES-Zell-, Tag 10- und Tag 15- Kulturen des Wt,

des *Rest* ts KOs (Abb. 20 A) und des miR-26 tKOs (Abb. 20 B) durchgeführt. Die Expression von miR-124, miR-135a und miR-218 war an Tag 15 der Differenzierung im Vergleich zwischen Wt- und *Rest* ts KO-Kulturen reduziert. Die miR-9 Expression war an Tag 10 und an Tag 15 der Differenzierung in den *Rest* ts KO-Kulturen im Vergleich mit den Wt-Kulturen reduziert. Bei der Betrachtung der Expressionsanalysen im miR-26 tKO zeigten sich mit dem *Rest* ts KO vergleichbare Expressionsmuster (Abb.20 B). Die Expression der miR-124, miR-9, miR-135a und miR-218 war an Tag 15 der Differenzierung deutlich verringert. Diese Daten sind konsistent mit Arbeiten von Dr. Mark Sauer, bei denen nach Transfektion von miR-26 *Mimics* an Tag 9 der Differenzierung in die Zellen eingebracht wurden und eine Hochregulation dieser miRNAs beobachtet wurde [142].

Um zu überprüfen, ob die Regulation der REST-miRs auf murine, neuronale Zelltypen beschränkt war, wurden Expressionsanalysen von mit miR-26 *Mimics* transfizierten humanen Zellen (HEK293T) durchgeführt. Bei diesem Versuch wurden die HEK293T Zellen wie für das in Kapitel 4.2.1.8 beschriebene Luziferase-Reportergenassay transfiziert und die Expression REST-regulierter miRNAs anschließend analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 20 C gezeigt. Die Expression der miR-124 veränderte sich in den mit miR-26 *Mimics* transfizierten Proben nicht. Jedoch konnte eine signifikant höhere Expression der miR-9, miR-132 und miR-218 in mit miR-26 *Mimics*-transfizierten Proben detektiert werden. Auch in HEK293T Zellen wurde also ein Teil der REST-miRs über die miR-26 reguliert.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die initial erfolgende Herabregulation von *Rest* durch miR-26 während der neuronalen Differenzierung verantwortlich für die Hochregulation weiterer miRNAs ist und dass dieser regulatorische Mechanismus möglicherweise zwischen Maus und Mensch konserviert ist.

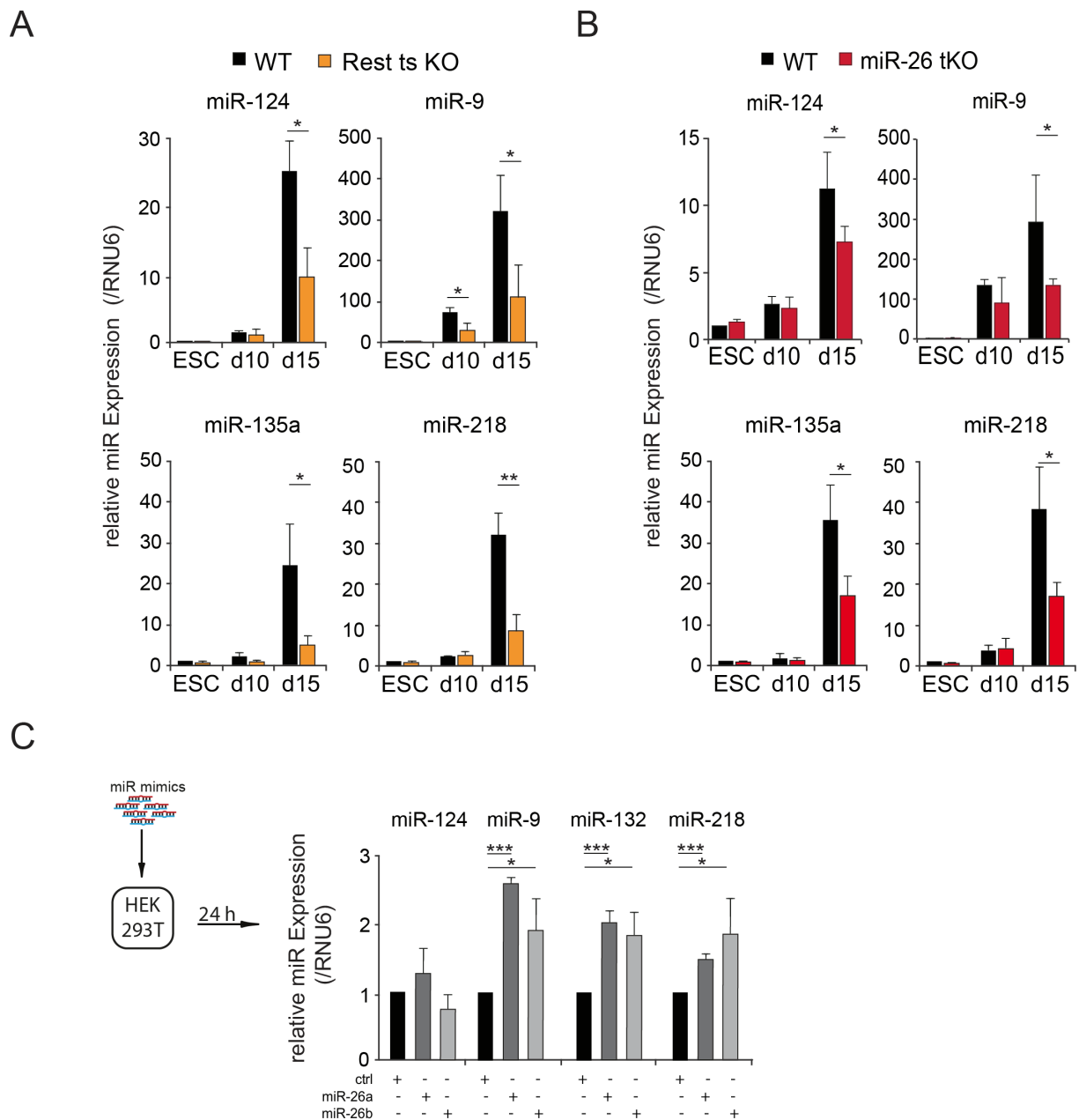


Abbildung 20 Die Expression von REST-regulierten miRNAs ist abhängig von *Rest*-Regulation durch miR-26

A) qRT-PCR Analysen der miR-124, miR-9, miR-135a und miR-218 Expression in Wt- und Rest ts KO ES-Zell-Kulturen sowie in Kulturen an d10 und d15 der Differenzierung. n=3, einseitiger Anova-Test B) miRNA spezifische qRT-PCR für miR-124, miR-9, miR-135a und miR-218 in ES-Zellen, d10 und d15 Kulturen der Differenzierung im Wt und miR-26 tKO. n=3, einseitiger Anova-Test C) qRT-PCR Analyse für miR-124, miR-9, miR-132 und miR-218 in Hek293T Zellen 24 h nach der Transfektion mit miR-Mimics (Kontrolle ctrl, miR-26a, miR-26b). n=3, einseitiger Anova-Test, *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$.

5.2 Die Rolle von *Malat1* als potentieller Regulator der miR-26 während der Neurogenese

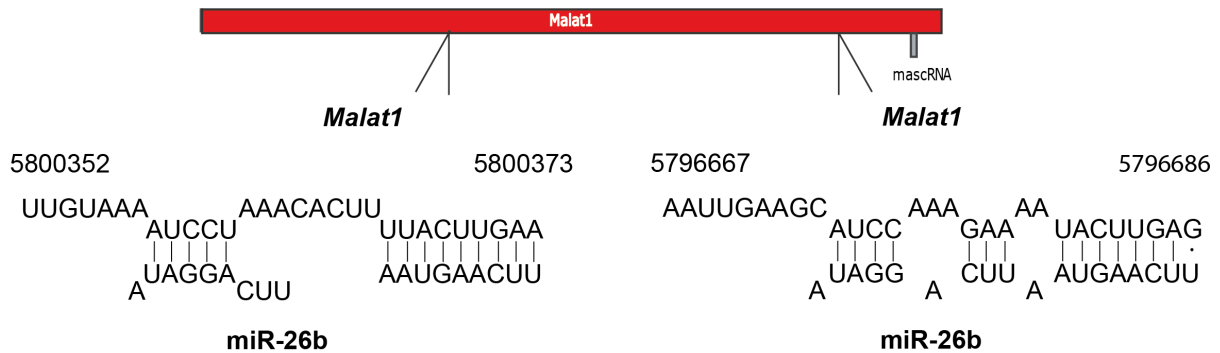
Die Maturierung der miR-26 während der embryonalen Entwicklung setzt zeitverzögert zur pre-miR-26 Expression ein und beginnt erst mit dem Start der Neurogenese [139, 141]. Eines der Ziele dieser Arbeit war es mögliche regulatorische Faktoren der miR-26 zu identifizieren, die für die verzögerte Maturierung während der Entwicklung verantwortlich sein könnten. Neben Proteinfaktoren, welche die Maturierung der miR-26 reprimieren könnten, gelten auch lncRNAs als Faktoren, welche mature miR-26 durch Sequestrierung regulieren könnten. Die Sequestrierung verschiedener miRNAs durch *Malat1* ist gut dokumentiert aber auf mechanistischer Ebene noch nicht vollständig verstanden (siehe Kapitel 3.2.2.3). Unterschiedliche publizierte Studien konnten auch bereits die Sequestrierung von miR-26 durch *Malat1* zeigen [242-246]. Eigene *in silico* miR-26 Bindestellen-Analysen der *Malat1* RNA mit Hilfe der DIANA-LncBase v2 [247] identifizierten zwei putative miR-26b Bindestellen (Abb. 21 A). Da die miR-26a über dieselbe Seedsequenz verfügt, kann auch diese potentiell an diesen Stellen binden. Im folgenden Teil dieser Arbeit wurde deshalb der Einfluss von *Malat1* auf die neuronale *in vitro* Differenzierung sowie auf die Maturierung und Expression der miR-26 genauer untersucht.

5.2.1 *Malat1* wird während der neuronalen Differenzierung hochreguliert

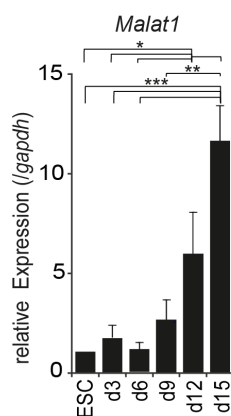
Zunächst wurde die *Malat1*-Expression während der neuronalen *in vitro* ES-Zell-Differenzierung und während der murinen Embryonalentwicklung untersucht (Abb. 21 B, C). Diese Analysen zeigen, dass während der Differenzierung von ES-Zellen zu NPCs eine Zunahme der *Malat1*-Expression um etwa das 6-fache erfolgte. In Tag 15 Kulturen, die hauptsächlich Neurone enthalten, verdoppelte sich die Expression noch einmal auf das etwa 12-fache. Während der embryonalen Mausentwicklung stieg die *Malat1*-Expression um etwa das 12-fache bis E15.5 an. Danach sank die Expression wieder und erreichte im adulten Gehirn das Niveau von E11.5 Embryonen. Diese Ergebnisse sind konsistent mit einer entwicklungsabhängigen Regulation der lncRNA *Malat1*-Expression. Da der Verlauf der Expression von miR-26 [139] und *Malat1* während der neuronalen Differenzierung vergleichbar war, erscheint es eher unwahrscheinlich, dass *Malat1* die miR-26 während der Neurogenese sequestriert und somit als eine ceRNA für miR-26 wirkt. Die Befunde waren eher konsistent mit einer positiven Regulation der miR-26 durch *Malat1*. Da die bisherigen publizierten Untersuchungen, welche eine negative Regulation der miR-26 durch *Malat1* nachwiesen, in nicht-neuronalen

Modellsystemen und Zelltypen durchgeführt wurden [242-246], kann eine mögliche positive Regulation der miR-26 durch *Malat1* im Kontext der embryonalen Neurogenese nicht ausgeschlossen werden.

A



B



C

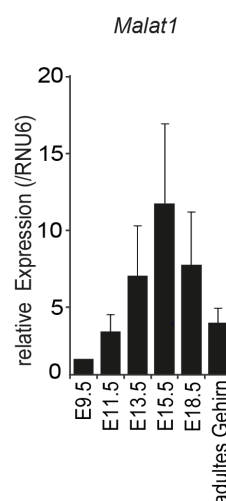


Abbildung 21 Analyse der miR-26 Bindestellen in *Malat1* und *Malat1* Expression während der neuronalen Differenzierung von ES-Zellen und der embryonalen Neurogenese

A) Vorhersage der miR-26b Zielsequenzen in *Malat1* mittels DIANA-LncBase v2 [247]. B) qRT-PCR Analyse der *Malat1* Expression während der neuronalen Differenzierung von Wt ES-Zellen. n=3, einseitiger ANOVA-Test, *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$. C) qRT-PCR Analyse der *Malat1* Expression in Gehirnen von Mausembryonen an unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten, sowie im adulten Gehirn. n=3.

5.2.2 Deletion von *Malat1* im Genom embryonaler Stammzellen

Um zu untersuchen welche Konsequenz der Verlust von *Malat1* und für die neuronale ES-Zell-Differenzierung hat, wurden *Malat1* knockout (*Malat1* KO) ES-Zellen mittels CRISPR/Cas9 hergestellt. Dabei wurde methodisch wie bei der Herstellung der ts KO-Zelllinien (Kapitel 5.1.2) vorgegangen. Zur Deletion des kompletten *Malat1* Lokus wurden je zwei sgRNAs die 3' bzw. 5' des *Malat1* Lokus binden verwendet. Die durch Einbringen dieser sgRNAs generierten klonalen ES-Zelllinien wurden in PCR-Analysen unter der Verwendung von zwei

verschiedenen Primerpaaren (Knockout- bzw. Wt-spezifische Amplifikationsprodukte) genotypisiert. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 22 A gezeigt. Die für die *Knockout* PCR verwendeten Primer wurden so gewählt, dass diese 3' und 5' der sgRNA Zielsequenz banden und ein PCR-Produkt nur dann synthetisiert werden konnte, wenn der komplette *Malat1* Locus deletiert war. Abbildung 22 A zeigt, dass bei der Durchführung der *knockout*-spezifischen Genotypisierungs-PCR nur mit genomischer DNA der putativen KO Klone #26, #42, #15 und #19 nicht aber mit genomischer Wt DNA ein Fragment der erwarteten Größe amplifiziert wurde. Für die *Full length* bzw. Wt-spezifischen Genotypisierungs-PCR wurde ein Primerpaar entworfen, das im Wt *Malat1* Locus bindet. Die Ergebnisse dieser PCR und die Ergebnisse der *knockout*-spezifischen-PCR erlauben die Unterscheidung zwischen heterozygoten und homozygoten *knockout* Zellen. Wie in Abb. 22 A gezeigt, konnte in dieser PCR-Analyse mit Proben der Klone #26 und #42 und mit Proben des Wt, ein DNA-Fragment der erwarteten Größe amplifiziert werden, während mit Proben der Klone #15 und #19 kein Fragment amplifiziert wurde. Somit wurde bei den Klonen #26 und #42 nur ein *Malat1* Allel deletiert. Es handelt sich also um heterozygote *Malat1* KOs. Bei den Klonen #15 und #19 wurden beide *Malat1* Allele deletiert. Es handelt sich hier also um homozygote *Malat1* KOs. Die in der *Knockout* PCR erhaltenen PCR-Produkte der Klone #15 und #19 wurden anschließend aufgereinigt und sequenziert. Abbildung 22 B zeigt die Ergebnisse des Sequenzvergleichs mit der genomischen *Malat1* Wt Sequenz. Diese Analyse bestätigte die vollständige Deletion des *Malat1* Locus.

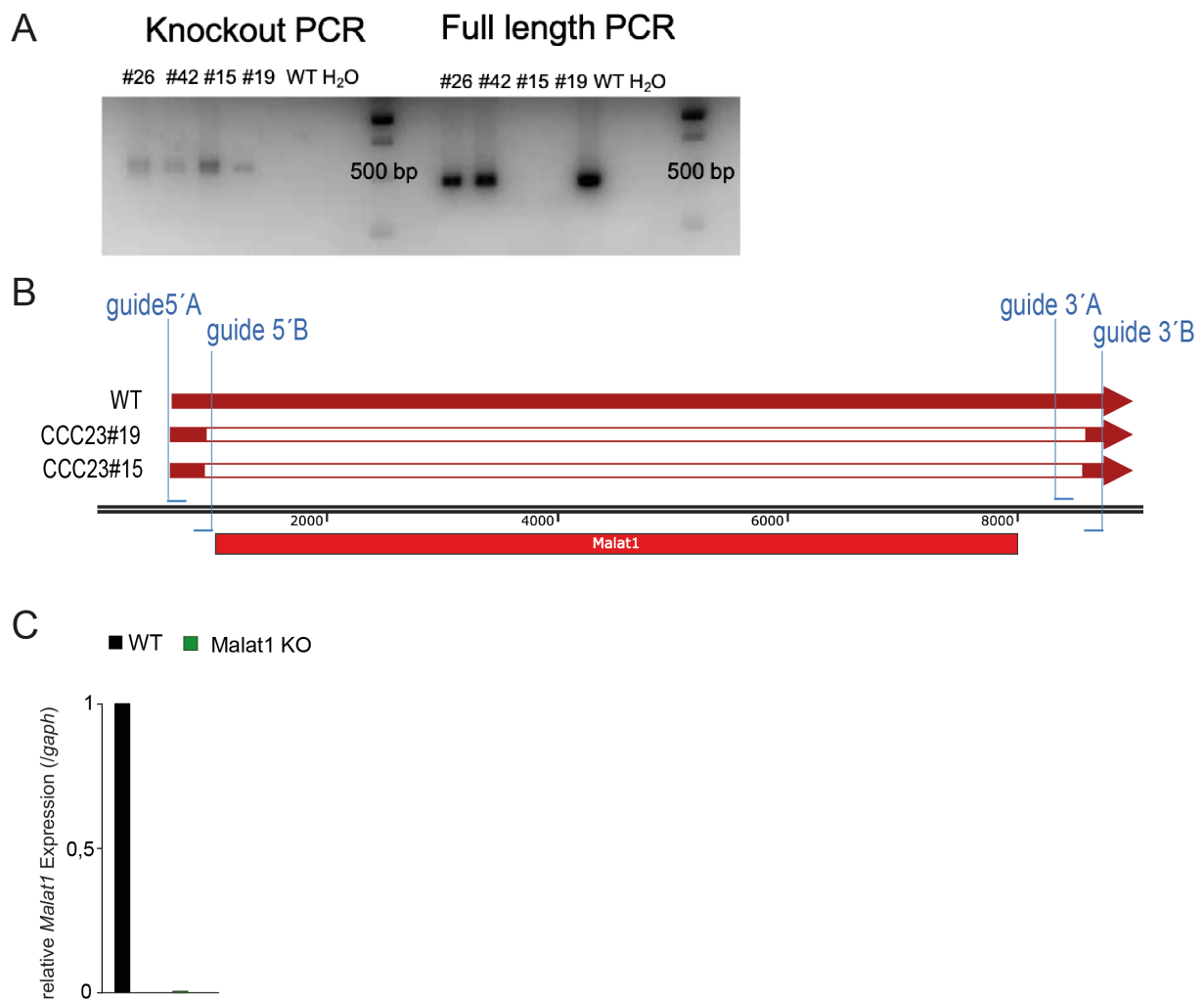


Abbildung 22 Generierung von *Malat1* KO ES-Zellen

A) Gelbild elektrophoretisch aufgetrennter PCR-Produkte der *Knockout* und *Full length* Genotypisierungs-PCRs die mit genomischen DNA-Proben des Wt und der putativen *Malat1* KO Zelllinien #26, #42, #15 und #19 durchgeführt wurden. B) Schematische Darstellung der Position der verwendeten sgRNAs und des *Malat1* Lokus. Alignements der Sequenzierung der verwendeten *Malat1* KO ES-Zelllinien. C) *Malat1*-spezifische qRT-Analyse von aus Wt und *Malat1* KO ES-Zellen präparierter RNA. n=4.

Um mögliche *Off-Target* Mutationen in den KO-Klonen weitgehend auszuschließen, wurden analog zu dem Kapitel 5.1.2 beschriebenen Verfahren die *in silico* Top 3 priorisierten *Off-Target* Bindestellen für die zur *Malat1*-Deletion verwendeten sgRNAs überprüft.

Für die Analyse möglicher Mutationen wurde für jeden *Off-Target* Locus ein Primerpaar entworfen, die betroffene genomische Region PCR-amplifiziert, sequenziert und anschließend mittels Sequenzvergleich (Referenzgenom: *Mus musculus* GRCm39 des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)) auf Mutationen untersucht. Beide in dieser Arbeit verwendeten Klone wurden auf diese Weise analysiert. Die potentiellen *Off-Target* Sequenzen, die zwischen 2 und 3 *Missmatches* im Vergleich zu den sgRNA-Sequenzen besaßen, sind in Tabelle 5 (siehe Appendix) aufgelistet.

Diese Analysen ergaben keine *Off-Target*-Mutationen im Genom der *Malat1* KO Klone. Zur Validierung der Deletion von *Malat1* wurde die Expression von *Malat1* mittels qRT-PCR Analysen in ES-Zellen untersucht. Abbildung 20 C zeigt, dass *Malat1* in den KO Klonen auf RNA-Ebene nicht exprimiert wurde. Dies bestätigt somit den *Malat1* KO. Um für klonale Variation zu kontrollieren, wurden alle weiteren in dieser Arbeit vorgestellten Analysen mit den beiden *Malat1* KO Klonen (CCC23#15, CCC23#19) durchgeführt.

5.2.3 Der Verlust von *Malat1* hat keinen Einfluss auf die Proliferation und den pluripotenten Status von ES-Zellen

Um zu untersuchen, welchen Effekt der *knockout* von *Malat1* in ES-Zellen hat, wurden die Morphologie der ES-Zellkolonien, die Zellzahl in serieller Kultur, die Frequenz Alkalinephosphatase (AP)⁺ Kolonien, sowie die Expression von pluripotenz-assoziierten Genen in ES-Zellen untersucht. *Malat1* KO ES-Zellkolonien wiesen die gleiche ES-Zell-typische Morphologie wie Wt ES-Zellkolonien auf. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen *Malat1* KO ES-Zellen und Wt ES-Zellen in der Zahl der Populationsverdopplung in serieller Kultur (Abb. 23 B). Die Expression von Pluripotenzmarkergenen *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* und *Rex1* zeigte zwischen Wt und *Malat1* KO ES-Zellen keinen Unterschied (Abb. 23 D). Weiterhin war die Frequenz pluripotenter AP⁺ ES-Zell-Kolonien nach *Malat1* KO im Vergleich zum Wt nicht verändert (Abb. 23 C). Zuletzt wurde die Zellzahl differenzierender ES-Zellen während der Bildung von *embryoid bodies* (EBs) bestimmt. Abbildung 23 E zeigt, dass *Malat1* KO EB-Kulturen an Tag 2 und an Tag 4 leicht erhöhte aber gegenüber den Wt-Kulturen nicht signifikant veränderte Zellzahlen aufwiesen.

Insgesamt zeigen diese initialen Analysen, dass der Verlust von *Malat1* keinen Einfluss auf das Wachstum und den pluripotenten Status von ES-Zellen hatte.

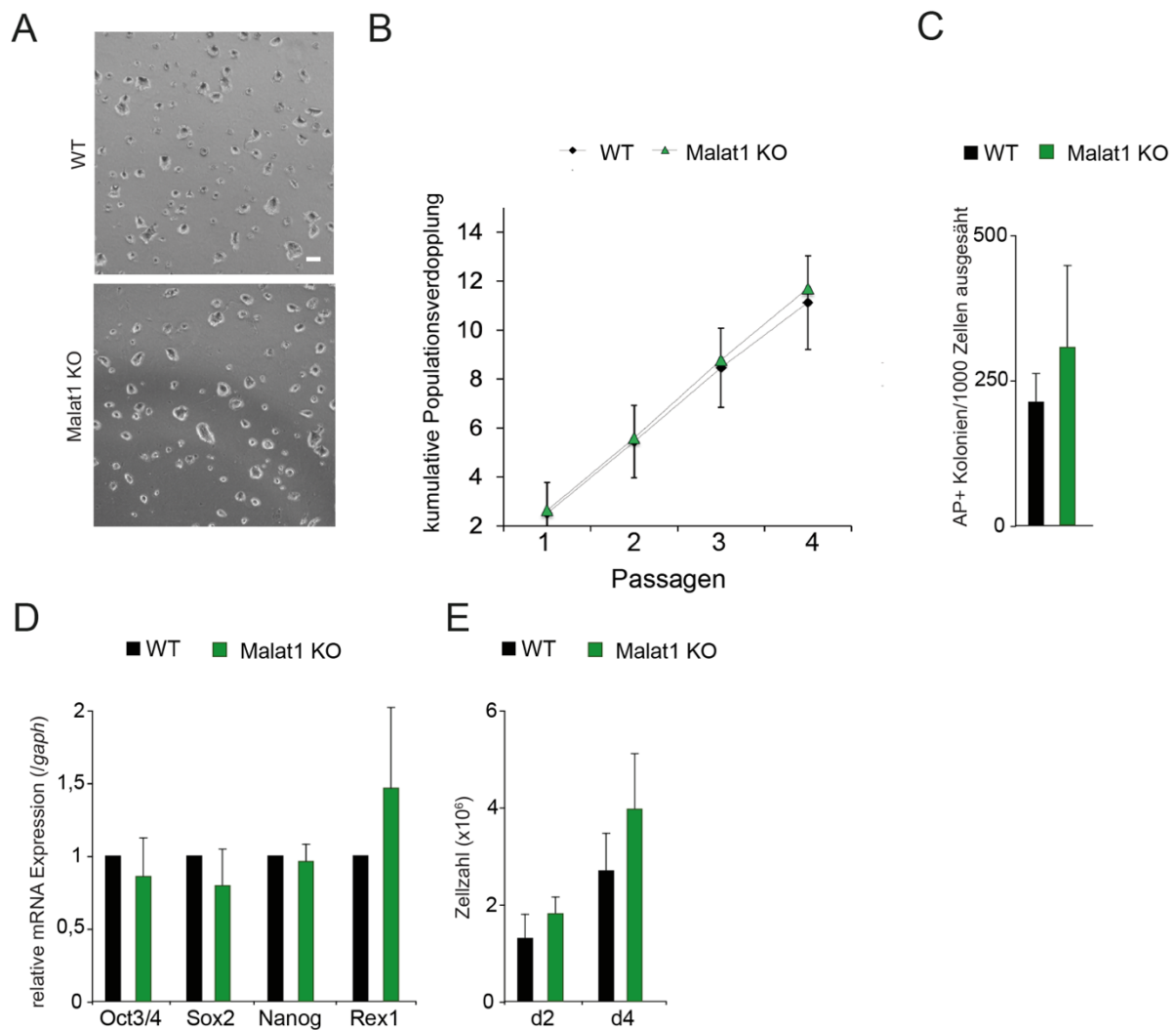


Abbildung 23 Charakterisierung der *Malat1* KO ES-Zellen

A) Repräsentative Phasenkontrastbilder der Wt und *Malat1* KO ES-Zellen. n=4. B) Quantifizierung der kumulativen Populationsverdopplung von Wt und *Malat1* KO ES-Zellen über vier Passagen. C) Bestimmung der Anzahl AP+ Zellen in Wt und *Malat1* KO ES-Zell-Kulturen. n=3. D) qRT-PCR Analyse der Pluripotenzmarker *Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog* und *Rex1* in Wt und *Malat1* KO ES-Zellen. n=3. E) Quantifizierung der Zellzahl in Wt und *Malat1* KO EB-Kulturen an d2 und d4. n=3.

5.2.4 Der KO von *Malat1* führt zu einer starken Beeinträchtigung der neuronalen Differenzierung

Als nächstes sollte der Einfluss des Verlustes von *Malat1* auf die neuronale Differenzierung analysiert werden. Repräsentative phasenkontrastmikroskopische Bilder von Kulturen an Tag 15 der Differenzierung sind in Abbildung 24 A gezeigt. In Wt-Kulturen ließen sich Zellen mit einer deutlich neuronalen Morphologie und deutlich ausgebildeten Neuriten erkennen. In *Malat1* KO-Kulturen waren hingegen große abgeflachte Zellen in hoher Zahl vorhanden. Ein Neuritenwachstum war bei Zellen dieser Kulturen kaum vorhanden. Um die Frequenz neuronaler Zellen in den Kulturen zu bestimmen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen des

neuronalen Markers TUBB3 sowie der neuronalen Vorläufermarkern NESTIN und SOX2 durchgeführt. Abbildung 24 A zeigt repräsentative Bilder dieser Immunfluoreszenzfärbung von Wt und *Malat1* KO ES-Zellkulturen an Tag 15 der Differenzierung. Im Vergleich zu den Wt-Kulturen bildeten sich in *Malat1* KO-Kulturen kein dichtes Netz aus TUBB3⁺ Neuronen. Stattdessen waren nur einzelne TUBB3⁺ Neurone erkennbar. Die Quantifizierung der Immunfluoreszenz-gefärbten Zellen (Abb. 24 B) macht deutlich, dass die Frequenz TUBB3⁺ Neurone in *Malat1* KO-Kulturen ($16,57\% \pm 8,18\%$) im Vergleich zu der Frequenz in den Wt-Kulturen ($60,47\% \pm 16,65\%$) niedriger war. Die Frequenz der NESTIN⁺ und SOX2⁺ Vorläuferzellen waren zu diesem Zeitpunkt jedoch zwischen Wt (NESTIN: $19,58\% \pm 8,76\%$; SOX2: $25,22 \pm 6,77\%$) und *Malat1* KO-Kulturen (NESTIN: $24,42\% \pm 16,72\%$; SOX2: $28,41 \pm 9,0\%$) nicht unterschiedlich.

