

ABBREVIATIONS

3'UTR	3' untranslated region
α MEM	α modified form of Eagle's minimal essential medium
Ago1, 2	Argonaute proteins 1 or 2
APS	Ammonium phosphate sulfate
ATP	Adenosine 5'-triphosphat
BCA	Bicinchoninic acid
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
Ci	Curie
CMV	Cytomegalovirus
CNS	Central nervous system
CTP	Cytosine 5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	Deoxynucleotidetriphosphat
dsRBD	Double-stranded RNA binding domain
DTT	1,4-dithiothreitol
EB	Embryoid bodies
EDTA	Ethylenediamine-tetraaceticacid
EC cells	Embryonal carcinoma cells
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ES cells	Embryonic stem cells
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FBS	Fetal bovine serum
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
G418	Geneticin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
HEK293	Human Embryonic Kidney cells
HRP	Horseradish Peroxidase
kDa	Kilodalton

LCS	<i>let-7</i> complementary site
LIF	Leukemia inhibitory factor
mAb	Monoclonal antibody
MAP2	Microtubule-Associated Protein 2
miRNA	microRNA
NeuN	Neuron-specific Nuclear protein
nt	Nucleotide
ORF	open reading frame
P19GM	P19 growth medium
P19IM	P19 induction medium
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyde
Pol II/ pol III	Polymerase II or III
RIIID	RNase III domain
RA	Retinoic acid
RISC	RNA induced silencing complex
RT	Room temperature
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Standard error of the mean
snRNA	Small nuclear RNA
SSC	Solution of sodium chloride and sodium citrate
SSPE	Saline-sodium phosphate-EDTA
TBE Buffer	Tris-borate-EDTA buffer
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TRBP	The human immunodeficiency virus transactivating response RNA binding protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Units
UTP	Uracil 5'-triphosphat

SUMMARY

In the present study the role of microRNAs (miRNAs) in the control of developmental timing in the mammalian nervous system and in the specification of neural cell fate was investigated. miRNAs are a recently discovered class of small, 21-22 nt, regulatory RNA molecules. They inhibit translation of target mRNAs by binding to sites of imperfect anti-sense complementarity in 3' untranslated regions (UTRs). Many miRNAs are evolutionarily conserved, which has allowed their identification in various species. In the model organisms *C. elegans* and *D. melanogaster*, miRNAs regulate genes involved in fundamental developmental processes including cell proliferation, apoptosis, and the timing of cell fate decisions in the CNS (e.g. *let-7* and *lin-4* for *C. elegans* and *Bantam* and *mir-14* for *D. melanogaster*). Hundreds of miRNA genes are expressed in humans and mice, and a substantial fraction of these genes has been identified in neural cells. Although the biological functions of most miRNAs are unknown, miRNAs are predicted to regulate about 30% of the human genes. Disruption of miRNA biogenesis is definitely associated with severe disturbances in neural development in model organisms and most likely with human clinical syndromes (Fragile X Mental Retardation Syndrome, Spinal Motor Atrophy, DiGeorge Syndrome). This fact, together with the well established role of miRNA genes in *C. elegans* and *D. melanogaster* development, points to the relevance of this newly emerging field for the understanding of developmental disorders.

In this work the regulation of a set of highly expressed neural miRNAs, and in particular the *let-7* family during mouse brain development and neural differentiation of embryonic stem (ES) cells has been studied. Significant differences were observed in the onset and magnitude of induction for individual miRNAs. miRNAs were strongly induced during neural differentiation of ES cells, suggesting the validity of the stem cell model for studying miRNA regulation in neural development. In undifferentiated ES and embryonal carcinoma (EC) cells, both the *let-7* primary transcript and precursor were detected in the absence of mature miRNA accumulation, suggesting an important post-transcriptional component in the regulation of *let-7* expression. An *in vitro* assay for precursor processing revealed developmental regulation of *let-7* as well as *mir-128* and *mir-30* maturation. Precursor processing activity increased during neural differentiation of ES and EC cells and was greater in primary neurons compared to astrocytes. Neuron-specific binding activity of pre-miRNAs was shown by antibody challenge to contain the Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP). As further evidence for developmental regulation of the miRNA processing pathway, it was shown that Argonaute proteins and FMRP failed to localize to cytoplasmic foci identified as processing bodies (P-bodies) in self-renewing ES or EC cells.

