

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie der
Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Matthias Glanemann

**Untersuchung der miR-496 abhängigen mTOR Regulation im
Rahmen des Diabetes Mellitus Typ 2 und Adipositas**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2018

vorgelegt von: Jonas Zimmer

geboren am: 24.04.1992 in Saarlouis

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	2
2. Abkürzungsverzeichnis	3
3. Zusammenfassung	5
4. Abstract	6
5. Einleitung	7
6. Material und Methoden	10
6.1. Material	10
6.1.1. Geräte	10
6.1.2. Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	10
6.1.3. Verwendete Kits	11
6.1.4. Materialien für die Isolation von RNA und Protein	12
6.1.5. Standards und Lösungen für BCA-Assay	13
6.1.6. Standards, Lösungen und Antikörper für ELISA	13
6.2. Methoden	15
6.2.1 Patienten- und Kontrollkollektiv	15
6.2.2 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten	15
6.2.3 RNA- und Proteinisolation aus PBMC	16
6.2.4 Einzelsträngige cDNA-Synthese	17
6.2.5 Quantitative Real-Time PCR	18
6.2.6 BCA-Assay	20
6.2.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	21
6.2.8 Statistik	23
7. Ergebnisse	24
8. Diskussion	29
9. Ausblick	34
10. Literaturverzeichnis	36
11. Anhang	41
Tabellenverzeichnis	41
12. Publikation	43
13. Danksagung	43

2. Abkürzungsverzeichnis

Aq. dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	bicinchoninic acid
BMI	Body-Mass-Index
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fab	fragment antigen binding
Foxa2	forkhead box protein A2
GLP-1	glukagon-like peptide 1
GLUT	Glucosetransporter
Grb10	growth factor receptor-bound protein 10
GSIS	Glukose stimulierte Insulinsekretion
HRP	horseradish
IGF-1R	insulin-like growth factor 1 receptor
miRNA	micro ribonucleic acid
mRNA	messenger ribonucleic acid
mTOR	mechanistic target of rapamycin
mTORC1/2	mechanistic target of rapamycin complex 1/2
OGTT	Orales Glukosetoleranz-Test
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphate buffered saline
PSMB6	proteasome subunit beta type-6
qRT-PCR	quantitative real-time-polymerase chain reaction
rpm	runs per minute
RT	reverse Transkriptase
S6K1	ribosomal protein S6 kinase beta-1

SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the mean
T2DM	Typ-2-Diabetes Mellitus

3. Zusammenfassung

Hintergrund: mTOR (mechanistic target of rapamycin) reguliert den Lipid- und Glukosemetabolismus und spielt somit eine Schlüsselrolle bei Stoffwechselerkrankungen wie Typ-2-Diabetes mellitus (T2DM). Kürzlich wurde eine funktionelle Interaktion von miRNA-496 (miR-496) mit mTOR und dessen Einfluss auf die Regulation des menschlichen Alterns gezeigt. Da T2DM am häufigsten bei älteren Erwachsenen vorkommt, ist vorstellbar, dass die miR-496 auch einen Einfluss auf die mTOR-Regulation bei T2DM und Adipositas haben könnte.

Methoden: Basierend auf RT-PCR und ELISA wurde die mTOR-mRNA und Proteinexpression sowie die miR-496 Expression in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von T2DM-Patienten (n=36, Durchschnittsalter: 71) und gesunden altersentsprechenden Kontrollen (n=36, Durchschnittsalter: 69) untersucht. Des Weiteren wurde die mTOR-Proteinexpression und miR-496 Expression bei unterschiedlichen Adipositasgraden bestimmt.

Ergebnisse: Es zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine miR-496- und BMI-abhängige mTOR-Überexpression bei T2DM-Patienten sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene.

Schlussfolgerung: MiR-496 ist durch die Regulation von mTOR an der Regulation von T2DM und Adipositas beteiligt. Daher könnte eine Kontrolle der mTOR-Expression als Marker für die T2DM-Entwicklung und das Fortschreiten von Adipositas angesehen werden. Ferner könnte die mTOR-Überexpression bei Übergewicht die zirkulierenden Fettsäuren im physiologischen Bereich halten, weshalb sie auch als kompensatorischer Mechanismus zum Schutz des Körpers angesehen werden kann.

4. Abstract

Background: Mechanistic target of rapamycin (mTOR) regulates lipid and glucose metabolism thus playing a key role in metabolic diseases like type 2 diabetes mellitus (T2DM). Recently, a functional interaction of miRNA-496 (miR-496) with mTOR and its impact on the regulation of human ageing was demonstrated. As T2DM is most prevalent in older adults, miR-496 may also have an impact on mTOR regulation in T2DM and obesity.

Methods: Based on real time PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) mTOR gene and protein expression as well as miR-496 expression was monitored in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from T2DM patients (n=36, median age: 71) and healthy age-matched controls (n=36, median age: 69). Further the mTOR protein- and miR-496 expression was determined in T2DM patients with different degrees of obesity.

Results: Findings presented in this thesis demonstrate an inverse expression profile of down-regulated miR-496 and up-regulated mTOR mRNA and protein activity in T2DM patients correlating with patients body mass index (BMI).

Conclusions: MiR-496 is involved in the regulation of T2DM and obesity through the control of mTOR. Hence, monitoring mTOR expression may be considered as a marker for T2DM development and the progression of obesity. As mTOR up-regulation caused by obesity maintains circulating fatty acids within the physiological range, the BMI-dependent mTOR up-regulation may be considered as a compensatory mechanism to protect the body from metabolic harm.

5. Einleitung

Heute werden im Wesentlichen 4 Typen des Diabetes unterschieden, wobei der Typ 2 die häufigste Form darstellt. Für diese Arbeit wurden ausschließlich Patienten mit Typ 2 Diabetes ausgewählt. Der pathogenetische Mechanismus liegt hier vor allem in einer erworbenen Insulinresistenz der peripheren Gewebe. Eine wichtige Rolle spielt zudem die erbliche Komponente des Typ 2 Diabetes. Vor allem aber wird die Insulinresistenz durch exogene modulierende Faktoren wie z. B. das Essverhalten getriggert, was sich unter anderem darin zeigt, dass Patienten mit einem sog. metabolischen Syndrom überproportional häufig an Diabetes Mellitus Typ 2 leiden. Die Insulinresistenz ist neben anderen Faktoren auch ein Diagnosekriterium für dieses Syndrom. Durch diesen Zusammenhang kann auch die in den letzten Jahren stark ansteigende Prävalenz des Typ 2 Diabetes erklärt werden, die vor allem auf die zuckerlastige Ernährung in den Industrienationen zurückzuführen ist. Es wird zwischen Patienten mit einem sog. Prädiabetes bzw. pathologischer Glukosetoleranz und den manifest an Typ 2 Diabetes Erkrankten unterschieden. Die Diagnose erfolgt unter anderem über eine abnorme Nüchternblutglukose oder einen pathologischen Wert im HbA1c-Messwert (Langzeitmesswert). Auch kann ein Orale Glukose Toleranztest (OGTT) 2h nach Einnahme von 75g Glukose und vorheriger Bestimmung der Nüchternblutglukose bei unklarer Diagnose eingesetzt werden. Molekular gesehen wird nach der Aufnahme von Kohlenhydraten über den Magen-Darm-Trakt ins Blut, Glukose konzentrationsabhängig über GLUT-Transporter in die pankreatische Inselzelle aufgenommen. Über die verschiedenen Schritte der Glykolyse und des Citratzyklus und abschließend in der Atmungskette des Mitochondriums wird energiereiches Adenosintriphosphat hergestellt. Dieses akkumuliert schließlich in der Inselzelle und führt zu einer Hemmung ATP-sensitiver Kaliumkanäle der Zellmembran. Die daraufhin folgende Depolarisation der Zelle bewirkt ihrerseits einen Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran, welches nun für eine Exkretion der mit Insulin und C-Peptid beladenen Vesikel aus der Inselzelle in den Blutkreislauf führt. Aufgrund dieses hochsensitiven Mechanismus ist es dem menschlichen Körper möglich, auftretende Blutzuckeranstiege nach Nahrungsaufnahme effektiv abzapuffern, denn das ausgeschüttete Insulin sorgt für eine Aufnahme des Zuckers in die Skelett- und Herzmuskulatur sowie in das Fettgewebe. Des Weiteren regt Insulin in der Leber und in der Muskulatur die Glykogensynthese an und hemmt die Glukoneogenese. Diese Funktion wird über die Bindung des Insulins an den Insulinrezeptor (eine Rezeptortyrosinkinase) der verschiedenen Gewebe vermittelt. In der nachgeschalteten Signalkaskade nimmt unter anderem der mTOR-

Proteinkomplex (mechanistic target of rapamycin) als Serin/Threonin-Kinase eine zentrale Rolle im Glukosestoffwechsel ein. Ferner hat das Protein auch eine wesentliche Bedeutung im zellulären Alterungsprozess. Diverse Umweltreize aber auch hormonelle Signalkaskaden werden durch die zentrale Schaltstelle mTOR in adäquate zelluläre Antworten umgewandelt (19). MTOR gehört zu den Phosphatidylinositol 3´ Kinasen und wurde ursprünglich als Angriffsziel des Immunsuppressivums Rapamycin identifiziert (37). MTOR ist ein Proteinkomplex, welcher aus 2 katalytischen Untereinheiten mTORC1 und mTORC2 besteht. Diese Untereinheiten variieren in ihren Funktionen, Komponenten und ihrer Regulation. Der mTORC 1-Komplex, welcher unter anderem als Bindungsstelle für das Immunsuppressivum Rapamycin fungiert, reguliert den Stoffwechsel sowie das Zellwachstum, indem er Autophagie inhibiert. Der mTORC 2-Komplex ist resistent gegenüber einer Behandlung mit Rapamycin und spielt eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung und der Organisation des Aktinzytoskeletts der Zelle (18, 23, 39). Die Deregulation des mTOR-Proteinkomplexes findet oft bei metabolischen Erkrankungen wie Adipositas und Typ 2 Diabetes mellitus statt und ist darüber hinaus assoziiert mit der Entstehung von Karzinomen. Insbesondere der Typ 2 Diabetes mellitus ist eine Erkrankung, die unter anderem von Beta-Zelldysfunktion und Resistenz der peripheren Gewebe gegenüber Insulin begleitet ist (29, 48). Viele verschiedene Signalwege sind beim Typ 2 Diabetes pathologisch verändert, insbesondere die Insulinsignalkaskade, die mitochondriale Funktion, die Differenzierung der Fettzellen sowie die Fettsäureoxidation sind betroffen. Beim Diabetes mellitus findet unter anderem auch eine abnormale Verteilung von Triglyceriden von Fettzellen in periphere Gewebe statt. Dies fördert wiederum die Entstehung von verschiedenen metabolischen Erkrankungen (6).

