

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. C. Klein

**Einfluss des mTOR-Signalwegs auf die differentielle
microRNA-Expression während der Adipozytendifferenzierung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Andrea Oßwald
aus
München
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Adelbert Roscher

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Bärbel Otto
Priv. Doz. Dr. Beatrice Bachmeier

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. Julia von Frowein

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2012

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Adipositas	1
1.2	Adipogenese.....	2
1.3	Regulation der Adipogenese	4
1.3.1	„nutrient-sensing“ Signalwege	4
1.3.2	mTOR-Signalweg.....	5
1.3.3	Rolle des mTOR-Signalwegs in Adipogenese und Lipidstoffwechsel.....	7
1.3.4	microRNAs.....	8
1.3.5	Mechanismen der miRNA-induzierten Regulation von Zielgenen	9
1.3.6	Rolle von miRNAs in der Adipogenese	11
1.3.7	Regulatorische Rolle von miRNAs in Bezug auf „nutrient-sensing“	13
1.4	Ziele der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Reagenzien und Verbrauchsmaterial	15
2.1.2	Lösungen	15
2.1.3	Oligonukleotide	15
2.1.4	Kits und Assays	16
2.1.5	Glas- und Plastikmaterial.....	16
2.1.6	Geräte.....	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Zellkultur	17
2.2.1.1	Kultivierung von 3T3-L1 Zellen.....	17
2.2.1.2	Passagieren von 3T3-L1 Zellen	18
2.2.1.3	Kryokonservierung von 3T3-L1 Zellen.....	18
2.2.1.4	Differenzierung von 3T3-L1 Zellen.....	19
2.2.1.5	Rapamycinbehandlung.....	20
2.2.1.6	Dokumentation der Zelldichte und der Differenzierung.....	20
2.2.1.7	Oil Red O Färbung.....	21
2.2.1.8	Zell-Ernte zur RNA-Extraktion	21
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.2.1	RNA-Isolation und Bestimmung der RNA-Konzentration.....	22
2.2.2.2	cDNA-Synthese	23
2.2.2.3	Real-Time PCR.....	23
2.2.2.4	Semiquantitativer miRNA Microarray.....	25

2.2.2.5	miRNA Microarray Statistik	27
2.2.2.6	Quantitativer „low density array“	28
2.2.2.7	miRNA Reverse Transkription	29
2.2.2.8	RT-PCR Quantifizierung von einzelnen miRNAs.....	29
2.2.3	Cluster- und Genfamilienzugehörigkeit	30
2.2.4	Bioinformatische Vorhersage von miRNA-Zielgenen	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Charakterisierung des Modellsystems	32
3.2	miRNA-Expression während der Adipozytendifferenzierung.....	36
3.2.1	Microarray	36
3.2.2	Konfirmation mittels quantitativer „low density array“-Analyse.....	37
3.2.3	Vergleich der Arrayverfahren.....	37
3.3	Auswirkung von Rapamycin auf die Adipozytendifferenzierung.....	40
3.4	Auswirkung von Rapamycin auf die miRNA-Expression	44
3.4.1	Microarray	44
3.4.2	Konfirmation mittels quantitativer „low density array“-Analyse.....	45
3.4.3	Vergleich der Arrayverfahren.....	46
3.4.4	Expressionsgruppen.....	47
3.4.5	Zeitliche Abhängigkeit der miRNA-Expression.....	49
3.5	Cluster- und Genfamilienzugehörigkeit.....	51
3.6	Bioinformatische Vorhersage von miRNA-Zielgenen.....	52
4	Diskussion.....	55
4.1	Validierung der experimentellen Verfahren.....	55
4.1.1	Adipozytenmodellsystem	55
4.1.2	Validierung und Konfirmation von miRNA-Expressionsprofilen.....	57
4.1.3	Vorhersage von miRNA-Zielgen-Interaktionen	58
4.2	Differentielle miRNA-Expression während der Adipozyten-differenzierung.....	58
4.2.1	Neu identifizierte differentiell ausregulierte miRNAs.....	59
4.2.2	Konfirmierung von Vorbefunden	61
4.2.3	Cluster- und Genfamilienzugehörigkeit der miRNAs	63
4.3	Rapamycin-sensitive miRNAs.....	65
4.3.1	miRNA-Expressionsgruppen unter mTOR-Hemmung	66
4.3.2	Funktionelle Bedeutung der als Rapamycin-sensitiv ermittelten miRNAs.....	67
4.3.3	Vorhersage von miRNA-Zielgenen im mTOR-Signalweg	70
5	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	73
6	Literaturverzeichnis	75
7	Anhang.....	83

8	Abkürzungsverzeichnis	91
9	Danksagung.....	93

1 Einleitung

1.1 Adipositas

Adipositas ist definiert als eine über das normale Maß hinausgehende Akkumulation von Fettgewebe, die ein gesundheitliches Risiko darstellt. Sie beginnt, laut World Health Organization, ab einem „Body Mass Index“ (BMI = Gewicht in kg dividiert durch das Quadrat der Größe in m) von 30.

Adipositas hat sich zu einer der größten Herausforderungen des öffentlichen Gesundheitswesens im 21. Jahrhundert entwickelt. Seit den 1980er Jahren hat sich ihre Prävalenz in vielen Ländern Europas verdreifacht und die Zahl der Betroffenen steigt weiterhin mit alarmierender Geschwindigkeit an, besonders bei Kindern. Schon jetzt sind die Folgen von Adipositas für 2 - 8% der Gesundheitskosten und für 10 - 13% der Todesfälle in Europa mit verantwortlich (www.who.int).

Mit Adipositas sind diverse Komplikationen assoziiert: erhöhtes kardiovaskuläres Risiko, Bluthochdruck, Dyslipidämie, endotheliale Dysfunktion, Diabetes mellitus Typ II, gestörte Glucosetoleranz, Steatosis hepatis (Fettleber), Hypogonadismus, polyzystisches Ovarialsyndrom, obstruktives Schlafapnoesyndrom, orthopädische Komplikationen, Cholelithiasis und Pseudotumor cerebri (Barness et al. 2007), eventuell auch Krebs (Pan et al. 2009) und Inflammation (Mathieu et al. 2009).

Für die Adipositasentstehung sind u.a. multiple Mechanismen der Appetitregulation von Bedeutung, die jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit waren. Neuronale und hormonelle Signale wie Insulin und Leptin, die Informationen über vorhandene Nährstoffe enthalten, konvergieren im Hypothalamus und regulieren die Nahrungsaufnahme (Jordan et al. 2010).

Auf Ebene des Fettgewebes beruht die Entwicklung von Adipositas auf einem koordinierten Zusammenspiel von Adipozytenhypertrophie, Adipozytenhyperplasie und Angiogenese. Entscheidend ist also nicht nur eine Zunahme der Zellgröße durch exzessive Lipidakkumulation (Hypertrophie), sondern auch eine erhöhte Anzahl an Fettzellen (Hyperplasie). Man nimmt an, dass die Adipozytenhyperplasie während des ganzen Lebens erfolgt, und zwar sowohl im Rahmen des gewöhnlichen Zellumsatzes als auch als Antwort auf einen erhöhten Bedarf an zusätzlichen Fettspeichern, wenn die Kalorienzufuhr den Nährstoffbedarf überschreitet. Bei der Entstehung von Adipositas scheint die Hypertrophie der Hyperplasie voranzugehen (Avram et al. 2007).

1.2 Adipogenese

Die Adipozytenhyperplasie, auch Adipogenese genannt, beinhaltet die Rekrutierung neuer Adipozyten aus Vorläuferzellen, den Präadipozyten (Hausman et al. 2001). Präadipozyten wiederum entstehen aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen im Vorgang der sogenannten „Determination“ (siehe Abb. 1-1).

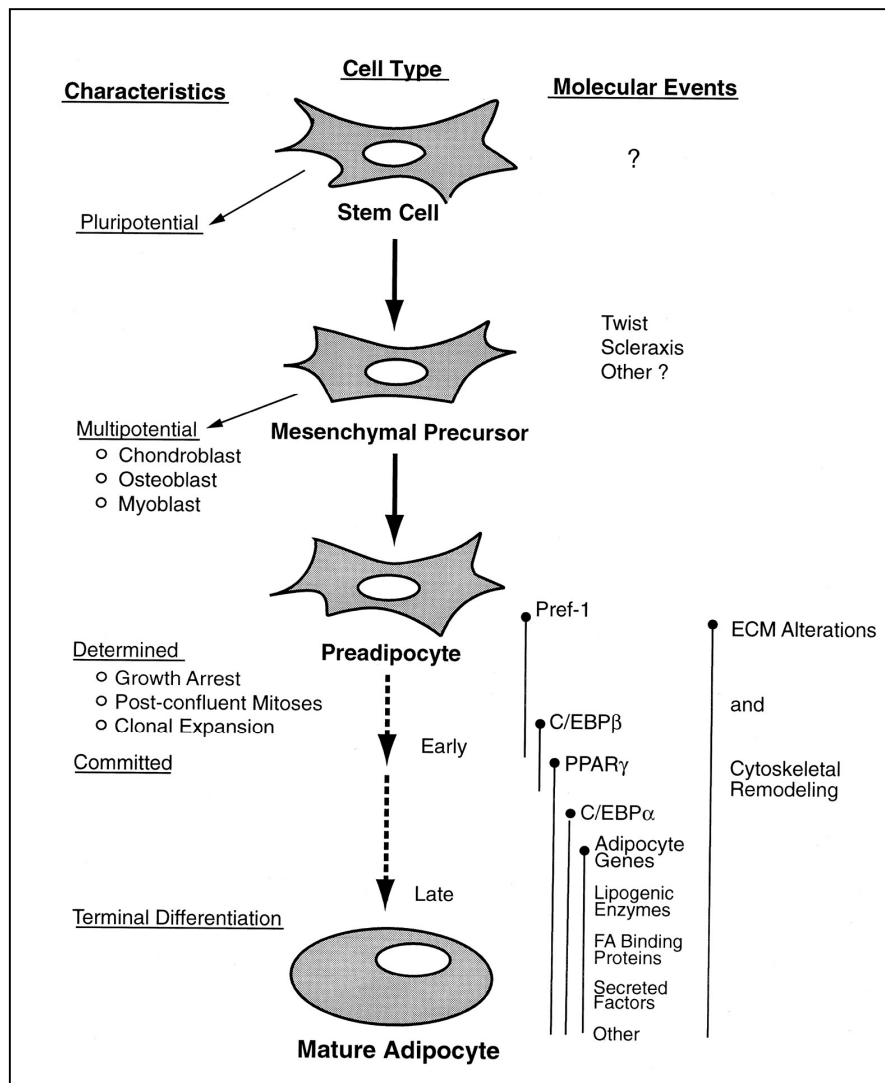


Abb. 1-1: Überblick über die Adipozytendifferenzierung, entnommen aus Gregoire et al. (1998).

Morphologisch unterscheiden sich Präadipozyten nicht von Stammzellen, aber sie haben die Fähigkeit zur Differenzierung in andere Zelltypen verloren (Rosen et al. 2006).

Bei der Adipogenese kommt es zur Proliferation und Differenzierung dieser Präadipozyten. Die Proliferation führt zur Zunahme der Zellzahl von Präadipozyten durch Replikation. Differenzierung hingegen bezeichnet die Umwandlung undifferenzierter, Fibroblasten-ähnlicher Präadipozyten in erwachsene, runde, lipidgefüllte Fettzellen (Hausman et al. 2001).

Dieser Vorgang ist charakterisiert durch die Expression einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, die wiederum zur Expression spezifischer Gene führt und die lipogene Kapazität der Zellen erhöht (Butterwith 1994).

Ein wichtiger sequentiell aktivierter Transkriptionsfaktor ist „peroxisome proliferator-activated receptor γ “ (PPAR- γ), der zur Familie der nukleären Rezeptoren gehört. Er ist sowohl notwendig als auch hinreichend zur Induktion der Adipogenese. Die meisten pro-adipogenen Faktoren wie die „CCAAT-enhancer-binding Proteine“ (C/EBP) und „Krüppel-like Faktoren“ (KLF) (siehe unten) scheinen mindestens einen der beiden PPAR- γ -Promotoren zu induzieren. PPAR- γ ist sowohl für die Induktion der Adipogenese als auch für die Aufrechterhaltung des differenzierten Zellstatus notwendig.

Neben PPAR- γ sind auch einige Mitglieder der C/EBP-Familie an der Adipogenese beteiligt. Aufgrund der temporären Expression dieser Transkriptionsfaktoren während der Differenzierung nimmt man an, dass es sich um eine Kaskade handelt, bei der die Induktion von C/EBP- β und C/EBP- δ zur Induktion von C/EBP- α führt. C/EBP- α wiederum induziert die Expression vieler Adipozytengene auf direktem Weg. Bei Abwesenheit von PPAR- γ können die C/EBPs die Adipogenese jedoch nicht effizient vorantreiben.

Schließlich ist auch eine Kaskade von „Krüppel-like Faktoren“ an der Regulation der Adipozytendifferenzierung beteiligt. Die KLFs sind eine große Familie von C2H2 Zinkfinger Proteinen, die Apoptose, Proliferation und Differenzierung regulieren. KLF5 wird in der frühen Adipozytendifferenzierung durch C/EBP- β und C/EBP- δ induziert. Daraufhin bindet KLF5 an den PPAR- γ -2 Promoter und aktiviert ihn zusammen mit den C/EBPs. KLF6 inhibiert die Expression des „deltalike-1/pre-adipocyte factor-1“ (DLK1/Pref-1) bei 3T3-L1 Zellen und Fibroblasten (Rosen et al. 2006). Pref-1 ist ein Präadipozytenmarker, den nur undifferenzierte 3T3-L1-Zellen exprimieren (Smas et al. 1998).

Neben PPAR- γ , den C/EBPs und KLFs spielen noch eine Reihe anderer Transkriptionsfaktoren bei der Förderung der Adipozytenentwicklung eine Rolle. Auf der anderen Seite existierten aber auch anti-adipogene Transkriptionsfaktoren, die die Adipogenese unterdrücken. Hierzu gehören u.a. KLF2 und KLF7 (Farmer 2006; Rosen et al. 2006).

Nach vollendeter terminaler Differenzierung besitzt der Adipozyt die zelluläre Ausstattung, die für Lipidtransport und Lipidsynthese, Insulinsensitivität und die Sekretion Adipozytenspezifischer Proteine nötig ist (Rosen et al. 2006). Dann nehmen die Zellen durch zusätzliche Lipidakkumulation nur noch an Größe zu (Avram et al. 2007). Die terminale Differenzierung ist charakterisiert durch die Expression von Adipozytentypischen und -spezifischen Genen wie „fatty acid binding protein 4“ (FABP4=aP2), „adipsin“ (complement factor D),

“adiponectin, C1Q and collagen domain containing” (ADIPOQ) und Leptin (Avram et al. 2007).

Unter den vielen möglichen Genen haben sich C/EBP- α , PPAR- γ und Pref-1 als zuverlässige Marker für die Adipozytendifferenzierung bewährt (MacDougald et al. 1995).

3T3-L1-Zellen

Zum Studium der molekularen Vorgänge während der Adipozytendifferenzierung wurden verschiedene Modellsysteme geschaffen. In den 1970er Jahren haben Green et al. (1974) eine Subpopulation von Präadipozyten von disaggregierten, 17 bis 19 Tage alten Swiss Mausembryonen geklont. Die entstandene 3T3-L1-Zelllinie ist ein gut geeignetes *in vitro* Modellsystem, um die molekularen Mechanismen der Adipogenese zu untersuchen (Ntambi et al. 2000). Sie ist eines der am umfassendsten charakterisierten und am weitesten verbreiteten Zellmodelle der Adipogenese. Durch die Zugabe von Insulin, Dexamethason und Isobutylmethylxanthin (IBMX) sowie fetalem Kälberserum differenzieren die 3T3-L1-Präadipozyten zu Adipozyten (Cornelius et al. 1994).

1.3 Regulation der Adipogenese

1.3.1 „nutrient-sensing“ Signalwege

Nährstoffe wie Glucose, Aminosäuren und Fettsäuren wurden lange Zeit nur als Energielieferanten zur ATP-Gewinnung angesehen. Neuere Befunde zeigen jedoch, dass Glucose und Aminosäuren auch als Signalmoleküle in komplexen „nutrient-sensing transductional pathways“ oder „nutrient-sensing signaling pathways“ dienen. Die „nutrient-sensing pathways“ triggern Signalkaskaden, die verschiedene Anteile des Energiemetabolismus regulieren und beeinflussen so Zellwachstum, Proliferation und Überleben. Diese Signalwege bestehen aus 2 Komponenten: einem Sensor, der Veränderungen in der Nährstoffverfügbarkeit detektiert und einem Transduktionselement - typischerweise ein Enzym -, das regulatorische Proteine z.B. durch Phosphorylierung modifiziert. Zu den drei am besten erforschten, funktionell verschiedenen „nutrient-sensing“-Signalwegen gehören der Hexosamin-Signalweg, der „mechanistic target of rapamycin“ (mTOR)-Signalweg und der Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK)-Signalweg (Marshall 2006).

1.3.2 mTOR-Signalweg

In unserer Arbeit wurde der Fokus auf den mTOR-Signalweg gelegt, der in der Onkologie gut erforscht ist und für den eine Reihe von Inhibitoren für den experimentellen Einsatz zur Verfügung steht. Im Zusammenhang mit „nutrient-sensing“-Regulation ist dagegen relativ wenig bekannt, insbesondere in Bezug auf eine Modulierbarkeit des mTOR-Signalwegs mittels miRNAs oder Diätetik.

MTOR ist eine Proteinkinase, die von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist, und Signalnetzwerke, die für Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Überleben essentiell sind, integriert (Zhang et al. 2009b). MTOR besteht aus 2 getrennten Multiproteinkomplexen – „mTOR complex 1“ (mTORC1) und „mTOR complex 2“ (mTORC2). mTORC1 besteht aus mTOR, Raptor (regulatory associated protein of mTOR) und LST8.

Der mTOR-Signalweg (siehe Abb. 1-2) vermittelt Veränderungen der Nährstoffverfügbarkeit, der intrazellulären Energiespiegel sowie des extrazellulären Milieus z.B. durch die Bindung von Insulin, Leptin und Adiponectin an membranständige Rezeptoren (Marshall 2006). Bindet Insulin an den Insulinrezeptor, so kommt es zur Phosphorylierung von Insulin Rezeptor Substrat (IRS) Proteinen, welche wiederum die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktivieren. Die Produktion von PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) führt zur Bindung von „phosphoinositide-dependent kinase 1“ (PDK1) und Proteinkinase B (PKB oder AKT) an die Plasmamembran. Die aktivierte Proteinkinase B phosphoryliert und inaktiviert daraufhin „tuberosis sclerosis complex protein 2“ (TSC2), ein GTP-ase aktivierendes Protein, das auch Signale aus dem AMPK-Signalweg integriert. Auf diese Weise kommt es zum Anstieg von GTP gebunden an Rheb (Ras homolog enriched in brain). Rheb-GTP aktiviert schließlich mTORC1 (Um et al. 2006). Der aktivierte mTORC1-Komplex phosphoryliert daraufhin u.a. „4E-binding“ Proteine (4E-BP) und „40S ribosomal protein S6“ Kinasen (S6K) (Lian et al. 2008; Ma et al. 2009). Während unphosphoryliertes 4E-BP1 an „5' cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E“ (eIF4E) bindet und dadurch die Translationsinitiation hemmt, führt die Phosphorylierung von 4E-BP1 zur Freisetzung von eIF-4E und somit zur Translationsinitiation (Gingras et al. 1999). Die Phosphorylierung der beiden S6-Kinasen, S6K1 und S6K2 durch mTORC1 führt zu deren Aktivierung. Die aktivierte S6K1 phosphoryliert daraufhin verschiedene Translationsfaktoren und RNA-Bindungs-Proteine wie z.B. ribosomales Protein S6 (RPS6) (Ma et al. 2009). Auf diese Weise erhöht mTORC1 die Proteinsyntheserate, hemmt Autophagie und stimuliert ribosomale Biogenese (Marshall 2006).

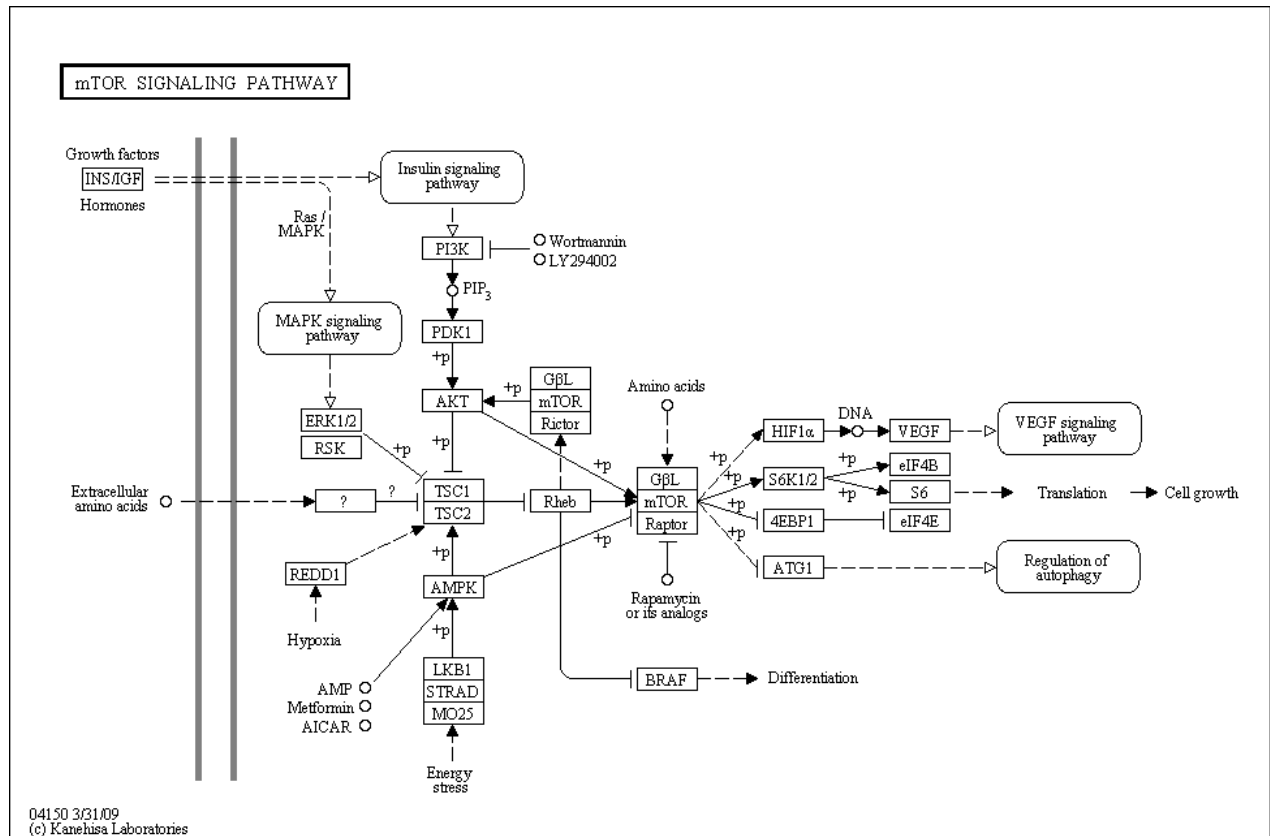


Abb. 1-2: mTOR-Signalweg, entnommen aus der „KEGG“ Signalweg-Datenbank (Kanehisa et al. 2010).

Der “hypoxia-inducible factor 1 α “ (HIF-1 α), ebenfalls ein downstream Target von mTOR, trägt zur Regulation der Angiogenese bei. Er wird durch Hypoxie induziert und reguliert die Expression von “vascular endothelial growth factor” (VEGF) durch Bindung an das “hypoxia responsive element” (HRE) des VEGF Promoters (Jiang et al. 2009).

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass mTORC1/S6K1 eine negative Rückkopplungsschleife aktivieren, die das Insulinsignal durch Phosphorylierung und Inaktivierung des Insulin Rezeptor Substrates 1 (IRS1) hemmt. So führt bei pankreatischen β -Zellen die Stimulierung von mTORC1/S6K1 durch chronische Hyperglykämie zur IRS1-Phosphorylierung. Es kommt zum Abbau des phosphorylierten IRS1 und in der Folge zu verstärkter β -Zell-Apoptose. Diese Befunde deuten auf einen Zusammenhang zwischen Überernährung bzw. Insulinresistenz und β -Zell-Apoptose hin (Shah et al. 2004; Leibowitz et al. 2008).

Rapamycin, ein bakterielles Macrolid und Immunsuppressivum, kann den mTORC1-Signalweg durch Bindung an das Immunophilin FKBP12 (FK-506-binding protein-12) spezifisch inhibieren (Ma et al. 2009). Dies führt zur Hemmung der downstream Targets von mTOR (Yeh et al. 1995; Ma et al. 2009). Bei Adipozyten führt eine Rapamycinbehandlung möglicherweise zur Unterbrechung der positiven Rückkopplungsschleife zwischen PPAR- γ

und C/EBP- α und verhindert so die Differenzierung der Präadipozyten (Yeh et al. 1995; Kim et al. 2004).

Im Falle eines Energiemangels in der Zelle kann mTORC1 über den AMPK-Signalweg gehemmt werden. Erniedrigte ATP-Spiegel führen über eine allosterische Aktivierung der AMP-Kinase durch AMP zur Phosphorylierung verschiedener downstream Targets, u.a. auch mTOR und TSC2. Dies führt zur Hemmung des Energie verbrauchenden Prozesses der Proteinsynthese und des Zellwachstums und damit zur Regeneration der ATP-Spiegel (Marshall 2006).

Durch das „Sensing“ von Wachstumsfaktoren und Nährstoffverfügbarkeit leitet der aktivierte mTORC1-Komplex - durch direkte oder indirekte Phosphorylierung - also Signale zu verschiedensten Komponenten der Translationsmaschinerie weiter (Ma et al. 2009).

Im Gegensatz zu mTORC1 sind der genaue Signalweg und die Aufgaben von mTORC2 noch nicht so detailliert erforscht. Er scheint aber die Aktinorganisation zu regulieren und die Proteinkinase B (PKB) zu aktivieren (Marshall 2006).

Nachdem eine Dysregulation des mTOR-Signalwegs bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen des Menschen eine wichtige pathogenetische Rolle spielt, wurden nach der Entdeckung von Rapamycin eine Reihe von weiteren mTOR-Inhibitoren wie Everolimus und Temsirolimus entwickelt. Durch die Inhibierung von Zellproliferation, Zellwachstum und Angiogenese stellen sie potente antineoplastische Medikamente dar. Inzwischen gibt es auch eine neue Generation von sog. „active-site“ mTOR-Inhibitoren, die neben mTORC1 auch mTORC2 hemmen (Yuan et al. 2009; Dowling et al. 2010).

1.3.3 Rolle des mTOR-Signalwegs in Adipogenese und Lipidstoffwechsel

Der Einfluss des mTOR-Signalwegs auf den Fettstoffwechsel wurde bereits mehrfach gezeigt. Khamzina et al. (2005) beobachteten eine verstärkte Aktivierung von mTOR und S6K1 in Leber und Skelettmuskulatur von adipösen Ratten. Ohne et al. (2008) demonstrierten, dass bei Zellen mit hyperaktiven mTOR-Mutanten die unter Aminosäuremangel natürliche Autophagie und Verkleinerung der Zellgröße unterblieb. Dies unterstützt die Annahme, dass mTORC1 die Fettzellgröße und Autophagie-Induktion als Antwort auf die Nahrungsmittelverfügbarkeit reguliert.

Eine Aktivierung von mTORC1 in 3T3-L1 Adipozyten durch ektope Expression von „Ras homolog enriched in brain“ (Rheb) führte zur Suppression von Lipolyse, Stimulation von *de novo* Lipogenese und Erhöhung der intrazellulären Triglyceridakkumulation. Eine Inhibierung von mTORC1 mittels Rapamycin oder Raptor-Knockdown wiederum stimulierte

die Lipolyse. Diese Daten legen nahe, dass eine mTORC1-Aktivierung die Fettspeicherung induziert (Chakrabarti et al. 2010).

Schließlich konnte *in vivo* gezeigt werden, dass eine Rapamycinbehandlung bei mit „high-fat“ Diät gefütterten Mäusen eine Zunahme des Körpergewichts verhindert. Trotz gesteigerter Nahrungsaufnahme war die Lipidakkumulation reduziert (Chang et al. 2009a). Polak et al. (2008) demonstrierten den Effekt einer Hemmung von mTORC1 an Mäusen mit einem Adipozytenspezifischen Knockdown von Raptor. Diese Mäuse besaßen weniger Fettgewebe, waren gegen Diätinduzierte Adipositas und Hypercholesterinämie geschützt und zeigten eine erhöhte Insulinsensitivität. In einem anderen Adipositas-Mausmodell wurde unter Rapamycinbehandlung ebenfalls eine Abnahme von Körpergewicht bzw. Adipositas sowie eine Reduktion der Fettzellgröße und Leberfettkonzentration beobachtet. Allerdings zeigten hier im Gegensatz zu den Ergebnissen von Polak et al. die behandelten Tiere gleichzeitig eine verminderte Glucosetoleranz (Chang et al. 2009b). Auch bei Ratten führte eine chronische Rapamycinbehandlung zu reduzierter Adipositas und Herabregulation von Genen des Lipidstoffwechsels. Gleichzeitig aber auch zu Insulinresistenz, Glucoseintoleranz und verstärkter Gluconeogenese (Houde et al. 2010).

Rovira et al. (2008) beobachteten, dass eine mTOR-Inhibierung mittels Rapamycin auch beim Menschen zur Gewichtsreduktion führt. Unter Rapamycinbehandlung war der BMI von Nierentransplantierten signifikant niedriger als bei Einnahme eines anderen Immunsuppressivums. Dies führte zur Annahme, dass Rapamycin auch beim Menschen einen Einfluss auf die metabolische Regulation und die Fettzellgröße hat.

Zusammenfassend führt eine chronische mTOR-Aktivierung, wie dies bei Adipositas der Fall ist, zu *de novo* Lipogenese, Inhibierung von Lipolyse und damit zur Fettspeicherung. Das biologische Korrelat einer chronischen mTOR-Inhibierung wiederum besteht in einer Abnahme von Körpergewicht und Fettzellgröße, aber möglicherweise auch in einer Neigung zu Insulinresistenz.

Die an einer physiologischen Inhibierung von mTOR-assoziierten Signalwegen potentiell beteiligten microRNAs sind bislang nicht bekannt.

1.3.4 microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) stellen eine Subgruppe der „small RNAs“ dar, zu denen auch die „endogenous small interfering RNAs“ (endo-siRNAs) und die „Piwi-interacting RNAs“ (piRNAs) gehören. Dabei zählen die miRNAs zu den am besten untersuchten „small RNAs“ (Kim et al. 2009a).

MiRNAs sind 21 – 24 Nukleotide lange, einzelsträngige, endogene RNA-Moleküle (Lagos-Quintana et al. 2001; Lau et al. 2001). Sie können die Genexpression posttranskriptionell regulieren, indem sie an die „3' untranslated region“ (3'UTR) von Ziel-mRNAs binden. Abhängig von der Stärke der Basenpaarung kommt es dann zur Translationshemmung oder zum Abbau der mRNA (Ambros 2004; Bartel 2004; Valencia-Sanchez et al. 2006).

Seit der Entdeckung der ersten miRNA, *lin-4*, die bei der Entwicklung des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* eine Rolle spielt, sind Hunderte weiterer miRNAs beschrieben worden (Lee et al. 1993). Zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Arbeit sind 706 menschliche miRNAs in der „miRBase Sequence Database“ (Griffiths-Jones et al. 2008) erfasst und ihre Anzahl steigt ständig.

Die meisten miRNAs regulieren ein bestimmtes Set an Genen. Einige miRNAs können aber auch mehrere Tausend Zielgene regulieren. Man nimmt an, dass insgesamt über 30% der Gentranskripte durch miRNAs reguliert werden (Lewis et al. 2005).

Viele miRNAs sind in sog. Clustern organisiert. Ca. 40% der menschlichen miRNA Loci befinden sich in einer Nähe von weniger als 3kB zu benachbarten miRNAs (Altuvia et al. 2005). MiRNAs, die in demselben Cluster lokalisiert sind, entstehen meist aus einem einzigen polycistronischem Transkript (Bartel 2004). Deshalb sind sie fast immer koreguliert und koexprimiert (Leung et al. 2008). Darüber hinaus sind viele miRNAs paralog, d.h. einander ähnlich und möglicherweise durch Genduplikation entstanden (Wilfred et al. 2007). Im menschlichen Genom gibt es z.B. 12 Loci für die *let-7* Genfamilie. Paraloge miRNAs haben oft eine identische Nukleotidsequenz am 5'-Ende, welche für die Basenpaarung mit der Ziel-mRNA essentiell ist. Deshalb wird angenommen, dass sie funktionell redundant agieren (Kim et al. 2009a).

1.3.5 Mechanismen der miRNA-induzierten Regulation von Zielgenen

Die Gene der meisten miRNAs sind zwischen kodierenden Genen lokalisiert (sog. „intergenic regions“), ein Teil befindet sich aber auch in den Introns kodierender Gene (Kim 2005).

Die miRNA-Synthese beinhaltet die Transkription im Zellkern, den Export ins Zytoplasma und dort die Prozessierung und Reifung. Die Transkription der miRNAs wird durch die RNA Polymerase II oder auch RNA Polymerase III vermittelt. Es entsteht ein langes primäres miRNA-Transkript (pri-miRNA), das sich zurückfaltet und so eine „stem-loop“-Struktur bildet (siehe Abb. 1-3). Meist ist es mit einem 7-Methylguanosin Cap und einem Poly-A-Schwanz versehen. Die miRNA-Sequenz befindet sich im Stammabschnitt (Singh et al. 2008).

Die pri-miRNA wird dann vom Mikroprozessor-Komplex, bestehend aus dem RNase III Enzym Drosha und dem DGCR8 (DiGeorge critical region 8)- Protein, zu einer ~70-80 Nukleotid großen „precursor microRNA“ (pre-miRNA) prozessiert. Dabei wird die „stem-loop“-Struktur gespalten und es entsteht eine Haarnadelstruktur. Dieser Vorgang wird „cropping“ genannt (Lee et al. 2003; Denli et al. 2004).