Comparing expression in cultures of embryonic neurons and astrocytes, marked lineage specificity was found for many of the miRNAs studied. Two of the most highly expressed miRNAs in adult brain (*mir-124*, *mir-128*) were preferentially expressed in neurons. In contrast, *mir-23*, a miRNA previously implicated in neural specification, was restricted to astrocytes. Lineage specificity was further explored using reporter constructs for three miRNAs of particular interest (*let-7*, *mir-125* and *mir-128*). miRNA-mediated suppression of these reporters was observed after their transfection into neurons but not astrocytes. Furthermore, reporter constructs containing *let-7* or *mir-125* target sites were downregulated in EC-derived neurons, reflecting the upregulation of miRNAs during neuronal development. In addition, mRNA target degradation was observed in response to *let-7* and *mir-125*, opening new questions regarding the mechanism of miRNA-mediated mRNA silencing. Disrupting the interaction of *let-7* and *mir-125* with their target genes during neural differentiation led to an increase in astrocyte marker expression (GFAP and A2B5), implicating *let-7* and *mir-125* in neuronal lineage commitment. Finally, a functional *let-7/mir-125* response element in the 3' UTR of a mouse *lin-41* homolog was identified, revealing a conserved *let-7*/target gene interaction that is active during early neural differentiation.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser vorgelegten Studie sollte der Einfluss von microRNAs (miRNAs) auf die zeitspezifische Entwicklung des Nervensystems sowie die neuronale Spezifizierung von Stammzellen untersucht werden. miRNAs gehören zu einer kürzlich entdeckten Klasse regulatorischer RNA-Moleküle mit einer Länge von ca. 22 NT. Diese inhibieren die Translation durch unvollständig komplementäre Bindung an 3'-gelegenen untranslatierten Bereich (3'UTR) ihrer Ziel-mRNAs. Viele miRNAs und deren Zielregionen sind hochkonserviert und konnten in einer Vielzahl von Arten nachgewiesen werden. Anhand von entwicklungsbiologischen Studien an *C. elegans* und *D. melanogaster*, wurde gezeigt, dass miRNAs an fundamentalen, entwicklungspezifischen Prozessen wie Proliferation, Apoptose sowie an der zeit- und gewebespezifischen Differenzierung des zentralen Nervensystems (ZNS) beteiligt sind (z.B. *let-7* und *lin-4* bei *C. elegans* sowie *Bantam* und *mir-14* bei *D. melanogaster*). Beim Menschen und der Maus konnten über hundert miRNAs identifiziert werden, von denen eine beträchtliche Anzahl im Nervensystem vorkommt. Obwohl die genaue biologische Funktion der meisten miRNAs noch unbekannt ist, wird angenommen, dass ca. 30% der proteincodierenden Gene von ihnen reguliert werden. Viele klinische Krankheiten wie z.B. Fragiles-X-Syndrom, Spinale Muskelatrophie, DiGeorge Syndrom und neurospezifische Entwicklungsstörungen sind u.a. auf eine defekte miRNA-Biogenese zurückzuführen. miRNA-Entwicklungsstudien an *C. elegans* und *D. Melanogaster* und die oben genannten Tatsachen weisen auf die Relevanz dieses neuen Forschungsgebiets für das Verständnis von Entwicklungsstörungen.