Die *in vitro* Differenzierung der *Malat1* KO ES-Zellen führte somit zu einer deutlichen Reduktion der Frequenz neuronaler Zellen ohne gleichzeitige Veränderung der Frequenz neuronaler Vorläuferzellen.

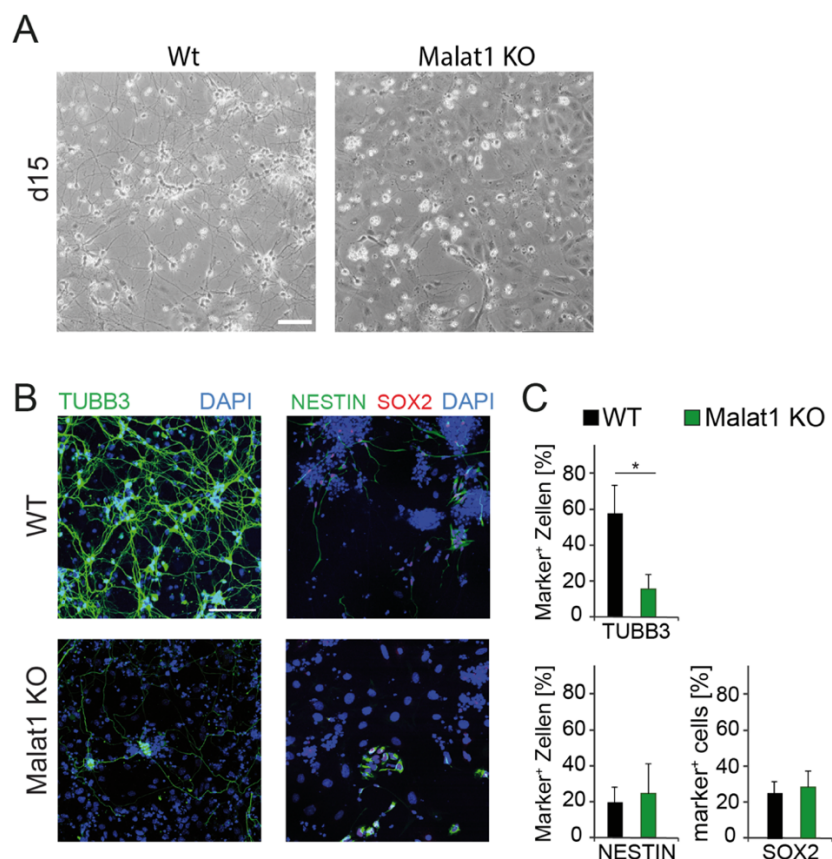


Abbildung 24 Der Verlust von *Malat1* verhindert die neuronale *in vitro* Differenzierung aus ES-Zellen

A) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen der Wt und *Malat1* KO-Kulturen an d15 der Differenzierung. Maßstabsbalken: 100 μ m B) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen der Wt und *Malat1* KO-Zellen mit TUBB3, NESTIN und SOX2 an d15 der Differenzierung. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstabsbalken: 100 μ m. C) Quantifizierung der Marker⁺ Zellen. n=3, einseitiger Anova-Test, *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$.

5.2.5 Erhöhte Expression von Zellzyklusinhibitoren und verminderte Proliferation neuronaler Vorläuferzellen in *Malat1* KO-Kulturen

Aus verschiedenen *in vitro* Studien ist bekannt, dass hohe *Malat1* Expressionslevel mit einer gesteigerten Proliferation unterschiedlicher Zelltypen einhergeht, während der Verlust von *Malat1* zu einer verringerten Proliferation führt [248-254]. Um den Einfluss des Verlustes von *Malat1* auf die Proliferation neural differenzierender ES-Zellkulturen zu untersuchen, wurde mittels qRT-PCR Analysen zunächst die Expression der Zellzyklusinhibitoren *p16^{ink4A}*, *p19^{arf}* und *p21^{cip1}* in ES-Zellen, an Tag 3, Tag 6, Tag 9, Tag 12 und Tag 15 der neuronalen Differenzierung in Wt- und *Malat1* KO-Kulturen untersucht. Abbildung 25 A zeigt, dass die Expression von *p16^{ink4A}* und *p19^{arf}* an Tag 12 und Tag 15 der Differenzierung in *Malat1* KO-Kulturen signifikant erhöht war. Auch die Expression von *p21^{cip1}* war an Tag 15 deutlich erhöht. Um zu untersuchen welchen Effekt der Verlust von *Malat1* auf die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen hatte, wurden die Bromdesoxyuridine (BrdU)-Inkorporation von Wt und *Malat1* KO-Zellen an Tag 10 der Differenzierung untersucht. Dabei wurde dem Zellkulturmedium BrdU für 24h zugesetzt. BrdU kann anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut werden und anschließend mittels spezifischer Antikörper angefärbt werden. An Tag 10 der Differenzierung erreicht die Zahl neuronaler Vorläuferzellen in den Kulturen das Maximum [142]. Aus diesem Grund wurde diese Analyse mit Tag 10 Kulturen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 25 B anhand repräsentativer Immunfluoreszenzbilder sowie der Quantifizierung der Marker+ Zellen dargestellt. Es zeigte sich, dass die Frequenz der BrdU+ Zellen im *Malat1* KO-Kulturen ($20,98\% \pm 6,39\%$) im Vergleich zu der Frequenz in Wt-Kulturen ($43,41\% \pm 12,18\%$) deutlich verringert war. Die Frequenz der MSI1+ neuronalen Vorläuferzellen war im *Malat1* KO-Kulturen ($58,95\% \pm 4,55\%$) auf dem gleichen Niveau wie in Wt-Kulturen ($61,78\% \pm 8,93\%$). Der prozentuale Anteil von MSI1+ im Verhältnis zu BrdU+ Zellen zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen Wt-Kulturen ($65,6\% \pm 22,57\%$) und *Malat1* KO-Kulturen ($23,84\% \pm 4,18\%$).

Der Verlust von *Malat1* führte während der Differenzierung also zu einer ähnlichen Frequenz neuronaler Vorläuferzellen, die jedoch vermindert proliferieren. Ob dies in Zusammenhang mit der erhöhten Expression des Zellzyklusinhibitors P16^{INK4A} stand, sollte im nächsten Schritt untersucht werden. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Wt- und *Malat1* KO-Kulturen an Tag 10 der Differenzierung mit Antikörpern gegen MSI1 und P16^{INK4A} durchgeführt. Repräsentative Abbildungen dieser Immunfluoreszenzfärbungen sowie die Quantifizierung der Marker+ Zellen sind in Abbildung 25 C gezeigt. Auch bei dieser Analyse

konnte kein Unterschied in der Frequenz der MSI1+ neuronalen Vorläuferzellen zwischen Wt- (62,92% \pm 3,84%) und *Malat1* KO-Kulturen (59,45% \pm 0,9%) festgestellt werden. Jedoch konnten in *Malat1* KO-Kulturen deutlich mehr P16^{INK4A}+ Zellen als in Wt-Kulturen detektiert werden (Wt: 6,18% \pm 1,19%; *Malat1* KO: 37,56% \pm 4,59%). Der Anteil der P16^{INK4A}+, neuronalen Vorläuferzellen (MSI1+) an Tag 10 der Differenzierung war in *Malat1* KO-Kulturen 61,07% \pm 7,17% im Vergleich zu 9,26% \pm 2,7% in Wt-Kulturen.

Diese Daten machen deutlich, dass der Verlust von *Malat1* keinen Einfluss auf die Differenzierung von ES-Zellen zu neuronalen Vorläuferzellen hatte. Jedoch war die Proliferation neuraler Vorläuferzellen inhibiert, was mit einer erhöhten Expression des Zellzyklusinhibitors P16^{INK4A} einherging.

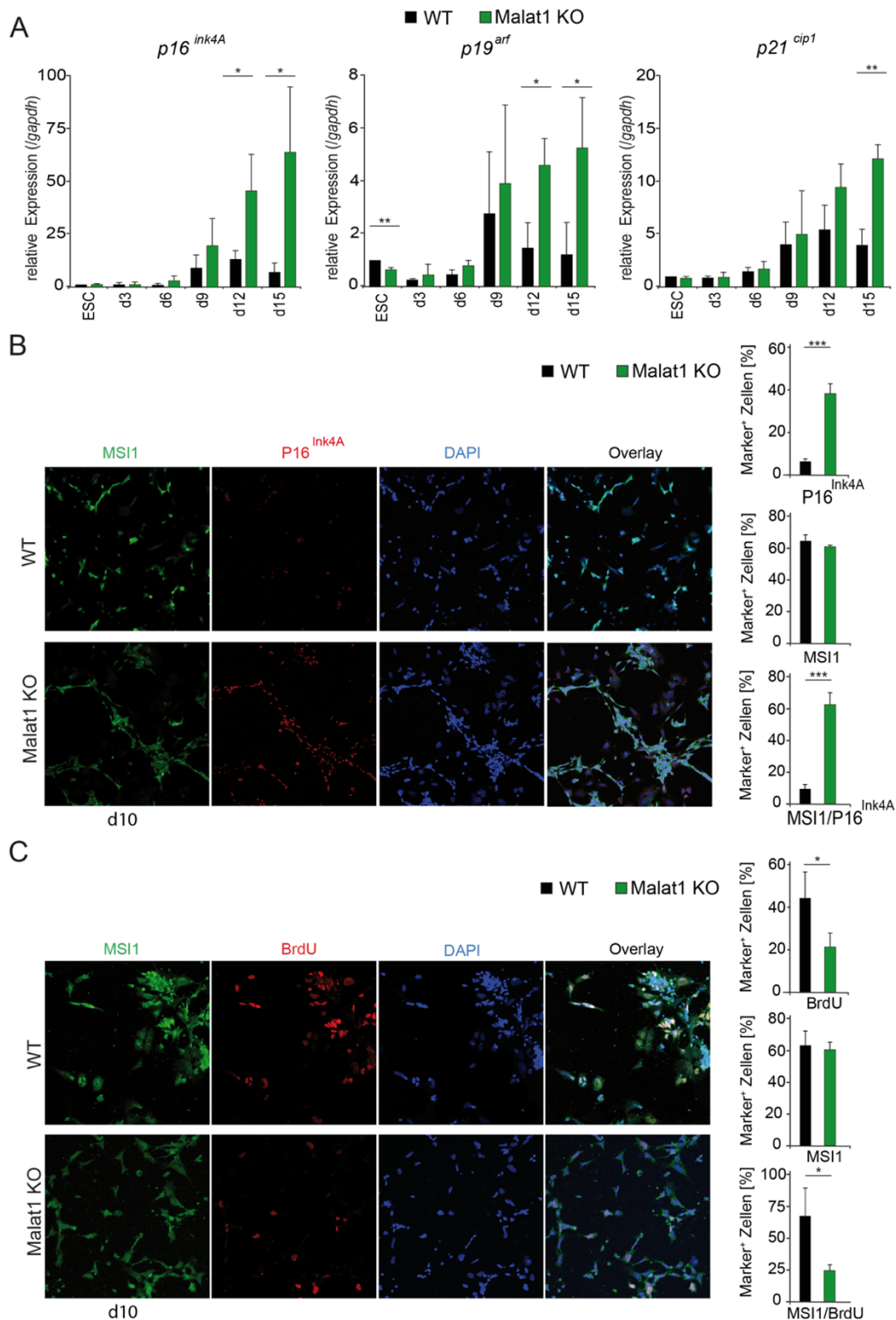


Abbildung 25 Der Verlust von *Malat1* führt zu einer geringeren Proliferation, sowie erhöhter $P16^{INK4A}$ Expression in neuronalen Vorläuferzellen

A) qRT-PCR Analysen der Zellzyklusinhibitoren $p16^{ink4A}$, $p19^{arf}$ und $p21^{cip1}$ in ES-Zellen, d3, d6, d9, d12 und d15 in Wt- und *Malat1* KO-Kulturen. n=3. B) Repräsentative Abbildungen der Immunfluoreszenzfärbung mit $P16^{INK4A}$ sowie MSI1-spezifischen Antikörpern (links). Quantifizierung der Frequenzen $P16^{INK4A+}$ und MSI1+ Zellen (rechts). n=3. C) Repräsentative Abbildungen der Immunfluoreszenzfärbung mit BrdU und MSI1-spezifischen Antikörpern (links). Quantifizierung der Frequenzen BrdU+ und MSI1+ Zellen an d10 der neuronalen Differenzierung (rechts). n=3. B); C) Maßstabsbalken: 100 μ m. A), B), C) Einseitiger Anova-Test, *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$.

5.2.6 Der Verlust von *Malat1* führt zu erhöhter Expression der miR-26 und der miR-26 Wirtsgene

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass *Malat1* die Regulation verschiedener miRNAs beeinflusst. Es konnte zudem gezeigt werden, dass *Malat1* die miR-26 Familienmitglieder als ceRNA sequestriert und so reguliert [243, 244, 246, 255]. Außerdem konnte *Malat1* mit der Regulation der Tumorzellproliferation und Tumorprogression durch die Kontrolle verschiedener miRNAs, unter anderem der miR-26 Familie, gezeigt werden [242, 256, 257]. Um den Einfluss des Verlustes von *Malat1* auf die Expressionslevel der miR-26 Familie während der neuronalen Differenzierung zu untersuchen, wurden RNA Proben von ES-Zellen an Tag 3, 6, 9, 12 und 15 der neuronalen Differenzierung verwendet. Mittels qRT-PCR Analyse wurde die Expression der maturen miR-26a und miR-26b, ihrer Precursor (pre-miRs) und die Expression der *Ctdsp* Wirtsgene untersucht. Abbildung 26 A zeigt, dass die Expression der maturen miR-26a und miR-26b bis Tag 9 der Differenzierung durch den Verlust von *Malat1* unbeeinflusst blieb. Ab Tag 12 konnte jedoch für beide miR-26 Isoformen eine signifikant höhere Expression in *Malat1* KO-Kulturen im Vergleich zu Wt-Kulturen beobachtet werden. Auch die Expression der pre-miR-26a und der pre-miR-26b (Abb. 26 B) war an Tag 12 und Tag 15 in *Malat1* KO-Kulturen deutlich erhöht. Das miR-26b Wirtsgens *Ctdsp1* zeigte an Tag 12 und an Tag 15 der Differenzierung eine signifikant erhöhte Expression, während die Expression des miR-26a2 Wirtsgens *Ctdsp2* und des miR-26a1 Wirtsgens *CtdspL* nur an Tag 15 in *Malat1* KO-Kulturen signifikant erhöht war (Abb. 26 C). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die miR-26 Prozessierung durch den Verlust von *Malat1* nicht beeinflusst war, da in frühen Stadien der Differenzierung keine erhöhte Expression maturer miR-26 zu beobachten war. Allerdings zeigte sich ein deutlicher Einfluss des *Malat1* Verlustes auf die miR-26 Expression und die Expression der miR-26 Wirtsgene zu späteren Zeitpunkten der Differenzierung.

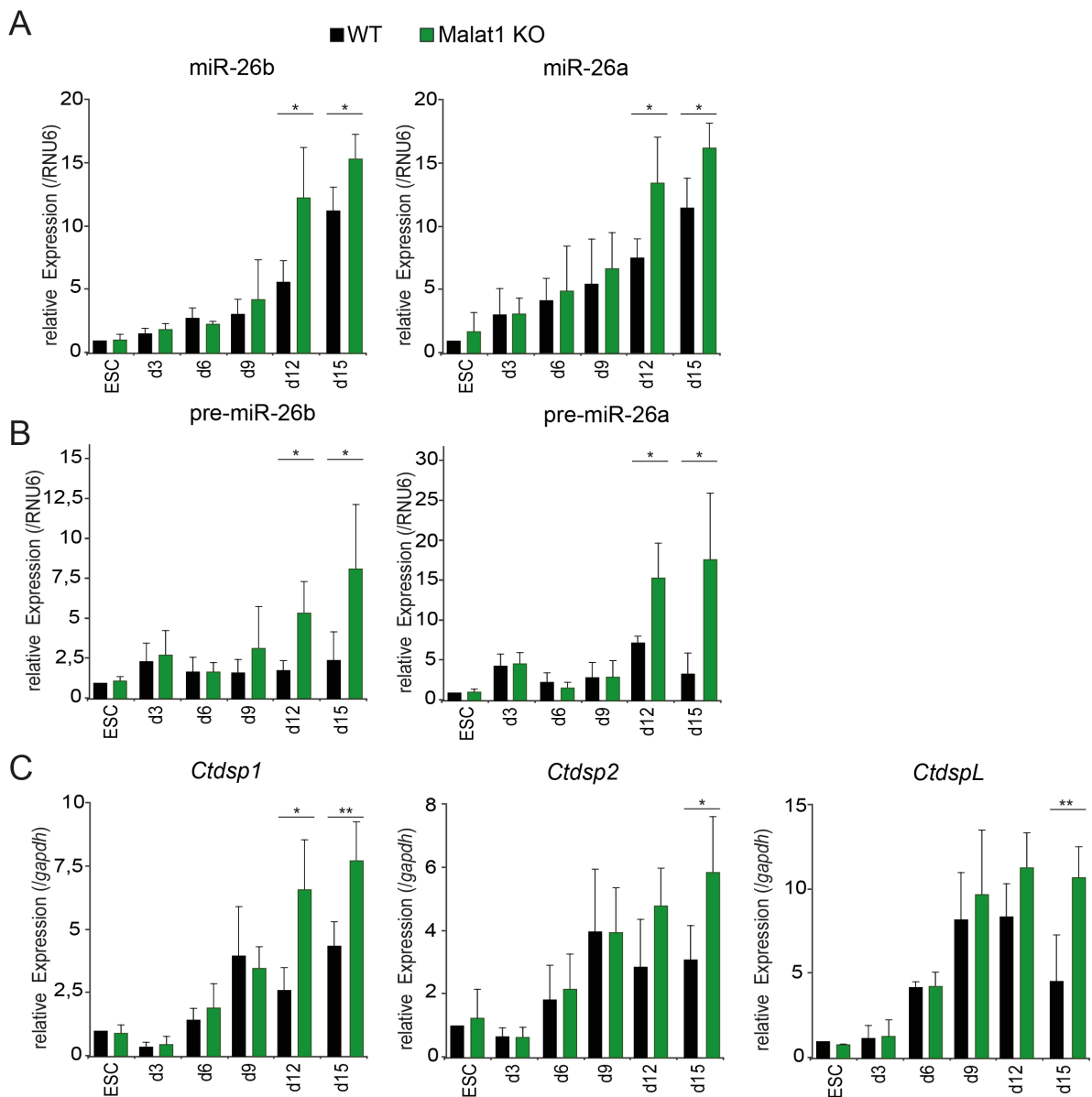


Abbildung 26 Erhöhte Expression von miR-26 und der miR-26 Wirtsgene der Ctdsp-Familie in differenzierenden *Malat1* KO ES-Zellen

A) miR-26a und miR-26b spezifische qRT-PCR-Analyse mit RNA Proben aus Wt und *Malat1* KO ES-Zell-Kulturen und aus d3, d6, d9, d12 und d15 Kulturen der Differenzierung. n=4. B) precursor-miRNA spezifische qRT-PCR für pre-miR-26a und pre-miR-26b mit RNA Proben aus ES-Zell-Kulturen und aus d3, d6, d9, d12 und d15 Kulturen der Differenzierung im Wt- und *Malat1* KO-Kulturen. n=4. C) qRT-PCR Analyse der *Ctdsp*-Familienmitglieder mit RNA Proben aus ES-Zell-Kulturen und aus d3, d6, d9, d12 und d15 Kulturen der Differenzierung im Wt und *Malat1* KO. n=4. A), B), C) einseitiger Anova-Test. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$.

Unsere publizierten Daten zu differenzierenden miR-26 tKO ES-Zellen zeigen eine erhöhte Frequenz neuronaler Vorläuferzellen am Endpunkt der neuronalen Differenzierung, die mit einer verringerten Expression der Zellzyklusinhibitoren *p16^{ink4A}*, *p19^{arf}* und *p21^{cip1}* sowie einer erhöhten Frequenz von Zellen die sich in S/G₂/M-Phase des Zellzyklus befinden, einher ging [142]. Um zunächst den Effekt des Verlustes der miR-26 auf die NPC Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen zu untersuchen, wurde der Anteil BrdU⁺ und somit proliferierender

Zellen in miR-26tKO- und Wt-Kulturen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 27 dargestellt. Der Anteil der BrdU⁺ und MSI1⁺ Zellen zeigte an Tag 10 keinen signifikanten Unterschied zwischen Wt- (BrdU: 44,63% ± 12,56%; MSI1: 70,03% ± 14,66%) und miR-26 tKO-Kulturen (BrdU: 55,59% ± 9,28%; MSI1: 72,15% ± 20,3%). In Wt-Kulturen nahm die Anzahl der BrdU⁺ sowie der MSI1⁺ Zellen von Tag 10 zu Tag 12 der Differenzierung signifikant ab (BrdU: 12,93% ± 9,4%; MSI1: 27,98% ± 1,99%). Im Gegensatz hierzu konnte keine signifikante Abnahme der BrdU⁺ und der MSI1⁺ Zellen in miR-26 tKO-Kulturen beobachtet werden (BrdU: 35,26% ± 13,15%; MSI1: 41,41% ± 3,17%). Der Vergleich von Wt- und miR-26 tKO-Kulturen an Tag 12 zeigte eine erhöhte Frequenz der BrdU⁺ und MSI1⁺ Zellen in miR-26-tKO Kulturen. Neben den Frequenzen der BrdU⁺ und MSI1⁺ Zellen wurde ebenfalls das Verhältnis von BrdU⁺ zu MSI1⁺ Zellen berechnet. Diese Analyse zeigte, dass zwischen 70% und 80% der proliferierenden Zellen neuronale Vorläuferzellen waren. Hier konnten keine Unterschiede zwischen Wt- und miR-26 tKO-Kulturen festgestellt werden. Diese Daten zeigen deutlich, dass in miR-26 tKO-Kulturen an Tag 12 der Differenzierung der Anteil an proliferierenden NPCs im Vergleich zu Wt-Kulturen erhöht war.

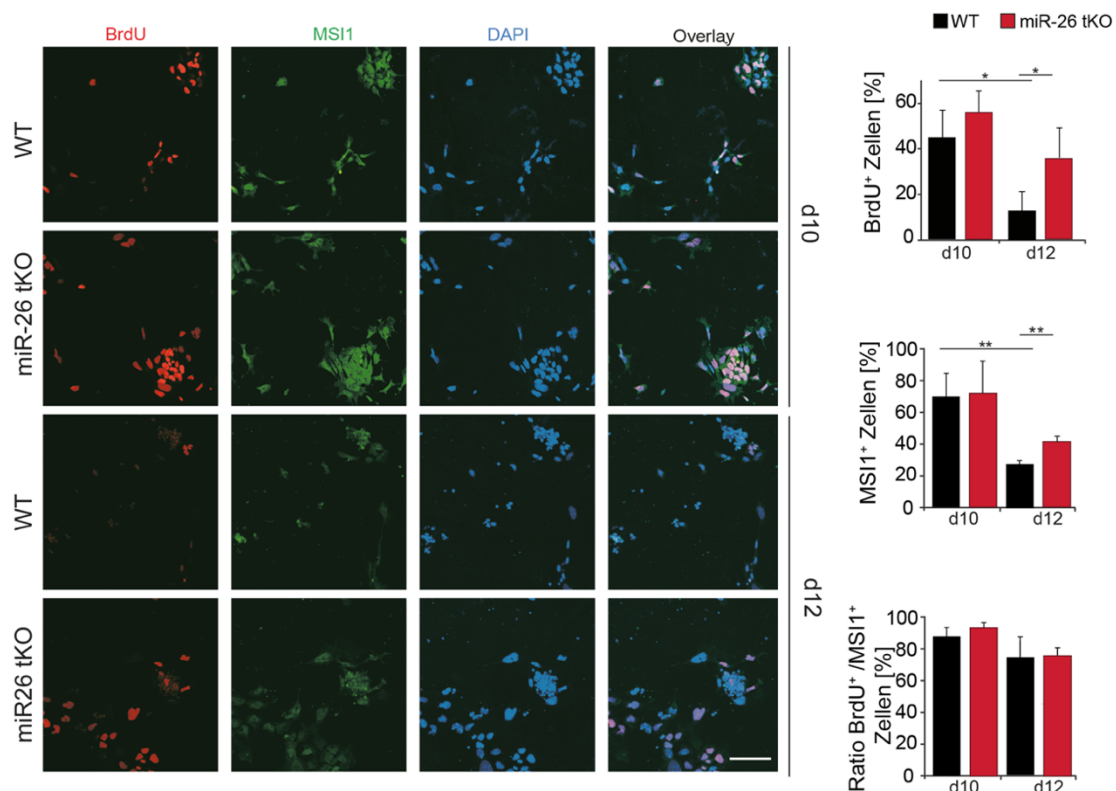


Abbildung 27 Erhöhte Frequenz proliferierender neuronaler Vorläuferzellen in miR-26 tKO-Kulturen an d12 der Differenzierung

A) Repräsentative BrdU (rot) und MSI1 (grün) Immunfluoreszenzfärbungen von Wt- und miR-26 KO-Kulturen an d10 und d12 der Differenzierung. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Maßstabsbalken: 100 µm B) Quantifizierung der BrdU⁺ und MSI1⁺ Zellen in Wt- und miR-26 tKO-Kulturen. n=3; einseitiger Anova-Test, *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01.

5.2.7 Einfluss von miR-26 auf die Expression von Zellzyklusinhibitoren in Wt- und *Malat1* KO-Kulturen

Die in Kapitel 5.2.5 gezeigten Analysen weisen auf eine gegensätzliche Funktion von miR-26 und *Malat1* bei der Proliferationsregulation von NPCs hin. Während miR-26 tKO-Kulturen eine verringerte Expression von Zellzyklusinhibitoren und eine erhöhte Frequenz sich teilender neuronaler Vorläuferzellen aufwiesen, konnte in *Malat1* KO-Kulturen eine erhöhte Zellzyklusinhibitor-Expression und eine geringere Frequenz sich teilender NPCs gezeigt werden. Publierte Daten weisen zusätzlich darauf hin, dass miR-26 eine die Proliferation inhibierende Funktion in unterschiedlichen Zelltypen hat [258-262]. Ob dies auch während der neuronalen Differenzierung in *Malat1* KO-Kulturen der Fall ist, sollte im Folgenden untersucht werden. Hierfür wurden zunächst Wt- und *Malat1* KO-Kulturen an Tag 9 der Differenzierung mit miR-26 Inhibitoren transfiziert und die Expression der Zellzyklusinhibitoren nach 72 Stunden analysiert. Als Kontrolle wurde ein negativ Kontroll-Inhibitor verwendet, dessen Sequenz auf *C. elegans* basiert und keine Sequenzhomologien in Wirbeltieren aufweist. Abbildung 28 zeigt die relative Expression der Zellzyklusinhibitoren der transfizierten NPCs. In Wt-Kulturen kam es zu einer signifikanten Reduktion der Expression von *p19^{arf}*. Für die Expression *p16^{ink4A}* und *p21^{cip1}* konnte in Wt-Kulturen keine Veränderung festgestellt werden, jedoch waren die Expressionslevel von *p16^{ink4A}*, *p19^{arf}* und *p21^{cip1}* in *Malat1* KO-Kulturen nach Transfektion mit dem miR-26 Inhibitoren signifikant verringert und erreichten fast das Expressionsniveau der Wt-Kulturen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition von miR-26 in differenzierenden *Malat1* KO-Zellen zu einer Reduktion der Zellzyklusinhibitor-Expression führt.

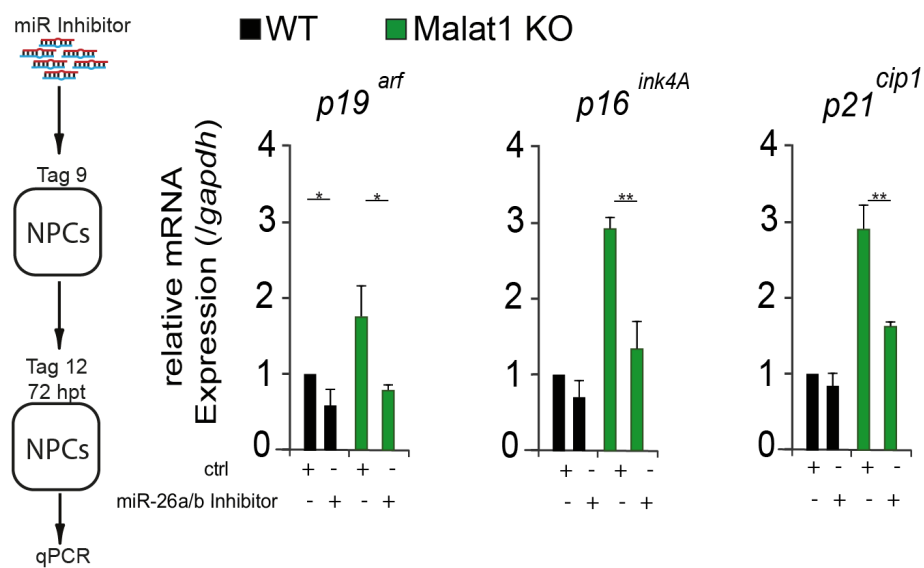


Abbildung 28 Einfluss der miR-26 auf die Expression der Zellzyklusinhibitoren $p16^{ink4A}$, $p19^{arf}$ und $p21^{cip1}$
 Wt und *Malat1* KO NPCs wurden an Tag 9 der neuronalen Differenzierung mit Kontroll- und miR-26-Inhibitoren transfiziert und die Expression der Zellzyklusinhibitoren $p16^{ink4A}$, $p19^{arf}$ und $p21^{cip1}$ nach 72 Stunden mittels qRT-PCR analysiert. n=3, einseitiger Anova-Test, *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$.

