

## SIGNALING REGULATION OF THE HUMANS MSC OSTEOGENIC DIFFERENTIATION. METANALYSIS AND BIOINFORMATIC ANALYSIS OF MICRORNAS IMPACT

D.S. AVRAMETS, L.L. MACEWICZ, O.O. PIVEN \*

Department of Human Genetics, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, 150 Akad. Zabolotnogo str, Kyiv, 03680, Ukraine  
E-mail: o.o.piven@imb.org.ua

*Numerous experimental data shows crucial involvement of miRs in skeletal development in embryos, osteogenic differentiation, and maturation. However, molecular mechanisms of miRs action, in other words their target signaling pathways and transcriptional factors that specific drives osteogenic differentiation is far from being understood. With meta-analysis we identified miRs significantly involved in hMSCs osteogenic differentiation. Statistical analysis revealed significant trend of upregulation of let-7a, mir-21, mir-26a, mir-29b, mir-101, mir-143, mir-218 during hMSCs differentiation into osteoblast. And the opposite trend was shown for mir-17, mir-31, mir-138 and mir-222: their content was significantly lower during osteogenic differentiation. Using bioinformatics approaches we identified predictable genes-target for each miRs, analyzed signaling networks and biological process enriched by these genes. Bioinformatic assay shows that miRNAs specifically involved in hMSCs transition into osteogenic differentiation via microenvironment formation (i.e. let-7a, mir-17, mir-21, mir-29b and mir-101), TGF- $\beta$ /BMP-SMAD dependent pathway (i.e. let-7a, mir-17, mir-21, mir-26a mir-101) and MAPK signaling pathway (i.e. let-7a, mir-21, mir-26a, mir-29b, mir-143 and mir17). Yap-dependent expression of osteogenic transcriptional factors modulated by let-7a, mir-31mir-101, mir-138 and mir-222. We predicted that mir-17, mir-26a, mir-29b, mir-101, mir-138 and mir-222 are specifically involved in canonical Wnt signaling dependent osteogenesis as well as in osteoblast maturation together with let-7a, mir-29b and mir-218 which modulate AMPK signaling. Additionally, identified mir-101 is likely involved into osteoblast homeostasis via Hedgehog signaling. Presented here data expands knowledge in the field of hMSCs fate and osteogenesis orchestration by miRs, points to pro-osteogenic and anti-osteogenic miRs and their potential molecular pathways.*

**Key words:** cells signaling, differentiation, miR, microRNA, osteogenesis, osteogenic lineage, hMSCs.

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2023

СИГНАЛЬНА РЕГУЛЯЦІЯ ОСТЕОГЕННОГО ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ. МЕТА АНАЛІЗ ТА БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ РОЛІ мікроРНК

Низка експериментальних робіт демонструє важливе значення мікроРНК у ембріональному розвитку скелету та остеогенному диференціюванні. Однак молекулярні механізми дії мікроРНК лишаються не до кінця з'ясованими, тобто наразі не відомо достеменно які саме сигнальні шляхи та транскрипційні фактори остеогенезу є мішенями мікроРНК. Тож, за допомогою мета аналізу ми ідентифікували мікроРНК що достовірно залучені до остеогенного диференціювання МСК людини. Статистичний аналіз виявив тренд підвищення експресії наступних мікроРНК let-7a, mir-21, mir-26a, mir-29b, mir-101, mir-143, mir-218 під час остеогенного диференціювання. І навпаки, зниження експресії виявили для mir-17, mir-31, mir-138 and mir-222. Із застосуванням біоінформатичних методів досліджень ми ідентифікували передбачувані гени-мішені для кожної з вказаних вище мікроРНК та проаналізували які сигнальні мережі та біологічні процеси збагачені ідентифікованими генами. У результаті ми продемонстрували, що мікроРНК специфічно регулюють остеогенез МСК людини сприяючи формуванню мікрооточення (let-7a, mir-17, mir-21, mir-29b і mir-101), регулюють активність TGF- $\beta$ /BMP-SMAD залежного сигнального каскаду (let-7a, mir-17, mir-21, mir-26a і mir-101) та MAPK сигнального шляху (let-7a, mir-21, mir-26a, mir-29b, mir-143 та mir17). Уязвима експресія остеогенних транскрипційних факторів let-7a, mir-31mir-101, mir-138 та mir-222. Ми передбачили, що mir-17, mir-26a, mir-29b, mir-101, mir-138 та mir-222 залучені у регулювання канонічного Wnt сигнального каскаду та остеогенезу відповідною. Окрім того, mir-17, mir-26a, mir-29b, mir-101, mir-138 та mir-222 разом з let-7a, mir-29b та mir-218 регулюють дозрівання остеобластів, оскільки let-7a, mir-29b та mir-218 здатні модулювати активність AMPK сигнального каскаду. Окрім того, ідентифікована нами mir-101 вочевидь регулює гомеостаз остеобластів опосередковано через Hedgehog сигнальний каскад. Загалом, отримані нами дані розширюють та систематизують існуючі знання щодо ролі мікроРНК у регулюванні остеогенезу та долі МСК людини, ідентифікуючи про-остеогенні та анти-остеогенні мікроРНК та їхні потенційні молекулярні механізми дії.

