

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Stefan Frantz

Modulation der Fettzellfunktion durch die Nicotinamid-N-Methyltransferase

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Nils Arne Kraus
aus Bielefeld

Würzburg, Juli 2019

Referent:	Prof. Dr. med. Christoph Wanner
Koreferent:	Priv.-Doz. Dr. med. Daniel Zeller
Dekan:	Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Mai 2020

Der Promovend ist Arzt

Veröffentlichungen

Aus dieser Dissertation ging folgende Veröffentlichung hervor:

- Kraus, Nils A.; Ehebauer, Franziska; Zapp, Benedikt; Rudolphi, Bianca; Kraus, Bettina J.; Kraus, Daniel (2016). **Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture**. Adipocyte 5:351-358.
DOI: 10.1080/21623945.2016.1240137

Inhalte dieser Dissertation wurden auf folgendem Kongress präsentiert:

- Kraus, Nils A.; Rudolphi, Bianca; Zapp, Benedikt; Wanner, Christoph; Kraus, Daniel (2016). **Valid assessment of lipid content of cultured adipocytes using oil red O**. Diabetes Kongress 2016, Berlin.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	4
2.1 Material	4
2.1.1 Geräte	4
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	6
2.1.3 Chemikalien und Lösungen	7
2.1.4 Analysetests	9
2.2 Methoden	10
2.2.1 Hergestellte Lösungen	10
2.2.1.1 Zusätze zur Zellkultur	10
2.2.1.1.1 Insulin	10
2.2.1.1.2 Isobuthylmethylxanthin	10
2.2.1.1.3 Indomethacin	10
2.2.1.1.4 Dexamethason	10
2.2.1.1.5 Rosiglitazon	10
2.2.1.2 Zellkulturmedien	11
2.2.1.2.1 Zellkulturgrundmedium	11
2.2.1.2.2 Zellkulturdifferenzierungsmedium	11
2.2.1.2.3 Zellkulturinduktionsmedium	11
2.2.1.3 Krebs-Ringer-HEPES-Puffer	12
2.2.1.4 Lysepuffer	12
2.2.2 Zellkultur	13
2.2.2.1 Technisches Vorgehen	13
2.2.2.2 Aussaat und Differenzierung	13
2.2.3 MTT-Test	14
2.2.4 Laktat-Analyse	14
2.2.5 Oil-Red-O	15
2.2.5.1 Optimiertes Oil-Red-O-Protokoll	15
2.2.6 Lipolyse-Analyse	16
2.2.7 ELISA	18
2.2.7.1 Leptin-ELISA	18
2.2.7.2 Adiponektin-ELISA	19
2.2.8 Statistik und Software	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Validierung des experimentellen Ansatzes	20

3.2	Quantifizierung der Adipozytendifferenzierung	22
3.3	Lipolyse	31
3.4	Adipokinsekretion	32
4	Diskussion	34
4.1	Zellvorbehandlung mit 1-MN	34
4.2	Abschätzung der Fettzellendifferenzierung mittels Oil-Red-O	35
4.3	Einfluss der NNMT auf die Adipokine und die Lipolyse	39
5	Zusammenfassung	40
	Literatur	41
	Tabellenverzeichnis	47
	Abbildungsverzeichnis	48
	Danksagung	49
	Lebenslauf	50

Abkürzungsverzeichnis

1-MN	1-Methylnicotinamid
2-Prop	2-Propanol = Isopropanol
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Aqua dest.	Aqua destillata
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FA	Formaldehyd
FBS	fetales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IBMX	Isobutylmethylxanthinin
LR	lineare Regression
MTT	Methylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid
MW	Molekularmasse (<i>molecular mass</i>)
NBCS	Neugeborenenkalbserum (<i>Newborn Calf Serum</i>)
NNMT	Nicotinamid-N-Methyltransferase
NP-40	Tergitol NP-40
NaOH	Natriumhydroxid
ORO	Oil-Red-O
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
Tris-Cl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid

1 Einleitung

Der Anteil übergewichtiger Erwachsener in der Bevölkerung hat sich seit 1980 mehr als verdoppelt [Weltgesundheitsorganisation 2014]. Adipositas ist jedoch nicht nur ein ästhetisches Merkmal, sondern erhöht signifikant das Risiko für verschiedene Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus, Myokardinfarkte, Thrombosen und sogar für maligne Tumore [Wilson et al. 2002] [Patel et al. 2014]. Im Jahr 2013 lebten weltweit circa 2,1 Milliarden übergewichtige oder adipöse Menschen, was einen Anteil von 36,9 % bei Männern und 38 % bei Frauen ausmacht [Ng et al. 2014]. Seit 1980 stieg der Bevölkerungsanteil mit einem BMI von 25 kg/m² und mehr stetig an und diese Entwicklung konnte bisher durch keine Maßnahme vollständig aufgehalten werden [Ng et al. 2014]. Als effektivste Therapie zur dauerhaften Gewichtsreduktion gilt die bariatrische Operation, die allerdings aufgrund der Kosten und Operationsrisiken nicht für die breite Masse der Bevölkerung sinnvoll einsetzbar ist. Umso mehr besteht daher die Notwendigkeit, die Mechanismen der Energiehomöostase zu verstehen und auf dieser Grundlage neue Therapieansätze zur Vermeidung sowie Behandlung von Übergewicht beziehungsweise Adipositas zu entwickeln.

Seit circa dem Jahr 1990 begann ein Umdenken in der Wahrnehmung des Fettgewebes: Es galt nun nicht mehr lediglich als passiver Energiespeicher, sondern als aktives Organ mit den Funktionen Lipolyse, Lipogenese, Hormonproduktion, Regulation der Insulinsensitivität und der Thermogenese [Rosen et al. 2014]. Die Einstufung als endokrines Organ mit zentraler Bedeutung in der Energiehomöostase erfolgte durch die Identifizierung vieler vom Fettgewebe sezernierter Hormone – in der Gesamtheit Adipokine genannt – und im Besonderen durch die

Entdeckung des Leptins 1994 [Zhang et al. 1994] [Rosen et al. 2014]. Patienten mit Adipositas oder Metabolischem Syndrom haben charakteristische Veränderungen ihres Adipokinprofils mit erhöhten Adipokinspiegeln, welche sich nach einer Kalorienrestriktion wieder vermindern [Deng et al. 2010]. Unter den Adipokinen hervorzuheben sind die bedeutenden antagonistisch wirkenden Hormone Leptin und Adiponektin.

Leptin supprimiert im Hypothalamus appetitanregende Gene und wird bei Adipositas vermehrt sezerniert [Galic et al. 2010]. Es korreliert somit linear mit der Fettmasse des Körpers [Kershaw et al. 2004]. Darüber hinaus agiert Leptin auch in der Peripherie unter anderem durch Interaktionen mit dem Immunsystem und einer proangiogenetischen Wirkung [Deng et al. 2010]. In Muskelzellen steigert Leptin die Lipolyse [Galic et al. 2010], wohingegen Insulin der größte physiologische Suppressor der Lipolyse ist [Rosen et al. 2014]. Adipositas kann unter anderem durch einen Wirkverlust des Leptins erklärt werden [Rosen et al. 2014], Leptin gelangt nicht mehr oder nur eingeschränkt über die Blut-Hirn-Schranke zu den Rezeptoren des Hypothalamus und entzieht sich somit seiner Wirksamkeit. In Analogie zu der Insulinresistenz beim Diabetes mellitus Typ 2 wird bei Adipositas daher von einer Leptinresistenz mit deutlich erhöhten Leptinplasmaspiegeln gesprochen [Deng et al. 2010]. Auf der anderen Seite sinkt der Leptinplasma Spiegel nach einer Kalorienrestriktion und einem Gewichtsverlust wieder stark ab [Kershaw et al. 2004].