5.2.8 Deletion von *Malat1* in miR-26 knockout ES-Zellen

Um den Einfluss der miR-26 Inaktivierung im Verlauf der neuronalen Differenzierung untersuchen zu können, wurde im nächsten Schritt *Malat1* in miR-26 tKO ES-Zellen deletiert. Dabei wurde wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben vorgegangen. Abbildung 29 A zeigt die Ergebnisse der Genotypisierungs-PCR der *Malat1*/miR-26 KO ES-Zellen. Die in der *Knockout* PCR erhaltenen Produkte der Klone #11 und #31 wurden anschließend aufgereinigt und mittels Sequenzierung analysiert. Abbildung 29 B zeigt die Ergebnisse der Sequenzvergleiche mit der genomischen Wt-Sequenz für *Malat1*. Hier ist zu erkennen, dass der *Malat1* Locus vollständig deletiert wurde. Die Deletion von *Malat1*, sowie miR-26a und miR-26b, wurde mittels qRT-PCR Analysen in ES-Zellen bestätigt (Abb. 29 C). Um die klonale Variabilität zu überprüfen wurden für alle weiteren Analysen beide *Malat1*/miR-26 KO Klone (CCC9E#11, CCC9E#31) verwendet.

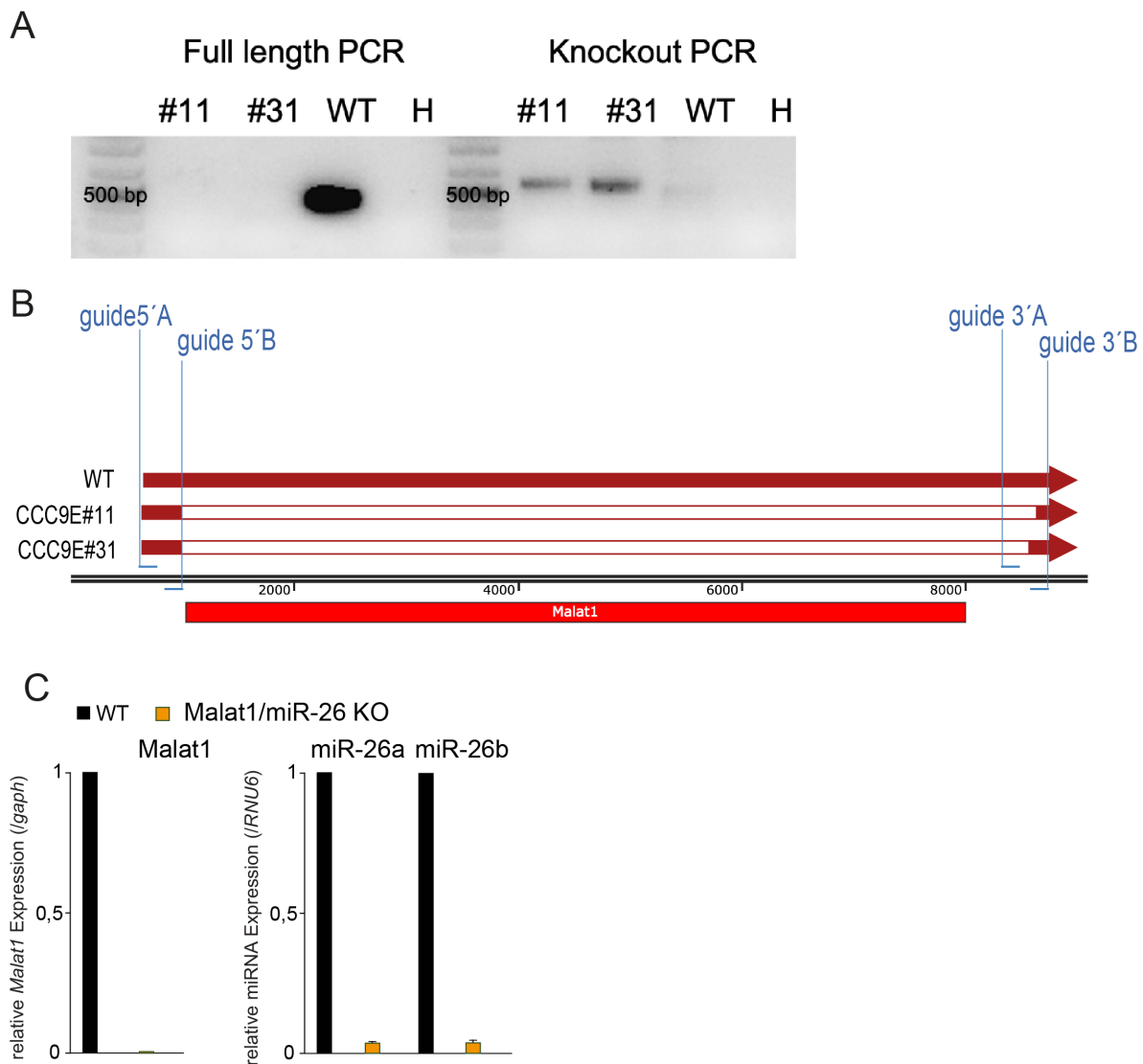


Abbildung 29 Generierung von *Malat1*/miR-26 knockout ES-Zellen

A) Gelbild elektrophoretisch aufgetrennter PCR-Produkte der *Knockout* und *Full length* Genotypisierungs-PCRs die mit genomischen DNA-Proben der putativen *Malat1*/miR-26 KO ES-Zellen durchgeführt wurden. B) Schematische Darstellung der Position der verwendeten sgRNAs und des *Malat1* Lokus. Alignments der Sequenzierung der verwendeten *Malat1*/miR-26 KO ES-Zelllinien. C) *Malat1*-spezifische (links), miR-26a und miR-26b spezifische (rechts) qRT-Analysen in Wt und *Malat1*/miR-26 KO ES-Zellen. n=3.

Die phasenkontrastmikroskopische Analyse zeigte, dass *Malat1*/miR-26 KO Zell-Kolonien die gleiche ES-Zell-typische Morphologie wie Wt ES-Zell-Kolonien besitzen. Zur Untersuchung der Veränderung der Zellzahl über die Zeit in Wt und *Malat1*/miR-26 KO ES-Zell-Kulturen wurden die kumulativen Populationsverdopplungen an Tag 2, 4, 6 und 8 berechnet. Wie Abbildung 30 B zeigt, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation zwischen Wt und *Malat1*/miR-26 KO ES-Zell-Kulturen festgestellt werden. Um den Einfluss des gleichzeitigen Verlustes von *Malat1* und miR-26 auf den pluripotenten Zustand der ES-Zellen zu untersuchen, wurde sowohl die Anzahl AP⁺ ES-Zellkolonien als auch die Expressionslevel

der Pluripotenzmarker *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* und *Rex1* mittels qRT-PCR Analyse untersucht. Die Frequenz AP⁺ ES-Zellkolonien war zwischen Wt und *Malat1*/miR-26 KO ES-Zell-Kulturen nicht zu unterscheiden (Abb. 30 C). Die Expression der Pluripotenzmarker war zwischen Wt und *Malat1*/miR-26 KO ES-Zellen unverändert (Abb. 30 D). Zuletzt wurde die Zellzahl während der Bildung von *embryoid bodies* (EBs) untersucht. Abbildung 30 E zeigt, dass *Malat1*/miR-26 KO-Zellen an Tag 2 und Tag 4 keine signifikant veränderten Zellzahlen im Vergleich zum Wt aufwiesen.

Diese ersten Analysen der *Malat1*/miR-26 KO ES-Zellen zeigten, dass der gleichzeitige Verlust von *Malat1* und miR-26 keinen Einfluss auf das Wachstum und die Pluripotenz von ES-Zellen hatte. Auch die individuellen *knockouts* dieser beiden ncRNAs hatte keinen Einfluss auf ES-Zell-Ebene (siehe Kapitel 5.2.3, [142]). Der Verlust dieser beiden nicht kodierenden RNAs hat also keinen Einfluss auf das Wachstum oder die Pluripotenz von ES-Zellen.

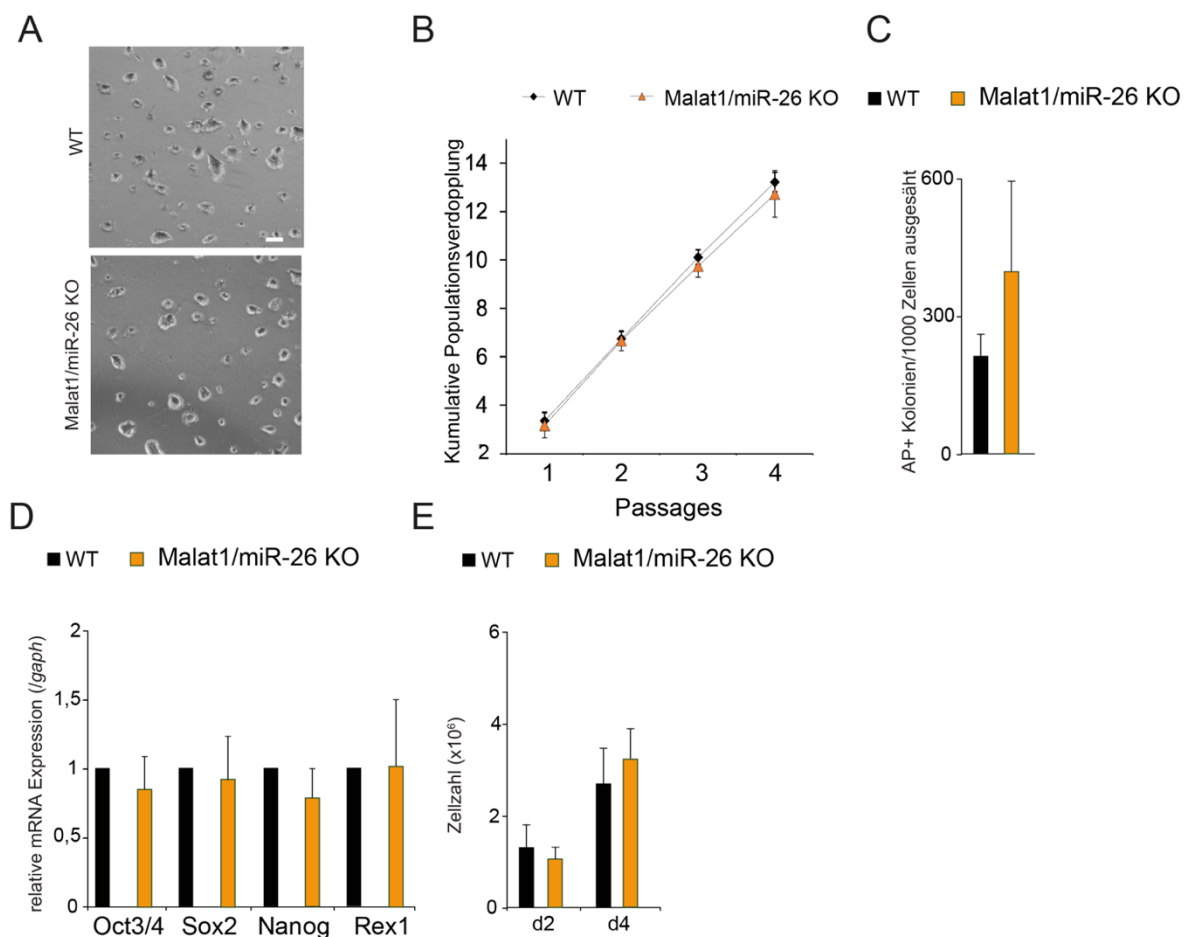


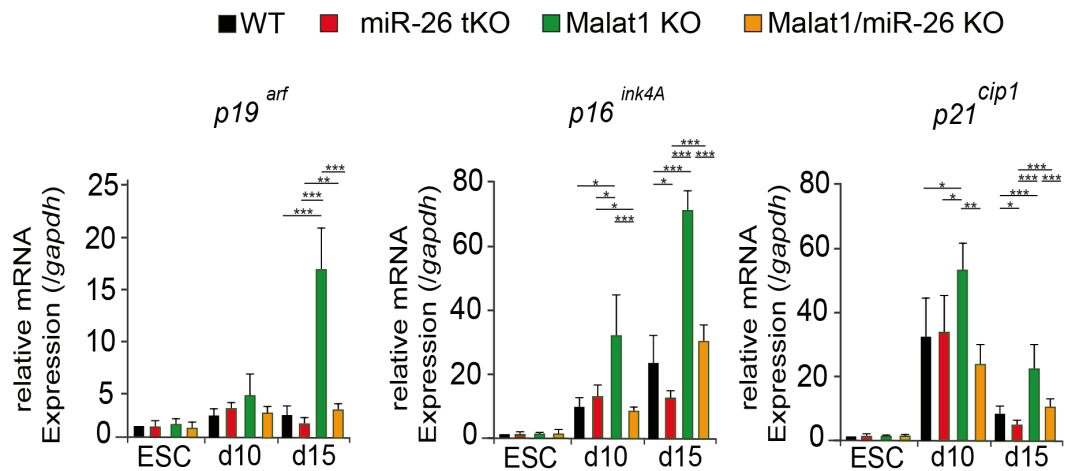
Abbildung 30 Charakterisierung der *Malat1*/miR-26 KO ES-Zellen

A) Repräsentative Phasenkontrastbilder der Wt und *Malat1*/miR-26 KO ES-Zellen. Maßstabsbalken: 100 µm. B) Quantifizierung der kumulativen Populationsverdopplung von Wt und *Malat1*/miR-26 KO ES-Zellen über vier Passagen. n=3. C) Bestimmung der Anzahl AP⁺ Zellen in Wt und *Malat1*/miR-26 KO ES-Zell-Kulturen. n=4. D) qRT-PCR Analyse der Pluripotenzmarker *Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog* und *Rex1* in Wt und *Malat1*/miR-26 KO ES-Zellen. n=3. E) Quantifizierung der Zellzahl in Wt und *Malat1*/miR-26 KO EB-Kulturen an Tag 2 und Tag 4. n=3.

5.2.9 Die Expression von Zellzyklusinhibitoren in differenzierenden *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen ist gegenüber differenzierenden *Malat1* KO-Kulturen reduziert

In Kapitel 5.2.7 konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von miR-26 zu einer verminderten Zellzyklusinhibitor-Expression in *Malat1* KO-Zellen führte. Um zu überprüfen welchen Effekt der Verlust der endogenen miR-26 zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung auf die Zellzyklusinhibitor Expression hat, wurden qRT-PCR Analysen mit RNA Proben, die an Tag 10 und Tag 15 der Differenzierung aus Wt, miR-26 tKO, *Malat1* KO und *Malat1*/miR-26 KO ES-Zell-Kulturen isoliert wurden, durchgeführt. Die Analyse zeigte in Übereinstimmung mit vorangegangenen publizierten Arbeiten [142], dass die Expression der Zellzyklusinhibitoren *p16^{ink4A}* und *p21^{cip1}* an Tag 15 in miR-26 tKO-Kulturen signifikant niedriger war als in Wt-Kulturen. Die Expression von *p16^{ink4A}* und *p21^{cip1}* war in *Malat1* KO-Kulturen an Tag 10 und Tag 15 signifikant erhöht. Die Expression von *p19^{arf}* war hingegen nur an Tag 15 der Differenzierung in *Malat1* KO-Kulturen signifikant erhöht. Die Expression der Zellzyklusinhibitoren war in Kulturen des *Malat1*/miR-26 KOs auf vergleichbaren Leveln wie die Expression in Wt-Kulturen. Jedoch konnte, im Vergleich zum miR-26 tKO eine signifikant höhere Expression aller Zellzyklusinhibitoren an Tag 15 und im Vergleich zum *Malat1* KO eine signifikant niedrigere Expression aller Zellzyklusinhibitoren an Tag 15 sowie eine niedrigere Expression von *p16^{ink4A}* und *p21^{cip1}* an Tag 10 beobachtet werden (Abb. 31 A). Nachdem gezeigt wurde, dass die Expression der Zellzyklusinhibitoren durch den Verlust der endogenen miR-26 in *Malat1* KO-Kulturen auf Wt-Expressionslevel zurück gebracht werden konnten, sollte dies durch Verwendung von artifiziellen miR-26 *Mimics* überprüft werden. Dabei sollte untersucht werden, ob das Einbringen von miR-26 *Mimics* in miR-26 tKO-Zellen als auch in *Malat1*/miR-26 KO-Zellen die Expressionslevel der Zellzyklusinhibitoren beeinflusst. Dafür wurden die Zellen ebenfalls an Tag 9 der Differenzierung transfiziert und die Expression der Zellzyklusinhibitoren 72 Stunden nach der Transfektion analysiert. Abbildung 31 B zeigt, dass die Transfektion mit miR-26 *Mimics* zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von *p16^{ink4A}* und *p19^{arf}* in Wt-Kulturen führte. Nach der Transfektion von miR-26 *Mimics* in miR-26 tKO- als auch *Malat1*/miR-26 tKO-Kulturen kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der Expressionslevel von *p16^{ink4A}*, *p19^{arf}* und *p21^{cip1}*. Zusammengefasst verdeutlichen diese Analysen, dass miR-26 an der Regulation der Zellzyklusinhibitoren in neuronalen Vorläuferzellen beteiligt war.

A



B

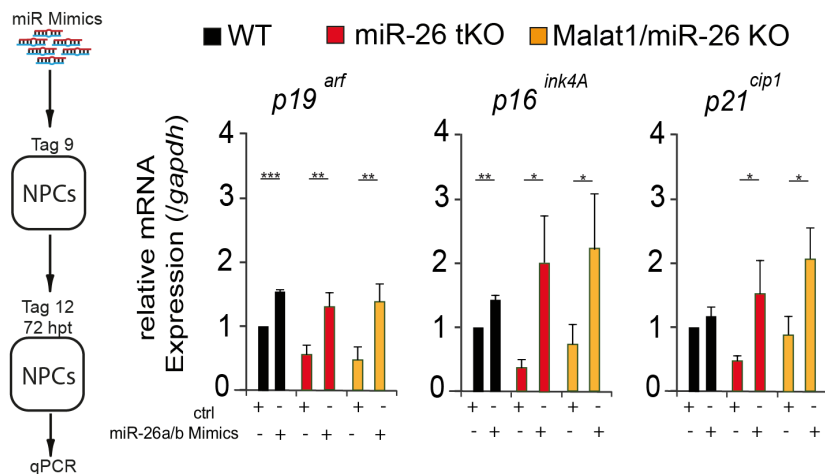


Abbildung 31 Einfluss der miR-26 auf die Expression der Zellzyklusinhibitoren *p16^{ink4A}*, *p19^{arf}* und *p21^{cip1}*

A) qRT-PCR Analyse der Zellzyklusinhibitoren *p16^{ink4A}*, *p19^{arf}* und *p21^{cip1}* in ES-Zellen, d10 und d15 Kulturen der Differenzierung im Wt, miR-26 tKO, *Malat1* KO und *Malat1/miR-26* KO. n=4, einseitiger Anova-Test, *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,005. B) Wt, miR-26 tKO und *Malat1/miR-26* KO NPCs wurden an Tag 9 der neuronalen Differenzierung mit Kontroll- und miR-26-Mimics transfiziert und die Expression der Zellzyklusinhibitoren *p16^{ink4A}*, *p19^{arf}* und *p21^{cip1}* nach 72 Stunden mittels qRT-PCR analysiert. n=3, einseitiger Anova-Test, *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,005.

5.2.10 Der gleichzeitige Verlust von miR-26 und *Malat1* bringt die Proliferationsrate neuronaler Vorläuferzellen zurück auf Wt Niveau

Wie in Kapitel 5.2.4 bereits beschrieben, war in *Malat1* KO-Kulturen an Tag 10 der Differenzierung eine erhöhte Frequenz an P16^{INK4A}+ neuronaler Vorläuferzellen zu beobachten. Die vorhergehenden qRT-PCR Analysen zeigten, dass in *Malat1/miR-26* KO-Kulturen die Expression der Zellzyklusinhibitoren nicht erhöht war. Um zu untersuchen, ob die Expression von P16^{INK4A} in *Malat1/miR-26* KO-Kulturen vermindert war, wurde die Frequenz der MSI1+ und der P16^{INK4A}+ Zellen an Tag 10 und Tag 12 der neuronalen Differenzierung in

Wt-, miR-26 tKO-, *Malat1* KO- sowie *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen bestimmt. Repräsentative Abbildungen der zu diesem Zweck durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen sowie die Frequenz Marker⁺ Zellen sind in Abbildung 32 A gezeigt. Die Frequenz P16^{INK4A} + Zellen in Wt- (13,01% ± 8,42%), miR-26 tKO- (13,56% ± 9,66%) sowie *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen (11,46% ± 1,67%) waren nicht signifikant verschieden. In *Malat1* KO-Kulturen war jedoch die Zahl der P16^{INK4A}+ im Vergleich zu den anderen Kulturen deutlich erhöht (65,12% ± 15,56%). Die Frequenz der MSI1⁺ Zellen zeigt keine signifikante Veränderung in den hier analysierten Kulturen (Wt: 74,11% ± 19,31%; miR-26 tKO: 65,51% ± 11,46%; *Malat1* KO: 65,12% ± 15,56%; *Malat1*/miR-26 KO: 40,81% ± 14,05%). Betrachtet man den Anteil MSI1/ P16^{INK4A}+ Zellen wird deutlich, dass in Wt-, miR-26 tKO- und *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen nur zwischen 15 und 30% der neuronalen Vorläuferzellen positiv für P16^{INK4A} waren, während es in *Malat1* KO-Kulturen über 70% waren. Abbildung 32 B zeigt die Analyse von Tag 12 Kulturen der Differenzierung. Hier konnte eine leicht erhöhte Frequenz an P16^{INK4A}+ Zellen in miR-26 tKO-Kulturen (8,11% ± 2,45%) im Vergleich mit den Wt-Kulturen (2,24% ± 0,6%) beobachtet werden. Zudem zeigte sich auch an Tag 12 im Vergleich zu anderen Kulturen, in *Malat1* KO-Kulturen eine signifikant höhere Frequenz P16^{INK4A} + Zellen (*Malat1* KO: 21,35% ± 8,64% vs. Wt: 2,24% ± 0,6%; miR-26 tKO: 8,11% ± 2,45%; *Malat1*/miR-26 KO: 2,78% ± 0,75%). Die Frequenz MSI1⁺ neuronaler Vorläuferzellen an Tag 12 der Differenzierung war in miR-26 tKO-Kulturen (49,87% ± 12,03%) im Vergleich zu Wt-Kulturen (21,9% ± 10,58%), *Malat1* KO-Kulturen (21,03% ± 10,36%) und *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen (17,36% ± 4,61%) signifikant erhöht. Um den Anteil der neuronalen Vorläuferzellen zu bestimmen die den Zellzyklus verlassen, wurde die Frequenz der MSI1/ P16^{INK4A}+ Zellen in den Kulturen bestimmt. Da es in miR-26 tKO-Kulturen zu einer Akkumulation MSI1⁺ neuronaler Vorläuferzellen kam, konnte bei dieser Analyse kein signifikanter Unterschied zwischen Wt- (16,93% ± 10,86%), miR-26 tKO-(15,69% ± 1,48%) und *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen (18,89% ± 3,79%) festgestellt werden. *Malat1* KO-Kulturen wiesen hingegen eine deutlich erhöhte Frequenz MSI1/ P16^{INK4A}+ Zellen (84,58% ± 12,2%) im Vergleich mit den anderen Kulturen auf.

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass, im Gegensatz zu Kulturen mit *Malat1* Deletion, in Kulturen mit kombinierter Deletion von *Malat1* und miR-26 kein erhöhter Anteil von P16^{INK4A} NPCs zu beobachten war. Dies deutet darauf hin, dass miR-26 die erhöhte Expression von P16^{INK4A} in *Malat1* KO NPCs vermittelt.

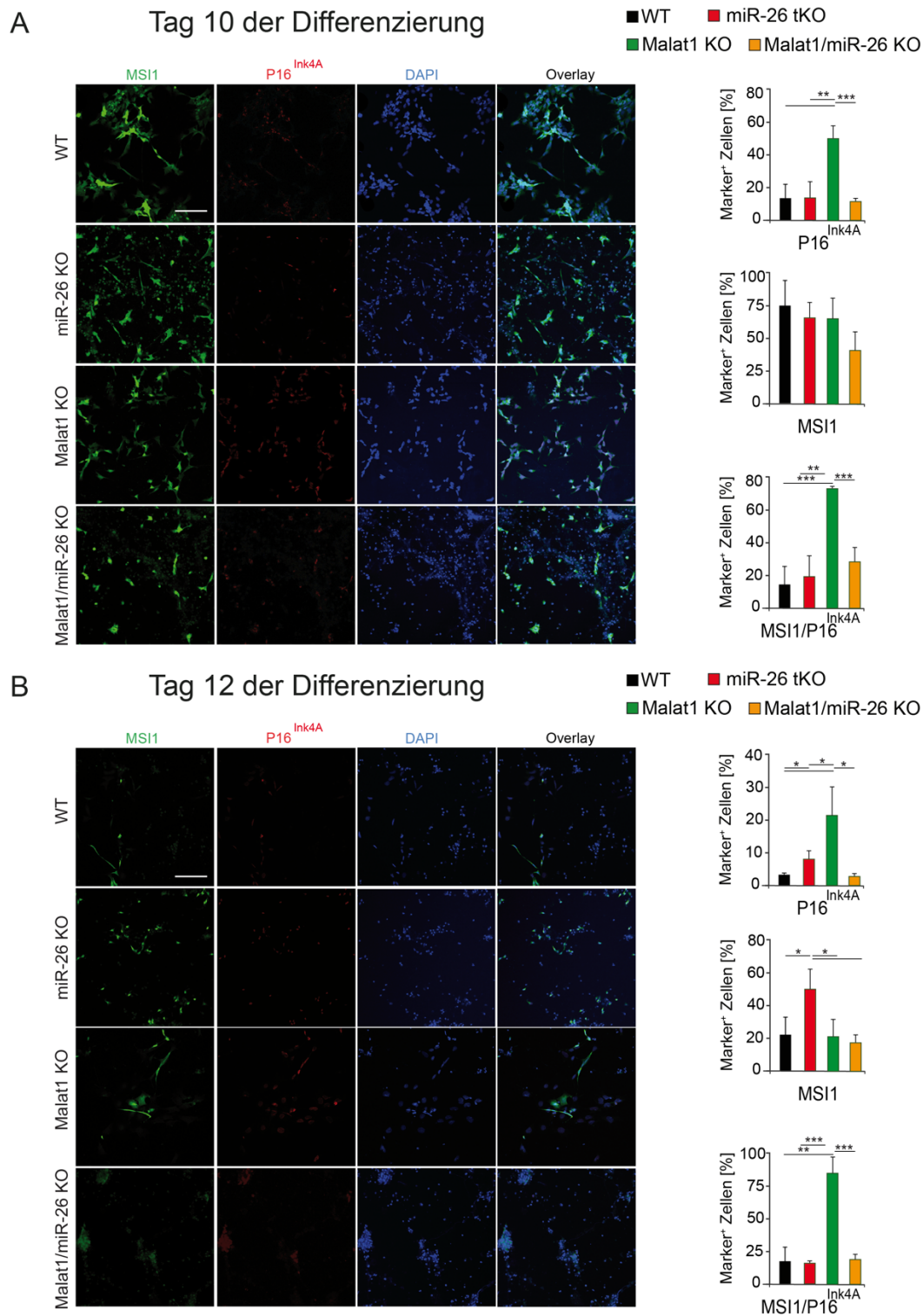


Abbildung 32 Der gleichzeitige Verlust von *Malat1* und miR-26 führt nicht zu einer Erhöhung der P16^{INK4A} exprimierenden Vorläuferzellen

A) Repräsentative Abbildungen der Immunfluoreszenzfärbung mit P16^{INK4A} sowie MSI1-spezifischen Antikörpern an Tag 10 der Differenzierung in Wt-, miR-26 tKO-, *Malat1* KO- sowie *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen. Quantifizierung der Frequenzen P16^{INK4A}+ und MSI1+ Zellen. n=3. Maßstabsbalken: 100 µm. Einseitiger Anova-Test. B) Repräsentative Abbildungen der Immunfluoreszenzfärbung mit P16^{INK4A} sowie MSI1-spezifischen Antikörpern an Tag 12 der Differenzierung in Wt-, miR-26 tKO-, *Malat1* KO sowie *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen. Quantifizierung der Frequenzen P16^{INK4A}+ und MSI1+ Zellen. n=3. Maßstabsbalken: 100 µm. Einseitiger Anova-Test. *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,005.

