



RNA regulons during heart development and regeneration

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Wenjie Yao

aus Hebei, China

1 Abstract

Cardiac development requires well-orchestrated cell fate programming, which is controlled by gene regulatory networks. While the epigenetic factors, transcription factors, and signaling events facilitating cell fate decisions have been intensively studied, the transcript-centric mechanisms remain relatively unexplored. This transcript-centric regulation is particularly critical for the functional specification during cardiac development, where specific sarcomeric proteins are known to undergo selective and specialized splicing events enabling cardiac contractility. RNA binding proteins (RBPs), as key co-/post-transcriptional regulators, are dynamically expressed during cardiogenesis. However, our understanding of the contributions of RBPs to heart development is minimal.

The RNA binding protein QKI belongs to the Signal Transduction and Activation of RNA (STAR) protein family and is documented as a regulator of pre-mRNA splicing and translation. The functional studies of mice and fruit fly suggest that QKI may have an essential, yet underappreciated, role in cardiovascular development. In the human embryonic stem cells (hESCs)-based directed differentiation system, QKI is a nuclear RBP significantly upregulated in cardiac mesoderm cells and peaks its expression in cardiac progenitors. Despite its significant abundance, depletion of QKI does not impair the pluripotent state of hESCs and the ability of early germ layer commitment. However, the loss of QKI abolishes cardiac mesoderm induction. Moreover, impaired cardiac mesoderm induction upon QKI depletion can be compensated by the modulation of WNT signaling, implying a potential interplay of QKI with WNT in cardiac mesoderm commitment. More importantly, QKI is crucial for myofibril formation and contraction of the cardiomyocytes.

Enhanced UV crosslinking and immunoprecipitation (eCLIP) analysis of QKI highlighted that the presence of a distinct QKI RNA-recognition element (UACUAACC) is predominantly found within the intronic regions (63.7% of binding sites). Curiously, the core QKI binding motif is a branch point element, which can also serve as the splicing acceptor sequence for the minor spliceosome. Furthermore, QKI targets are enriched for heart development, cytoskeleton organization, and cardiac conduction pathways. Taken together, the data suggest that QKI is a

crucial RNA processing factor that sets the transcript processing code for cardiac commitment and contractility during development.

During embryogenesis, the cellular fates remain restricted to keep the integrity and function of the tissue/organ that it constitutes. Importantly, each cell type harbors a degree of plasticity, which defines its ability for regenerative repair. In contrast to mammalian hearts, lower vertebrates, such as zebrafish, can regenerate the injured heart via resetting CM identity to the earliest embryonic stages. Unfortunately, our knowledge on the mechanistic basis of cellular reprogramming that enables cardiac regeneration is limited.

To bridge this apparent gap-of-knowledge, firstly, a high resolution, comprehensive temporal transcriptomic map of zebrafish cardiac regeneration was generated. Secondly, a computational approach integrating the expression dynamics of known regeneration regulators was applied to set key landmarks potentially determining regeneration. Next, by integrating the miRNA profiles, a miRNA-centric regulatory network was built. The analysis highlighted two key interdependent molecular nodes mediating de-differentiation and re-differentiation of cardiomyocytes. Central to each of these nodes were a set of novel and uncharacterized microRNAs, which were predicted *in silico* to target the key RBPs, cardiac TFs, and sarcomeric genes. In conjunction with bioinformatics functional prediction and qPCR analysis, dre-miR-429a, was identified as a novel component of the cardiac pro-regenerative network in zebrafish. Additionally, exogenous manipulation of dre-miR-429a in heart post-heart injury further validated that dre-miR-429a is essential for inducing cardiomyocyte proliferation during cardiac regeneration. Taken together, inferring from the bioinformatics analysis and functional study, dre-miR-429a contributes to cardiomyocyte proliferation during heart regeneration. Moreover, the bioinformatics strategy developed to mine and build hierarchical regulatory nodes will be useful for understanding any cell-lineage transition during development, homeostasis, as well as in diseases.

Collectively, this thesis provides key insights into the role of mRNA processing factors in cell fate commitment and functional specialization in the heart during development and regeneration.

Zusammenfassung

Die Herzentwicklung erfordert eine gut koordinierte Programmierung des Zellschicksals, die durch Genregulationsnetzwerke gesteuert wird. Die Regulation der Genexpression beim Übergang der Zellschicksalen in der Entwicklung von Herzzellen erfolgt auf vielen Ebenen, einschließlich der Transkriptions- und Posttranskriptionsregulation. Während die epigenetischen Faktoren, Transkriptionsfaktoren und Signalereignisse, die die Entscheidung über das Zellschicksal erleichtern, intensiv untersucht wurden, blieben die transkriptzentrierten Mechanismen relativ unerforscht. Diese transkriptzentrierte Regulation ist besonders kritisch für die funktionelle Spezifikation während der Herzentwicklung, bei der bekannt ist, dass bestimmte sarkomerische Proteine selektiven und spezialisierten Spleißereignissen unterliegen, die eine Kontraktilität des Herzens ermöglichen. RNA-Bindungsproteine (RBPs) als wichtige posttranskriptionelle Regulatoren werden während der Kardiogenese dynamisch exprimiert. Unser Verständnis der Beiträge von RBPs zur Herzentwicklung ist jedoch minimal.