**Ключові слова:** Сигнальна регуляція клітини, диференціювання, miR, мікроРНК, остеогенез, остеогенна лінія, МСК.

REFERENCES

- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2):281–297.
- Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks D S, Sander C (2008) The microRNA.org resource: Targets and expression. *Nucl Acids Res* 36:D149–D153. <http://doi.org/10.1093/nar/gkm995>.
- Brandaõ A S, Bensimon-Brito A, Lourenço R, Borbinhal J, Soares A R, Mateus R, Jacinto A (2019) Yap induces osteoblast differentiation by modulating Bmp signalling during zebrafish caudal fin regeneration. *J Cell Sci* 132:jcs231993. <http://doi.org/10.1242/jcs.231993>
- Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ (2014) Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Europ Cells Mater* 28:269–286. <http://doi.org/10.22203/eCM.v028a19>.
- Discher D, Mooney D, Zandstra P (2009) Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells *Science* 324(5935):1673–1677. <http://doi.org/10.1126/science.1171643>.
- Felber K, Elks PM, Lecca M, Roehl HH (2015) Expression of *osterix* Is Regulated by FGF and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalling during Osteoblast Differentiation. *PLoS ONE* 10(12):e0144982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144982>.
- Fröhlich LF (2019) Micrnas at the Interface between Osteogenesis and Angiogenesis as Targets for Bone Regeneration. *Cells* 8(2). <https://doi.org/10.3390/cells8020121>.
- Gebauer F, Hentze MW (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10):827–835.
- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27:91–105. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017>.
- Guo P-Y, Wu L-F, Xiao Z-Y, Huang T-L, Li X. (2019) Knockdown of MiR-140-5 promotes osteogenesis of adipose-derived mesenchymal stem cells by targeting TLR4 and BMP2 and promoting fracture healing in the atrophic nonunion rat model. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23(5):2112–2124. [http://doi.org/10.26355/eurrev\\_201903\\_17255](http://doi.org/10.26355/eurrev_201903_17255).
- Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R (2015) InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 16:169. <http://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>.
- Houschyar KS, Tapking C, Borrelli MR, Popp D, Duscher D, Maan ZN et al (2019) Wnt Pathway in Bone Repair and Regeneration – What Do We Know So Far. *Front Cell Develop Biol* 6:170. <http://doi.org/10.3389/fcell.2018.00170>.
- Huang W, Yang S, Shao J, Li Y-P (2007) Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci* 12:3068–3092.
- Jeggari A, Alekseenko Z, Dias J, Ericson J, Alexeyenko A (2018) EviNet: a web platform for network enrichment analysis with flexible definition of gene sets. *Nucl Acids Res* 46(1):W163–W170. <http://doi.org/10.1002/1878-0261.12350>.
- Jeyabalan J, Shah M, Viollet B, Chenu C (2012) AMP-activated protein kinase pathway and bone metabolism. *J Endocrinol* 212(3):277–290.
- Jiang X, Zhang Z, Peng T, Wang G, Xu Q, Li G (2020) miR204 inhibits the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by targeting bone morphogenetic protein 2. *Mol Med Rep* 21:43–50.
- Jing D, Hao J, Shen Y et al (2015) The role of microRNAs in bone remodeling. *Int J Oral Sci* 7:131–143. <https://doi.org/10.1038/ijos.2015.22>.
- Karner C M, Long F (2017) Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 74(9):1649–1657. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2425-5>.
- Landrier J-F, Derghal A, Mounien L (2019) MicroRNAs in Obesity and Related Metabolic Disorders. *Cells* 8(8):859.
- Long H, Zhu Y, Lin Z et al (2019) miR-381 modulates human bone mesenchymal stromal cells (BMSCs) osteogenesis via suppressing Wnt signaling pathway during atrophic nonunion development. *Cell Death Dis* 10:470. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1693-z>.
- Lv W T, Du DH, Gao RJ, Yu CW, Jia Y, Jia ZF, Wang CJ (2019) Regulation of Hedgehog signaling Offers A Novel Perspective for Bone Homeostasis Disorder Treatment. *Inter J Mol Sci* 20(16):3981. <https://doi.org/10.3390/ijms20163981>.
- Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T et al (2008) miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 368(2):267–272. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.073>.
- Mohri T, Nakajima M, Takagi S, Komagata S, Yokoi T (2009) MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int J Cancer* 125(6):1328–1333. <http://doi.org/10.1002/ijc.24459>.
- Pan JX, Xiong L, Zhao K et al (2018) YAP promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation by regulating  $\beta$ -catenin signaling. *Bone Res* 6:18.
- Peng H, Lu S-L, Bai Y, Fang X, Huang H, Zhuang H-Q (2018) MiR-133a inhibits fracture healing via targeting RUNX2/BMP2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22(9):2519–2526. [http://doi.org/10.26355/eurrev\\_201805\\_14914](http://doi.org/10.26355/eurrev_201805_14914)
- Peng S, Gao D, Gao C, Wei P, Niu M, Shuai C (2016) MicroRNAs regulate signaling pathways in osteoge-