Um die Konsequenz des gleichzeitigen Verlustes von *Malat1* und miR-26 auf die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen zu untersuchen, wurde der Anteil proliferierender Zellen durch BrdU-Aufnahme mittels Immunfluoreszenzfärbungen in Wt-, *Malat1* KO- und *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen an Tag 10 und Tag 12 der neuronalen Differenzierung analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 33 gezeigt. Die Frequenz BrdU⁺ Zellen war an Tag 10 in *Malat1* KO-Kulturen (23,63% ± 4,31%) signifikant niedriger als in Wt-Kulturen (34,4% ± 3,48%) und *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen (32,62% ± 0,98%). *Malat1* KO-Kulturen zeigten an Tag 10 eine vergleichbare Frequenz MSI1⁺ neuronaler Vorläuferzellen (62,84% ± 5,09%) wie die Wt-Kulturen (65,17% ± 6,85%). *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen zeigten hingegen eine geringere Frequenz (49,47% ± 3,65%) MSI1⁺ neuronaler Vorläuferzellen. Der prozentuale Anteil von MSI1⁺ im Verhältnis zu BrdU⁺ Zellen zeigte einen deutlichen geringeren Anteil proliferierender, neuronaler Vorläuferzellen in *Malat1* KO-Kulturen (34,28% ± 5,95%) als in Wt- (49,97% ± 5,5%) und *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen (57,68% ± 8,3%).

An Tag 12 konnten keine Unterschiede in der Frequenz BrdU⁺ Zellen oder dem prozentualen Anteil von MSI1⁺ im Verhältnis zu BrdU⁺ Zellen zwischen Wt-, *Malat1* KO- und *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen festgestellt werden. Jedoch weist der *Malat1*/miR-26 KO eine signifikant niedrigere Frequenz MSI1⁺ neuronaler Vorläuferzellen auf.

Sowohl miR-26 tKO-Kulturen als auch *Malat1* KO-Kulturen weisen während der neuronalen Differenzierung einen veränderten, proliferativen Zustand der neuronalen Vorläuferzellen auf. Die hier gezeigten Daten zeigten, dass *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen weder den Phänotyp des miR-26 tKOs noch des *Malat1* KOs in Bezug auf die Proliferation sowie auf die Expression der Zellzyklusinhibitoren aufweist.

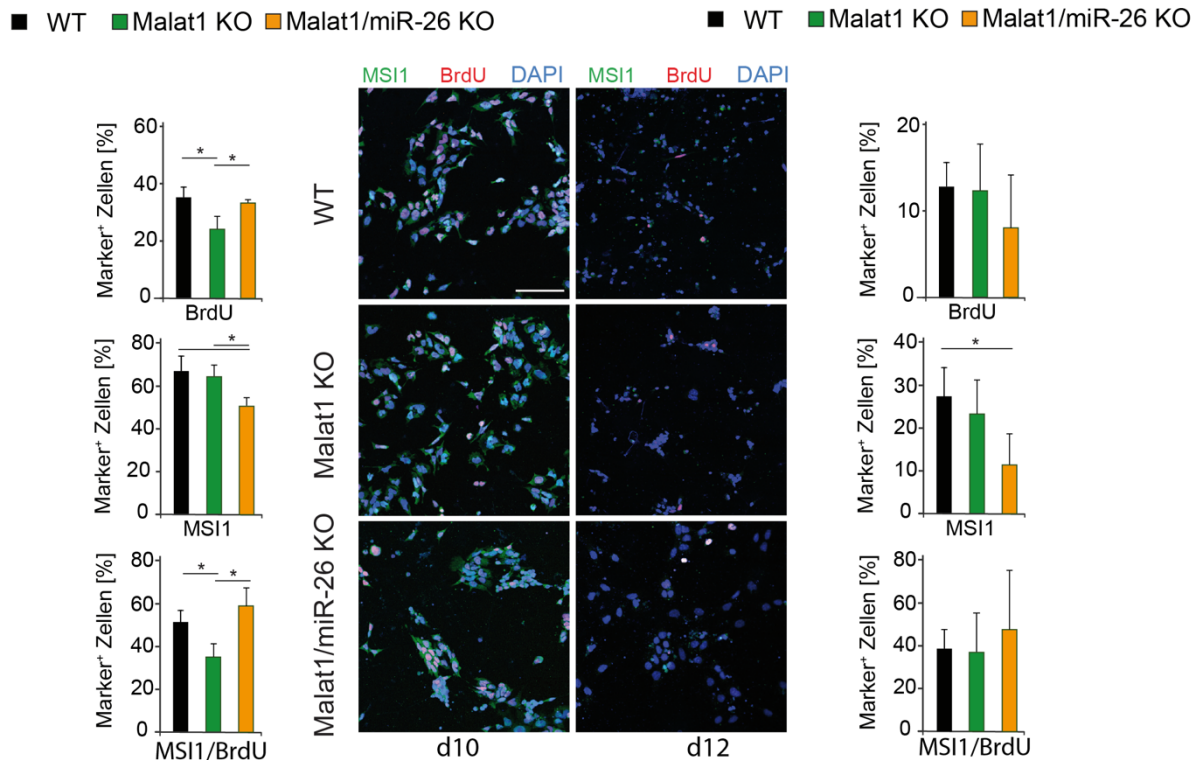
Die erhöhte Expression von P16^{INK4A} sowie die verringerte Proliferationsrate der *Malat1* KO-Zellen sind mögliche Marker für zelluläre Seneszenz [263]. Auch die morphologischen Veränderungen, die typisch für Seneszenz sind wie ein abflachen und eine Vergrößerung der Zellen [264], konnte in *Malat1* KO-Kulturen beobachtet werden (Abb. 24 A). Zelluläre Seneszenz ist ein irreversibler Arrest des Zellwachstums, die meist durch verschiedene Faktoren wie Alterung, DNA-Schäden, Aktivierung von Onkogenen und oxidativen Stress ausgelöst wird. Während der embryonalen Entwicklung spielt Seneszenz aber auch eine wichtige Rolle bei der zellulären Musterbildung (*Patterning*) [265]. Um zu überprüfen, ob es in *Malat1* KO-Kulturen während der neuronalen Differenzierung zur Ausbildung zellulärer Seneszenz kommt, wurde die β -Galaktosidase Aktivität [266] an Tag 10 und Tag 12 der Differenzierung

untersucht. Bei der Bestimmung der Aktivität der β -Galaktosidase, wird das chromogene Substrat X-Gal durch die β -Galaktosidase umgesetzt, was zu einer blauen Färbung führt.

Die repräsentativen Abbildungen, sowie die Ergebnisse der Quantifizierung β -Galaktosidase⁺ Zellen sind in Abbildung 33 B gezeigt. An Tag 10 der neuronalen Differenzierung konnten in Wt- und miR-26 tKO-Kulturen nur ein geringer Anteil β -Galaktosidase⁺ Zellen festgestellt werden (Wt: 14,08% \pm 2,26%; miR-26 tKO: 14,14% \pm 2,87%). In *Malat1* KO- sowie *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen konnten im Vergleich zu Wt- und miR-26 tKO-Kulturen signifikant erhöhte Frequenzen β -Galaktosidase⁺ Zellen an Tag 10 der Differenzierung detektiert werden (*Malat1* KO: 30,41% \pm 5,12%; *Malat1*/miR-26 KO: 23,24% \pm 4,94%). Jedoch ist der Anstieg β -Galaktosidase⁺ Zellen in *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen deutlich wenn auch nicht signifikant geringer als in *Malat1* KO-Kulturen. Betrachtet man die Frequenz β -Galaktosidase⁺ Zellen an Tag 12 der neuronalen Differenzierung, konnte in Wt- und miR-26 tKO-Kulturen nur ein geringer Anteil β -Galaktosidase⁺ Zellen detektiert werden (Wt: 12,26% \pm 3,52%; miR-26 tKO: 12,74% \pm 1,36%). Auch an Tag 12 der Differenzierung konnte in *Malat1* KO-Kulturen ein im Vergleich zum Wt und miR-26 tKO signifikant erhöhter Anteil β -Galaktosidase⁺ Zellen detektiert werden (30,87% \pm 13,26%). In *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen konnte jedoch kein signifikanter Anstieg der Frequenz β -Galaktosidase⁺ Zellen im Vergleich zu den Wt- und miR-26 tKO-Kulturen festgestellt werden (14,36% \pm 4,35%).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass es während der neuronalen Differenzierung von *Malat1* KO-Zellen zu zellulärer Seneszenz kommt. Durch den gleichzeitigen Verlust von *Malat1* und miR-26 kann dieser Phänotyp teilweise aufgehoben werden.

A



B

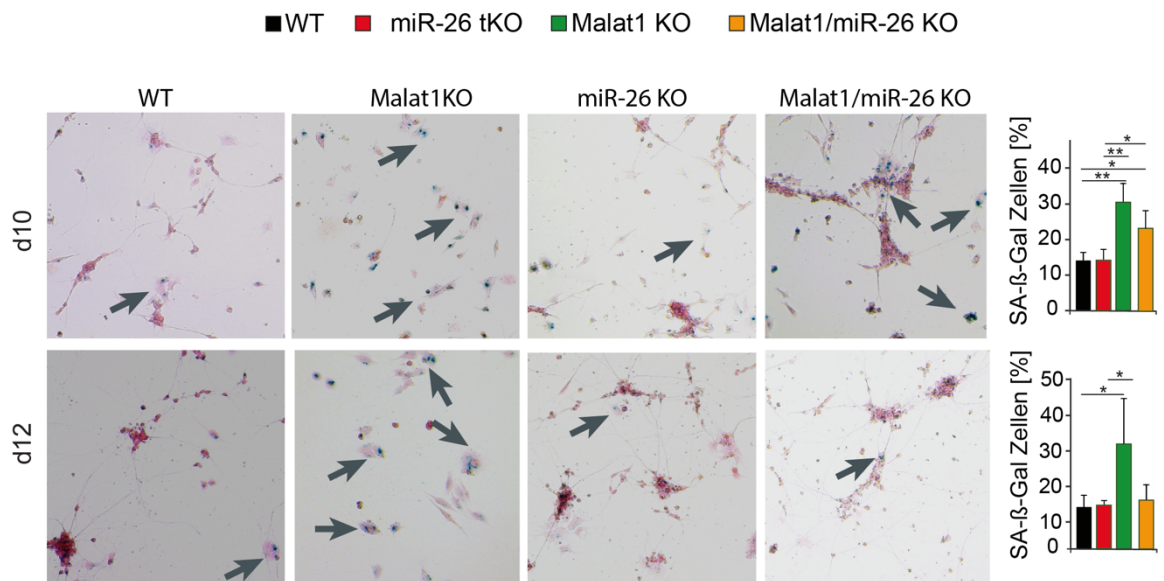


Abbildung 33 *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen zeigen keine veränderte Proliferationsrate sowie eine geringere Frequenz an β -Galaktosidase+ Zellen als *Malat1* KO-Kulturen

Repräsentative Abbildungen der Immunfluoreszenzfärbung mit BrdU und MSI1-spezifischen Antikörpern. Quantifizierung der Frequenzen BrdU+ und MSI1+ Zellen in Wt-, *Malat1* KO- und *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen an d10 (links) und d12 (rechts) der neuronalen Differenzierung. n=3, Maßstabsbalken: 100 μ m, einseitiger Anova-Test. B) Repräsentative Abbildungen der β -Galaktosidase Aktivität an Tag 10 (oben) und Tag 12 (unten) der Differenzierung in Wt-, miR-26 tKO-, *Malat1* KO- sowie *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen. Quantifizierung der Frequenzen β -Galaktosidase+ Zellen. n=4, einseitiger Anova-Test.

5.2.11 Der Verlust von *Malat1* führt zu erhöhter Expression seneszenz-assoziiierter miRNAs der neuronalen *in vitro* Differenzierung

Overhoff *et al.* konnten zeigen, dass die miR-26b zusammen mit miR-181, miR-210 und miR-322 eine Gruppe seneszenz-assoziiierter (SA) miRNAs bilden, die die P16^{INK4A} über die Polycomb Proteine CBX7, EED, EZH2 und SUZ12 regulieren [267]. Um zu überprüfen, ob es in *Malat1* KO-Kulturen zu einer Initiation dieser SA-miRNAs kommt, wurden miRNA-spezifische qRT-PCR Analysen mit RNA Proben von ES-Zellen sowie Kulturen von Tag 9, 12 und 15 der neuronalen Differenzierung durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen in Wt- und *Malat1* KO-Kulturen sind in Abbildung 34 A gezeigt. Die Expression der miR-210 und miR-322 war an Tag 12 der Differenzierung in *Malat1* KO-Kulturen signifikant höher im Vergleich zu den Wt-Kulturen. An Tag 15 war die Expression der SA-miRNAs in *Malat1* KO-Kulturen niedriger als in Wt-Kulturen. Jedoch konnte hier nur eine Signifikanz bei dem Vergleich der Expressionslevel von miR-181 zwischen Wt- und *Malat1* KO-Kulturen gezeigt werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass es zu einer erhöhten Expression der SA-miRNAs in *Malat1* KO-Kulturen und damit zur P16^{INK4A}-vermittelten zellulären Seneszenz kommt. Um zu überprüfen, welchen Einfluss der Verlust der miR-26 auf die Expression der anderen SA-miRNAs hat, wurden die qRT-PCR Analysen mit RNA Proben von *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 34 B gezeigt. Hier wird deutlich, dass es in *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen zu keinem der analysierten Zeitpunkte zu einer erhöhten Expression der SA-miRNAs im Vergleich mit den Wt-Kulturen kommt. An Tag 15 konnte eine signifikant niedrigere Expression der miR-322 beobachtet werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die in *Malat1* KO-Kulturen beobachtete Seneszenz von miR-26 abhängt.

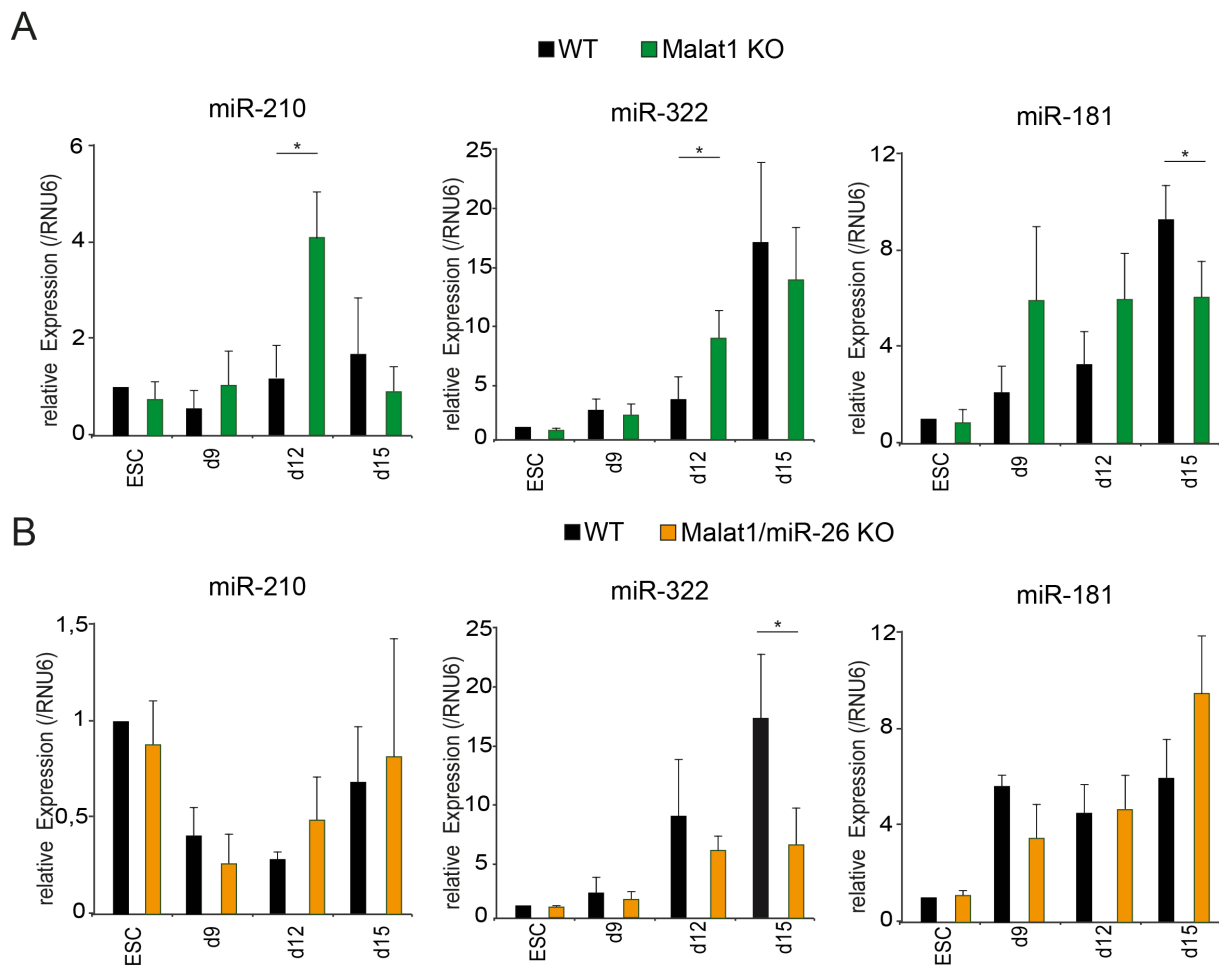


Abbildung 34 *Malat1* KO-Kulturen weisen eine erhöhte Expression seneszenz-assoziiierter miRNAs auf
miRNA spezifische qRT-PCR für miR-210, miR-322, und miR-181 in ES-Zellen, d19, d12 und d15 Kulturen der Differenzierung im Wt und *Malat1* KO (A) sowie Wt und *Malat1*/miR-26 KO (B). n=3, einseitiger Anova-Test, *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$.

5.2.12 Der gleichzeitige Verlust von miR-26 und *Malat1* führt zu einer beschleunigten neuronalen Differenzierung

Um die Auswirkungen des gleichzeitigen Verlustes von miR-26 und von *Malat1* auf die neuronale *in vitro* Differenzierung zu untersuchen, wurden die *Malat1*/miR-26 KO ES-Zellen zunächst bis Tag 15 differenziert. Zur Bestimmung der Frequenz neuronaler Vorläufer und neuronaler Zellen wurden Tag 15 Kulturen des Wt und des *Malat1*/miR-26 KOs mit Antikörpern gegen TUBB3, NESTIN und SOX2 angefärbt. Abbildung 35 zeigt repräsentative Bilder dieser Immunfluoreszenzfärbungen, sowie die Quantifizierung der Marker+ Zellen. Bei der Frequenz der Marker+ Zellen, konnten kein Unterschied zwischen Wt- (TUBB3: $62,3\% \pm 4,93\%$ NESTIN: $23,89\% \pm 3,06\%$; SOX2: $21,12\% \pm 2,53\%$) und *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen (TUBB3: $60,72\% \pm 3,42\%$ NESTIN: $22,94\% \pm 4,15\%$; SOX2: $25,033\% \pm 3,9\%$) festgestellt werden.

Es fiel jedoch auf, dass sich in Wt-Kulturen ein deutlich feineres, verzweigteres Netz aus Neuriten gebildet hatte. Dagegen bilden die Neuriten in *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen Strukturen aus, welche an radiale axonale Bündel erinnern, die schon in Kulturen humaner ES-Zell abgeleiteter sensorischer Neuronen beschrieben wurden [268]. Um diesen Eindruck quantitativ zu validieren, wurde ein Raster über die Immunfluoreszenzbilder mit den TUBB3 angefärbten Zellen gelegt und die Schnittpunkte der Neuriten mit diesem Raster im Verhältnis zur Anzahl der Zellen berechnet. Daraus ergab sich die Neuritendichte (Abb. 35, Quantifizierung links unten). Für die Neuritendichte in Wt-Kulturen erhält man bei dieser Analyse einen Wert von $0,98 \pm 0,13$ Neuritenschnittpunkte/Zelle, während im *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen nur $0,64 \pm 0,07$ Neuritenschnittpunkte/Zelle vorlagen. Diese Daten zeigen, dass der gleichzeitige Verlust von *Malat1* und miR-26 nicht die Frequenz der neuronalen Zellen beeinflusste, aber einen Einfluss auf deren Morphologie zu haben schien.

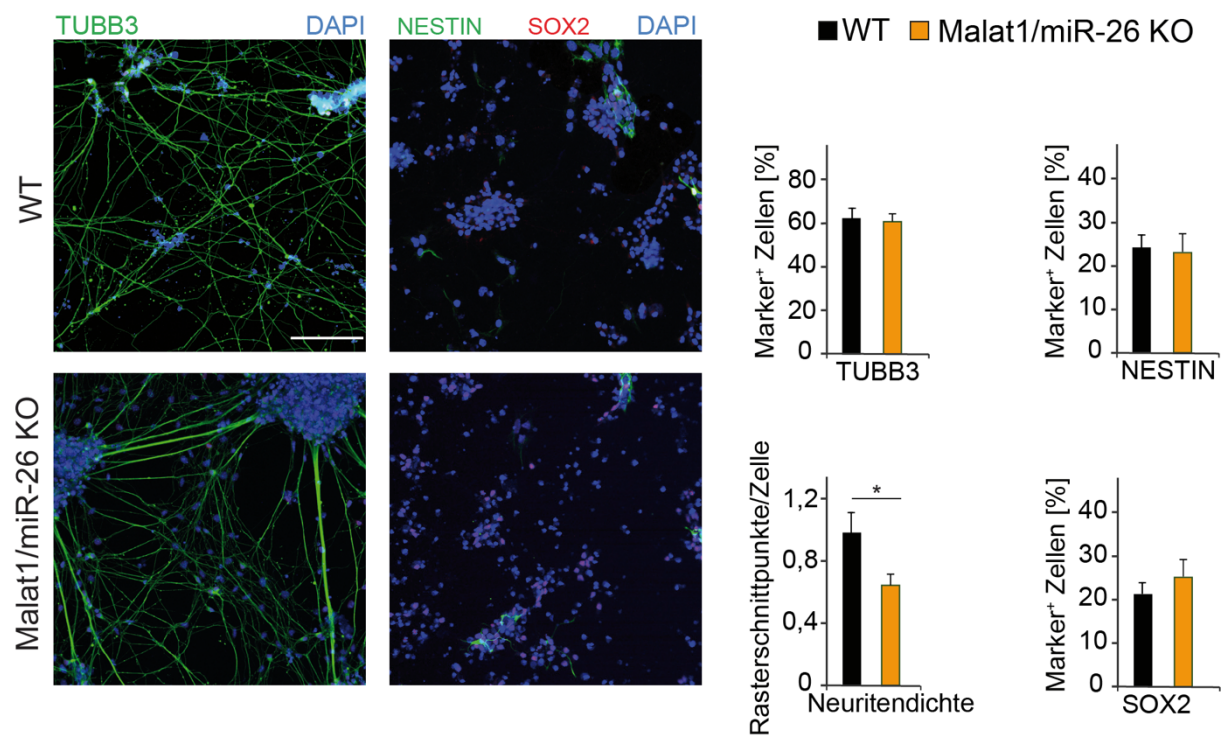


Abbildung 35 Der gleichzeitige Verlust von miR-26 und *Malat1* beeinflusst die neuronale Differenzierung nicht

Repräsentative Abbildungen der Immunfluoreszenzmikroskopie von Wt- und *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen an d15 der Differenzierung. Maßstabsbalken: 100 μ m. Quantifizierung der Marker⁺ Zellen. n=3, einseitiger Anova-Test, *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$.

Der gleichzeitige Verlust von miR-26 und *Malat1* beeinträchtigt nicht die Bildung von TUBB3⁺ Neuronen während der *in vitro* Differenzierung. Jedoch lassen sich morphologische Unterschiede feststellen, die auf eine beschleunigte neurale Differenzierung hindeuten. Um dies

genauer zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzanalysen der neuronalen Vorläuferzellen an Tag 10 der Differenzierung durchgeführt. Repräsentative Abbildungen und die Ergebnisse der Quantifizierung dieser Analyse sind in Abbildung 36 A gezeigt. Die Frequenz der Zellen, die positiv für die neuronalen Vorläuferzellen NESTIN und SOX2 waren, zeigte keinen Unterschied in *Malat1* KO-Kulturen (NESTIN: 29,59% ± 10,15%; SOX2: 62,01% ± 17,29%) und *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen (NESTIN: 34,91% ± 8,22%; SOX2: 63,53% ± 20,69%) im Vergleich zu Wt-Kulturen (NESTIN: 35,21% ± 6,11%; SOX2: 56,09% ± 23,84%). Betrachtet man die Frequenz der TUBB3+ Zellen in Wt- (30,89% ± 7,46%) und *Malat1* KO-(22,38% ± 1,77%) Kulturen, konnte eine leichte allerdings nicht signifikant verringerte Frequenz beobachtet werden. In *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen konnte eine leicht aber ebenfalls nicht signifikant erhöhte Frequenz an TUBB3+ Zellen (27,28% ± 4,99%) festgestellt werden. Vergleicht man die Frequenz der TUBB3+ Zellen in *Malat1* KO- und *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen, konnte hier eine signifikant höhere Frequenz in *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen ermittelt werden. Bei der Betrachtung der repräsentativen Abbildungen wird deutlich, dass die Morphologie der mittels TUBB3 Antikörper angefärbten Neurone in *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen sich deutlich von den anderen Kulturen unterschied. Diese Zellen hatten deutlich längere Neuriten ausgebildet, die sich ineinander verzweigen und ein Netzwerk ausbildeten. In Wt- und *Malat1* KO-Kulturen zeigten die TUBB3+ Zellen diese Morphologie noch nicht. Um diesen Unterschied zu quantifizieren, wurde die Neuritendichte ermittelt. Die Anzahl der Rasterschnittpunkte pro Zelle in Wt-Kulturen lag bei 0,11 ± 0,06. In *Malat1* KO-Kulturen war die Anzahl am niedrigsten (0,067 ± 0,014), es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zu der Frequenz in Wt-Kulturen festgestellt werden. *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen wiesen die höchste und im Vergleich zum *Malat1* KO-Kulturen signifikant erhöhte Anzahl an Rasterschnittpunkte pro Zelle auf (0,39 ± 0,19). Diese Analyse lässt vermuten, dass die Zellen in *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen den Prozess der Differenzierung schneller durchlaufen, da eine neuronale Morphologie schon an Tag 10 deutlich zu erkennen war. Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurden qRT-PCR Analysen der neuronalen Vorläufermarker *Msi1* und *Pax6*, sowie der neuronalen Marker *Tubb3*, *Map2* und *NeuN* in ES-Zell-, Tag 10- und Tag 15-Kulturen des Wt, des miR-26 tKOs, des *Malat1* KOs und des *Malat1*/miR-26 KOs durchgeführt. Die Expressionsanalysen der neuronalen Vorläufermarker zeigten eine deutliche Erhöhung an Tag 15 der Differenzierung in miR-26 tKO Kulturen. Dieser schon beschriebene Effekt [142] konnte weder in *Malat1* KO- noch in *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen beobachtet werden. Die Expression des Vorläufermarkers *Msi1* war an Tag 10 der Differenzierung in

Malat1 KO-Kulturen signifikant niedriger als in Wt-Kulturen. Die Expression des neuronalen Vorläufermarkers *Pax6* wies jedoch keine signifikante Veränderung zwischen Wt- und *Malat1* KO-Kulturen während der Differenzierung auf. Die Expression neuronaler Vorläufermarker zeigte in *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Wt-Kulturen. Allerdings konnten im Vergleich zum miR-26 tKO signifikant verringerte Expressionslevel von *Msi1* und *Pax6* an Tag 15 der Differenzierung festgestellt werden. Die Expressionsanalysen des neuronalen Markers *Tubb3* sowie *Map2* zeigten im Vergleich zu Wt-Kulturen eine verringerte Expression an Tag 15 in miR-26 tKO-Kulturen, an Tag 10 und Tag 15 der Differenzierung in *Malat1* KO-Kulturen, sowie an Tag 15 in *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen. Jedoch wiesen *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen eine signifikant erhöhte *Tubb3* Expression an Tag 10 der Differenzierung auf. Auch die Expression des Markers *NeuN* war in *Malat1* KO-Kulturen an Tag 10 und Tag 15 der Differenzierung signifikant niedriger als in Wt-Kulturen. Deutlich erhöhte *NeuN*-Expressionslevel konnten an Tag 10 und Tag 15 der Differenzierung in *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen detektiert werden. Bei den Markern *Tubb3* sowie *Map2* handelt es sich um frühe neuronale Marker, während es sich bei *NeuN* um einen späteren neuronalen Marker handelt, der nicht exprimiert wird, solange die Zellen noch den Zellzyklus durchlaufen [269, 270]. Durch die hohe Expression des Markers *NeuN* in *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen bestätigt sich die Hypothese, dass sich die Zellen in einem weiter differenzierteren Zustand befinden als die Wt-Kulturen. Um die Expression früher neuronaler Marker in den *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen genauer zu untersuchen, wurden die Expressionsanalysen von *Tubb3* und *Map2* mit RNA Proben von ES-Zellen an Tag 3, 6, 9, 12 und 15 der neuronalen Differenzierung wiederholt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 36 C dargestellt. Hier wird deutlich, dass die Expression von *Tubb3* und *Map2* in *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen schon an Tag 12 ihr höchstes Level erreichte und an Tag 15 wieder abfiel, während die Wt-Kulturen erst an Tag 15 der Differenzierung die höchste Expression dieser Marker aufwiesen.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass der gleichzeitige Verlust von *Malat1* und miR-26 nicht zu einer Reduzierung des Differenzierungspotentials führt, wie es bei den individuellen *Knockouts* der Fall ist. Stattdessen kommt es durch den gleichzeitigen Verlust zu einer Beschleunigung der Differenzierung in diesen Kulturen.

