

Nicole Hecht

Dr. sc. hum.

## **Differenzielle Regulation von mechanosensitiven microRNAs nach anaboler und kataboler mechanischer Belastung von humanem Knorpelersatzgewebe**

Fach/Einrichtung: Orthopädie

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

Die degenerative Gelenkerkrankung Arthrose (*osteoarthritis*, OA), bei der große, flächige Knorpelareale teilweise bis zum darunterliegenden Knochen abgerieben sind, stellt ein großes medizinisches und sozioökonomisches Problem in der Gesellschaft dar, da die Knorpelheilung durch fehlende Durchblutung und die geringe Fähigkeit zur Zellteilung stark limitiert ist. Mechanische Stimulation spielt bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Knorpelgewebe eine essenzielle Rolle. Gleichzeitig trägt aber eine dauerhafte Fehlbelastung zur Entstehung einer OA bei. Die Mechanismen, wann mechanische Stimulation die Aufrechterhaltung von Knorpel unterstützt, und wann sie den Knorpelabbau begünstigt, sind nicht hinreichend verstanden. Derzeitig gibt es kaum Möglichkeiten zur frühzeitigen Entdeckung und möglicherweise Therapie von OA. Aufgrund der Assoziation spezifischer Expressionsprofile in Geweben und zu Krankheitsstadien, ihrer Stabilität und Sekretionsfähigkeit, besitzen miRs ein großes diagnostisches Potenzial, um sie als mögliche Surrogatmarker für die Stoffwechselaktivität von Chondrozyten im Knorpelgewebe nach mechanischer Belastung einzusetzen. Ziel dieser Arbeit war daher die Expression von mechanosensitiven miRs in der Belastungsantwort von Chondrozyten nach anaboler und knorpelerhaltender bzw. kataboler und gewebeabbauender dynamischer Kompression zu untersuchen, und zu überprüfen, ob eine Regulation spezifischer miR-Sets mit diesen Belastungsepisoden assoziiert werden kann. Um katabol-assoziierte mechanosensitive miRs als potenzielle neue und vielversprechende diagnostische Marker für OA zu etablieren, wurde ihre Expression zusätzlich in gesundem versus OA Knorpelgewebe analysiert.

Zu Beginn wurde mit Hilfe von histologischen, biochemischen und biomechanischen Methoden sichergestellt, dass das verwendete Modell zur Generierung von Knorpelersatzgewebe *in-vitro* qualitativ und quantitativ den Eigenschaften und Umgebungsparametern von nativem Knorpel nahezu gleichkam. Dadurch konnten Auswirkungen mechanischer Kompression auf Chondrozyten von zwei gegensätzlich wirkende Belastungsepisoden, die für eine physiologische versus pathologische Gelenksituation stehen können, als repräsentativ für natives Knorpelgewebe angesehen werden. Die Beurteilung einer anabolen bzw. katabolen Belastungsantwort der Chondrozyten erfolgte anhand Erhöhung bzw. Absenkung der Proteoglykanen-Neusynthese, sowie weiteren knorpelrelevanten Markermolekülen. Die globale Analyse

des miR Expressionsprofils nach anaboler mechanischer Stimulation identifizierte nur wenige mechanosensitive miRs mit geringen Regulationsfaktoren. Globale Analyse der miR-Spiegel nach kataboler mechanischer Belastung hingegen führte zu einer Modulation von 80 miRs, von denen 6 ausgewählte miRs eine spezifische Regulation nur dann aufzeigten, wenn eine negative Stressantwort in den Chondrozyten ausgelöst wurde. Weitere 3 miRs waren sowohl nach anaboler als auch kataboler dynamischer Kompression reguliert und wurden daher mit grundlegenden Mechanotransduktionsvorgängen verknüpft. Die mit einer allgemeinen Mechanosensitivität verknüpfte miR-221 zeigte in der Tat nur dann eine belastungsinduzierte Regulation, wenn der prominente Mechanotransduktionssignalweg ERK1/2 durch mechanische Stimulation aktiviert worden war. Für das neu entdeckte und verifizierte mechanosensitive miR-Set wurde *in-silico* nach putativen Zielmolekülen gesucht und ECM-Rezeptor-Interaktionen, Adhäsionsmoleküle, dem Hippo-Signalweg und der GAG-Neusynthese zugehörige Ziel-mRNAs herausgestellt. Durch eine globale Transkriptomanalyse nach kataboler mechanischer Stimulation wurden viele gegenläufige Regulationen von denselben mechanosensitiven miRs (miR-221, miR-1275, miR-4459) zu mechano-regulierten putativen Zielgenen ermittelt (CGNL1, BBS1, ADARB1), was für eine funktionell vernetzte und koordinierte Regulation der mechanosensitiven miRs spricht. Im Einzelnen gehörten die kollagenbindenden Integrine  $\alpha 10$  und  $\alpha 11$  zu putativen Zielmolekülen von miR-221 bzw. miR-1275 sowie die in Adhäsions- und Migrationsprozessen involvierten Moleküle CGNL1 und RHOJ. Eine gegenläufige Regulation von miR-1275 zu Integrin  $\alpha 11$  auf Proteinebene nach mechanischer Belastung spricht zudem für eine vielversprechende mögliche funktionelle Beteiligung dieser miR zu ECM-Zell-Interaktionen. MiR-1275 war zudem nicht nur mechanosensitiv, sondern differenziell zwischen gesunden und OA Knorpelgewebe exprimiert. Erstmals wurde in dieser Arbeit für humane Chondrozyten im Knorpelersatzgewebe eine differenzielle Regulation von mechanosensitiven miRs nach anaboler bzw. kataboler mechanischer Belastung identifiziert. Sie stellt heraus, dass miR Regulationen kein dominanter Mechanismus bei physiologischen Belastungsepisoden sind, aber dass nach kataboler mechanischer Stimulation miR Regulationen nachhaltig an den Auswirkungen dynamischer Kompression beteiligt sind, indem sie an der Modulation von Molekülen involviert sind, die Adhäsions- und Migrationsprozesse steuern. Damit scheinen miR Regulationen stärker als bisher wahrgenommen in die Regulation von Signalwegen in die Belastungsantwort von Chondrozyten, besonders bei schädlichen Belastungsepisoden, involviert zu sein. Zukünftige Studien sollten diese vielversprechende miR-mRNA-Interaktionen, die eine funktionelle Verbindung zu Integrinen und ECM Molekülen aufweisen, mittels Bindungsanalysen bestätigen. Zudem sollte das diagnostische Potenzial von mechanosensitiven miRs in verschiedenen OA Subtypen weiter untersucht werden, um sie als mögliche neue, frühzeitige Biomarker für Bewegungstherapien zur Behandlung einer OA einsetzen zu können.