

Aus dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Nicht kodierende RNAs in der Knochenentwicklung“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium
(Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johannes Grünhagen

aus Berlin

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt in Deutsch	3
Abstrakt in Englisch	4
Eidesstattliche Versicherung	4
Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation.....	6
Auszug aus der Journal Summary Liste	8
Publikation	9
Lebenslauf.....	9
Publikationsliste	25
Danksagung	28

Abstrakt

Einleitung: MiRNAs als Teil nicht kodierender RNAs stellen potente Modulatoren der intrazellulären Signaltransduktion dar. Viele Studien der Knochenbiologie beschäftigen sich mit der Wirkung von miRNAs auf einzelne Ziel-mRNAs oder auf deren differenzielle Expression nach osteogener Induktion von Vorläuferzellen oder nach Signalwegaktivierung. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass der *miR-497-195* Cluster als intrazellulärer BMP-Antagonist wirkt, der die BMP-Signalkaskade an multiplen Stellen beeinflusst.

Ergebnisse: Der *miR-497-195* Cluster ist der bedeutendste Vertreter der *miR-15*-Familie in der postnatalen Knochenentwicklung *in vivo* und im Verlauf der späteren Osteoblastendifferenzierung *in vitro*. Nach Überexpression von *miR-195-5p* in murinen Osteoblasten kommt es zu einer verzögerten Differenzierung und Mineralisierung.

Mit Hilfe von Genexpressions-Mikroarrays und Q-PCR konnte gezeigt werden, dass es durch *miR-195-5p* Überexpression zu einer reduzierten Induktion BMP-responsiver Gene kommt. Eine Dosisabhängigkeit der BMP-Antwort in Abhängigkeit des Grades der *miR-195-5p* Überexpression wurde durch Luciferase Experimente mit BMP-sensitiven Reporterkonstrukten und Western Blots auf phospho Smad1/5/8 bestätigt.

Die Induktion BMP-responsiver Gene nach BMP2-Zugabe war sowohl bei Osteoblasten erniedrigt, in denen *miR-195-5p* überexprimiert wurde, als auch in untransfizierten Zellen eines späteren Differenzierungsstadiums, in welchem der *miR-497-195* Cluster endogen hochreguliert ist.

Schlussfolgerung: Diese Arbeit stellt eine wesentliche Grundlage für die Untersuchung des *miR-497-195* Clusters im Tiermodell dar. Eine Hemmung dieses hier erstmals identifizierten intrazellulär wirkenden BMP-Antagonisten könnte eine BMP2-basierte Behandlung von Problemfrakturen hilfreich unterstützen.

Abstract

Introduction: MiRNAs are noncoding RNAs that represent a powerful modulator of signal transduction. In bone cell biology many microRNA-studies focused on single miRNA-target interactions or differential miRNA expression after osteogenic induction of precursor cells or upon pathway activation.

Here we present evidence that the *miR-497-195* cluster microRNAs antagonize BMP signaling by downregulation of numerous genes that are part of this signaling cascade.

Results: The *miR-497-195* cluster is the most prominent member of the miR-15 family in postnatal bone development *in vivo* and during later stages of osteoblast differentiation *in vitro*. An inhibitory effect on differentiation and mineralization was observed when *miR-195-5p* was overexpressed in murine osteoblasts.

Using gene expression array experiments and quantitative PCR we demonstrate that *miR-195-5p* overexpression leads to reduced induction of BMP-responsive genes.

A dose dependent impact of *miR-195-5p* overexpression on BMP-response was confirmed by Luciferase assays based on Bmp-response element containing reporter constructs and by phospho-Smad1/5/8 Western blots.

Induction of Bmp-responsive genes following BMP2 treatment was not only reduced upon overexpression of *miR-195-5p*, but also at later stages of osteoblast differentiation, where we observed endogenous upregulation of the *miR-497-195* cluster.

Conclusion: Based on this work we plan further investigation of the *miR-497-195* cluster in an animal model. Inhibition of the intracellular acting BMP-antagonist might be a useful therapeutic option to support treatment with recombinant BMP2 to promote healing of non-unions and large-size defects.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Johannes Grünhagen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Nicht kodierende RNAs in der Knochenentwicklung“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Grünhagen J, Bhushan R, Degenkolbe E, Jäger M, Knaus P, Mundlos S, Robinson P.N., Ott C.-E. MiR-497~195

Cluster MicroRNAs Regulate Osteoblast Differentiation by Targeting BMP Signaling
J Bone Miner Res. 2015 May;30(5):796-808. doi: 10.1002/jbmr.2412.