Das metabolische Syndrom bestehend aus Insulinresistenz, Hypertriglyceridämie, Adipositas und Bluthochdruck ist hierfür ein gutes Beispiel. Obwohl bekannt ist, dass die Insulinresistenz aufgrund abnormer zellulärer Signaltransduktion entsteht, sind viele Details zur Pathogenese noch unbekannt. Neuere Erkenntnisse implizieren, dass sogenannte microRNAs (miRNAs), eine Klasse nichtkodierender RNAs, die als Translationsrepressoren dienen, bei der Entstehung von Typ 2 Diabetes und Adipositas eine entscheidende Rolle spielen (10, 50). Auch Insulinresistenz und β -Zellfunktion werden wesentlich durch miRNAs beeinflusst (9, 15). Während mehrere Studien an Menschen und Tieren die Bedeutung von miRNAs für die Insulinsensitivität von Skelettmuskeln gezeigt haben, wurde auch vorgeschlagen, zirkulierende miRNAs als Biomarker des T2DM zur Früherkennung der Erkrankung einzusetzen (54). Kürzlich wurde eine funktionelle Interaktion der miRNA-496 (miR-496) mit mTOR nachge-

wiesen und ein potentieller Einfluss von mTOR auf die Regulation des menschlichen Alterns gezeigt (36). Da an T2DM vor allem ältere Menschen erkranken, ist vorstellbar, dass die miR-496 möglicherweise auch die mTOR-Regulation im Rahmen des T2DM beeinflusst.

Fragestellung

Es sollte daher in dieser Arbeit überprüft werden, ob die miR-496 an der Regulation des T2DM und der Adipositas durch eine Kontrolle von mTOR beteiligt ist und ob diese Interaktion vom Körpermasseindex (BMI) des Patienten beeinflusst wird. Fernziel dieser Untersuchungen ist es daher, mTOR möglicherweise als Marker für die Entwicklung von T2DM und Adipositas zu etablieren.

6. Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Geräte

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>
Abzug	Waldner
Analysewaage	Sartorius
Biophotometer	Eppendorf
Nano Drop	Thermo Fisher Scientific
Microplate Reader EL 800	Bio-Tek-Instruments
Gene Amp PCR-System 2700	Applied Biosystems
Reagenzschüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries
Thermomixer compact	Eppendorf
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

6.1.2 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>
ELISA Platte (96 well)	R&D Systems, Catalog # DY990
Plate sealers	R&D Systems, Catalog # DY992

Filtersäulen	mirNEAsy Kit Quiagen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Optical 96-Well Reaction Plate Micro Amp™	Thermo Fisher Scientific
Micro Amp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific
Optical Adhesive Film PCR compatible	Thermo Fisher Scientific
PCR Tubes 0,2 ml	VWR
Pipetten 200µl, 1000µl	Eppendorf Research
Pipettierhilfe Macro	Carl Roth GmbH
Rotilabo Einmalwiegeschälchen	Carl Roth GmbH
50 ml Falcons	VWR
PBS-Puffer	Thermo Fisher Scientific

6.1.3 Verwendete Kits

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>
mirNEAsy Kit (Kat.-Nr.: 21704)	Qiagen
Pierce™ BCA Protein Assay Kit 23225	Thermo Fisher Scientific
Duo Set ELISA (DYC1665)	R&D Systems
High Capacity mTOR-cDNA Reverse Transcription Kit (Kat.-Nr.: 4368814)	Thermo Fisher Scientific

High Capacity miRNA-cDNA Reverse Transcription Kit (Kat.-Nr.: 4366597)	Thermo Fisher Scientific
TaqMan-Micro-RNA-Reverse Transcription Kit (Kat.-Nr.: 4366597)	Thermo Fisher Scientific

6.1.4 Materialien für die Isolation von RNA und Protein

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen
Chloroform	Thermo Fisher Scientific
Ethanol 100 %	Thermo Fisher Scientific
Bromochloropropan	Sigma-Aldrich
Biocoll-Lösung	Biochrom
PBS-Puffer	Thermo Fisher Scientific
SDS-Pulver	Thermo Fisher Scientific

6.1.5 Standards und Lösungen für BCA-Assay

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>
BCA Reagenz A 1000 ml, Na ₂ CO ₃ , NaHCO ₃ , Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1 M NaOH	Thermo Scientific
BCA Reagenz B 25 ml 4% Kupfersulfat	Thermo Scientific
Albumin Standard Ampullen, 2 mg/ml BSA in 0,9 % NaCl und 0,05 % Natriumazid	Thermo Scientific

6.1.6 Standards, Lösungen und Antikörper für ELISA

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>
Human Phospho-TOR (S2448) Capture Antibody (Part 841740) goat anti-human TOR antibody	Duo Set IC Human Phospho-TOR (R&D Systems)
Human Phospho-TOR (S2448) Detection Antibody (Part 841741) biotinylated rabbit anti-human phospho-TOR	Duo Set IC Human Phospho-TOR (R&D Systems)
Human Phospho-TOR (S2448) Standard (Part 841742) recombinant human phospho-TOR	Duo Set IC Human Phospho-TOR (R&D Systems)

Streptavidin-HRP (Part 890803)	Duo Set IC Human Phospho-TOR (R&D Systems)
PBS 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄	R&D Systems, Catalog # DY006
Waschpuffer: 0,05% Tween® 20 in PBS	R&D Systems, Catalog # WA126
Blockingpuffer: 1% BSA in PBS	R&D Systems
IC Diluent #1: 1% BSA in PBS	R&D Systems, Catalog # DY995
IC Diluent #4: 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100 in PBS	Thermo Fisher Scientific
Substrate Solution: 1:1 Mixtur von Color Reagent A (H ₂ O ₂) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)	R&D Systems, Catalog # DY 999
Stop Solution: 2 N H ₂ SO ₄	R&D Systems, Catalog # DY 994

6.2 Methoden

6.2.1 Patienten- und Kontrollkollektiv

Insgesamt wurden 72 Blutproben für molekular- und proteinchemische Analysen gesammelt, in denen eine mTOR-mRNA-, phospho-mTOR-Protein- und miR-496-Expression durchgeführt werden sollte. Das Kollektiv umfasste 36 Blutproben von T2DM-Patienten mit einem Durchschnittsalter von 71 Jahren (Bereich: 56-88 Jahre) und 36 Blutproben von Kontrollprobanden ohne T2DM mit einem Durchschnittsalter von 69 Jahren (Bereich: 56-88 Jahre), die hinsichtlich ihres BMI an das Patientenkollektiv angepasst waren. Die Patientendaten und -merkmale wurden prospektiv aus den klinischen Aufzeichnungen akquiriert und sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Der BMI ist definiert als das Gewicht in Kilogramm geteilt durch das Quadrat der Höhe in Metern (kg/m^2) (Tabelle 2) (49). T2DM-Patienten wurden in der Ambulanz der Abteilung für Innere Medizin II der Uniklinik Homburg rekrutiert. Um eine entsprechende Kontrollkohorte zusammenzustellen, wurden Blutproben von älteren Teilnehmern des Bluttransfusionszentrums der Universität des Saarlandes und von älteren, gesunden Personen gesammelt, die sich routinemäßigen Kontrolluntersuchungen in unserer Klinik unterzogen. Alle Spender sind nicht miteinander verwandte Personen der mitteleuropäischen kaukasischen Ethnie. Eine Einverständniserklärung für die Blutentnahme wurde von allen Blutspendern erhalten. Die Studie wurde durch die Ethikkommission des Saarlandes genehmigt (Ethikantragsnummer: 34/15).

6.2.2 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung der Biocoll-Lösung (Kat.-Nr.: 6715, Biochrom, Berlin, Deutschland) isoliert. Allen Patienten und Kontrollprobanden wurden jeweils 10 ml Blut in Li-Heparinröhrchen abgenommen, welches anschließend für die Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL) verwendet wurde (aus 1 ml Vollblut erhält man ca. $1 \cdot 10^6$ PBL's). Das Blut wurde in 50 ml Falcons pipettiert und mit sterilem PBS 1:1 verdünnt. Daraufhin wurde die Blut/PBS-Suspension mit 15 ml Biocoll-Reagenz vorsichtig unterschichtet und anschließend einer 20 minütigen Dichtegradientenzentrifugation in einer Eppendorf Zentrifuge bei 1200 g unterzogen. Die Interphase, bestehend u. a. aus mononukleären Zellen wurde nach diesem Schritt mit einer 5 ml Pipette vollständig abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon

überführt, welches anschließend wieder mit sterilem PBS aufgefüllt wurde. Es schloss sich ein Zentrifugationszyklus bei 600 g für 10 min an. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet leicht mit dem Finger vom Boden des Falcons aufgeklopft und mit 1 ml PBS resuspendiert. Diese Lösung wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß umgefüllt und in einer Eppendorf Zentrifuge bei 1400 rpm und 4°C, 3 min lang aufgetrennt, sodass der Waschpuffer nach diesem Vorgang abpipettiert werden konnte. Im nächsten Schritt erfolgte dann die Zugabe von 700 µl QIAzol Lysis Reagenz. Das nun entstandene homogene Zelllysat konnte nun umgehend bei -70°C weggefroren werden.

6.2.3 RNA- und Proteinisolation aus PBMC

Für die RNA-Extraktion wurde das Qiagen miRNeasy Mini Kit (Kat.-Nr.: 21704, Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet, das die Isolierung von Gesamt-RNA einschließlich microRNAs aus PBMC ermöglicht. Die Proteine wurden unter Verwendung einer Ethanol-Bromchlorpropan-Wasser-Mischung isoliert und der Proteinniederschlag wurde in einer 4%igen SDS-Lösung aufgelöst. Hierbei ging der Isolation eine Phenol/Chloroform Extraktion des lysierten Zellpellets voraus. Die wässrige Phase (ca. 350µl), die sich hierbei nach Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C als Überstand bildete wurde in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die untere Phase in der nunmehr die Proteine und die DNA vorhanden waren, wurde bei -20°C bis zur endgültigen Proteinisolation gelagert. Zur RNA wurde nun 525µl Ethanol (100%) hinzugefügt um optimale Bindungseigenschaften auf der RNeasy-Mini-Säule bzw. auf der Silicagel-Membran zu schaffen. Anschließend wurde das Lysat mit dem Ethanol gut gemischt und max. 450 µl im ersten Durchgang auf die Säule aufgebracht und für 20 Sek. bei 10000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Dies wurde später für den übrigbleibenden Rest des Gemisches wiederholt. Durch diesen Prozess und die anschließende Pufferzugabe, wie laut Herstellerangaben beschrieben, sowie jeweils anschließender Zentrifugation bei 10000 rpm, wurde die RNA aufgereinigt. Nach Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser auf die Säule und einem letzten Zentrifugationsschritt konnte das nun entstandene RNA-Eluat schließlich bei -80°C, für die sich später anschließende cDNA Synthese gelagert werden.