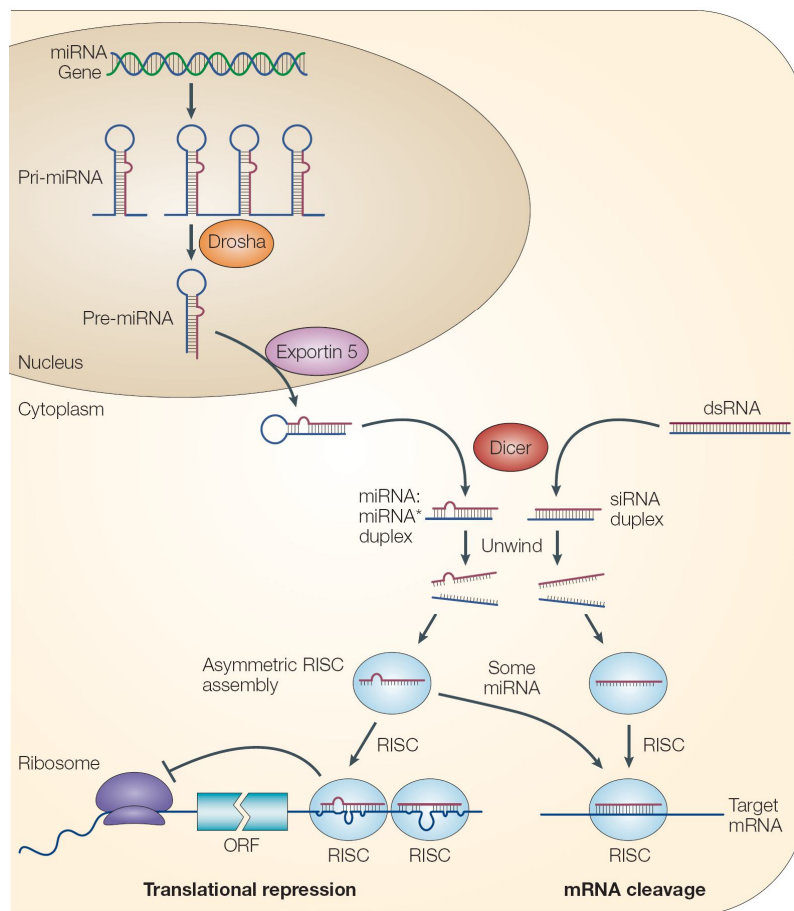


Abb. 1-3: miRNA-Synthese, entnommen aus He et al. (2004).

Die pre-miRNAs werden dann durch Exportin-5 in Anwesenheit von Ran-GTP als Kofaktor vom Zellkern ins Zytoplasma exportiert (Lund et al. 2004). Im Zytoplasma schließlich wird die Schleife der pre-miRNA durch das RNase III Enzym Dicer abgeschnitten, sodass eine ca. 22 Nukleotide lange, doppelsträngige miRNA-Duplex Struktur (miRNA:miRNA*) verbleibt. Sie enthält sowohl den reifen miRNA-Strang als auch den komplementären miRNA*-Strang, die sog. Minorsequenz (He et al. 2004). Eine RNA-Helicase scheint für das Entwinden und die Entfernung des miRNA*-Strangs verantwortlich zu sein. Der reife miRNA-Strang wird dann in den „RISC (RNA induced silencing complex) loading complex“ (RLC), bestehend aus Dicer, TREB (Tar RNA binding protein) und einem Argonautprotein aufgenommen (Kim et al. 2009a).

Es existieren nun verschiedene mögliche Mechanismen der miRNA-vermittelten posttranskriptionellen Genrepression. Zum Einen kann der entstandene „miRNA-induced silencing complex“ (miRISC) an die 3' UTR von mRNAs binden und so zur Deadenylierung und zum Zerfall der Ziel-mRNA beitragen. Zum Anderen kann der miRISC die Translationsinitiation in verschiedenen Stadien hemmen. MRNAs, die durch Deadenylierung oder während der Translationsinitiation gehemmt werden, werden zu „processing bodies“ (P-bodies) verbracht und dort degradiert oder gelagert. Die Repression kann aber auch in der postinitialialen Phase der Translation auftreten und zwar durch verlangsamte Elongation oder durch Abfall der Ribosomen von der mRNA (Filipowicz et al. 2008).

1.3.6 Rolle von miRNAs in der Adipogenese

Die miRNA-Expression bei Säugetieren ist stark Gewebe-spezifisch. Zudem verändert sich das zelluläre miRNA-Profil im Verlauf der Zelliniendifferenzierung und -spezifizierung. Dies führt zur Annahme, dass jede Zelllinie des Organismus ein spezifisches miRNA-Expressionsprofil aufweist (Lee et al. 2006a). Das miRNA-Profil während der Adipogenese und die funktionelle Rolle einzelner miRNAs in Adipozyten ist bislang nur unvollständig untersucht.

2004 wurde die miRNA-Expression bei Adipozyten von Esau et al. (2004) zum ersten Mal systematisch analysiert. Die Forscher inhibierten die Aktivität von 86 miRNAs in humanen primären Präadipozyten mit „antisense Oligonukleotiden“ (ASOs) durch Transfektion vor der Differenzierungsinduktion. 2 ASOs, welche miR-9* und miR-143 zum Ziel hatten, führten zur Inhibierung des Differenzierungsprozesses und Verminderung der Expression von Adipozytenmarkern. Die miR-143 war zudem bei Adipozyten höher exprimiert als bei Präadipozyten. Im Mesenterialfett von Mäusen mit einer durch fettreiche Diät induzierten Adipositas war die Expression der miR-143 ebenfalls hochreguliert und korrelierte mit der Expression von Adipozytenmarkern (Takanabe et al. 2008).

Oskowitz et al. (2008) konnten zeigen, dass die Differenzierung von humanen multipotenten stromalen Zellen (hMSCs) zu Osteoblasten bzw. Adipozyten durch die Inhibierung von Dicer und Drosha, den beiden Schlüsselenzymen der miRNA-Synthese, gehemmt wird. Dies unterstützt die Annahme, dass miRNAs für die Differenzierung von Stammzellen essentiell sind. Des Weiteren wurden mehrere während der Adipozytendifferenzierung differentiell regulierte miRNAs gefunden.

Die miR-27 Genfamilie wird anscheinend während der Adipozytendifferenzierung herunterreguliert. Eine Überexpression der miR-27 inhibierte die Adipozytenformation und hemmte die Expression von PPAR- γ und C/EBP- α (Lin et al. 2009b; Kim et al. 2010).

Das miR-17-92 Cluster und let-7 scheinen während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen hochreguliert zu werden. Eine ektope Introdution von let-7 inhibierte die Adipozytendifferenzierung (Wang et al. 2008b; Sun et al. 2009).

Gerin et al. (2010) beobachteten die Induktion der miR-378/378* während der Adipogenese und ihren Einfluss auf die Triglyceridakkumulation der Zellen und Nakanishi et al. (2009) zeigten, dass die miR-335 im Leber- und Fettgewebe von Adipositas-Mäusen hochreguliert war. Ihre Expression korrelierte mit der von Adipozytenmarkern.

Xie et al. (2009) zeigten, dass die ektope Expression von miR-103 und miR-143 die Adipogenese beschleunigt. Bemerkenswerterweise waren miRNAs, die bei der 3T3-L1-Differenzierung hochreguliert waren, bei Adipozytenexplantaten von Leptindefizienten ob/ob Mäusen und Diät-induzierten adipösen Mäusen herunterreguliert und umgekehrt. Die Forscher führten dies auf die chronisch inflammatorische Situation bei Adipositas zurück.

Kloting et al. (2009) untersuchten schließlich die miRNA-Expression in menschlichem omentalem und subkutanem Fettgewebe von Patienten mit Diabetes mellitus Typ II im Vergleich zu Menschen mit normaler Glucosetoleranz und fanden eine signifikante Korrelation zwischen 7 miRNAs und der Fettgewebsmorphologie bzw. metabolischen Parametern wie HBA_{1c}, Leptin und Interleukin-6. Ortega et al. (2010) analysierten ebenfalls die miRNA-Expression während der Differenzierung menschlicher Adipozyten und in Fettgewebeproben von übergewichtigen Diabetikern verglichen mit schlanken gesunden Menschen. Dabei konnten einige spezifisch deregulierte miRNAs ermittelt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es starke Evidenz dafür gibt, dass miRNAs für die Differenzierung von Adipozyten kritisch sind. Eine systematische Analyse aller in Adipozyten bekannten miRNAs wurde jedoch nur von wenigen Arbeitsgruppen durchgeführt. Zudem sind die Vordaten überwiegend deskriptiver Art und nur wenige Adipozyten-miRNAs wurden funktionell genauer charakterisiert. Auch über ihre pharmakologische oder nutritive Beeinflussbarkeit ist bislang nur wenig bekannt.

Darüber hinaus sind die mRNA-Zielgene der diversen miRNAs bislang überwiegend nicht experimentell validiert. Diese sind jedoch wichtig für das Verständnis der funktionellen Bedeutung der differentiell exprimierten miRNAs.

1.3.7 Regulatorische Rolle von miRNAs in Bezug auf „nutrient-sensing“

Über die Rolle von miRNAs beim „nutrient-sensing“ gibt es bisher nur wenige Hinweise. Einer stammt aus der Pflanzenbiologie: die beiden evolutionär konservierten miRNAs, miR-395 und miR-399, vermittelten dort die Antwort auf nutritiven Stress (Chiou 2007).

In der Humanbiologie gibt es bislang nur eine Arbeit mit einem direkten Beleg für eine Assoziation zwischen miRNAs und „nutrient-sensing“. In primären Adipozytenstammzellen regulierte miR-132 die Chemokinproduktion als Antwort auf Nährstoffüberschuss (Strum et al. 2009).

Einen indirekten Hinweis auf den Einfluss von miRNAs auf Adipositas bzw. den Lipidmetabolismus, lieferten einige Studien zur Cholesterolemie. MiR-33 modulierte die Expression von Cholesterin-Transport Genen und schien die Cholesterolemie zu kontrollieren (Najafi-Shoushtari et al. 2010; Rayner et al. 2010).

Hinweise für eine Rolle von miRNAs in der Regulation des mTOR-Signalwegs gibt es bislang fast ausschließlich aus der Tumorbologie. So konnte gezeigt werden, dass miR-100 und miR-99a mTOR in Ovarialzell- bzw. adrenocorticalen Tumoren inhibierten (Doghman et al. 2010; Nagaraja et al. 2010). MiR-199a-3p regulierte mTOR in humanen hepatozellulären Karzinomzellen (HCC-Zellen). Eine Erhöhung der miR-199a-3p-Expression in HCC-Zellen führte zum Zellzyklusarrest, verminderter Invasionskapazität, verstärkter Hypoxie-Sensibilität und höherem Ansprechen auf Doxorubicin-induzierte Apoptose (Fornari et al. 2010)

Über eine Assoziation zwischen dem mTOR-Signalweg und miRNAs ist außerhalb dem Gebiet der Onkologie sehr wenig bekannt. Man weiß zwar, dass der mTOR-Signalweg bei Adipositas chronisch überaktiviert ist, aber die regulatorischen Interaktionen beispielsweise mit „nutrient-sensing“-gesteuerten miRNAs sind noch unerforscht. Für die Entwicklung neuer Interventionsoptionen, beispielsweise durch spezifische Diätformen, ist das molekulare Verständnis der bei Adipositas auftretenden Dysregulationen essentiell.

1.4 Ziele der Arbeit

Wir stellten die Hypothese auf, dass eine regulatorische Interaktion zwischen miRNAs und dem mTOR-Signalweg während der Adipozytendifferenzierung stattfindet. Zur Überprüfung wurde der mTOR-Signalweg während der Differenzierung von 3T3L1-Zellen mittels Rapamycin spezifisch inhibiert und damit eine „hungrige Zelle“ simuliert. Unter dieser Bedingung sollten die durch mTOR-Inhibierung induzierten Veränderungen in der miRNA-Expression analysiert werden.

Die spezifischen Ziele dieser Arbeit bestanden

1. im Erstellen eines umfassenden differentiellen Expressionsprofils von miRNAs im zeitlichen Verlauf der Adipogenese
2. in der Identifizierung von miRNAs, die durch eine spezifische Hemmung von „mTOR nutrient-sensing“ beeinflusst werden
3. in der Priorisierung und Selektion von einzelnen Kandidaten-miRNAs durch Vorhersage und Ermittlung von biologisch relevanten Zielgenen (miRNA-mRNA Paaren) im mTOR –Signalweg.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
3-Isobutyl-1-methylxanthin, 99%	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Antibiotic/Antimycotic Solution	PAA, Pasching (Österreich)
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Chloroform, 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dexamethason, 98%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM, High Glucose (4,5 g/l), with L-Glutamine	PAA, Pasching (Österreich)
DPBS (1x), steril	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Steinheim
Foetal Bovine Serum, heat inactivated	PAA, Pasching (Österreich)
Glutaraldehyd Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycogen (20µg/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
Insulin Insuman rapid (40 I.E./ml)	Aventis, Frankfurt am Main
iQ SYBR Green Supermix	Biorad, München
3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Newborn Calf Serum, heat inactivated, steril	Invitrogen, Karlsruhe
Nuklease-Free Water	Ambion, Darmstadt
Oil Red O	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rapamycin	Serva, Heidelberg
TRIzol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Trypan Blue Stain 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10x), 0,5% / 0,2% in D-PBS	PAA, Pasching (Österreich)

2.1.2 Lösungen

Stoff	Lösungsmittel	Konzentration	Molarität	Inkubation
Dexamethason	100% Ethanol	0,39 mg/ml	1 mM	
IBMX	DMSO	0,222 mg/µl	1 M	10 Min. bei 37°C
Oil Red O	Isopropylalkohol	2,5 mg/ml	6,1 mM	1 Std. bei 56°C
Rapamycin	DMSO	9,14 mg/ml	10 mM	

2.1.3 Oligonukleotide

Gen	Sequenz	Referenz
CEBP-α	fwd: 5'-TGGACAAGAAGCAACAGAG-3' rev: 5'-AATCTCCTAGTCCTGGCTTG-3'	(Kim et al. 2007)
PPAR-γ	fwd: 5'-CAGCATTCTGCTCCACACTATGAAG-3' rev: 5'-AGCAAGGCACTTCTGAAACCG-3'	(Kajimoto et al. 2006)
Pref-1	fwd: 5'-GACCCACCCTGTGACCCC-3' rev: 5'-CAGGCAGCTCGTGACCCC-3'	(Kim et al. 2007)
β-Actin	fwd: 5'-TCCTCCTGAGCGCAAGTACTCT-3' rev: 5'-GCTCAGTAACAGTCCGCCTAGAA-3'	(Karamanlidis et al. 2007)

2.1.4 Kits und Assays

Bezeichnung	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Böblingen
Megaplex™ PreAmp Primer, Rodent Pool A und Pool B	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Megaplex™ RT Primer, Rodent Pool A und Pool B	Applied Biosystems, Foster City (USA)
miRCURY™ LNA microRNA Array	Exiqon, Woburn (USA)
miRCURY™ LNA microRNA Power Labeling Kit	Exiqon, Woburn (USA)
mirVana miRNA Isolation Kit	Ambion, Darmstadt
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
Taq Man® MicroRNA Assays	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Taq Man® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City (USA)
TaqMan® Rodent MicroRNA Array v2.0, Rodent Array A und Array B	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Taq Man® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Venor GeM Mycoplasma PCR Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin

2.1.5 Glas- und Plastikmaterial

Bezeichnung	Hersteller
175 cm ² Flask Nunclon™ Δ Surface	Nunc, Wiesbaden
225 cm ² Flask Easy Flask™	Nunc, Wiesbaden
6-Well und 12-Well Platten Nunclon™ Δ Surface	Nunc, Wiesbaden
96 Well Reaction Plate	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
BD Falcon™ Conical Tubes	BD, Franklin Lakes (USA)
CryoTube Vials	Nunc, Wiesbaden
LifterSlip™	Erie Scientific Company, Portsmouth (USA)
Membran Filter 0,45 µm, steril	Eppendorf, Hamburg
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Microtest Plate 96-Well Flat Bottom	Sarsted, Nümbrecht
Optical Tape	Biorad, München
Pipettenspitzen Safe Seal-Tips 2,5µl, 20µl, 100µl, 200µl und 1000µl	Biozym, Hess. Oldendorf
Safe-lock Tubes 2,0ml und 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
VersArray Hybridisation Chamber	Biorad, München

2.1.6 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
7900HT Fast Real-Time System	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Abzug mc6	Waldner, Wangen im Allgäu
Autoklav Systec D-65	Systec, Wettenberg
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Böblingen
Cellscreen	Innovatis, Bielefeld
Cryo-Einfriergerät	Nunc, Wiesbaden
Digitalkamera Power Shot G6	Canon, Krefeld
DNA-Workstation UV-Cleaner	Kisker, Steinfurt
Feinwaage R200D	Sartorius, Göttingen
Flocken-Eisbereiter AF 20	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills (USA)
Gefrierschrank -20°C Premium GNP 3376 No Frost	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80°C HERA freeze	Kendro, Langenselbold
iCycler	Biorad, München
Inkubator HERA cell 240	Kendro, Langenselbold
Kühl-Gefrier-Kombination electronic	Bosch, Stuttgart
Lichtmikroskop Leica DM IL	Leica, Bensheim

Low Density Array Sealer	Applied Biosystems, Foster City (USA)
MicroArray-Scanner GenePix 4000A	Axon Instruments, Sunnyvale (USA)
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen
PC mit folgender Software:	Fujitsu Siemens, München
Windows XP office package	
Bio-Rad iQ5 2.0 Optical System Software	
Clone Manager Suite 7	
EndNote X2	
GenePix ® Pro	
Sequence Detection Systems (SDS) Software	
Pipetten Research 2,5, 20, 100 und 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Hamburg
Spectrophotometer ND-1000	NanoDrop, Wilmington (USA)
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Sterilbank HERA safe	Kendro, Langenselbold
Thermocycler TPersonal	Biometra, Göttingen
Thermo Shaker TS-100	Kisker, Steinfurt
Thermoblock Grant Boekel BBA	Grant Instruments, Cambridge (UK)
Vortexer Mini-Vortex	Kisker, Steinfurt
Wärmetisch	Medax, Rendsburg
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich, Adelsried

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten 3T3-L1 Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Slawik, Ludwig-Maximilians-Universität München, zur Verfügung gestellt. Vor Beginn der Experimente wurden sie negativ auf Mykoplasmen getestet (Venor GeM Mycoplasma PCR Detection Kit).

2.2.1.1 Kultivierung von 3T3-L1 Zellen

3T3-L1 Zellen, Mausembryo-Präadipozyten, wachsen adherent und wurden in sog. Präadipozytenmedium kultiviert. Dieses bestand aus DMEM (4,5 g/l Glucose, mit L-Glutamin), 10% „Newborn Calf Serum“ (NCS) und 1% „Antibiotic/Antimycotic Solution“ (AAS). Die Zellen wurden in 225 cm²-Zellkulturflaschen mit 30 ml Präadipozytenmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Um 3T3-L1 Zellen im Präadipozyten-Stadium zu erhalten, dürfen sie sich gegenseitig nicht berühren, denn Zell-Zell-Kontakt wie auch das längerfristige Kultivieren in Kälberserumhaltigem Medium führen zur Induktion der Differenzierung. Aus diesem Grund wurde darauf geachtet, dass sich stets höchstens 400.000 bis 600.000 Zellen in einer 225 cm²-Flask

befanden. Zudem wurden die Zellen für jedes Experiment neu aufgetaut, um die Passagezahl möglichst gering und vergleichbar zwischen unterschiedlichen Experimenten zu halten.

2.2.1.2 Passagieren von 3T3-L1 Zellen

Durch das schnelle Wachstum der Zellen - die Verdopplungszeit beträgt im Durchschnitt nur 2 Tage - mussten die Zellen alle 2 bis 4 Tage gesplittet und subkultiviert werden. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Flask mit 12 ml DPBS vorsichtig gespült. Durch Zugabe von 3 ml Trypsin/EDTA und anschließender 10-minütiger Inkubation bei 37°C lösten sich die Zellen vom Boden der Flasche ab. Der Ablösevorgang wurde mikroskopisch kontrolliert und durch Hinzufügen von 12 ml (Serumhaltigem) Präadipozytenmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in einem Falcon-Röhrchen aufgenommen und bei 21°C und 1000 rpm für 4 Min. zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Trypsin/EDTA-haltige Überstand abgenommen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann auf die neuen Zellkulturflaschen verteilt. Zum Schluss wurden die Zellkulturflaschen horizontal geschwenkt, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen und dann bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Für gewöhnlich wurden die 3T3-L1 Zellen nicht höher als 1:4 gesplittet.

2.2.1.3 Kryokonservierung von 3T3-L1 Zellen

Um die Passagezahl möglichst gering zu halten, wurde ein Teil der Zellen nach einer kurzen Vermehrungsperiode bei – 80°C eingefroren.

Für die Kryokonservierung wurde zuerst das Einfriermedium hergestellt. Es bestand aus Präadipozytenmedium mit 10% DMSO, wobei pro Zellkulturflasche 1 ml Einfriermedium benötigt wurde. Die Zellen wurden analog zum Passagieren mit Hilfe von Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst und in Präadipozytenmedium aufgenommen. Die Zellsuspensionen der einzelnen Flasks wurden dann in einem Falcon-Tube vereint, welches bei 1000 rpm 4 Min. zentrifugiert wurde. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Einfriermedium langsam zum Zellpellet gegeben, kurz gemischt und dann je 1 ml Suspension in ein Kryo-Tube pipettiert. Anschließend wurden die Kryo-Tubes in das mit Isopropylalkohol gefüllte Kryo-Einfriergerät gestellt und bei – 80°C eingefroren. Der Isopropylalkohol führte dabei zu einem schonenden, langsameren Einfrieren der Zellen.

Zum Auftauen der Zellen wurden zuerst 10 ml vorgewärmtes Präadipozytenmedium in einem Falcon-Tube und 25 ml Präadipozytenmedium in einer 175 cm²-Flask vorgelegt. Dann wurde

das Kryo-Tube aus dem - 80°C Gefrierschrank genommen und bei 37°C so lange aufgetaut bis nur mehr ein erbsengroßes Stück gefroren war. Der Kryotube-Inhalt wurde dann zügig in das vorbereitete Falcon-Tube geschüttet und bei 21°C und 1000 rpm für 4 Min. zentrifugiert. Dadurch trennten sich die Zellen vom Einfriermedium und dieses konnte verworfen werden. Das verbleibende Zellpellet wurde in 3 ml Medium resuspendiert und in die 175 cm²-Flask transferiert. Die Flask wurde dann im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ aufbewahrt. Nach durchschnittlich 3 Tagen waren die Zellen gut angewachsen und konnten in eine 225 cm²-Flask überführt werden.

2.2.1.4 Differenzierung von 3T3-L1 Zellen

Für die Ausdifferenzierung wurden die Präadipozyten dicht ausgesät und nach 4 Tagen, am sog. „Tag 0“, durch Zugabe von Insulin, Dexamethason und IBMX zur Differenzierung angeregt. Der Differenzierungsprozess war 8 Tage nach der Induktion abgeschlossen. Dann waren die sternförmigen Präadipozyten zu runden, lipidhaltigen Adipozyten differenziert.

Aussaat in 6-Multiwells:

Die frisch aufgetauten Präadipozyten wurden solange in Präadipozytenmedium vermehrt bis mindestens zwanzig 225 cm²-Flasks zur Verfügung standen. Die Zellen dieser Kulturflaschen wurden dann wie beim Passagieren mit Hilfe von Trypsin/EDTA abgelöst, in Medium aufgenommen und 4 Min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Die entstandenen Zellpellets wurden anschließend in einem Falcon-Tube vereint und in 10 ml Medium resuspendiert. Zum Zählen der Zellen wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau vermischt und 10 µl dieser Mischung in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Durch Zugabe von Trypanblau können lebende von toten Zellen unterschieden werden: die avitalen Zellen haben eine löchrige Zellmembran, durch die Trypanblau eindringen kann und werden so dunkelblau anfärbt. Ungeschädigte Zellen bleiben hell. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden je 300.000 Zellen in 3 ml Medium in einem 6-Well (Kulturoberfläche 9,6 cm² pro Well) ausgesät und durch kurzes horizontales Schwenken gleichmäßig verteilt.

Alle 2 Tage erfolgte ein Mediumwechsel nach folgendem Schema (Tabelle 2-1). Für den Mediumwechsel wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, mit 3 ml DPBS pro 6-Well gespült und anschließend 3 ml neues Medium hinzugegeben.

Tabelle 2-1: Zusammensetzung des Präadipozyten-, Induktions- und Adipozytenmediums

Tag	Medium	Zusammensetzung
- 2	Präadipozytenmedium	DMEM 10% NCS 1% AAS
0	Induktionsmedium	DMEM 10% FBS 1% AAS 200 nM Insulin 1 µM Dexamethason 0,5 mM IBMX
2	Adipozytenmedium	DMEM 10% FBS 1% AAS 200 nM Insulin
4	Adipozytenmedium	DMEM 10% FBS 1% AAS 200 nM Insulin
6	Adipozytenmedium	DMEM 10% FBS 1% AAS 200 nM Insulin

2.2.1.5 Rapamycinbehandlung

Ein Teil der Zellen wurde während der Differenzierung mit Rapamycin, einem Inhibitor von mTOR und der Adipozytendifferenzierung, behandelt. Dazu wurde die 10mM Stammlösung von Rapamycin in DMSO für den Gebrauch 1:100 mit DEPC-Wasser verdünnt. Diese 100µM Arbeitslösung wurde bei jedem Mediumswechsel dem Induktions- bzw. Adipozytenmedium zugesetzt, sodass die Rapamycinendkonzentration im Medium entweder 10nM, 50nM oder 100nM betrug.

2.2.1.6 Dokumentation der Zelldichte und der Differenzierung

Alle 2 Tage wurde mit Hilfe des „Cellscreens“ die Zelldichte in den 6-Wells bestimmt. Das Cellscreen-Gerät speichert mikroskopische Bilder der Zellen. Durch die Analyse dieser Bilder kann der Prozentsatz der von Zellen bedeckten Fläche und damit der Konfluenzgrad der Zellen ermittelt werden. Mit Hilfe des Cellscreens wurde das Wachstumsverhalten der 3T3-L1 Zellen analysiert. Des Weiteren konnte durch dieses Verfahren gezeigt werden, dass die zu Anfang ausgesäte Zellmenge in allen Wells gleich war.

Ebenso wurden alle 2 Tage Fotos von den Zellen gemacht, um den Differenzierungsprozess zu illustrieren. Dazu wurden die Zellen unter dem Mikroskop bei 100-facher, 200-facher und 400-facher Vergrößerung mit einer Digitalkamera fotografiert.

2.2.1.7 Oil Red O Färbung

Nach Abschluss der Differenzierung am „Tag 8“ wurden die Lipideinlagerungen in den Zellen durch Färbung mit Oil Red O sichtbar gemacht. Oil Red O ist ein roter Farbstoff, der spezifisch Lipide anfärbt.

Dazu wurde zuerst eine 0,5%-ige Glutaraldehyd-Lösung (25% Glutaraldehydlösung 1:50 in DPBS verdünnt) hergestellt. Dann wurden 6 Teile Oil-Red-O Stammlösung (siehe 2.1.2) mit 4 Teilen Aqua ad injectabilia gemischt und die Mischung 10 Minuten stehen gelassen. Mittels anschließender Filtration durch eine 0,45 µm Membran entstand die Oil Red O Arbeitslösung. Für die Färbung wurde zunächst das Medium abgesaugt und die 6-Wells jeweils mit 3 ml DPBS gewaschen. Dann wurden die Zellen 5 Min. in 0,5%-iger Glutaraldehyd-Lösung, 0,5 ml pro Well, fixiert. Anschließend wurden die 6-Wells zweimal mit je 1 ml DPBS für jeweils 5 Min. gewaschen und dann mit 1 ml 60% Isopropylalkohol gespült. Darauf folgte die Färbung mit 1 ml Arbeitslösung Oil Red O pro 6-Well für 1 Stunde. Danach wurde kurz mit 1 ml 60% Isopropylalkohol und anschließend mit 1 ml DPBS gewaschen. Damit war die Färbung abgeschlossen und die 6-Wells wurden jeweils mit 2 ml DPBS gefüllt und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.1.8 Zell-Ernte zur RNA-Extraktion

Für die Genexpressionsanalyse spezifischer Adipozytenmarker sowie für die Bestimmung der miRNA-Expression wurden die Zellen je eines 6-Wells an den Tagen 0, 2, 4, 6 und 8 in Trizol aufgenommen. Dazu wurden die Zellen wie beim Passagieren mittels Trypsin/EDTA vom Boden der 6-Wells gelöst. Aufgrund des geringeren Volumens wurden allerdings nur 0,5 ml Trypsin/EDTA pro 6-Well verwendet. Nach 10 Min. Inkubation und mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen in 3 ml des jeweiligen Mediums aufgenommen. Es folgte eine 4-minütige Zentrifugation bei 21°C und 1000 rpm. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets in 2 ml DPBS gelöst und jeweils in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Eppendorfgefäße wurden dann erneut 4 Min. bei 1000 rpm und 21°C zentrifugiert und die Überstände entfernt. Anschließend wurden zu jedem Pellet 500 µl Trizol (15-40% Guanidin-isothiocyanat und 30-60% Phenol) gegeben, kurz gemischt und die Tubes bei -80°C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolation und Bestimmung der RNA-Konzentration

Für die RNA-Isolation wurde das „mirVana miRNA Isolation Kit“ von Ambion verwendet. Es eignet sich besonders gut für die Extraktion von kleinen RNAs wie den miRNAs. Einige andere Verfahren wie die Solvent-Extraktion mit organischen Lösungsmitteln oder die Silica-Membran-Methode wurden für die Isolierung der verhältnismäßig größeren mRNAs optimiert und liefern eine schlechte, nicht quantitative miRNA Ausbeute. Das verwendete Kit kombiniert die beiden Methoden und ermöglicht eine quantitative Isolation von Total-RNA inklusive der miRNA-Fraktion.

Die RNA-Isolation erfolgte aus den in Trizol aufgenommenen Zellpellets. Zuerst wurde das Trizol-Zellgemisch bei Raumtemperatur aufgetaut und zu 500 µl Trizol wurden 25 µl 2 M Natrium-Acetat (pH=4,2) zugegeben, analog von Frowein et al. (2011). Nach kräftigem Schütteln wurden 100 µl Chloroform hinzugefügt und erneut für 20 Sek. geschüttelt. Es folgten 3 Min. Inkubation bei Raumtemperatur und 15 Min. Zentrifugation bei 4°C und 12.000 rpm. Durch die Zentrifugation entstanden 3 Schichten: die oberste, wässrige Phase enthielt die RNA, die weiße mittlere Phase die DNA und die untere, organische Phase die Proteine. Für die RNA-Extraktion wurde die wässrige Phase in frische 2 ml Tubes überführt. Gemäß den Angaben des Herstellers wurde „Lysis/Binding Solution“ und „miRNA Homogenate Additive“ zugegeben, gemischt und 10 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde „Acid-Phenol:Chloroform“ hinzupipettiert. Nach dem Mischen folgten 5 Min. Zentrifugation bei Raumtemperatur und 10.000 rpm. Dadurch entstand eine Phasentrennung in eine wässrige, RNA-haltige Phase und eine organische Phase mit Zellbestandteilen. Die wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Tube transferiert. Anschließend wurde die 1,25-fache Menge dieses Volumens an 100%-igem Ethanol hinzupipettiert und gründlich gemischt. Durch 15 Sek. Zentrifugation bei 10.000 rpm wurde diese Mischung durch einen Glasfaserfilter getrieben. Der Filter wurde dann mit 2 verschiedenen Waschlösungen insgesamt 3 Mal gewaschen. Anschließend wurde der Filter noch einmal bei 10.000 rpm für 1 Min. zentrifugiert, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen. Dann wurde der Filter mit der daran gebundenen RNA in ein neues Tube transferiert und die RNA durch Zugabe von 100 µl 95°C heißem nukleasefreiem Wasser und Zentrifugation bei 10.000 rpm für 30 Sek. eluiert. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde das Spektrophotometer „Nanodrop“ verwendet.

2.2.2.2 cDNA-Synthese

Vor der Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) muss zuerst die eluierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde das „QuantiTect Reverse Transkriptase Kit“ von Qiagen verwendet. Dieses Kit vereint 2 Reaktionen: zum Einen die Elimination von eventuell vorhandener genomischer DNA und zum Anderen die Reverse Transkription der RNA in cDNA. Die Elimination von genomischer DNA ist nötig, damit bei der PCR nur die in cDNA umgeschriebene RNA amplifiziert wird, nicht aber Reste von genomischer DNA. Die Reverse Transkription erfolgt durch ein multifunktionelles Enzym, die Reverse Transkriptase. Sie synthetisiert als RNA-abhängige DNA-Polymerase – nach dem Anlagern von Primern – cDNA von der RNA-Matrize. Anschließend baut sie die RNA-Stränge der entstandenen RNA:DNA-Hybride ab. Die noch nicht abgeschriebene RNA wird dabei nicht angegriffen.

Für die cDNA-Synthese mit dem „QuantiTect Reverse Transkriptase Kit“ wurden jeweils 400ng RNA eingesetzt. Nach dem Auftauen, Mischen und Zentrifugieren aller Reaktionslösungen des Kits wurde als erstes die genomische DNA-Eliminationsreaktion bestehend aus „gDNA Wipeout Buffer“, „template“ RNA und Wasser auf Eis angesetzt. Während einer 2-minütigen Inkubationsphase bei 42°C wurde dann die genomische DNA abgebaut. Danach wurden die Reaktionsgefäße sofort wieder auf Eis gestellt und der Reverse Transkriptions-Mastermix bestehend aus der Reversen Transkriptase, einem Primer-Mix und „RT Buffer“ auf Eis angesetzt. Nach gründlichem Mischen wurden zu jedem RNA-Template, aus dem zuvor die genomische DNA entfernt wurde, der Reverse Transkriptions-Mastermix zupipettiert, gemischt und 30 Minuten bei 42°C inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte die cDNA-Synthese und der Abbau der abgeschriebenen RNA. Anschließend wurde die Quantiscript Reverse Transkriptase durch 3 Min. Inkubation bei 95°C inaktiviert. Die synthetisierte cDNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 Real-Time PCR

Für die Quantifizierung der beiden Adipozytendifferenzierungsmarker C/EBP- α , PPAR- γ und den Präadipozytenmarker Pref-1 wurde eine Real-Time PCR (RT-PCR) durchgeführt. Im Gegensatz zur konventionellen PCR mit anschließender Gelelektrophorese kann bei der Real-Time PCR der gesamte Amplifikationsprozess detektiert werden. Dies wird durch Zugabe eines fluoreszierenden Farbstoffes möglich. Der Farbstoff fluoresziert im ungebundenen Zustand kaum, erst durch Bindung an doppelsträngige DNA nimmt die Fluoreszenz stark zu.

Während der PCR wird nach jedem Elongationsschritt die Fluoreszenz gemessen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist dabei proportional zur Menge an amplifizierter DNA.

Für die RT-PCR wurde „iQ SYBR Green Supermix“ verwendet. Dieses Reaktionsgemisch enthält bereits Dinukleotidtriphosphate, sog. dNTPs, die iTaq DNA Polymerase, 6mM MgCl₂, SYBR Green I, Fluorescein und Stabilisatoren. Für den Mastermix müssen nur noch die jeweiligen Primer und Wasser zugesetzt werden.

Gemäß den Angaben des Herstellers wurde für jedes Gen ein Mastermix bestehend aus „iQ SYBR Supermix“ und nukleasefreiem Wasser mit den dazugehörigen Primern vorbereitet. Die verschiedenen Mastermixe wurden gemischt und auf Eis gestellt. Anschließend wurden zu jeweils 75,6 µl Mastermix 3,15 µl cDNA-Template pipettiert. Nach gründlichem Mischen wurden dieses Gemisch in Triplikaten zu jeweils 25 µl auf eine 96-Well Platte aufgebracht. Dann wurde die Platte mit einer Folie verschlossen und nach kurzer Zentrifugation bei 1000 rpm zur RT-PCR in den „iCycler“ gestellt. Für die RT-PCR wurde folgendes Programm verwendet:

Tabelle 2-2: RT-PCR-Programm

Zyklus	Wiederholungen	Inkubationszeit in Min.	Temperatur in °C
1	1	3:00	95,0
2	40	0:15	95,0
		0:15	60,0
		1:00	72,0
3	1	2:00	72,0
4	1	1:00	95,0
5	1	0:30	55,0
6	80	0:10	55,0 – 95,0 (Temperaturerhöhung um 0,5 pro Zyklus)
7	1	∞	15,0

Nach beendeter PCR wurde die Spezifität der Amplifikation durch eine Schmelzkurve überprüft.