Das RNA-Bindungsprotein QKI gehört zur Proteintransduktions- und Aktivierungsproteinfamilie (STAR) und ist als Regulator des Prä-mRNA-Spleißens und der Translation dokumentiert. Die funktionellen Studien an Mäusen und Fruchtfliegen legen nahe, dass QKI eine wesentliche, jedoch unterschätzte Rolle bei der kardiovaskulären Entwicklung spielen könnte. Um die Rolle und den molekularen Mechanismus von QKI bei der Herzentwicklung zu bestimmen, wird ein auf humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) basierendes gerichtetes Differenzierungssystem verwendet, das die Herzentwicklung rekapituliert. QKI ist ein nukleares RBP, das am Tag 4 (D4) signifikant hochreguliert ist und an D6 einen Spitzenwert aufweist. Dies ist ein wichtiges Zeitfenster für die Induktion von Herzmesoderm und Herzvorläufern. Trotz seiner signifikanten Häufigkeit beeinträchtigt die Abwesenheit von QKI nicht die Pluripotenz von hESCs und die Fähigkeit zur Bildung der Keimblätter. Der Verlust von QKI hebt jedoch die Induktion des Herzmesoderms auf. Darüber hinaus kann eine beeinträchtigte Induktion des Herzmesoderms in Abwesenheit von QKI durch die Modulation der WNT-Signalübertragung kompensiert werden, was ein mögliches Zusammenspiel von QKI mit WNT bei der Schicksalsbindung von Herzmesodermzellen impliziert. Noch wichtiger ist, dass QKI entscheidend für die Bildung und Kontraktion von Myofibrillen der Kardiomyozyten ist.

Eine verstärkte Analyse mittels UV-Crosslinking und Immunpräzipitation (eCLIP) von QKI zeigte, dass das Vorhandensein eines bestimmten QKI-RNA-Erkennungselements (UACUAACC) überwiegend in intronischen Regionen (63,7% der Bindungsstellen) gefunden wird. Interessanterweise ist das Kern-QKI-Bindungsmotiv ein Verzweigungspunktelement, das auch als Spleißakzeptorsequenz für das kleine Spleißosom dienen kann. Darüber hinaus sind QKI-Ziele für die Herzentwicklung, die Organisation des Zytoskeletts und angereichert Herzleitungswege. Zusammengefasst könnte QKI ein entscheidender RNA-Verarbeitungsfaktor sein, der den Transkriptverarbeitungscode für das kardiale Engagement und die Kontraktilität während der Entwicklung festlegt.

Während der Embryogenese bleiben die zellulären Schicksale eingeschränkt, um die Integrität und Funktion des Gewebes / Organs, aus dem es besteht, aufrechtzuerhalten. Wichtig ist, dass jeder Zelltyp einen Grad an Plastizität aufweist, der seine Fähigkeit zur regenerativen Reparatur definiert. Im Gegensatz zu Säugetierherzen können niedere Wirbeltiere wie Zebrafische das verletzte Herz regenerieren, indem sie die CM-Identität auf die frühesten embryonalen Stadien zurücksetzen. Leider ist unser Wissen über die mechanistischen Grundlagen der zellulären Reprogrammierung, die eine Herzregeneration ermöglicht, begrenzt.

Um diese offensichtliche Wissenslücke zu schließen, wurde zunächst eine hochauflösende, umfassende zeitliche transkriptomische Karte der Herzregeneration von Zebrafischen erstellt. Zweitens wurde ein rechnerischer Ansatz angewendet, der die Expressionsdynamik bekannter Regenerationsregulatoren integriert, um wichtige Orientierungspunkte zu setzen, die möglicherweise die Regeneration bestimmen. Als nächstes wurde durch Integration der miRNA-Profile ein miRNA-zentriertes regulatorisches Netzwerk aufgebaut. Die Analyse hob zwei wichtige voneinander abhängige molekulare Knoten hervor, die die De-Differenzierung und Re-Differenzierung von Kardiomyozyten vermitteln. Zentral für jeden dieser Knoten war eine Reihe neuer und nicht charakterisierter microRNAs, von denen *in silico* vorhergesagt wurde, dass sie auf die wichtigsten RBPs, Herz-TFs und sarkomerischen Gene abzielen. In Verbindung mit der funktionellen Vorhersage der Bioinformatik und der qPCR-Analyse wurde dre-miR-429a als neuartige Komponente des pro-regenerativen Herznetzwerks im Zebrafisch identifiziert. Darüber hinaus bestätigte die exogene Manipulation von dre-miR-429a bei Herz-Verletzungen

weiter, dass dre-miR-429a für die Induktion der Kardiomyozyten-Proliferation während der Herzregeneration essentiell ist. Zusammengenommen trägt dre-miR-429a, basierend auf der Bioinformatik-Analyse und Funktionsstudie, zur Proliferation von Kardiomyozyten während der Herzregeneration bei. Darüber hinaus wird die Bioinformatik-Strategie, die entwickelt wurde, um hierarchische regulatorische Knoten abzubauen und aufzubauen, nützlich sein, um jeden Übergang der Zelllinie während der Entwicklung, der Homöostase sowie bei Krankheiten zu verstehen.

Insgesamt liefert diese Arbeit wichtige Einblicke in die Rolle von mRNA-Prozessierungsfaktoren bei der Bindung des Zellschicksals und der funktionellen Spezialisierung im Herzen während der Entwicklung und Regeneration