Im Unterschied zu Leptin wird die Sekretion von Adiponektin bei Adipositas verringert [Arita et al. 1999]. Dabei besteht eine inverse Korrelation zwischen den zirkulierenden Adiponektinspiegeln und dem Adipositasgrad [Deng et al. 2010]. Adiponektin steigert am ganzen Körper die Insulinsensitivität, die Glukoseaufnahme wie auch in der Skelettmuskulatur die Betaoxidation [Z. V. Wang et al. 2016] [Kwon et al. 2013]. In der Leber hemmt es die Glukoneogenese sowie die Lipidakkumulation und schützt als antiinflammatorisches Adipokin in vielen Organen die Zellen vor der Apoptose [Z. V. Wang et al. 2016].

Neben der Sekretion von Adipokinen spielen für die systemische Wirkung des Fettgewebes auch intrazelluläre Mechanismen eine große Rolle. Die Nicotinamid-N-Methyltransferase (NNMT) stellt einen solchen intrazellulären Mechanismus dar. Vor kurzem wurde eine neue Rolle der NNMT in der Energiehomöostase des Fettgewebes beschrieben. Die NNMT ist im Fettgewebe adipöser Mäuse stärker exprimiert als bei schlanken Mäusen und eine fettgewebsspezifische NNMT-Suppression erhöht den Energieumsatz im Fettgewebe mit einer signifikanten Reduktion der relativen Körperfettmasse [D. Kraus et al. 2014]. Dabei konnten, im Vergleich zur Kontrollgruppe, keine Veränderungen der Energiezufuhr sowie der körperlichen Aktivität der Mäuse festgestellt werden [D. Kraus et al. 2014]. NNMT ist eine zytosolische Methyltransferase des Fettgewebes, der Leber und in niedriger Exprimierung auch anderer Organe [Kannt et al. 2015] [Rudolphi et al. 2018]. Lange Zeit wurde NNMT hauptsächlich in der Leber untersucht, wo sie Nicotinamid (Vitamin B3) metabolisiert [Cantoni 1951] [Aksoy et al. 1994]. Außerdem ist sie mit der Homozysteinsekretion von Adipozyten [Riederer et al. 2009], mit der Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen [Williams et al. 2005] und mit verschiedenen Tumoren assoziiert [Xu et al. 2016].

Fragestellung

Mit der vorliegenden Dissertation soll die Frage beantwortet werden, ob und inwiefern NNMT im Rahmen ihrer den Energieumsatz steigernden Wirkung die Fettzellfunktion moduliert. Insbesondere gilt es zu klären, ob eine NNMT-Hemmung zu einer veränderten Lipolyserate der Adipozyten führt. Darüberhinaus soll der Einfluss einer NNMT-Hemmung auf die Adipokinsekretion der Adipozyten untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller
Autoklav	VE-75	Systemec, Linden
CO ₂ -Inkubator	C150	Brand, Tuttlingen
Feinwaage	Electronic Balance Typ ABS120-4	Kern und Sohn, Balingen-Frommern
Fotokamera	DSC-100	Sony, Tokio, Japan
Gefrierschrank	bioline	Gram, Vojens, Dänemark
Kühlschrank	bioline	Gram, Vojens, Dänemark
Multipipette	Multipipette E3	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop	Wilovert 30	Hund, Wetzlar
Pipetten	Research Einkanal 0,1-2,5 µl	Eppendorf, Hamburg

Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller
	Research Einkanal 0,5-10 μ l	Eppendorf, Hamburg
	Research Einkanal 2-20 μ l	Eppendorf, Hamburg
	Research Einkanal 10-100 μ l	Eppendorf, Hamburg
	Research Einkanal 20-200 μ l	Eppendorf, Hamburg
	Research Einkanal 100-1000 μ l	Eppendorf, Hamburg
	Transferpipette-12 200 μ l	Brand, Wertheim
Pipettierhelfer	accu-jet pro	Brand, Wertheim
pH-Meter	pH 537	Wissenschaftlich- Technische Werkstätten, Weilheim
Photometer	ASYS UVM 340	biochrom, Cambridge, England
Rüttlerplatte	REAX3	Heidolph, Schwabach
Sterilarbeitsbank	HS18	Heraeus, Hanau
Trockenschrank	Modell 700	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Heraeus Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller
	Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen
	Micro Centrifuge SD	Roth, Karlsruhe
	Mikro 20	Hettich, Tuttlingen

Tabelle 2.1: Geräte

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Bezeichnung	Hersteller
96-Well-Mikrotiterplatte	Mikrotestplatte-96-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Kombitips	Combitips plus 0,1 ml	Eppendorf, Hamburg
	Combitips plus 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg
	Combitips plus 1 ml	Eppendorf, Hamburg
	Combitips plus 2 ml	Eppendorf, Hamburg
	Combitips plus 5 ml	Eppendorf, Hamburg
	Combitips plus 10 ml	Eppendorf, Hamburg
Kulturschalen	Zellkulturschale 15 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	6-Well Cell Culture - Plate, Polysterene	Corning Incorporated, Kennebunk, USA
	12-Well Cell Culture - Plate, Polysterene	Corning Incorporated, Kennebunk, USA
Latexhandschuhe	micro touch	Ansell, Iselin, USA

Materialien	Bezeichnung	Hersteller
Serologische Pipetten	Pipette 5 ml, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	Pipette 10 ml, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	Pipette 25 ml, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterilfiltereinheit	Nalgene Rapid-Flow	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen	Pipettenspitze 10 μ l	Sarstedt, Nümbrecht
	Pipettenspitze 200 μ l	Sarstedt, Nümbrecht
	Pipettenspitze 1000 μ l	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	SafeSeal Gefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
	SafeSeal Gefäß 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
	cellstar 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	cellstar 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Cell Scraper 16 cm	Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien	Hersteller
1-Methylnicotinamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua bidest.	Fresenius Kabi, Bad Homburg

Chemikalien	Hersteller
fettfreies BSA (Rinderalbumin)	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	gibco, Carlsbad, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
fetales Rinderserum (FBS)	gibco, Carlsbad, USA
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Fungizone	gibco, Carlsbad, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, Steinheim
Indometacin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isoproterenol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methylthiazolyldiphenyltetrazolium- bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim

Chemikalien	Hersteller
Natriumdiphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Neugeborenenkalbserum (NBCS)	gibco, Carlsbad, USA
Oil-Red-O (ORO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphatgepufferte-Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rosiglitazon	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-HCL	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin	gibco, Carlsbad, USA

Tabelle 2.3: Chemikalien

2.1.4 Analysetests

Bezeichnung	Hersteller
<i>Adiponectin (mouse) ELISA Kit</i>	Adipogen, Songdo-dong, Südkorea
<i>Lactate Assay Kit</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Mouse Leptin ELISA Kit</i>	Crystal Chem Inc., Downers Grove, USA
<i>Glycerol Colorimetric Assay Kit</i>	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA

Tabelle 2.4: Analysetests

2.2 Methoden

2.2.1 Hergestellte Lösungen

2.2.1.1 Zusätze zur Zellkultur

2.2.1.1.1 Insulin Wegen der schlechten Löslichkeit in Aqua bidest. wurde das lyophilisierte Insulin in verdünnter Salzsäure rekonstituiert und eine Lösung der Konzentration 1 mmol/l hergestellt. Im Differenzierungsmedium erfolgte die Anwendung im Verhältnis 1:1000 mit einer Zielkonzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$. Die Lagerung erfolgte in Reaktionsgefäßen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.1.1.2 Isobuthylmethylxanthin Isobuthylmethylxanthin (IBMX) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 250 mmol/l gelöst. Zur Verwendung im Induktionsmedium wurde IBMX im Verhältnis 1:500 mit einer Zielkonzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ hinzugegeben. Die Lagerung erfolgte in Reaktionsgefäßen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.1.1.3 Indomethacin Mit DMSO wurde eine 125 mmol/l-Lösung hergestellt und ebenfalls in Reaktionsgefäßen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Im Induktionsmedium erfolgte die Verwendung im Verhältnis von 1:500 zur Zielkonzentration 250 $\mu\text{mol/l}$.