Die Auswertung der RT-PCR erfolgte mit dem dazugehörigen Programm, „Bio-Rad iQ5 2.0 Optical System Software“. Dabei wird für jedes Amplikon der sog. C_T-Wert (threshold cycle) bestimmt. Der C_T-Wert bezeichnet den PCR-Zyklus in dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal über das Hintergrundrauschen ansteigt. Je mehr „template“ DNA zu Beginn der PCR vorhanden ist, umso niedriger ist der C_T-Wert. Mithilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode wurde die Genexpression der Adipozytengene quantifiziert. Als Referenzgen wurde β -Actin, welches in unserem Experiment konstant exprimiert war, verwendet.

2.2.2.4 Semiquantitativer miRNA Microarray

Mit Hilfe vom miRNA Microarrays kann die relative Expression von mehreren Hundert miRNAs in nur einem Ansatz analysiert werden. Dazu wird die RNA von 2 verschiedenen Proben mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert: die RNA der einen Probe mit einem roten, die RNA der anderen mit einem grünen. Die beiden markierten Proben werden dann auf einen mit miRNA-Sonden beschichteten Objektträger aufgebracht und es kommt zur Hybridisierung der miRNAs der Proben mit den miRNA-Sonden auf dem Array. Die Fluoreszenzsignale der gebundenen miRNAs werden dann mit einem Microarray-Scanner detektiert.

Wir verwendeten den „miRCURY™ LNA microRNA Array“ von Exiqon. Dieser Array besteht aus 8 Sub-Arrays in 4 Replikaten und deckte insgesamt 425 Maus-miRNAs (miRBase Release 9.2) ab. Seine Sonden sind mit „locked nucleic acid“ (LNA) angereicherte Oligonukleotide, welche optimale Hybridisierungsfähigkeiten besitzen (Petersen et al. 2003). Für die miRNA Microarray-Analyse wurden RNA-Proben aus 2 unabhängigen Differenzierungsexperimenten (Experiment 1 und Experiment 2), jeweils mit und ohne Rapamycinbehandlung, verwendet. Die Zellernte erfolgte zum Einen im präkonfluenten Stadium (Tag 0) als Referenz und an „Tag 8“, dem Differenzierungsendpunkt. Tabelle 2-3 veranschaulicht den Versuchsaufbau:

Tabelle 2-3: Microarray-Design

	<i>Hy 3</i>	<i>Hy 5</i>
Array 1	Tag 0 (Experiment 1)	Tag 8 (Experiment 2)
Array 2	Tag 8 (Experiment 1)	Tag 0 (Experiment 2)
Array 3	Tag 8 + 10nM Rapamycin (Experiment 2)	Tag 0 (Experiment 1)
Array 4	Tag 0 (Experiment 2)	Tag 8 + 10nM Rapamycin (Experiment 1)

Die verwendeten Farbstoffe Hy3 und Hy5 sind spektral äquivalent mit den bekannten Cy3 und Cy5 Fluoreszenzfarbstoffen.

Für die Microarray-Analyse erfolgte zuerst eine RNA-Isolation aus den in Trizol aufgenommenen Zellen wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Zum Entfernen der Phenolreste und Konzentrieren der Proben wurde eine RNA-Fällung durchgeführt. Dazu wurden zur in 100 µl nukleasefreiem Wasser eluierten RNA 10 µl Ammoniumacetat, 1 µl Glycogen und 450 µl 100% Ethanol zugesetzt und die Fällungsreaktion in dieser Mischung durch Inkubation bei -20°C über Nacht vervollständigt. Am folgenden Tag wurden die Proben auf Eis aufgetaut und 15 Min. bei 16.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 16.000 rpm. Nach dem Verwerfen des Überstandes und Hinzufügen von 1 ml 75% Ethanol wurde erneut 10 Min. bei 16.000 rpm zentrifugiert. Dann wurde der

Überstand gründlich abgesaugt und die RNA-Präzipitate 10 Min. an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die gefällte RNA in nukleasefreiem Wasser gelöst, sodass ihre Konzentration ca. 0,5 µg/µl betrug.

Mit Hilfe des „Bioanalyzer“-Gerätes wurde die Quantität und Qualität der RNA-Proben überprüft. Für die Microarray-Analyse darf die zu analysierende RNA nicht degradiert sein. Deshalb wurde die „RNA Integrity Number“ (RIN) bestimmt, die für Microarray-Experimente nicht kleiner als 7 sein sollte. Bei den verwendeten Proben lag sie zwischen 9,60 und 9,80.

Nun konnte mit dem „Labeling“ der Proben begonnen werden. Hierfür wurde das „miRCURY LNA microRNA Array Power Labeling Kit“ von Qiagen verwendet. Bei diesem Kit wird das Labeling in 2 Schritten vollzogen: zuerst werden die Phosphatgruppen am 5'-Ende der miRNAs durch eine alkalische Phosphatase entfernt. In einem zweiten Schritt wird dann der Fluoreszenzfarbstoff enzymatisch an das 3'-Ende gekoppelt. Für die Labeling-Reaktion wurden zuerst alle Reagenzien auf Eis aufgetaut und gemischt. Dann wurde ein Mastermix aus unterschiedlich konzentrierten „Spike-in“ miRNA Proben, „CIP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) Buffer“ und „CIP Enzyme“ hergestellt, auf 8 Eppendorfgefäße verteilt und diese jeweils mit 2 µl RNA der Proben versetzt. Es folgten 30 Min. Inkubation bei 37°C in einem Thermocycler. Durch eine 5-minütige Inkubation bei 56°C wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Proben für 2 Min. auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Dann wurde ein zweiter Mastermix, bestehend aus dem „Labeling Buffer“, DMSO und dem Labeling Enzym angesetzt. 7 µl dieses Mastermixes wurden dann in jedes der Reaktionsgefäße aus der vorherigen Reaktion pipettiert. Anschließend kamen noch 1,5 µl „Fluorescent Label“ (Hy3 oder Hy5) hinzu. Nach kurzem Mischen wurde 1 Std. bei 16°C in einem Thermocycler inkubiert. Dann wurden die Proben zentrifugiert und auf Eis gestellt.

Für die Hybridisierung wurden die beiden Hy3- bzw. Hy5-markierten Proben, die auf einen Array aufgetragen werden sollten, auf Eis gemischt und 25 µl Hybridisierungspuffer zugegeben. Nach kurzem Mischen wurden die Reaktionsgefäße 2 Min. bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und zentrifugiert. Die Microarray-Slides wurden in eine Hybridisierungskammer gelegt und jeweils 20 µl nukleasefreies Wasser von beiden Seiten unter die Slides pipettiert. Dann wurde auf jeden Microarray-Träger ein LifterSlip gelegt und die jeweilige Probe zwischen LifterSlip und Microarray-Slide pipettiert. Nach dem Verschließen der Hybridisierungskammern folgte eine 16-stündige Inkubation bei 56°C im Wasserbad. Anschließend wurden die LifterSlips mit 10 ml Waschpuffer A (siehe

Tabelle 2-4) von den Arrayslides abgespült. Dann wurden die Arrays 2 Min. in 250 ml 56°C warmem Puffer A in einer abgedunkelten Kammer gewaschen. Anschließend wurden sie kurz in 250 ml Waschpuffer B gespült und dann 2 Min. bei Raumtemperatur in Waschpuffer B gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte in 250 ml Waschpuffer C, ebenfalls für 2 Minuten.

Tabelle 2-4: Waschpuffer-Zusammensetzung

Puffer	Waschpuffer A	Waschpuffer B	Waschpuffer C
20x Salt Buffer	25 ml	25 ml	2,5 ml
10% Detergent	5 ml		
nukleasefreies Wasser	220 ml	475 ml	247,5 ml
Gesamtvolumen	250 ml	500 ml	250 ml

Dann wurden die Slides kurz in nukleasefreiem Wasser gewaschen und getrocknet. Bis zum Auslesen wurden sie lichtgeschützt gelagert. Das Auslesen erfolgte mit dem „GenePix 4000A Microarray Scanner“ bei einer Auflösung von 10 µm. Für die Auswertung wurde die „GenePix ® Pro Software“ verwendet.

2.2.2.5 miRNA Microarray Statistik

Bioinformatische Unterstützung erfuhren wir freundlicherweise durch Dr. Philipp Pagel, Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik, Technische Universität München. Die miRNA Microarray Statistik wurde analog von Frowein et al. (2011) durchgeführt. Alle Analysen wurden in der Datenanalyse- und Statistiksprache „R“ durchgeführt. Es wurde das Paket „limma“ (Smyth 2005) aus der „Bioconductor Suite“ (Gentleman et al. 2004) verwendet. Zuerst wurde eine Gewichtung durchgeführt: a priori erhielt jeder Datenpunkt das Gewicht 1, leere Felder und andere „schlechte“ Spots wurden auf 0,1 heruntergewichtet. Dann wurde eine Hintergrund-Korrektur durchgeführt und die Daten innerhalb jedes Arrays mittels des „loess-smoother“ Verfahrens (Cleveland 1979; Yang et al. 2002) normalisiert. Nach der Normalisierung wurden alle Datenpunkte mit einer Gewichtung $\leq 0,1$ entfernt. Die so vorbereiteten Daten wurden dann mittels eines linearen Modells basierend auf einer moderierten *t*-Statistik (limma) auf differentielle Expression untersucht (Smyth 2004). Die differentielle Expression der miRNAs wurde als \log_2 „Fold-Change“ Wert ($\text{Log}_2\text{FC} = \log_2 \text{expr}_1/\text{expr}_2$) und die mittlere Expression als „mittlere Expressionshöhe“ ($\text{AveExpr} = \log_2 \sqrt{\text{expr}_1 \cdot \text{expr}_2}$) angegeben. Für die Signifikanz wurde der für multiples Testen korrigierte p-Wert verwendet (Benjamini und Hochberg-Methode (Benjamini 1995)). Eine differentielle

miRNA-Expression mit einem korrigierten p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Zur Beurteilung der miRNA-Expression unter Rapamycinbehandlung wurde die Differenz der \log_2FC -Werte der miRNA-Expression von „Tag 8 + 10nM Rapamycin“- und „Tag 8“-Zellen ohne Behandlung mit Inhibitor ermittelt. Dieser sog. \log_2FC (8R/8) Wert diente zur Bestimmung des Rapamycineffekts auf die Differenzierung. Bei einer gegenüber unbehandelten Zellen unter Rapamycinbehandlung verstärkten miRNA-Expression ergab sich ein positiver Rapamycineffekt, bei einer Verminderung der miRNA-Expression unter Rapamycineinfluss ergab sich ein negativer Rapamycineffekt.

2.2.2.6 Quantitativer „low density array“

Zur Konfirmation der Microarray-Ergebnisse wurde ein „low density array“ (LDA) von Applied Biosystems (TaqMan Rodent MicroRNA Array) durchgeführt. Er ermöglicht die gleichzeitige relative Quantifizierung von Hunderten von miRNAs. Über eine quantitative Real-time PCR werden auf einer Micro-Fluid-Karte miRNA-Expressionsprofile hoch spezifisch und sensitiv unter Verwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode analysiert. Die einzelnen TaqMan Genexpressions-Assays sind bereits in den jeweils 384 Wells der TaqMan Array-Karten anwendungsfertig vorbereitet. Auf den beiden „Rodent MicroRNA Array-Karten“ A und B befinden sich insgesamt 518 Mausspezifische miRNA Einzelassays.

Für unsere Analyse wurde die RNA von 8 Tage differenzierten 3T3-L1-Zellen bzw. mit Rapamycin behandelten Zellen und undifferenzierten „Tag-0“-Zellen als Referenz verwendet. Die „TaqMan® Rodent MicroRNA“ Arrays wurden gemäß dem Hersteller-Protokoll durchgeführt. Kurz zusammengefasst, erfolgte zuerst die „Megaplex cDNA“-Synthese aus 350 ng Total-RNA. Nach einer Präamplifikation mit 12 Zyklen wurden jeweils 100 μ l des Mastermixes mit dem Präamplifikations-Produkt in die 8 Reservoirs der Array-Karten pipettiert, mittels Zentrifugation bei 1200 rpm auf die einzelnen Wells verteilt und anschließend versiegelt. Die nachfolgende quantitative Analyse wurde an einem 7900HT Real-time PCR Gerät durchgeführt.

Bei der Auswertung mittels „Sequence Detection Systems“ (SDS) -Software wurde die Expression auf die „small-nucleolar RNA“ sno-202 als Referenz bezogen. Die ermittelten RQ-Werte ($RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$) wurden \log_2 transformiert (Livak et al. 2001).

2.2.2.7 miRNA Reverse Transkription

Für die quantitative Analyse der miRNA-Expression mittels PCR wurde wie bei den mRNAs zuerst eine Reverse Transkription durchgeführt. Dazu wurde das „TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit“ von Applied Biosystems verwendet. Die Reverse Transkription erfolgt hierbei für die jeweiligen miRNAs getrennt mit Hilfe von „stem-looped RT Primern“. Nach dem Auftauen der Reagenzien wurde der Mastermix aus nukleasefreiem Wasser, „RNase Inhibitor“, „RT Buffer“, einem dNTP Mix und der Reversen Transkriptase angesetzt. Der Mastermix wurde durchmischt und auf Eis gestellt. Anschließend wurden 7 µl des Mastermixes mit 5 µl RNA (10ng/µl) versetzt und 3 µl der auf Eis aufgetauten Primer hinzugefügt. Nach kurzem Mischen wurde für 5 Min. auf Eis vorinkubiert und danach die Reverse Transkription mit Hilfe eines Thermocyclers unter Verwendung des folgenden Programms durchgeführt:

Tabelle 2-5: RT-Programm

<i>Inkubationszeit in Min.</i>	<i>Temperatur in °C</i>
30	16,0
30	42,0
5	85,0
∞	4,0

Die in cDNA umgeschriebenen miRNAs konnten dann bei – 20°C gelagert werden.

2.2.2.8 RT-PCR Quantifizierung von einzelnen miRNAs

Mittels des „TaqMan MicroRNA Assays“ von Applied Biosystems wurde die Expression der miR-96, miR-143, miR-378, miR-193, miR-107, miR-222, miR-322 und miR-450a-5p zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten mit und ohne Rapamycinbehandlung quantitativ bestätigt.

Zuerst wurde „Universal PCR Master Mix“ laut Herstellerprotokoll mit nukleasefreiem Wasser versetzt, kurz gemischt und auf Eis gestellt. Dann wurden jeweiligen Primer und das Produkt der Reversen Transkription zugefügt:

Tabelle 2-6: Mastermix

<i>Reagenz</i>	<i>Volumen pro Reaktion</i>
Universal PCR Master Mastermix, verdünnt	17,67 µl
TaqMan MicroRNA Assay 20x (Primer)	1,00 µl
RT-Produkt	1,33 µl
Gesamtvolumen	20,00 µl

Nach vorsichtigem Mischen wurden die Mastermixe in Triplikaten zu jeweils 20 µl auf eine 96-Well Platte aufgebracht. Dann wurde die Platte mit einer Folie verschlossen und die RT-PCR mit dem „StepOnePlus“-Gerät unter Verwendung des folgenden Programms durchgeführt:

Tabelle 2-7: RT-PCR-Programm

Zyklus	Wiederholungen	Inkubationszeit in Min.	Temperatur in °C
1	1	3:00	95,0
2	40	0:15	95,0
		1:00	60,0
3	1	10:00	95,0
4	1	∞	15,0

Ausgewertet wurde die RT-PCR mit dem dazugehörigen Programm, „StepOne Software“. Als interne Kontrolle für die Normalisierung wurde die „small-nucleolar RNA“ snoRNA-234 verwendet. Die miRNA-Expression wurde als Mittelwert aus 2 biologischen Replikaten errechnet.

2.2.3 Cluster- und Genfamilienzugehörigkeit

Die Differenzierungs- bzw. Rapamycin-sensitiven miRNAs wurden mithilfe der miRNA-Datenbank „MirBase“ (<http://www.mirbase.org/>) auf ihre Cluster- und Genfamilienzugehörigkeit überprüft. Die Definition für den Abstand zwischen Clustermitgliedern beinhaltete dabei maximal 10kB.

2.2.4 Bioinformatische Vorhersage von miRNA-Zielgenen

Die miRNA-Zielgen-Vorhersage erfolgte mit folgenden bioinformatischen Datenbanken: „PITA“ (http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_dyn_data.html), „miRanda“ (<http://www.microrna.org/microrna>), „TargetScanS“ (<http://www.targetscan.org>), „pictar“ (<http://www.pictar.org>) und „TargetSpy“ (<http://www.targetspy.org>). Es wurden mehrere Datenbanken verwendet, um sich die jeweiligen Unterschiede in den verwendeten Algorithmen zu Nutze zu machen.

Aufgrund der sehr hohen Zahl von vorhergesagten miRNA-mRNA Paaren wurde eine Eingrenzung auf nur solche Vorhersagen vorgenommen, bei denen sich mindestens 2 Datenbanken einig waren. So sollte die Wahrscheinlichkeit einer richtigen Vorhersage erhöht werden. Weiterhin haben wir eng verwandte miRNAs analog „TargetScanS“

zusammengefasst, so dass insgesamt 482 miRNA-Genfamilien für die Zielgensuche übrig blieben. Zur Erleichterung der Interpretierbarkeit führten wir 2 Größen ein. Freq1 bezeichnete die Anzahl der miRNAs, die laut Konsensusvorhersage an eine bestimmte mRNA binden und diese damit regulieren können. Freq2 gab die Anzahl der Gene bzw. Transkripte an, die von einer definierten miRNA laut Vorhersage potentiell reguliert werden können.

Die mRNAs des mTOR-Signalwegs wurden anhand der von der Datenbank „Kegg“ (<http://www.genome.jp/kegg>) erstellten Gen-Tabelle ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Modellsystems

Um die miRNA-Expression während der Adipozytendifferenzierung zu analysieren, mussten Präadipozyten zu Adipozyten ausdifferenziert werden. Dazu wurden 3T3-L1-Präadipozyten verwendet und ihre Differenzierung mit Hilfe von Insulin, Dexamethason und IBMX am sog. „Tag 0“ (4 Tage nach der Aussaat) induziert.

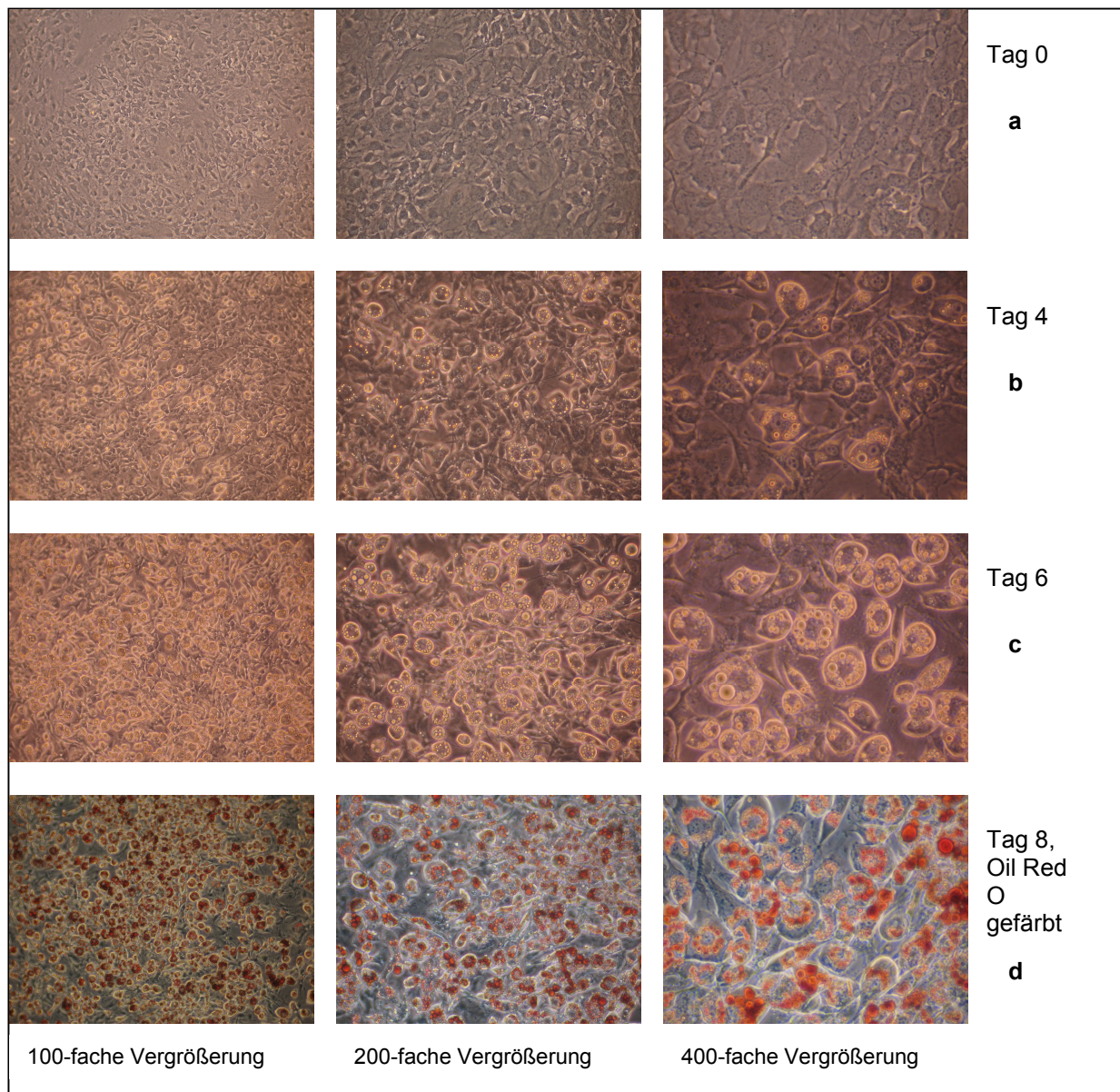


Abb. 3-1: Mikroskopische Dokumentation der Adipozytendifferenzierung und Lipidfärbung. Die 3T3-L1-Zellen wurden am Tag der Induktion (a) und 4, 6 oder 8 Tage später (b, c, d) bei verschiedenen Vergrößerungen (100-fach, 200-fach und 400-fach) fotografiert. Die Fotos von „Tag 8“ wurden nach einer Lipidfärbung mittels Oil Red O aufgenommen.

Abb. 3-1 zeigt die morphologischen Veränderungen während des Differenzierungsprozesses. Die am „Tag 0“ (Abb. 3-1 a) noch sternförmig ausgebreiteten Präadipozyten rundeten sich im Verlauf zunehmend ab und bildeten ihre Ausläufer schrittweise zurück. Gleichzeitig nahm die Zelldichte stark zu. Ab „Tag 4“ (Abb. 3-1 b) bildeten sich Vakuolen in den Zellen, die sich vermehrten und vergrößerten bis schließlich am „Tag 8“ (Abb. 3-1 d) fast alle Zellen Vakuolen enthielten. Die am „Tag 8“ durchgeführte Oil Red O Färbung zeigte, dass es sich um Fettvakuolen handelte, denn dieser Farbstoff färbt spezifisch Lipide rot. Diese morphologischen Veränderungen, insbesondere das Einlagern von Lipidtröpfchen und die Abrundung der Zellen sind typische Charakteristika ausdifferenzierter Fettzellen.

Um die optimale Zelldichte für die Ausdifferenzierung zu bestimmen, wurden die Präadipozyten zu je 50.000, 100.000, 200.000 und 300.000 Zellen pro Well ausgesät und der Anteil der differenzierten Zellen am „Tag 8“ verglichen (siehe Abb. 3-2). Dabei zeigte sich, dass die Zahl der differenzierten Zellen in diesem Bereich proportional zur Zelldichte bei Aussaat war. Während bei 50.000 Zellen pro Well nur vereinzelt Fettvakuolen auftraten (Abb. 3-2 a), so waren es bei doppelter Zelldichte (Abb. 3-2 b) schon mehr. Bei 300.000 Zellen pro Well schließlich war der überwiegende Teil der Zellen ausdifferenziert (Abb. 3-2 d). Es wurde auch ein Versuch mit 450.000 Zellen pro Well durchgeführt. Dies führte jedoch nicht zu einem erhöhten Anteil an differenzierten Zellen gegenüber den 300.000 pro Well und hatte den Nachteil, dass die Zellen wegen der hohen Dichte gegen Ende der Differenzierungsperiode zum Ablösen neigten. Deshalb entschlossen wir uns, für die folgenden Experimente 300.000 Zellen pro Well auszusäen.

Neben der optischen Dokumentation der Adipozytendifferenzierung erfolgte eine Analyse der Expression verschiedener Marker der Adipozytendifferenzierung. Pref-1 ist ein Präadipozytenmarker und verschwindet im Laufe der Differenzierung. C/EBP- α und PPAR- γ hingegen werden von Präadipozyten nur gering exprimiert und steigen während der Differenzierung an. Abb. 3-3 zeigt die Expression dieser 3 Marker zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten. C/EBP- α und PPAR- γ stiegen von „Tag 0“ bis „Tag 8“ stetig an. Am 8. Tag hatte C/EBP- α das 78,2-fache und PPAR- γ das 33,6-fache des Ausgangswertes erreicht. Pref-1 hingegen fiel von „Tag 0“ bis „Tag 8“ ab. An „Tag 4“ war er zwar etwas stärker exprimiert als an „Tag 2“, insgesamt jedoch betrug seine Expression am 8. Tag nur mehr 19,4% des Ausgangswertes. Die Expressionszunahme der beiden Adipozytendifferenzierungsmarker C/EBP- α und PPAR- γ sowie die Abnahme des Präadipozytenmarkers Pref-1 zeigten, dass die große Mehrheit der Präadipozyten zu Adipozyten ausdifferenziert war.

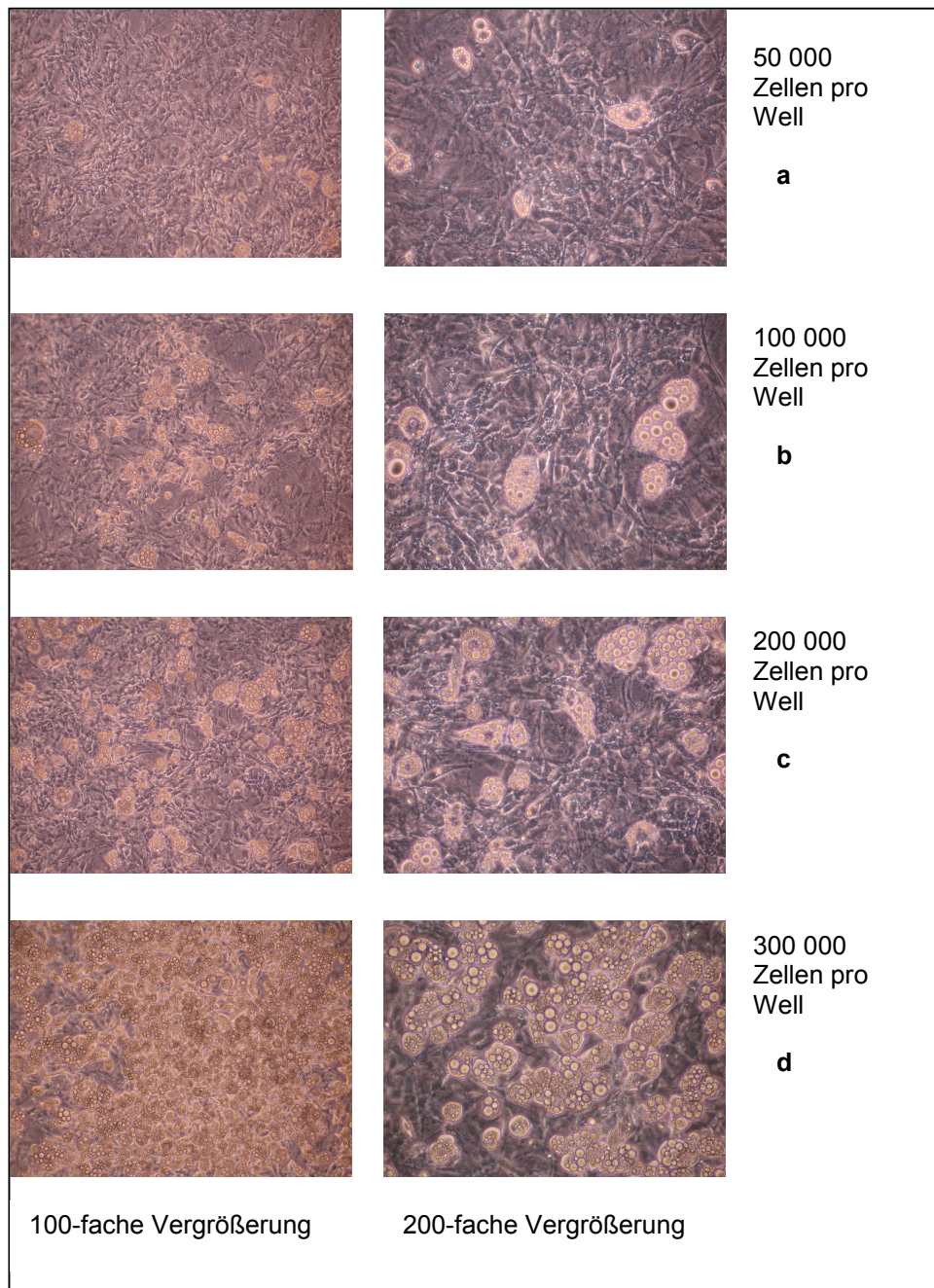


Abb. 3-2: Differenzierung in Abhängigkeit von der Zelldichte bei Aussaat. Mikroskopische Bilder (bei 100- bzw. 200-facher Vergrößerung) von 3T3-L1-Zellen 8 Tage nach Induktion. Die Zellen waren unterschiedlich dicht ausgesät und unter denselben Bedingungen zur Differenzierung angeregt worden.

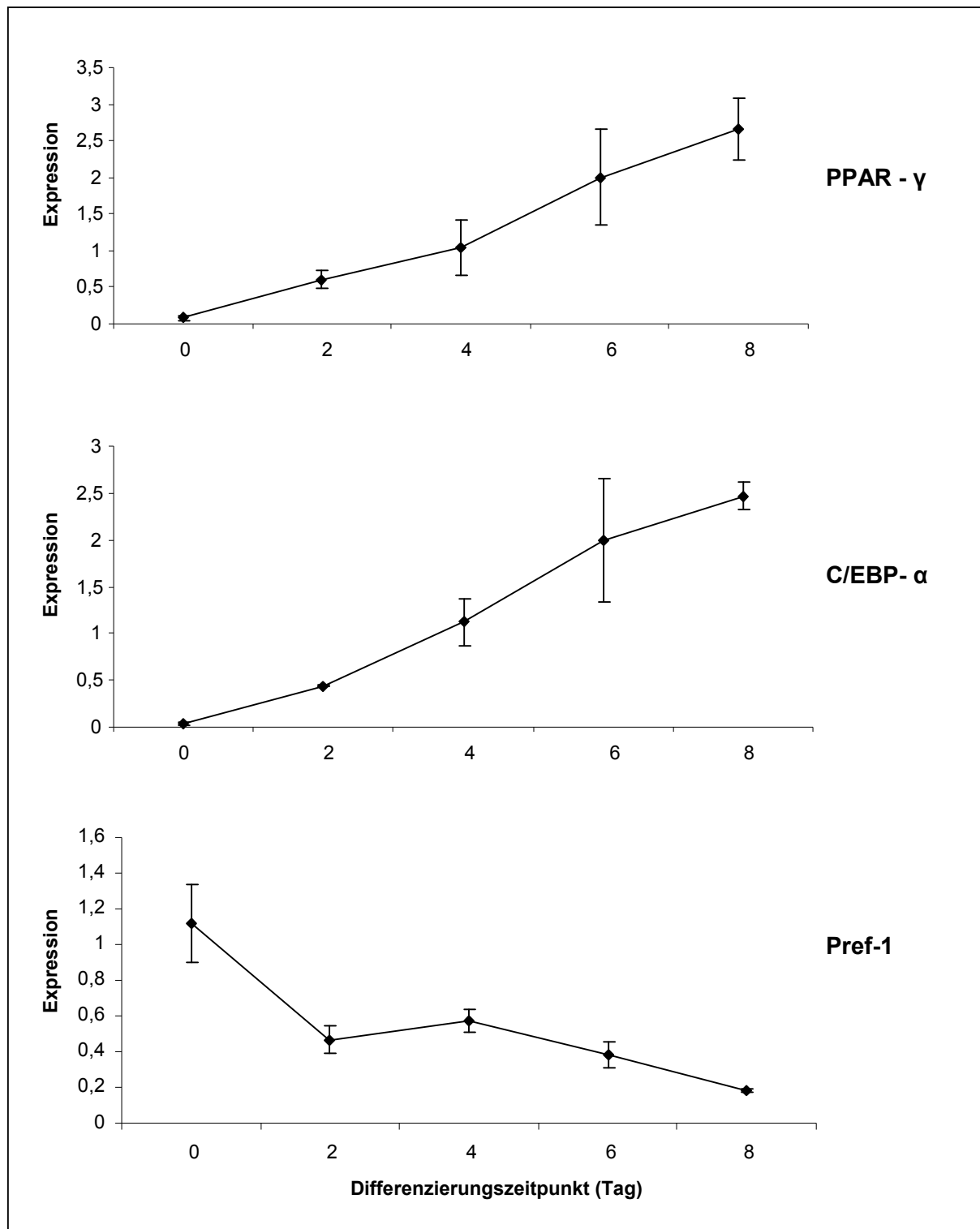


Abb. 3-3: Expression von Markern der Adipozytendifferenzierung zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten. 3T3-L1-Zellen wurden am Tag der Induktion, 2, 4, 6, und 8 Tage später in Trizol aufgenommen und mit der extrahierten RNA eine RT-PCR für die Adipozytendifferenzierungsmarker C/EBP- α , PPAR- γ und den Präadipozytenmarker Pref-1 durchgeführt. Die Expression wurde auf β -Actin bezogen. Es sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der beiden Experimente.

3.2 miRNA-Expression während der Adipozytendifferenzierung

Nachdem nun sichergestellt war, dass die Adipozyten unter den gewählten Bedingungen optimal differenzierten, konnte eine zentrale Frage dieser Arbeit in Angriff genommen werden: die Ermittlung differentiell regulierter miRNAs während der Differenzierung.

3.2.1 Microarray

Zu diesem Zweck wurde zuerst ein Microarray, mit dem semiquantitativ die Expression von 425 Maus-miRNAs bestimmt werden konnte, mit folgendem Design durchgeführt: auf einem Array wurde die RNA von am „Tag 0“ geernteten Zellen aus einem Experiment mit RNA von „Tag 8“ aus einem anderen Differenzierungsexperiment hybridisiert. Beim zweiten Array wurde genau umgekehrt verfahren (siehe Tabelle 2-3).