Später erfolgte die Isolation der Proteine. Hierzu wurde die Phenolphase aufgetaut. Die noch enthaltene DNA wurde durch Zugabe von 400 µl Ethanol und Zentrifugation für 15 min bei 6000 rpm und 4°C gefällt. Der Proteinüberstand (insgesamt 800µl in Phenol/Ethanol) wurde

nun auf je 400 μ l in 2 Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt. Danach wurden zu je 400 μ l proteinhaltiger Lösung 800 μ l Ethanol (100%), 200 μ l Bromochloropropan und 530 μ l Aqua bidest. hinzugegeben. Nun wurde für 8 min bei 12000 rpm zentrifugiert und die wässrige, obere Phase, abgenommen. Die Proteine die sich nun in der Interphase befanden, wurden mit 1 ml Ethanol (100%) gewaschen und für 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Diesen Vorgang wiederholte man nun noch ein weiteres Mal, um anschließend das vorhandene Proteinpellet für ca. 20 min unter dem Abzug trocknen zu lassen. Im letzten Schritt wurden ca. 100 μ l SDS-Lösung (4%) zum Pellet gegeben und zur besseren Löslichkeit die Probe für 5 min im Eppendorf Thermomixer auf 50°C erwärmt. So konnte die fertige Protein/SDS-Lösung bei -20°C, bis zur Gesamtproteinbestimmung bzw. zum ELISA-Immunoassay gelagert werden. Weitergehende Details zur simultanen Isolierung von Proteinen und Nukleinsäuren aus PBMC wurden bereits an anderer Stelle beschrieben (7).

6.2.4 Einzelsträngige cDNA-Synthese

Bei der RT-PCR wird mittels dem Enzym Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) eine Kopie-DNA (cDNA) hergestellt. Hierzu wurden vor der cDNA-Synthese sämtliche RNA-Proben die bei -80°C lagerten photometrisch gemessen und so die aktuelle Konzentration in μ g/ml festgestellt. Für die mTOR-cDNA-Synthese wurde das High Capacity Reverse Transcription Kit (Kat.-Nr.: 4368814, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet, um 1 μ g jeder mit dem Qiagen RNeasy Mini-Kit isolierten Gesamt-RNA-Probe in einem Endreaktionsvolumen von 25 μ l in cDNA umzuwandeln. Zusätzlich benötigt man für die Synthese Primer um ein freies 3' Hydroxylende zu schaffen an dem die Reverse Transkriptase die Synthese starten kann, des Weiteren dNTP's als Bausteine für die neu entstehende cDNA und ein Puffermedium. Dementsprechend waren im Reaktionsvolumen 1x TaqMan RT-Puffer, 4 mM dNTPs und 3 U/ μ l Multiscribe RT sowie 1x random primers enthalten. Die Synthese fand im Gene AMP System 2700 (Applied Biosystems) statt. Die Zyklusbedingungen betragen 10 Minuten bei 27 °C, 120 Minuten bei 37 °C und 5 Minuten bei 85 °C. Für die miRNA-cDNA-Synthese wurde der TaqMan micro RNA Reverse Transcription Kit von Thermo Fisher (Kat.-Nr.: 4366597) verwendet, um 10 ng Gesamt-RNA (welche vorher mit dem miRNeasy-Kit isolierte wurde) in ein Endreaktionsvolumen von 15 μ l (enthaltend 1 x RT-Puffer, 1 mM dNTPs, 3,33 U/ μ l Multiscribe RT und 0,05 U/ μ l RNase-Inhibitor) umzuschreiben. Anstelle von random primern wurden 1 x spezifische miR-496-Primer in dem

cDNA-Syntheseschritt angewendet. Die Zyklusbedingungen betragen 30 Minuten bei 16°C, 30 Minuten bei 42°C und 5 Minuten bei 85°C. Ein Kontrollansatz wurde ebenfalls bei jedem Durchgang der cDNA-Synthese mitbearbeitet. Damit man eine Verunreinigung der Proben mit DNA ausschließen konnte, wurde diesem deshalb keine RT zugesetzt.

6.2.5 Quantitative Real-Time PCR

Bei der q-RT-PCR laufen die einzelnen Reaktionschritte zur quantitativen Detektion der Zielsequenzen folgendermaßen ab. Die Taq-Man Sonde hybridisiert zwischen die beiden Primer an die Zielsequenz der cDNA. Die Sonde ist mit einem Quencher-Farbstoff am 3'-Ende und mit einem Reporterfarbstoff am 5'-Ende bestückt. Die Distanz zwischen Reporter und Quencher auf molekularer Ebene ist so gering, dass das Farbsignal des Reporters durch den Quencher unterdrückt wird. Wird nun durch die Synthese der Reversen Transkriptase vom 5'-Ende die Elongation des komplementären DNA-Stranges durchgeführt, wird der Reporter durch Dissoziation von der Sonde vom Quencher getrennt. Dadurch kann das Fluoreszenzsignal des Reporters ansteigen und gibt so eine Aussage über den quantitativen Anteil der entsprechenden Gensequenz in der Probe, denn die Fluoreszenz ist proportional zur Anzahl der entstehenden PCR-Produkte. Dieser Prozess ist in nachstehender Abbildung noch einmal aufgeführt.

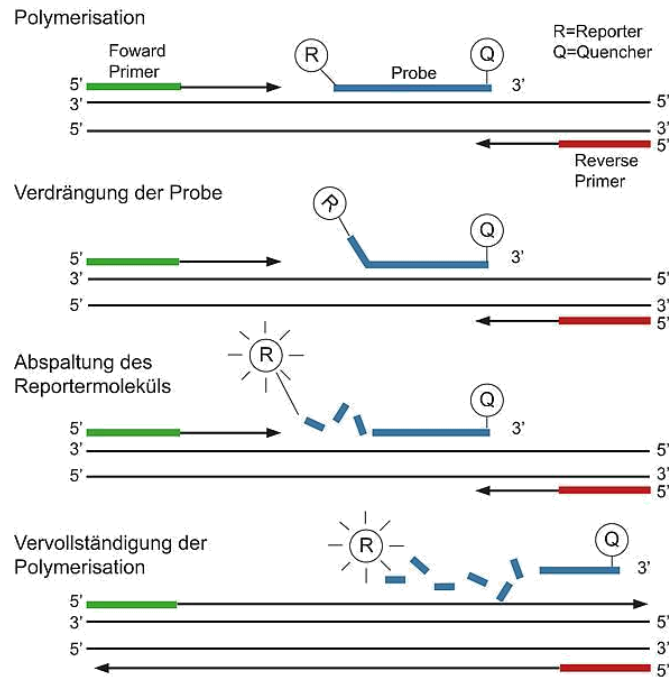


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Quantitativen Real-Time PCR (Quelle: Thermo Fisher Scientific)

Die qRT-PCR für den mTOR-mRNA-Nachweis wurde unter Verwendung von 2 x 10 µl Taqman Universal PCR Master Mix II und 1 µl mTOR-Genexpressionsassay (Kat.-Nr.: Hs00234508_m1, Thermo Fisher), 8 µl RNase-freiem Wasser und 1 µl cDNA-Matrize (50 ng/µl) durchgeführt. Die qRT-PCR für die miR-496 (Kat.-Nr.: TM 001042, Thermo Fisher) Detektion wurde analog dem oben beschriebenen Ansatz durchgeführt. Duplikate wurden für alle Reaktionen zusammen ohne Matrizenkontrollen und einer zusätzlichen Kontrolle für DNA-Kontaminationen durchgeführt, wobei die Reverse Transkriptase weggelassen wurde. Als Detektionssystem wurde der ABI Prism 7900 Sequenzdetektor (Thermo Fisher), auf einen anfänglichen Schritt von 10 min bei 95°C programmiert, gefolgt von 40 thermischen Zyklen von 15 s bei 95 °C und 10 min bei 60 °C. Die logarithmisch-lineare Phase der Amplifikation wurde überwacht, um CT-Werte für jede RNA-Probe zu bestimmen. Das Expressionsniveau der mTOR-mRNA wurde in Relation zum Gehalt der housekeeping-Gene (Proteasom-Untereinheit beta Typ-6 (PSMB6) (Kat.-Nr.: Hs00382586_m1, Thermo Fisher)) für mTOR und (RNU48 (Kat.-Nr.: TM 001006, Thermo Fisher)) für miR-496 analysiert (35). Die Umwandlung der einzelnen CT-Werte in die lineare Form wurde gemäß der 2-Delta-CT-Methode und der relativen Standardkurvenmethode durchgeführt.

6.2.6 BCA-Assay

Die Gesamtproteinbestimmung erfolgte mit der sogenannten Bicinchoninsäuremethode. Bei diesem Verfahren macht man sich zunutze, dass Proteine in alkalischer Lösung, Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduzieren.