2.2.1.1.4 Dexamethason Mit Ethanol wurde zunächst eine Stammlösung der Konzentration 10 mmol/l hergestellt. Von dieser konnte sodann mittels Wasser verdünnung eine 100 $\mu\text{mol/l}$ -Arbeitslösung hergestellt und beide Lösungen in Reaktionsgefäßen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden. Im Induktionsmedium erfolgte die Anwendung der Arbeitslösung im Verhältnis 1:1000 zur Zielkonzentration 100 nmol/l.

2.2.1.1.5 Rosiglitazon Rosiglitazon wurde in DMSO zu einer 1 mmol/l-Lösung gelöst. Im Induktionsmedium wurde eine Zielkonzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ durch die

Anwendung der Stammlösung im Verhältnis 1:1000 erzielt. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -20 °C.

2.2.1.2 Zellkulturmedien

2.2.1.2.1 Zellkulturgrundmedium Dem Zellkulturmedium (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - DMEM) mit 4,5 g/l Glukose wurden Neugeborenenkalbserum (*newborn calf serum* - NBCS) mit einer Zielkonzentration von 10 % sowie Fungizone in einer Zielkonzentration von 1,5 µmol/l hinzugefügt, steril filtriert (0,45 µm Porengröße) und bei 4 °C gelagert. Vor der Verwendung in der Zellkultur wurde das Medium im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

2.2.1.2.2 Zellkulturdifferenzierungsmedium Als Grundlösung diente ebenfalls DMEM. Diesem wurden fetales Rinderserum (*fetal bovine serum* - FBS) in der Konzentration von 10 % sowie Fungizone in einer Zielkonzentration von 1,5 µmol/l hinzugegeben. Auch das Zellkulturdifferenzierungsmedium wurde steril filtriert (0,45 µm Porengröße) und anschließend im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Vor jeder Verwendung wurde das benötigte Volumen in Reaktionsgefäße überführt und Insulin mit der Zielkonzentration 1 µmol/l hinzugegeben. Im Wasserbad wurde das Zellkulturdifferenzierungsmedium zudem auf 37 °C erwärmt.

2.2.1.2.3 Zellkulturinduktionsmedium Zur Herstellung des Induktionsmediums wurde die benötigte Menge Zellkulturdifferenzierungsmedium hergestellt und diesem anschließend Dexamethason mit der Zielkonzentration 100 nmol/l, Rosiglitazon mit der Zielkonzentration 1 µmol/l, IBMX mit der Zielkonzentration 500 µmol/l und Indomethacin mit der Zielkonzentration 250 µmol/l hinzugefügt. Das Induktionsmedium wurde jeweils unmittelbar vor der Verwendung hergestellt.

2.2.1.3 Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

Die Herstellung der 10-fachen Stammlösung des Krebs-Ringer-2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-Puffers (Krebs-Ringer-HEPES-Puffer) erfolgte durch Zugabe aller Inhaltsstoffe gemäß Tabelle 2.5 und anschließendem Auffüllen mit destilliertem Wasser auf 1000 ml Volumen. Der pH wurde mit HCl und NaOH auf 7,4 eingestellt. Der konzentrierte Puffer wurde zur Verwendung mit Aqua bidest. 1:10 verdünnt.