In der Microarrayanalyse (siehe 2.2.2.5) waren insgesamt 52 miRNAs mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ differentiell reguliert. 29 miRNAs waren im Verlauf der Differenzierung hoch- und 23 miRNAs waren herunterreguliert. Eine Tabelle mit diesen während der Differenzierung differentiell exprimierten miRNAs findet sich im Anhang (Tabelle 7-1). Zur übersichtlicheren Darstellung zeigt Abb. 3-4 ein Balkendiagramm mit der Häufigkeitsverteilung der relativen miRNA-Expressionsveränderung zwischen den beiden Differenzierungszeitpunkten.

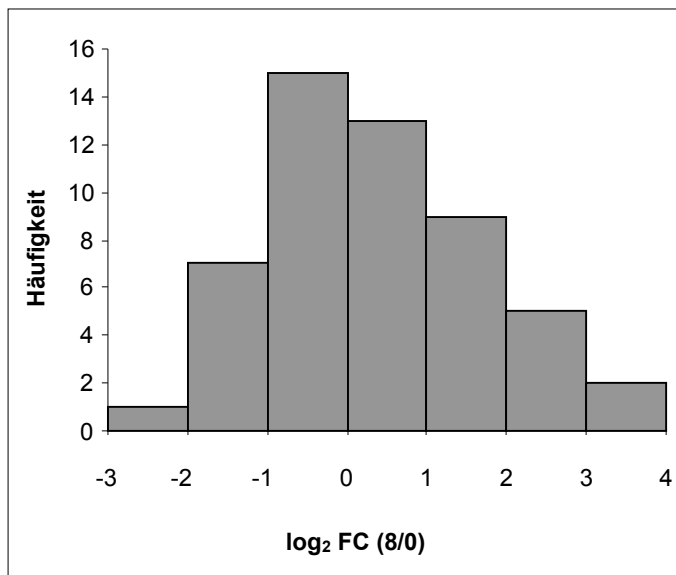


Abb. 3-4: Differentielle miRNA-Expression während der Adipozytendifferenzierung – Microarray. Häufigkeitsverteilung der relativen miRNA-Expressionsveränderungen zwischen Differenzierungsinduktion und Ausdifferenzierung bei 3T3-L1 Zellen (vgl. Tabelle 7-1). Log₂ FC (8/0) gibt die Veränderung der miRNA-Expressionen von „Tag 0“ gegenüber „Tag 8“ aus 2 biologischen Replikaten an.

3.2.2 Konfirmation mittels quantitativer „low density array“-Analyse

Um die semiquantitativen Microarrayergebnisse mit einer quantitativen Methode zu validieren, wurde zusätzlich ein „low density array“ (LDA, Applied Biosystems) durchgeführt. Dazu wurden RNA-Proben der beiden Differenzierungszeitpunkte („Tag 0“ und „Tag 8“) aus einem der Experimente, die auch für den Microarray verwendet wurden, eingesetzt. Nachdem der LDA nur für ein biologisches Experiment durchgeführt wurde, konnte kein Signifikanzniveau wie beim Microarray bestimmt werden.

Bei der LDA-Auswertung waren 224 miRNAs während der Differenzierung hoch-, 75 herunter- und 2 nicht differentiell reguliert (vgl. Tabelle 7-2 im Anhang). Auch hier wurde zur übersichtlicheren Darstellung ein Balkendiagramm mit der Häufigkeitsverteilung der relativen miRNA-Expressionveränderungen zwischen den beiden Differenzierungszeitpunkten angefertigt (siehe Abb. 3-5).

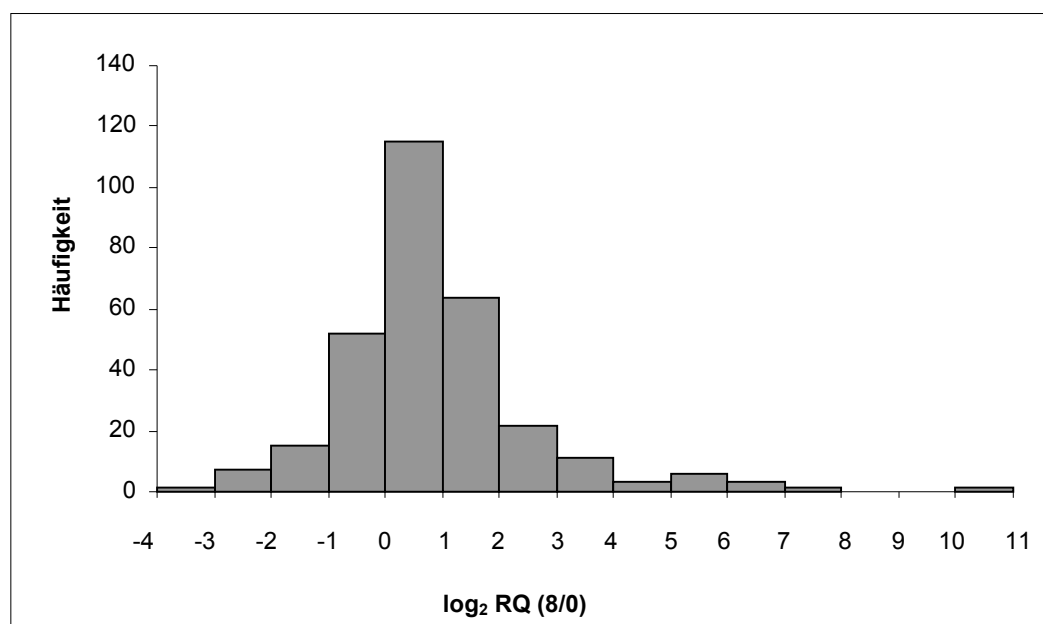


Abb. 3-5: Differentielle miRNA-Expression während der Adipozytendifferenzierung – LDA. Häufigkeitsverteilung der relativen miRNA-Expressionsveränderungen zwischen Differenzierungsinduktion und Ausdifferenzierung bei 3T3-L1 Zellen (vgl. Tabelle 7-2). Log₂ RQ (8/0) gibt die Veränderung der miRNA-Expressionen von „Tag 0“ gegenüber „Tag 8“ an. Die miRNA-Expression ist bezogen auf sno-202.

3.2.3 Vergleich der Arrayverfahren

Nun sollte die Übereinstimmung der beiden Methoden evaluiert werden. Dazu wurden alle miRNAs herangezogen, die in beiden Methoden bestimmt worden waren und im semiquantitativen Microarray ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ bzw. im quantitativen LDA

eine fehlerfreie Detektion gezeigt hatten. Diese Kriterien wurden von 43 miRNAs erfüllt. Abbildung 3-6 zeigt die \log_2 FC- bzw. RQ-Werte der beiden Methoden für diese miRNAs in einem Streudiagramm. Bis auf zwei größere und einen kleineren Ausreißer (miR-146a, let-7e und miR-29b, grau markiert) stimmten sowohl die Richtung als auch die Stärke der Expressionsauslenkung in beiden Methoden gut überein. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,87 bei einer Signifikanz von $2,55 \times 10^{14}$, welche durch einen Korrelationstest bestimmt wurde.

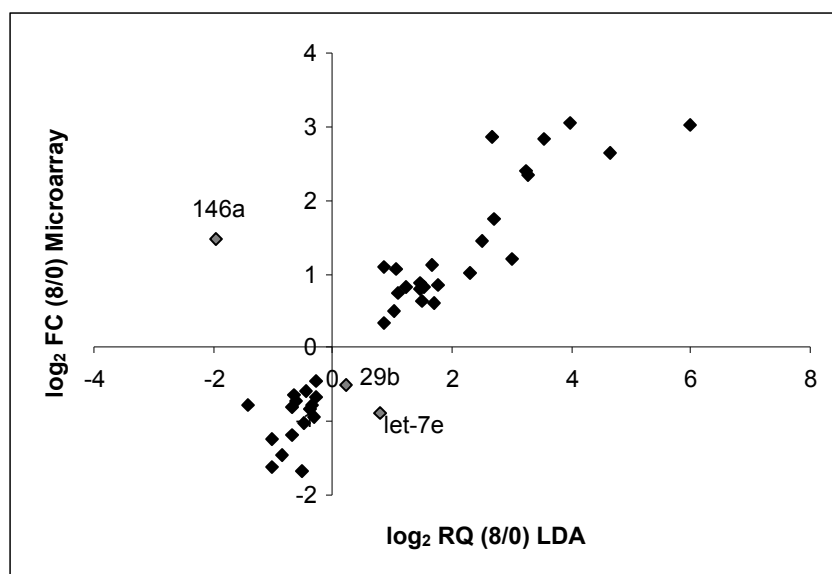


Abb. 3-6: Differentielle miRNA-Expression während der Adipozytendifferenzierung – Microarray und LDA. Streudiagramm der relativen miRNA-Expressionsveränderungen zwischen Induktion und Differenzierung, welche mittels Microarray- bzw. LDA-Analyse bestimmt wurden. \log_2 FC (8/0) bzw. \log_2 RQ (8/0) zeigen die differentielle miRNA-Expression von „Tag 0“ gegenüber „Tag 8“ bei der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen. Grau dargestellt sind die 3 Ausreißer.

Von den in beiden Methoden übereinstimmend regulierten miRNAs sollten nun die am stärksten differentiell ausregulierten miRNAs ermittelt werden. Dazu wurden in Tabelle 3-1 die miRNAs farblich markiert, die über das 0,5- bzw. 1,0-fache hinaufreguliert oder aber unter das - 0,5- bzw. - 1,0-fache herunterreguliert waren. Als besonders relevant wurden all jene miRNAs angesehen, die in beiden Methoden eine starke Ausregulation zeigten. Für einige dieser miRNAs wurde die Expression auch an zusätzlichen Differenzierungszeitpunkten mittels RT-PCR bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analyse finden sich unter Kapitel 3.4.5.

Tabelle 3-1: Differentielle miRNA-Expression während der Adipozytendifferenzierung – in Microarray und LDA übereinstimmend regulierte miRNAs

hochregulierte miRNAs	log₂ FC (8/0) Microarray	log₂ RQ (8/0) LDA	korr. p-Wert Microarray
miR-378	3,047309073	3,982765463	4,85E-07
miR-193	3,026435379	5,989139007	6,18E-11
miR-107	2,869566835	2,684818738	1,49E-06
miR-103	2,839534928	3,557042415	1,49E-06
miR-210	2,638953455	4,636334602	0,000626933
miR-146b	2,394903629	3,231125158	1,49E-06
miR-365	2,352179114	3,282439805	0,008189925
miR-96	1,751567925	2,709290636	3,86E-05
miR-183	1,4578083	2,495695163	0,00728791
miR-182	1,208975134	2,989139007	0,012764596
miR-143	1,116816385	1,655351829	0,000115835
miR-22	1,100592483	0,871843649	0,000626933
miR-30a	1,065822675	1,056583528	0,000174927
miR-148b	1,016706772	2,289834465	0,039181386
let-7c	0,888483118	1,480265122	0,000816972
miR-30c	0,852021076	1,757023247	0,001166223
miR-30e	0,831968885	1,521050737	0,002281511
miR-152	0,82499539	1,214124805	0,005686187
miR-10b	0,797276359	1,448900951	0,005759812
miR-15a	0,753028544	1,09085343	0,04208957
miR-106b	0,640371565	1,485426827	0,030944451
miR-30b	0,60872672	1,700439718	0,007588987
let-7d	0,495360654	1,021479727	0,035153997
miR-27b	0,345222521	0,871843649	0,044217517
herunterregulierte miRNAs			
miR-690	-0,453371121	-0,286304185	0,039181386
miR-125b-5p	-0,59615269	-0,434402824	0,003792781
miR-125a-5p	-0,632539868	-0,64385619	0,005742936
miR-503	-0,667843359	-0,268816758	0,001628424
miR-199a-3p/199b	-0,727463709	-0,59946207	0,000609988
miR-31	-0,76726974	-0,358453971	0,001289299
miR-199a-5p	-0,769696757	-1,434402824	0,000495463
miR-678	-0,816222796	-0,666576266	0,003437456
miR-199b*	-0,843475965	-0,395928676	0,000626933
miR-29a	-0,943664327	-0,321928095	0,000113359
miR-34a	-1,012332524	-0,473931188	3,04E-05
miR-214*	-1,176052454	-0,666576266	0,034912306
miR-214	-1,243825318	-1,029146346	8,82E-05
miR-34c	-1,464176676	-0,862496476	9,49E-05
miR-221	-1,618870076	-1,029146346	0,003052591
miR-222	-1,684789047	-0,514573173	1,49E-06

Log₂ FC (8/0) bzw. log₂ RQ (8/0) geben die miRNA-Expressionsveränderung von „Tag 0“ gegenüber „Tag 8“ der Differenzierung an. Für den Microarray zeigt der korrigierte p-Wert die Signifikanz der Veränderung, dabei steht E-x für 10^{-x}. MiRNAs mit >1-facher Hoch- bzw. <-1-facher Herunterregulation (dunkelgrau) und miRNAs mit >0,5-facher Hoch- bzw. <-0,5-facher Herunterregulation (hellgrau) sind hinterlegt. * steht für die miRNA-Minorsequenz.

3.3 Auswirkung von Rapamycin auf die Adipozytendifferenzierung

Nachdem die miRNA-Expression während der Differenzierung analysiert worden war, sollte sie nun unter dem Einfluss von Rapamycin, einem mTOR-Inhibitor, der die Differenzierung blockiert, charakterisiert werden.

Dazu wurde dem Induktions- und Differenzierungsmedium Rapamycin in verschiedenen Konzentrationen (10nM, 50nM und 100nM) zugesetzt. Die genaue Vorgehensweise ist in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben. Abb. 3-7 zeigt ein Foto von einem 6-Well mit 3T3-L1-Zellen, die während der Differenzierung mit verschiedenen Rapamycinkonzentrationen behandelt und am „Tag 8“ Oil Red O gefärbt wurden. Die mit Rapamycin behandelten Zellen (Abb. 3-7 a, b, c) färbten sich nur schwach rosa, während die unbehandelten Zellen (Abb. 3-7 d) rot erschienen. Zwischen den verschiedenen Rapamycinkonzentrationen zeigte sich makroskopisch kein Unterschied.

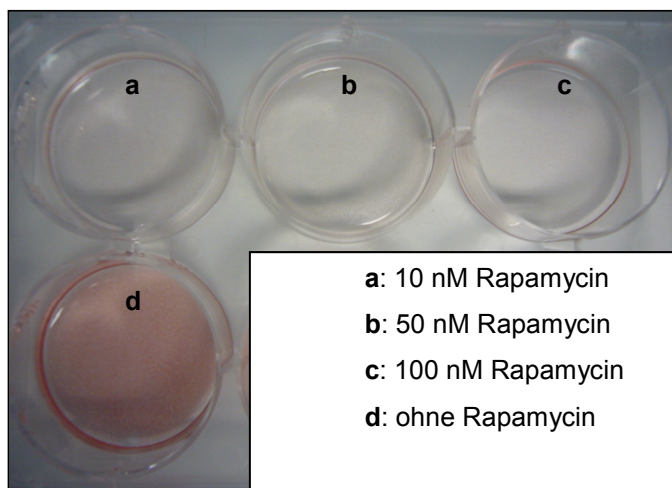


Abb. 3-7: Auswirkung von Rapamycin auf die Adipozytendifferenzierung – makroskopisch. 6-Well mit 3T3-L1-Zellen, die ab der Induktion mit 3 verschiedenen Rapamycinkonzentrationen (10nM, 50nM und 100nM) behandelt wurden bzw. ohne Behandlung blieben (d) und an „Tag 8“ Oil Red O gefärbt wurden.

Mikroskopisch (Abb. 3-8) bestätigte sich dieses Bild. Über 90% der unbehandelten Zellen enthielten rot gefärbte Fettvakuolen (Abb. 3-8 d). Bei den mit Rapamycin behandelten Zellen (Abb. 3-8 a, b, c) waren es nur 10-15%. Dabei war rein optisch keine Korrelation zwischen der jeweiligen Rapamycinkonzentration und der Anzahl der differenzierten Adipozyten festzustellen.

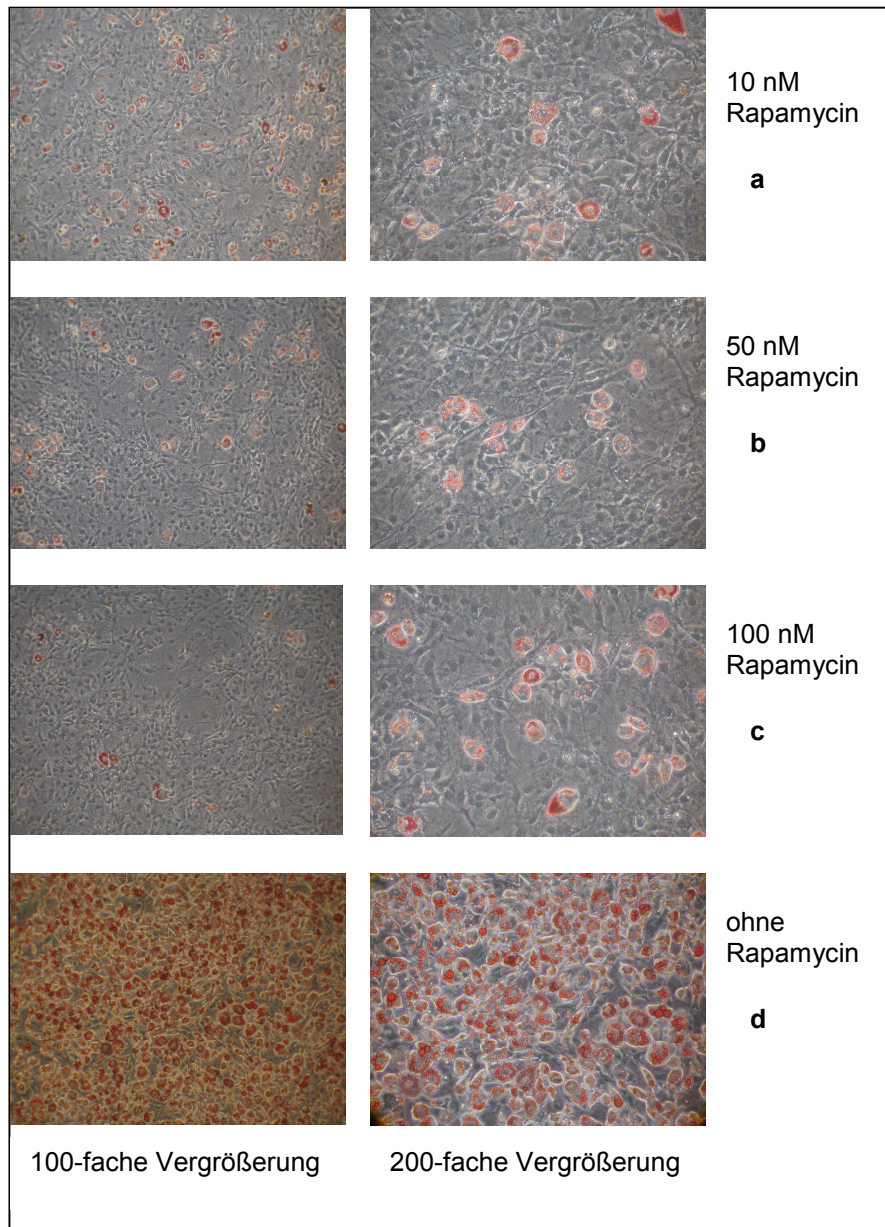


Abb. 3-8: Auswirkung von Rapamycin auf die Adipozytendifferenzierung – mikroskopisch. Mikroskopische Bilder von 3T3-L1-Zellen, die ab der Induktion mit 3 verschiedenen Rapamycinkonzentrationen (10nM, 50nM und 100nM) behandelt wurden bzw. ohne Behandlung blieben und an „Tag 8“ Oil Red O gefärbt wurden.

Zur weiteren Analyse der Auswirkung einer Rapamycinbehandlung auf die Adipozytendifferenzierung wurde die Expression der Adipozytenmarker mittels RT-PCR quantifiziert (Abb. 3-9).

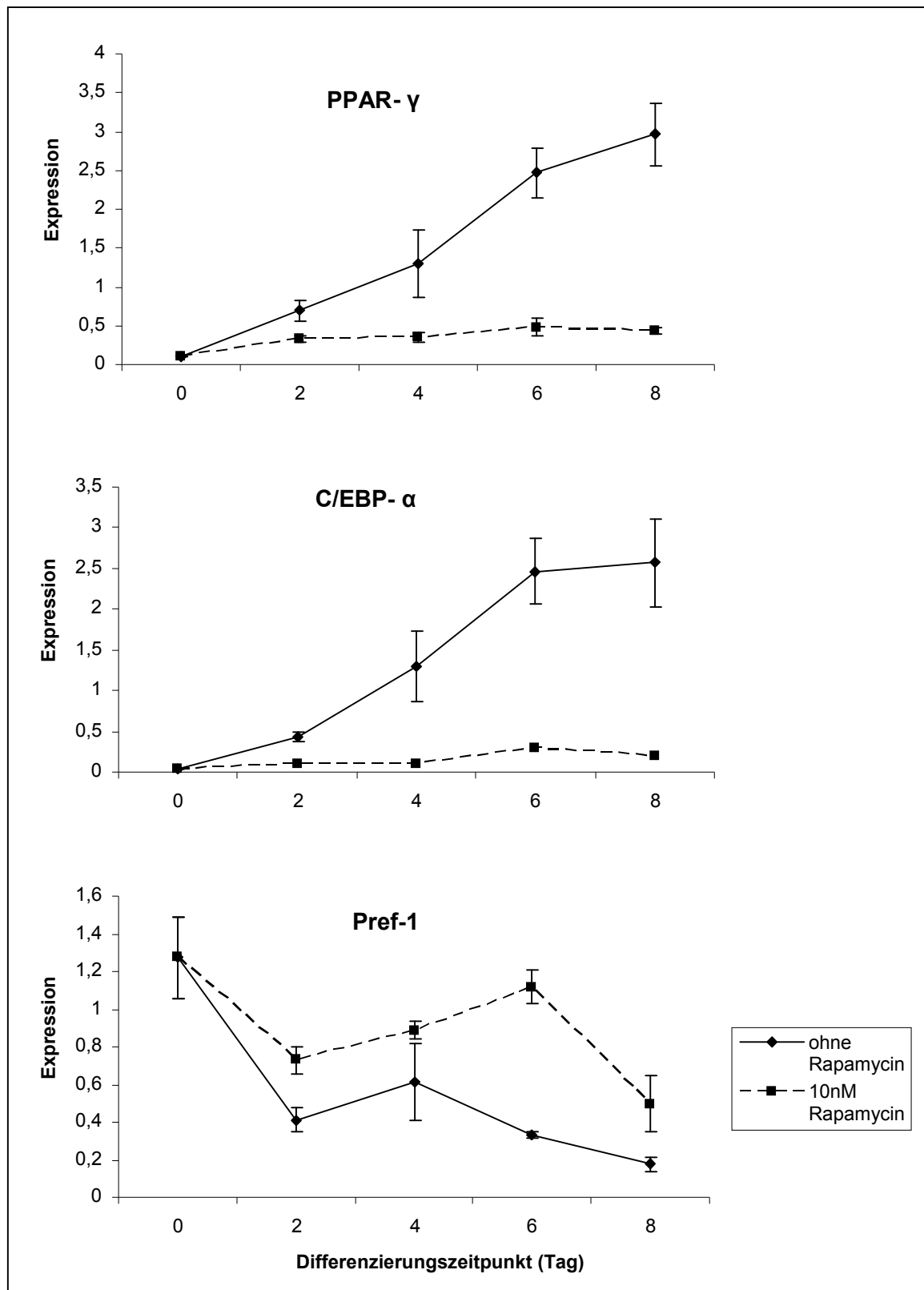


Abb. 3-9: Expression von Markern der Adipozytendifferenzierung unter Behandlung mit Rapamycin. 3T3-L1-Zellen wurden ab der Induktion mit 10nM Rapamycin behandelt (gestrichelte Linie) oder blieben unbehandelt. Am Tag der Induktion, 2, 4, 6, und 8 Tage später wurden sie in Trizol aufgenommen und mit der extrahierten RNA eine RT-PCR für C/EBP- α , PPAR- γ und Pref-1 durchgeführt. Die Expression wurde auf β -Actin bezogen und es sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der beiden Experimente.

Während unter Kontrollbedingungen C/EBP- α bis „Tag 8“ auf das 78,2-fache und PPAR- γ auf das 33,6-fache stiegen, betrug deren Expression unter 10nM Rapamycin nur das 5,1-fache respektive das 4,0-fache des Ausgangswertes. Analog erreichten C/EBP- α und PPAR- γ an „Tag 4“ ohne Rapamycin das 37,7-fache bzw. das 13,1-fache des Ausgangswertes, mit Rapamycinbehandlung erzielte C/EBP- α jedoch nur das 3,1-fache und PPAR- γ das 3,7-fache. Der Präadipozytenfaktor Pref-1 fiel im Verlauf der Differenzierung bis auf 19,4% der Ausgangsexpression ab, unter Einfluss von Rapamycin hingegen nur auf 54,8% des Ausgangswertes. An „Tag 4“ betrug seine Expression ohne Rapamycin 50,9%, unter Rapamycinbehandlung jedoch 79,7% der Ausgangsexpression.

Insgesamt war das Expressionsmuster der mit Rapamycin behandelten Zellen ähnlich dem undifferenzierter Zellen. Dennoch zeigten die Differenzierungsmarker einen gegenüber „Tag 0“- Zellen leicht erhöhten Differenzierungsgrad an.

Auch die Auswirkung der 3 verschiedenen Rapamycinkonzentrationen, 10nM, 50nM und 100nM, wurde mittels RT-PCR analysiert. Abb. 3-10 stellt die Expression der Differenzierungsmarker unter den jeweiligen Rapamycinkonzentrationen exemplarisch für „Tag 8“ dar.

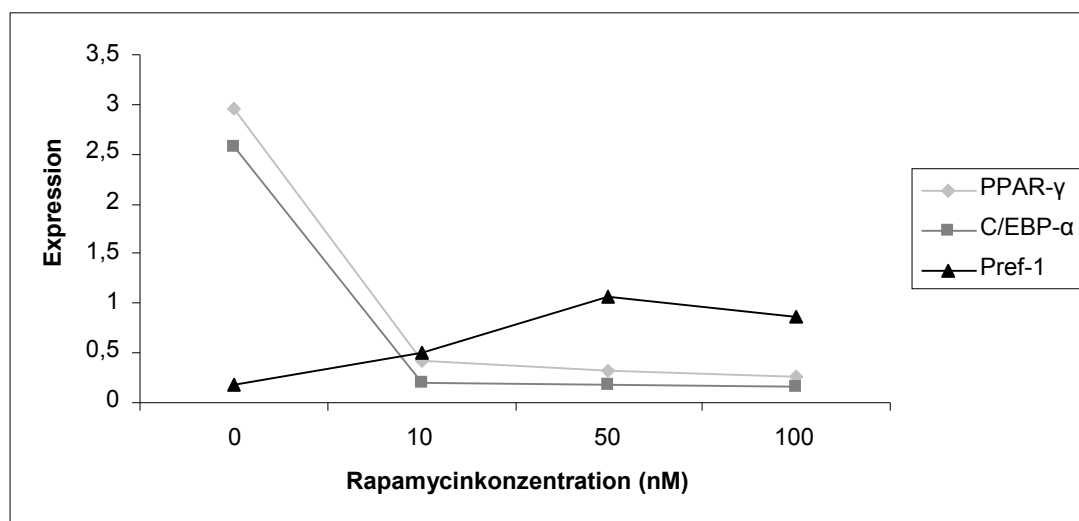


Abb. 3-10: Expression von Markern der Adipozytendifferenzierung an „Tag 8“ unter Behandlung mit verschiedenen Rapamycinkonzentrationen. 3T3-L1-Zellen wurden ab der Induktion mit 10nM, 50nM oder 100nM Rapamycin behandelt oder blieben unbehandelt. Am „Tag 8“ wurden sie in Trizol aufgenommen und mit der extrahierten RNA eine RT-PCR für C/EBP- α , PPAR- γ und Pref-1 durchgeführt. Die Expression wurde auf β -Actin bezogen.

C/EBP- α und PPAR- γ zeigten bei 100nM Rapamycin die stärkste Inhibierung ihrer Expression: C/EBP- α erreichte nur 6,0% des Wertes von unbehandelten Zellen und PPAR- γ

9,0%. Pref-1 hingegen wies bei 50nM den stärksten Rapamycineffekt auf: die Expression betrug hier das 6,9-fache gegenüber unbehandelten „Tag 8“-Zellen. Insgesamt zeigte sich jedoch kein großer Unterschied bezüglich des inhibierenden Effekts der verschiedenen Rapamycinkonzentrationen: schon mit 10nM Rapamycin fiel die Expression von C/EBP- α und PPAR- γ auf 8,6% respektive 14,4% des Wertes von unbehandelten „Tag 8“-Zellen. Pref-1 stieg unter dieser geringen Behandlung auf das 3,2-fache der Expression differenzierter Adipozyten. Deshalb entschieden wir uns, die geringste wirksame und vermutlich nicht toxische Konzentration (10nM) für die weiteren Experimente zu verwenden.

3.4 Auswirkung von Rapamycin auf die miRNA-Expression

Nachdem die Inhibierung der Adipozytendifferenzierung durch Rapamycin nachgewiesen werden konnte, sollte nun der Einfluss von Rapamycin auf die miRNA-Expression der Adipozyten analysiert werden.

3.4.1 Microarray

Dazu wurden zwei weitere Microarrays mit folgendem Design (siehe auch Tabelle 2-3) durchgeführt: 3T3-L1-Zellen wurden ab der Induktion mit 10nM Rapamycin behandelt und am „Tag 8“ geerntet. Für den Array wurde die RNA dieser Zellen mit der von am „Tag 0“ geernteten, unbehandelten Zellen aus einem anderen Experiment hybridisiert. Beim zweiten Array wurde genau umgekehrt verfahren.

Für die Auswertung wurden die Daten dieser beiden Arrays mit den unter 3.2.1 beschriebenen Microarrays kombiniert. Dies war möglich, weil alle Arrays „Tag 0“-Zellen als Bezugspunkt hatten. So konnte die miRNA-Expression von Zellen, die 8 Tage lang mit 10nM Rapamycin behandelt worden waren, mit solchen ohne Behandlung verglichen werden. Die Differenz der \log_2 FC-Werte von „Tag 8 + 10nM Rapamycin“- und „Tag 8“-Zellen (\log_2 FC (8R/8)) konnte ermittelt werden und diente der Beschreibung der Effektstärke der Rapamycinbehandlung.

Insgesamt fanden sich in der Auswertung der Microarrays 27 miRNAs mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ unter Rapamycinbehandlung differentiell exprimiert (siehe Anhang, Tabelle 7-3). Alle 27 miRNAs wiesen einen relativ starken Rapamycineffekt ($> 0,5$ -fach oder $< -0,5$ -fach) auf. 22 dieser 27 miRNAs waren auch im zeitlichen Verlauf der normalen Differenzierung als stark differentiell reguliert nachweisbar ($> 0,5$ -fache Hochregulation oder $< -0,5$ -fache Herunterregulation).

14 miRNAs wiesen einen positiven und 13 einen negativen Rapamycineffekt auf. Dabei bezeichnet ein positiver Rapamycineffekt eine unter Rapamycinbehandlung höhere miRNA-Expression als ohne Behandlung, beim negativen Rapamycineffekt verhält es sich genau umgekehrt. Insgesamt werden miRNAs, die eine Expressionsbeeinflussung durch eine Rapamycinbehandlung aufwiesen, im Folgenden Rapamycin-sensitiv genannt.

Unter den miRNAs mit einem $> 0,5$ -fach positiven Rapamycineffekt waren 86% auch im Zeitverlauf der Differenzierung vom Präadipozyten zum ausgereiften Adipozyten differentiell herunterreguliert. Von den miRNAs mit einem $< -0,5$ -fach negativen Rapamycineffekt fanden sich 77% auch als differentiell hochreguliert während der Differenzierung. Umgekehrt betrachtet wiesen 37% der während der Differenzierung $>0,5$ -fach hochregulierten miRNAs einen negativen Rapamycineffekt auf. Von den unter $-0,5$ -fach herunterregulierten miRNAs zeigten 57% einen positiven Rapamycineffekt.

3.4.2 Konfirmation mittels quantitativer „low density array“ -Analyse

Zur Konfirmierung der Microarraydaten wurde erneut ein „low density array“ (LDA) mit RNA-Proben der beiden Behandlungsbedingungen („Tag 8 + 10nM Rapamycin“ und „Tag 8 ohne Behandlung“) von einem der Experimente, die auch für den Microarray verwendet wurden, durchgeführt.

Bei der Auswertung zeigten 71 miRNAs einen positiven Rapamycineffekt, 220 einen negativen und 3 gar keinen Effekt. Im Anhang enthält Tabelle 7-4 die Liste dieser unter Rapamycinbehandlung differentiell regulierten miRNAs.

Wir haben den LDA nur zur Konfirmation der Microarray-Daten verwendet, weshalb er nur für ein Experiment durchgeführt wurde und damit kein Signifikanzniveau bestimmt werden konnte. Er erbrachte jedoch ganz ähnliche Befunde wie der Microarray.

Abb. 3-11 zeigt ein Balkendiagramm mit der Häufigkeitsverteilung der relativen miRNA-Expressionsveränderungen unter den beiden Bedingungen. Von den 40 miRNAs mit einem $> 0,5$ -fach positiven Rapamycineffekt waren 34 während der normalen Differenzierung differentiell herunterreguliert. Von den 156 miRNAs mit einem $< -0,5$ -fach negativen Rapamycineffekt waren 147 differentiell hochreguliert. Umgekehrt wiesen von den 169 miRNAs mit einer Differenzierungsabhängigen Hochregulation über das 0,5-fache 159 einen negativen Rapamycineffekt auf. Von den 45 miRNAs mit einer Herunterregulation unter das $-0,5$ -fache wiesen 40 einen positiven Rapamycineffekt auf.

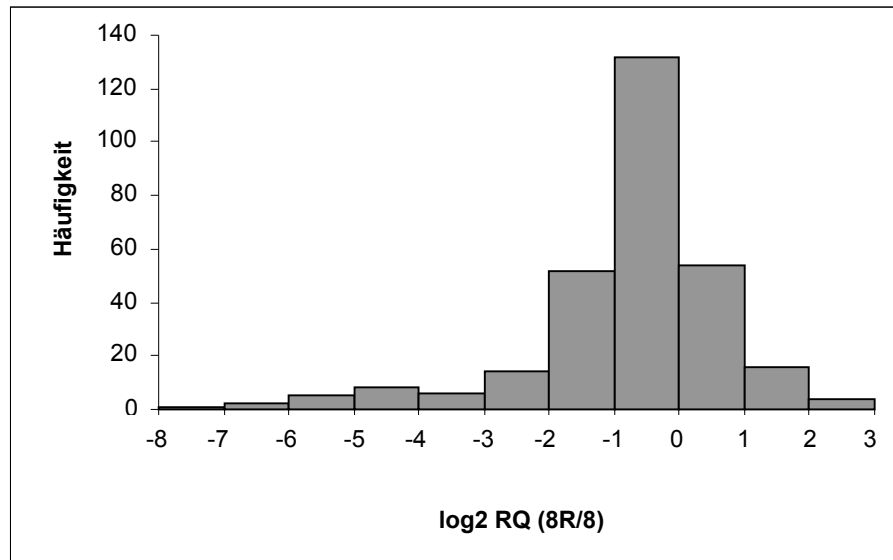


Abb. 3-11: Auswirkung von Rapamycin auf die miRNA-Expression während der Adipozytendifferenzierung – LDA. Häufigkeitsverteilung der differentiellen miRNA-Expression bei 3T3-L1 Zellen am „Tag 8“ mit und ohne Behandlung mit 10nM Rapamycin (vgl. Tabelle 7-4). Log₂ RQ (8R/8) gibt die Veränderung der miRNA-Expression von „Tag 8“ gegenüber „Tag 8 + 10nM Rapamycin“ an. Die miRNA-Expression ist bezogen auf sno-202.