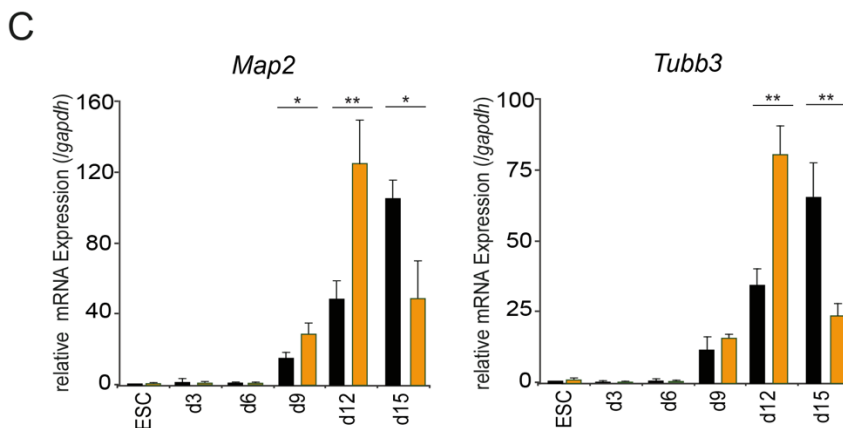
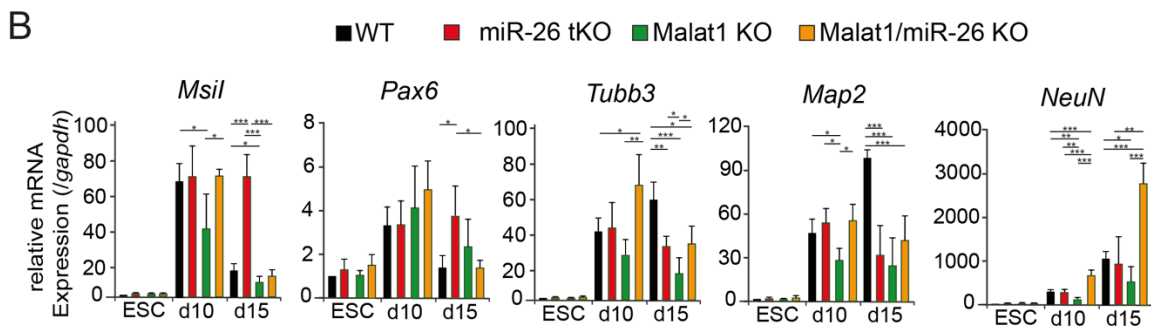
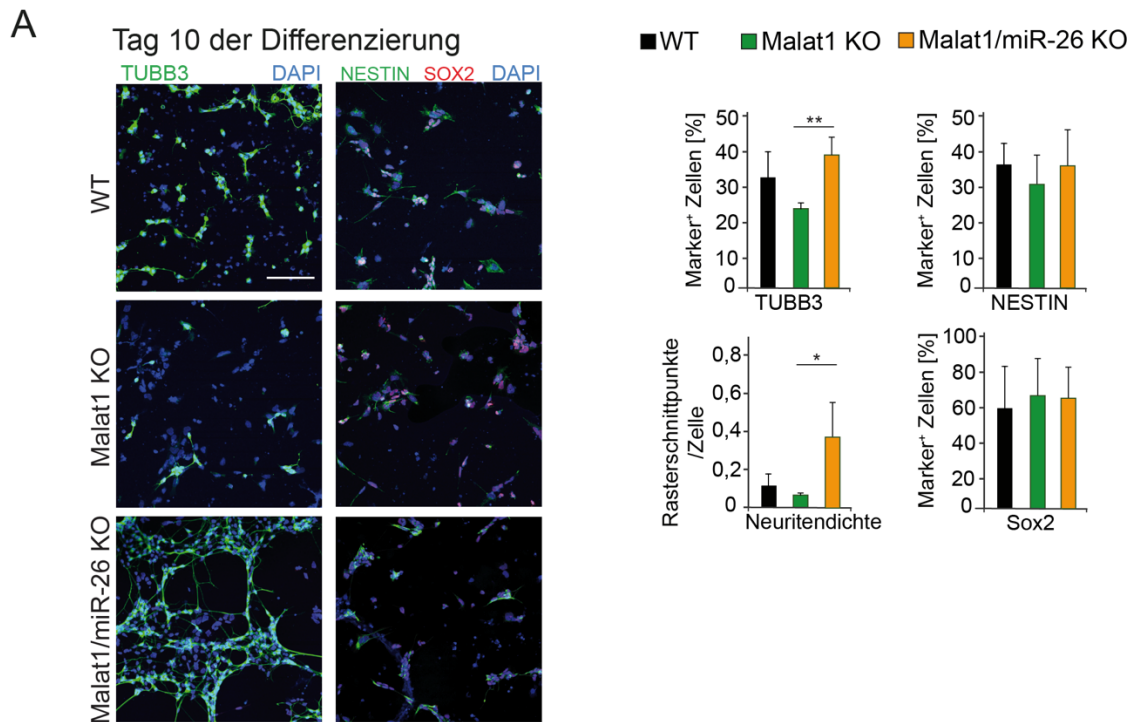


Abbildung 36 *Malat1*/miR-26 KO-Zellen durchlaufen die neuronale Differenzierung schneller als Wt-Zellen

A) Repräsentative Abbildungen immunfluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von Wt- und *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen an d15 der Differenzierung. Maßstabsbalken: 100 μ m. Quantifizierung der Marker⁺ Zellen. n=3, einseitiger Anova-Test. B) qRT-PCR Analyse der neuronalen Vorläufermarker *Msi1* und *Pax6* sowie der neuronalen Marker *Tubb3*, *Map2* und *NeuN* in ES-Zellen, d10 und d15 Kulturen der Differenzierung im Wt, miR-26 tKO, *Malat1* KO und *Malat1*/miR-26 KO. n=4, einseitiger Anova-Test. C) qRT-PCR Analyse der neuronalen Marker *Tubb3* und *Map2* in ES-Zellen, d3, d6, d9, d12 und d15 Kulturen der Differenzierung im Wt und *Malat1*/miR-26 KO. n=3, einseitiger Anova-Test, *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,005$.

5.2.13 Der Verlust von *Malat1* hat keinen Einfluss auf die Expression von *Rest*

In den vorhergehenden Kapiteln konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Malat1* im miR-26 tKO Hintergrund nicht nur den erhöhten Anteil proliferativer NPCs verhindert, sondern auch zu einer schnelleren neuronalen Differenzierung führt. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass die neurale Differenzierung in diesen Zellen nicht nur über REST-vermittelte Regulation (wie in Kapitel 5.1.4 gezeigt) kontrolliert wird, sondern auch die Regulation über die lncRNA *Malat1* eine wichtige Rolle spielt.

Um die Konsequenzen der *Malat1* Deletion auf die zuvor in Kapitel 5.1.4 gezeigten regulatorischen REST-vermittelten Mechanismen genauer zu untersuchen, wurde zunächst die Expression von *Rest* mittels qRT-PCR Analyse mit RNA Proben von ES-Zellen, Tag 3, Tag 9, Tag 12 und Tag 15 in Wt- und *Malat1* KO- sowie *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen untersucht. Abbildung 37 A zeigt die Ergebnisse dieser Expressionsanalysen. Sowohl in *Malat1* KO-, als auch *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen, konnte zu keinem der getesteten Zeitpunkte eine signifikant veränderte Expression von *Rest* im Vergleich zu Wt-Kulturen beobachtet werden. In vorhergehenden Arbeiten konnte in miR-26 tKO Kulturen jedoch erhöhte *Rest* mRNA Level an Tag 15 der Differenzierung beobachtet werden [139].

Ebenfalls konnte eine verringerte Expression von REST-regulierten miRNAs in miR-26 tKO-Kulturen beobachtet werden [139]. Um die Konsequenz des *Malat1* Verlustes in Wt und miR-26 tKO Hintergrund auf die REST-regulierten miRNAs zu überprüfen, wurden die Expressionslevel der miR-124 und miR-9 mittels miRNA-spezifischer qRT-PCR Analyse untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 37 B für den *Malat1* KO und in Abbildung 37 C für den *Malat1*/miR-26 KO gezeigt. In *Malat1* KO-Kulturen wurde an Tag 12 der Differenzierung miR-124 höher exprimiert als in Wt-Kulturen. An Tag 15 der Differenzierung konnte eine signifikant verringerte Expression der miR-124 und der miR-9 in *Malat1* KO-Kulturen im Vergleich mit Wt-Kulturen beobachtet werden. In *Malat1*/miR-26 KO-Kulturen wurde bis zum Tag 12 der Differenzierung keine Veränderungen in der miR-124 und miR-9 Expression beobachtet. An Tag 15 der Differenzierung hingegen waren beide miRNAs im Vergleich zu Wt-Kulturen höher exprimiert. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass *Malat1* die neuronale Differenzierung unabhängig von REST beeinflusste. Ob die hier gezeigte Veränderung REST-regulierter miRNAs dabei eine Rolle spielt, müssen weitere Analysen zeigen.

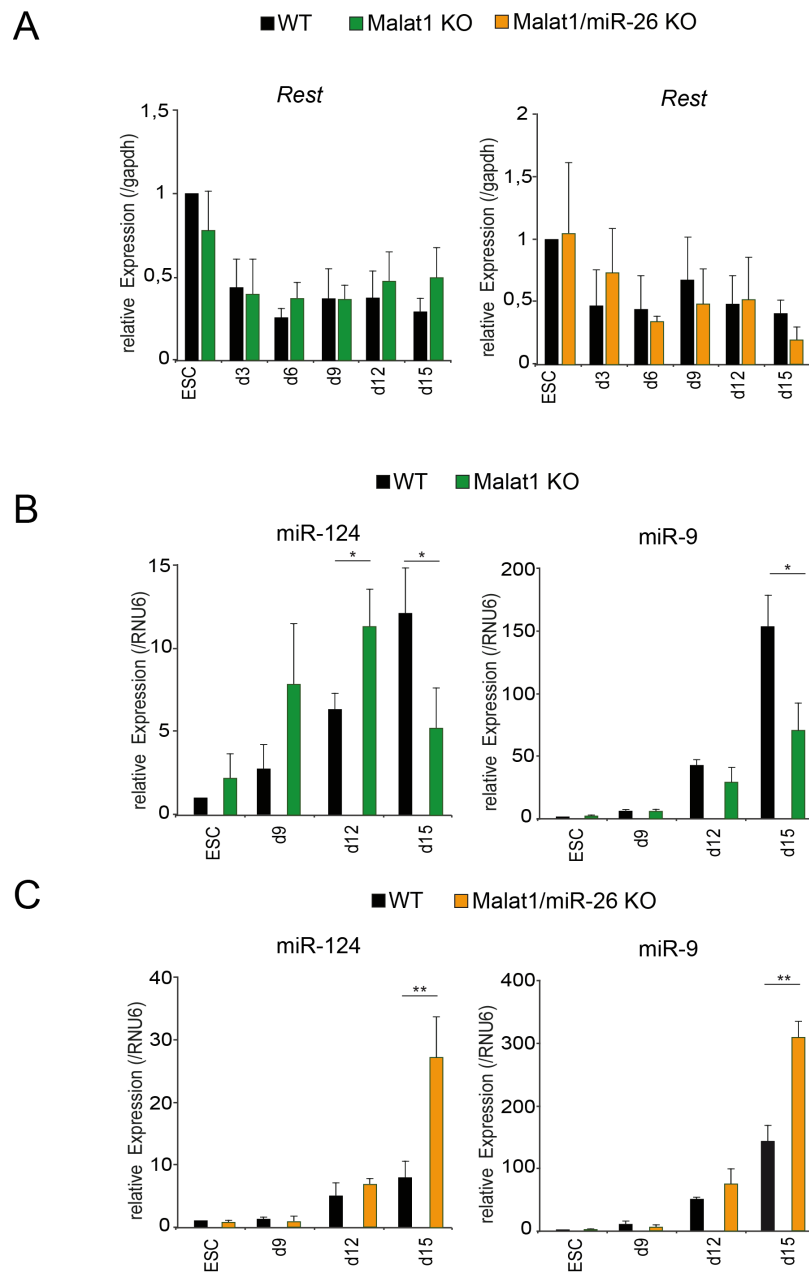


Abbildung 37 Der Verlust von *Malat1* beeinflusst nicht die Expression von *Rest*, aber die Expression von REST-miRs

A) qRT-PCR Analyse der *Rest* Expression in Wt- und *Malat1* KO-Kulturen (links) sowie Wt- und *Malat1*/miR-26 tKO-Kulturen (rechts) in ES-Zellen, d9, d12 und d15 der Differenzierung. n=3, einseitiger Anova-Test. B) miRNA spezifische qRT-PCR für miR-124 und miR-9 in ES-Zellen, d19, d12 und d15 Kulturen der Differenzierung im Wt und *Malat1* KO. n=3, einseitiger Anova-Test. C) miRNA spezifische qRT-PCR für miR-124 und miR-9 in ES-Zellen, d19, d12 und d15 Kulturen der Differenzierung im Wt und *Malat1*/miR-26 KO. n=3, einseitiger Anova-Test, *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$.

6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Rolle die miR-26 Familie bei der Regulation des REST-Komplexes während der Neurogenese spielt. Des Weiteren sollte untersucht werden, welche Faktoren die miR-26 während der Neurogenese regulierten. Eine Rolle der miR-26 während der Neurogenese konnte sowohl in Zebrafischen als auch in einem ES-Zell basierten Differenzierungssystem nachgewiesen werden. In Zebrafischen konnte für die miR-26b bei der terminalen Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu Neuronen eine entscheidende Funktion nachgewiesen werden [141]. Vorhergehende Untersuchungen der miR-26 Familie mittels eines murinen ES-Zell basierten neuronalen Differenzierungssystems konnten diese Rolle der miR-26 bestätigen [142].

Die Differenzierung von ES-Zellen über neuronale Vorläuferzellen zu Neuronen wird durch ein komplexes Genexpressionsprogramm reguliert. Um Einblicke in die molekularen Mechanismen zu bekommen, wurde in dieser Arbeit ein ES-Zell basiertes neurales Differenzierungsprotokoll verwendet. Durch die Deletion der miR-26 Zielsequenzen in den 3'UTRs von REST-Komplex Komponenten konnte die direkte Regulation von *Ctdsp2* und *Rest* über miR-26 aufgeklärt werden. Zudem zeigte sich, dass der Verlust der miR-26 Zielsequenz in *Rest* einen starken Einfluss auf die neurale Differenzierung hatte.

Die Prozessierung der miR-26 Familie ist sowohl in Zebrafischen als auch Mäusen inhibiert und beginnt erst mit dem Einsetzen der Neurogenese [141, 142]. In dieser Arbeit konnte ein potentieller Regulator (lncRNA *Malat1*) der miR-26 mittels *in silico* Analyse identifiziert werden und durch CRISPR/Cas9-vermittelte Deletion in einem murinen ES-Zell basierten neuronalen Differenzierungssystem untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die *Malat1* keinen Einfluss auf die Prozessierung der miR-26 hat. Allerdings beeinflusst diese lncRNA sowohl die Expression der miR-26 Familie als auch ihrer Wirtsgene. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass während der neuralen Differenzierung sowohl Proliferation als auch Differenzierung von NPCs durch *Malat1* und miR-26 reguliert werden.

6.1 *Rest* und *Ctdsp2* werden direkt durch miR-26 reguliert

Sowohl während der embryonalen als auch während der adulten Neurogenese ist die Inaktivierung des REST-Komplexes eine wichtige Voraussetzung für die Expression neuronaler Gene [51, 52]. Bei der Inaktivierung des REST-Komplexes spielen unter anderem miRNAs eine wichtige Rolle (siehe dazu Kapitel 3.2.1.4). Durch *in silico* Analysen konnten miR-26 Zielsequenzen in den 3'UTRs von *Rest*, *CoRest* sowie *Ctdsp2* identifiziert werden. Die Repression von *Rest* durch miR-26 konnte schon in humanen Neuroblastom Zellen gezeigt werden. Jedoch lassen die in dieser Studie durchgeführten Luziferase-Reporter-Assays darauf schließen, dass keine direkte Regulation von miR-26 über die untersuchte *Rest* Zielsequenz erfolgte [271]. Durch Studien mit miR-26 *Mimics* in Zebrafischembryonen konnte die direkte Reprimierung von *Ctdsp2* durch Reporter-Assays nachgewiesen werden [141]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Luziferase-Reporter-Assays unterstützen eine direkte Regulation sowohl von *Rest* als auch von *Ctdsp2* über in 3'UTRs Regionen gelegenen miR-26 Zielsequenzen. Für *CoRest* konnte eine solche Regulation jedoch nicht beobachtet werden. Da es sich bei den Luziferase-Reporter-Assays um ein artifizielles System handelt, geben die hier erhaltenen Daten jedoch nur einen Hinweis auf eine mögliche Regulation. Durch die Transfektion von miRNAs kann es zu verschiedenen Nebeneffekten kommen. So kann es durch die sehr hohen Mengen an vorhandenen miRNAs in der Zelle zu einer Sequestrierung von Komponenten der endogenen miRNA Maschinerie kommen. Dadurch kann es zu Veränderungen der endogenen regulatorischen Mechanismen von miRNAs kommen, die die globale Genexpression beeinflussen [272]. Es konnte zudem beobachtet werden, dass einige miRNAs eine höhere Affinität zu bestimmten Zielsequenzen haben. Kommt es durch die Transfektion von miRNAs zu sehr hohen, unphysiologischen miRNA Konzentrationen in der Zelle, können jedoch multiple Zielsequenzen zeitgleich reguliert werden, auch wenn dies unter normalen physiologischen Konditionen nicht der Fall ist [273]. Luziferase-Reporter-Assays werden zudem in einfach zu transfizierenden Zellen wie in diesem Fall HEK293T Zellen durchgeführt. Diese stehen meist nicht im Zusammenhang mit dem zu untersuchenden zellulären Kontext wie im Falle dieser Arbeit der neuronalen Differenzierung. Brosnan *et al.* konnten zeigen, dass miRNAs während der Entwicklung von *C. elegans* mit einer räumlichen und zeitlichen Dynamik in Ago geladen werden und entsprechend eine räumlich und zeitlich veränderte Regulation der Genexpression durch miRNAs stattfindet [274].

Um die Regulation der miR-26 in einem endogenen Kontext näher zu untersuchen, wurden die zuvor im Luziferase-Reporter-Assay validierten miR-26 Zielsequenzen mittels CRISPR/Cas9

in ES-Zellen deletiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass die mRNA Level von *Rest* als auch *Ctdsp2* durch den Verlust der miR-26 Zielsequenz beeinflusst wurden und zeigen somit die direkte Regulation der endogenen mRNAs durch miR-26. Die Deletion der miR-26 Zielsequenz in der 3'UTR von *Ctdsp2* zeigt sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene nur einen Effekt auf *Ctdsp2*, während die Deletion der miR-26 Zielsequenz in der 3'UTR von *Rest* ebenfalls Effekte auf RNA- und Protein-Level der Familienmitglieder der Ctdsp-Familie zeigt. Dabei begrenzen sich diese Effekte auf den Tag 15 der Differenzierung. Dies ist in Übereinstimmung, mit dem für den miR-26 tKO beschriebenen Phänotyp, bei dem die Zellen bis Tag 10 der Differenzierung keinen Unterschied zum Wt zeigen und dann in einem neuronalen Vorläuferstadium arretiert bleiben [142]. Ursächlich dafür ist, dass die miR-26 in neuronalen Zellen erst nach dem NPC Stadium hochreguliert wird [275] und in ES-Zellen nicht exprimiert wird [276]. Diese Ergebnisse zeigen, dass während der Neurogenese in der Maus die Regulation von *Rest* durch miR-26 entscheidend ist, während vorhergehende Arbeiten zeigen, dass im Zebrafisch die Regulation von *ctdsp2* entscheidend ist [141]. Ein solcher Effekt der evolutionären Konservierung der miRNA-Regulation auf Signalwegebene und nicht auf spezifischer Zielsequenzebene konnte schon beschrieben werden [277].

In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass es durch den Verlust der Mitglieder der miR-26 Familie zu einer verringerten Expression von REST-miRs kommt. Auch durch den Verlust der miR-26 Zielsequenz in *Rest* konnte in *Rest* ts KO-Kulturen eine verringerte Expression der *Rest*-regulierten miRNAs miR-9, miR-124, miR-135a und miR-218 beobachtet werden. Dies bietet eine mögliche Erklärung für die erhöhte Expression von Ctdsp-Familienmitgliedern in *Rest* ts KOs. Es wurde gezeigt, dass miR-124 die Expression der Ctdsp-Familienmitglieder beeinflussen kann [146]. Des Weiteren unterstreicht dies die Bedeutung der miR-26 Familie bei Regulation der neuronalen Genexpression während der Differenzierung. Die durch miR-26 induzierten REST-miRs regulieren nicht nur Mitglieder des REST-Komplexes, sondern auch eine Vielzahl anderer Zielgene, die von Bedeutung für die neuronale Differenzierung sind. Vor allem miR-9 und miR-124 gelten als wichtige regulatorische Faktoren während der Neurogenese. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von miR-9 und miR-124 in humanen Fibroblasten die Reprogrammierung dieser Zellen in Neurone ermöglicht [153]. Neben REST-Komplex Komponenten, werden für die Neurogenese entscheidende Gene von diesen miRNAs reguliert. So inhibiert miR-9 während der terminalen Differenzierung von Neuronen den Kernrezeptor TLX, der essentiell für die Selbsterneuerung von neuronalen Stammzellen ist [278].

6.2 Regulation von *Rest* durch miR-26 ist essentiell für die neuronale Differenzierung

Um den Einfluss der miR-26 auf die Regulation der neuronalen Differenzierung über den REST-Komplex zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein murines ES-Zell basiertes neuronales Differenzierungsmodell verwendet. Dabei werden ES-Zellen zunächst zu EBs differenziert, wobei diese die frühe Differenzierung aller drei Keimblätter im Embryo rekapitulieren [279]. Durch anschließende Zugabe von Retinsäure wird im Folgenden die neurale Zellidentität gefördert [280]. Das in dieser Arbeit verwendete Differenzierungsprotokoll wurde von Dr. Mark Sauer (AG Müller/Becker) etabliert und genauer charakterisiert. Folgt man diesem Differenzierungsprotokoll, so setzt sich an Tag 15 der Differenzierung die Kultur aus etwa 60% postmitotischen TUBB3+ Neurone, 2-3% GFAP+ Astroglia, sowie etwa 15% SOX2+ und NESTIN+ neuronalen Vorläuferzellen zusammen [142]. Diese Zusammensetzung entspricht ungefähr der neuronalen Komposition im adulten Mausgehirn, da dieses aus etwa 65% neuronalen und 35% nicht-neuronalen Zellen besteht. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass sich diese Zahlen auf das gesamte Gehirn beziehen, da einzelne Bereiche des Gehirns unterschiedliche Frequenzen an verschiedenen Zellpopulationen aufweisen [281]. Da die in dieser Arbeit differenzierten Neuronen nicht genauer charakterisiert wurden, können keine genauen Aussagen über die Rekapitulation der *in vivo* Situation im adulten Gehirn getroffen werden. Die Untersuchungen in dieser Arbeit sollten sich auf die Regulation des REST-Komplex auf die Entstehung von Neuronen im embryonalen Kontext beziehen. Daher kann dieses System näherungsweise als *in vitro* Modell der embryonalen Neurogenese betrachtet werden. In einer Untersuchung, die ein sehr vergleichbares ES-Zell basiertes Differenzierungsmodell der Neurogenese verwendete, konnte gezeigt werden, dass die Dissoziation des REST-Komplexes von seinen Zielpromotoren ein entscheidender Schritt für die terminale Differenzierung von Neuronen ist [51]. Dabei spielen neben dem proteosomalen Abbau nach Ubiquitinierung und Phosphorylierung [54, 55] auch miRNAs eine wichtige Rolle (siehe Kapitel 3.2.1.4). Nachdem in dieser Arbeit geklärt werden konnte, dass *Rest* und *Ctdsp2* direkt durch miR-26 reguliert werden, stellt sich weiterhin die Frage, ob der Verlust der Regulation von *Rest* oder *Ctdsp2* durch miR-26 Auswirkungen auf die neuronale Differenzierung hat. Dies wurde in Kapitel 5.1.4 untersucht. Dazu wurden die Frequenzen von neuronalen Vorläufermarkern und Markern für mature Neurone an Tag 15 der Differenzierung quantifiziert. Während in *Ctdsp2* ts KO-Kulturen keine Unterschiede im Vergleich zu Wt-Kulturen zu beobachten waren, zeigten die *Rest* ts KO-Kulturen deutliche Ähnlichkeiten zu miR-26 tKO-Kulturen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die direkte Regulation von

Rest durch miR-26 entscheidend für die terminale Differenzierung von neuronalen Vorläufern zu maturen Neuronen ist. Die fehlende Regulation von *Rest* durch miR-26 führt zu einer höheren Frequenz neuronaler Vorläuferzellen und einer verringerten Frequenz an maturen Neuronen in Tag 15 Kulturen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer Studie von Yeo *et al.*. Hier konnte in P19 Zellen gezeigt werden, dass die Funktion von Ctdsp-Familienmitgliedern abhängig von REST ist [47]. Dass die Regulation von REST essentiell für die Initiierung des neuronalen Genexpressionsprogramms ist, konnte schon in verschiedenen Studien gezeigt werden [51, 52, 147, 282, 283]. Dass REST eine wichtige Bedeutung für Initiation des neuronalen Genexpressionsprogramms hat, wird durch die Umprogrammierung von adulten humanen Fibroblasten zu induzierten Neuronen durch Reprimierung von *Rest* deutlich [154].

Jedoch sind einzelne miRNAs in der Lage mehrere Zielgene gleichzeitig zu regulieren. Die in dieser Arbeit gezeigte für die neurale Differenzierung essentielle Regulation von *Rest* durch miR-26 ist nicht die einzige Funktion, die miR-26 während der Neurogenese erfüllt. Weitere Studien belegen einen regulatorischen Einfluss von miR-26 auf andere Signalwege, die ebenfalls kritisch für die neuronale Differenzierung sind. Es handelt sich dabei um die in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Signalwege WNT, NOTCH, SHH und FGF. Verschiedene Studien zeigen eine Beteiligung der miR-26 Familie an der Regulation des WNT-Signalwegs [284-286], des NOTCH-Signalwegs [287], des SHH-Signalwegs [288] als auch des FGF-Signalwegs [289, 290]. Allerdings wurde bei keiner dieser Studien die Interaktion von miR-26 mit diesen Signalwegen während der neuronalen Entwicklung untersucht. Weitere Analysen müssen also zeigen, ob miR-26 neben REST auch weitere wichtige Ziele während der Neurogenese ansteuert.

Unterschiedliche Studien zeigen, dass die miR-26 eine wichtige funktionelle Rolle in unterschiedlichen Zelltypen des zentralen Nervensystems von Säugetieren spielt [291-293]. Dies steht im starken Kontrast dazu, dass verschiedene, unabhängig voneinander generierte miR-26 *knockout* Mäuse keine Auffälligkeiten bei der neuronalen Entwicklung, als auch ihrem Verhalten aufweisen [294-296]. Dies lässt darauf schließen, dass es *in vivo* zu kompensatorischen Mechanismen kommt, die *in vitro* nicht nachgebildet werden können. Zudem lag bei keiner dieser Studien der miR-26 *knockout* Mäuse der Fokus auf dem Zentralnervensystem dieser Tiere. Genauere Untersuchungen dieser Mäuse im Kontext der neuronalen Entwicklung wären notwendig, um einen Einblick in die Rolle der miR-26 *in vivo* zu bekommen.