Impact Factor 6,589

Beitrag im Einzelnen:

Johannes Grünhagen hat murine Gewebe entnommen, RNA isoliert und miRNA Expression gemessen (Abbildung 1). Er hat murine Osteoblasten und die Zelllinien NIH3T3, MC3T3 S4 und C2C12 kultiviert, transfiziert, osteogen induziert und anschließend ALP Aktivität bestimmt und Mineral angefärbt sowie RNA isoliert, mRNA und miRNA Expression gemessen (Abbildung 1, 2, 5). RNA aus Osteoblasten hat Johannes Grünhagen ebenfalls zur Expressionsanalyse per Microarray verwendet (Abbildung 3 und 6). Johannes Grünhagen hat Osteoblasten osteogen induziert, gehungert und mit rhBMP2 stimuliert um anschließend mRNA Expression per Q-PCR zu messen (Abbildung4). Bestimmung von Luciferaseaktivität nach Transfektion von miRNAs wurde von Johannes Grünhagen ausgeführt (Abbildung 5). Die Bestätigung von Zielgenen wurde ebenfalls von Johannes Grünhagen durchgeführt (Abbildung 7). Johannes Grünhagen hat alle genannten Experimente selbstständig durchgeführt und das Manuskript zusammen mit Claus-Eric Ott und Raghu Bhushan verfasst.

Die Reportervektoren stammen von Peter ten Dijke aus Leiden.

Das Projekt wurde von Claus-Eric Ott, Johannes Grünhagen, Peter Nick Robinson und Stefan Mundlos konzipiert.

C2C12 Zellen wurden von Raghu Bhushan zur Verfügung gestellt.

Die Ergebnisse der Western Blots wurden von Raghu Bhushan erzeugt.

Elisa Degenkolbe war bei der Etablierung der Luciferaseexperimente und bei Bereitstellung von humanen Testproben behilflich.

Frau Knaus begutachtete die Veröffentlichung intern.

Unterschrift des Doktoranden

Auszug aus der Journal Summary Liste

Journal of Bone and Mineral Research: Impact Faktor 6,589, Position 12 von 124
Zeitschriften „Endocrinology & Metabolism“; Eigenfaktor 0,0433, Journal Summary
List 2013

MARKED JOURNAL LIST

Sorted by: Impact Factor

Abbreviated Journal Title	ISSN	2013 Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	2013 Articles	Cited Half-life	Eigenfactor® Score	Article Influence® Score
ENDOCR REV	0163-769X	13623	19.358	24.124	3.400	25	>10.0	0.02071	8.571
CELL METAB	1550-4131	15636	16.747	17.878	3.052	153	4.5	0.07864	8.209
NAT REV ENDOCRINOL	1759-5029	2753	12.958	11.843	1.804	56	2.7	0.01609	4.330
TRENDS ENDOCRIN MET	1043-2760	6047	8.868	8.936	1.681	69	5.5	0.01916	3.324
DIABETES CARE	0149-5992	52771	8.570	8.462	2.233	626	7.2	0.10550	2.578
DIABETES	0012-1797	49801	8.474	9.105	2.212	425	8.4	0.09326	3.129
OBES REV	1467-7881	6388	7.859	7.922	2.076	105	4.5	0.02096	2.567
J PINEAL RES	0742-3098	6136	7.812	5.961	2.011	88	5.9	0.00750	0.919
ANTIOXID REDOX SIGN	1523-0864	14273	7.667	8.499	2.248	306	4.1	0.04456	2.495
FRONT NEUROENDOCRIN	0091-3022	3070	7.581	10.579	1.160	25	5.4	0.00934	3.419
DIABETOLOGIA	0012-186X	26485	6.880	6.835	1.532	284	7.5	0.05549	2.235
J BONE MINER RES	0884-0431	23020	6.589	6.520	1.324	250	8.3	0.04433	2.108
J CLIN ENDOCR METAB	0021-972X	69351	6.310	6.479	1.148	788	8.6	0.11798	1.993
CURR OPIN LIPIDOL	0957-9672	3898	5.803	6.017	1.230	61	6.3	0.00961	1.923