3.4.3 Vergleich der Arrayverfahren

Schließlich sollte die Übereinstimmung der beiden Methoden bezüglich des Rapamycineffektes auf die miRNA-Expression bestimmt werden. Alle miRNAs, die in beiden Methoden bestimmt worden waren und im semiquantitativen Microarray ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ bzw. im quantitativen LDA eine fehlerfreie Detektion gezeigt hatten, wurden dazu herangezogen. 23 miRNAs erfüllten diese Kriterien. Das Streudiagramm in Abb. 3-12 zeigt die Übereinstimmung der log₂ FC- bzw. RQ-Werte der beiden Methoden. Bis auf einen Ausreißer (let-7e, grau markiert) stimmten sowohl die Richtung als auch die Stärke des Rapamycineffekts in beiden Methoden gut überein. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,94 bei einer Signifikanz von $1,62 \times 10^{11}$, welche durch einen Korrelationstest bestimmt wurde.

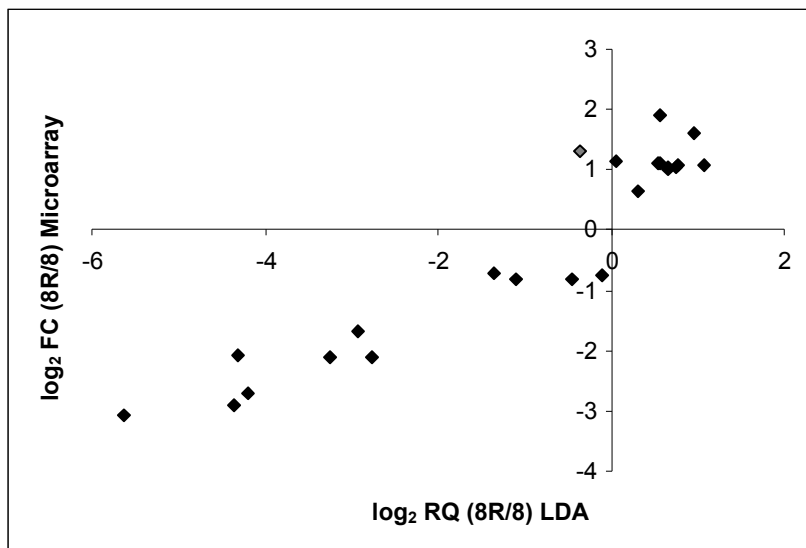


Abb. 3-12: Auswirkung von Rapamycin auf die miRNA-Expression während der Adipozytendifferenzierung – Microarray und LDA. Streudiagramm der differentiellen miRNA-Expressionen bei 3T3-L1 Zellen am „Tag 8“ mit und ohne Behandlung mit 10nM Rapamycin in Microarray- und LDA-Analyse. \log_2 FC (8R/8) bzw. \log_2 RQ (8R/8) geben die differentielle miRNA-Expression von „Tag 8“ gegenüber „Tag 8 + 10nM Rapamycin“ bei 3T3-L1-Zellen an. Grau dargestellt ist der Ausreißer let-7e.

3.4.4 Expressionsgruppen

Weiters wurde das Expressionsverhalten der einzelnen miRNAs während der Differenzierung mit und ohne Rapamycinbehandlung verglichen. Anhand ihrer Expressionsmuster konnten die miRNAs in insgesamt 3 verschiedene Gruppen eingeteilt werden.

Gruppe 1 beinhaltet miRNAs, die während der Adipozytendifferenzierung anstiegen und bei denen dieser Anstieg durch Rapamycin inhibiert wurde.

Gruppe 2 bestand aus miRNAs mit genau gegensätzlichem Verhalten. Sie waren im Verlauf der Differenzierung herunterreguliert und zeigten unter Rapamycinbehandlung eine Hemmung der Herabregulation.

Unter Gruppe 3 wurden schließlich miRNAs zusammengefasst, die während der Differenzierung nur geringfügig anstiegen, bei Rapamycinexposition jedoch verstärkt exprimiert wurden.

Insgesamt wurden von den 22 bestätigten miRNAs (ohne let-7e) 11 miRNAs Gruppe 1 zugeteilt, 9 miRNAs Gruppe 2 und 2 miRNAs Gruppe 3 (siehe Abb. 3-13).

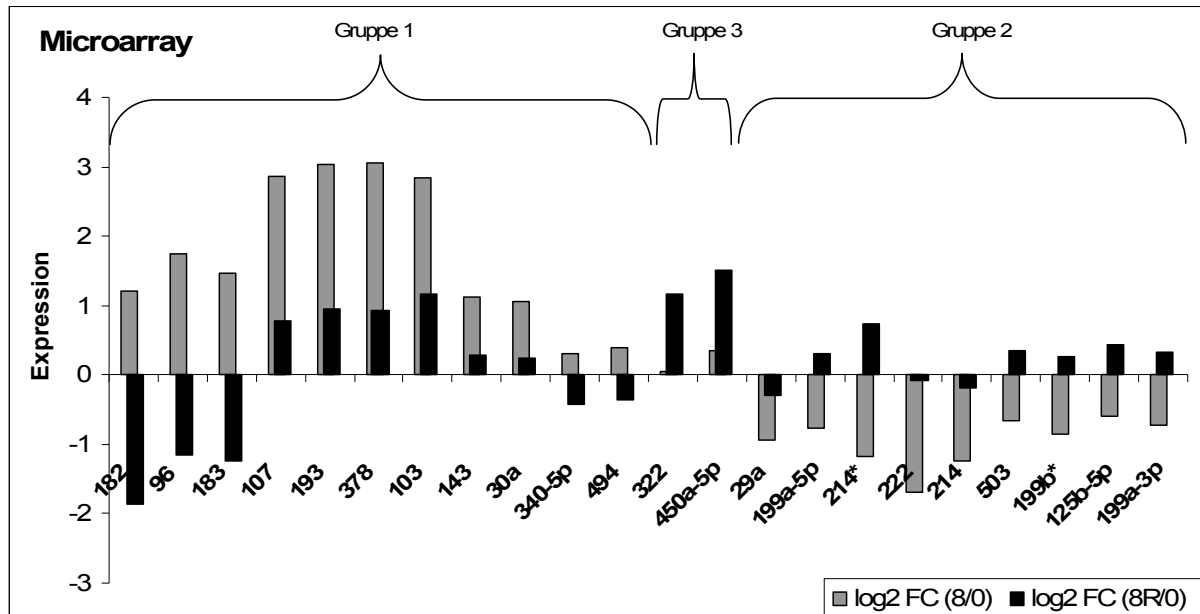


Abb. 3-13: Auswirkung von Rapamycin auf die miRNA-Expression während der Adipozytendifferenzierung - Microarray. MiRNA-Expressionsprofil von 3T3-L1 Zellen am „Tag 8“ mit und ohne Behandlung mit 10nM Rapamycin. Log₂ FC (8/0) bzw. (8R/0) gibt die Veränderung der miRNA-Expression von „Tag 0“ zu „Tag 8“ (grau) bzw. „Tag 0“ zu „Tag 8 + 10nM Rapamycin“ (schwarz) an. Die Zugehörigkeit der miRNAs zu den 3 im Text erläuterten Expressionsgruppen wurde durch geschweifte Klammern gekennzeichnet.

Die mit Hilfe des Microarrays vorgenommene Gruppeneinteilung der Rapamycin-sensitiven miRNAs ließ sich in der LDA-Analyse bestätigen:

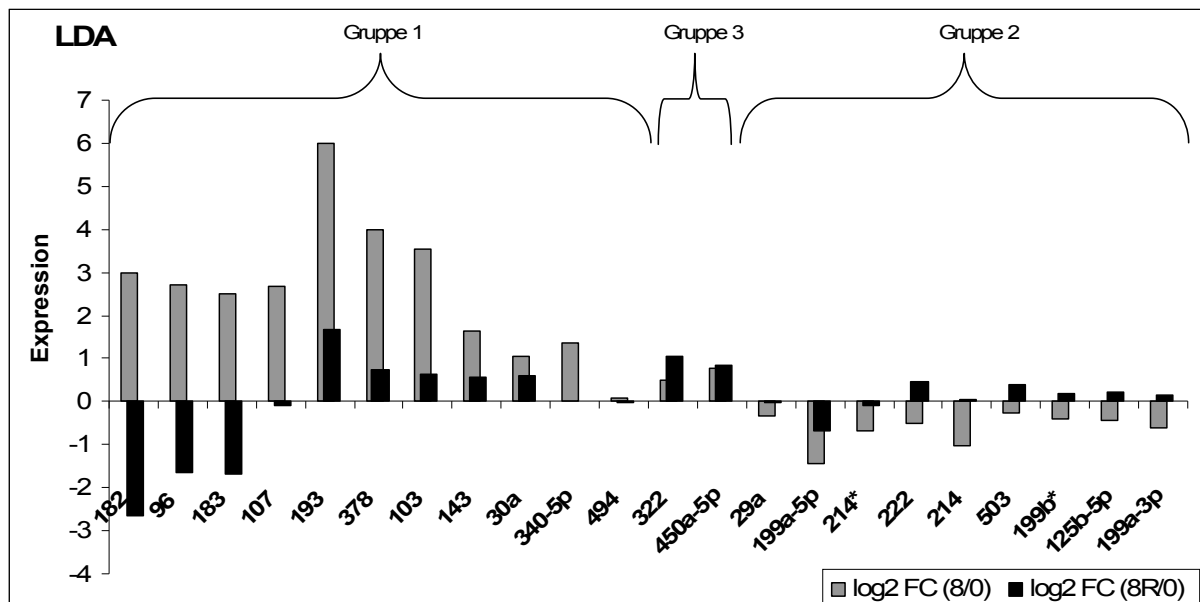


Abb. 3-14: Auswirkung von Rapamycin auf die miRNA-Expression während der Adipozytendifferenzierung - LDA. MiRNA-Expressionsprofil von 3T3-L1 Zellen am „Tag 8“ mit und ohne Behandlung mit 10nM Rapamycin. Log₂ RQ (8/0) bzw. (8R/0) gibt die Veränderung der miRNA-Expression von „Tag 0“ zu „Tag 8“ (grau) bzw. „Tag 0“ zu „Tag 8 + 10nM Rapamycin“ (schwarz) an. Die Zugehörigkeit der miRNAs zu den 3 im Text erläuterten Expressionsgruppen wurde durch geschweifte Klammern gekennzeichnet.

Zur weiteren quantitativen Konfirmation wurde die Expression einzelner miRNAs der 3 Gruppen mittels RT-PCR analysiert. Für alle analysierten miRNAs (miR-96, miR-378, miR-193, miR-107, miR-143, miR-222, miR-322, miR-450a-5p) ergab sich eine gute Übereinstimmung mit den Microarray- und LDA-Daten. Dies soll anhand der Expression der miR-222 repräsentativ veranschaulicht werden:

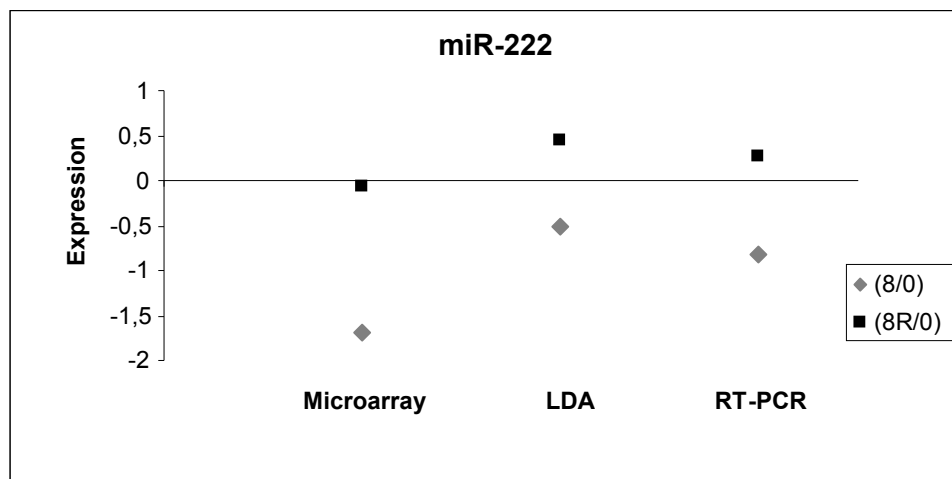


Abb. 3-15: MiR-222-Expression in Microarray, LDA und RT-PCR. Analyse der relativen Expression der miR-222 während der Differenzierung (Tag 8/Tag 0, grau) und unter Rapamycinbehandlung (Tag 8 10nM Rapamycin/Tag 0, schwarz) mittels Microarray, LDA und RT-PCR. Bei Microarray und RT-PCR sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten dargestellt, beim LDA nur das einzelne Experiment. Die Expression ist in \log_2 FC bzw. \log_2 RQ angegeben.

3.4.5 Zeitliche Abhängigkeit der miRNA-Expression

Zusätzlich wurde als weiterer Aspekt eine Analyse der zeitlichen Abhängigkeit des Expressionsverhaltens einiger miRNAs durchgeführt (siehe Abb. 3-16).

Dabei zeigte miR-96 während der frühen Differenzierung eine Reduktion der Expression, während es danach zu einem starken Anstieg bis zum Differenzierungsendpunkt kam. Unter Rapamycinbehandlung zeigte sie bis „Tag 4“ eine exakt gleiche Expression wie ohne Behandlung. Erst im weiteren Verlauf kam es zu einer starken Inhibierung des Expressionsanstiegs durch Rapamycin auf einen niedrigeren Wert als bei undifferenzierten Zellen.

Eine besondere Beobachtung stellte auch das Expressionsverhalten der miR-378 und miR-193 dar. Diese beiden miRNAs zeigten einen langsamen Anstieg während der frühen Differenzierung und einen stärkeren Anstieg während der späten Differenzierungsphase.

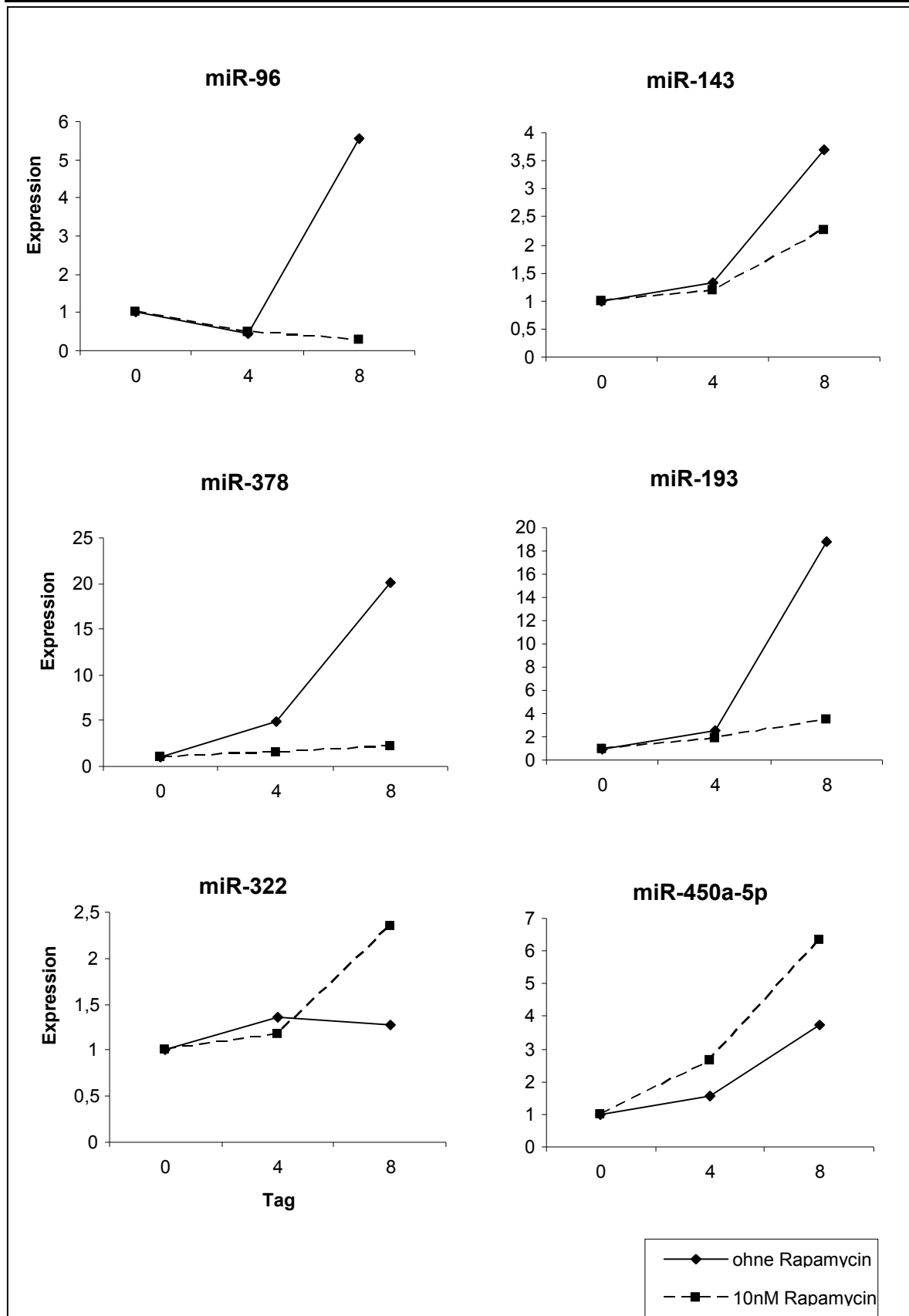


Abb. 3-16: Expression von miR-96, miR-143, miR-378, miR-193, miR-322 und miR-450a-5p an „Tag 0“, „Tag 4“ und „Tag 8“ unter Rapamycinbehandlung. 3T3-L1-Zellen wurden ab der Induktion mit 10nM Rapamycin behandelt oder blieben unbehandelt. Am Tag der Induktion, 4 und 8 Tage später wurden sie geerntet und eine RT-PCR für miR-96, miR-143, miR-378, miR-193, miR-322 und miR-450a-5p durchgeführt. Die Expression wurde auf sno-234 bezogen und es sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten dargestellt.

Unter Rapamycinbehandlung kam es bei beiden nur zu einem geringfügigen, konstanten Anstieg der Expression. Auch bei der miR-143 fand sich ein äußerst geringer Expressionsanstieg bei der frühen Differenzierung und ein stärkerer Anstieg in der späten Phase. Insgesamt jedoch zeigte miR-143 eine viel geringere differentielle Expression im Verlauf der Differenzierung und in Bezug auf den Rapamycineffekt im Vergleich zu den vorgenannten miRNAs.

Bezüglich der unabhängig vom Differenzierungsvorgang durch Rapamycin beeinflussten miRNAs, miR-322 und miR-450a-5p, ergab sich Folgendes: die miR-322 zeigte während der gesamten Differenzierung eine fast konstante Expression. Erst unter längerfristiger Rapamycinbehandlung (nach „Tag 4“) kam es zu einem Anstieg ihrer Expression. Bei der miR-450a-5p war während der frühen Differenzierung ein geringer Anstieg, in der späteren Phase - entgegen des Microarray-Ergebnisses - ein stärkerer Expressionsanstieg zu verzeichnen. Insgesamt zeigte sie dennoch unter Rapamycinbehandlung eine höhere Expression als bei ungestörter Differenzierung.

3.5 Cluster- und Genfamilienzugehörigkeit

Zum Zweck der Gruppierung der identifizierten miRNAs in potentiell zusammengehörige funktionelle Kategorien haben wir unsere Differenzierungs- und Rapamycin-sensitiven miRNAs mit Hilfe der miRNA-Datenbank „MirBase“ auf ihre Clusterzugehörigkeit überprüft. Mehr als 50% dieser miRNAs konnten Clustern zugeordnet werden: 23 der 43 während der Differenzierung differentiell regulierten miRNAs und 13 der 23 Rapamycin-sensitiven miRNAs gehörten einem Cluster an.

Häufig war eine Koregulation von Clustermitgliedern in ähnlichen Mustern zu beobachten. Fast immer stimmte dabei die Richtung der differentiellen Expression bei den einzelnen Clustermitgliedern überein. Nur bei den Rapamycin-sensitiven miRNAs ergab sich innerhalb eines Clusters eine Expressionsdiskrepanz (miR-322/miR-503/miR-450a-5p).

Exemplarisch für das ähnliche Expressionsverhalten der miRNAs eines Clusters sei das miR-96/182/183-Cluster aufgeführt (Abb. 3-17).

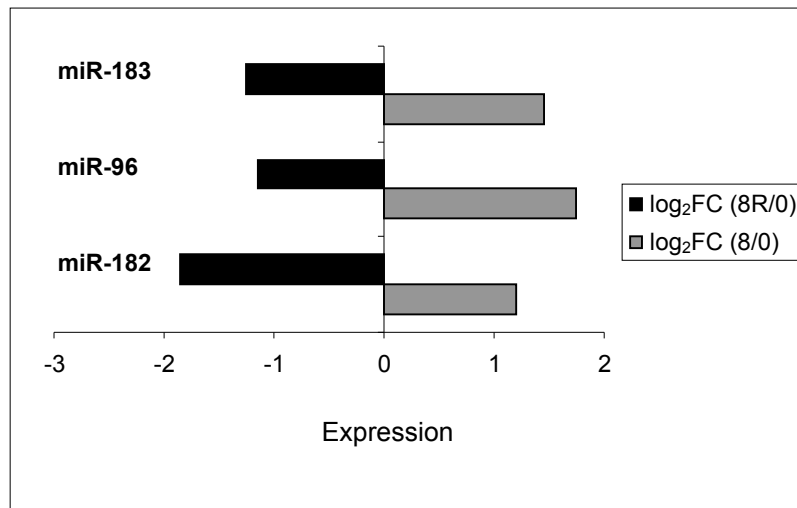


Abb. 3-17: Expression des miR-183/96/182-Clusters während der Differenzierung und unter Rapamycinbehandlung. Microarray-Analyse von 3T3-L1 Zellen am „Tag 8“ mit und ohne Behandlung mit 10nM Rapamycin. Log₂ FC (8/0) gibt die Veränderung der miRNA-Expression von „Tag 0“ zu „Tag 8“ (grau) und log₂ FC (8R/0) von „Tag 0“ zu „Tag 8 + 10nM Rapamycin“ (schwarz) an.

Genauso haben wir unsere Differenzierungs- und Rapamycin-sensitiven miRNAs auf ihre Genfamilienzugehörigkeit überprüft. 29 der 43 während der Differenzierung differentiell regulierten miRNAs und 12 der 23 Rapamycin-sensitiven miRNAs gehörten einer Genfamilie an. Auch hier zeigte sich sehr häufig ein Muster der Koexpression von miRNAs gleicher Genfamilien. Insbesondere stimmte die Richtung der differentiellen Expression stets überein.

3.6 Bioinformatische Vorhersage von miRNA-Zielgenen

Um die bisher ungeklärte Rolle der miRNAs bzw. der miRNA Cluster in Bezug auf die Regulation des mTOR-Signalwegs zu eruieren, sollten die miRNAs ermittelt werden, die Gene des mTOR-Signalwegs adressieren.

Da bisher nur wenige miRNA-mRNA Interaktionen experimentell belegt sind, mussten wir auf bioinformatische Zielgenvorhersagen zurückgreifen. Für die folgende Analyse verwendeten wir die 53 Gene aus dem mTOR-Signalweg der von der Signalweg-Datenbank „Kegg“ erstellten Gen-Tabelle. Die miRNA-Zielgen Vorhersage erfolgte mit 4 unterschiedlichen Algorithmen und es wurden nur solche Vorhersagen herangezogen, bei denen sich mindestens 2 Datenbanken einig waren.

Auf diese Weise konnten wir insgesamt 500 mRNA-miRNA-Interaktionen vorhersagen. Zur weiteren Eingrenzung wurden die vorhergesagten Ziel-mRNAs der zuvor von uns experimentell als Rapamycin-sensitiv ermittelten miRNAs herausgegriffen. Von den 500

potentiellen mRNA-miRNA-Interaktionen betrafen 53 Interaktionen gleichzeitig auch eine Rapamycin-sensitive miRNA (siehe Tabelle 3-2).

Bei genauerer Analyse der vorhergesagten Interaktionen stellte sich heraus, dass insgesamt häufiger upstream (36) als downstream (17) Targets von mTOR adressiert wurden (mTOR-Signalweg siehe Abb. 1-2). Die meisten miRNAs hatten mehrere upstream (hier v.a. im Insulinsignalweg) und 1 bis 2 vorhergesagte downstream Targets.

Tabelle 3-2: Zielgenvorhersage für Rapamycin-sensitive miRNA-Genfamilien

<i>miRNA-Genfamilie</i>	<i>Gen</i>	<i>Freq1</i>	<i>Freq2</i>
let-7/98	BRAF	31	5
let-7/98	IGF1	26	5
let-7/98	PDPK1	12	5
let-7/98	TSC1	23	5
let-7/98	ULK2	22	5
miR-103/107	AKT3	36	5
miR-103/107	CAB39	19	5
miR-103/107	EIF4B	10	5
miR-103/107	PIK3CB	20	5
miR-103/107	PIK3R1	31	5
miR-125/351	BRAF	31	4
miR-125/351	EIF4EBP1	2	4
miR-125/351	RPS6KA1	5	4
miR-125/351	VEGFA	31	4
miR-182	BRAF	31	4
miR-182	MAPK1	23	4
miR-182	PIK3R1	31	4
miR-182	PIK3R3	28	4
miR-183	TSC1	23	1
miR-199/199-3p	CAB39	19	4
miR-199/199-3p	DDIT4=REDD1	10	4
miR-199/199-3p	PIK3CB	20	4
miR-199/199-3p	RPS6KA6	11	4
miR-214/761	AKT2	5	5
miR-214/761	AKT3	36	5
miR-214/761	PGF	2	5
miR-214/761	PIK3CB	20	5
miR-214/761	VEGFA	31	5
miR-221/222	BRAF	31	4
miR-221/222	DDIT4=REDD1	10	4
miR-221/222	IGF1	26	4
miR-221/222	PIK3R1	31	4
miR-29abc	AKT3	36	7
miR-29abc	EIF4E2	25	7
miR-29abc	IGF1	26	7
miR-29abc	PIK3CB	20	7
miR-29abc	PIK3R1	31	7
miR-29abc	PIK3R3	28	7
miR-29abc	VEGFA	31	7
miR-30a/30a-5p/30b/30b-5p/30cde/384-5p	DDIT4=REDD1	10	5
miR-30a/30a-5p/30b/30b-5p/30cde/384-5p	PIK3CD	5	5
miR-30a/30a-5p/30b/30b-5p/30cde/384-5p	PIK3R2	2	5

miR-30a/30a-5p/30b/30b-5p/30cde/384-5p	PRKAA2	6	5
miR-30a/30a-5p/30b/30b-5p/30cde/384-5p	RPS6KB1	17	5
miR-378/422a	CAB39	19	3
miR-378/422a	MAPK1	23	3
miR-378/422a	TSC1	23	3
miR-494	AKT3	36	1
miR-503	AKT3	36	4
miR-503	EIF4E	27	4
miR-503	IGF1	26	4
miR-503	VEGFA	31	4
miR-96/1271	RPS6KA6	11	1

Konsensus der Zielgenvorhersagen für miRNA-Genfamilien bei denen mindestens 1 Mitglied als Rapamycin-sensitiv konfirmiert war. Freq1 bezeichnet die Anzahl der miRNAs, die laut Konsensusvorhersage diese mRNA binden. Freq2 gibt die Anzahl der Gene an, die von dieser miRNA vorhergesagterweise reguliert werden. MiRNAs mit Rapamycinvermittelter Inhibierung der Differenzierungsabhängigen Hochregulation sind grau hinterlegt (Gruppe 1), miRNAs mit Rapamycinvermittelter Inhibierung der Differenzierungsabhängigen Herunterregulation sind nicht hinterlegt (Gruppe 2).

4 Diskussion

Über die Expressionsveränderung der Gene und Transkripte während der Adipogenese ist bereits vieles bekannt. Hinsichtlich ihrer Regulierbarkeit und Interaktionen bestehen jedoch noch Wissenslücken. Insbesondere ist die Rolle von regulatorischen miRNAs bei der Adipogenese nur unvollständig beschrieben.

In dieser Arbeit wurde zunächst die differentielle miRNA Expression während der Adipogenese durch miRNA-Arrayanalysen umfassend charakterisiert. Darauf aufbauend wurde spezifisch das Netzwerk jener miRNAs eingegrenzt, die mit mRNA Targets des mTOR Pathways, einem „nutrient-sensing“ Signalweg, interagieren können. Dieser Stoffwechselweg ist bei Adipositas als überreguliert bekannt. Rapamycin, ein mTOR-Inhibitor, wurde als Modellsubstanz verwendet, um die durch Rapamycin modulierbaren miRNA Targets zu identifizieren.

4.1 Validierung der experimentellen Verfahren

4.1.1 Adipozytenmodellsystem

Zur Analyse der miRNA-Expression während der Differenzierung von Adipozyten wurde die 3T3-L1-Zelllinie verwendet, ein häufig genutztes Modellsystem der Adipozytendifferenzierung (Ntambi et al. 2000). Innerhalb von 8 Tagen war eine fast vollständige Ausdifferenzierung der Adipozyten erfolgt: die sternförmigen, Fibroblasten-ähnlichen Präadipozyten rundeten sich zunehmend ab (vgl. Abb. 3-1). Gleichzeitig bildeten sich kleine Fettvakuolen, die im Verlauf miteinander verschmolzen bis am „Tag 8“ über 90 % der Zellen mit großen Vakuolen angefüllt waren. Die Veränderungen in der Morphologie der Zellen stimmten unter den von uns gewählten Bedingungen mit früheren Literaturdaten für die Adipozytendifferenzierung überein (Avram et al. 2007).

Um die optimalen Bedingungen für die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen zu ermitteln, wurden verschiedene Zelldichten miteinander verglichen (Abb. 3-2). Die Anzahl der nach 8 Tagen ausdifferenzierten Zellen war proportional zur initialen Zelldichte. Als optimale Zelldichte wurden schließlich 300.000 Zellen pro Well ermittelt und in der Folge als ideale Versuchsbedingung verwendet.

Zur weiteren Validierung des Modellsystems wurden die beiden Marker der Adipozytendifferenzierung, C/EBP- α und PPAR- γ , sowie der Präadipozytenmarker „preadipocyte factor-1“ (Pref-1) mittels RT-PCR analysiert. Auf diese Weise konnte gezeigt

werden, dass die Differenzierung der 3T3-L1 Zellen nicht nur morphologisch, sondern auch auf Genexpressionsebene optimal von statten gegangen war. Wie von Avram et al. (2007) beschrieben war die Expression von C/EBP- α und PPAR- γ bei den undifferenzierten „Tag 0“-Zellen sehr gering und stieg ab „Tag 2“ nach Induktion der Differenzierung kontinuierlich an. Am Ende der Differenzierung hatte sie das fast 80-fache respektive das über 30-fache des Ausgangswertes erreicht. Die Expression des Präadipozytenfaktors Pref-1 hingegen fiel im Verlauf der Differenzierung auf unter 20% des Wertes von „Tag 0“. Die verbliebene Pref-1-Expression könnte unter unseren Versuchsbedingungen von den 5 – 10% undifferenzierten Präadipozyten stammen. 90 - 95% der Präadipozyten waren in unseren Experimenten nach Induktion der Differenzierung innerhalb von 8 Tagen völlig ausdifferenziert (vgl. Abb. 3-1); dies stimmt mit Befunden aus der Literatur überein (Cho et al. 2004; Kim et al. 2004). Insgesamt bestätigten sowohl die morphologischen Befunde als auch die Genexpressions-Daten, dass sich 3T3-L1-Zellen als ein standardisiertes, reproduzierbares Modellsystem eignen, um die Differenzierung von Adipozyten in verschiedenen Stadien zu untersuchen.

Um die Modulierbarkeit der miRNA-Expression unter „nutrient-sensing“ Beeinflussung zu analysieren, wurde der mTOR-Inhibitor Rapamycin eingesetzt. Zuerst wurde die Dosierung von Rapamycin optimiert. Zur Inhibierung der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen früher verwendete Rapamycinkonzentrationen waren 10nM und 100nM (Yeh et al. 1995; Bell et al. 2000; Kim et al. 2004). Bei einer Behandlung mit nur 1nM Rapamycin differenzierte ein Drittel der Zellen trotzdem aus (Cho et al. 2004). Nachdem dieser Anteil für unsere Fragestellung als zu hoch erachtet wurde, untersuchten wir das Inhibierungspotential von 10nM, 50nM und 100nM Rapamycin.

Auf der Basis von Zellmorphologie und Genexpression der Adipozytenmarker fanden wir dass, schon mit 10nM Rapamycin ein maximaler inhibitorischer Effekt auf die Differenzierung zu erzielen ist. Unter dieser Konzentration differenzierten nur mehr 10 – 15% der Zellen aus, was auch anderen Angaben aus der Literatur entspricht (Bell et al. 2000; Cho et al. 2004; Kim et al. 2004). Die verringerte Expression von C/EBP- α und PPAR- γ deckte sich ebenso mit veröffentlichten Western Blot- (Yeh et al. 1995; Kim et al. 2004) und Northern Blot-Ergebnissen (Cho et al. 2004; Kim et al. 2004). C/EBP- α und PPAR- γ stiegen nur bis Tag 2 leicht an und zeigten dann bis Tag 8 keinen weiteren Anstieg. Es kann also von einer im Zeitverlauf frühen Inhibierung der Differenzierung ausgegangen werden. Der Differenzierungsabhängige Abfall von Pref-1 wurde unter Rapamycinbehandlung fast

vollständig verhindert. Das Expressionsmuster der über 8 Tage mit 10nM Rapamycin behandelten Zellen war also dem undifferenzierter Präadipozyten ähnlich.

4.1.2 Validierung und Konfirmation von miRNA-Expressionsprofilen

Bei allen miRNA-Expressionsexperimenten stellt sich zunächst die Frage, welche Methode zur Bestimmung von umfassenden miRNA-Profilen verwendet werden soll. Wir haben zuerst einen semiquantitativen Microarray, das bislang übliche Standardverfahren für die Analyse einer hohen Anzahl von miRNAs, unter Verwendung von zwei experimentellen Proben durchgeführt. Für die anschließende Konfirmation von differentiell regulierten miRNAs gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten: entweder mehrere biologische und technische Replikate oder eine unabhängige, quantitative Methode anzuschließen. Wegen ihrer quantitativen Aussage haben wir die zweite Variante gewählt. Die RT-PCR gilt als Goldstandard für eine quantitative Konfirmation von mRNA Transkripten oder miRNAs. Aufgrund des großen Anteils an ausregulierten miRNAs konnte sie jedoch nicht für alle miRNAs einzeln durchgeführt werden. Deshalb führten wir einen „low density array“ (LDA) bei einer experimentellen Probe durch. Dieser basiert wie die RT-PCR auf einer quantitativen Bestimmung der miRNA-Expression, jedoch können mehrere Hundert miRNAs gleichzeitig bestimmt werden. Soweit uns bekannt, wurden LDA und Microarray nur in wenigen Arbeiten systematisch miteinander verglichen und das beschriebene Vorgehen zur Konfirmation von miRNA-Expressionen durch eine Kombination aus Microarray und LDA wurde noch nicht häufig angewandt.