6.3 Der Verlust von *Malat1* beeinträchtigt die neuronale Differenzierung

Die in Kapitel 5.2.3 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass der Verlust von *Malat1* keinen Einfluss auf die Morphologie oder Proliferation von ES-Zellen oder EBs hat. Die Expressionsanalysen zeigen jedoch, dass die Expression im neuronalen *in vitro* Differenzierungssystem erst nach dem Erreichen des NPC Stadiums stark anstieg. Dies ist in Übereinstimmung mit der hohen Expression von *Malat1* im humanen Gehirn [297] sowie der Beobachtung von Bernard *et al.*, dass nur neuronale Zellen im Gehirn hohe Level an *Malat1* exprimieren [228]. An Tag 15 der Differenzierung konnten in *Malat1* KO-Kulturen nur wenige Zellen beobachtet werden, die eine neuronale Morphologie aufwiesen und positiv für mature neuronale Marker angefärbt werden konnten. Dies steht im starken Kontrast dazu, dass *Malat1* KO-Mäuse eine normale Physiologie und keine neurologischen Abnormalitäten aufweisen [184, 192, 193]. Jedoch konnte auch schon bei *in vitro* Studien mit primären, hippocampalen, murinen Neuronen gezeigt werden, dass der *knockdown* von *Malat1* zu einer verringerten synaptischen Dichte sowie zu einer verringerten Expression von *Nlgn1* und *SynCAM* führt. Die Daten deuten darauf hin, dass *Malat1* die Expression von Genen reguliert, die für die Bildung von Synapsen verantwortlich sind [228]. Solche Beobachtungen eines *in vitro* Effekts, der *in vivo* nicht zum Tragen kommt, konnte schon in anderen Studien gemacht werden und ist also, ähnlich wie für die miR-26 angenommen, vermutlich auf kompensatorische Mechanismen zurückzuführen [194, 195]. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten neuronalen *in vitro* Differenzierungssystem wird auf die Zugabe von Wachstumsfaktoren wie FGF-2, FGF-8, SHH oder EGF verzichtet. Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, kommt es jedoch bei der *in vivo* Neurogenese zu einer Freisetzung verschiedener extrinsischer Faktoren, die die räumlichen und zeitlichen Abläufe kontrollieren. Einer dieser Faktoren könnte möglicherweise den Phänotyp des *Malat1* KOs *in vivo* kompensieren. Jedoch sind neben *Malat1* auch weitere lncRNAs bekannt, bei denen sich Ergebnisse aus *in vitro* Studien und *in vivo* Studien deutlich unterscheiden. So konnte der lncRNA *Eyf2* *in vitro* eine in trans-aktivierende Regulation von *Dlx5/6* zugeordnet werden [298], während die Daten aus *Eyf2* KO Mäusen eine in cis-reprimierende Regulation von *Dlx5/6* zeigen [175]. Dieses Beispiel zeigt, dass bei der Untersuchung vieler Mechanismen sowohl Daten aus *in vitro* Versuchen als auch *in vivo* Versuchen betrachtet werden sollten.

6.4 *Malat1* ist nicht direkt an der Prozessierung der miR-26 beteiligt

Ein Ziel dieser Arbeit war es Faktoren zu identifizieren, die die zeitlich verzögerte Maturierung der miR-26 regulieren. In vorhergehenden Arbeiten (in Kollaboration mit AG Fischer) wurde dabei nach einem Protein-Faktor gesucht, der die pre-miR-26 bindet und dadurch die Prozessierung inhibiert. Jedoch konnte mit den verwendeten experimentellen Ansätzen kein Faktor identifiziert werden, was nahelegt, dass möglicherweise andere Mechanismen die Prozessierung beeinflussen könnten [299]. Ein weiterer möglicher regulatorischer Mechanismus wäre die Sequestrierung von maturen miRNAs durch eine lncRNA in frühen Stadien der embryonalen Neurogenese. Die Sequestrierung von miR-26 durch *Malat1* wurde schon in verschiedenen Studien belegt [223, 242-244, 246, 257, 300]. Neben der Sequestrierung maturer miRNAs, können lncRNAs ebenfalls die Prozessierung von pre-miRNAs beeinflussen. So inhibiert die lncRNA *MPRL* durch Bindung der pre-miR-483 ihre Prozessierung zu maturen miRNA [301]. Die Daten aus dieser Arbeit zeigten, dass der Verlust von *Malat1* zu einer höheren Expression der maturen miR-26, der pre-miR-26, sowie der miR-26 Wirtsgene der Ctdsp-Familie an Tag 12 und Tag 15 der Differenzierung führte. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass der Verlust von *Malat1* keine Konsequenzen auf die Maturierung hat, sondern zu einer erhöhten Expression der miR-26 Wirtsgene und somit auch der miR-26 führte. Ob diese Regulation der Expression über direkte Interaktion von *Malat1* oder indirekte Mechanismen über andere Faktoren vermittelt wird, ist nicht bekannt. Im Folgenden wird die Möglichkeit einer direkten transkriptionellen Regulation der miR-26 Wirtsgene durch *Malat1* diskutiert. Zhuang *et al.* konnten in Chromatin-Immunpräzipitations- (ChIP) Analysen zeigen, dass die H3K27 Methylierung am miR-26a-Promotor durch EZH2 vermittelt wird. Durch Bindung von EZH2 kommt es demnach zu epigenetischen Reprimierung der Transkription der miR-26 Wirtsgene und somit auch zu einer verminderten Expression der reifen miR-26 [302]. In verschiedenen Studien konnte die Bindung von *Malat1* an die PRC2-Komplex Komponenten EZH2, EED und SUZ12 und eine damit einhergehende Regulation der Genexpression bestimmter Genabschnitte gezeigt werden. So führt der *knockdown* von *Malat1* zu einer reduzierten H3K27 Trimethylierung des miR-29a/b Promotors und somit zu einer erhöhten miR-29 Transkription und Herabregulierung der miR-29 Zielgene [303]. Zudem konnten Wang *et al.* zeigen, dass die Überexpression von EZH2 eine *Malat1 knockdown*-induzierte Herabregulation von β -Catenin und Lin28 auf transkriptioneller Ebene aufheben kann [304]. Demnach könnte es in *Malat1* KO-Zellen durch fehlende Bindung von EZH2 an die Promotorregion von Ctdsp zur erhöhten Expression von miR-26 kommen. Um das hier

beschriebene Szenario genauer zu untersuchen, wären globale Expressionsanalysen sowie eine Bisulfid-Sequenzierung zur Untersuchung von DNA Methylierung oder eine globale ChIP-Seq notwendig.

6.5 *Malat1* und miR-26 haben gegenteilige Effekte auf die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen

Wie in Kapitel 5, sowie in den vorhergehenden Arbeiten von Dr. Mark Sauer [142] gezeigt wurde, kommt es durch den Verlust der miR-26 während der neuronalen Differenzierung zu einem Arrest im proliferativen NPC Stadium. Diese Daten legen eine Funktion der miR-26 bei der terminalen Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu muren Neuronen nahe. Jedoch ist hier nicht bekannt, ob miR-26 tKO NPCs nicht differenzieren können, weil sie den Zellzyklus nicht verlassen können oder ob sie den Zellzyklus nicht verlassen, weil sie nicht differenzieren können. Da auch andere Studien schon den Einfluss der miR-26 sowie der Wirtsgene (Ctdsp-Familie) auf den Zellzyklus belegen, könnte es sich bei dem hier beobachteten Differenzierungsarrest um einen Zellzyklus-vermittelten Arrest handeln. Bisherige Studien kommen jedoch zum Teil zu widersprüchlichen Ergebnissen. Verschiedene Studien belegen, dass die Überexpression von miR-26 die Expression von c-myc, Cyclin D2, Cyclin D3, Cyclin E2, CDK4 sowie CDK6 unterdrückt und damit die Zellproliferation inhibiert [136, 305]. Außerdem kommt es zu einer erhöhten Expression der Zellzyklusinhibitoren p14^{arf} und p21^{cip} über Repression von EZH2 [306]. Diese Studien wurden jedoch in verschiedenen Tumormodellen durchgeführt. Im Gegensatz dazu zeigen zwei Studien, dass die Proliferation von Gliomazellen durch Überexpression von miR-26 gefördert wird [131, 307]. Weitere Studien deuten auf einen positiven Effekt der miR-26 oder seiner Wirtsgene auf den Zellzyklus hin. So kommt es durch die Überexpression von Ctdsp1 in Neuroepithelzellen von Hühnern zu einer starken Proliferation und einem verminderten Anteil an Zellen, die den Zellzyklus verlassen [146]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Überexpression sowohl von Ctdsp2 als auch miR-26 in murinen Embryonen zu einer erhöhten Proliferation von neuronalen Vorläufern im embryonalen Cortex führt [291]. Diese Studie zeigt einen gegenteiligen Effekt der miR-26 auf neuronale Vorläuferzellen wie die Ergebnisse aus unseren Studien. Zusammengefasst deuten diese Daten auf einen zelltyp-spezifischen Einfluss der miR-26 auf die Proliferation hin.

Neben dem Einfluss der miR-26 auf die NPC Proliferation konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass differenzierende *Malat1* KO-Kulturen eine verringerte Frequenz proliferierender

NPCs aufwiesen. Auch für *Malat1* konnte ein Einfluss auf den Zellzyklus in verschiedenen Studien belegt werden. Während der G2/M-Phase transloziert *Malat1* in das Cytosol. Die Herabregulation von *Malat1* im Zellkern führt dabei zu einem G2/M Arrest [252]. Zudem ist bekannt, dass der Verlust von *Malat1* die Expression des Onkogens B-Myb reduziert und dadurch die Proliferation von Zellen inhibiert [248]. Auch während der Differenzierung früher hämatopoetischer Stammzellen kommt es durch den Verlust von *Malat1* zu einer verringerten Proliferation dieser Zellen [308]. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wären weitere Analysen notwendig um den proliferativen Phänotyp der *Malat1* KO NPCs näher zu charakterisieren. Dazu wäre z.B. eine Zellzyklusanalyse notwendig, um die Zellzyklusphasenverteilung in dieser Zellpopulation genauer zu beschreiben. Zudem könnte eine RNA Sequenzierung an verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung genauere Einblicke in die Expression von Zellzyklus-regulierenden Genen in den *Malat1* KO-Kulturen geben.

6.6 Seneszenz, die Rolle von *Malat1* und miRNAs

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Verlust von *Malat1* zu Seneszenz in NPCs während der in vitro Differenzierung führt. Dies konnte schon in anderen Studien und zellulären Kontexten beobachtet werden. So kann zum Beispiel in Gallenblasenkrebszellen durch eine verringerte *Malat1* Expression Seneszenz induziert werden [309]. Zusammen mit anderen lncRNAs reguliert *Malat1* verschiedene Signalwege, die bei der Seneszenzentstehung eine Rolle spielen können [310]. Welche Funktionen miRNAs dabei zukommt wurde bisher noch nicht erschöpfend untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Malat1* zu einer erhöhten Expression der miR-26 Familie führt. Publierte Daten zeigen, dass miR-26b zusammen mit einigen anderen miRNAs (miR-210, miR-322, miR-181) über die Polycomb-vermittelte Repression von p16^{INK4A} Seneszenz induziert [311]. Auch für die in dieser Studie identifizierten seneszenz-assoziierten miRNAs konnte in dieser Arbeit zum Teil eine erhöhte Expression in NPCs beobachtet werden. Welcher Zusammenhang zwischen diesen miRNAs und miR-26 sowie *Malat1* besteht, wurde jedoch noch nicht untersucht. Bekannt ist jedoch, dass *Malat1* miR-181 als ceRNA reguliert [213]. Die Expressionsanalysen der seneszenz-assoziierten miRNAs im *Malat1*/miR-26 KO deuten jedoch darauf hin, dass die Expression dieser miRNAs zum Teil unabhängig von *Malat1* vermittelt werden. Durch die gleichzeitige Deletion beider ncRNAs kommt es wiederum zu einer Annäherung der Expressionslevel auf Wt-Niveau. Zur Veränderung der Expression dieser miRNAs kommt es

somit am wahrscheinlichsten durch die Induktion des spezifischen Genexpressionprogramms durch die p16^{INK4A}-vermittelte Seneszenz.

6.7 Auswirkungen des Verlustes von *Malat1* auf die neuronale Differenzierung

Um die Konsequenz der erhöhten miR-26 Expression auf die neuronale Differenzierung in *Malat1* KO-Zellen genauer zu untersuchen, wurde *Malat1* in miR-26 tKO-Zellen deletiert. Überraschenderweise kann durch diese Deletion der Effekt des *Malat1* KOs, als auch des miR-26 tKOs auf die neuronale Differenzierung kompensiert werden, da Zellen mit kombiniertem *Malat1*/miR-26 KO eine mit Wt-Kulturen vergleichbare Anzahl maturer Neurone bilden. Weder ein Arrest im NPC Stadium wie in miR-26 tKO-Kulturen noch ein Übergang in Seneszenz wie in den *Malat1* KO-Kulturen konnte hier beobachtet werden. Die in Kapitel 5.2.10 gezeigten Ergebnisse belegen sogar, dass es durch den gleichzeitigen Verlust von miR-26 und *Malat1* zu einer Beschleunigung der neuronalen *in vitro* Differenzierung kommt. Im Hinblick auf die zentrale Funktion der miR-26 während der Neurogenese, die in dieser und der Arbeit von Dr. Mark Sauer aufgeklärt wurde, sind diese Ergebnisse überraschend und widersprechen den Erwartungen, dass die neurale Differenzierung durch die Deletion beider ncRNAs weiter eingeschränkt werden würde. Diese Ergebnisse zeigen, dass neben der zentralen Rolle der miR-26 als Repressor des REST-Komplexes weitere regulatorische Mechanismen in den Ablauf der Neurogenese eingreifen. Über welche regulatorischen Mechanismen diese Kompensation stattfindet, kann hier nur spekuliert werden. Durch *Malat1* wird eine Vielzahl verschiedener miRNAs reguliert (siehe hierzu Kapitel 3.2.2.3). Darunter sind auch miRNAs, die einen schon nachgewiesenen Einfluss auf die neuronale Differenzierung haben. So wird die miR-124 durch *Malat1* reguliert [219]. miR-124 kann über verschiedene Zielgene die neuronale Differenzierung regulieren [312-315], unter anderem über REST [146]. Eine weitere miRNA, die eine Rolle bei der neuronalen Differenzierung spielt und über *Malat1* reguliert wird ist miR-29. Der *knockdown* von *Malat1* in multiplen Myeloma Zellen führt zu einer verringerten H3K27 Trimethylierung des miR-29a/b-1 Promotors und damit zu einer erhöhten Expression dieser miRNA [303]. Auch miR-29 ist ein bekannter Regulator von REST [148]. Auch weitere miRNAs, die unter der Kontrolle von REST stehen und die ihrerseits REST-Komplex regulieren können, interagieren mit *Malat1*. Die miR-218 [316], miR-135[317], miR-9 [210], miR-346 [318], miR-203 [319], miR-330 [320], miR-204 [321] und miR-212 [322] werden in verschiedenen gewebsspezifischen Kontexten durch *Malat1* reguliert.

Um einen genaueren Einblick in die regulatorischen Mechanismen zwischen *Malat1*, miR-26 und diesem neuronalem miR-Netzwerk zu erhalten sind weitere Untersuchungen notwendig. Neben der Regulation der neuronalen Differenzierung über miRNAs könnte auch die Regulation des Zellzyklus von entscheidender Bedeutung für die in dieser Arbeit beobachteten Effekte sein, da das Verlassen des Zellzyklus einen entscheidenden Schritt bei der Differenzierung von Neuronen darstellt. Abbildung 38 fasst die in dieser Arbeit beobachteten Effekte schematisch zusammen. Während es in miR-26 tKO-Zellen zu einer erhöhten Frequenz proliferierender Zellen kommt, weisen *Malat1* KO-Zellen eine verringerte Frequenz proliferierender Zellen auf. Die Kombination dieser Knockouts führt hingegen zu einer beschleunigten Differenzierung und einer mit dem Wt vergleichbaren Frequenz proliferierender Zellen. Die Bedeutung der Regulation des Zellzyklus für die Neurogenese wurde schon in verschiedenen Untersuchungen deutlich. So führt zum Beispiel der Doppelknockout von *Cdk2* und *Cdk4* in Mäusen zu einer bevorzugten neuronalen Differenzierung und einer geringeren Proliferation des Vorläuferkompartiments von NSCs [323]. Die Überexpression von *Cdk4* führt hingegen zu einer verringerten neuronalen Differenzierung und einer erhöhten Frequenz an NSCs und Vorläuferzellen im Maus Hippocampus [324]. Ob der Knockout der miR-26 und/oder *Malat1* einen Einfluss auf die Expression von *Cdk2* und *Cdk4* hat, sollte in zukünftigen Analysen genauer untersucht werden.

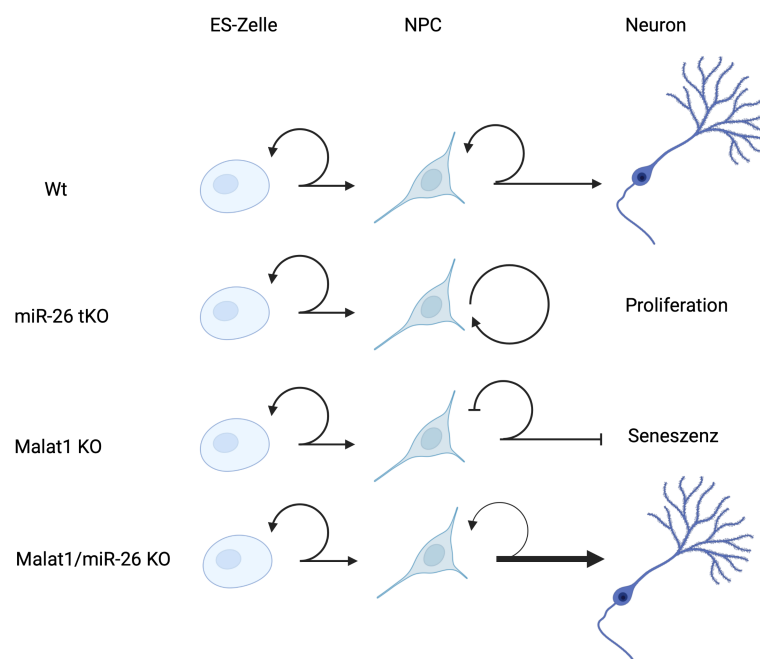


Abbildung 38 Schematische Zusammenfassung der Phänotypen während der Neurogenese

Wt ES-Zellen differenzieren zu NPCs, welche eine gewisse Proliferationsrate aufweisen und dann vollständig zu Neuronen ausdifferenzieren. In miR-26 tKO-Kulturen differenzieren die Zellen zu NPCs, welche in einem proliferativen Vorläuferstadium verbleiben. *Malat1* KO ES-Zellen differenzieren zu NPCs, die eine reduzierte Proliferationsrate aufweisen und in Seneszenz gehen. In *Malat1/miR-26* KO-Kulturen entstehen proliferative NPCs, die sehr schnell in mature Neurone ausdifferenzieren.

7 Appendix

Tabelle 4 Ergebnisse der *Off-Target* Analysen Rest ts KOs

<i>Off-Target</i>	Sequenz (5' - 3')	Missmatch	Position	Gen-ID	Ergebnis
REST- ts off 3' A1	TCCcCTTACtTTA ACTCCaGTGG	3	Chr1, 175676421	13603	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
REST- ts off 3' A2	TCCTCTTACATat ACTCCcTGG	3	Chr14, 23430335	16531	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
REST- ts off 3' A3	TCCTCTTACAgT AACTtCtGTGG	3	Chr14, 87180486	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
REST- ts off 3' B1	tGCgCGTGCAGG CAtGTGCATGG	3	Chr8, 73336318	16795	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
REST- ts off 3' B2	AtCTCcTGCAGtC AGGTGCAGGG	3	Chr8, 126760686	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
REST- ts off 3' B3	AGCTCtaGgAGG CAGGTGCAGGG	3	Chr12, 76547710	263406/ 100504549	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
REST- ts off 5' A1	aAAfTTAATTTAT ATAAAGCCGG	2	Chr12, 27848109	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
REST- ts off 5' A2	TAACTTtATTTAT gTAAAGCAGG	2	Chr 9, 51019533	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
REST- ts off 5' A3	TAACTTAATTTtT AgAAAAtCAGG	3	Chr8, 9792474	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
REST- ts off 5' B1	GAAAAAAAAGA GATTTTAAgTGG	1	Chr5, 80556369	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
REST- ts off 5' B2	tAAAAAAAAGA GATTTTAgTGGG	2	Chr16, 30462895	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
REST- ts off 5' B3	aAAAAAAAaAG ATTTTAATAGG	2	Chr15, 58373791	69787/ 115489421	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen

Tabelle 5 Ergebnisse der *Off-Target* Analysen des *Malat1* KOs

<i>Off-Target</i>	Sequenz (5' - 3')	Missmatch	Position	Gen-ID	Ergebnis
Malat1 off 3' A1	CCCCCGtAtCCTA GTAACCtTCC	3	Chr11, 116492357	67763	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 3' A2	GGaAGGTTACTA GGaTtCGGCGG	3	Chr11, 116526153	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 3' A3	GtAGGGTTgCTA GGTcCCGGTGG	3	Chr16, 20329815	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 3' B1	CCCTTtaAATAA ATACCtGCGCT	3	Chr13, 96496587	27015	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 3' B2	AaCGtCaGTATTT ATTGCAATGG	3	Chr14, 80164285	238988/ 118568118	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 3' B3	CCTTTGCAgTtAA TACTGGCGCT	3	Chr9, 14601906	75723	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 5' A1	GTAaCACTTCCC ATTCaTgAAGG	3	Chr14, 80164285	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 5' A2	CCCTAAaGAATG GGgAGTGGTAg	3	Chr 2, 66084901	14425	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 5' A3	CCAgTAGGAATG GGAAGTGAATAC	3	Chr6, 127112029	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 5' B1	CCCGTGTGGaGC AgGCATGGTgG	3	Chr3, 152412575	108946	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 5' B2	CCctTGTGGTGC AAGCATGGgaG	3	Chr4, 59934357	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 5' B3	CGACaATGCTTG CACCAgACAGG	2	Chr8, 90149981	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen

Tabelle 6 Ergebnisse der *Off-Target* Analysen des *Malat1*/miR-26 KOs

<i>Off-Target</i>	Sequenz (5' - 3')	Missmatch	Position	Gen-ID	Ergebnis
Malat1 off 3'A1	CCCCCGtAtCCTA GTAACcTCC	3	Chr11, 116492357	67763	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 3'A2	GGAAgGTTACTA GGaTtCGGCGG	3	Chr11, 116526153	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 3'A3	GtAGGGTTgCTA GGTcCCGGTGG	3	Chr16, 20329815	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 3'B1	CCCTTtaAATAA ATACcTGCCT	3	Chr13, 96496587	27015	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 3'B2	AaCGtCaGTATTT ATTGCAATGG	3	Chr14, 80164285	238988/ 118568118	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 3'B3	CCTTTGCAGtTAA TACtGGCGCT	3	Chr9, 14601906	75723	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 5'A1	GTAaCACTTCCC ATTCaTgAAGG	3	Chr14, 80164285	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 5'A2	CCCTAAaGAATG GGgAGTGGTAg	3	Chr 2, 66084901	14425	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 5'A3	CCAgTAGGAATG GGAAGTgATAC	3	Chr6, 127112029	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 5'B1	CCCGTGTGGaGC AgGCATGGTgG	3	Chr3, 152412575	108946	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 5'B2	CCcTGTGGTGC AAGCATGGgaG	3	Chr4, 59934357	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen
Malat1 off 5'B3	CGACaATGCTTG CACCAgACAGG	2	Chr8, 90149981	/	Keine <i>Off-Target</i> Mutationen

8 Literaturverzeichnis

1. Mitalipov, S. and D. Wolf, *Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2009. **114**: p. 185-99.
2. Williams, R.L., et al., *Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells*. Nature, 1988. **336**(6200): p. 684-7.
3. Smith, J.L. and G.C. Schoenwolf, *Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation*. J Exp Zool, 1989. **250**(1): p. 49-62.
4. Vieira, C., et al., *Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(1): p. 7-20.
5. Huang, X. and J.P. Saint-Jeannet, *Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge*. Dev Biol, 2004. **275**(1): p. 1-11.
6. Campbell, K. and M. Götz, *Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development*. Trends Neurosci, 2002. **25**(5): p. 235-8.
7. Huttner, W.B. and M. Brand, *Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells*. Curr Opin Neurobiol, 1997. **7**(1): p. 29-39.
8. Osumi, N., et al., *Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator*. Stem Cells, 2008. **26**(7): p. 1663-72.
9. Asami, M., et al., *The role of Pax6 in regulating the orientation and mode of cell division of progenitors in the mouse cerebral cortex*. Development, 2011. **138**(23): p. 5067-78.
10. Sansom, S.N., et al., *The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis*. PLoS Genet, 2009. **5**(6): p. e1000511.
11. Galichet, C., F. Guillemot, and C.M. Parras, *Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus*. Development, 2008. **135**(11): p. 2031-41.
12. Kageyama, R. and S. Nakanishi, *Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system*. Curr Opin Genet Dev, 1997. **7**(5): p. 659-65.
13. Kageyama, R., T. Ohtsuka, and T. Kobayashi, *Roles of Hes genes in neural development*. Dev Growth Differ, 2008. **50 Suppl 1**: p. S97-103.
14. Ishibashi, M., et al., *Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects*. Genes Dev, 1995. **9**(24): p. 3136-48.
15. Castro, D.S., et al., *A novel function of the proneural factor Ascl1 in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets*. Genes Dev, 2011. **25**(9): p. 930-45.
16. Kishi, Y., et al., *HMGA regulates the global chromatin state and neurogenic potential in neocortical precursor cells*. Nat Neurosci, 2012. **15**(8): p. 1127-33.
17. Pereira, J.D., et al., *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, 2010. **107**(36): p. 15957-62.

18. Hirabayashi, Y., et al., *Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition*. Neuron, 2009. **63**(5): p. 600-13.
19. Tan, S.L., et al., *Essential roles of the histone methyltransferase ESET in the epigenetic control of neural progenitor cells during development*. Development, 2012. **139**(20): p. 3806-16.
20. Weinmaster, G., *Notch signal transduction: a real rip and more*. Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(4): p. 363-9.
21. Shimojo, H., T. Ohtsuka, and R. Kageyama, *Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors*. Neuron, 2008. **58**(1): p. 52-64.
22. Shimizu, H., et al., *Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin*. Cell Growth Differ, 1997. **8**(12): p. 1349-58.
23. Wrobel, C.N., et al., *Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors*. Dev Biol, 2007. **309**(2): p. 285-97.
24. Kuwahara, A., et al., *Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex*. Development, 2010. **137**(7): p. 1035-44.
25. Munji, R.N., et al., *Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors*. J Neurosci, 2011. **31**(5): p. 1676-87.
26. Zinin, N., et al., *MYC proteins promote neuronal differentiation by controlling the mode of progenitor cell division*. EMBO Rep, 2014. **15**(4): p. 383-91.
27. Zechner, D., et al., *beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system*. Dev Biol, 2003. **258**(2): p. 406-18.
28. Dessaud, E., A.P. McMahon, and J. Briscoe, *Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network*. Development, 2008. **135**(15): p. 2489-503.
29. Willaredt, M.A., E. Tasouri, and K.L. Tucker, *Primary cilia and forebrain development*. Mech Dev, 2013. **130**(6-8): p. 373-80.
30. Wang, H., et al., *Gli3 is required for maintenance and fate specification of cortical progenitors*. J Neurosci, 2011. **31**(17): p. 6440-8.
31. Mossahebi-Mohammadi, M., et al., *FGF Signaling Pathway: A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 79.
32. Maric, D., et al., *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, 2007. **27**(8): p. 1836-52.
33. Thiel, G., M. Lietz, and M. Cramer, *Biological activity and modular structure of RE-1-silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26891-9.
34. Schoenherr, C.J. and D.J. Anderson, *Silencing is golden: negative regulation in the control of neuronal gene transcription*. Curr Opin Neurobiol, 1995. **5**(5): p. 566-71.
35. Schoenherr, C.J., A.J. Paquette, and D.J. Anderson, *Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9881-6.

36. Bruce, A.W., et al., *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, 2004. **101**(28): p. 10458-63.
37. Mozzi, A., et al., *REST, a master regulator of neurogenesis, evolved under strong positive selection in humans and in non human primates*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 9530.
38. Andrés, M.E., et al., *CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9873-8.
39. Lunyak, V.V., et al., *Corepressor-dependent silencing of chromosomal regions encoding neuronal genes*. Science, 2002. **298**(5599): p. 1747-52.
40. Lee, M.G., et al., *An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 432-5.
41. Battaglioli, E., et al., *REST repression of neuronal genes requires components of the hSWI.SNF complex*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 41038-45.
42. Roopra, A., et al., *Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes*. Mol Cell, 2004. **14**(6): p. 727-38.
43. Grimes, J.A., et al., *The co-repressor mSin3A is a functional component of the REST-CoREST repressor complex*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9461-7.
44. Huang, Y., S.J. Myers, and R. Dingledine, *Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes*. Nat Neurosci, 1999. **2**(10): p. 867-72.
45. Zhang, Y., et al., *SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex*. Mol Cell, 1998. **1**(7): p. 1021-31.
46. Ooi, L. and I.C. Wood, *Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(7): p. 544-54.
47. Yeo, M., et al., *Small CTD phosphatases function in silencing neuronal gene expression*. Science, 2005. **307**(5709): p. 596-600.
48. Oelgeschläger, T., *Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control*. J Cell Physiol, 2002. **190**(2): p. 160-9.
49. Jones, F.S. and R. Meech, *Knockout of REST/NRSF shows that the protein is a potent repressor of neuronally expressed genes in non-neural tissues*. Bioessays, 1999. **21**(5): p. 372-6.
50. Yamada, Y., et al., *Rest promotes the early differentiation of mouse ESCs but is not required for their maintenance*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(1): p. 10-5.
51. Ballas, N., et al., *REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis*. Cell, 2005. **121**(4): p. 645-657.
52. Gao, Z., et al., *The master negative regulator REST/NRSF controls adult neurogenesis by restraining the neurogenic program in quiescent stem cells*. J Neurosci, 2011. **31**(26): p. 9772-86.
53. Kaneko, N., et al., *Casein kinase 1 suppresses activation of REST in insulted hippocampal neurons and halts ischemia-induced neuronal death*. J Neurosci, 2014. **34**(17): p. 6030-9.

