

Abstract

Human embryonic development requires well-orchestrated cell fate programming controlled by gene regulatory networks. While the epigenetic factors, transcription factors, and signalling events that facilitate the cell fate decisions have been extensively studied, the role of RNA regulons, which form an overarching regulatory layer over gene regulatory processes, including RNA binding proteins, remain relatively underexplored. The regulatory role of RNA binding proteins (RBPs) is particularly critical for human cortical and cardiac development as key regulators of ribosome biogenesis and co-/post transcriptional processes. Many studies have studied and highlighted their contribution. However, the discovery of novel RBPs and their disease-causing mutations, along with new studies highlighting novel roles of previously studied RBPs, show that much remains to be explored.

The Chromosome 1 Open Reading Frame 131 (C1ORF131), a relatively uncharacterized protein, was classified as an RBP based on multiple high-throughput studies. Recent studies have shown its association with ribosome biogenesis, particularly the 40S subunit, and also on mitotic chromosomes. Variants in C1ORF131 have been associated with individuals with microcephaly-like syndrome and intellectual disability. Since ribosome biogenesis is one of the metabolically expensive developmental processes, the role of an uncharacterized RBP like C1ORF131 is underappreciated in human cortical development. In human pluripotent stem cells (hPSCs)-based directed differentiation system, C1ORF131 is expressed throughout the cortical development and localizes to the nucleolus. Loss of C1ORF131 leads to cell death in hPSCs. G<112A is a missense mutation from patients, which leads to the replacement of conserved aspartic acid residue at the 38th position to asparagine (D38N), associated with the microcephaly-like syndrome. To address the pathological role of C1ORF131-D38N in human cortical development, I generated iPSC lines using CRISPR/Cas9. Despite C1ORF131 being essential for hPSC survival, C1ORF131-D38N does not affect the growth dynamics in hPSCs. However, the mutant neural progenitor cells have reduced stage-specific markers, indicating problems in either specification or temporally misaligned specification of the critical progenitor stage. Moreover, C1ORF131-D38N shows distorted nucleolar sub-compartmental organization, with altered fibrillar center number and dense fibrillar component area. Enhanced UV crosslinking and immunoprecipitation (eCLIP) analysis of C1ORF131 in hPSCs

showed binding to ribosomal RNA (rRNA) loci, indicating its role in rRNA processing. Multiple proteins involved in rRNA processing were discovered as binding partners of C1ORF131, and C1ORF131-D38N abolished these interactions. As a result, C1ORF131-D38N background NPCs and cortical neurons show defective rRNA processing, leading to nucleolar stress and possibly developmental defects. The data suggests that C1ORF131 is a nucleolar RBP, a crucial regulator of pre-rRNA processing and ribosome biogenesis whose dysfunction leads to cortical developmental defects.

The RNA binding protein QKI belongs to the Signal Transduction and Activation of RNA (STAR) protein family. It is documented as a regulator of pre-mRNA splicing, especially in muscular and cardiac development. eCLIP data generated in our lab showed that the binding of QKI to QKI RNA-recognition element (UACUAACC) is predominantly found within the intronic regions. QKI targets are enriched for heart development, cytoskeleton organization, and cardiac conduction pathways. Specific mRNA targets of QKI, such as ACTN2, TPM1, and TTN, are mispliced by exon exclusion or intron inclusion in the absence of QKI. Modification of the QKI binding motif and 5' splice site strength shows the importance of the QKI function in the recognition and inclusion of crucial exons in the mature mRNA transcript. Thus QKI is a crucial RNA processing factor that sets the processing code for cardiac contractility during development.

This thesis provides key insights into the role of RBPs in cell fate decisions in embryonic development and disease.

Zusammenfassung

Die menschliche Embryonalentwicklung erfordert eine gut orchestrierte Programmierung des Zellschicksals, die durch genregulatorische Netzwerke gesteuert wird. Während die epigenetischen Faktoren, Transkriptionsfaktoren und Signalereignisse, die die Entscheidungen über das Zellschicksal erleichtern, umfassend untersucht wurden, ist die Rolle der RNA-Regulone, die eine übergreifende regulatorische Schicht über den genregulatorischen Prozessen bilden, einschließlich der RNA-bindenden Proteine, noch relativ wenig erforscht. Die regulatorische Rolle der RNA-bindenden Proteine (RBPs) ist besonders wichtig für die Entwicklung der menschlichen Kortikalis und des Herzens, da sie die Ribosomenbiogenese und ko-/posttranskriptionelle Prozesse maßgeblich regulieren. Viele Studien haben ihren Beitrag untersucht und hervorgehoben. Die Entdeckung neuartiger RBPs und ihrer krankheitsverursachenden Mutationen sowie neue Studien, die neue Rollen von bereits untersuchten RBPs aufzeigen, zeigen jedoch, dass noch viel zu erforschen ist.