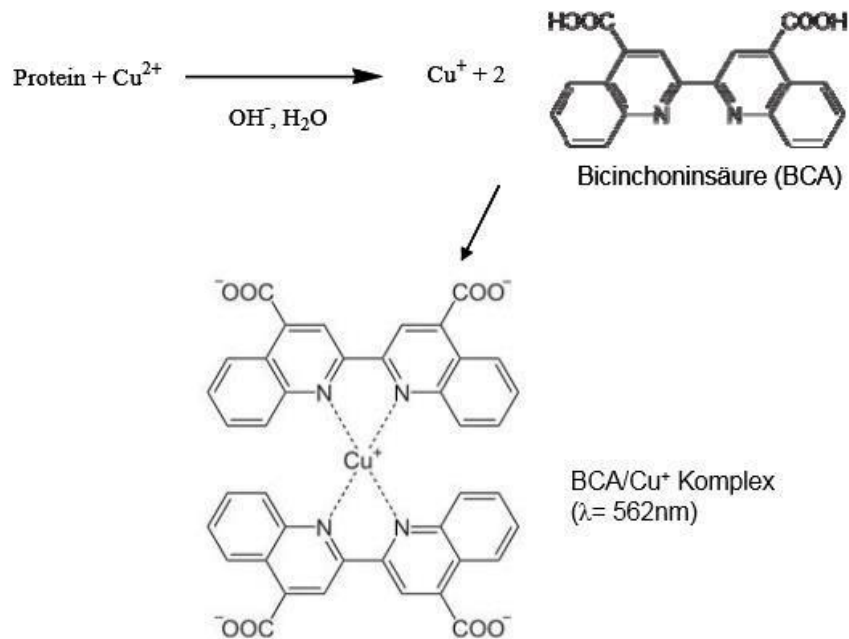


Abbildung 2: BCA-Methode (Quelle: Thermo Fisher Scientific)

Der dabei entstehende violette Farbkomplex aus BCA/Cu^+ kann dann bei einer Wellenlänge von 562 nm im Photometer detektiert werden. Da die gemessene Extinktion proportional zur Proteinkonzentration in der Probe ist, kann somit nach Erstellen einer Standardverdünnungsreihe, bei der die Konzentration bekannt ist, auf die entsprechende Konzentration der Probe geschlossen werden. Eventuell durchgeführte Verdünnungen der Proteinproben vor der photometrischen Messung, werden später vom Gerät berücksichtigt. Die Proteinlysate wurden vor der Messung mit Aq. dest. verdünnt. Anschließend wurden je 10 μl der Proben im Doppelanatz auf eine 96 well Platte vorgelegt, dasselbe Volumen wurde für die Standardverdünnungsreihe eingesetzt. Zur Detektion der Proteinkonzentration wurden pro well schließlich 200 μl Reagenz hinzugefügt wobei hierin 50 Anteile BCA und ein Anteil 4 % Kupfer(II)sulfat ent-

halten waren. Nun wurde die Platte noch für 30 min bei 37°C inkubiert und konnte danach im Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 562 nm ausgelesen werden.

6.2.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA Immunoassay ermöglicht es, Proteinmengen in biologischen Proben quantitativ zu messen. Die Technik beruht darauf, dass die gesuchten Antigene mit spezifischen, vom Untersucher ausgewählten Antikörpern eine Bindung eingehen, wobei der Antikörper mit seinem Fab-Fragment am Epitop des Antigens bindet. Beim sogenannten Sandwich-ELISA, wird zunächst ein Primärantikörper auf die Platte gecoatet, nach Inkubation dann ein Absättigungspuffer hinzugegeben, der dafür sorgt, dass eine Bindung an unbeschichteten Flächen nicht stattfinden kann. Nach einem Waschschrift werden dann die Proben hinzupipettiert. Diese können nun unter etwas längerer Inkubation an die gecoateten Antikörper binden. Damit nicht bindende Probenanteile entfernt werden, erfolgt schließlich noch ein Waschschrift. Nun wird der biotinylierte Sekundärantikörper hinzugegeben, der ebenfalls an ein Epitop des Antigens bindet, dieser dient als Detektionsantikörper. Das Antigen liegt nun genau zwischen den beiden Antikörpern, weshalb dieses Verfahren den Namen Sandwich-ELISA trägt. Anschließend wird in einem weiteren Waschschrift ein zuviel an Sekundärantikörper abgewaschen, dann Streptavidin hinzugegeben welches mit Meerrettichperoxidase (HRP), einem Enzym, konjugiert ist. Durch die Zugabe eines chromogenen Substrats (Tetramethylbenzidin), welches vom Enzym umgesetzt wird kann schließlich die enthaltene Proteinmenge bestimmt werden, die proportional zur Farbentwicklung ist. Die Farbreaktion wird mit 2 molarer Schwefelsäure abgestoppt. Durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im Photometer, und mit Abgleich bekannter Proteinkonzentrationen aus der Standardkurve kann schließlich der Proteingehalt der Proben quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde das Expressionsniveau von humanem Phospho-mTOR-Protein durch ELISA vom Sandwich-Typ mit dem R&D-Duoset DYC1665 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) gemäß dem Protokoll des Herstellers quantifiziert. Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: Auf eine 96 well Platte wurden 100 µl des Coating Antikörper aufgebracht, mit einer Folie verschlossen und über Nacht inkubiert. Vom Antikörper wurde eine Konzentration von 2 µg/ml (vorher mit PBS verdünnt) eingesetzt. Nun wurde die Platte mit dem selbst hergestellten Waschpuffer (bestehend aus 200 ml PBS, 1800 ml Aq. dest. und 1 ml 0,05 % Tween 20) gewaschen. Anschließend wurden 300 µl vom Blocking Puffer (1g BSA auf 100 ml PBS) 2 h lang aufgetra-

gen um zu verhindern, dass eine Bindung an unbeschichteten Flächen nicht stattfinden kann. Die Proben wurden je nachdem wie viel Ausgangsmaterial zur Verfügung stand, in unterschiedlichen Verhältnissen verdünnt, welche später im Photometer wieder berücksichtigt wurden. Des Weiteren wurde eine Standardverdünnungsreihe erstellt, die Ausgangskonzentration des Human Phospho-TOR Standard betrug dabei 420 ng/ml. Diese wurde zunächst auf 10000 pg/ml verdünnt und schrittweise halbiert bis auf 156 pg/ml, dabei wurde der IC Diluent #4 (1mM EDTA, 0,5% Triton X-100 in PBS) aus dem Duo Set verwendet. Anschließend wurden je 100 µl vom Standard und von den Proben im Doppelansatz auf die 96 well Platte aufgetragen, die Platte mit einer Folie abgedeckt und bis zum nächsten Tag inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde dann im IC Diluent #1 (1% BSA in PBS) auf 1 µg/ml verdünnt und je 100 µl pro well aufgetragen. Das Streptavidin-HRP wurde ebenfalls im IC Diluent #1 1:200 verdünnt und 100 µl in jede well eingebracht. Nun wurde die Platte für 20 min bei Raumtemperatur ohne direkte Lichtzufuhr inkubiert. Schließlich wurden 100 µl der Substratlösung bestehend aus einer 1:1 Mixtur aus H₂O₂ und Tetramethylbenzidin in jede well gegeben. Zum Abstoppen des Vorgangs wurden im letzten Schritt 50 µl der Stopp-Lösung (2 N H₂SO₄) pro well verwendet.

Die Proben wurden zweifach getestet, wobei alle Werte als Mittelwert von zwei Messungen berechnet wurden. Zur Messung der Proteinexpressionsniveaus wurde die Extinktion bei 450 nm (mit einer Referenzwellenlänge von 562 nm) in einem 96-Loch-Mikrotiterplattenlesegerät abgelesen. Die Phospho-mTOR-Proteinkonzentration wurde auf den Gesamtproteingehalt jeder Probe normalisiert. Dieser wurde vorher mithilfe der BCA-Methode (siehe Abschnitt 6.2.6) entsprechend des Herstellerprotokolls (Pierce™ BCA Protein Assay Kit 23225, Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

6.2.8 Statistik

MTOR-mRNA- und Proteinexpressionsprofile sowie miR-496 Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Mittels t-Test wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen bestimmt. Die Signifikanzniveaus betragen $P < 0,05$ bzw. $P < 0,0001$.

7. Ergebnisse

Die mTOR-mRNA und Phospho-mTOR-Proteinexpression sind bei Diabetes Mellitus Typ 2 Patienten signifikant erhöht.

Die mTOR-Aktivität, die sich in der Phospho-mTOR-Proteinexpression widerspiegelt, wurde bei T2DM-Patienten (Durchschnittsalter: 71,2 Jahre, Bereich: 56-88 Jahre) und einer Kontrollkohorte mit ähnlichem BMI (Durchschnittsalter: 69,3 Jahre, Bereich: 56-88 Jahre), untersucht. Es wurden hierbei nur T2DM Patienten mit Präadipositas und Adipositas Grad 1 (n = 20) ausgewählt, um sie mit einer Kontrollkohorte zu vergleichen, die keinen manifesten T2DM Befund hatte, aber ebenfalls Präadipositas und Adipositas Grad 1 zeigte (n = 36). Wie in Abbildung 1A dargestellt, sind die Phospho-mTOR-Proteinspiegel in PBMC von T2DM-Patienten im Vergleich zur Kontrollkohorte (P = 0,0001) signifikant erhöht.

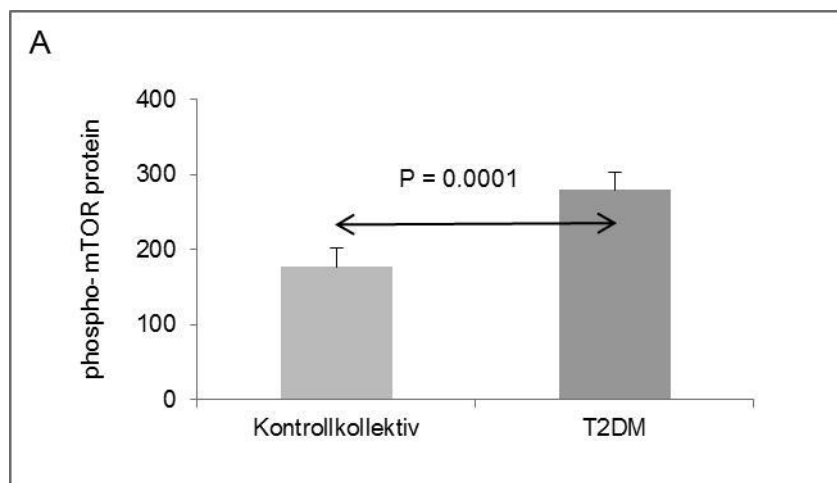


Abbildung 3 A: Die Phospho-mTOR-Proteinexpression ist in T2DM-Patienten signifikant erhöht. MTOR-Proteine wurden durch ELISA in Gesamtzelllysaten von PBMC, die aus T2DM-Patienten und alters- sowie BMI angepassten Kontrollprobanden ohne T2DM isoliert wurden, bestimmt und als pg/ml pro mg Gesamtprotein deklariert. Fehlerbalken bezeichnen SEM (n = 20 und 36, respektive).

Darüber hinaus war auch die mTOR-mRNA in PBMC der T2DM-Patientenkohorte im Vergleich zur Kontrollkohorte signifikant erhöht ($P = 0,0001$, 1B) (Abbildung 1B). Da sich die beiden alters- und BMI angeglichenen Patientengruppen nur in einem Faktor, ihrer T2DM Erkrankung unterscheiden, darf davon ausgegangen werden, dass der signifikante Anstieg der mTOR-Expression auf mRNA- und Proteinebene auf die T2DM Erkrankung zurückzuführen ist.