Publikation

MiR-497~195 Cluster MicroRNAs Regulate Osteoblast Differentiation by Targeting BMP Signaling

Johannes Grünhagen, Raghu Bhushan, Elisa Degenkolbe, Marten Jäger, Petra Knaus, Stefan Mundlos, Peter N Robinson, and Claus-Eric Ott

Abstract

MicroRNAs play important roles during cell reprogramming and differentiation. In this study, we identified the miR-497/195 cluster, a member of the miR-15 family, as strongly upregulated with age of postnatal bone development in vivo and late differentiation stages of primary osteoblasts cultured in vitro. Early expression of miR-195-5p inhibits differentiation and mineralization. Microarray analyses along with quantitative PCR demonstrate that miR-195-5p alters the gene regulatory network of osteoblast differentiation and impairs the induction of bone morphogenetic protein (BMP) responsive genes. Applying reporter gene and Western blot assays, we show that miR-195-5p interferes with the BMP/Smad-pathway in a dose-dependent manner. Systematically comparing the changes in mRNA levels in response to miR-195-5p overexpression with the changes observed in the natural course of osteoblast differentiation, we demonstrate that microRNAs of the miR-15 family affect several target genes involved in BMP signaling. Predicted targets including Furin, a protease that cleaves pro-forms, genes encoding receptors such as Acvr2a, Bmp1a, Dies1, and Tgfbr3, molecules within the cascade like Smad5, transcriptional regulators like Ski and Zfp423 as well as Mapk3 and Smurf1 were validated by quantitative PCR. Taken together, our data strongly suggest that miR-497/195 cluster microRNAs act as intracellular antagonists of BMP signaling in bone cells.

J Bone Miner Res. 2015 May;30(5):796-808

Diese Publikation ist unter folgender URL einsehbar:

<http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.2412>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Originalarbeiten

Grünhagen J, Bhushan R, Degenkolbe E, Jäger M, Knaus P, Mundlos S, Robinson PN, Ott CE. „MiR-497~195 Cluster MicroRNAs Regulate Osteoblast Differentiation by Targeting BMP Signaling.“

J Bone Miner Res. 2015 May;30(5):796-808

Impact Faktor 6.589

Keupp K, Beleggia F, Kayserili H, Barnes AM, Steiner M, Semler O, Fischer B, Yigit G, Janda CY, Becker J, Breer S, Altunoglu U, **Grünhagen J**, Krawitz P, Hecht J, Schinke T, Makareeva E, Lausch E, Cankaya T, Caparrós-Martín JA, Lapunzina P, Temtamy S, Aglan M, Zabel B, Eysel P, Koerber F, Leikin S, Garcia KC, Netzer C, Schönau E, Ruiz-Perez VL, Mundlos S, Amling M, Kornak U, Marini J, Wollnik B.

„Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility.“

Am J Hum Genet. 2013 Apr 4;92(4):565-74

Impact Faktor 10.987

Schwill S, Seppelt P, **Grünhagen J**, Ott CE, Jugold M, Ruhparwar A, Robinson PN, Karck M, Kallenbach K.

„The fibrillin-1 hypomorphic mgR/mgR murine model of Marfan syndrome shows severe elastolysis in all segments of the aorta.“

J Vasc Surg. 2013 Jun;57(6):1628-36

Impact Faktor 2.98

Bhushan R, **Grünhagen J**, Becker J, Robinson PN, Ott CE, Knaus P. „miR-181a promotes osteoblastic differentiation through repression of TGF- β signaling molecules.“ *Int J Biochem Cell Biol.* 2013 Mar;45(3):696-705

Impact Faktor 4.24

Guo G, Muñoz-García B, Ott CE, **Grünhagen J**, Mousa SA, Pletschacher A, von Kodolitsch Y, Knaus P, Robinson PN „Antagonism of GxxPG fragments ameliorates manifestations of aortic disease in Marfan syndrome mice. „*Hum Mol Genet.* 2013 Feb 1;22(3):433-43
Impact Faktor 6.677

Ott CE, Hein H, Lohan S, Hoogeboom J, Foulds N, **Grünhagen J**, Stricker S, Villavicencio-Lorini P, Klopocki E, Mundlos S. „Microduplications upstream of MSX2 are associated with a phenocopy of cleidocranial dysplasia.“ *J Med Genet.* 2012 Jul;49(7):437-41.
Impact Faktor 5.636