-
54. Nesti, E., et al., *C-terminal domain small phosphatase 1 and MAP kinase reciprocally control REST stability and neuronal differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(37): p. E3929-36.
 55. Lu, T., et al., *REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease*. Nature, 2014. **507**(7493): p. 448-54.
 56. Brockdorff, N., et al., *The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus*. Cell, 1992. **71**(3): p. 515-26.
 57. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
 58. Vagin, V.V., et al., *A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline*. Science, 2006. **313**(5785): p. 320-4.
 59. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D68-73.
 60. Griffiths-Jones, S., *The microRNA Registry*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D109-11.
 61. Lau, N.C., et al., *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 858-62.
 62. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome Res, 2004. **14**(10a): p. 1902-10.
 63. Baskerville, S. and D.P. Bartel, *Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes*. Rna, 2005. **11**(3): p. 241-7.
 64. Martinez, N.J., et al., *Genome-scale spatiotemporal analysis of Caenorhabditis elegans microRNA promoter activity*. Genome Res, 2008. **18**(12): p. 2005-15.
 65. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. Embo j, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
 66. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. Rna, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
 67. Chang, T.C., et al., *Genome-wide annotation of microRNA primary transcript structures reveals novel regulatory mechanisms*. Genome Res, 2015. **25**(9): p. 1401-9.
 68. Saini, H.K., A.J. Enright, and S. Griffiths-Jones, *Annotation of mammalian primary microRNAs*. BMC Genomics, 2008. **9**(1): p. 564.
 69. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
 70. Landthaler, M., A. Yalcin, and T. Tuschl, *The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis*. Curr Biol, 2004. **14**(23): p. 2162-7.
 71. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-5.
 72. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. Cell, 2006. **125**(5): p. 887-901.

-
73. Herbert, K.M., et al., *A heterotrimer model of the complete Microprocessor complex revealed by single-molecule subunit counting*. *Rna*, 2016. **22**(2): p. 175-83.
 74. Kwon, S.C., et al., *Structure of Human DROSHA*. *Cell*, 2016. **164**(1-2): p. 81-90.
 75. Nguyen, T.A., et al., *Functional Anatomy of the Human Microprocessor*. *Cell*, 2015. **161**(6): p. 1374-87.
 76. Quick-Cleveland, J., et al., *The DGCR8 RNA-binding heme domain recognizes primary microRNAs by clamping the hairpin*. *Cell Rep*, 2014. **7**(6): p. 1994-2005.
 77. Wang, Y., et al., *DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal*. *Nat Genet*, 2007. **39**(3): p. 380-5.
 78. Chong, M.M., et al., *Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery*. *Genes Dev*, 2010. **24**(17): p. 1951-60.
 79. de la Chapelle, A., et al., *A deletion in chromosome 22 can cause DiGeorge syndrome*. *Hum Genet*, 1981. **57**(3): p. 253-6.
 80. Fénelon, K., et al., *Deficiency of Dgcr8, a gene disrupted by the 22q11.2 microdeletion, results in altered short-term plasticity in the prefrontal cortex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(11): p. 4447-52.
 81. Stark, K.L., et al., *Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model*. *Nat Genet*, 2008. **40**(6): p. 751-60.
 82. Okada, C., et al., *A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery*. *Science*, 2009. **326**(5957): p. 1275-9.
 83. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. *Rna*, 2004. **10**(2): p. 185-91.
 84. Melo, S.A., et al., *A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells*. *Cancer Cell*, 2010. **18**(4): p. 303-15.
 85. Kim, Y.K., B. Kim, and V.N. Kim, *Re-evaluation of the roles of DROSHA, Export in 5, and DICER in microRNA biogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(13): p. E1881-9.
 86. Martinez, I., et al., *An Exportin-1-dependent microRNA biogenesis pathway during human cell quiescence*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017. **114**(25): p. E4961-E4970.
 87. Lau, P.W., et al., *The molecular architecture of human Dicer*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(4): p. 436-40.
 88. Macrae, I.J., et al., *Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer*. *Science*, 2006. **311**(5758): p. 195-8.
 89. Bernstein, E., et al., *Dicer is essential for mouse development*. *Nat Genet*, 2003. **35**(3): p. 215-7.
 90. Wilson, R.C., et al., *Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis*. *Mol Cell*, 2015. **57**(3): p. 397-407.
 91. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. *Nature*, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
 92. Fukunaga, R., et al., *Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals*. *Cell*, 2012. **151**(3): p. 533-46.

-
93. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
 94. Hu, H.Y., et al., *Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 413.
 95. Pfaff, J. and G. Meister, *Argonaute and GW182 proteins: an effective alliance in gene silencing*. Biochem Soc Trans, 2013. **41**(4): p. 855-60.
 96. Lai, E.C., *Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation*. Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 363-4.
 97. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
 98. Chandradoss, S.D., et al., *A Dynamic Search Process Underlies MicroRNA Targeting*. Cell, 2015. **162**(1): p. 96-107.
 99. Grimson, A., et al., *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 91-105.
 100. Broughton, J.P., et al., *Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity*. Mol Cell, 2016. **64**(2): p. 320-333.
 101. Wolf, J. and L.A. Passmore, *mRNA deadenylation by Pan2-Pan3*. Biochem Soc Trans, 2014. **42**(1): p. 184-7.
 102. Niinuma, S., T. Fukaya, and Y. Tomari, *CCR4 and CAF1 deadenylases have an intrinsic activity to remove the post-poly(A) sequence*. Rna, 2016. **22**(10): p. 1550-9.
 103. Xiang, K. and D.P. Bartel, *The molecular basis of coupling between poly(A)-tail length and translational efficiency*. Elife, 2021. **10**.
 104. Zekri, L., et al., *The Silencing Domain of GW182 Interacts with PABPC1 To Promote Translational Repression and Degradation of MicroRNA Targets and Is Required for Target Release*. Molecular and Cellular Biology, 2009. **29**(23): p. 6220-6231.
 105. Eulalio, A., et al., *Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing*. Genes Dev, 2007. **21**(20): p. 2558-70.
 106. De Pietri Tonelli, D., et al., *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, 2008. **135**(23): p. 3911-21.
 107. Kawase-Koga, Y., G. Otaegi, and T. Sun, *Different timings of Dicer deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system*. Dev Dyn, 2009. **238**(11): p. 2800-12.
 108. Davis, T.H., et al., *Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus*. J Neurosci, 2008. **28**(17): p. 4322-30.
 109. Huang, T., et al., *Wnt1-cre-mediated conditional loss of Dicer results in malformation of the midbrain and cerebellum and failure of neural crest and dopaminergic differentiation in mice*. J Mol Cell Biol, 2010. **2**(3): p. 152-63.
 110. Cuellar, T.L., et al., *Dicer loss in striatal neurons produces behavioral and neuroanatomical phenotypes in the absence of neurodegeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5614-9.
 111. Shibata, M., et al., *MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription factors*. J Neurosci, 2011. **31**(9): p. 3407-22.

-
112. Nowakowski, T.J., et al., *MicroRNA-92b regulates the development of intermediate cortical progenitors in embryonic mouse brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(17): p. 7056-61.
 113. Brett, J.O., et al., *The microRNA cluster miR-106b~25 regulates adult neural stem/progenitor cell proliferation and neuronal differentiation*. Aging (Albany NY), 2011. **3**(2): p. 108-24.
 114. Szulwach, K.E., et al., *Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis*. J Cell Biol, 2010. **189**(1): p. 127-41.
 115. Smrt, R.D., et al., *MicroRNA miR-137 regulates neuronal maturation by targeting ubiquitin ligase mind bomb-1*. Stem Cells, 2010. **28**(6): p. 1060-70.
 116. Liu, C., et al., *Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(5): p. 433-44.
 117. Winter, J., *MicroRNAs of the miR379-410 cluster: New players in embryonic neurogenesis and regulators of neuronal function*. Neurogenesis (Austin), 2015. **2**(1): p. e1004970.
 118. Nishino, J., et al., *Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression*. Cell, 2008. **135**(2): p. 227-39.
 119. Zhang, W., et al., *MiRNA-128 regulates the proliferation and neurogenesis of neural precursors by targeting PCMI in the developing cortex*. Elife, 2016. **5**.
 120. Choi, P.S., et al., *Members of the miRNA-200 family regulate olfactory neurogenesis*. Neuron, 2008. **57**(1): p. 41-55.
 121. Luikart, B.W., et al., *miR-132 mediates the integration of newborn neurons into the adult dentate gyrus*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19077.
 122. Erni, A., C. Rolando, and V. Taylor, *Chapter 6 - miRNA-Dependent and Independent Functions of the Microprocessor in the Regulation of Neural Stem Cell Biology*, in *Essentials of Noncoding RNA in Neuroscience*, D. De Pietri Tonelli, Editor. 2017, Academic Press. p. 101-117.
 123. Kim, Y.K. and V.N. Kim, *Processing of intronic microRNAs*. Embo j, 2007. **26**(3): p. 775-83.
 124. Chen, Z., et al., *MicroRNA-26b regulates cancer proliferation migration and cell cycle transition by suppressing TRAF5 in esophageal squamous cell carcinoma*. Am J Transl Res, 2016. **8**(5): p. 1957-70.
 125. Liu, Y., et al., *Overexpression of miR-26b-5p regulates the cell cycle by targeting CCND2 in GC-2 cells under exposure to extremely low frequency electromagnetic fields*. Cell Cycle, 2016. **15**(3): p. 357-67.
 126. Xu, G., et al., *Obesity-associated microRNA-26b regulates the proliferation of human preadipocytes via arrest of the G1/S transition*. Mol Med Rep, 2015. **12**(3): p. 3648-3654.
 127. Zhu, Y., et al., *MicroRNA-26a/b and their host genes cooperate to inhibit the G1/S transition by activating the pRb protein*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(10): p. 4615-25.
 128. Jiang, J.J., et al., *MicroRNA-26a supports mammalian axon regeneration in vivo by suppressing GSK3 β expression*. Cell Death Dis, 2015. **6**(8): p. e1865.

-
129. Song, G., et al., *The role of microRNA-26b in human adipocyte differentiation and proliferation*. *Gene*, 2014. **533**(2): p. 481-7.
 130. Absalon, S., et al., *MiR-26b, upregulated in Alzheimer's disease, activates cell cycle entry, tau-phosphorylation, and apoptosis in postmitotic neurons*. *J Neurosci*, 2013. **33**(37): p. 14645-59.
 131. Huse, J.T., et al., *The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo*. *Genes Dev*, 2009. **23**(11): p. 1327-37.
 132. Wang, G., et al., *Up-regulation of microRNA in bladder tumor tissue is not common*. *Int Urol Nephrol*, 2010. **42**(1): p. 95-102.
 133. Zhang, B., et al., *Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2 in breast cancer*. *Carcinogenesis*, 2011. **32**(1): p. 2-9.
 134. Visone, R., et al., *Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas*. *Oncogene*, 2007. **26**(54): p. 7590-5.
 135. Ciarapica, R., et al., *Deregulated expression of miR-26a and Ezh2 in rhabdomyosarcoma*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(1): p. 172-5.
 136. Kota, J., et al., *Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model*. *Cell*, 2009. **137**(6): p. 1005-17.
 137. Li, Y., et al., *Tumor-suppressive miR-26a and miR-26b inhibit cell aggressiveness by regulating FUT4 in colorectal cancer*. *Cell Death & Disease*, 2017. **8**(6): p. e2892-e2892.
 138. Wei, Z., et al., *MiR-26a/miR-26b represses tongue squamous cell carcinoma progression by targeting PAK1*. *Cancer Cell International*, 2020. **20**(1): p. 82.
 139. Sauer, M., et al., *The miR-26 family regulates neural differentiation-associated microRNAs and mRNAs by directly targeting REST*. *J Cell Sci*, 2021. **134**(12).
 140. Zhao, B., et al., *MicroRNA expression profiling during neural differentiation of mouse embryonic carcinoma P19 cells*. *Methods Mol Biol*, 2013. **936**: p. 105-16.
 141. Dill, H., et al., *Intronic miR-26b controls neuronal differentiation by repressing its host transcript, ctdsp2*. *Genes Dev*, 2012. **26**(1): p. 25-30.
 142. Sauer, M., *Die microRNA-26 Familie kontrolliert über den REST-Komplex ein für die Neurogenese essentielles regulatorisches RNA Netzwerk*, in *Fakultät für Biologie*. 2019, JMU Würzburg.
 143. Wu, J. and X. Xie, *Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression*. *Genome Biology*, 2006. **7**(9): p. R85.
 144. Packer, A.N., et al., *The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease*. *J Neurosci*, 2008. **28**(53): p. 14341-6.
 145. Laneve, P., et al., *A minicircuitry involving REST and CREB controls miR-9-2 expression during human neuronal differentiation*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(20): p. 6895-905.
 146. Visvanathan, J., et al., *The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development*. *Genes Dev*, 2007. **21**(7): p. 744-9.

-
147. Conaco, C., et al., *Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2422-7.
 148. Duan, P., et al., *miR-29a modulates neuronal differentiation through targeting REST in mesenchymal stem cells*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97684.
 149. Sun, G., et al., *miR-137 forms a regulatory loop with nuclear receptor TLX and LSD1 in neural stem cells*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 529.
 150. Cui, Y., et al., *The miR-20-Rest-Wnt signaling axis regulates neural progenitor cell differentiation*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 23300.
 151. Wada, R., et al., *miR-212 is downregulated and suppresses methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human gastric cancer*. Int J Cancer, 2010. **127**(5): p. 1106-14.
 152. Klein, M.E., et al., *Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA*. Nat Neurosci, 2007. **10**(12): p. 1513-4.
 153. Yoo, A.S., et al., *MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons*. Nature, 2011. **476**(7359): p. 228-31.
 154. Drouin-Ouellet, J., et al., *REST suppression mediates neural conversion of adult human fibroblasts via microRNA-dependent and -independent pathways*. EMBO Mol Med, 2017. **9**(8): p. 1117-1131.
 155. Quinn, J.J. and H.Y. Chang, *Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function*. Nature Reviews Genetics, 2016. **17**(1): p. 47-62.
 156. Djebali, S., et al., *Landscape of transcription in human cells*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 101-108.
 157. Chu, C., et al., *Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions*. Mol Cell, 2011. **44**(4): p. 667-78.
 158. Bonetti, A., et al., *RADICL-seq identifies general and cell type-specific principles of genome-wide RNA-chromatin interactions*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 1018.
 159. Li, X., et al., *GRID-seq reveals the global RNA-chromatin interactome*. Nat Biotechnol, 2017. **35**(10): p. 940-950.
 160. Dueva, R., et al., *Neutralization of the Positive Charges on Histone Tails by RNA Promotes an Open Chromatin Structure*. Cell Chem Biol, 2019. **26**(10): p. 1436-1449.e5.
 161. Hung, T., et al., *Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters*. Nat Genet, 2011. **43**(7): p. 621-9.
 162. Cooper, D.R., et al., *Long Non-Coding RNA NEAT1 Associates with SRp40 to Temporally Regulate PPAR γ 2 Splicing during Adipogenesis in 3T3-L1 Cells*. Genes (Basel), 2014. **5**(4): p. 1050-63.
 163. Rani, N., et al., *A Primate lncRNA Mediates Notch Signaling during Neuronal Development by Sequestering miRNA*. Neuron, 2016. **90**(6): p. 1174-1188.
 164. Bousard, A., et al., *The role of Xist-mediated Polycomb recruitment in the initiation of X-chromosome inactivation*. EMBO Rep, 2019. **20**(10): p. e48019.
 165. Tsai, M.C., et al., *Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes*. Science, 2010. **329**(5992): p. 689-93.
 166. Wang, K.C. and H.Y. Chang, *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs*. Mol Cell, 2011. **43**(6): p. 904-14.

-
167. Derrien, T., et al., *The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression*. Genome Res, 2012. **22**(9): p. 1775-89.
168. Li, A.W. and P.R. Murphy, *Expression of alternatively spliced FGF-2 antisense RNA transcripts in the central nervous system: regulation of FGF-2 mRNA translation*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **170**(1-2): p. 233-42.
169. Sauvageau, M., et al., *Multiple knockout mouse models reveal lincRNAs are required for life and brain development*. Elife, 2013. **2**: p. e01749.
170. Ramos, A.D., et al., *The long noncoding RNA Pnky regulates neuronal differentiation of embryonic and postnatal neural stem cells*. Cell Stem Cell, 2015. **16**(4): p. 439-447.
171. Goff, L.A., et al., *Spatiotemporal expression and transcriptional perturbations by long noncoding RNAs in the mouse brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(22): p. 6855-62.
172. Rapicavoli, N.A., et al., *The long noncoding RNA Six3OS acts in trans to regulate retinal development by modulating Six3 activity*. Neural Dev, 2011. **6**: p. 32.
173. Ng, S.Y., et al., *The long noncoding RNA RMST interacts with SOX2 to regulate neurogenesis*. Mol Cell, 2013. **51**(3): p. 349-59.
174. Vance, K.W., et al., *The long non-coding RNA Paupar regulates the expression of both local and distal genes*. Embo j, 2014. **33**(4): p. 296-311.
175. Bond, A.M., et al., *Balanced gene regulation by an embryonic brain ncRNA is critical for adult hippocampal GABA circuitry*. Nat Neurosci, 2009. **12**(8): p. 1020-7.
176. Modarresi, F., et al., *Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional upregulation*. Nat Biotechnol, 2012. **30**(5): p. 453-9.
177. Aprea, J., et al., *Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment*. Embo j, 2013. **32**(24): p. 3145-60.
178. Rea, J., et al., *HOTAIRMI regulates neuronal differentiation by modulating NEUROGENIN 2 and the downstream neurogenic cascade*. Cell Death & Disease, 2020. **11**(7): p. 527.
179. Cui, Y., et al., *LncRNA Neat1 mediates miR-124-induced activation of Wnt/ β -catenin signaling in spinal cord neural progenitor cells*. Stem Cell Research & Therapy, 2019. **10**(1): p. 400.
180. Chalei, V., et al., *The long non-coding RNA Dali is an epigenetic regulator of neural differentiation*. Elife, 2014. **3**: p. e04530.
181. Aprea, J. and F. Calegari, *Long non-coding RNAs in corticogenesis: deciphering the non-coding code of the brain*. The EMBO Journal, 2015. **34**(23): p. 2865-2884.
182. Ji, P., et al., *MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer*. Oncogene, 2003. **22**(39): p. 8031-41.
183. Wilusz, J.E., S.M. Freier, and D.L. Spector, *3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA*. Cell, 2008. **135**(5): p. 919-32.
184. Zhang, B., et al., *The lncRNA Malat1 is dispensable for mouse development but its transcription plays a cis-regulatory role in the adult*. Cell Rep, 2012. **2**(1): p. 111-23.

-
185. Ageeli, A.A., et al., *Finely tuned conformational dynamics regulate the protective function of the lncRNA MALAT1 triple helix*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(3): p. 1468-1481.
 186. Wilusz, J.E., et al., *A triple helix stabilizes the 3' ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails*. Genes Dev, 2012. **26**(21): p. 2392-407.
 187. Hutchinson, J.N., et al., *A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 39.
 188. Wilusz, J.E. and D.L. Spector, *An unexpected ending: noncanonical 3' end processing mechanisms*. Rna, 2010. **16**(2): p. 259-66.
 189. Lin, Q., et al., *MALAT1 affects ovarian cancer cell behavior and patient survival*. Oncol Rep, 2018. **39**(6): p. 2644-2652.
 190. Yang, M.H., et al., *MALAT1 promotes colorectal cancer cell proliferation/migration/invasion via PRKA kinase anchor protein 9*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(1): p. 166-74.
 191. Zhou, X., et al., *Long Non Coding RNA MALAT1 Promotes Tumor Growth and Metastasis by inducing Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 15972.
 192. Eißmann, M., et al., *Loss of the abundant nuclear non-coding RNA MALAT1 is compatible with life and development*. RNA Biol, 2012. **9**(8): p. 1076-87.
 193. Nakagawa, S., et al., *Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice*. Rna, 2012. **18**(8): p. 1487-99.
 194. El-Brolosy, M.A. and D.Y.R. Stainier, *Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms*. PLoS Genet, 2017. **13**(7): p. e1006780.
 195. Barbaric, I., G. Miller, and T.N. Dear, *Appearances can be deceiving: phenotypes of knockout mice*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2007. **6**(2): p. 91-103.
 196. Tripathi, V., et al., *The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation*. Mol Cell, 2010. **39**(6): p. 925-38.
 197. Arun, G., et al., *Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss*. Genes Dev, 2016. **30**(1): p. 34-51.
 198. Malakar, P., et al., *Long Noncoding RNA MALAT1 Promotes Hepatocellular Carcinoma Development by SRSF1 Upregulation and mTOR Activation*. Cancer Res, 2017. **77**(5): p. 1155-1167.
 199. Engreitz, J.M., et al., *RNA-RNA interactions enable specific targeting of noncoding RNAs to nascent Pre-mRNAs and chromatin sites*. Cell, 2014. **159**(1): p. 188-199.
 200. West, J.A., et al., *The long noncoding RNAs NEAT1 and MALAT1 bind active chromatin sites*. Mol Cell, 2014. **55**(5): p. 791-802.
 201. Li, B., et al., *Activation of LTBP3 gene by a long noncoding RNA (lncRNA) MALAT1 transcript in mesenchymal stem cells from multiple myeloma*. J Biol Chem, 2014. **289**(42): p. 29365-75.
 202. Zhou, L., et al., *Long non-coding RNA MALAT1 interacts with transcription factor Foxo1 to regulate SIRT1 transcription in high glucose-induced HK-2 cells injury*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **503**(2): p. 849-855.

-
203. Yang, L., et al., *ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs*. Cell, 2011. **147**(4): p. 773-88.
204. Han, Y., et al., *Hsa-miR-125b suppresses bladder cancer development by down-regulating oncogene SIRT7 and oncogenic long noncoding RNA MALAT1*. FEBS Lett, 2013.
205. Yu, F., et al., *MALAT1 functions as a competing endogenous RNA to mediate Rac1 expression by sequestering miR-101b in liver fibrosis*. Cell Cycle, 2015. **14**(24): p. 3885-96.
206. Luo, W., et al., *MALAT1 promotes osteosarcoma development by targeting TGFA via MIR376A*. Oncotarget, 2016. **7**(34): p. 54733-54743.
207. Du, Y., et al., *Estradiol promotes EMT in endometriosis via MALAT1/miR200s sponge function*. Reproduction, 2019. **157**(2): p. 179-188.
208. Feng, C., et al., *LncRNA MALAT1 Promotes Lung Cancer Proliferation and Gefitinib Resistance by Acting as a miR-200a Sponge*. Arch Bronconeumol (Engl Ed), 2019. **55**(12): p. 627-633.
209. Xiao, H., et al., *LncRNA MALAT1 functions as a competing endogenous RNA to regulate ZEB2 expression by sponging miR-200s in clear cell kidney carcinoma*. Oncotarget, 2015. **6**(35): p. 38005-15.
210. Leucci, E., et al., *microRNA-9 targets the long non-coding RNA MALAT1 for degradation in the nucleus*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 2535.
211. Li, F., et al., *MALAT1 regulates miR-34a expression in melanoma cells*. Cell Death & Disease, 2019. **10**(6): p. 389.
212. Yang, X., et al., *LncRNA MALAT1 shuttled by bone marrow-derived mesenchymal stem cells-secreted exosomes alleviates osteoporosis through mediating microRNA-34c/SATB2 axis*. Aging (Albany NY), 2019. **11**(20): p. 8777-8791.
213. Cao, D.-w., et al., *The lncRNA Malat1 functions as a ceRNA to contribute to berberine-mediated inhibition of HMGB1 by sponging miR-181c-5p in poststroke inflammation*. Acta Pharmacologica Sinica, 2020. **41**(1): p. 22-33.
214. Wang, Y., et al., *MALAT1 promotes liver fibrosis by sponging miR-181a and activating TLR4-NF- κ B signaling*. Int J Mol Med, 2021. **48**(6).
215. Zhang, C., et al., *Long Noncoding RNA MALAT1 Promotes Colorectal Cancer Progression by Acting as a ceRNA of miR-508-5p to Regulate RAB14 Expression*. Biomed Res Int, 2020. **2020**: p. 4157606.
216. Zheng, L., et al., *Long non-coding RNA MALAT1 regulates BLCAP mRNA expression through binding to miR-339-5p and promotes poor prognosis in breast cancer*. Bioscience Reports, 2019. **39**(2).
217. Ye, W., et al., *LncRNA MALAT1 Regulates miR-144-3p to Facilitate Epithelial-Mesenchymal Transition of Lens Epithelial Cells via the ROS/NRF2/Notch1/Snail Pathway*. Oxid Med Cell Longev, 2020. **2020**: p. 8184314.
218. Sun, Z., et al., *YAP1-induced MALAT1 promotes epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis by sponging miR-126-5p in colorectal cancer*. Oncogene, 2019. **38**(14): p. 2627-2644.

-
219. Liu, W., et al., *Long non-coding RNA MALAT1 contributes to cell apoptosis by sponging miR-124 in Parkinson disease*. Cell & Bioscience, 2017. **7**(1): p. 19.
220. Wu, J., C. Wang, and H. Ding, *LncRNA MALAT1 promotes neuropathic pain progression through the miR-154-5p/AQP9 axis in CCI rat models*. Mol Med Rep, 2020. **21**(1): p. 291-303.
221. Che, H., et al., *Melatonin alleviates cardiac fibrosis via inhibiting lncRNA MALAT1/miR-141-mediated NLRP3 inflammasome and TGF- β 1/Smads signaling in diabetic cardiomyopathy*. Faseb j, 2020. **34**(4): p. 5282-5298.
222. Ferri, C., et al., *MiR-423-5p prevents MALAT1-mediated proliferation and metastasis in prostate cancer*. J Exp Clin Cancer Res, 2022. **41**(1): p. 20.
223. Wang, N., et al., *lncRNA MALAT1/miR-26a/26b/ST8SIA4 axis mediates cell invasion and migration in breast cancer cell lines*. Oncol Rep, 2021. **46**(2).
224. Su, Y., C. Liang, and Q. Yang, *LncRNA MALAT1 promotes glioma cell growth through sponge miR-613*. J buon, 2021. **26**(3): p. 984-991.
225. Li, F., et al., *MALAT1 regulates miR-34a expression in melanoma cells*. Cell Death Dis, 2019. **10**(6): p. 389.
226. Wang, Q., et al., *miR-485-3p regulated by MALAT1 inhibits osteosarcoma glycolysis and metastasis by directly suppressing c-MET and AKT3/mTOR signalling*. Life Sci, 2021. **268**: p. 118925.
227. Zhang, J., et al., *LncRNA MALAT1 facilitates lung metastasis of osteosarcomas through miR-202 sponging*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 12757.
228. Bernard, D., et al., *A long nuclear-retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression*. Embo j, 2010. **29**(18): p. 3082-93.
229. Chen, L., et al., *Long non-coding RNA Malat1 promotes neurite outgrowth through activation of ERK/MAPK signalling pathway in N2a cells*. J Cell Mol Med, 2016. **20**(11): p. 2102-2110.
230. Ma, P., et al., *Long Non-coding RNA MALAT1 Inhibits Neuron Apoptosis and Neuroinflammation While Stimulates Neurite Outgrowth and Its Correlation With MiR-125b Mediates PTGS2, CDK5 and FOXQ1 in Alzheimer's Disease*. Curr Alzheimer Res, 2019. **16**(7): p. 596-612.
231. Qiao, Y., et al., *LncRNA MALAT1 is Neuroprotective in a Rat Model of Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury Through miR-204 Regulation*. Curr Neurovasc Res, 2018. **15**(3): p. 211-219.
232. Masoumi, F., et al., *Malat1 long noncoding RNA regulates inflammation and leukocyte differentiation in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 2019. **328**: p. 50-59.
233. Wolber, W., et al., *Phenotype and Stability of Neural Differentiation of Androgenetic Murine ES Cell-Derived Neural Progenitor Cells*. Cell Med, 2013. **5**(1): p. 29-42.
234. Bibel, M., et al., *Generation of a defined and uniform population of CNS progenitors and neurons from mouse embryonic stem cells*. Nat Protoc, 2007. **2**(5): p. 1034-43.
235. Debacq-Chainiaux, F., et al., *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo*. Nature Protocols, 2009. **4**(12): p. 1798-1806.