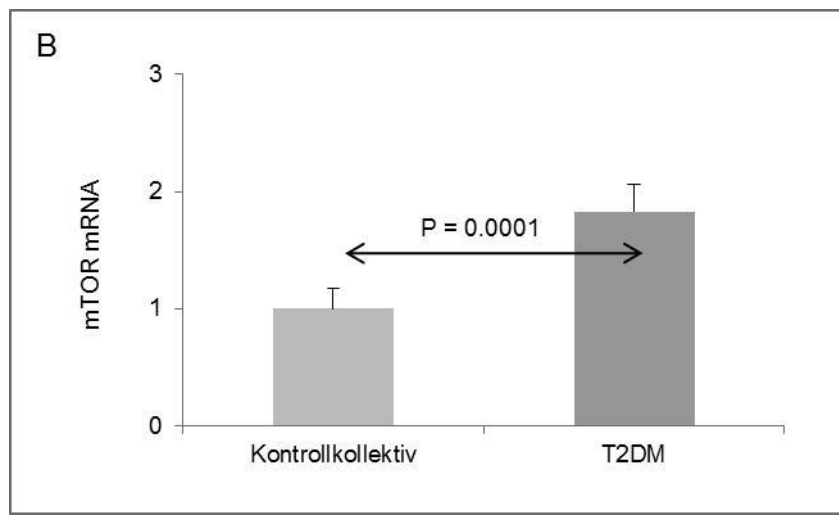


Abbildung 3B: MTOR-mRNA ist in T2DM signifikant erhöht. Die Abbildung zeigt die relative mTOR-mRNA-Expression in PBMCs von Diabetikern und gesunden Kontrollen. MTOR-mRNA-Spiegel sind in PBMCs von Diabetikern signifikant hochreguliert. Der Nachweis der mTOR-mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR an demselben Patientenkollektiv durchgeführt. Fehlerbalken bezeichnen SEM (jeweils $n = 20$ und 36 , respektive).

MiR-496 ist in Diabetes Mellitus Typ 2 Patienten signifikant herunterreguliert.

Die miR-496-Expression wurde in den gleichen PBMC der T2DM-Patienten und Kontrollpersonen analysiert, die zuvor auch auf die mTOR-Expression untersucht worden waren. Hierbei zeigt sich, dass die miR-496-Expression in den PBMC der T2DM-Patienten im Vergleich zu den Kontrollblutspendern um ungefähr 80% herunterreguliert ist ($P < 0,0001$), siehe Abbildung 2. Die Expression der miRNA-496 einerseits und die mTOR-mRNA- und Proteinexpression andererseits, werden in der Typ 2 Diabetes Mellitus Gruppe gegenüber der Kontroll-

gruppe ohne manifesten T2DM Befund reziprok exprimiert, was darauf hindeutet, dass die miR-496 über die Regulation von mTOR T2DM beeinflussen könnte.

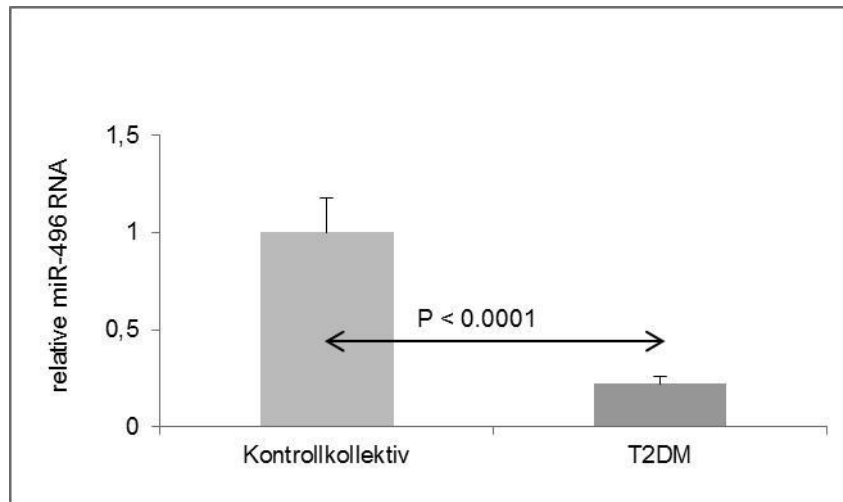


Abbildung 4: Signifikante Unterexpression der miR-496 RNA in Typ 2 Diabetes mellitus im Vergleich zur Kontrollgruppe. MiR-496-Expressionslevel sind in PBMC von T2DM-Patienten signifikant reduziert. MiR-496 wurde durch qRT-PCR aus der zellulären Gesamt-RNA, die aus PBMC von T2DM-Patienten und alters-/BMI angepassten Kontrollprobanden ohne T2DM hergestellt wurde, quantifiziert. Fehlerbalken bezeichnen SEM (jeweils n = 20 und 36, respektive).

BMI abhängige Hochregulation der mTOR-Aktivität

Nachdem gezeigt wurde, dass die mTOR-Aktivität in der T2DM-Patientenkohorte signifikant hochreguliert ist, wurde untersucht, ob auch verschiedene Adipositasgrade einen Einfluss auf die mTOR-Aktivität bzw. die miR-496 Expression haben. Daher wurde die Phospho-mTOR-Proteinexpression vergleichend bei T2DM-Patienten mit Präadipositas und Adipositas Grad 1 einerseits (n = 20) und bei T2DM-Patienten mit Adipositas Grad 2 bzw. 3 andererseits (n = 16) untersucht. Wie Abbildung 5 zeigt, sind die Phospho-mTOR-Proteinspiegel in den PBMC von T2DM-Patienten mit Adipositas Grad 2 und 3 im Vergleich zu T2DM-Patienten mit Präadipositas und Adipositas Grad 1 signifikant erhöht (P < 0,05).

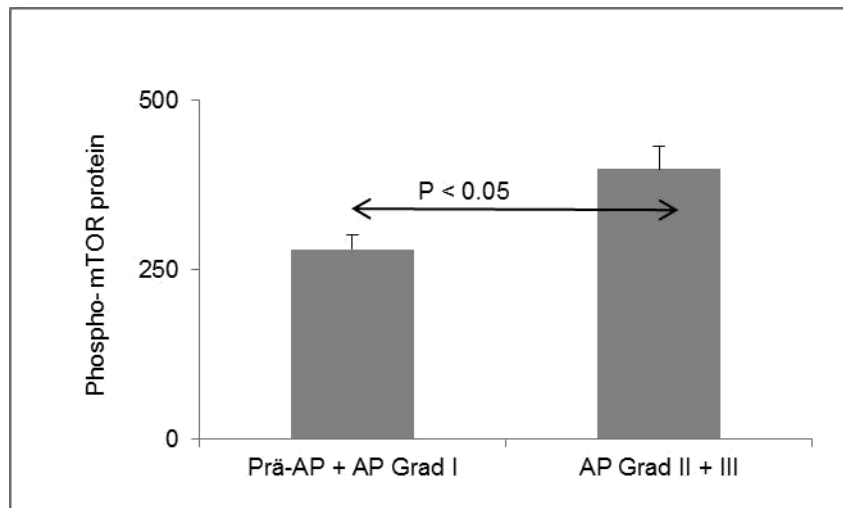


Abbildung 5: BMI-abhängiger mTOR-Anstieg bei T2DM-Patienten. Phospho-mTOR-Proteinspiegel sind in PBMC von T2DM-Patienten mit Adipositas Grad II und III (n = 16) im Vergleich zu T2DM-Patienten mit Präadipositas oder Adipositas Grad I (n = 20) signifikant hochreguliert. MTOR-Proteine wurden durch ELISA in Gesamtzelllysaten von PBMC, die aus T2DM-Patienten isoliert wurden, bestimmt und als pg/ml pro mg Gesamtprotein ausgedrückt. Fehlerbalken bezeichnen SEM.

Mit zunehmendem Adipositasgrad erhöht sich somit die mTOR-Aktivität signifikant. Demgegenüber wurde die entgegengesetzte Tendenz, d.h. eine signifikante Herunterregulation von miR-496 mit zunehmenden Adipositasgraden beobachtet, wie in Abbildung 6 dargestellt ($p < 0,05$).

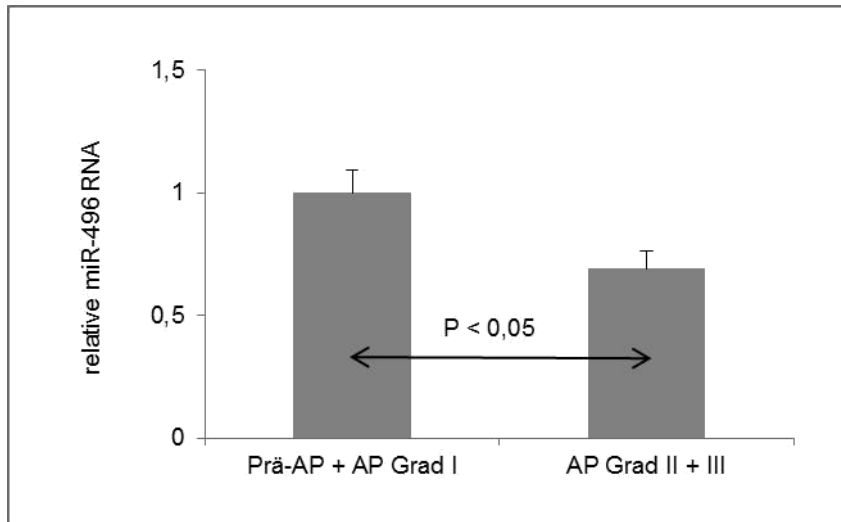


Abbildung 6: BMI-abhängiger miR-496-Abfall bei T2DM-Patienten. MiR-496-Expressionslevel wurden durch qRT-PCR an der zellulären Gesamt-RNA, die aus PBMC von T2DM-Patienten hergestellt wurde, quantifiziert. MiR-496-Spiegel sind bei T2DM-Patienten mit Adipositas Grad II und III (n = 16) im Vergleich zu T2DM-Patienten mit Präadipositas oder Adipositas Grad I (n = 20) herunterreguliert. Fehlerbalken bezeichnen SEM.

8. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikante miR-496-abhängige mTOR-mRNA- und Proteinüberexpression auf der zellulären Ebene bei T2DM-Patienten. Darüber hinaus wird gezeigt, dass der Fortschritt der Adipositaserkrankung mit einer höheren mTOR-Aktivität einhergeht, da in der T2DM-Kohorte höhere Phospho-mTOR-Proteinspiegel in fortgeschrittenen Adipositasstadien gemessen wurden. Es ist mittlerweile belegt, dass T2DM und Adipositas im Rahmen des metabolischen Syndroms Erkrankungen sind, die stark miteinander verknüpft sind, insbesondere weil periphere Gewebe wie z. B. Fettgewebe bei T2DM nicht mehr auf Insulin ansprechen (19). Neuere Befunde weisen mTOR darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Lipidverteilung in normalerweise weniger fettreichen Geweben wie Herz, Leber oder Skelettmuskel zu, wo dies nachteilige Auswirkungen haben kann (6). Demgegenüber wurde gezeigt, dass mTORC1 in den Geweben von adipösen und mit hohem Fettanteil gefütterten Nagetieren sehr aktiv ist und eine mögliche Beteiligung an Adipositas gekoppelter Insulinresistenz wurde postuliert (16). Die Lipogenese wird aber nicht nur durch mTORC1 reguliert, sondern es wurde auch ein von mTORC2 gesteuerter Lipogeneseweg beschrieben (12, 52). Somit sind sowohl mTORC1 als auch mTORC2 für die sterol-regulatory-element-binding-protein (SREBP) abhängige hepatische Lipogenese erforderlich. Abnorme Fettverteilung führt zur Entwicklung von verschiedenen Stoffwechselerkrankungen, einschließlich der Pathogenese der Insulinresistenz und T2DM (4, 38). Bei Adipositas steigen die zirkulierenden Fettsäurespiegel viel stärker und unproportional zur Körperfettmasse an. Als ein zentraler Regulator des Lipidmetabolismus und der -speicherung stimuliert mTOR, insbesondere mTORC1, hier die Aktivierung der De-novo-Lipogenese und die Unterdrückung der Lipolyse und fördert so die Adipogenese. Die mTORC1-gesteuerte Suppression der Lipolyse wiederum wird durch die Hemmung der Adipozytentriglyceridlipase (ATGL), die den ersten Schritt der Lipolyse katalysiert und darüber hinaus, durch Aktivierung der oxidativen Phosphorylierung erreicht, wodurch ATGL-Produkte als Induktoren der Insulinresistenz entfernt werden (5, 18, 32). In braunem Fettgewebe wird zudem das an den Insulinrezeptor bindende Protein Grb10, ein direktes Substrat von mTOR, hoch exprimiert und fördert hier in phosphorylierter Form die Lipolyse und Thermogenese durch Feedback-Hemmung von mTORC1 (20). Diese Prozesse führen zu einer massiven Anhäufung von Triglyceriden, was zu einer Ausdehnung des Fettgewebes führt (6). Die durch Fettleibigkeit verursachte Hyperaktivierung von mTORC1 hält also zirkulierende Fettsäuren im physiologischen Bereich. In dieser Hinsicht könnte der signifikante BMI-abhängige Anstieg der mTOR-

mRNA- und Proteinexpression, welcher in der T2DM-Patientenkohorte beobachtet wird, die Bestrebung von mTOR widerspiegeln, die Triglyceridreserven auf das eigentliche Fettgewebe beschränkt zu halten. Daher kann die BMI-abhängige mTOR-Überexpression, wie sie bei T2DM-Patienten beobachtet wird, als ein kompensatorischer Mechanismus angesehen werden, um den Körper vor metabolischen Schäden zu schützen. Mit der weiteren Entwicklung der Insulinresistenz verliert mTORC 1 jedoch seine Insulinsensitivität (28) und die Lipolyse wird gemäß dem aktuellen Modell über die metabolischen Bedürfnisse des Körpers hinaus verändert (11, 38). Mehrere aktuelle Berichte unterstützen den Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit und mTOR-Aktivität. Es wurde gezeigt, dass die Hemmung von Foxa2 in der Leber den mTOR-Signalweg aktiviert, und hierdurch eine erhöhte hepatische Lipogenese und Fettleibigkeit induziert wird (3). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die durch Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme und die daraus resultierende Fettleibigkeit von zentraler mTORC1 / S6K1-Signalgebung abhängen (41). Das Bromodomänen enthaltende Protein 2 (Brd 2) verringert die Expression des mTOR-interagierenden Proteins (Deptor), um die mTOR-Signalgebung zu verstärken. So induzierte Brd2 über den mTOR / Akt-Signalweg eine Insulinresistenz und eine Entzündungsreaktion im Fettgewebe (43). Zunehmende Evidenz deutet zusätzlich auf eine Beteiligung von miRNAs in der mTOR-assoziierten Pathogenese von T2DM und Adipositas hin. Durch Bindung an regulatorische Stellen der Ziel-mRNA modifizieren miRNAs ihre Expression durch Translationsrepression oder Ziel-mRNA-Abbau, wodurch eine verminderte Proteinproduktion verursacht wird (2). MiRNAs sind an der Regulation der Insulinsekretion sowie -antwort und an der Glucosehomöostase beteiligt (45). Darüber hinaus werden sie in der Adipozytendifferenzierung und Fettsäuresynthese in Hepatozyten benötigt (31). Jüngste Studien haben miRNAs als neuartige Biomarker für das Screening von Personen mit hohem T2DM-Risiko eingesetzt und sie als therapeutische Ziele für Adipositas und mit Adipositas in Verbindung stehenden Komplikationen vorgeschlagen (26). Derzeit wird angenommen, dass zirkulierende miRNA-Expressionsprofile in Abhängigkeit von BMI- und auch T2DM variieren, so dass sich die miRNA-Regulation auch in den unterschiedlichen Adipositasgraden widerspiegelt (27, 30). In dieser Hinsicht wurde auch die miR-100 mit Adipositas und T2DM in Verbindung gebracht, da sich gezeigt hat, dass die zirkulierende und im viszeralen Fett vorhandene miR-100 bei Patienten mit Adipositas und T2DM reprimiert wird (30). Dementsprechend wird vermutet, dass die miR-100 IGF-1R und mTOR moduliert und Adipogenese vermittelt. Eine weitere miRNA, die im Verdacht steht, eine wichtige Rolle in der Pathogenese von T2DM zu spielen, ist die miR-99a, von der man annimmt,

dass sie die insulininduzierte Proliferation, Migration und Phänotyp-Umwandlung von vaskulären glatten Muskelzellen zumindest teilweise durch Hemmung von IGF-1R und mTOR-Expression hemmt (55). Auch kann die miR-7a als eine mTOR-regulierende Bremse der adulten β -Zell-Proliferation wirken, welche ein kritischer Faktor bei regenerativen therapeutischen Ansätzen für Diabetes Mellitus ist. Darüber hinaus aktiviert die Hemmung von miR-7a die mTOR-Signalgebung und fördert die adulte β -Zell-Replikation in primären Maus-Inselzellen (46). Die hier präsentierten Daten deuten stark auf eine Rolle der miR-496 bei der Regulierung von Typ 2 Diabetes Mellitus und Adipositas über eine Expressionskontrolle von mTOR hin. So wurde reziprok zur mTOR-Induktion eine miR-496-Repression in der gleichen T2DM-Patientenkohorte beobachtet. Ferner tendierte die miR-496 dazu, mit fortgeschrittenen Adipositasgraden weiter herunterreguliert zu werden. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass Metformin, ein Biguanid, welches unter anderem über eine Hemmung der Glukosefreisetzung in der Leber wirkt und in der heutigen Diabetestherapie standardmäßig als orales Antidiabetikum eingesetzt wird, dazu in der Lage ist, zusätzlich den mTOR-Signalweg zu inhibieren (51). Mehrere andere Studien zeigen den positiven Einfluss einer Therapie mit Sirolimus, besser bekannt als Rapamycin, einem hoch potenten mTOR-Inhibitor, der in der Transplantationsmedizin eingesetzt wird. Es wurde festgestellt, dass eine Therapie mit Rapamycin das Potential hat, diabetische Folgeerkrankungen zu vermindern. Zum Beispiel konnte eine Rapamycinbehandlung die Gewichtszunahme sowohl in Ratten als auch im Menschen verhindern (51). Darüber hinaus zeigt auch eine Studie von Das und Durrant vielversprechende Ergebnisse, denn unter Therapie mit Rapamycin wurden das Körper- sowie Herzgewicht, der Plasma Glukosespiegel, die Triglycerid- sowie Insulinlevel in diabetischen Mäusen signifikant gesenkt (8). Des Weiteren wurde in dieser Studie der oxidative Stress durch Messungen des Glutathionspiegels erfasst. Hier zeigte sich ein signifikanter Rückgang des oxidativen Stresses bei Mäusen, die mit Rapamycin behandelt wurden. Durch die Behandlung mit Rapamycin konnte hier schlussendlich gezeigt werden, dass dieser mTOR-Inhibitor über mehrere Signalwege die kardiale Dysfunktion beeinflussen bzw. reduzieren kann. Eine andere, aktuellere Studie stimmt mit diesen Ergebnissen überein, denn sie belegt im Mausmodell, dass im hypoxischen Hirngewebe von Ratten mit induziertem Diabetes ein höherer Anteil an Neuronen zerstört wird, als an solchen Ratten die nicht unter Diabetes leiden. Wurde den Mäusen einen Monat vor der induzierten Ischämie Rapamycin verabreicht, verringerte sich der Hirnschaden durch die Inhibition von mTOR signifikant (21). Nicht nur Rapamycin sondern auch Vitamin D ist dazu in der Lage den mTOR Proteinkomplex zu inhibieren. Eine Studie zu die-