Jäger M, Ott CE, **Grünhagen J**, Hecht J, Schell H, Mundlos S, Duda GN, Robinson PN, Lienau J. „Composite transcriptome assembly of RNA-seq data in a sheep model for delayed bone healing.“ *BMC Genomics.* 2011 Mar 24;12:158
Impact Faktor 4.041

Ott CE*, **Grünhagen J***, Jäger M, Horbelt D, Schwill S, Kallenbach K, Guo G, Manke T, Knaus P, Mundlos S, Robinson PN. „MicroRNAs differentially expressed in postnatal aortic development downregulate elastin via 3' UTR and coding-sequence binding sites.“ *PLoS One.* 2011 Jan 31;6(1):e16250
Impact Faktor 3.534

Krawitz PM, Schweiger MR, Rödelsperger C, Marcelis C, Kölsch U, Meisel C, Stephani F, Kinoshita T, Murakami Y, Bauer S, Isau M, Fischer A, Dahl A, Kerick M, Hecht J, Köhler S, Jäger M, **Grünhagen J**, de Condor BJ, Doelken S, Brunner HG, Meinecke P, Passarge E, Thompson MD, Cole DE, Horn D, Roscioli T, Mundlos S, Robinson PN. “Identity-by-descent filtering of exome sequence data identifies PIGV mutations in hyperphosphatasie mental retardation syndrome.” *Nat Genet.* 2010 Oct;42(10):827-9.
Impact Faktor 29.648

Ott CE, Bauer S, Manke T, Ahrens S, Rödelsperger C, **Grünhagen J**, Kornak U, Duda G, Mundlos S, Robinson PN „Promiscuous and Depolarization-Induced Immediate-Early Response Genes are Induced by Mechanical Strain of Osteoblasts.“ *J Bone Miner Res.* 2009 Jul;24(7):1247-62
Impact Faktor 6.589

Nicht Originalarbeiten

Grünhagen J, Ott CE „On microRNA-214 suppressing osteogenic differentiation of C2C12 myoblast cells by targeting Osterix.“ *Bone* 2013 Nov;57(1):325-7
Impact Faktor 4.461

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Peter Nick Robinson dafür, dass ich an diesem spannenden Thema in seiner Arbeitsgruppe arbeiten durfte und für die dabei gewährten Freiräume. Danken möchte ich auch für notwendige Korrekturen und Einwände in verfahrenen Projektphasen.

Sehr großen Dank möchte ich meinem Kollegen Claus-Eric Ott aussprechen, der mich stets bei der Umsetzung meiner Vorschläge und Ideen unterstützte und mir durch sein Vertrauen dazu verhalf, aus gemachten Fehlern wertvolle Erfahrung zu schöpfen. Gemeinsam Projektpläne zu schmieden und unmöglich erscheinendes möglich machen zu wollen, wird mir immer in Erinnerung bleiben.

Ich möchte meiner langjährigen Sitz-und Labornachbarin Denise Emmerich für die vielen guten Gespräche und Diskussionen danken, für ihr offenes Ohr und aufbauenden Worte. Allen meinen Weggefährten im Labor danke ich für die vielen spaßigen Stunden im Labor bis in den späten Abend und auch außerhalb der Institutsmauern.

Für die Hilfsbereitschaft bedanke ich mich besonders bei meinen Kollegen Raghu, Claire und Björn sowie Patrick, Anja, Philippe und Janina. Es war mir immer eine Freude mit Bastian und Petra über die schicksalhafte Forschung zu philosophieren.

Herzlichen Dank richte ich an Valerie Johnston, Mohsen Karbasyan und Véronique Dutrannoy, ohne deren Hilfe und unerschöpfliches Wissen viele Probleme nicht gelöst worden wären. Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Genetik und Humangenetik, deren Unterstützung und Hilfe ich mir stets gewiss sein konnte.

Ich danke meiner Frau Jenifer Grünhagen dafür, dass sie mich in dieser sehr bewegten Zeit ertragen hat. Dafür, dass sie mich zu motivieren wusste, auch an schwierigen Tagen aufbaute und wenn nötig schonungslos der Prokrastination Einhalt geboten hat. Ich danke für ihre Liebe, das Vertrauen und die Unterstützung und widme ihr diese Doktorarbeit.