Das Chromosom 1 Open Reading Frame 131 (C1ORF131), ein relativ uncharakterisiertes Protein, wurde auf der Grundlage mehrerer Hochdurchsatzstudien als RBP eingestuft. Jüngste Studien haben gezeigt, dass es mit der Ribosomen-Biogenese, insbesondere der 40S-Untereinheit, und auch mit mitotischen Chromosomen in Verbindung steht. Varianten in C1ORF131 wurden mit Personen mit Mikrozephalie-ähnlichem Syndrom und geistiger Behinderung in Verbindung gebracht. Da die Ribosomenbiogenese einer der stoffwechselintensivsten Entwicklungsprozesse ist, wird die Rolle eines uncharakterisierten RBP wie C1ORF131 in der menschlichen Kortikalentwicklung unterschätzt. In einem auf humanen pluripotenten Stammzellen (hPSCs) basierenden gerichteten Differenzierungssystem wird C1ORF131 während der gesamten kortikalen Entwicklung exprimiert und ist im Nukleolus lokalisiert. Der Verlust von C1ORF131 führt zum Zelltod in hPSCs. G<112A ist eine Missense-Mutation von Patienten, die dazu führt, dass der konservierte Asparaginsäurerest an der 38. Position durch Asparagin (D38N) ersetzt wird, was mit dem Mikrozephalie-ähnlichen Syndrom assoziiert ist. Um die pathologische Rolle von C1ORF131-D38N in der menschlichen kortikalen Entwicklung zu untersuchen, habe ich mit CRISPR/Cas9 iPSC-Linien erzeugt. Obwohl C1ORF131 für das Überleben von hPSCs essentiell ist, beeinträchtigt C1ORF131-D38N die Wachstumsdynamik in hPSCs nicht. Die mutierten neuronalen Vorläuferzellen weisen jedoch reduzierte stadienspezifische Marker auf, was

entweder auf Probleme bei der Spezifikation oder auf eine zeitlich falsch ausgerichtete Spezifikation des kritischen Vorläuferstadiums hinweist. Darüber hinaus zeigt C1ORF131-D38N eine verzerrte nukleoläre Subkompartiment-Organisation mit veränderter Anzahl von Fibrillenzentren und dichter Fibrillenkomponentenfläche. Die Analyse der verstärkten UV-Vernetzung und Immunpräzipitation (eCLIP) von C1ORF131 in hPSCs zeigte eine Bindung an ribosomale RNA-Loci (rRNA), was auf seine Rolle bei der rRNA-Verarbeitung hinweist. Mehrere an der rRNA-Verarbeitung beteiligte Proteine wurden als Bindungspartner von C1ORF131 entdeckt, und C1ORF131-D38N hob diese Interaktionen auf. Infolgedessen weisen NPCs und kortikale Neuronen mit C1ORF131-D38N-Hintergrund eine gestörte rRNA-Verarbeitung auf, was zu nuklearem Stress und möglicherweise zu Entwicklungsstörungen führt. Die Daten deuten darauf hin, dass C1ORF131 ein nukleolares RBP ist, ein entscheidender Regulator der prä-rRNA-Verarbeitung und der Ribosomen-Biogenese, dessen Fehlfunktion zu kortikalen Entwicklungsdefekten führt.

Das RNA-Bindeprotein QKI gehört zur Familie der STAR-Proteine (Signal Transduction and Activation of RNA). Es ist als Regulator des prä-mRNA-Spleißens dokumentiert, insbesondere in der Muskel- und Herzentwicklung. eCLIP-Daten aus unserem Labor haben gezeigt, dass die Bindung von QKI an das QKI-RNA-Erkennungselement (UACUAACC) vorwiegend in den intronischen Regionen zu finden ist. Die QKI-Targets sind in der Herzentwicklung, der Organisation des Zytoskeletts und den kardialen Erregungswegen angereichert. Spezifische mRNA-Targets von QKI, wie ACTN2, TPM1 und TTN, werden durch Exon-Exklusion oder Intron-Inklusion in Abwesenheit von QKI fehlgesplliced. Die Modifikation des QKI-Bindungsmotivs und der Stärke der 5'-Spleißstelle zeigt die Bedeutung der QKI-Funktion für die Erkennung und den Einschluss wichtiger Exons in das reife mRNA-Transkript. QKI ist also ein entscheidender RNA-Prozessierungsfaktor, der den Verarbeitungscode für die kardiale Kontraktilität während der Entwicklung festlegt.

Diese Arbeit liefert wichtige Erkenntnisse über die Rolle von RBPs bei Entscheidungen über das Zellschicksal in der Embryonalentwicklung und bei Krankheiten.