

Zusammenfassung

Knorpelgewebe entsteht aus der Kondensation mesenchymaler Zellen, die sich in Chondrozyten des temporären Knorpels der Wachstumsfuge oder des permanenten artikulären Knorpels der Gelenkoberflächen und der Trachea differenzieren. MicroRNAs (miRNAs) scheinen eine wichtige Rolle in der Regulation der Knorpeldifferenzierung zu spielen. Jedoch sind bislang keine miRNAs identifiziert worden, die wichtige Signalwege der Knorpelentwicklung beeinflussen. In dieser Arbeit sollte die Bedeutung der in der Wachstumsfuge differentiell exprimierten miR-322 für die Skelettentwicklung bestimmt werden. Hierzu wurde zunächst die Expressionszunahme der miR-322 im Verlauf der chondrogenen Differenzierung mit Hilfe von qPCR Analysen in ATDC5 Mikromasskulturen validiert. Über Transfektionsstudien mit miR-322 Mimic Oligonukleotiden konnte nachfolgend ein antiproliferativer Effekt der miR-322 in PECs nachgewiesen werden. Basierend auf bioinformatischen Analysen wurde der Insulin Signalweg als potentiell regulierter Signalweg identifiziert, dessen Inhibierung über die miR-322 den antiproliferativen Effekt auf Chondrozyten erklären könnte. Eine detaillierte proteinbiochemische Untersuchung der miR-322 spezifischen Zielgene zeigte hierbei, dass die miR-322 die Proteinmengen der zentralen Kinase MEK1 erhöht und nachfolgend die Phosphorylierung der nachgeschalteten Kinase ERK1/2 in PECs inhibiert. Diese Zunahme der MEK1 Proteinmengen korrelierte mit gesteigerten *Mek1* mRNA Mengen. In Actinomycin D-vermittelten Degradationsstudien konnte gezeigt werden, dass die erhöhten mRNA Mengen auf einen durch die miR-322 Bindung an die mRNA vermittelten langsameren Abbau der mRNA zurückzuführen war. Die direkte Interaktion der miR-322 mit der Zielsequenz im 3'UTR der *Mek1* mRNA wurde mit CRISPR/Cas9 basierten Deletionsstudien bestätigt. *In situ* konnte die Expression der miR-322 mit Hilfe der Expression eines Reportergens in muskuloskelettalen Geweben und in den prähypertrophen/hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge nachgewiesen werden. Die knorpelspezifische Inaktivierung der miR-322 in Mäusen führte aufgrund einer Verengung der Knorpelspannen und des Tracheallumens zu einer respiratorischen Insuffizienz, wodurch die Tiere kurz nach der Geburt an Atemversagen verstarben. Außerdem konnte eine leichte Verlängerung der Röhrenknochen, einhergehend mit einer verkürzten hypertrophen Zone, gezeigt werden. Auf molekularer Ebene korrelierte der Verlust der miR-322 mit einer Abnahme der MEK1 Proteinmenge und einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2. Diese Ergebnisse belegen, dass die miR-322 an den 3'UTR der *Mek1* mRNA binden kann und die Stabilität der mRNA und damit direkt die Proteinmenge von MEK1 in Chondrozyten erhöht. Diese Erhöhung unterdrückt die Aktivierung des ERK1/2 Signalwegs und inhibiert auf diese Weise die Proliferation der Chondrozyten in der Wachstumsfuge und im trachealen Knorpel.