sem Thema zeigt nämlich, dass die mTOR Aktivität durch höhere Vitamin D3 Spiegel vermindert wird und dadurch zusätzlich auch die diabetische Nephropathie positiv beeinflusst wird (47). Hierzu passen auch andere Ergebnisse, die einen Zusammenhang zwischen einer Vitamin D Therapie und der Verbesserung der kardialen Funktionsparameter bei Kardiomyopathie zeigen. Auch hier wurde die Phosphorylierung bzw. Aktivierung des mTOR-Komplexes durch die Therapie mit Vitamin D signifikant gesenkt. Die Tiere bei denen das Vitamin-D-Rezeptor-Gen abgeschaltet wurde profitierten nicht von der oben genannten Therapie. Es zeigt sich also hier, dass die mTOR-Inhibition durch Vitamin D3 das Potential hat die diabetische Kardiomyopathie einzudämmen bzw. zu verhindern (33). Hier sind noch weitere Forschungsarbeiten von Nöten. Des Weiteren könnte auch die prophylaktische Vitamin D Substitution bei Diabetikern einen sinnvollen Nutzen zur Prävention der Folgekrankheiten haben, sowie durch eine frühzeitige Therapie mit anderen mTOR-Inhibitoren in Zukunft durchaus ein weiterer kurativer Ansatz zur Verfügung stehen (42). Insgesamt zeigt sich also durchgehend, dass durch Inhibierung von mTOR, sei es durch Metformin, Rapamycin oder Vitamin D eine Verbesserung der Pathogenese des Typ 2 Diabetes Mellitus erreicht wird. Hong et al. zeigen in einer Studie, dass Exendin-4, ein GLP-1 Analogon, welches bereits in der Typ 2 Diabetes Therapie verwendet wird, über eine Aktivierung des mTORC1 Pathways eine Downregulation von Ghrelin verursacht (13). Ghrelin seinerseits gilt als appetitanregendes Hormon, d. h. durch die mTORC1 Aktivierung wird laut dieser Studie die Nahrungsaufnahme reduziert, was unter Umständen auch auf einen kompensatorischen Mechanismus bei Typ 2 Diabetes Mellitus hindeuten könnte. Eine andere Arbeit postuliert darüber hinaus, dass der mTORC1 Komplex in diabetischen Inselzellen ebenfalls hochreguliert ist. Es zeigt sich dort eine erhöhte mTORC1 Aktivität in Patienten mit Typ 2 Diabetes sowie in diabetischen Mäusen, welche mit einer verringerten Betazellfunktion/-anzahl, verbunden sei. Gemessen wurde dies an der Glukose stimulierten Insulinsekretion (GSIS). Diese war in der Testgruppe signifikant vermindert. Ebenfalls vermindert war die Aktivität des mTORC2 Komplexes. Wurde nun der mTORC1 Komplex gehemmt, erholte sich die Betazellfunktion und die mTORC2 Aktivität stieg wieder an. Dies lässt vermuten, dass eine erhöhte mTORC1 Aktivität ein wesentliches Kennzeichen der Pathogenese des Typ 2 Diabetes Mellitus darstellt (53).

Eine Insulinresistenz kann auch durch Proteine im weissen Fettgewebe bewirkt werden. Die Überexpression eines Proteins (Brd2) im weißen Fettgewebe hat ebenfalls zur Folge, dass durch die Blockade eines mTOR hemmenden Proteins (Deptor), eine Insulinresistenz durch vermehrte Aktivität von mTOR ausgelöst wird (43). Darüber hinaus könnte mTOR auch als

Verbindung zwischen Diabetes und Alzheimer angesehen werden. Diabetes im mittleren Alter stellt einen Risikofaktor für die Demenzerkrankung dar (1). Es hat sich außerdem gezeigt, dass in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit der Wiedereintritt in den Zellzyklus eine entscheidende Rolle spielt. Dieser Wiedereintritt wird durch das Amyloid- β -Protein getriggert, welches in einer Aktivierung des mTORC1 Komplexes resultiert (25). Wird der Zellzyklus in Neuronen wieder aktiv, verläuft die Teilung ineffektiv und die Neuronen gehen letztendlich zugrunde (24). Es bleibt in Zukunft noch zu überprüfen, ob eine erhöhte mTOR-Aktivität bei Typ 2 Diabetikern per se mit einem höheren Risiko der Alzheimerentwicklung einhergeht und vielleicht sogar einen entscheidenden Anteil an der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit hat.

mTOR-Inhibitoren können auch Diabetes auslösen. Ungefähr 87 Prozent der mit mTOR-Inhibitoren behandelten Patienten entwickelten einen neu aufgetretenen Typ 3 Diabetes (17). Dieser war durch konventionelle Therapie gut behandelbar. Auch in der Transplantationsmedizin, in der immunsuppressive Medikamente wie z. B. Sirolimus eine große Bedeutung haben, zeigt sich durch die mTOR Blockade ein vermindertes Betazellwachstum sowie eine verminderte Insulinproduktion und Sekretion (34). Der Gebrauch von mTOR-Inhibitoren in der Krebstherapie zeigt ebenfalls eine erhöhte Assoziation mit dem Neuauftritt eines Diabetes Mellitus (40). Es ist aber abhängig von der Art der mTOR-Inhibition, ob eine Diabetes Erkrankung ausgelöst wird oder nicht. Wie oben erwähnt zeigt sich, dass das Immunsuppressivum Rapamycin (ein mTORC 1- und mTORC 2-Inhibitor) innerhalb einer chronischen Therapie einen Diabetes Mellitus auslösen kann. Resveratrol hingegen, welches man als Inhaltsstoff im Rotwein finden kann, ist ein spezifischer Inhibitor des mTORC 1 Komplexes und es hat sich gezeigt, dass Resveratrol einen positiven Einfluss auf Stoffwechselerkrankungen hat (44). Dies passt wiederum zu den Ergebnissen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit eruiert wurden, denn in den Diabetespatienten liegt eine erhöhte Aktivität des mTORC 1 Pathways vor. Ferner werden die positiven Effekte der mTORC 1 Inhibierung auf die Glukosetoleranz durch Rapamycin weitestgehend durch die Inhibierung des mTORC 2 Komplexes aufgehoben (14). Der mTORC2 Mechanismus bzw. seine Inhibition könnte deshalb auch ein wesentlicher Aspekt bei der Entstehung eines Diabetes Mellitus Typ 2 sein (14). Hinsichtlich des Risikofaktors der Adipositas zeigten Liu et al., dass Grb10 ein zelluläres Protein, dazu in der Lage ist Lipolyse durch die Hemmung des mTORC1 Komplexes zu bewirken (20). Dies unterstützt die Ergebnisse dieser Arbeit, denn Patienten mit einem höheren BMI zeigten eine signifikant erhöhte mTOR-Aktivität, was wiederum darauf hindeuten könnte, dass die Grb10 vermittelte

Lipolyse in Patienten mit metabolischem Syndrom nicht in ausreichendem Maße funktioniert. Eine Deletion im sogenannten Foxa2-Gen kann zu einer hepatisch getriggerten Adipositas führen. Dies sei auf die mTOR inhibierende Funktion des Foxa2 Genproduktes zurückzuführen (3). Ghrelin, ein appetitanregendes Hormon aus dem Gastrointestinaltrakt, kann bei intrathekalen sowie peripherer Gabe Adipositas triggern. Auch hier zeigt Rapamycin, dass die Ghrelin-abhängige Phosphorylierung von S6K1, einem mTORC 1 nachgeschaltetem Protein hemmt, dass es in der Lage ist, die gesteigerte Nahrungsaufnahme durch Ghrelin sowie die Insulinspiegel zu senken (41). Dies veranschaulicht den Zusammenhang zwischen mTOR-Aktivität und dem Ausprägungsgrad der Adipositas. Darüber hinaus kann eine erhöhte mTOR-Aktivität zu einer Zunahme der diabetischen Folgeerkrankungen führen. Es hat sich gezeigt, dass eine erhöhte mTOR-Proteinexpression zum einen an der Pathogenese des Typ 2 Diabetes beteiligt ist und dass zum anderen auch die Morbidität und Mortalität vor allem durch die hiermit einhergehenden kardiovaskulären Probleme erhöht ist (8). Hierzu passen auch die Ergebnisse von Maiese et al., die nahe legen, dass die längerfristige Aktivierung von mTOR auch zu einer Vaskulopathie, also einer pathologischen Veränderung der Blutgefäße, beiträgt (22). Zudem wird der mTOR-Signalweg in der frühen diabetischen Myokardschädigung signifikant aktiviert (42). Trotzdem bleibt weiterhin zu überprüfen, ob auch andere Komplikationen des Typ 2 Diabetes wie z. B. die diabetische Nephro- sowie Retinopathie, aber auch das diabetische Fußsyndrom in ihren Ausprägungen durch eine erhöhte mTOR-Aktivität zunehmen.

9. Ausblick

Die vorliegende Datenlage legt nahe, dass die miR-496 an der mTOR-assoziierten Entwicklung von T2DM und Adipositas beteiligt ist. Eine miR-496 abhängige Regulation der mTOR-Signalgebung könnte einen neuen molekularen Mechanismus der Regulation von Adipogenese und Typ 2 Diabetes Mellitus identifizieren. Unter diesem Aspekt könnte mTOR als ein entscheidender Pathogenesemarker für die Entwicklung des T2DM und der Adipositas in Zukunft klinisch Anwendung finden.

Ziel ist es hierbei, neben schon etablierten Verfahren wie z. B. der regelmäßigen HbA1c-Messung, eine mTOR-Quantifizierung aus peripherem Blut vorzunehmen, um Patienten mit erhöhtem Risiko für schwerwiegende Folgeerkrankungen eines Diabetes Mellitus zu erkennen und um auf diese Weise frühzeitig eine eventuell notwendige intensivere Therapie zu beginnen.