In dieser Arbeit wurden einige miRNAs untersucht, die eine starke neuralspezifische Expression während der Gehirnentwicklung und der neuralen Differenzierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) und embryonalen Karzinomzellen (EC-Zellen) der Maus zeigten. Es konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich des Expressionsstarts und der Expressionsstärke für einzelne miRNAs nachgewiesen werden. Da diese miRNAs während der neuralen Differenzierung von ES-Zellen stark exprimiert werden, empfiehlt sich das Stammzellenmodell für die Untersuchung der miRNA-Regulation in der neuralen Entwicklung. In undifferenzierten ES- und EC-Zellen konnten zwar das primäre *let-7* Transkript (*pri-let-7*) und das 70 NT lange Precursor-Transkript (*pre-let-7*), jedoch kaum reife *let-7* miRNA nachgewiesen werden. Dies weist auf wichtige, noch unbekannte posttranskriptionale regulatorische Komponenten für die Prozessierung der „reifen“ *let-7* miRNA hin. Weitere *in vitro* Studien über die posttranskriptionale Prozessierung der Precursor-miRNA zeigten, dass die Reifung von *let-7* sowie von *mir-128* und *mir-30* entwicklungspezifisch reguliert wird. Die Aktivität dieser Prozessierung steigt während der Neurdifferenzierung von ES und EC stark an. Diese Aktivität war in entstehenden primären Neuronen höher als in Astrozyten.

Durch Inkubation der *in vitro* Reaktion mit einem Antikörper gegen das Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) konnte eine neuronenspezifische Bindungsaktivität von pre-miRNAs an das FMRP nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte durch Antikörperfärbungen gezeigt werden, dass in undifferenzierten ES- und EC-Zellen Argonauteproteine und FMRP nicht in processing-Bodies (P-Bodies) vorhanden sind. Die oben genannten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die miRNA-Prozessierung während der Entwicklung reguliert wird.

Durch vergleichende Expressionsstudien zwischen embryonalen Neuronen und Astrozyten konnte gezeigt werden, dass viele miRNAs zelllinienspezifisch sind. Zum Beispiel werden die im adulten Gehirn am stärksten exprimierten miRNAs, *mir-124* und *mir-128*, bevorzugt in Neuronen exprimiert, dagegen *mir-23*, welches zunächst als neuralspezifische miRNA impliziert wurde, rein astrozytenspezifisch ist. Die Zelllinienspezifität und Funktionalität von drei miRNAs (*let-7*, *mir-125* and *mir-128*) wurde mittels GFP-Reporterkonstrukten untersucht. Ein schwaches GFP-Signal bzw. eine miRNA induzierte Hemmung der Translation konnte nach der Transfektion in Neuronen jedoch nicht in Astrozyten beobachtet werden. Des Weiteren konnte eine Inhibierung der Translation für *let-7*- und *mir-125*-Sensorstrukturen in EC-induzierten Neuronen gezeigt werden. Dies ist auf eine Aktivierung dieser miRNAs während der neuralen Differenzierung zurückzuführen.

Zusätzlich konnte hier eine Degradierung der mRNA von *let-7*- und *mir-125*-Zielgenen festgestellt werden, was neue Fragen hinsichtlich der miRNA induzierten "Stilllegung" von Zielgenen aufwirft. In einem anderen Versuch wurde die natürliche Interaktion von *let-7* und *mir-125* mit deren Zielgenen durch Überexpression von exogenen Sensorstrukturen verhindert. Das führte zu einer verstärkten Expression von Astrozyten-spezifischen Proteinen (GFAP und A2B5), was die Bedeutung von *let-7* und *mir-125* für die Differenzierung von neuralen Vorläuferzellen unterstreicht. Schließlich konnten hochkonservierte funktionelle *let-7*- und *mir-125* Bindestellen in der 3' UTR des Maus *lin-41* Homologs identifiziert werden. Diese Untersuchungen zeigen, dass konservierte *let-7*-Zielgen-Interaktionen während der frühe neuralen Differenzierung stattfinden.