Chemikalien	MW [g/mol]	Masse [g]	10x-Konzentration [mM]	1x-Konzentration [mM]
HEPES	238,3	48	200	20
Natriumchlorid	58,44	79	1360	136
Kaliumchlorid	74,55	3,5	47	4,7
Magnesiumsulfat	246,48	3,1	12,5	1,25
Calciumchlorid	110,98	1,4	12,5	1,25

Tabelle 2.5: Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

2.2.1.4 Lysepuffer

Der Lysepuffer wurde entsprechend der Tabelle 2.6 in Tris-HCL-Puffer hergestellt, in Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei Bedarf auf Eis aufgetaut. Das Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) wurde jeweils erst unmittelbar vor der Verwendung hinzugefügt. Die Natrium-Orthovanadat-Lösung (Na_3VO_4) wurde unter Zugabe von Aqua bidest. zu einer 100 mM-Lösung hergestellt, der pH auf 9,0 eingestellt, die Lösung bis zur Farblosigkeit erhitzt, anschließend abgekühlt und der pH erneut auf 9,0 eingestellt. Der Vorgang des Erhitzens, Abkühlens und pH-Einstellens wurde so oft wiederholt, bis der pH nach dem Abkühlen konstant bei 9,0 war. Das Volumen wurde mit Aqua bidest. auf das Initialvolumen aufgefüllt und die Natriumvanadatlösung im Lysepuffer verwendet bzw. Reste bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Chemikalien	Lösungs- medium	MW [g/mol]	Konzentration Stammlösung [mM]	Endkonzentration [mM]
Tris-HCl	Aqua bidest.	121,10	1000	20
Ethylendiamin- tetraessigsäure (EDTA)	Aqua bidest.	336,21	500	5
Natriumdiphosphat	Aqua bidest.	265,90	100	10
Natriumfluorid (NaF)	Aqua bidest.	41,99	1000	100
Igepal CA-630		408,50	224,8	24,48
Aprotinin	Aqua bidest.	6511,51	1,54	0,001
Leupeptin	Aqua bidest.	463,01	21,6	0,014
Natriumorthovana- dat	Aqua bidest.	183,91	100	2
Phenylmethylsul- fonylfluorid (PMSF)	Isopropanol	174,19	100	1

Tabelle 2.6: Lysepuffer

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Technisches Vorgehen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilarbeitsbank durchgeführt und alle verwendeten Materialien zuvor desinfiziert. Die Aufbewahrung der Kulturschalen außerhalb der Zellkulturarbeiten fand in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ statt. Das Wachstum, der Konfluenzgrad und die Morphologie der Zellen wurden spätestens bei jedem Mediumwechsel mit Hilfe des Lichtmikroskops in unmittelbarer räumlicher Nähe zum CO₂-Inkubator und der Sterilarbeitsbank begutachtet.

2.2.2.2 Aussaat und Differenzierung

Nach zügigem Auftauen im Wasserbad bei 37 °C wurden kryokonservierte 3T3-L1-Prädipozyten zunächst im Grundmedium kultiviert. Sobald sie zu 80 Prozent konfluent waren, erfolgte zum Zweck der Ausdifferenzierung die Aufteilung (*Splitting*) auf kleinere Kulturschalen. Nach Erreichen vollständiger Konfluenz wurden

weitere 72 bis 96 Stunden abgewartet und anschließend die Differenzierung mittels der Zugabe des Induktionsmediums induziert. Nach weiteren 48 Stunden wurde das Induktionsmedium durch das Differenzierungsmedium ersetzt, zudem wurden anschließend dreimalig pro Woche die Zellen visuell begutachtet und das Differenzierungsmedium gewechselt. Die Verwendung der Zellen für Experimente erfolgte frühestens 10 Tage nach Beginn der Induktion.

2.2.3 MTT-Test

Die Zellviabilität wurde mit dem Methylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid-Test (MTT-Test) nachgewiesen. MTT wird enzymatisch zu Formazan reduziert. Die Reaktion ist von NADH und NADPH abhängig und vollzieht sich somit nur in vitalen Zellen mit intaktem Energiestoffwechsel [Mosmann 1983].