Bei der Auswertung zeigte sich, dass die „Fold Change“-Expressionswerte im LDA generell etwas höher waren als im Microarray. Dies stimmt mit einer Arbeit von Mees et al. überein, die ebenfalls eine höhere differentielle miRNA-Expression beim LDA im Vergleich zum Microarray zeigte (Mees et al. 2009). Darüber hinaus wurde in unseren Experimenten durch den LDA eine höhere Zahl differentiell regulierter miRNAs erfasst als durch den Microarray. Dies entspricht der Erwartung, da der LDA als quantitativer Assay ein sensitiveres Ergebnis liefern sollte.

Für die Validierung der Ergebnisse wurden folgende Kriterien erarbeitet: eine Übereinstimmung zwischen Microarray und LDA bzgl. einer relevant differentiellen miRNA-Expression während der Differenzierung beinhaltete, dass als konfirmiert betrachtete miRNAs in beiden Methoden über das 0,5-fache hinaufreguliert oder unter das -0,5-fache herunterreguliert sein mussten. Für weitere Experimente priorisiert wurden jene miRNAs, die in einer der beiden unterschiedlichen Methoden eine Regulation über das +/- 1,0-fache

zeigten. Eine Übereinstimmung der beiden Methoden bezüglich der miRNA-Expression unter mTOR-Hemmung mittels Rapamycin wurde dadurch definiert, dass die betreffende miRNA in beiden Methoden einen Rapamycineffekt in dieselbe Richtung aufweisen musste.

Bei all unseren miRNA-Arrayanalysen zeigte sich eine sehr gute und signifikante Korrelation zwischen Microarray und LDA. Diese Beobachtung stand im Gegensatz zu einer früheren Arbeit, in der Diskrepanzen zwischen Microarray und LDA beobachtet wurden (Mees et al. 2009). Die Expression einiger stark differentiell regulierter miRNAs wurde deshalb zusätzlich mittels RT-PCR quantitativ validiert. Tatsächlich bestätigte die RT-PCR einzelner miRNAs die in den Profil-Methoden jeweils bestimmte Expression bei allen untersuchten miRNAs.

Die in unseren Experimenten gute Korrelation zwischen Microarray und LDA legt nahe, dass die Kombination der beiden unabhängigen Methoden ein sehr effizientes Verfahren ist, um eine größere Anzahl an miRNA-Alterationen in relativ kurzer Zeit zumindest analytisch zu bestätigen.

4.1.3 Vorhersage von miRNA-Zielgen-Interaktionen

Nachdem bislang nur sehr wenige experimentell validierte mRNA-miRNA-Interaktionspaare bekannt sind, musste für die Identifizierung von Zielgenen der durch Rapamycin beeinflussten miRNAs auf bioinformatische Vorhersagen zurückgegriffen werden. Um sich die jeweiligen Unterschiede in den verwendeten Algorithmen zu Nutze zu machen und die Zuverlässigkeit der Vorhersage zu erhöhen, wurden mehrere Datenbanken verwendet (PITA, miRanda, targetScanS, pictar und targetspy). Aufgrund der sehr hohen Zahl an vorhergesagten miRNA-mRNA Paaren wurden nur solche Interaktionen für die weitere Analyse priorisiert, die von mindestens 2 Datenbanken vorhergesagt wurden.

4.2 Differentielle miRNA-Expression während der Adipozyten-differenzierung

Die Häufigkeitsverteilung der differentiellen miRNA-Expression während der Adipogenese zeigte, dass nur ein gewisser Anteil der bekannten miRNAs während der Differenzierung signifikant differentiell reguliert wird. Im Microarray waren 28% der miRNAs über das 1,0-fache hoch- und 15% der miRNAs unter das -1,0-fache herunterreguliert. In früheren Daten von Esau und Sun zur Adipozytendifferenzierung wird ebenfalls jeweils nur ein relativ

geringer Teil (6-9%) der miRNAs als differentiell reguliert beschrieben (Esau et al. 2004; Sun et al. 2009).

Darüber hinaus fiel auf, dass bei beiden Methoden ein höherer Anteil an miRNAs hoch- als herunterreguliert war. Beim Microarray fanden sich 54,7% der regulierten miRNAs hochreguliert, beim LDA 74,8%. Diese Beobachtung stimmt ebenso mit früheren Befunden zur Adipozytendifferenzierung von Sun und Esau überein, die 91,3% respektive 81,8% der regulierten miRNAs als hochreguliert berichteten (Esau et al. 2004; Sun et al. 2009).

4.2.1 Neu identifizierte differentiell ausregulierte miRNAs

In unserem miRNA-Expressionsdatensatz wurde eine Reihe von bislang noch nicht als in der Adipogenese involviert beschriebenen miRNAs („neue miRNAs“) als ausreguliert identifiziert. Dies könnte auf Unterschiede in der Sensitivität der verwendeten Assays oder der jeweiligen Konfirmationsverfahren zurückgeführt werden. Darüber hinaus zeigte sich eine gute Übereinstimmung zu publizierten Vorbefunden, welche gesondert gelistet werden. Unsere Ergebnisse erweitern dadurch das Spektrum der bisher bekannten und bei der Adipogenese differentiell regulierten miRNAs.

Die „neuen“, in Bezug auf die Adipozytendifferenzierung noch nicht bekannten und hochregulierten miRNAs umfassen: miR-365, miR-96, miR-183, miR-182, miR-148b, miR-15a, miR-106b. Über die differentielle Herunterregulation der miR-678, miR-199b*, miR-34a, miR-214*, miR-34c bei der Adipogenese liegen bisher, soweit uns bekannt, ebenfalls keine publizierten Daten vor. Einige dieser „neuen“ miRNAs gehören zu den in unseren Analysen am stärksten ausregulierten miRNAs.

Über eine mögliche funktionelle Bedeutung dieser in der Differenzierung von Adipozyten „neuen“ miRNAs gibt die Literatur z.T. erste Hinweise (siehe Tabelle 4-1). So spielt die miR-148b wenn auch nicht bei der adipogenetischen, sondern bei der osteogenetischen Differenzierung eine Rolle (Schoolmeesters et al. 2009). Für miR-96, miR-183 und miR-182 wird von einer Beteiligung an der Zellzyklusregulation und der Innenohrentwicklung wie auch vom Insulinsignalweg ausgegangen (Xu et al. 2008; Guttilla et al. 2009; Li et al. 2010). MiR-106b steht in Verbindung mit dem „transforming growth factor beta“ (TGF β) Tumorsuppressor Signalweg und beeinflusst die Zellzyklusregulation durch ihr Zielgen „cyclin-dependent kinase inhibitor 1A“ (p21/CDKN1A) (Ivanovska et al. 2008; Petrocca et al. 2008). Für miR-15a wurde eine tumorsuppressive Funktion durch Hemmung von „B-cell CLL/lymphoma 2“ (BCL2) bei der chronisch lymphatischen Leukämie gezeigt (Lee et al. 2006b). Zudem gibt es einen Hinweis darauf, dass sie Zellgröße und Proliferation durch

„fine-tuning“ von „Delta like 1 homolog“ (Dlk1) bei Präadipozyten reguliert (Andersen et al. 2010). MiR-34a induziert möglicherweise durch Targeting von „cyclin D1“ (CCND1) und „cyclin-dependent kinase 6“ (CDK6) Apoptose und Zellzyklusarrest (Sun et al. 2008; Hermeking 2010). Darüber hinaus besteht eine Assoziation der miR-34a zu nichtalkoholischer Steatohepatitis (Pogribny et al. 2010) und es wird über eine Hochregulation der miR-34a in der Leber von diabetischen Mäusen, sowie bei mit proinflammatorischen Zytokinen behandelten pankreatischen β -Zellen berichtet (Li et al. 2009b; Roggli et al. 2010).

Tabelle 4-1: In der Literatur berichtete Funktionen der neu ermittelten Differenzierungsabhängigen miRNAs

<i>miRNA</i>	<i>funktioneeller Zusammenhang</i>	<i>potentielles Zielgen</i>	<i>Referenz</i>
miR-365	Brustkrebs		(Yan et al. 2008)
miR-96, miR-183, miR-182- Cluster	Zellzyklusregulation Innenohrentwicklung Insulinsignalweg	FOXO1 Irs1, Rasa1, Grb2	(Guttilla et al. 2009; Myatt et al. 2010) (Li et al. 2010) (Xu et al. 2008)
miR-148b miR-15a	osteogenetische Differenzierung tumorsuppressive Funktion bei CLL	BCL2	(Schoolmeesters et al. 2009) (Lee et al. 2006b)
miR-106b	Zellgröße und Proliferation TGF β -Signalweg Zellzyklusregulation	Dlk1 = Pref-1 p21 = CDKN1A	(Andersen et al. 2010) (Ivanovska et al. 2008; Petrocca et al. 2008)
miR-34a	Apoptose und Zellzyklusarrest nichtalkoholische Steatohepatitis	CCND1, CDK6	(Sun et al. 2008; Hermeking 2010) (Pogribny et al. 2010)
miR-34c	Diabetes Apoptose und Zellzyklusarrest		(Li et al. 2009b) (He et al. 2007b; Hermeking 2010)

Für miR-678 und die Minor-Sequenzen miR-199b* und miR-214* konnten keine bislang in der Literatur belegten spezifischen Funktionen eruiert werden.

Zusammenfassend zeigt die Literaturrecherche, dass für miR-96, miR-183, miR-182 und miR-34a funktionelle Zusammenhänge mit dem Insulinstoffwechsel respektive mit Regelmechanismen des Diabetes mellitus bestehen könnten.

Darüber hinaus fällt auf, dass für einige der bisher nur in unserem Datensatz in der Adipogenese differentiell exprimierten miRNAs v.a. Funktionen im Bereich der Zellzyklusregulation postuliert werden, z.B. für miR-96/183/182, miR-106b, miR-34a bzw. 34c. In der Tat gibt es Befunde zur wichtigen Rolle der Zellzyklusregulation im Zusammenhang mit Adipositas und Adipogeneseregulation, beispielsweise von Suwa et al. (2010).

4.2.2 Konfirmierung von Vorbefunden

Ein Vergleich der in unseren Experimenten als Differenzierungsabhängig detektierten miRNAs mit bisher bekannten Literaturdaten zeigte neben den geschilderten neuen Befunden eine sehr gute Übereinstimmung mit den publizierten Vorbefunden. Die folgende Tabelle (4-2) führt die bei der Adipogenese differentiell regulierten miRNAs auf, die durch unsere Daten nochmals konfirmiert wurden. Für einige der hochregulierten miRNAs wurde bereits eine funktionelle Validierung durchgeführt (Referenz mit ¹).

Let-7e, miR-29b und miR-146a werden in der Tabelle nicht aufgeführt, weil sie unsere strikten Kriterien für eine Konfirmation ihrer differentiellen Expression nicht erfüllt hatten. Für let-7e und miR-29b ist in anderen publizierten Daten eine differentielle Expression während der Adipogenese beschrieben (He et al. 2007a; Sun et al. 2009).

Nur zwei der in der Regulation der Adipogenese als involviert berichteten miRNAs wurden bei uns als gegensätzlich reguliert detektiert: miR-27a und miR-27b wurden in der Literatur als herabreguliert beschrieben, waren in unseren Experimenten jedoch heraufreguliert (Lin et al. 2009b; Kim et al. 2010).

Tabelle 4-2: In der Literatur und in unseren Analysen übereinstimmend differentiell regulierte miRNAs während der Adipozytendifferenzierung

<i>miRNA hochreguliert</i>	<i>Zellen</i>	<i>Referenz</i>
let-7c	humane Adipozyten	(Esau et al. 2004) ¹
	hMSC	(Oskowitz et al. 2008)
	3T3-L1	(Gerin et al. 2010)
let-7d	hMSC	(Oskowitz et al. 2008)
	3T3-L1	(Sun et al. 2009)
miR-103	humane Adipozyten	(Esau et al. 2004)
	hMSC	(Oskowitz et al. 2008)
	3T3-L1	(Sun et al. 2009)
	3T3-L1	(Xie et al. 2009) ¹
miR-107	3T3-L1	(Gerin et al. 2010)
	humane Adipozyten	(Esau et al. 2004)
	hMSC	(Oskowitz et al. 2008)
	3T3-L1	(Xie et al. 2009)
miR-10b	3T3-L1	(Gerin et al. 2010)
	hMSC	(Oskowitz et al. 2008)
miR-143	humane Adipozyten	(Esau et al. 2004) ¹
	hMSC	(Oskowitz et al. 2008)
	3T3-L1	(Sun et al. 2009)
	3T3-L1	(Xie et al. 2009) ¹
miR-146b	3T3-L1	(Xie et al. 2009)
miR-152	hMSC	(Oskowitz et al. 2008)
miR-193	3T3-L1	(Sun et al. 2009)
miR-210	3T3-L1	(Sun et al. 2009)
	3T3-L1	(Gerin et al. 2010)
miR-22	hMSC	(Oskowitz et al. 2008)

miR-30a-5p	3T3-L1	(Xie et al. 2009)
	humane Adipozyten	(Ortega et al. 2010)
miR-30b	humane Adipozyten	(Esau et al. 2004)
	humane Adipozyten	(Ortega et al. 2010)
miR-30c	humane Adipozyten	(Esau et al. 2004)
	3T3-L1	(Xie et al. 2009)
	humane Adipozyten	(Ortega et al. 2010)
miR-30e	humane Adipozyten	(Ortega et al. 2010)
miR-378	3T3-L1	(Gerin et al. 2010)
	humane Adipozyten	(Ortega et al. 2010)
miRNA herunterreguliert		
miR-125a	3T3-L1	(Gerin et al. 2010)
miR-125b	3T3-L1	(Xie et al. 2009)
	3T3-L1	(Gerin et al. 2010)
miR-199a	3T3-L1	(Gerin et al. 2010)
miR-199b	3T3-L1	(Gerin et al. 2010)
miR-214	3T3-L1	(Gerin et al. 2010)
miR-221	3T3-L1	(Xie et al. 2009)
	3T3-L1	(Gerin et al. 2010)
	humane Adipozyten	(Ortega et al. 2010)
miR-222	3T3-L1	(Xie et al. 2009)
miR-29a	3T3-L1	(He et al. 2007a)
	3T3-L1	(Gerin et al. 2010)
miR-31	3T3-L1	(Gerin et al. 2010)
miR-503	humane Adipozyten	(Ortega et al. 2010)

MiRNAs mit >1-facher Hoch- bzw. < -1-facher Herunterregulation (dunkelgrau) und miRNAs mit > 0,5-facher Hoch- bzw. < -0,5-facher Herunterregulation (hellgrau) in der Microarrayanalyse sind hinterlegt. ¹ bedeutet funktionell validierte miRNA-Expression.

Mit unserer Studie direkt vergleichbare experimentelle und analytische Settings wurden nur von Sun et al. und Xie et al. angewendet. Sie untersuchten die miRNA-Expression während der 3T3-L1 Differenzierung mittels Microarray und ermittelten 23 respektive 28 miRNAs mit einer signifikant differentiellen Expression (Sun et al. 2009; Xie et al. 2009). Eine bei Sun et al. beschriebene signifikante Überexpression von bestimmten miRNAs konnte in 8 Fällen auch in unserem Datensatz bestätigt werden (let-7c, miR-103, -210, -193, -143, -30e, -22, -30a). Bei 2 miRNAs (miR-214, -182) fanden wir im Vergleich zu den publizierten Vordaten eine gegensätzliche Regulation. Übereinstimmend zu den Befunden von Xie et al. waren 6 von 8 der in dieser Arbeit als differentiell hochreguliert berichteten miRNAs (miR-107, -103, -30c, -30a, -146b, -143). Weiters alle dort erwähnten und in ihrer Expression supprimierten miRNAs (miR-125b, -99b, -222, -221).

Für die in unseren Microarraydaten am stärksten hochregulierte miRNA, miR-378, sind v.a. Funktionen in der Angiogenese und der Differenzierung, u.a. auch von Adipozyten dokumentiert (Kahai et al. 2009; Wang et al. 2009; Gerin et al. 2010). Experimentell

validierte Zielgene sind „suppressor of fused homolog“ (SUFU) und „tumor suppressor candidate 2“ (TUSC2=FUS1) (Lee et al. 2007).

Besonders gut hinsichtlich ihres adipogenen Potentials untersucht, wenn auch in unserem Setting nicht so ausgeprägt ausreguliert, ist miR-143. In Vordaten wird berichtet, dass eine Inhibierung der miR-143 mittels „antisense“ Oligonukleotiden (ASOs) zur Hemmung des Differenzierungsprozesses führt (Esau et al. 2004). Im Mesenterialfett von Mäusen mit einer durch „high-fat“ Diät induzierten Adipositas war die Expression der miR-143 hochreguliert (Takanabe et al. 2008) und eine ektope Expression der miR-143 beschleunigte die Adipogenese (Xie et al. 2009). Die mRNA des Gens „mitogen-activated protein kinase 7“ (MAPK7=ERK5) stellt ein experimentell validiertes Target der miR-143 dar (Esau et al. 2004; Akao et al. 2007).

4.2.3 Cluster- und Genfamilienzugehörigkeit der miRNAs

Um aus der großen Zahl während der Differenzierung ausregulierter miRNAs einige besonders relevante Kandidaten-miRNAs herauszufiltern, wurden die in Clustern organisierten miRNAs ermittelt. MiRNAs aus einem Cluster werden gemeinsam reguliert und sind vorwiegend koexprimiert. Diese miRNAs sind potentiell als Targets interessant, weil sie koordiniert verschiedene Zielgene angreifen und so vermutlich biologisch und funktionell wichtige regulatorische Einflüsse ausüben. Besonders interessant erschienen 4 miRNA-Cluster, bei denen alle jeweiligen Mitglieder eine starke differentielle Regulation in dieselbe Richtung zeigten (Tabelle 4-3).

Die Mitglieder des miRNA-Clusters miR-96/182/183 zeigten eine starke Expressionszunahme während der Adipozytendifferenzierung. Über deren Beteiligung bei der Adipogenese wurde bisher jedoch noch nicht berichtet. Für dieses miRNA-Cluster wurden bislang lediglich Zusammenhänge mit der Innenohrentwicklung, der Zellzyklusregulation über das Zielgen FOXO1 sowie mit dem Insulinsignalweg dokumentiert (Xu et al. 2008; Guttilla et al. 2009; Li et al. 2010). Bei der Betrachtung der möglichen biologischen Funktion des stark herabregulierten Clusters miR-221/222 fiel ein Zusammenhang mit Krebsentstehung, Zellzyklusprogression und Angiogenese auf, an denen der mTOR-Signalweg zentral beteiligt ist (Kim et al. 2009b; Liu et al. 2009a; Zhang et al. 2009a). MiR-222 scheint die Zellzyklusprogression über das Zielgen „cyclin-dependant kinase inhibitor 1B“ (CDKN1B) zu regulieren (Galardi, 2007).

Tabelle 4-3: geclusterte Differenzierungssensitive miRNAs

hochreguliertes Cluster	miR-182	miR-183	miR-96
hochreguliertes Cluster	miR-30c	miR-30e	
herunterreguliertes Cluster	miR-199a	miR-214	
herunterreguliertes Cluster	miR-221	miR-222	

MiRNAs mit >1-facher Hoch- bzw. < -1-facher Herunterregulation in der Microarrayanalyse sind dunkelgrau, miRNAs mit > 0,5-facher Hoch- bzw. < -0,5-facher Herunterregulation sind hellgrau hinterlegt.

Eine weitere Möglichkeit zur Priorisierung von potentiell wichtigen Kandidatentargets ist die Ermittlung der Genfamilienzugehörigkeit der miRNAs. Denn miRNAs aus einer Genfamilie haben, obwohl sie an unterschiedlichen Orten des Genoms lokalisiert sind, aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit häufig dieselben Zielgene. Genfamilien, bei denen ein Großteil der Mitglieder eine starke differentielle Regulation während der Differenzierung zeigte, waren folgende:

Tabelle 4-4: Genfamilien Differenzierungssensitiver miRNAs

Genfamilie hochreguliert	Mitglieder				
miR-103:	miR-103	miR-107			
miR-148:	miR-148a	miR-148b	miR-152		
miR-30:	miR-30a	miR-30b	miR-30c	miR-30d	miR-30e
Genfamilie herunterreguliert					
miR-125:	miR125a	miR-125b			
miR-199:	miR-199a	miR-199b			
miR-221:	miR-221	miR-222			
miR-34:	miR-34a	miR-34b	miR-34c		

MiRNAs mit >1-facher Hoch- bzw. < -1-facher Herunterregulation in der Microarrayanalyse sind dunkelgrau, miRNAs mit > 0,5-facher Hoch- bzw. < -0,5-facher Herunterregulation sind hellgrau hinterlegt.

Die Genfamilie miR-103 besteht aus zwei in unseren Analysen stark ausregulierten miRNAs, für die bereits eine differentielle Hochregulation in der Adipogenese bekannt ist (Xie et al. 2009). Darüber hinaus spielen sie im Rahmen der Hypoxievermittlung und beim Glucosestoffwechsel eine Rolle (Herrera et al. 2010; Yamakuchi et al. 2010). Ein verifiziertes Zielgen der miR-107 ist „nuclear factor I/A“ (NFI-A) (Garzon et al. 2007). Dem während der Adipogenese herabregulierten Cluster miR-199a/214 bzw. der Genfamilie miR-199 wird eine funktionelle Bedeutung bei der Krebsentstehung, Differenzierung und Apoptose zugeschrieben (Cheng et al. 2005; Ichimi et al. 2009; Lin et al. 2009a; Yang et al. 2009b). Ein Zielgen der miR-199a-3p scheint mTOR zu sein (Fornari et al. 2010).

Die hier besprochenen miRNAs zeigten alle auch eine signifikante Beeinflussung ihrer Expression durch Hemmung des mTOR Signalweges mittels Rapamycin.

4.3 *Rapamycin-sensitive miRNAs*

Bislang sind die den mTOR „nutrient-sensing“-Mechanismus regulierenden miRNAs - mit Ausnahme der miR-199a-3p - nicht bekannt. Deshalb war die Identifikation der in der Regulation des mTOR-Signalweges während der Adipogenese involvierten miRNAs eines unserer Ziele. Für die Priorisierung von Kandidaten-miRNAs nach einem funktionellem Kriterium wurde Rapamycin als mTOR-Inhibitor verwendet. Eine chronische mTOR-Inhibierung mittels Rapamycin bei Adipozyten wie in unseren Experimenten führt zur Reduktion der Fettzellgröße und Herunterregulation von Genen des Lipidstoffwechsels. Es kommt aber auch zur Hochregulation der Gluconeogenese und zur Insulinresistenz (Rovira et al. 2008; Houde et al. 2010).

Die auf die Rapamycinbehandlung mit einer Expressionsalteration ansprechenden miRNAs wurden als Rapamycin-sensitiv klassifiziert. Dies unter der Hypothese, dass diese miRNAs damit auch direkt oder indirekt Komponenten des mTOR-Signalweges beeinflussen.

Bezüglich der Bedeutung einer Rapamycinbeeinflussbarkeit von miRNAs ergibt sich für die dazugehörigen Zielgene hypothetisch folgendes: miRNAs mit sog. negativem Rapamycineffekt waren nach unserer Definition geringer exprimiert als bei ungehinderter Differenzierung. Dies bedeutet auf die Biologie bezogen, dass eine von diesen miRNAs ausgeübte Suppression der zugehörigen Targetgene verringert oder aufgehoben wird und die mRNA dieser Zielgene wieder translatiert werden kann. Bei einem positiven Rapamycineffekt stieg die miRNA-Expression gegenüber unbehandelt ausdifferenzierten Zellen an. Hier kann erwartet werden, dass die entsprechenden Zielgene unter mTOR-Inhibierung verstärkt reprimiert und ihre Translation inhibiert wird.

Insgesamt konnte eine große Zahl an Rapamycin-sensitiven miRNAs ermittelt werden. In Microarray und LDA wurden nach mTOR-Inhibierung mittels Rapamycin ca. 90% der während der Differenzierung über 0,5-fach hochregulierten miRNAs reprimiert; sie zeigten einen negativen Rapamycineffekt. Ebenso waren ca. 90 % der während der Differenzierung unter -0,5-fach herunterregulierten miRNAs durch einen positiven Rapamycineffekt signifikant beeinflusst. Eine während der Differenzierung auftretende Herunterregulation von miRNAs wurde hier durch Rapamycin abgeschwächt oder aufgehoben. Ein Großteil der während der Differenzierung differentiell regulierten miRNAs war also auch Rapamycin-sensitiv. Die chronische mTOR-Inhibierung hatte fast ausschließlich einen der Differenzierung entgegen gesetzten und somit „hemmenden“ Effekt.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass der Effekt einer mTOR-Inhibierung auf die Adipozytendifferenzierung auch den Großteil der den Differenzierungsprozess regulierenden

miRNAs mit betrifft. Diese Beobachtung unterstreicht die zentrale Rolle des Signalwegs bei der Differenzierung.

4.3.1 miRNA-Expressionsgruppen unter mTOR-Hemmung

Zur weiteren Analyse wurden die miRNAs anhand ihres Verhaltens während der Differenzierung mit und ohne Rapamycinbehandlung in 3 verschiedene Expressionsgruppen eingeteilt.

Knapp die Hälfte der differentiell regulierten miRNAs wurde Gruppe 1 zugeteilt. Sie zeigten alle eine Inhibierung ihrer Differenzierungsabhängigen Hochregulation durch die Rapamycinbehandlung. Es ist zu erwarten, dass diese miRNAs Gene steuern, welche während der Differenzierung inhibiert werden. Unter mTOR-Hemmung wird die Suppression dieser Zielgene aufgehoben. Innerhalb dieser Gruppe fiel auf, dass die 3 miRNAs mit dem am stärksten ausgeprägten Rapamycineffekt, miR-182, miR-183 und miR-96, einem Cluster angehörten. Ihre Expression sank durch die Rapamycinbehandlung sogar unter das Expressionsniveau undifferenzierter Zellen. Die mTOR-Inhibierung hatte hier möglicherweise einen über die Abschwächung des Differenzierungseffekts hinausgehenden Effekt.

Das experimentelle Setting war nicht darauf ausgerichtet, frühe und späte Rapamycineffekte auf die miRNA-Expression zu unterscheiden. Die Expressionswerte der miR-96 im Zeitverlauf (Abb. 3-16) legten jedoch nahe, dass während der frühen Differenzierung noch keine Rapamycinbeeinflussbarkeit bestand. Erst in der späten Phase wurde der Expressionsanstieg der miR-96 stark durch Rapamycin inhibiert.

Der Expressionsgruppe 2 wurden 9 miRNAs zugeteilt, die während der Differenzierung herabreguliert waren und bei denen Rapamycin diese Suppression aufheben konnte. Unter mTOR-Inhibierung zeigten 6 der 9 miRNAs eine gegenüber dem Expressionsniveau undifferenzierter Zellen erhöhte Expression. MiRNAs dieser Gruppe müssten hypothetisch Gene adressieren, die während der Adipozytendifferenzierung verstärkt exprimiert werden. Unter mTOR-Hemmung würden diese Gene dann durch die miRNAs inhibiert. Auch in dieser Gruppe konnten die miR-199a und miR-214 einem miRNA-Cluster zugeordnet werden. Interessanterweise bilden miR-199a und miR-199b auch eine Genfamilie. Diese miRNAs sind also z.T. im Genom nebeneinander lokalisiert oder teilen dieselbe Sequenz. Man kann deshalb postulieren, dass sie teilweise denselben Regulationsmechanismen unterliegen oder dieselben Gene regulieren. Diese miRNAs könnten möglicherweise einen vielversprechenden therapeutischen Angriffspunkt darstellen, da sie koordiniert verschiedene Zielgene in wichtigen Stoffwechselwegen angreifen könnten.

Schließlich wurden noch 2 miRNAs der Gruppe 3 zugeteilt. Sie zeigten kaum differentielle Regulation während der Differenzierung, aber eine Expressionssteigerung durch die Rapamycinbehandlung. Damit scheinen sie möglicherweise Differenzierungsunabhängige Effekte der mTOR-Inhibierung zu vermitteln. MiR-322 zeigte während der gesamten Differenzierung eine fast konstante Expression. Erst unter längerfristiger Rapamycinexposition kam es zu einem Anstieg ihrer Expression (Abb. 3-16). Bei miR-322 könnte es sich also um eine erst durch anhaltende mTOR-Inhibierung aktivierte miRNA handeln. Für die andere miRNA, miR-450a-5p war ebenfalls während der gesamten Differenzierungsperiode eine Expressionssteigerung durch mTOR-Inhibierung zu verzeichnen.

Nachdem bisher keine publizierten Daten zu miRNAs mit Einfluss auf den mTOR-Signalweg während der Adipogenese existieren, stellt die Identifikation und Eingrenzung von Kandidaten-miRNAs, die durch Rapamycin beeinflussbar sind, einen wichtigen Datensatz für weitere diesbezügliche Untersuchungen dar. Von besonderem Interesse wegen ihrer starken Ausregulation und ihres therapeutischen Potentials waren das miR-96/182/183-Cluster und das miR-199a/214 – Cluster sowie die miR-103-Genfamilie.

4.3.2 Funktionelle Bedeutung der als Rapamycin-sensitiv ermittelten miRNAs

Vorhersagen auf Basis von mit miRNAs assoziierten funktionellen Kategorien

In Bezug auf miRNA-Expression unter mTOR-Inhibierung gibt es bislang mit Ausnahme eines Berichtes zu miR-199a-3p (Fornari et al. 2010) keine publizierten Daten. Ebenso sind die Zielgene für die meisten der hier beschriebenen miRNAs bislang nicht experimentell nachgewiesen. Zur Eingrenzung der möglichen funktionellen Bedeutung analysierten wir für unsere Kandidaten-miRNAs deren Zuordnung zu bisher damit assoziierten funktionellen Kategorien. Dabei fiel auf, dass es sich vielfach um Funktionen wie Zellzykluskontrolle, Zellmigration, Apoptose und Angiogenese etc. handelte, die überwiegend im Zusammenhang mit der Tumorbilogie untersucht wurden (siehe Tabelle 4-5).

Die Expression der miR-182 bzw. miR-103/107 erwies sich beispielsweise als prognostischer Marker für das Überleben von Patienten mit malignen Gliomen respektive Ösophaguskarzinomen (Guo et al. 2008; Jiang et al. 2010).

Für einige Rapamycin-sensitive miRNAs sind Tumorsuppressorgene als Zielgene experimentell evaluiert worden: „suppressor of fused homolog“ (SUFU) und „tumor suppressor candidate 2“ (TUSC2=FUS1) für miR-378 (Lee et al. 2007), „cyclin-dependent kinase inhibitor 1B“ (CDKN1B=p27) für miR-222 (Felicetti et al. 2008; Mercatelli et al.

2008) und „forkhead box O1“ (FOXO1) für miR-96/182 (Guttilla et al. 2009; Myatt et al. 2010).

Tabelle 4-5: Publierte biologische Funktionen von Rapamycin-sensitiven miRNAs

biologische Funktion	miR-96, miR-182, miR-183	miR-103, miR-107	miR-378	miR-193	miR-222	miR-214	miR-199 Genfamilie
Zellzykluskontrolle		(Takahashi et al. 2009)			(Kim et al. 2009b) (Zhang et al. 2009a) (Frenquelli et al. 2010)		
Zellproliferation	(Sirotkin et al. 2009) (Sun et al. 2010)		(Song et al. 2010)		(Di Leva et al. 2010)	(Jindra et al. 2010) (Yang et al. 2009b)	
Zelldifferenzierung		(Yang et al. 2009a)	(Kahai et al. 2009)		(Cardinali et al. 2009) (Qian et al. 2009)	(Chen et al. 2010) (Juan et al. 2009) (Liu et al. 2010) (Yin et al. 2010)	(Lin et al. 2009a)
Zellwachstum		(Cheng et al. 2005) (Lee et al. 2009)	(Lee et al. 2007)	(Cheng et al. 2005)			(Lee et al. 2008)
Zellmigration	(Li et al. 2009a) (Segura et al. 2009) (Wang et al. 2008a)				(Liu et al. 2009b) (Wong et al. 2010)		
Apoptose	(Sirotkin et al. 2009)				(Forrest et al. 2009)	(Cheng et al. 2005)	(Kim et al. 2008)
Angiogenese			(Lee et al. 2007)		(Dentelli et al. 2010) (Liu et al. 2009a)	(Chan et al. 2009)	
Reaktion auf Hypoxie		(Yamakuchi et al. 2010)					(Rane et al. 2009)
Stoffwechsel	(Dolganiuc et al. 2009)	(Wilfred et al. 2007)					
Glucose-stoffwechsel Signalwege	(Xu et al. 2008)	(Herrera et al. 2010)			(Herrera et al. 2010) (Zhang et al. 2010)		(Fornari et al. 2010) (Chen et al. 2008)
Entwicklung der Sinnesorgane	(Li et al. 2010) (Mencia et al. 2009) (Xu et al. 2007)						
Entwicklung des Skelettsystems						(Watanabe et al. 2008)	(Watanabe et al. 2008)

Für miR-107 wurde hingegen das Oncogen „pleomorphic adenoma gene 1“ (PLAG1) als Zielgen identifiziert (Pallasch et al. 2009) und das „met proto-oncogene“ (MET) für miR-199a* (Kim et al. 2008; Migliore et al. 2008). MiR-107 und miR-222/221 haben zudem die den Zellzyklus regulierenden Gene „cyclin dependent kinase 6“ (CDK6) (Lee et al. 2009) respektive „cyclin-dependent kinase inhibitor 1C“ (CDKN1C) (Qian et al. 2009) zum Ziel.

Auch im Stoffwechsel, v.a. im Glucosemetabolismus, sind miR-103/107 und miR-222 möglicherweise involviert (Tang et al. 2009; Herrera et al. 2010).

Die Gene der miR-103/107 befinden sich im Wirbeltiergenom in den Introns der Pantothenatkinase (PANK)-Gene. Diese steuert die Konzentration von Acetyl-CoA und Lipiden in der Zelle. Möglicherweise agieren hier die miRNAs und das „host gene“ synergistisch (Wilfred et al. 2007). Darüber hinaus wurde über eine Korrelation der miR-103-Expression mit dem „Body Mass Index“ berichtet (Iliopoulos et al. 2008).

All diese funktionellen Kategorien könnten auch über den mTOR-Signalweg vermittelt werden: der mTOR-Signalweg ist an der Regulation von Zellwachstum, Zellinvasion, Zellzyklusprogression und Apoptose, aber auch am Intermediär-Stoffwechsel sowie der Hypoxievermittlung bzw. Angiogenese beteiligt (Baldo et al. 2008). Darüber hinaus steht der mTOR-Signalweg mit der Entstehung und Progression einer Reihe von Krebsarten in Zusammenhang (Gibbons et al. 2009). Unsere Daten sind konsistent mit der Hypothese, dass einige der beschriebenen Funktionen der Rapamycin-sensitiven miRNAs direkt oder indirekt über mTOR vermittelt werden könnten.

Für die miR-214 ist z.B. bereits gezeigt, dass sie „phosphatase and tensin homolog“ (PTEN) regulieren kann und so den AKT-Signalweg aktiviert, der letztendlich auch in den mTOR-Signalweg mündet (Jindra et al. 2010).