- nic differentiation of mesenchymal stem cells (Review). *Mol Med Rep* 14:623–629.
- Rodríguez-Carballo E, Gámez B, Ventura F (2016) p38 MAPK Signaling in Osteoblast Differentiation. *Front Cell Develop Biol* 4:40. <http://doi.org/10.3389/fcell.2016.00040>.
- Sanpaolo ER, Rotondo C, Cici D et al (2020) JAK/STAT pathway and molecular mechanism in bone remodeling. *Mol Biol Rep* 47:9087–9096. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05910-9>.
- Schindeler A, Little DG (2006) Ras-MAPK Signaling in Osteogenic Differentiation: Friend or Foe? *JBMR* 21(9):1331–1338.
- Sera S, zur Nieden S (2017) MicroRNA Regulation of Skeletal Development. *Curr Osteoporos Rep* 15(4):353–366. <http://doi.org/10.1007/s11914-017-0379-7>.
- Trompeter et al (2013) MicroRNAs miR-26a, miR-26b, and miR-29b accelerate osteogenic differentiation of unrestricted somatic stem cells from human cord blood. *BMC Genomics* 14:111.
- van Wijnen AJ, van de Peppel J, van Leeuwen JP, Lian JB, Stein GS, Westendorf JJ et al (2013) MicroRNA functions in osteogenesis and dysfunctions in osteoporosis. *Curr Osteopor Rep* 11(2):72–82. <https://doi.org/10.1007/s11914-013-0143-6>.
- Wang C, Qiao X, Zhang Z, Li C (2020) MiR-128 promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rat by targeting DKK2. *Biosci Rep* 40(2):BSR20182121. <http://doi.org/10.1042/BSR20182121>.
- Wang J, Liu S, Li J et al (2019) Roles for miRNAs in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 10:197. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1309-7>.
- Wu M, Chen G, Li YP (2016) TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 4:16009. <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.9>.
- Wu X, Gu Q, Chen X, Mi W, Wu T, Huang H (2018) MiR-27a targets DKK2 and SFRP1 to promote reosseointegration in the regenerative treatment of peri-implantitis. *J Bone Miner Res* 34:123–157.
- Xu1 G, Ding Z, Shi H-F (2019) The mechanism of miR-889 regulates osteogenesis in human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Orthopaed Surgery Res* 14:366. <https://doi.org/10.1186/s13018-019-1399-z>.
- Yang XM, Song YQ, Li L et al (2012) miR-1249-5p regulates the osteogenic differentiation of ADSCs by targeting PDX1. *J Orthop Surg Res* 16:10. <https://doi.org/10.1186/s13018-020-02147-x>.
- Yeh YT, Wei J, Thorossian S, Nguyen K, Hoffman C, del Álamo CJ et al (2019) MiR-145 mediates cell morphology-regulated mesenchymal stem cell differentiation to smooth muscle cells. *Biomaterials*. 204:59–69. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.03.003>.
- Zhang Y, Gordon A, Qian W, Chen W (2015) Engineering Nanoscale Stem Cell Niche: Direct Stem Cell Behavior at Cell-Matrix Interface. *Advanced Healthcare Materials*. 4(13):1900–1914. <http://doi.org/10.1002/adhm.201500351>.
- Zhang Ch (2010) Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor Osx. *J Orthopaedic Surgery Res* 5:37. <http://doi.org/10.1186/1749-799X-5-37>.

Received May 19, 2022  
 Received July 22, 2022  
 Accepted January 18, 2023