

Abstract

Cartilage is formed from mesenchymal condensations and is gradually replaced by bone during endochondral ossification. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs, which regulate gene expression post-transcriptionally and may play an important role for cartilage-mediated bone formation. Previously, our group showed that *Mirc24* cluster-encoded miR-322 and miR-503 are increasingly expressed in the prehypertrophic and hypertrophic zone of the growth plate. Genetic inactivation of the *Mirc24* cluster specifically in cartilage manifests in a decrease of hypertrophic growth plate cartilage associated with less porous bone formation. Presumably, *Mirc24* cluster-encoded miR-322 and miR-503 regulate chondrocyte-derived factors that control cartilage-mediated bone formation and remodeling. The aim of this thesis was to identify molecular networks that are targeted by these miRNAs to promote the transformation of cartilage into bone and provide a molecular understanding of how the regulation of these networks results in less porous bone formation in *Mirc24* cluster-deficient mice.

First, the role of the *Mirc24* cluster-encoded miRNAs for extracellular matrix (ECM) production was analyzed. Transfection studies with miRNA mimic oligonucleotides demonstrated that increased miR-322 and miR-503 levels in primary epiphyseal chondrocytes suppress the production of several components of the cartilage matrix. Bioinformatic analysis, luciferase assays and CRISPR/Cas9-based deletion studies showed no direct interaction between the miRNAs and their putative ECM targets, but proteome and immunoblot experiments demonstrated that the cartilage ECM levels, e.g. aggrecan and collagen type X, were decreased in epiphyseal cartilage of *Mirc24* cluster-deficient mice. The decrease was associated with a strong reduction of the transcription factors SOX6 and SOX9, both needed to maintain cartilage integrity and ECM production at the chondro-osseous junction. In bone, osteoclast activity and numbers were strongly reduced as shown by TRAP activity assays, but osteoblast distribution was not affected. Reduced osteoclast numbers were accompanied by a decrease of *Rankl* expression in cartilage tissue and co-culture experiments of chondrocytes with osteoclast progenitor cells showed that chondrocyte-mediated osteoclast formation is impaired. Moreover, immunoblot experiments indicated that the activation of the TGF- β /SMAD signaling pathway is increased in *Mirc24* cluster-deficient chondrocytes, which may control RANKL expression in these cells.

In summary, the results show that *Mirc24* cluster-encoded miR-322 and miR-503 control a molecular network of transcription factors, signaling pathways and extracellular matrix proteins to fine tune chondrocyte differentiation, ECM deposition and bone remodeling and transform cartilage tissue into bone.

Zusammenfassung

Während der endochondralen Ossifikation entsteht Knorpelgewebe durch die Kondensation mesenchymaler Stammzellen und wird allmählich in Knochen umgewandelt. MicroRNAs (miRNAs) sind kleine nicht kodierende RNAs, die Genexpression posttranskriptionell steuern und eine wichtige Rolle in der Regulation von Knorpel- und Knochendifferenzierung zu spielen scheinen. Zuvor zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass die im Mirc24 Cluster kodierten miR-322 und miR-503 erhöht in der prähypertrophen und hypertrophen Zone der Wachstumsfuge vorliegen. Genetische Inaktivierung des Mirc24 Clusters im Knorpel führt zu einer Verkleinerung der hypertrophen Zone und zum Aufbau von weniger porösen Knochelementen. Vermutlich regulieren miR-322 und miR-503 im Knorpel produzierte Faktoren, die den Knochenaufbau und Knochenumbau steuern. In dieser Arbeit sollten molekulare Netzwerke identifiziert werden, die von den miRNAs reguliert sind und die Umwandlung von Knorpel zu Knochen beeinflussen.

Hierzu wurde zuerst die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen (EZM Proteinen) analysiert. Transfektionsstudien mit miRNA Mimic Oligonukleotiden zeigten, dass eine erhöhte miR-322 oder miR-503 Konzentration in primären epiphysealen Chondrozyten zu einer verminderten Produktion von einigen Komponenten der Knorpelmatrix führt. Obwohl durch bioinformatische Analyse, Luciferase Bindungsassays und CRISPR/Cas9-basierte Deletionsstudien keine direkte Interaktion der miRNAs mit den potentiellen Matrixzielgenen nachgewiesen werden konnte, zeigte Proteom- und Immunblotanalyse eine Abnahme der Matrixproteinen Aggrecan und Kollagen Typ X im epiphysealen Knorpel von Mäusen mit einer Inaktivierung des Mirc24 Clusters. Diese Reduktion korrelierte mit einer starken Abnahme der Transkriptionsfaktoren SOX6 und SOX9, die essenziell für die Knorpelintegrität und EZM Produktion an der Knorpel-Knochen Grenze sind. Im Knochen war die Anzahl und Aktivität der knochenabbauenden Osteoklasten stark vermindert, während die Verteilung der knochenaufbauenden Osteoblasten nicht geändert war. Die gesenkte Osteoklastenanzahl ging einher mit einer Abnahme der *Rankl* Genexpression und Co-Kultur Versuche mit Chondrozyten und Osteoklasten Vorläufer zeigten eine beeinträchtigte von Chondrozyten gesteuerte Osteoklastogenese. Darüber hinaus deuteten Immunblotexperimente auf eine verstärkte Aktivierung vom TGF- β /SMAD Signalweg in Chondrozyten von Mäusen mit einer Inaktivierung des Mirc24 Clusters, was möglicherweise die Expression von RANKL in diesen Zellen hemmt.

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass die im Mirc24 Cluster enthaltenen miR-322 und miR-503 ein molekulares Netzwerk von Transkriptionsfaktoren, Signalwegen und extrazellulären Matrixproteinen steuern, um Chondrozytendifferenzierung, EZM Produktion und Knochenumbau zu regulieren und Knorpel zu Knochen umzuwandeln.