10. Literaturverzeichnis

- 1) Aktuelles: „Genetische Verbindung zwischen Diabetes und Alzheimer“, in: Alzheimer Forschung Initiative e.V. (2012), unter: <https://www.alzheimer-forschung.de/alzheimer-krankheit/aktuelles.htm?showid=3700> (abgerufen am 18.04.2017).
- 2) Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-97
- 3) Bochkis IM, Shin S, Kaestner KH (2013) Bile acid-induced inflammatory signaling in mice lacking *Foxa2* in the liver leads to activation of mTOR and age-onset obesity. *Mol Metab* 2:447-56
- 4) Boden G (2011) Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18:139-43
- 5) Chakrabarti P, English T, Shi J, Smas CM, Kandror KV (2010) Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes* 59:775-81
- 6) Chakrabarti P, Kandror KV (2015) The role of mTOR in lipid homeostasis and diabetes progression. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 22:340-6
- 7) Chey S, Claus C, Liebert UG (2011) Improved method for simultaneous isolation of proteins and nucleic acids. *Anal Biochem* 411:164-6
- 8) Das A, Durrant D, Koka S, Salloum FN, Xi L, Kukreja RC (2014) Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition with rapamycin improves cardiac function in type 2 diabetic mice: potential role of attenuated oxidative stress and altered contractile protein expression. *J Biol Chem* 289:4145–4160
- 9) Dehwah MA, Xu A, Huang Q (2012) MicroRNAs and type 2 diabetes/obesity. *J Genet Genomics* 39:11-18
- 10) Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV (2004) MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279:52361-65
- 11) Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP (2008) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:367–77
- 12) Hagiwara A, Cornu M, Cybulski N (2012) Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. *Cell Metab* 15:725-38
- 13) Hong X, Zhang H, Liang H, Li D, Huang J, Li Z (2016) Exendin-4 decreases ghrelin levels through mTOR signaling. *Mol Cell Endocrinol* 437: 201–212

- 14) Jung MJ, Lee J, Shin NR, Kim MS, Hyun DW, Yun JH (2016) Chronic Repression of mTOR Complex 2 Induces Changes in the Gut Microbiota of Diet-induced Obese Mice. *Sci Rep* 6:30887
- 15) Kadamkode V (2014) Micro RNA: an epigenetic regulator of type 2 diabetes. *Microna* 3:86-97
- 16) Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A (2005) Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 146:1473-81
- 17) Khan KH, Wong M, Rihawi K, Bodla S, Morganstein D, Banerji U, Molife LR (2016) Hyperglycemia and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B/Mammalian Target of Rapamycin (PI3K/AKT/mTOR) Inhibitors in Phase I Trials: Incidence, Predictive Factors, and Management. *The oncologist* 21:855–860
- 18) Lamming DW, Sabatini DM (2013) A central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell Metab* 18:465-9
- 19) Laplante M, Sabatini DM (2010) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274–93
- 20) Liu M, Bai J, He S, Villarreal R, Hu D, Zhang C (2014) Grb10 promotes lipolysis and thermogenesis by phosphorylation-dependent feedback inhibition of mTORC1. *Cell Metab* 19:967-80
- 21) Liu P, Yang X, Hei C, Meli Y, Niu J, Sun T, Li PA (2016) Rapamycin Reduced Ischemic Brain Damage in Diabetic Animals Is Associated with Suppressions of mTOR and ERK1/2 Signaling. *Int J Biol Sci* 12:1032–1040
- 22) Maiese K (2016) Novel nervous and multi-system regenerative therapeutic strategies for diabetes mellitus with mTOR. *Neural Regen Res* 11:372–385
- 23) Munson MJ, Ganley IG (2015) MTOR, PIK3C3, and autophagy: Signaling the beginning from the end. *Autophagy* 11:2375-6
- 24) Neurologie: „Ablagerungen doch keine Ursache für Alzheimer?“, in: WELT (2012), unter: <https://www.welt.de/gesundheit/article112082745/Ablagerungen-doch-keine-Ursache-fuer-Alzheimer.html> (abgerufen am 07.05.2018).
- 25) Norambuena A, Wallrabe H, McMahon L, Silva A, Swanson E, Khan SS (2016) mTOR and neuronal cell cycle reentry: How impaired brain insulin signaling promotes Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 13:152-167

- 26) Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, Sabater M, Hummel M, Ferrer A (2010) MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS One* 5:9022
- 27) Ortega FJ, Mercader JM, Catalan V, Moreno-Navarrete JM, Pueyo N, Sabater M (2013) Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin Chem* 59:781-92
- 28) Ost A, Svensson K, Ruishalme I, Brännmark C, Franck N, Krook H (2010) Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. *Mol Med* 16:235-46
- 29) Parkhitko AA, Favorova OO, Khabibullin DI, Anisimov VN, Henske EP (2014) Kinase mTOR: regulation and role in maintenance of cellular homeostasis, tumor development, and aging. *Biochemistry* 79:88-101
- 30) Pek SL, Sum CF, Lin MX, Cheng AK, Wong MT, Lim SC (2016) Circulating and visceral adipose miR-100 is down-regulated in patients with obesity and type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 427:112-23
- 31) Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE (2004) A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432:226-30
- 32) Qatanani M, Lazar MA (2007) Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev* 21:1443-55
- 33) Qu H, Lin K, Wang H, Wei H, Ji B, Yang Z (2016) 1,25(OH)₂ D₃ improves cardiac dysfunction, hypertrophy, and fibrosis through PARP1/SIRT1/mTOR-related mechanisms in type 1 diabetes. *Mol Nutr Food Res* 61
- 34) Rovira J, Ramirez-Bajo MJ, Banon-Maneus E, Moya-Rull D, Ventura-Aguilar P, Hierro-Garcia N (2016) mTOR Inhibition: Reduced Insulin Secretion and Sensitivity in a Rat Model of Metabolic Syndrome. *Transplant Direct* 2:65
- 35) Rubie C, Kempf K, Hans J, Su T, Tilton B, Georg T (2005) Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol Cell Probes* 19:101–109
- 36) Rubie C, Kölsch K, Halajda B, Eichler H, Wagenpfeil S, Roemer K (2016) MicroRNA-496 – a new, potentially ageing-relevant regulator of mTOR. *Cell Cycle* 15:1108-16
- 37) Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH (1994) RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78:35-43
- 38) Savage DB, Petersen KF, Shulman GI (2007) Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* 87:507-20

- 39) Schmidt KM, Hellerbrand C, Ruemmele P, Michalski CW, Kong B, Kroemer A (2017) Inhibition of mTORC2 component RICTOR impairs tumor growth in pancreatic cancer models. *Oncotarget* 8:24491-24505
- 40) Shah RR (2016) Hyperglycaemia Induced by Novel Anticancer Agents: An Undesirable Complication or a Potential Therapeutic Opportunity? *Drug saf* 40:211-228
- 41) Stevanovic D, Trajkovic V, Müller-Lühhoff S, Brandt E, Abplanalp W, Bumke-Vogt C (2013) Ghrelin-induced food intake and adiposity depend on central mTORC1/S6K1 signaling. *Mol Cell Endocrinol* 381:280-90
- 42) Sun XH, Yin MS, Mu YL (2016): Alterations of mTOR pathway and autophagy in early type 2 diabetic cardiomyopathy in rats. *Zhonghua bing li xue za zhi* 45:707-710
- 43) Sun R, Wu Y, Hou W, Sun Z, Wang Y, Wei H (2017) Bromodomain-containing protein 2 induces insulin resistance via the mTOR/Akt signaling pathway and an inflammatory response in adipose tissue. *Cell Signal.* 30:92–103
- 44) Taniguchi T, Iizumi Y, Watanabe M, Masuda M, Morita M, Aono Y (2016) Resveratrol directly targets DDX5 resulting in suppression of the mTORC1 pathway in prostate cancer. *Cell Death Dis.* 7:2211
- 45) Tavintharan S, Chi LS, Fang SC, Arunmozhiarasi A, Jeyaseelan K (2009) Riboregulators and metabolic disorders: getting closer towards understanding the pathogenesis of diabetes mellitus? *Curr Mol Med* 9:281-6
- 46) Wang Y, Liu J, Liu C, Naji A, Stoffers DA (2013) MicroRNA-7 regulates the mTOR pathway and proliferation in adult pancreatic β -cells. *Diabetes* 62:887-95
- 47) Wang H, Wang J, Qu H, Wei H, Ji B, Yang Z, Wu J (2016) In vitro and in vivo inhibition of mTOR by 1,25-dihydroxyvitamin D3 to improve early diabetic nephropathy via the DDIT4/TSC2/mTOR pathway. *Endocrine.* 54:348-359
- 48) Weir GC, Bonner-Weir S (2004) Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53:16-21
- 49) WHO: “Obesity - preventing and managing the global epidemic.”, in: WHO Technical Report Series 894, Genf (2000), unter: http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/ (abgerufen am 03.02.2018).
- 50) Xie H, Lim B, Lodish HF (2009) MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. *Diabetes* 58:1050-7

- 51) Yoon MS, Choi CS (2016) The role of amino acid-induced mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling in insulin resistance. *Exp Mol Med.* 48:201
- 52) Yuan M, Pino E, Wu L (2012) Identification of Akt-independent regulation of hepatic lipogenesis by mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 2. *J Biol Chem* 287:29579-88
- 53) Yuan T, Rafizadeh S, Gorrepati KD, Lupse B, Oberholzer J, Maedler K, Ardestani A (2016) Reciprocal regulation of mTOR complexes in pancreatic islets from humans with type 2 diabetes. *Diabetologia* 60:668-678
- 54) Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M (2010) Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circulation Res* 107:810-17
- 55) Zhang ZW, Guo RW, Lv JL, Wang XM, Ye JS, Lu NH (2017) MicroRNA-99a inhibits insulin-induced proliferation, migration, dedifferentiation, and rapamycin resistance of vascular smooth muscle cells by inhibiting insulin-like growth factor-1 receptor and mammalian target of rapamycin. *Biochem Biophys Res Commun* 486:414-22

11. Anhang

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Klinische Charakteristika von Patienten mit T2DM

Charakteristika	T2DM (n=36)	Kontrollen (n=36)
Geschlecht		
männlich	19	22
weiblich	17	14
Alter (Jahre)		
Median	71	69
Bereich	56 - 88	56 - 88
Insulin abhängig		
Positiv	33	0
Negativ	3	36
Bluthochdruck		
Positiv	35	19
Negativ	1	13
Unknown		4
Nikotin Abusus		
Positiv	19	3
Negativ	17	33

Tabelle 2 BMI Klassifikation

Kategorie	BMI (kg/m ²)	Körpergewicht	Krankheitsrisiko in Relation zum Normalgewicht
Normal	18,5 – < 25	normal	normal
Präadipositas	25,0 - < 30	leichtes Übergewicht	leicht erhöht
Adipositas Grad I	30,0 - < 35	Übergewicht	hoch
Adipositas Grad II	35,0 - < 40	schweres Übergewicht	sehr hoch
Adipositas Grad III	≥ 40	extremes Übergewicht	extrem hoch

* Krankheitsrisiko für T2DM, Hypertonie und kardiovaskuläre Erkrankungen

12. Publikation

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in dem Fachjournal "Annals of Nutrition and Metabolism" zur Publikation eingereicht.

13. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Claudia Rubie für die Vergabe dieser Doktorarbeit, sowie für die fachlich und menschlich ausgezeichnete Unterstützung während der Anfertigung meiner Dissertation. Insbesondere gilt dieser Dank auch den Labormitarbeitern von Frau Rubie, die mir während meiner Laborarbeiten, aber auch darüber hinaus, immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Matthias Glanemann, für die Bereitstellung der Forschungsmittel, sowie des Forschungslabors, in dem diese Arbeit angefertigt wurde.

Darüber hinaus gilt mein Dank natürlich auch meinen Eltern, die mir mein Studium und diese Doktorarbeit erst ermöglicht haben und mich immer unterstützen.