Als MTT-Vorratslösung wurden 5 mg/ml MTT in DMEM gelöst und anschließend daraus als MTT-Arbeitslösung eine 1:10 Verdünnung mit DMEM hergestellt. Diese wurde zusammen mit PBS im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Alle Wells wurden mit warmem PBS gewaschen und 1 ml/Well der MTT-Arbeitslösung hinzugegeben. Nach 3 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C wurde das Medium entfernt. Alle Wells wurden ein Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl/Well Lysespuffer versehen. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden der Farbstoff mehrfach mit der Pipette resuspendiert und die Proben 2 Minuten bei 16.060 g zentrifugiert. Jeweils 100 µl des Überstands wurden in Duplikaten im Photometer bei 570 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der Duplikate und anschließend die Mittelwerte der entsprechenden Gruppen errechnet.

2.2.4 Laktat-Analyse

Die Laktatsekretion wurde mit einem kommerziell erhältlichen Test gemessen. Jeweils 50 µl/Well der Überstände bzw. Standards wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und 50 µl/Well der Reaktionslösung hinzugegeben. Nach

30 Minuten Inkubation an einem lichtgeschützten Ort wurden die Extinktionen bei 570 nm Wellenlänge im Photometer gemessen und die Laktatkonzentrationen anhand der Standardkurve errechnet.

2.2.5 Oil-Red-O

Das Ausmaß der Fettzellendifferenzierung wurde durch die Oil-Red-O-Färbung bestimmt. Oil-Red-O ist ein lipophiler, roter Farbstoff der Triglyceride und Cholesterinoleat färbt [Ramirez-Zacarias et al. 1992]. Fettzellen können mit Oil-Red-O angefärbt werden, um den Farbstoff anschließend aus den Zellen zu eluieren. Die Farbstoffkonzentration wurde nach dem Eluieren photometrisch gemessen [Ramirez-Zacarias et al. 1992]. Da eine relevante Fetтанreicherung nur bei differenzierten Adipozyten besteht, kann somit der Differenzierungsgrad abgeschätzt werden.

2.2.5.1 Optimiertes Oil-Red-O-Protokoll

Für die Oil-Red-O-Vorratslösung (0,5 %-Lösung) wurden 0,2 g Oil-Red-O und 40 ml Isopropanol in ein 50-ml-Reaktionsgefäß gegeben und, bis sich das gesamte Pulver gelöst hatte, in einem Rüttler vermischt. Diese Vorratslösung war bei Raumtemperatur lagerungsfähig. Vor jeder Verwendung wurde das Oil-Red-O im Rüttler resuspendiert. Zur Herstellung der 0,2 %-Oil-Red-O-Lösung wurde ein Teil der Vorratslösung mit Aqua bidest. verdünnt und anschließend mit einem Papierfilter filtriert. Die 4 %-Formaldehydlösung wurde aus 37 %-Formaldehydlösung mit PBS verdünnt.

Der Überstand der Wells wurde zunächst abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten lang mit 4 %-Formaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert. Dann wurden $0,132 \text{ ml/cm}^2$ 0,2 %-Oil-Red-O-Lösung (0,5 ml/Well bei 12-Well-Kulturschalen) hinzugefügt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um alle freien Farbreste im Well zu entfernen, wurden die Wells anschließend mindestens fünf Mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Der Farbstoff wurde an-

schließlich durch Zugabe von $0,263 \text{ ml/cm}^2$ Isopropanol (1 ml/Well bei 12-Well-Kulturschalen) eluiert. Nach zehnmütigem Schwenken wurden jeweils Proben von $200 \mu\text{l}$ Volumen als Duplikate sowie ein Duplikat eines Isopropanol-Leerwertes in eine 96-Well-Mikrotestplatte überführt. Die Extinktion wurde bei 510 nm Wellenlänge im Photometer gemessen.