MiR-103/107 haben u.a. HIF1 α zum Ziel, welches als downstream Target von mTOR die durch Hypoxie vermittelte Angiogenese reguliert (Yamakuchi et al. 2010).

In Bezug auf den Intermediär-Stoffwechsel wurde gezeigt, dass miR-96/182/183 Zielgene wie Rasa1, Grb2 und Irs1 steuern könnten (Xu et al. 2008). Diese sind alle im Insulinsignalweg lokalisiert, der ebenfalls in den mTOR-Signalweg mündet.

Für die miR-199a-3p wurde bereits experimentell bestätigt, dass sie mTOR in HCC-Zellen angreift. Eine Erhöhung der bei HCC-Zellen normalerweise erniedrigten miR-199a-3p-Expression führte zum Zellzyklusarrest, reduzierter Invasionskapazität, erhöhter Anfälligkeit gegenüber Hypoxie und verstärkter Sensitivität gegenüber Doxorubicin-induzierter Apoptose (Fornari et al. 2010).

Prinzipiell kann ein Effekt von Rapamycin auf die miRNA-Expression zwei funktionelle Komponenten beinhalten: zum Einen einen durch miRNAs vermittelten Effekt, wenn deren Zielgene direkt im mTOR-Signalweg lokalisiert sind. Zum Anderen die durch die Rapamycin-induzierte mTOR-Hemmung vermittelten Stoffwechseleffekte, die via Adaptationsmechanismen zahlreicher Gene zu sekundären miRNA-Abweichungen führen. Deshalb haben wir mit bioinformatischen Methoden untersucht, für welche der Rapamycin-sensitiven miRNAs direkte miRNA-Target Interaktionen innerhalb des mTOR-Signalweges vorhergesagt werden können.

4.3.3 Vorhersage von miRNA-Zielgenen im mTOR-Signalweg

Ein Ziel der Arbeit war es, die bisher ungeklärte Rolle der miRNAs bzw. der miRNA Cluster in Bezug auf die Regulation des mTOR-Signalwegs zu definieren. Da bisher nur wenige miRNA-mRNA Interaktionen experimentell bestätigt sind, mussten wir auf bioinformatische Vorhersagen der Zielgene zurückgreifen. Auf diese Weise konnten wir unter Berücksichtigung aller Gene im mTOR-Signalweg (siehe Abb. 1-2) insgesamt 500 mRNA-miRNA Interaktionen ermitteln, die mindestens von 2 verschiedenen Datenbanken vorausgesagt wurden.

Als Mittel für die weitere Priorisierung der vorhergesagten Ziel-mRNAs wurde der experimentell erstellte Datensatz der zuvor als Rapamycin-sensitiv ermittelten Kandidaten-miRNAs herangezogen. Von den 500 mRNA-miRNA Interaktionen betrafen 53 Interaktionen eine dieser Kandidaten-miRNAs. Damit war ca. ein Zehntel der miRNAs, die laut Konsensusvorhersage ein Zielgen im mTOR-Signalweg haben, in unseren Analysen Rapamycin-sensitiv. Diese miRNAs erachteten wir für weitere Untersuchungen als besonders vielversprechend, da sie experimentell auf eine Veränderung im mTOR-Signalweg reagiert haben und zusätzlich vorhergesagte Angriffspunkte im mTOR-Signalweg besitzen.

Insgesamt hatten 18 der 23 Rapamycin-sensitiven miRNAs bioinformatisch vorhergesagte Zielgene im mTOR-Signalweg; darunter fanden sich sowohl während der Differenzierung hoch- wie auch herunterregulierte miRNAs.

Als weitere Strategie zur Eingrenzung der großen Zahl an potentiellen mRNA-miRNA Interaktionen wurde der Datensatz nach der Anzahl der vorhergesagten Zielgene sortiert. Unter den Rapamycin-sensitiven miRNAs gab es solche, für die nur eine einzige Interaktion mit einem Gen des mTOR-Signalwegs vorhergesagt war (miR-183: TSC1, miR-494: AKT3 und miR-96/1271: RPS6KA6). Für andere unserer Kandidaten-miRNAs wurden Interaktion mit mehreren Genen des mTOR-Signalweges vorhergesagt (miR-29abc: 7 Gene, let-7/98,

miR-103/107, miR-214/761, miR-30a/30a-5p/30b/30b-5p/30cde/384-5p jeweils 5 Gene). Umgekehrt wurden manche Gene (AKT, BRAF, PIK3R, VEGFA) von über 30, andere nur von wenigen miRNAs adressiert. Diese Beobachtung bestätigt den für miRNAs bekannten Sachverhalt, dass miRNA-Target Interaktionen zwar auch spezifisch nur ein bestimmtes Target betreffen können; viel häufiger jedoch üben miRNAs ihre regulatorische Funktion gleichzeitig an multiplen Targets aus (Lim et al. 2005). Für medizinische Anwendungen könnten sich neu identifizierte miRNA-mTOR Interaktionspaare als diagnostische Marker oder als therapeutische Targets eignen. Die Identifizierung von miRNA-gesteuerten multiplen Interaktionen innerhalb von Signalwegen sind von Interesse, da damit über eine einzige miRNA komplexe Abweichungen in verschiedenen Signalwegen (z.B. AKT, mTOR) therapeutisch (z.B. via Antagomire) angesteuert werden können.

Bei Betrachtung der downstream Targets von mTOR (Tabelle 4-6, Signalweg Abb.1-2) war die während der Adipozytendifferenzierung niedrige Expression all jener miRNAs auffällig, die Komponenten des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) - Signalwegs als Target vorhergesagt haben.

Tabelle 4-6: Vorhergesagte miRNA-mRNA Interaktionen zwischen Rapamycin-sensitiven miRNA-Genfamilien und downstream Targets von mTOR

miRNA-Genfamilie	Gen	Freq1	Freq2	annotierte biologische Funktion
miR-214/761	PGF	2	5	Angiogenese
miR-125/351	VEGFA	31	4	Angiogenese
miR-214/761	VEGFA	31	5	Angiogenese
miR-29abc	VEGFA	31	7	Angiogenese
miR-503	VEGFA	31	4	Angiogenese
let-7/98	ULK2	22	5	Autophagie
miR-103/107	EIF4B	10	5	Zellwachstum
miR-503	EIF4E	27	4	Zellwachstum
miR-29abc	EIF4E2	25	7	Zellwachstum
miR-125/351	EIF4EBP1	2	4	Zellwachstum
miR-125/351	RPS6KA1	5	4	Zellwachstum
miR-199/199-3p	RPS6KA6	11	4	Zellwachstum
miR-96/1271	RPS6KA6	11	1	Zellwachstum
miR-30a/30a-5p/30b/30b-5p/30cde/384-5p	RPS6KB1	17	5	Zellwachstum

Freq1 bezeichnet die Anzahl der miRNAs, die laut Vorhersage diese mRNA binden. Freq2 gibt die Anzahl der Gene an, die laut Vorhersage von dieser miRNA reguliert werden. MiRNAs mit Rapamycinvermittelter Inhibierung der Differenzierungsabhängigen Hochregulation sind grau hinterlegt, miRNAs mit Rapamycinvermittelter Inhibierung der Differenzierungsabhängigen Herunterregulation sind nicht hinterlegt.

Bemerkenswert war auch die vorhergesagte miRNA-Zielgen Interaktion zwischen der miR-125-Genfamilie und EIF4EBP1, da dieses Gen insgesamt nur über 2 miRNA-

Bindungsstellen verfügt. EIF4EBP1 ist an der Regulation von Translationsinitiation, Proteinsynthese und Zellwachstum beteiligt (Armengol et al. 2007).

Das funktionell zentrale Gen des mTOR-Signalweges TSC1, über welches die Informationen des MAPK-, Insulin-, REDD1- und AMPK-Signalwegs konvergieren, kann laut Vorhersage von miR-183 und miR-378 reguliert werden.

Für mTOR selbst, an dessen Genprodukt Rapamycin bindet, wurde unter unseren stringenten Kriterien der Prädiktion keine Bindungsstelle für eine der als Rapamycin-sensitiv ermittelten miRNAs vorhergesagt. In der Literatur ist jedoch eine Interaktion zwischen miR-199a-3p und mTOR gezeigt (Fornari et al. 2010).

Die Zielgenvorhersage dokumentierte auch, dass miRNAs eines Clusters Bindungsstellen von ganz unterschiedlichen Genen des mTOR-Signalwegs adressieren können (miR-96/182/183- und miR-199a/214-Cluster). Sie regulieren damit möglicherweise den Signalweg gemeinsam und koordiniert über unterschiedliche Angriffspunkte.

Auch die miRNA-Genfamilien hatten laut Konsensusvorhersage Gene auf unterschiedlichen Ebenen des mTOR-Signalwegs zum Ziel. Da sie dieselben Zielgene besitzen könnten sie möglicherweise eine effektive physiologische Feinregulation der Expression dieser Gene bereitstellen. Die miR-29-Genfamilie weist auffällig viele Zielgene im Insulinsignalweg upstream von mTOR auf. Die Genfamilien miR-199 und miR-30 adressieren 3 verschiedene upstream-Signalwege: AMPK, REDD1 und den Insulinsignalweg. Die miR-125-Genfamilie hingegen adressiert 2 downstream Funktionen, das Zellwachstum und den VEGF-Signalweg. Zusammenfassend macht die große Zahl an vorhergesagten mTOR-Signalweg Zielgenen der Rapamycin-sensitiven miRNAs eine Interaktion zwischen miRNAs und dem mTOR-Signalweg während der Adipozytendifferenzierung wahrscheinlich. Für die Auswahl einer spezifischen miRNA-Zielgen Interaktion zur experimentellen Validierung könnten die geschilderten Überlegungen zur Spezifität der Interaktion und zur potentiellen biologischen Relevanz herangezogen werden.

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Das Verständnis der molekularen Vorgänge während der Adipogenese ist von fundamentaler Bedeutung für die Entwicklung neuer nutritiver oder pharmakologischer Interventionen zur Behandlung der Adipositas.

Eine chronische Überaktivierung des „mechanistic target of rapamycin“ (mTOR) „nutrient-sensing“ Signalwegs ist als einer der zentralen molekularen Pathomechanismen bei Adipositas vielfach beschrieben. Nicht präzise definiert waren bislang jedoch die regulatorischen Elemente im mTOR Signalnetzwerk in Bezug auf die Adipogenese. Die Identifizierung von durch „mTOR nutrient-sensing“ beeinflussten microRNAs (miRNAs) war deshalb ein Hauptziel dieser Arbeit.

Wir stellten die Hypothese auf, dass eine regulatorische Interaktion zwischen miRNAs und dem mTOR-Signalweg während der Adipozytendifferenzierung stattfindet.

Daraus ergaben sich folgende Hauptziele dieser Arbeit:

1. die Charakterisierung der differentiellen Expression von miRNAs im Verlauf der Adipozytendifferenzierung
2. die Identifizierung von durch „mTOR nutrient-sensing“ beeinflussten miRNAs
3. die Ableitung von Kandidatengenomen als potentielle Targets der identifizierten „nutrient-sensing“-sensitiven miRNAs.

Dazu wurden zuerst umfassende differentielle miRNA-Expressionsprofile im zeitlichen Verlauf der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen, Maus-Prädipozyten, erstellt. Verwendet wurden dazu semiquantitative Arrayverfahren sowie ein „low density array“ als quantitatives Verfahren zur Konfirmation der Resultate. Dabei konnten 40 differentiell exprimierte miRNAs konfirmiert werden, von denen für einige (12) bislang noch keine Assoziation zur Adipogenese bekannt oder publiziert war.

Zur Identifizierung von sog. „nutrient-sensing“-sensitiven miRNAs wurde der mTOR-Signalweg bei 3T3L1-Zellen mittels Rapamycin spezifisch inhibiert und dadurch eine „hungernde Zelle“ simuliert. Die durch diese Behandlung induzierte differentielle miRNA-Expression wurde ebenso mittels Arrayanalysen erfasst.

Die Ausgangshypothese einer Interaktion zwischen miRNAs und dem mTOR-Signalweg wurde durch eine Reihe von Befunden und Beobachtungen unterstützt:

1. eine Inhibierung des mTOR-Signalwegs mittels Rapamycin führte zur Expressionsveränderung der meisten Differenzierungsabhängig regulierten miRNAs. Insgesamt konnten erstmals 22 miRNAs konfirmiert werden, deren Expression durch eine mTOR-Inhibierung signifikant beeinflusst wird. Fast alle dieser miRNAs waren auch Differenzierungsabhängig reguliert und die Rapamycinbehandlung hatte einen der Differenzierung entgegen gesetzten Effekt auf die miRNA-Expression.
2. für zahlreiche dieser Rapamycin-sensitiven miRNAs wurden bereits in der Literatur dokumentierte biologische Funktionen ermittelt, die größtenteils sowohl mit dem mTOR-Signalweg wie auch mit der Adipogenese in Zusammenhang stehen. In Bezug auf die Ausgangsfragestellung als besonders vielversprechend wurde das ausgeprägt via mTOR regulierte miRNA-Cluster miR-182/183/96 identifiziert.
3. viele Rapamycin-sensitive miRNAs besaßen bioinformatisch vorhergesagte Bindungssequenzen in Zielgenen innerhalb des mTOR-Signalwegs.

Diese Arbeit legte die wesentlichen Grundlagen zur Identifizierung „nutrient-sensing“-sensitiver miRNAs während der Adipogenese. In nachfolgenden Arbeiten könnten die *in vitro* Daten dieser Arbeit zur differentiellen miRNA-Expression *in vivo* überprüft werden und die Gewebespezifität der durch „mTOR nutrient-signaling“ beeinflussten miRNAs ermittelt werden. Schließlich müssten die vorhergesagten Zielgene noch experimentell konfirmiert und funktionell validiert werden.

Einige der in dieser Arbeit identifizierten „nutrient-sensing“-sensitiven miRNAs könnten zusammen mit ihren ermittelten Zielgenen aus dem mTOR-Signalweg potentiell auch diagnostisch oder therapeutisch genutzt werden. Beispielsweise als Biomarker zur Verlaufskontrolle der Adipositas bzw. der mTOR-Überaktivierung oder als Screening-Biomarker zur Evaluation anti-adipogener Diäten oder Nahrungsmittel.

6 Literaturverzeichnis

- Akao, Y., Nakagawa, Y., et al. (2007). "Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies." *Cancer Sci* **98**(12): 1914-1920.
- Altuvia, Y., Landgraf, P., et al. (2005). "Clustering and conservation patterns of human microRNAs." *Nucleic Acids Res* **33**(8): 2697-2706.
- Ambros, V. (2004). "The functions of animal microRNAs." *Nature* **431**(7006): 350-355.
- Andersen, D. C., Jensen, C. H., et al. (2010). "MicroRNA-15a fine-tunes the level of Delta-like 1 homolog (DLK1) in proliferating 3T3-L1 preadipocytes." *Exp Cell Res* **316**(10): 1681-1691.
- Armengol, G., Rojo, F., et al. (2007). "4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications." *Cancer Res* **67**(16): 7551-7555.
- Avram, M. M., Avram, A. S., et al. (2007). "Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell." *J Am Acad Dermatol* **56**(3): 472-492.
- Baldo, P., Cecco, S., et al. (2008). "mTOR pathway and mTOR inhibitors as agents for cancer therapy." *Curr Cancer Drug Targets* **8**(8): 647-665.
- Barnes, L. A., Opitz, J. M., et al. (2007). "Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects." *Am J Med Genet A* **143A**(24): 3016-3034.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* **116**(2): 281-297.
- Bell, A., Grunder, L., et al. (2000). "Rapamycin inhibits human adipocyte differentiation in primary culture." *Obes Res* **8**(3): 249-254.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995). "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to powerful testing." *J R Stat Soc* **57**: 289-300.
- Butterwith, S. C. (1994). "Molecular events in adipocyte development." *Pharmacol Ther* **61**(3): 399-411.
- Cardinali, B., Castellani, L., et al. (2009). "MicroRNA-221 and microRNA-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells." *PLoS ONE* **4**(10): e7607.
- Chakrabarti, P., English, T., et al. (2010). "Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage." *Diabetes* **59**(4): 775-781.
- Chan, L. S., Yue, P. Y., et al. (2009). "Role of microRNA-214 in ginsenoside-Rg1-induced angiogenesis." *Eur J Pharm Sci* **38**(4): 370-377.
- Chang, G. R., Chiu, Y. S., et al. (2009a). "Rapamycin protects against high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice." *J Pharmacol Sci* **109**(4): 496-503.
- Chang, G. R., Wu, Y. Y., et al. (2009b). "Long-term Administration of Rapamycin Reduces Adiposity, but Impairs Glucose Tolerance in High-Fat Diet-fed KK/HIJ Mice." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **105**(3): 188-198.
- Chen, H., Shalom-Feuerstein, R., et al. (2010). "miR-7 and miR-214 are specifically expressed during neuroblastoma differentiation, cortical development and embryonic stem cells differentiation, and control neurite outgrowth in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* **394**(4): 921-927.
- Chen, R., Alvero, A. B., et al. (2008). "Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells." *Oncogene* **27**(34): 4712-4723.
- Cheng, A. M., Byrom, M. W., et al. (2005). "Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis." *Nucleic Acids Res* **33**(4): 1290-1297.
- Chiou, T. J. (2007). "The role of microRNAs in sensing nutrient stress." *Plant Cell Environ* **30**(3): 323-332.

- Cho, H. J., Park, J., et al. (2004). "Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin." Biochem Biophys Res Commun **321**(4): 942-948.
- Cleveland, W. S. (1979). "Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots." J Amer Statist Assoc **74**: 829-836.
- Cornelius, P., MacDougald, O. A., et al. (1994). "Regulation of adipocyte development." Annu Rev Nutr **14**: 99-129.
- Denli, A. M., Tops, B. B., et al. (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." Nature **432**(7014): 231-235.
- Dentelli, P., Rosso, A., et al. (2010). "microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(8): 1562-1568.
- Di Leva, G., Gasparini, P., et al. (2010). "MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer." J Natl Cancer Inst **102**(10): 706-721.
- Doghman, M., El Wakil, A., et al. (2010). "Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors." Cancer Res **70**(11): 4666-4675.
- Dolganiuc, A., Petrasek, J., et al. (2009). "MicroRNA expression profile in Lieber-DeCarli diet-induced alcoholic and methionine choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis models in mice." Alcohol Clin Exp Res **33**(10): 1704-1710.
- Dowling, R. J., Topisirovic, I., et al. (2010). "Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors." Biochim Biophys Acta **1804**(3): 433-439.
- Esau, C., Kang, X., et al. (2004). "MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation." J Biol Chem **279**(50): 52361-52365.
- Farmer, S. R. (2006). "Transcriptional control of adipocyte formation." Cell Metab **4**(4): 263-273.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., et al. (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" Nat Rev Genet **9**(2): 102-114.
- Fornari, F., Milazzo, M., et al. (2010). "MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells." Cancer Res **70**(12): 5184-5193.
- Forrest, A. R., Kanamori-Katayama, M., et al. (2009). "Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation." Leukemia **24**(2): 460-466.
- Frenquelli, M., Muzio, M., et al. (2010). "MicroRNA and proliferation control in chronic lymphocytic leukemia: functional relationship between miR-221/222 cluster and p27." Blood **115**(19): 3949-3959.
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., et al. (2004). "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics." Genome Biol **5**(10): R80.
- Gerin, I., Bommer, G. T., et al. (2010). "Roles for miRNA-378/378* in adipocyte gene expression and lipogenesis." Am J Physiol Endocrinol Metab **299**(2): E198-206.
- Gingras, A. C., Raught, B., et al. (1999). "eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation." Annu Rev Biochem **68**: 913-963.
- Green, H. and Meuth, M. (1974). "An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture." Cell **3**(2): 127-133.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M., et al. (1998). "Understanding adipocyte differentiation." Physiol Rev **78**(3): 783-809.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., et al. (2008). "miRBase: tools for microRNA genomics." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D154-158.
- Guttilla, I. K. and White, B. A. (2009). "Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells." J Biol Chem **284**(35): 23204-23216.

- Hausman, D. B., DiGirolamo, M., et al. (2001). "The biology of white adipocyte proliferation." *Obes Rev* **2**(4): 239-254.
- He, A., Zhu, L., et al. (2007a). "Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes." *Mol Endocrinol* **21**(11): 2785-2794.
- He, L. and Hannon, G. J. (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." *Nat Rev Genet* **5**(7): 522-531.
- He, X., He, L., et al. (2007b). "The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network." *Cancer Res* **67**(23): 11099-11101.
- Hermeking, H. (2010). "The miR-34 family in cancer and apoptosis." *Cell Death Differ* **17**(2): 193-199.
- Herrera, B. M., Lockstone, H. E., et al. (2010). "Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes." *Diabetologia* **53**(6): 1099-1109.
- Houde, V. P., Brule, S., et al. (2010). "Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue." *Diabetes* **59**(6): 1338-1348.
- Ivanovska, I., Ball, A. S., et al. (2008). "MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression." *Mol Cell Biol* **28**(7): 2167-2174.
- Jiang, B. H. and Liu, L. Z. (2009). "PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis." *Adv Cancer Res* **102**: 19-65.
- Jindra, P. T., Bagley, J., et al. (2010). "Costimulation-dependent expression of microRNA-214 increases the ability of T cells to proliferate by targeting Pten." *J Immunol* **185**(2): 990-997.
- Jordan, S. D., Konner, A. C., et al. (2010). "Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis." *Cell Mol Life Sci* **67**(19): 3255-3273.
- Juan, A. H., Kumar, R. M., et al. (2009). "Mir-214-dependent regulation of the polycomb protein Ezh2 in skeletal muscle and embryonic stem cells." *Mol Cell* **36**(1): 61-74.
- Kahai, S., Lee, S. C., et al. (2009). "MicroRNA miR-378 regulates nephronectin expression modulating osteoblast differentiation by targeting GalNT-7." *PLoS ONE* **4**(10): e7535.
- Kajimoto, K., Naraba, H., et al. (2006). "MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation." *RNA* **12**(9): 1626-1632.
- Kanehisa, M., Goto, S., et al. (2010). "KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs." *Nucleic Acids Res* **38**(Database issue): D355-360.
- Karamanlidis, G., Karamitri, A., et al. (2007). "C/EBPbeta reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a Brown adipocyte pattern of gene expression." *J Biol Chem* **282**(34): 24660-24669.
- Khamzina, L., Veilleux, A., et al. (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**(3): 1473-1481.
- Kim, J. E. and Chen, J. (2004). "regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis." *Diabetes* **53**(11): 2748-2756.
- Kim, K. A., Kim, J. H., et al. (2007). "Pref-1 (preadipocyte factor 1) activates the MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway to inhibit adipocyte differentiation." *Mol Cell Biol* **27**(6): 2294-2308.
- Kim, S., Lee, U. J., et al. (2008). "MicroRNA miR-199a* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2)." *J Biol Chem* **283**(26): 18158-18166.

- Kim, S. Y., Kim, A. Y., et al. (2010). "miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPAR γ expression." Biochem Biophys Res Commun **392**(3): 323-328.
- Kim, V. N. (2005). "MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(5): 376-385.
- Kim, V. N., Han, J., et al. (2009a). "Biogenesis of small RNAs in animals." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(2): 126-139.
- Kim, Y. K., Yu, J., et al. (2009b). "Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer." Nucleic Acids Res **37**(5): 1672-1681.
- Kloting, N., Berthold, S., et al. (2009). "MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue." PLoS ONE **4**(3): e4699.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., et al. (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science **294**(5543): 853-858.
- Lau, N. C., Lim, L. P., et al. (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." Science **294**(5543): 858-862.
- Lee, C. T., Risom, T., et al. (2006a). "MicroRNAs in mammalian development." Birth Defects Res C Embryo Today **78**(2): 129-139.
- Lee, D. Y., Deng, Z., et al. (2007). "MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(51): 20350-20355.
- Lee, J. W., Choi, C. H., et al. (2008). "Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas." Clin Cancer Res **14**(9): 2535-2542.
- Lee, K. H., Lotterman, C., et al. (2009). "Epigenetic silencing of MicroRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer." Pancreatolgy **9**(3): 293-301.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-419.
- Lee, Y. S. and Dutta, A. (2006b). "MicroRNAs: small but potent oncogenes or tumor suppressors." Curr Opin Investig Drugs **7**(6): 560-564.
- Leibowitz, G., Cerasi, E., et al. (2008). "The role of mTOR in the adaptation and failure of beta-cells in type 2 diabetes." Diabetes Obes Metab **10 Suppl 4**: 157-169.
- Leung, W. S., Lin, M. C., et al. (2008). "Filtering of false positive microRNA candidates by a clustering-based approach." BMC Bioinformatics **9 Suppl 12**: S3.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.
- Li, G., Luna, C., et al. (2009a). "Targeting of integrin beta1 and kinesin 2alpha by microRNA 183." J Biol Chem **285**(8): 5461-5471.
- Li, H., Kloosterman, W., et al. (2010). "MicroRNA-183 family members regulate sensorineural fates in the inner ear." J Neurosci **30**(9): 3254-3263.
- Li, S., Chen, X., et al. (2009b). "Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status." J Lipid Res **50**(9): 1756-1765.
- Lian, J., Yan, X. H., et al. (2008). "The mammalian target of rapamycin pathway and its role in molecular nutrition regulation." Mol Nutr Food Res **52**(4): 393-399.
- Lim, L. P., Lau, N. C., et al. (2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." Nature **433**(7027): 769-773.

- Lin, E. A., Kong, L., et al. (2009a). "miR-199a, a bone morphogenic protein 2-responsive MicroRNA, regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1." *J Biol Chem* **284**(17): 11326-11335.
- Lin, Q., Gao, Z., et al. (2009b). "A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis." *FEBS J* **276**(8): 2348-2358.
- Liu, J., Luo, X. J., et al. (2010). "MicroRNA-214 promotes myogenic differentiation by facilitating exit from mitosis via down-regulation of proto-oncogene N-ras." *J Biol Chem* **285**(34): 26599-26607.
- Liu, X., Cheng, Y., et al. (2009a). "A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia." *Circ Res* **104**(4): 476-487.
- Liu, X., Yu, J., et al. (2009b). "MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines." *Cancer Genomics Proteomics* **6**(3): 131-139.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Lund, E., Guttinger, S., et al. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." *Science* **303**(5654): 95-98.
- Ma, X. M. and Blenis, J. (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(5): 307-318.
- MacDougald, O. A. and Lane, M. D. (1995). "Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation." *Annu Rev Biochem* **64**: 345-373.
- Marshall, S. (2006). "Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer." *Sci STKE* **2006**(346): re7.
- Mathieu, P., Poirier, P., et al. (2009). "Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease." *Hypertension* **53**(4): 577-584.
- Mees, S. T., Schleicher, C., et al. (2009). "Analyzing miRNAs in Ductal Adenocarcinomas of the Pancreas." *J Surg Res* **169**(2): 241-246.
- Mencia, A., Modamio-Hoybjor, S., et al. (2009). "Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss." *Nat Genet* **41**(5): 609-613.
- Myatt, S. S., Wang, J., et al. (2010). "Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer." *Cancer Res* **70**(1): 367-377.
- Nagaraja, A. K., Creighton, C. J., et al. (2010). "A link between mir-100 and FRAP1/mTOR in clear cell ovarian cancer." *Mol Endocrinol* **24**(2): 447-463.
- Najafi-Shoushtari, S. H., Kristo, F., et al. (2010). "MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis." *Science* **328**(5985): 1566-1569.
- Nakanishi, N., Nakagawa, Y., et al. (2009). "The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice." *Biochem Biophys Res Commun* **385**(4): 492-496.
- Ntambi, J. M. and Young-Cheul, K. (2000). "Adipocyte differentiation and gene expression." *J Nutr* **130**(12): 3122S-3126S.
- Ohne, Y., Takahara, T., et al. (2008). "Isolation of hyperactive mutants of mammalian target of rapamycin." *J Biol Chem* **283**(46): 31861-31870.
- Ortega, F. J., Moreno-Navarrete, J. M., et al. (2010). "MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation." *PLoS ONE* **5**(2): e9022.

- Oskowitz, A. Z., Lu, J., et al. (2008). "Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(47): 18372-18377.
- Pan, S. Y. and DesMeules, M. (2009). "Energy intake, physical activity, energy balance, and cancer: epidemiologic evidence." *Methods Mol Biol* **472**: 191-215.
- Petersen, M. and Wengel, J. (2003). "LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics." *Trends Biotechnol* **21**(2): 74-81.
- Petrocca, F., Vecchione, A., et al. (2008). "Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling." *Cancer Res* **68**(20): 8191-8194.
- Pogribny, I. P., Starlard-Davenport, A., et al. (2010). "Difference in expression of hepatic microRNAs miR-29c, miR-34a, miR-155, and miR-200b is associated with strain-specific susceptibility to dietary nonalcoholic steatohepatitis in mice." *Lab Invest* **90**(10): 1437-1446.
- Polak, P., Cybulski, N., et al. (2008). "Adipose-specific knockout of raptor results in lean mice with enhanced mitochondrial respiration." *Cell Metab* **8**(5): 399-410.
- Qian, K., Hu, L., et al. (2009). "Hsa-miR-222 is involved in differentiation of endometrial stromal cells in vitro." *Endocrinology* **150**(10): 4734-4743.
- Rane, S., He, M., et al. (2009). "Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes." *Circ Res* **104**(7): 879-886.
- Rayner, K. J., Suarez, Y., et al. (2010). "MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis." *Science* **328**(5985): 1570-1573.
- Roggli, E., Britan, A., et al. (2010). "Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic beta-cells." *Diabetes* **59**(4): 978-986.
- Rosen, E. D. and MacDougald, O. A. (2006). "Adipocyte differentiation from the inside out." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(12): 885-896.
- Rovira, J., Marcelo Arellano, E., et al. (2008). "Effect of mTOR inhibitor on body weight: from an experimental rat model to human transplant patients." *Transpl Int* **21**(10): 992-998.
- Schoolmeesters, A., Eklund, T., et al. (2009). "Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem cells." *PLoS ONE* **4**(5): e5605.
- Segura, M. F., Hanniford, D., et al. (2009). "Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(6): 1814-1819.
- Shah, O. J., Wang, Z., et al. (2004). "Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies." *Curr Biol* **14**(18): 1650-1656.
- Singh, S. K., Pal Bhadra, M., et al. (2008). "MicroRNAs--micro in size but macro in function." *FEBS J* **275**(20): 4929-4944.
- Sirotkin, A. V., Ovcharenko, D., et al. (2009). "Identification of microRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen." *J Cell Physiol* **219**(2): 415-420.
- Smas, C. M., Kachinskas, D., et al. (1998). "Transcriptional control of the pref-1 gene in 3T3-L1 adipocyte differentiation. Sequence requirement for differentiation-dependent suppression." *J Biol Chem* **273**(48): 31751-31758.
- Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**: Article3.
- Smyth, G. K. (2005). "Limma: linear model for microarray data." *Springer, New York*.

- Song, G., Sharma, A. D., et al. (2010). "MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration." *Hepatology* **51**(5): 1735-1743.
- Strum, J. C., Johnson, J. H., et al. (2009). "MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1." *Mol Endocrinol* **23**(11): 1876-1884.
- Sun, F., Fu, H., et al. (2008). "Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest." *FEBS Lett* **582**(10): 1564-1568.
- Sun, T., Fu, M., et al. (2009). "MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis." *Mol Endocrinol* **23**(6): 925-931.
- Sun, Y., Fang, R., et al. (2010). "Hsa-mir-182 suppresses lung tumorigenesis through down regulation of RGS17 expression in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* **396**(2): 501-507.
- Suwa, A., Yoshino, M., et al. (2010). "RMI1 deficiency in mice protects from diet and genetic-induced obesity." *FEBS J* **277**(3): 677-686.
- Takahashi, Y., Forrest, A. R., et al. (2009). "MiR-107 and MiR-185 can induce cell cycle arrest in human non small cell lung cancer cell lines." *PLoS ONE* **4**(8): e6677.
- Takanabe, R., Ono, K., et al. (2008). "Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet." *Biochem Biophys Res Commun* **376**(4): 728-732.
- Um, S. H., D'Alessio, D., et al. (2006). "Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1." *Cell Metab* **3**(6): 393-402.
- Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., et al. (2006). "Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs." *Genes Dev* **20**(5): 515-524.
- von Frowein, J., Pagel, P., et al. (2011). "MicroRNA-492 is processed from the keratin 19 gene and up-regulated in metastatic hepatoblastoma." *Hepatology* **53**(3): 833-842.
- Wang, G., Mao, W., et al. (2008a). "MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells." *FEBS Lett* **582**(25-26): 3663-3668.
- Wang, Q., Li, Y. C., et al. (2008b). "miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(8): 2889-2894.
- Wang, S. and Olson, E. N. (2009). "AngiomiRs--key regulators of angiogenesis." *Curr Opin Genet Dev* **19**(3): 205-211.
- Watanabe, T., Sato, T., et al. (2008). "Dnm3os, a non-coding RNA, is required for normal growth and skeletal development in mice." *Dev Dyn* **237**(12): 3738-3748.
- Wilfred, B. R., Wang, W. X., et al. (2007). "Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways." *Mol Genet Metab* **91**(3): 209-217.
- Wong, Q. W., Ching, A. K., et al. (2010). "MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling." *Clin Cancer Res* **16**(3): 867-875.
- Xie, H., Lim, B., et al. (2009). "MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity." *Diabetes* **58**(5): 1050-1057.
- Xu, J. and Wong, C. (2008). "A computational screen for mouse signaling pathways targeted by microRNA clusters." *RNA* **14**(7): 1276-1283.
- Xu, S., Witmer, P. D., et al. (2007). "MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster." *J Biol Chem* **282**(34): 25053-25066.
- Yamakuchi, M., Lotterman, C. D., et al. (2010). "P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(14): 6334-6339.

- Yan, L. X., Huang, X. F., et al. (2008). "MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis." RNA **14**(11): 2348-2360.
- Yang, G. H., Wang, F., et al. (2009a). "MicroRNAs are involved in erythroid differentiation control." J Cell Biochem **107**(3): 548-556.
- Yang, Y. H., Dudoit, S., et al. (2002). "Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation." Nucleic Acids Res **30**(4): e15.
- Yang, Z., Chen, S., et al. (2009b). "MicroRNA-214 is aberrantly expressed in cervical cancers and inhibits the growth of HeLa cells." IUBMB Life **61**(11): 1075-1082.
- Yeh, W. C., Bierer, B. E., et al. (1995). "Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11086-11090.
- Yin, G., Chen, R., et al. (2010). "TWISTing stemness, inflammation and proliferation of epithelial ovarian cancer cells through MIR199A2/214." Oncogene **29**(24): 3545-3553.
- Yuan, R., Kay, A., et al. (2009). "Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy." J Hematol Oncol **2**: 45.
- Zhang, C., Han, L., et al. (2010). "Global changes of mRNA expression reveals an increased activity of the interferon-induced signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway by repression of miR-221/222 in glioblastoma U251 cells." Int J Oncol **36**(6): 1503-1512.
- Zhang, C., Kang, C., et al. (2009a). "Co-suppression of miR-221/222 cluster suppresses human glioma cell growth by targeting p27kip1 in vitro and in vivo." Int J Oncol **34**(6): 1653-1660.
- Zhang, C., Yoon, M. S., et al. (2009b). "Amino acid-sensing mTOR signaling is involved in modulation of lipolysis by chronic insulin treatment in adipocytes." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(4): E862-868.

