

miRNA-503/322 cluster regulates splicing of *Ccne1* gene by modulating the expression of a serine and arginine rich splicing factor 1 (SRSF1) to promote cardiomyocyte quiescence

NARASIMHA SWAMY TELUGU

ABSTRACT

Understanding the mechanism of cardiac differentiation and maturation may lead to better approaches for stimulating heart regeneration after injury. MicroRNAs (miRNAs) are small, 22 nucleotides long, non-protein-coding RNAs that negatively regulate gene expression at the posttranscriptional level. Some of them are implicated in the regulation of genes that are essential for cardiomyocyte (CM) proliferation and differentiation. Using global miRNA profiling, we found that the mammalian-specific miR-322/503 cluster is highly expressed in immature CMs derived from murine embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs). *In vivo*, their expression levels were highest in late fetal and neonatal murine hearts but very low in the adult heart. Transient knockdown of these miRNAs using miRNA-antagomirs and stable knock-out generated by CRISPR/Cas9 system resulted in increased proliferation of murine iPSC-derived CMs. *In silico* miRNA target prediction analysis, pathway analysis, quantitative RT-PCR and immunoblotting analyses revealed that these miRNAs regulate the expression of essential genes involved in the control of a cell cycle, transcription and RNA splicing. We showed that cell cycle genes like *Ccne1*, *Cdc25a*, *Chek1* and splicing regulators *Srsf1*, *Srsf3*, *Srfs7* are direct targets for the miR-322/503 cluster. We further found that the alternative spliced isoform of CCNE1 that

is lacking the exons 3-8 ($\Delta 3/8$ -CCNE1), known to reduce cell proliferation in other biological systems, is significantly down-regulated in miRNA knock-out iPSC-derived CMs. Hence, our data indicate that miR-322/503 promote the quiescent state of iPSC-derived CMs *in vitro* by, at least in part, directly repressing the expression of a full-length proliferation-stimulating isoform of CCNE1 as well as by indirectly increasing the expression of the alternative proliferation-inhibiting $\Delta 3/8$ -CCNE1 isoform as a consequence of direct miR-mediated downregulation of SRSF expression, and the other is the reciprocal relationship between miR-322/-503 and expression of Connexin 43 gene which is known for its role in CM proliferation, maturation, and disease. The same reciprocal relationship was observed in CMs and neurons derived from Huntington's disease-specific iPSCs, suggesting the potential application of this finding in developing a biomarker and therapeutic target to track and treat neuromuscular diseases. This study is one of the proofs of concept for the application of iPSCs and CRISPR/Cas9 to understand the biological roles of miRNAs in CMs physiology.

Thesis Highlights

- miRNA-322/503 highly is highly expressed in murine ESC- and iPSC-derived CMs.
- By establishing a relationship between miRNA and splicing regulation, we revealed another layer of cell cycle control, particularly in fetal stage CMs.
- Deletion of miR-322/503 down regulates GJA1 expression.
- Down-regulation of miR-322/503 and GJA1 gene expression in Huntington disease patient-specific CMs and neurons.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Verständnis des Mechanismus der kardialen Differenzierung und Reifung kann zu besseren Ansätzen zur Stimulierung der Herzregeneration nach Verletzung führen. MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, 22 Nukleotide lange, nicht-Protein-kodierende RNAs, die die Genexpression auf der posttranskriptionellen Ebene negativ regulieren und an der Regulation von Genen beteiligt sind, die für die CM-Proliferation und -Differenzierung essentiell sind. In jüngster Zeit haben wir mit der globalen miRNA-Profilierung eine hohe Expression von säugetierspezifischen miR-Clustern bekannt, die als miR-322/503 in unreifen CMs bekannt sind, die aus murinen embryonalen Stammzellen (ESCs) und induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) stammen. In vivo waren ihre Expressionsniveaus am höchsten in späten fötalen und neonatalen murinen Herzen, aber sehr niedrig im erwachsenen Herzen. Das vorübergehende Abklingen dieser miRNAs mit miRNA-antagomeren und dem stabilen Knock-out mittels CRISPR-Cas9-System führte zu einer erhöhten Proliferation von iPSC-abgeleiteten CMs. In silico miRNA-Zielvorhersageanalyse zeigte die Pathway-Analyse, die quantitative RT-PCR- und Immunoblotting-Analysen, dass diese miRNAs die Expression wichtiger Gene, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, regulieren und die verknüpften Wege spleißen. Wir haben gezeigt, dass Zellzyklus-Gene wie *Ccne1*, *Cdc25a*, *Chek1* und Splicing Regulatoren *Srsf1*, *Srsf3*, *Srfs7* direkte Ziele für den miR-322/503-Cluster sind. Wir fanden ferner, dass die alternativ gespleißte Isoform von CCNE1, die die Exons 3-8 ($\Delta 3/8$ -CCNE1) fehlt; Bekannt, um die Zellproliferation in anderen biologischen Systemen zu reduzieren, ist in miRNA-Knock-out-iPSC-abgeleiteten CMs signifikant herunterreguliert. Daher zeigen unsere Daten, dass miR-322/503 den Ruhezustand von iPSC-abgeleiteten CMs in vitro fördern. Zumindest zum Teil durch die direkte Unterdrückung der Expression einer Vollängen-

Proliferations-stimulierenden Isoform von CCNE1 sowie indirekt durch Erhöhung der Expression der alternativen proliferations-hemmenden $\Delta 3/8$ -CCNE1-Isoform als Folge des direkten miR-vermittelten Herunterregulierung der SRSF-Expression. Abgesehen davon haben wir zwei weitere Rollen des miR-322/503-Clusters in CMs gefunden: Ein weiterer Befund unserer Studie ist die wechselseitige Beziehung zwischen miR-322/503 und Connexin 43 Expression (bekannt für seine Rolle CMs Proliferation, Die gleiche wechselseitige Beziehung, die bei der neuromuskulären Erkrankung (Huntington) beobachtet wurde, deutet auf die mögliche Anwendung dieses Befundes bei der Entwicklung eines Biomarkers und eines therapeutischen Ziels hin, um neuromuskuläre Erkrankungen zu verfolgen und zu behandeln.