-
236. Hanahan, D., J. Jessee, and F.R. Bloom, *Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria*. Methods Enzymol, 1991. **204**: p. 63-113.
 237. Agarwal, V., et al., *Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs*. Elife, 2015. **4**.
 238. Ran, F.A., et al., *Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity*. Cell, 2013. **154**(6): p. 1380-9.
 239. Cho, S.W., et al., *Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases*. Genome Res, 2014. **24**(1): p. 132-41.
 240. Shen, B., et al., *Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects*. Nat Methods, 2014. **11**(4): p. 399-402.
 241. Gopalappa, R., et al., *Paired D10A Cas9 nickases are sometimes more efficient than individual nucleases for gene disruption*. Nucleic Acids Research, 2018. **46**(12): p. e71-e71.
 242. Zhou, J., et al., *Long noncoding RNA MALAT1 sponging miR-26a-5p to modulate Smad1 contributes to colorectal cancer progression by regulating autophagy*. Carcinogenesis, 2021. **42**(11): p. 1370-1379.
 243. Li, Q., et al., *MALAT1 sponges miR-26a and miR-26b to regulate endothelial cell angiogenesis via PFKFB3-driven glycolysis in early-onset preeclampsia*. Mol Ther Nucleic Acids, 2021. **23**: p. 897-907.
 244. Xu, J., et al., *Exosomal MALAT1 sponges miR-26a/26b to promote the invasion and metastasis of colorectal cancer via FUT4 enhanced fucosylation and PI3K/Akt pathway*. J Exp Clin Cancer Res, 2020. **39**(1): p. 54.
 245. Dong, N., *Long Noncoding RNA MALAT1 Acts as a Competing Endogenous RNA to Regulate TGF- β 2 Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Lens Epithelial Cells by a MicroRNA-26a-Dependent Mechanism*. BioMed Research International, 2019. **2019**: p. 1569638.
 246. Li, Z., J. Li, and N. Tang, *Long noncoding RNA Malat1 is a potent autophagy inducer protecting brain microvascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury by sponging miR-26b and upregulating ULK2 expression*. Neuroscience, 2017. **354**: p. 1-10.
 247. Paraskevopoulou, M.D., et al., *DIANA-LncBase v2: indexing microRNA targets on non-coding transcripts*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(D1): p. D231-8.
 248. Tripathi, V., et al., *Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB*. PLoS Genet, 2013. **9**(3): p. e1003368.
 249. Hu, L., et al., *Up-regulation of long noncoding RNA MALAT1 contributes to proliferation and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2015. **34**(1): p. 7.
 250. Wang, X., et al., *LncRNA MALAT1 promotes development of mantle cell lymphoma by associating with EZH2*. Journal of Translational Medicine, 2016. **14**(1): p. 346.
 251. Jiao, F., et al., *Elevated expression level of long noncoding RNA MALAT-1 facilitates cell growth, migration and invasion in pancreatic cancer*. Oncol Rep, 2014. **32**(6): p. 2485-92.

-
252. Yang, F., et al., *MALAT-1 interacts with hnRNP C in cell cycle regulation*. FEBS Lett, 2013. **587**(19): p. 3175-81.
253. Kangboonruang, K., et al., *MALAT1 Decreases the Sensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells to Radiation and Cisplatin*. Anticancer Res, 2020. **40**(5): p. 2645-2655.
254. Xie, S.J., et al., *lincRNA and its parent lncRNA MALAT1 promote proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma cells by activating ERK/MAPK signaling pathway*. Cell Death Discov, 2021. **7**(1): p. 110.
255. Dong, N., *Long Noncoding RNA MALAT1 Acts as a Competing Endogenous RNA to Regulate TGF- β 2 Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Lens Epithelial Cells by a MicroRNA-26a-Dependent Mechanism*. Biomed Res Int, 2019. **2019**: p. 1569638.
256. Wang, J. and G. Sun, *FOXO1-MALAT1-miR-26a-5p Feedback Loop Mediates Proliferation and Migration in Osteosarcoma Cells*. Oncol Res, 2017. **25**(9): p. 1517-1527.
257. Zhao, C., et al., *The m6A methyltransferase METTL3 controls epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of breast cancer through the MALAT1/miR-26b/HMGA2 axis*. Cancer Cell International, 2021. **21**(1): p. 441.
258. Du, J.Y., et al., *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, 2015. **33**(4): p. 1890-8.
259. Li, Y., et al., *miR-26a-5p Inhibit Gastric Cancer Cell Proliferation and Invasion Through Mediated Wnt5a*. Onco Targets Ther, 2020. **13**: p. 2537-2550.
260. Wang, X.J., et al., *miR-26 suppresses renal cell cancer via down-regulating coronin-3*. Mol Cell Biochem, 2020. **463**(1-2): p. 137-146.
261. Tan, X., et al., *MicroRNA-26a inhibits osteosarcoma cell proliferation by targeting IGF-1*. Bone Res, 2015. **3**: p. 15033.
262. Sun, T.Y., et al., *miR-26a inhibits the proliferation of ovarian cancer cells via regulating CDC6 expression*. Am J Transl Res, 2016. **8**(2): p. 1037-46.
263. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 729-40.
264. Munk, R., et al., *Senescence-Associated MicroRNAs*. Int Rev Cell Mol Biol, 2017. **334**: p. 177-205.
265. Storer, M., et al., *Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning*. Cell, 2013. **155**(5): p. 1119-30.
266. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
267. Overhoff, M.G., et al., *Cellular senescence mediated by p16INK4A-coupled miRNA pathways*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(3): p. 1606-18.
268. Jones, I., et al., *Development and validation of an in vitro model system to study peripheral sensory neuron development and injury*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 15961.
269. Sharma, Y., et al., *In vitro human stem cell derived cultures to monitor calcium signaling in neuronal development and function*. Wellcome Open Res, 2020. **5**: p. 16.

-
270. Gusel'nikova, V.V. and D.E. Korzhevskiy, *NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker*. Acta Naturae, 2015. **7**(2): p. 42-7.
271. Lambert, M.P., et al., *The RNA helicase DDX17 controls the transcriptional activity of REST and the expression of proneural microRNAs in neuronal differentiation*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(15): p. 7686-7700.
272. Khan, A.A., et al., *Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(6): p. 549-55.
273. Bosson, A.D., J.R. Zamudio, and P.A. Sharp, *Endogenous miRNA and target concentrations determine susceptibility to potential ceRNA competition*. Mol Cell, 2014. **56**(3): p. 347-359.
274. Brosnan, C.A., A.J. Palmer, and S. Zuryn, *Cell-type-specific profiling of loaded miRNAs from Caenorhabditis elegans reveals spatial and temporal flexibility in Argonaute loading*. Nature Communications, 2021. **12**(1): p. 2194.
275. Krichevsky, A.M., et al., *Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis*. Stem Cells, 2006. **24**(4): p. 857-64.
276. Houbaviy, H.B., M.F. Murray, and P.A. Sharp, *Embryonic stem cell-specific MicroRNAs*. Dev Cell, 2003. **5**(2): p. 351-8.
277. Le, M.T., et al., *Conserved regulation of p53 network dosage by microRNA-125b occurs through evolving miRNA-target gene pairs*. PLoS Genet, 2011. **7**(9): p. e1002242.
278. Zhao, C., et al., *A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(4): p. 365-71.
279. Itskovitz-Eldor, J., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers*. Mol Med, 2000. **6**(2): p. 88-95.
280. Okada, Y., et al., *Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells*. Dev Biol, 2004. **275**(1): p. 124-42.
281. Herculano-Houzel, S., B. Mota, and R. Lent, *Cellular scaling rules for rodent brains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(32): p. 12138-43.
282. Sun, Y.M., et al., *Rest-mediated regulation of extracellular matrix is crucial for neural development*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3656.
283. Jørgensen, H.F., et al., *REST selectively represses a subset of RE1-containing neuronal genes in mouse embryonic stem cells*. Development, 2009. **136**(5): p. 715-21.
284. Zhao, S., et al., *MiR-26a inhibits prostate cancer progression by repression of Wnt5a*. Tumour Biol, 2014. **35**(10): p. 9725-33.
285. Hu, X., et al., *MiR-26b suppresses hepatocellular carcinoma development by negatively regulating ZNRD1 and Wnt/ β -catenin signaling*. Cancer Med, 2019. **8**(17): p. 7359-7371.
286. Wang, D., et al., *Impact of miR-26b on cardiomyocyte differentiation in P19 cells through regulating canonical/non-canonical Wnt signalling*. Cell Prolif, 2017. **50**(6).
287. Chen, X., et al., *MicroRNA-26a and -26b inhibit lens fibrosis and cataract by negatively regulating Jagged-1/Notch signaling pathway*. Cell Death Differ, 2017. **24**(11): p. 1990.

-
288. Liu, T., et al., *MicroRNA-26a inhibits cell proliferation and invasion by targeting FAM98A in breast cancer*. *Oncol Lett*, 2021. **21**(5): p. 367.
289. Deng, M., et al., *miR-26a suppresses tumor growth and metastasis by targeting FGF9 in gastric cancer*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e72662.
290. Ma, J., et al., *MiR-26b-5p regulates the preadipocyte differentiation by targeting FGF21 in goats*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2021. **57**(3): p. 257-263.
291. Zhang, H., L. Zhang, and 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*. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2018. **11**(44).
292. Xie, L., et al., *MicroRNA-26a-2 maintains stress resiliency and antidepressant efficacy by targeting the serotonergic autoreceptor HTR1A*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019. **511**(2): p. 440-446.
293. Ehses, J., et al., *Synergistic regulation of Rgs4 mRNA by HuR and miR-26/RISC in neurons*. *RNA Biol*, 2020: p. 1-11.
294. Zhang, Y.H., et al., *Pulmonary surfactant synthesis in miRNA-26a-1/miRNA-26a-2 double knockout mice generated using the CRISPR/Cas9 system*. *Am J Transl Res*, 2017. **9**(2): p. 355-365.
295. Sun, Y.F., et al., *Knockout of microRNA-26a promotes lung development and pulmonary surfactant synthesis*. *Mol Med Rep*, 2018. **17**(4): p. 5988-5995.
296. Acharya, A., et al., *miR-26 suppresses adipocyte progenitor differentiation and fat production by targeting Fbxl19*. *Genes Dev*, 2019. **33**(19-20): p. 1367-1380.
297. Lipovich, L., et al., *Activity-dependent human brain coding/noncoding gene regulatory networks*. *Genetics*, 2012. **192**(3): p. 1133-48.
298. Feng, J., et al., *The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator*. *Genes Dev*, 2006. **20**(11): p. 1470-84.
299. Ziegenhals, T., *The role of the miR-26 family in neurogenesis*, in *Graduate School of Life Science, Section Biomedicine*. 2017, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
300. Chen, Y., et al., *The lncRNA Malat1 regulates microvascular function after myocardial infarction in mice via miR-26b-5p/Mfn1 axis-mediated mitochondrial dynamics*. *Redox Biol*, 2021. **41**: p. 101910.
301. Tian, T., et al., *Long Noncoding RNA MPRL Promotes Mitochondrial Fission and Cisplatin Chemosensitivity via Disruption of Pre-miRNA Processing*. *Clin Cancer Res*, 2019. **25**(12): p. 3673-3688.
302. Zhuang, C., et al., *A double-negative feedback loop between EZH2 and miR-26a regulates tumor cell growth in hepatocellular carcinoma*. *Int J Oncol*, 2016. **48**(3): p. 1195-204.
303. Stamato, M.A., et al., *Inhibition of EZH2 triggers the tumor suppressive miR-29b network in multiple myeloma*. *Oncotarget*, 2017. **8**(63): p. 106527-106537.
304. Wang, W., et al., *Long noncoding RNA MALAT1 promotes malignant development of esophageal squamous cell carcinoma by targeting β -catenin via Ezh2*. *Oncotarget*, 2016. **7**(18): p. 25668-82.

-
305. Chen, L., et al., *Tumor-specific expression of microRNA-26a suppresses human hepatocellular carcinoma growth via cyclin-dependent and -independent pathways*. Mol Ther, 2011. **19**(8): p. 1521-8.
306. Lu, J., et al., *MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2*. Cancer Res, 2011. **71**(1): p. 225-33.
307. Kim, H., et al., *Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(5): p. 2183-8.
308. Ma, X.Y., et al., *Malat1 as an evolutionarily conserved lncRNA, plays a positive role in regulating proliferation and maintaining undifferentiated status of early-stage hematopoietic cells*. BMC Genomics, 2015. **16**(1): p. 676.
309. Lin, N., et al., *Long noncoding RNA MALAT1 potentiates growth and inhibits senescence by antagonizing ABI3BP in gallbladder cancer cells*. J Exp Clin Cancer Res, 2019. **38**(1): p. 244.
310. Puvvula, P.K., *LncRNAs Regulatory Networks in Cellular Senescence*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(11).
311. Overhoff, M.G., et al., *Cellular senescence mediated by p16INK4A-coupled miRNA pathways*. Nucleic Acids Research, 2013. **42**(3): p. 1606-1618.
312. Makeyev, E.V., et al., *The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing*. Mol Cell, 2007. **27**(3): p. 435-48.
313. Mondanizadeh, M., et al., *MicroRNA-124 regulates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sp1 mRNA*. J Cell Biochem, 2015. **116**(6): p. 943-53.
314. Jiao, S., et al., *miR-124 promotes proliferation and differentiation of neuronal stem cells through inactivating Notch pathway*. Cell & Bioscience, 2017. **7**(1): p. 68.
315. Neo, W.H., et al., *MicroRNA miR-124 controls the choice between neuronal and astrocyte differentiation by fine-tuning Ezh2 expression*. J Biol Chem, 2014. **289**(30): p. 20788-801.
316. Shi, D., et al., *The long non-coding RNA MALAT1 interacted with miR-218 modulates choriocarcinoma growth by targeting Fbxw8*. Biomed Pharmacother, 2018. **97**: p. 543-550.
317. Lv, K., et al., *Long non-coding RNA MALAT1 regulates cell proliferation and apoptosis via miR-135b-5p/GPNMB axis in Parkinson's disease cell model*. Biol Res, 2021. **54**(1): p. 10.
318. Yang, Q., et al., *Hsa-miR-346 plays a role in the development of sepsis by downregulating SMAD3 expression and is negatively regulated by lncRNA MALAT1*. Mol Cell Probes, 2019. **47**: p. 101444.
319. Jin, H., J. Zhao, and C. Li, *LncRNA MALAT1 Functions as a Competing Endogenous RNA to Regulate BMII Expression by Sponging miR-200c/miR-203 in the Control of the Differentiation of Pulp Cells*. Biochem Genet, 2021. **59**(5): p. 1260-1277.

-
320. Shi, Z., et al., *Long Noncoding RNA MALAT1 Regulates the Progression of Atherosclerosis by miR-330-5p/NF- κ B Signal Pathway*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021. **78**(2): p. 235-246.
 321. Tan, X., Z. Huang, and X. Li, *Long Non-Coding RNA MALAT1 Interacts With miR-204 to Modulate Human Hilar Cholangiocarcinoma Proliferation, Migration, and Invasion by Targeting CXCR4*. *J Cell Biochem*, 2017. **118**(11): p. 3643-3653.
 322. Zhang, Y., et al., *MALAT1 knockdown promoted cell viability and migration of LPS-treated MG-63 cells via sponging miR-212*. *Genes & Genomics*, 2021. **43**(5): p. 523-531.
 323. Lim, S. and P. Kaldis, *Loss of Cdk2 and Cdk4 induces a switch from proliferation to differentiation in neural stem cells*. *Stem Cells*, 2012. **30**(7): p. 1509-20.
 324. Artegiani, B., D. Lindemann, and F. Calegari, *Overexpression of cdk4 and cyclinD1 triggers greater expansion of neural stem cells in the adult mouse brain*. *J Exp Med*, 2011. **208**(5): p. 937-48.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Embryonale Stammzellen sind pluripotent.....	10
Abbildung 2 Neurulation in Vertebraten	11
Abbildung 3 Differenzierungsschritte während der embryonalen Neurogenese.....	12
Abbildung 4 Der REST-Komplex verhindert die Expression neuronaler Gene.....	16
Abbildung 5 Genomische Organisation von miRNAs	19
Abbildung 6 Aufbau von pri-, pre- und maturer miRNA.....	20
Abbildung 7 Biogenese von miRNAs.....	22
Abbildung 8 Regulation der Neurogenese durch miRNAs	24
Abbildung 9 Genomische Lokalisation der miR-26 Familien Mitglieder in Maus und ihre Homologie in Vertebraten	26
Abbildung 10 Regulation der Genexpression durch lncRNAs	29
Abbildung 11 lncRNAs regulieren die Neurogenese auf verschiedenen Ebenen	31
Abbildung 12 Prozessierung des primären <i>Malat1</i> Transkripts	32
Abbildung 13 Neuronale Differenzierung aus ES-Zellen.....	49
Abbildung 14 <i>In silico</i> Analyse der miR-26 Zielsequenzen in den 3'UTRs von REST-Komplex Komponenten.....	59
Abbildung 15 Validierung der miR-26 Zielsequenzen in <i>Ctdsp2</i> , <i>Rest</i> und <i>CoRest</i> mittels Luziferase-Reporter Assays.....	62
Abbildung 16 Generierung und Validierung der <i>Ctdsp2</i> und <i>Rest</i> ts KO ES-Zelllinien	65
Abbildung 17 Repräsentative Abbildung der Analyse potentieller <i>Off-Target</i> Sequenzen im <i>Ctdsp2</i> ts KO.....	66
Abbildung 18 Analyse des Einflusses des Verlustes der miR-26 Zielsequenz in <i>Ctdsp2</i> und <i>Rest</i> auf die Expression der <i>Ctdsp</i> -Familie und <i>Rest</i>	69
Abbildung 19 Immunfluoreszenzfärbung der Neurone und neuronalen Vorläuferzellen in Kulturen von Wt, miR-26 tKo, <i>Ctdsp2</i> ts KO sowie <i>Rest</i> ts KO an Tag 15 der Differenzierung	71
Abbildung 20 Die Expression von REST-regulierten miRNAs ist abhängig von <i>Rest</i> -Regulation durch miR-26	73
Abbildung 21 Analyse der miR-26 Bindestellen in <i>Malat1</i> und <i>Malat1</i> Expression während der neuronalen Differenzierung von ES-Zellen und der embryonalen Neurogenese.....	75
Abbildung 22 Generierung von <i>Malat1</i> KO ES-Zellen	77
Abbildung 23 Charakterisierung der <i>Malat1</i> KO ES-Zellen.....	79
Abbildung 24 Der Verlust von <i>Malat1</i> verhindert die neuronale <i>in vitro</i> Differenzierung aus ES-Zellen.....	80
Abbildung 25 Der Verlust von <i>Malat1</i> führt zu einer geringeren Proliferation, sowie erhöhter P16 ^{INK4A} Expression in neuronalen Vorläuferzellen.....	83
Abbildung 26 Erhöhte Expression von miR-26 und der miR-26 Wirtsgene der <i>Ctdsp</i> -Familie in differenzierenden <i>Malat1</i> KO ES-Zellen	85
Abbildung 27 Erhöhte Frequenz proliferierender neuronaler Vorläuferzellen in miR-26 tKO-Kulturen an d12 der Differenzierung.....	86
Abbildung 28 Einfluss der miR-26 auf die Expression der Zellzyklusinhibitoren <i>p16^{ink4A}</i> , <i>p19^{arf}</i> und <i>p21^{cip1}</i>	88
Abbildung 29 Generierung von <i>Malat1</i> /miR-26 <i>knockout</i> ES-Zellen.....	89
Abbildung 30 Charakterisierung der <i>Malat1</i> /miR-26 KO ES-Zellen	90
Abbildung 31 Einfluss der miR-26 auf die Expression der Zellzyklusinhibitoren <i>p16^{ink4A}</i> , <i>p19^{arf}</i> und <i>p21^{cip1}</i>	92

Abbildung 32 Der gleichzeitige Verlust von <i>Malat1</i> und miR-26 führt nicht zu einer Erhöhung der P16^{INK4A} exprimierenden Vorläuferzellen	94
Abbildung 33 <i>Malat1</i>/miR-26 KO-Kulturen zeigen keine veränderte Proliferationsrate sowie eine geringere Frequenz an β-Galaktosidase+ Zellen als <i>Malat1</i> KO-Kulturen ...	97
Abbildung 34 <i>Malat1</i> KO-Kulturen weisen eine erhöhte Expression seneszenz-assoziiertes miRNAs auf.....	99
Abbildung 35 Der gleichzeitige Verlust von miR-26 und <i>Malat1</i> beeinflusst die neuronale Differenzierung nicht.....	100
Abbildung 36 <i>Malat1</i>/miR-26 KO-Zellen durchlaufen die neuronale Differenzierung schneller als Wt-Zellen	103
Abbildung 37 Der Verlust von <i>Malat1</i> beeinflusst nicht die Expression von <i>Rest</i>, aber die Expression von REST-miRs.....	105
Abbildung 38 Schematische Zusammenfassung der Phänotypen während der Neurogenese.....	116

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 miRNAs mit einer RE1 Sequenz bis zu 25 kb upstream von ihrem Promotor	26
Tabelle 2 Interaktionen zwischen <i>Malat1</i> und miRNAs.....	33
Tabelle 3 Ergebnisse der <i>Off-Target</i> Analysen des <i>Ctdsp2</i> ts KOs	67
Tabelle 4 Ergebnisse der <i>Off-Target</i> Analysen <i>Rest</i> ts KOs.....	117
Tabelle 5 Ergebnisse der <i>Off-Target</i> Analysen des <i>Malat1</i> KOs	117

11 Abkürzungsverzeichnis

AGO	<i>Argonaute</i>
AP	Alkaline Phosphatase
APS	Ammonium Persulfate
Ascl1	<i>Achaere-scute homolog 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BrdU	Bromdesoxyuridine
BRG1	<i>Brahma-related gene 1</i>
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
cel	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ceRNA	<i>competitive endogenous RNA</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CK1	<i>Casein kinase 1</i>
CoREST	<i>REST corepressor 1</i>
CPD	<i>Cumulative population doublings</i> / Kumulative Populationsverdopplung
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CRISPR	<i>Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats</i>
CTDSP	<i>Carboxy terminal domain small phosphatase like</i>
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
d	Tag
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrom critical Region 8</i>
DHH	<i>Desert Hedgehog</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dll1	<i>Delt-like protein 1</i>

DROSHA	<i>Double-stranded RNA-specific Endoribonuclease</i>
DTT	Dithiothreitol
EB	<i>Embryoid body</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
EZH2	<i>Enhancer of zeste 2</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
FOXO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase</i>
gDNA	Genomische DNA
Gli	<i>Glioma-associated oncogene</i>
GTP	Guanisine 5'-Triphosphat
HCl	Chlorwasserstoff / Salzsäure
HDAC	<i>Histon deacetylase</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
Hes	<i>Hairy and enhancer of split</i>
HMGA2	<i>High-mobility-group protein AT-hook 2</i>
HotairM1	<i>HOXA transcript antisense RNA, myeloid-specific 1</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
hsa	<i>Homo sapiens</i>
ICM	<i>Inner cell mass</i>
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>
kb	Kilobasen
kDA	Kilo Dalton
KO	<i>knockout</i>
LB	Luria Broth
LIF	<i>Leukemia-inhibitory factor</i>
Linc	<i>Long intergenic non-protein coding RNA</i>
lncRNA	<i>Long non coding RNA</i>

LSD1	<i>Lysine demethylase 1</i>
LTBP3	<i>Latent transforming growth factor beta binding protein 3</i>
M	Mol
Malat1	<i>Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript1</i>
Map2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>
mascRNA	<i>Malat1-associated small cytoplasmic RNA</i>
MECP2	<i>Methyl-CpG binding protein 2</i>
MEF	<i>Murine embryonic fibroblasts</i>
MIB1	<i>Mind bomb 1</i>
min	<i>Minuten</i>
miR/miRNA	microRNA
ml	Milliliter
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
Mmu	<i>Mus musculus</i>
MsiI	<i>Musashi1</i>
Myc	<i>Myelocytomatosis oncogene</i>
NCBI	The National Center for Biotechnology and Information
ncRNA	<i>Non coding RNA</i>
NEAT1	<i>Nuclear-enriched abundant transcript 1</i>
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NeuN	<i>Neuronal nuclear protein</i>
NF-YA	<i>Nuclear factor Y subunit alpha</i>
NIH	National Institute of Health
NPC	<i>Neuronal precursor cell/Neuronale Vorläuferzelle</i>
NRSF	<i>Neuron-restrictive silencer factor</i>
NSC	Neuronale Stammzellen
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
OCT4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
p16 ^{INK4A}	<i>Cycline-dependent kinase inhibitor 2a</i>
p19 ^{ARF}	<i>Cycline-dependent kinase inhibitor 2a alternative reading frame</i>
p21 ^{CIP1}	<i>Cycline-dependent kinase inhibitor 1</i>
PABPC	<i>Polyadenylate binding protein</i>

PAM	<i>Protospacer adjacent motiv</i>
PAN2/3	<i>Poly(A) specific ribonuclease subunit 2/3</i>
PANDA	<i>p21-associated ncRNA DNA damage activated</i>
Pax6	<i>Paired Box Protein 6</i>
PBS	Phosphatgepufferte Sazlösung
PC2	<i>Proprotein convertase 2</i>
PCM1	<i>Pericentriolar material 1</i>
PCP2	<i>Purkinje cell protein 2</i>
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI ₃ K/AKT	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B</i>
piRNA	<i>Piwi interacting RNA</i>
PLC _γ	<i>Phospholiase C_γ</i>
PolII	RNA Polymerase II
Pou3f3	<i>POU domain class 3 transcription factor 3</i>
PPAR _γ	Peroxisime proliferator-activated receptor gamma
PRC	<i>Polycomb repressive complex</i>
pre-miRNA	<i>Precursor microRNA</i>
pri-miRNA	Primäre microRNA
qRT-PCR	<i>Quantitative real time PCR</i>
RAS/MAPK	<i>Rat sarcoma/mitogen-activated protein kinase</i>
RE1	<i>repressor element 1</i>
REST	<i>RE-1 silencing transcription factor</i>
REX1	<i>Reduced expression 1</i>
RGC	Radiale Gliazellen
RISC	<i>RNA-induced silencing compex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
RNase	Ribonuklease
rno	<i>Rattus norvegicus</i>
RNU6	<i>RNA U6 small nuclear</i>
rpm	<i>Rounds per minute / Umdrehungen pro Minute</i>
SA	Seneszenz-assoziiert

SDS	Sodiumdodecylsulfat
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SIX3	<i>Sine oculis homeobox 3</i>
SIX3OS	<i>Sine oculis homeobox 3 opposite strand</i>
SMO	<i>Smoothened homolog</i>
SOB	<i>Super optimal broth</i>
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
SOX2	<i>SRY-Box transcription factor 2</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA Puffer
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRBP	<i>Tandem repeat binding protein</i>
tRNA	Transfer-RNA
Tubb3	β -III-Tubulin
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
WNT	<i>Wingless-related integration site</i>
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
XIST	<i>X-inactive-specific transcript</i>
XPO	Exportin
XRN1	<i>5'-3' exoribonuclease 1</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
μ l	Mikroliter

12 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Sauer M*, Was N*, Ziegenhals T, Wang X, Hafner M, Becker M, Fischer U.
The miR-26 family regulates neural differentiation-associated microRNAs and mRNAs by directly targeting REST. *Journal of Cell Science*, 2021

Teile dieser Arbeit werden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Was N, Sauer M, Fischer U, Becker M.
lncRNA Malat1 and miR-26 cooperate in the regulation of neuronal progenitor cell proliferation and differentiation (Akzeptiert im *Journal RNA*, Publikation ausstehend)

13 Danksagungen

Hiermit möchte ich meinen herzlichsten Dank an alle Personen aussprechen, die mich bei diesem Projekt und der Fertigstellung meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Es war eine Reise über Stock und Stein und ohne euer aller Unterstützung nicht möglich gewesen.

An erster Stelle möchte ich mich hier bei Prof. Dr. Albrecht Müller bedanken, der mir ermöglicht hat in seinem Labor an diesem Projekt arbeiten zu dürfen.

Ein großer Dank geht an PD Dr. Matthias Becker für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit, viele wissenschaftliche Diskussionen, die praktische Hilfestellung im Labor und für die gemeinsame Zeit die wir mit diesem Projekt verbringen durften.

Prof. Dr. Utz Fischer möchte ich sowohl für die Übernahme der Betreuung und der Begutachtung meiner Doktorarbeit als auch für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung innerhalb des Projekts danken.

Ich danke Prof. Dr. Manfred Alsheimer, der sich als Betreuer und Gutachter für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Mark Sauer, ohne dessen Vorarbeiten dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre. Danke für die tolle Zusammenarbeit, die wissenschaftliche Hilfestellung und die vielen wissenschaftlichen, als auch nicht wissenschaftlichen Diskussionen.

Danke an alle Mitarbeiter der AG Müller/Becker, die mich in den Jahren begleitet haben. Vroni und Olga danke ich für die großartige Unterstützung im Labor. Danke an Laura und Sammy das ihr immer da wart. Sabrina danke ich für die tolle Mitarbeit am Projekt während der Arbeit an ihrer Bachelorarbeit.

Ein großer Dank geht auch an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gessler, die uns beim Umzug unterstützt haben. Hier möchte ich mich vor allem bei Lisa für die Hilfe in der Zellkultur bedanken sowie bei Balász und Nadja für die tolle Zeit.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während meines Studiums immer unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Patrick, der immer hinter mir gestanden, mich unterstützt und mir vor allem in chaotischen Zeiten immer den Rücken freigehalten hat. Ohne ihn wäre das alles nicht möglich gewesen.

14 Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Die Rolle der nicht-kodierenden RNAs miR-26 und Malat1 bei der in vitro Differenzierung zu Neuronen**“, 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 declare that my thesis entitled: „**The role of the non-coding RNAs miR-26 and Malat1 during in vitro neuronal differentiation**” 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 verify that the thesis has not 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.

Würzburg, den _____

Signature PhD-student