7 Anhang

Tabelle 7-1: differentielle miRNA-Expression während der Adipozytendifferenzierung – Microarray (grafische Abbildung der Daten siehe Abb. 3-4)

miRNA	log₂FC (8/0)	mittlere Expressionshöhe	korrigierter p-Wert
mmu-miR-378	3,047306	9,07	4,85E-07
mmu-miR-193	3,026436	9,87	6,18E-11
mmu-miR-107	2,869567	9,75	1,49E-06
mmu-miR-103	2,839532	9,03	1,49E-06
mmu-miR-210	2,638945	8,16	6,27E-04
mmu-miR-146b	2,394904	10,52	1,49E-06
mmu-miR-365	2,352164	8,48	8,19E-03
mmu-miR-96	1,75156	8,92	3,86E-05
mmu-miR-146a	1,478391	7,75	2,96E-02
mmu-miR-183	1,457804	8,08	7,29E-03
mmu-let-7b	1,288496	11,17	8,81E-05
mmu-miR-182	1,208936	8,55	1,28E-02
mmu-miR-143	1,116817	11,99	1,16E-04
mmu-miR-22	1,100592	13,16	6,27E-04
mmu-miR-30a	1,065823	11,19	1,75E-04
mmu-miR-148b	1,016707	7,27	3,92E-02
mmu-let-7c	0,888483	11,92	8,17E-04
mmu-miR-30c	0,852021	11,18	1,17E-03
mmu-miR-30e	0,831969	10,43	2,28E-03
mmu-miR-152	0,824996	9,99	5,69E-03
mmu-miR-10b	0,79727	9,04	5,76E-03
mmu-miR-98	0,79025	8,76	2,73E-02
mmu-miR-15a	0,753016	9,06	4,21E-02
mmu-miR-106b	0,640372	10,37	3,09E-02
mmu-miR-30b	0,608727	10,87	7,59E-03
mmu-miR-689	0,573141	11,07	2,65E-02
mmu-miR-212	0,534858	11,9	3,05E-03
mmu-let-7d	0,495361	12,57	3,52E-02
mmu-miR-27b	0,345223	11,2	4,42E-02
mmu-miR-691	-0,442465	11,94	3,90E-02
mmu-miR-690	-0,453371	14,48	3,92E-02
mmu-miR-29b	-0,518192	10,66	3,49E-02
mmu-miR-125b-5p	-0,596153	12,99	3,79E-03
mmu-miR-125a-5p	-0,632539	10,54	5,74E-03
mmu-miR-503	-0,667838	9,73	1,63E-03
mmu-miR-574-5p	-0,711125	8,62	1,97E-02
mmu-miR-199a-3p/199b	-0,727464	12,92	6,10E-04
mmu-miR-31	-0,767269	10,62	1,29E-03
mmu-miR-199a-5p	-0,769697	12,85	4,95E-04
mmu-miR-678	-0,816221	8,78	3,44E-03
mmu-miR-762	-0,838698	12,27	1,24E-04
mmu-miR-199b*	-0,843476	11,82	6,27E-04
mmu-let-7e	-0,897259	9,05	1,50E-02
mmu-miR-29a	-0,943664	11,68	1,13E-04
mmu-miR-34a	-1,012332	9,93	3,04E-05
mmu-miR-214*	-1,176046	7,01	3,49E-02
mmu-miR-214	-1,243825	11,06	8,81E-05

mmu-miR-34c	-1,464182	9,24	9,50E-05
mmu-miR-34b-5p	-1,575533	8,31	7,33E-04
mmu-miR-221	-1,618867	8,52	3,05E-03
mmu-miR-222	-1,68481	9,86	1,49E-06
mmu-miR-330*	-2,00436	6,55	3,43E-02

MiRNA Microarray-Analyse von 3T3-L1 Zellen am Tag der Differenzierungsinduktion und 8 Tage danach.

\log_2 FC (8/0) gibt die Veränderung der miRNA-Expression von „Tag 0“ gegenüber „Tag 8“ aus 2 biologischen Replikaten an. Der korrigierte p-Wert zeigt die Signifikanz der Veränderung, dabei steht E-x für 10^{-x} . Dargestellt sind nur miRNAs mit einem korrigierten p-Wert $\leq 0,05$.

Tabelle 7-2: differentielle miRNA-Expression während der Adipozytendifferenzierung – LDA
(grafische Abbildung der Daten siehe Abb. 3-5)

miRNA	\log_2 RQ (8/0)		
mmu-miR-295	10,7297142	mmu-miR-15a*	2,283921772
mmu-miR-294	7,527477006	mmu-miR-335-5p	2,283921772
mmu-miR-708	6,955359305	mmu-miR-184	2,247927513
mmu-miR-203	6,894454013	mmu-miR-183*	2,201633861
mmu-miR-205	6,485909792	mmu-let-7a*	2,185866545
mmu-miR-193	5,989139007	mmu-miR-101a	2,15704371
mmu-miR-337-3p	5,63197732	mmu-miR-30e*	2,063502942
mmu-miR-337-5p	5,390942773	mmu-miR-345-3p	2,014355293
mmu-miR-741	5,378511623	mmu-miR-7b	1,989139007
mmu-miR-148a*	5,177917792	mmu-let-7g*	1,98550043
mmu-miR-465b-5p	5,036942845	mmu-miR-425	1,906890596
mmu-miR-215	4,938285792	mmu-miR-877*	1,803227036
mmu-miR-210	4,636334602	mmu-miR-702	1,778208576
mmu-miR-326	4,237257771	mmu-miR-30c	1,757023247
mmu-miR-378	3,982765463	mmu-miR-19a*	1,735522177
mmu-miR-434-3p	3,851998837	mmu-miR-30b	1,700439718
mmu-miR-465a-3p	3,743084056	mmu-miR-7a	1,682573297
mmu-miR-32	3,701549057	mmu-miR-143	1,655351829
mmu-miR-378*	3,576522138	mmu-miR-216b	1,646162657
mmu-miR-103	3,557042415	mmu-miR-125b*	1,618238656
mmu-miR-127	3,372952098	mmu-miR-877	1,550900665
mmu-miR-365	3,282439805	mmu-miR-298	1,545968369
mmu-miR-148a	3,252476214	mmu-miR-509-3p	1,5360529
mmu-miR-146b	3,231125158	mmu-miR-328	1,526068812
mmu-miR-139-5p	3,056583528	mmu-miR-30e	1,521050737
mmu-miR-182	2,989139007	mmu-miR-582-5p	1,516015147
mmu-miR-192	2,989139007	mmu-miR-29c*	1,495695163
mmu-miR-193b	2,885574364	mmu-miR-376a	1,495695163
mmu-miR-96	2,709290636	mmu-miR-106b	1,485426827
mmu-miR-107	2,684818738	mmu-let-7c	1,480265122
mmu-miR-146b*	2,516015147	mmu-miR-200c	1,475084883
mmu-miR-183	2,495695163	mmu-miR-22*	1,475084883
mmu-miR-339-3p	2,451540833	mmu-miR-335-3p	1,475084883
mmu-miR-194	2,448900951	mmu-miR-128a	1,459431619
mmu-miR-30a*	2,411426246	mmu-miR-10b	1,448900951
mmu-miR-193*	2,386810946	mmu-miR-99a	1,448900951
mmu-miR-136	2,321928095	mmu-miR-362-3p	1,443606651
mmu-miR-101b	2,313245852	mmu-miR-467d	1,438292852
mmu-miR-148b	2,289834465	mmu-miR-126-5p	1,432959407
		mmu-let-7f	1,411426246

mmu-miR-484	1,3950628	mmu-miR-7a*	0,790772038
mmu-miR-685	1,367371066	mmu-miR-582-3p	0,782408565
mmu-let-7i*	1,361768359	mmu-miR-671-3p	0,782408565
mmu-miR-340-5p	1,361768359	mmu-miR-320	0,773996325
mmu-miR-188-5p	1,310340121	mmu-miR-450a-5p	0,773996325
mmu-miR-425*	1,292781749	mmu-miR-106a	0,748461233
mmu-miR-132	1,280956314	mmu-miR-350	0,748461233
mmu-miR-598	1,280956314	mmu-miR-542-3p	0,748461233
mmu-miR-186	1,257010618	mmu-miR-20a	0,739848103
mmu-miR-93	1,257010618	mmu-miR-30b*	0,739848103
mmu-miR-138	1,244887059	mmu-miR-684	0,739848103
mmu-miR-704	1,22650853	mmu-miR-9*	0,731183242
mmu-miR-152	1,214124805	mmu-miR-145	0,713695815
mmu-miR-27a	1,207892852	mmu-miR-376c	0,704871964
mmu-miR-224	1,201633861	mmu-miR-455	0,687060688
mmu-miR-9	1,182692298	mmu-miR-195	0,678071905
mmu-let-7d*	1,163498732	mmu-miR-451	0,678071905
mmu-miR-495	1,14404637	mmu-miR-804	0,678071905
mmu-miR-500	1,137503524	mmu-miR-191*	0,669026766
mmu-miR-24-2*	1,097610797	mmu-miR-339-5p	0,641546029
mmu-miR-15a	1,09085343	mmu-miR-19a	0,632268215
mmu-miR-491	1,09085343	mmu-miR-592	0,622930351
mmu-miR-30a	1,056583528	mmu-miR-92a	0,622930351
mmu-miR-16*	1,049630768	mmu-miR-16	0,613531653
mmu-miR-501-5p	1,049630768	mmu-miR-15b	0,604071324
mmu-let-7d	1,021479727	mmu-miR-19b	0,604071324
mmu-miR-190b	1,007195501	mmu-miR-331-3p	0,604071324
mmu-miR-191	1,007195501	mmu-miR-467e	0,59454855
mmu-miR-497	1,007195501	mmu-miR-10b*	0,584962501
mmu-miR-669a	1,007195501	mmu-miR-301a	0,584962501
mmu-miR-26b	1	mmu-miR-296-5p	0,565597176
mmu-miR-449c	1	mmu-miR-676*	0,565597176
mmu-miR-324-5p	0,992768431	mmu-miR-151-3p	0,526068812
mmu-miR-805	0,992768431	mmu-miR-21	0,526068812
mmu-let-7g	0,98550043	mmu-miR-467b	0,526068812
mmu-miR-190	0,97819563	mmu-miR-196b	0,516015147
mmu-miR-340-3p	0,956056652	mmu-miR-33*	0,516015147
mmu-miR-28	0,918386234	mmu-miR-197	0,50589093
mmu-miR-17	0,895302621	mmu-miR-322	0,495695163
mmu-miR-455*	0,887525271	mmu-miR-106b*	0,475084883
mmu-miR-185	0,879705766	mmu-miR-667	0,475084883
mmu-miR-423-5p	0,879705766	mmu-miR-186*	0,464668267
mmu-miR-22	0,871843649	mmu-miR-501-3p	0,464668267
mmu-miR-27b	0,871843649	mmu-miR-532-5p	0,464668267
mmu-miR-700	0,871843649	mmu-miR-24	0,454175893
mmu-miR-467a	0,86393845	mmu-miR-301b	0,454175893
mmu-miR-296-3p	0,855989697	mmu-miR-744*	0,454175893
mmu-miR-100	0,831877241	mmu-miR-218-2*	0,443606651
mmu-miR-126-3p	0,807354922	mmu-miR-20b	0,432959407
mmu-miR-18a	0,807354922	mmu-miR-130a	0,422233001
mmu-let-7a	0,790772038	mmu-miR-99b*	0,422233001
mmu-let-7e	0,790772038	mmu-miR-542-5p	0,411426246
mmu-let-7i	0,790772038	mmu-miR-20a*	0,389566812
mmu-miR-345-5p	0,790772038	mmu-miR-218	0,378511623
mmu-miR-410	0,790772038	mmu-miR-25	0,367371066

mmu-miR-744	0,367371066	mmu-miR-29a	-0,321928095
mmu-miR-381	0,35614381	mmu-miR-125a-3p	-0,358453971
mmu-miR-676	0,344828497	mmu-miR-31	-0,358453971
mmu-miR-677	0,344828497	mmu-miR-199b*	-0,395928676
mmu-miR-23b	0,333423734	mmu-miR-720	-0,395928676
mmu-miR-28*	0,321928095	mmu-miR-409-3p	-0,415037499
mmu-miR-93*	0,321928095	mmu-miR-547	-0,415037499
mmu-miR-15b*	0,310340121	mmu-miR-125b-5p	-0,434402824
mmu-miR-361	0,275007047	mmu-miR-18a*	-0,434402824
mmu-miR-376b*	0,275007047	mmu-miR-34a	-0,473931188
mmu-miR-411	0,275007047	mmu-miR-379	-0,473931188
mmu-miR-150	0,263034406	mmu-miR-149	-0,514573173
mmu-miR-26a	0,23878686	mmu-miR-222	-0,514573173
mmu-miR-29b	0,23878686	mmu-miR-872*	-0,514573173
mmu-miR-324-3p	0,23878686	mmu-miR-199a-3p	-0,59946207
mmu-miR-331-5p	0,22650853	mmu-miR-503*	-0,59946207
mmu-miR-467b*	0,22650853	mmu-miR-141	-0,621488377
mmu-miR-652	0,201633861	mmu-miR-155	-0,621488377
mmu-miR-322*	0,176322773	mmu-miR-485*	-0,621488377
mmu-miR-467c	0,176322773	mmu-miR-125a-5p	-0,64385619
mmu-miR-544	0,176322773	mmu-miR-214*	-0,666576266
mmu-miR-297a*	0,163498732	mmu-miR-678	-0,666576266
mmu-miR-30d	0,163498732	mmu-miR-129-3p	-0,689659879
mmu-miR-532-3p	0,163498732	mmu-miR-27b*	-0,689659879
mmu-miR-141*	0,150559677	mmu-miR-674	-0,689659879
mmu-miR-383	0,150559677	mmu-miR-467a*	-0,713118852
mmu-miR-494	0,097610797	mmu-miR-449a	-0,736965594
mmu-let-7c-1*	0,084064265	mmu-miR-29a*	-0,810966176
mmu-miR-201	0,084064265	mmu-miR-218-1*	-0,862496476
mmu-miR-26b*	0,084064265	mmu-miR-34c	-0,862496476
mmu-miR-99b	0,070389328	mmu-miR-701	-0,888968688
mmu-miR-140	0,028569152	mmu-miR-27a*	-0,943416472
mmu-miR-10a	0,014355293	mmu-miR-351	-0,943416472
mmu-miR-342-3p	0,014355293	mmu-miR-369-5p	-0,943416472
mmu-miR-709	0,014355293	mmu-miR-181a-1*	-1,029146346
mmu-miR-574-3p	0	mmu-miR-214	-1,029146346
mmu-miR-674*	0	mmu-miR-221	-1,029146346
mmu-miR-130b	-0,01449957	mmu-miR-699	-1,029146346
mmu-miR-760	-0,01449957	mmu-miR-34b-3p	-1,120294234
mmu-miR-29c	-0,058893689	mmu-miR-130b*	-1,217591435
mmu-miR-466d-3p	-0,058893689	mmu-miR-125b-3p	-1,251538767
mmu-miR-382	-0,074000581	mmu-miR-29b*	-1,395928676
mmu-miR-872	-0,089267338	mmu-miR-680	-1,395928676
mmu-miR-181a	-0,120294234	mmu-miR-199a-5p	-1,434402824
mmu-miR-135a*	-0,152003093	mmu-miR-223	-1,59946207
mmu-miR-764-5p	-0,184424571	mmu-miR-34c*	-1,64385619
mmu-miR-17*	-0,217591435	mmu-miR-384-5p	-1,64385619
mmu-miR-31*	-0,217591435	mmu-miR-875-5p	-1,64385619
mmu-miR-374	-0,234465254	mmu-miR-146a	-1,943416472
mmu-miR-721	-0,234465254	mmu-miR-325*	-2,058893689
mmu-miR-503	-0,268816758	mmu-miR-384-3p	-2,058893689
mmu-miR-181c	-0,286304185	mmu-miR-21*	-2,395928676
mmu-miR-380-5p	-0,286304185	mmu-miR-801	-2,395928676
mmu-miR-690	-0,286304185	mmu-miR-135a	-2,64385619
mmu-miR-706	-0,286304185	mmu-miR-138*	-2,64385619

mmu-miR-135b	-2,836501268
mmu-miR-206	-3,836501268

LDA-Analyse von 3T3-L1 Zellen am Tag der Differenzierungsinduktion und 8 Tage danach. Log₂ RQ (8/0) gibt die Veränderung der miRNA-Expression von „Tag 0“ gegenüber „Tag 8“ an. Die miRNA-Expression ist bezogen auf sno-202.

Tabelle 7-3: Auswirkung von Rapamycin auf die miRNA-Expression während der Adipozyten-differenzierung - Microarray

miRNA	log ₂ FC (8R/8)	mittlere Expressionshöhe	korrigierter p-Wert
mmu-miR-182	-3,061877	8,55	3,98E-04
mmu-miR-96	-2,898723	8,92	2,16E-05
mmu-miR-183	-2,704053	8,08	1,92E-03
mmu-miR-378	-2,116983	9,07	8,93E-04
mmu-miR-107	-2,096766	9,75	1,92E-03
mmu-miR-193	-2,085231	9,87	2,57E-06
mmu-miR-103	-1,663839	9,03	9,37E-03
mmu-miR-212	-0,983795	11,9	7,65E-04
mmu-miR-668	-0,858107	14,47	3,52E-02
mmu-miR-143	-0,829751	11,99	3,43E-02
mmu-miR-30a	-0,817175	11,19	3,52E-02
mmu-miR-494	-0,75904	13,34	3,61E-02
mmu-miR-340-5p	-0,724215	10,4	1,62E-02
mmu-miR-29a	0,649302	11,68	4,43E-02
mmu-miR-503	1,014469	9,73	1,74E-03
mmu-miR-125b-5p	1,028984	12,99	1,53E-03
mmu-miR-199a-3p/199b	1,058639	12,92	8,90E-04
mmu-miR-214	1,064303	11,06	1,00E-02
mmu-miR-199a-5p	1,076236	12,85	8,93E-04
mmu-miR-322	1,112222	10,28	1,02E-02
mmu-miR-199b*	1,112399	11,82	1,92E-03
mmu-miR-450a-5p	1,148986	8,43	4,12E-02
mmu-let-7e	1,316958	9,05	2,37E-02
mmu-miR-762	1,585085	12,27	2,16E-05
mmu-miR-222	1,612292	9,86	2,34E-04
mmu-miR-214*	1,917614	7,01	3,52E-02
mmu-miR-330*	3,07078	6,55	4,12E-02

MiRNA Microarray-Analyse von 3T3-L1 Zellen am „Tag 8“ mit und ohne Behandlung mit 10nM Rapamycin. Log₂ FC (8R/8) gibt die Veränderung der miRNA-Expression von „Tag 8“ gegenüber „Tag 8 + 10nM Rapamycin“ aus 2 biologischen Replikaten an. Der korrigierte p-Wert zeigt die Signifikanz der Veränderung, dabei steht E-x für 10^{-x}. Dargestellt sind nur miRNAs mit einem korrigierten p-Wert ≤ 0,05. MiRNAs, die zugleich während der Differenzierung signifikant differentiell reguliert waren, sind grau hinterlegt.

Tabelle 7-4: Auswirkung von Rapamycin auf die miRNA-Expression während der Adipozyten-differenzierung – LDA (grafische Abbildung der Daten siehe Abb. 3-11)

miRNA	log ₂ RQ (8R/8)	miRNA	log ₂ RQ (8R/8)
mmu-miR-295	-7,863795387	mmu-miR-708	-5,698348687
mmu-miR-203	-6,15460591	mmu-miR-182	-5,632995197
mmu-miR-465b-5p	-6,036942845	mmu-miR-741	-5,349942471
mmu-miR-465a-3p	-5,863378289	mmu-miR-337-5p	-5,293331976
		mmu-miR-294	-4,986457853

mmu-miR-205	-4,767822208	mmu-miR-19a	-1,276124405
mmu-miR-183*	-4,597562538	mmu-miR-484	-1,244503123
mmu-miR-127	-4,431845787	mmu-miR-704	-1,2410081
mmu-miR-210	-4,397547743	mmu-miR-150	-1,234465254
mmu-miR-96	-4,353146825	mmu-miR-423-5p	-1,219781208
mmu-miR-193	-4,320112242	mmu-miR-218-2*	-1,204819792
mmu-miR-183	-4,185355042	mmu-miR-186*	-1,201633861
mmu-miR-136	-3,878321443	mmu-miR-20a	-1,193879734
mmu-miR-148a*	-3,651848981	mmu-miR-93	-1,172946353
mmu-miR-378	-3,24291736	mmu-miR-7a*	-1,167841687
mmu-miR-378*	-3,175984208	mmu-miR-501-3p	-1,154328146
mmu-miR-32	-3,107000507	mmu-miR-128a/128b	-1,137503524
mmu-miR-434-3p	-3,020121596	mmu-miR-224	-1,131244533
mmu-miR-103	-2,934112064	mmu-miR-331-5p	-1,115477217
mmu-miR-7a	-2,834576391	mmu-miR-132	-1,104633541
mmu-miR-148a	-2,808869563	mmu-miR-152	-1,103093493
mmu-miR-7b	-2,775014202	mmu-miR-17	-1,096215315
mmu-miR-107	-2,758819319	mmu-miR-143	-1,089754653
mmu-miR-365	-2,491667767	mmu-miR-22*	-1,085518071
mmu-miR-326	-2,357552005	mmu-miR-805	-1,066769012
mmu-miR-193b	-2,253306149	mmu-miR-25	-1,057030945
mmu-miR-193*	-2,148024087	mmu-miR-340-3p	-1,045323991
mmu-miR-215	-2,147513754	mmu-miR-324-5p	-1,007268
mmu-miR-877*	-2,125155131	mmu-miR-495	-1,006542846
mmu-miR-30a*	-2,11276793	mmu-miR-339-3p	-0,99736494
mmu-miR-18a	-2,058893689	mmu-miR-509-3p	-0,990084531
mmu-miR-148b	-2,014827418	mmu-miR-106b*	-0,989658056
mmu-miR-425	-1,996157934	mmu-miR-20b	-0,96829114
mmu-miR-101a	-1,942918905	mmu-miR-106a	-0,966052668
mmu-miR-216b	-1,932466842	mmu-miR-497	-0,950611973
mmu-miR-101b	-1,859069959	mmu-miR-335-3p	-0,949016071
mmu-let-7a*	-1,852442812	mmu-miR-184	-0,925999419
mmu-miR-192	-1,819214006	mmu-miR-19b	-0,925999419
mmu-miR-30e*	-1,730079209	mmu-miR-350	-0,916583992
mmu-miR-15a*	-1,728105617	mmu-miR-467c	-0,913288367
mmu-miR-139-5p	-1,711755031	mmu-miR-598	-0,902444691
mmu-miR-200c	-1,709550137	mmu-miR-467d	-0,892324482
mmu-let-7d*	-1,678071905	mmu-miR-685	-0,892286183
mmu-miR-877	-1,671194898	mmu-miR-467a*	-0,886343218
mmu-miR-30b	-1,616375453	mmu-let-7f	-0,885357434
mmu-miR-362-3p	-1,563900885	mmu-miR-425*	-0,881355504
mmu-miR-298	-1,560467939	mmu-miR-467b*	-0,87036472
mmu-miR-328	-1,555215157	mmu-miR-296-5p	-0,869603363
mmu-miR-345-3p	-1,549687026	mmu-let-7i*	-0,85587743
mmu-miR-702	-1,503201529	mmu-miR-721	-0,854802084
mmu-miR-30c	-1,493988841	mmu-miR-18a*	-0,851901361
mmu-miR-194	-1,485426827	mmu-miR-29c*	-0,844930604
mmu-miR-126-5p	-1,447458977	mmu-miR-381	-0,830074999
mmu-miR-410	-1,434628228	mmu-miR-126-3p	-0,821854492
mmu-miR-9	-1,434231065	mmu-miR-345-5p	-0,819918384
mmu-miR-92a	-1,433896527	mmu-miR-138	-0,801280408
mmu-miR-106b	-1,401362562	mmu-miR-15b	-0,788495895
mmu-miR-340-5p	-1,361768359	mmu-miR-186	-0,781925735
mmu-miR-16*	-1,353636955	mmu-miR-678	-0,767826558
mmu-miR-29b	-1,328054198		

mmu-miR-301a	-0,75308526	mmu-miR-10a	-0,372809264
mmu-miR-30e	-0,747054412	mmu-miR-24-2*	-0,357762694
mmu-miR-20a*	-0,729642253	mmu-miR-582-5p	-0,352516415
mmu-miR-28	-0,72935241	mmu-let-7e	-0,347165386
mmu-miR-667	-0,72662365	mmu-miR-335-5p	-0,34657738
mmu-miR-31*	-0,725825037	mmu-miR-671-3p	-0,338801913
mmu-miR-15a	-0,723482365	mmu-miR-491	-0,333830184
mmu-miR-22	-0,721283972	mmu-miR-125b*	-0,31958034
mmu-miR-190	-0,691314482	mmu-miR-709	-0,31836148
mmu-miR-141*	-0,68589141	mmu-miR-339-5p	-0,308122295
mmu-miR-27b	-0,682809824	mmu-miR-146b*	-0,305002954
mmu-miR-331-3p	-0,662965013	mmu-let-7g	-0,298439742
mmu-miR-382	-0,662965013	mmu-let-7a	-0,295076875
mmu-miR-191	-0,662367004	mmu-miR-690	-0,291462814
mmu-miR-9*	-0,633572445	mmu-miR-130b	-0,289506617
mmu-miR-146b	-0,631807364	mmu-miR-677	-0,260764232
mmu-miR-467a	-0,612976877	mmu-miR-17*	-0,256339753
mmu-miR-376a	-0,608169892	mmu-miR-30b*	-0,254421276
mmu-miR-376c	-0,607261168	mmu-miR-532-3p	-0,25276607
mmu-miR-700	-0,596836601	mmu-miR-151-3p	-0,251061764
mmu-miR-15b*	-0,596644306	mmu-miR-342-3p	-0,248820547
mmu-miR-500	-0,581687369	mmu-miR-455	-0,232884795
mmu-miR-185	-0,569365646	mmu-miR-744*	-0,215389034
mmu-miR-130b*	-0,56828376	mmu-miR-376b*	-0,20461772
mmu-miR-409-3p	-0,556393349	mmu-miR-374	-0,199937571
mmu-let-7g*	-0,547207579	mmu-miR-31	-0,197939378
mmu-miR-10b	-0,545862681	mmu-miR-699	-0,188445089
mmu-miR-33*	-0,545161493	mmu-miR-195	-0,182376742
mmu-miR-301b	-0,543443231	mmu-miR-720	-0,160464672
mmu-miR-532-5p	-0,538668848	mmu-miR-26b	-0,160040413
mmu-miR-676*	-0,537028024	mmu-miR-296-3p	-0,159995884
mmu-miR-764-5p	-0,528694281	mmu-miR-196b	-0,148644081
mmu-let-7d	-0,525784565	mmu-miR-34a	-0,147557188
mmu-miR-467e	-0,524159222	mmu-miR-99a	-0,144389909
mmu-miR-320	-0,523034752	mmu-miR-494	-0,112110366
mmu-miR-191*	-0,505528033	mmu-miR-361	-0,098684275
mmu-miR-744	-0,503432615	mmu-miR-100	-0,074853995
mmu-miR-188-5p	-0,502985199	mmu-miR-28*	-0,070966521
mmu-miR-27a	-0,494197037	mmu-miR-30d	-0,065887936
mmu-let-7c	-0,487496691	mmu-miR-411	-0,060882242
mmu-miR-130a	-0,48112669	mmu-let-7i	-0,059588796
mmu-miR-99b*	-0,48112669	mmu-miR-23b	-0,058416686
mmu-miR-141	-0,467778961	mmu-miR-669a	-0,036341847
mmu-miR-676	-0,465122731	mmu-miR-674*	-0,029146346
mmu-miR-30a	-0,452512205	mmu-miR-455*	-0,02358682
mmu-miR-93*	-0,442222329	mmu-miR-542-3p	-0,017277991
mmu-miR-760	-0,439532061	mmu-miR-135a*	-0,016119665
mmu-miR-16	-0,424497829	mmu-miR-129-3p	0
mmu-miR-297a*	-0,415037499	mmu-miR-27b*	0
mmu-miR-190b	-0,412646952	mmu-miR-125a-5p	0
mmu-miR-99b	-0,410464769	mmu-miR-383	0,025763096
mmu-miR-145	-0,39176772	mmu-miR-450a-5p	0,065963262
mmu-miR-324-3p	-0,390789953	mmu-miR-467b	0,078002512
mmu-miR-10b*	-0,38332864	mmu-miR-582-3p	0,097297201
mmu-miR-706	-0,380272081	mmu-miR-181c	0,118181426

mmu-miR-21	0,124695747	mmu-miR-199b*	0,572251449
mmu-miR-592	0,159478214	mmu-miR-451	0,578938713
mmu-miR-501-5p	0,176877762	mmu-miR-149	0,625604485
mmu-miR-804	0,185866545	mmu-miR-125b-5p	0,648527629
mmu-miR-872	0,186878135	mmu-miR-547	0,653824359
mmu-miR-574-3p	0,201633861	mmu-miR-503	0,65838357
mmu-miR-449c	0,201633861	mmu-miR-542-5p	0,672638019
mmu-miR-24	0,214850872	mmu-miR-34b	0,705256734
mmu-miR-34c	0,218640286	mmu-miR-199a-3p	0,750021747
mmu-miR-380-5p	0,242360838	mmu-miR-199a-5p	0,767826558
mmu-miR-29c	0,247927513	mmu-miR-322*	0,77973388
mmu-miR-26b*	0,249359469	mmu-miR-125b-3p	0,836501268
mmu-miR-652	0,263034406	mmu-miR-222	0,968749066
mmu-miR-485*	0,281412935	mmu-miR-221	1,014646776
mmu-miR-181a	0,296617006	mmu-miR-351	1,054447784
mmu-miR-872*	0,296981738	mmu-miR-214	1,071790683
mmu-miR-449a	0,30256277	mmu-miR-21*	1,144389909
mmu-miR-140	0,304854582	mmu-miR-875-5p	1,14974712
mmu-miR-26a	0,30718151	mmu-miR-34c*	1,169925001
mmu-miR-29a	0,307428525	mmu-miR-503*	1,286522759
mmu-miR-325*	0,36923381	mmu-miR-181a-1*	1,292180751
mmu-miR-684	0,404198267	mmu-miR-155	1,299560282
mmu-miR-701	0,415037499	mmu-miR-384-5p	1,303780748
mmu-miR-674	0,420843121	mmu-miR-369-5p	1,354842717
mmu-miR-379	0,444784843	mmu-miR-135b	1,362570079
mmu-miR-29a*	0,470890734	mmu-miR-680	1,466318004
mmu-miR-218	0,501194143	mmu-miR-218-1*	1,4665678
mmu-miR-29b*	0,506959989	mmu-miR-384-3p	1,718818247
mmu-let-7c-1*	0,510484285	mmu-miR-801	1,752072487
mmu-miR-27a*	0,528378972	mmu-miR-146a	2,106915204
mmu-miR-322	0,546949175	mmu-miR-223	2,231730286
mmu-miR-125a-3p	0,547487795	mmu-miR-206	2,237039197
mmu-miR-214*	0,561878888	mmu-miR-138*	2,918863237

LDA-Analyse von 3T3-L1 Zellen am „Tag 8“ mit und ohne Behandlung mit 10nM Rapamycin. Log₂ RQ (8R/8) gibt die Veränderung der miRNA-Expression von „Tag 8“ gegenüber „Tag 8 + 10nM Rapamycin“ an. Die miRNA-Expression ist bezogen auf sno-202.

8 Abkürzungsverzeichnis

4E-BP	4E-binding protein
AAS	Antibiotic/Antimycotic Solution
AKT = PKB	Proteinkinase B
AMPK	Adenosinmonophosphat- aktivierte Proteinkinase
ASO	antisense Oligonukleotid
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
BRAF	Braf transforming gene
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding protein
CAB39	calcium binding protein 39
CDK6	cyclin-dependent kinase 6
CDKN1B = p27	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
cDNA	copyDNA
C _T	threshold cycle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B
EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
EIF4E2	eukaryotic translation initiation factor 4E family member 2
EIF4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
FBS	Fetal bovine serum
FC	Fold Change
FOXO1	forkhead box O1
fwd	forward
Grb2	growth factor receptor bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
HBA _{1c}	Hämoglobin A1c
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIF1 α	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IGF1	insulin-like growth factor 1
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
kB	Kilobase
KLF	Krüppel-like factor
LDA	low density array
MAPK	mitogen-activated protein kinase
miRISC	miRNA-induced silencing complex
miRNA	micro Ribonukleinsäure
miRNA*	Minor miRNA Sequenz
mmu	Mus musculus (Maus)
mRNA	messenger RNA
mTOR	mechanistic target of rapamycin
NCS	Newborn Calf Serum
PANK	Pantothentatkinase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK1 = PDPK1	phosphoinositide-dependent kinase 1
PGF	placental growth factor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PIK3CB	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide
PIK3CD	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
PIK3R2	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (beta)
PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKB = AKT	Proteinkinase B
PPAR-γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
Pref-1 = Dlk1	preadipocyte factor 1 = delta-like 1 homolog (Drosophila)
PRKAA2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit
PTEN	phosphatase and tensin homolog
Raptor	regulatory associated protein of mTOR
Rasa1	RAS p21 protein activator 1
REDD1 = DDIT4	regulated in development and DNA damage responses 1 = DNA-damage-inducible transcript 4
rev	reverse
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPS6	ribosomales Protein S6
RPS6KA1	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1
RPS6KA6	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 6
RPS6KB1	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1
RQ	Relative Quantity
RT-PCR	Real-Time-quantitative-PCR
S6K	40S ribosomal protein S6 kinase
snoRNA	small-nucleolar RNA
Sufu	suppressor of fused homolog (Drosophila)
TSC	tuberous sclerosis complex
ULK	unc-51-like kinase (C. elegans)
UTR	untranslated region
VEGF	vascular endothelial growth factor

9 Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Adelbert Roscher, für die Vergabe dieses interessanten Dissertationsthemas und seine engagierte Betreuung. Er stand für Fragen und Diskussionen stets zur Verfügung und vermittelte mir eine wissenschaftliche Sichtweise.

Besonders möchte ich mich auch bei meiner Betreuerin, Frau Dr. Julia von Frowein, für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten sowie für die kompetente und hilfsbereite Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken.

Herrn Dr. Philipp Pagel danke ich sehr für die bioinformatische Auswertung der Daten und die verständliche Erläuterung derer.

Bei Frau PD Dr. Susanne Krauss-Etschmann möchte ich mich für die Arbeitsmöglichkeit und die zur Verfügung gestellten technischen Mittel bedanken, bei Herrn Dr. Marc Slawik für die zur Verfügung gestellte Zelllinie.

Frau Kristin Hähnel und Frau Petra Eckel danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen beim Erlernen und der Durchführung der labortechnischen Arbeiten.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Hämatologie und Onkologie und des „Comprehensive Pneumology Center“ für ihre freundliche Aufnahme und Unterstützung.

Zuletzt danke ich meinen lieben Eltern, die mich immer gefördert und unterstützt haben, sowie meinem Freund und meinen Freundinnen für ihre verständnisvolle Anteilnahme am Fortgang dieser Arbeit.