

Jessica Gabler

Dr. sc. hum.

Differenzierungs-abhängige und Hypertrophie-assoziierte Regulation von microRNAs während der *in vitro* Chondrogenese Mesenchymaler Stromazellen

Fach/Einrichtung: Orthopädie

Doktormutter: Prof. Dr. rer. biol. hum. Wiltrud Richter

Degenerative Gelenkerkrankungen stellen ein großes medizinisches und sozioökonomisches Problem dar, da die endogene Reparatur des Knorpelgewebes aufgrund der fehlenden Gewebedurchblutung und des geringen mitogenen Potenzials der Knorpelzellen stark limitiert ist. Die Entwicklung MSC-basierter Tissue-Engineering-Konstrukte zur Regeneration des beschädigten Knorpelgewebes bietet einen vielversprechenden Therapieansatz. Unter Verwendung gängiger chondrogener Differenzierungsprotokolle wird eine Entwicklung ausgelöst, die der transienten embryonalen Knorpelentstehung weitgehend entspricht. Die größte Hürde für den klinischen Einsatz von MSC-basierten Tissue-Engineering-Konstrukte stellt die Instabilität der *in vitro* generierten Chondrozyten dar. Neben knorpel-assoziierten Markern induziert TGF- β als chondrogener Stimulator auch die Expression von fibrösen (Kollagen Typ I) und hypertrophen Markern (Kollagen Typ X, ALP). Um die unerwünschte Mineralisierung der Tissue-Engineering-Konstrukte nach Transplantation langfristig zu verhindern, müssen die molekularen Mechanismen der hypertrophen Differenzierung von MSC besser verstanden werden um unerwünschte Regulationsmechanismen gezielt zu unterbinden. Bisherige Studien, die vorwiegend die mRNA- und Protein-Ebene untersuchten, erbrachten zahlreiche vielversprechende Lösungsansätze, erreichten aber noch nicht das Ziel eines stabilen artikulären Phänotyps. Seit der Entdeckung von miRNAs hat sich das Verständnis für viele physiologische Prozesse grundlegend verbessert. Daher war das Ziel dieser Arbeit, mithilfe von miRNAs zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der chondrogenen *in vitro* Differenzierung von humanen MSC beizutragen.

Zu Beginn wurde mithilfe von molekularbiologischen, biochemischen und histologischen Methoden sichergestellt, dass Zellpopulationen der gewünschten Entwicklungsstadien die Sphäroid-Kultur an definierten Tagen der chondrogenen *in vitro* Differenzierung dominierten. Anschließend wurde eine miRNA Array-Analyse von drei chondrogen differenzierten MSC Populationen für 1205 humane miRNAs durchgeführt. Insgesamt wurden 553 verschiedene miRNAs in chondrogen differenzierten humanen MSC im Verlauf der *in vitro* Differenzierung exprimiert, von denen ein Drittel (169 miRNAs) signifikant im Verlauf der *in vitro* induzierten Chondrogenese reguliert wurden. Eine hierarchische Cluster Analyse dieser

169 miRNAs und die Baumstruktur des zugehörigen Dendrogramms zeigten eindeutig, dass jedes untersuchte Reifestadium durch ein charakteristisches miRNA Profil gekennzeichnet war, das sich deutlich vom Expressionsprofil der jeweils zeitlich angrenzenden Entwicklungsstadien abgrenzen ließ. Darüber hinaus wurden Stadien-spezifische miRNAs für vier der fünf untersuchten Entwicklungsstadien gefunden sowie signifikant regulierte miRNAs zwischen aufeinanderfolgenden Reifestadien und über den gesamten Entwicklungsverlauf identifiziert.

Zur Identifizierung Hypertrophie-assoziiierter miRNAs wurden die miRNA Expressionsspiegel von hypertrophen Chondrozyten mit re-differenzierten artikulären Chondrozyten verglichen. Die direkte Gegenüberstellung der Expressionsspiegel von 8 untersuchten miRNAs zeigte, dass hsa-miR-100, hsa-miR-181a, hsa-miR-210, hsa-miR-218 und hsa-miR-221 signifikant stärker in hypertrophen Chondrozyten exprimiert wurden als in re-differenzierten artikulären Chondrozyten. Für diese miRNAs wurde anschließend *in silico* mithilfe von drei ausgewiesenen Datenbanken nach bekannten Hypertrophie-assoziierten Zieltranskripten gesucht. Letztendlich konnte für hsa-miR-218 aus der Liste putativer Zielmoleküle drei vielversprechende und essenzielle Hypertrophie-assoziierte Gene (COL10A1, MEF2C und RUNX2) extrahiert werden. Unter Verwendung des im Rahmen dieser Doktorarbeit im Labor etablierten miRNA-mRNA Interaktionsnachweises wurde zum ersten Mal gezeigt, dass COL10A1 und MEF2C direkte Zielmoleküle von hsa-miR-218 sind. Hiermit gelang es, hsa-miR-218 als einen vielversprechenden potenziellen Negativ-Regulator der hypertrophen Differenzierung zu identifizieren.

Mit dieser Arbeit wurde somit eine umfassende Datenbasis generiert, die valide Schlussfolgerung über alle Entwicklungsstadien der chondrogenen *in vitro* Differenzierung von humanen MSC zulässt. In weiteren funktionellen Studien, kann nun untersucht werden, welche miRNA oder welches Set von miRNAs zur Optimierung der *in vitro* Chondrogenese, über die Inhibierung der fibrösen oder hypertrophen Entwicklung beitragen.