Um experimentelle Messwerte mit der quantitativen Oil-Red-O-Messung normieren zu können, wurden die Absorptionswerte durch den kleinsten der Werte dividiert. Dadurch wurde verhindert, dass Messwerte durch Zahlen zwischen 0 und 1 geteilt werden, was die Richtung der Korrektur umkehren würde. Zuvor sollte von jeder Oil-Red-O-Extinktion der Isopropanol-Leerwert subtrahiert und von den Duplikaten jeweils Mittelwerte gebildet werden.

2.2.6 Lipolyse-Analyse

Zur Ermittlung der Lipolyserate wurde das bei der Lipolyse freigesetzte Glycerol gemessen. Die Glycerol-Bestimmung erfolgte durch einen kommerziell erhältlichen Test (*Glycerol Colorimetric Assay Kit*). Der Messbereich stellte sich als nicht weit genug heraus, weshalb die Standardkurve zu höheren Konzentrationen hin erweitert wurde. Dazu wurden $24 \mu\text{l}$ Standard mit $1776 \mu\text{l}$ Standardverdünnung vermischt und diese Hauptstandardlösung, wie in Tabelle 2.7 beschrieben, verdünnt. Die ermittelte Standardkurve war auch im erweiterten Messbereich linear. Da die Lipolyserate in Ruhebedingungen sehr gering ist, erfolgte zusätzlich eine Behandlung mit Isoproterenol in submaximaler Dosis, welches über eine Adrenozeptoraktivierung die Lipolyse der Adipozyten steigert [Holm 2003]. Somit konnten die Lipolyserate auf mehr als das 6-fache erhöht werden und die Auswirkungen der 1-MN-Vorbehandlung auf die physiologische katecholaminabhängige Steigerung der Lipolyserate simuliert werden. Darüber hinaus lassen sich aufgrund der insgesamt größeren Messwerte Veränderungen besser detektieren und Messfehler minimieren. Für den Versuchspuffer wurden $0,09 \text{ g}$ Glukose und $0,6 \text{ g}$ fettfreies Rinderalbumin mit Krebs-Ringer-HEPES-

Puffer (Abschnitt 2.2.1.3) auf 20 ml Volumen aufgefüllt. Vor der Verwendung in der Zellkultur wurde dieser Versuchspuffer im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und das in Aqua bidest. gelöste und bei -20 °C konservierte Isoproterenol zur Erlangung einer Konzentration von 1 E-6 mol/l hinzugegeben. Alle Wells wurden nach dem Entfernen des Mediums mit 37 °C warmem PBS gewaschen. Bei der Verwendung von 12-Well-Kulturschalen erfolgte die Zugabe von 400 µl/Well Isoproterenol-Versuchspuffer sowie eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ über 60 Minuten. Anschließend wurden die Standardproben vorbereitet, in Reaktionsgefäßen eine 1:2-Verdünnung der Zellüberstandproben mit Versuchspuffer hergestellt und diese in Duplikaten mit einem Volumen von je 50 µl/Well in eine 96-Well-Mikrotestplatte überführt. Nach der Zugabe von 50 µl/Well Glycerol-Enzymmischung und einer Inkubation über 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 540 nm im Photometer gemessen. Mit Hilfe der Standardwerte konnte anschließend eine Standardkurve ermittelt und anhand dieser die Konzentrationen der Proben errechnet werden.

Nr.	Konzentration [mg/dl]	Hauptstandardlösung [µl]	Standardverdünnung [µl]
1	0	0	200
2	2	20	180
3	4	40	160
4	6	60	140
5	8	80	120
6	10	100	100
7	12	120	80
8	14	140	60
9	16	160	40
10	18	180	20
11	20	200	0
SUMME:		1100	1100

Tabelle 2.7: Verdünnungsreihe des Glycerolstandards

2.2.7 ELISA

Zur Messung der Leptin- und Adiponektinkonzentrationen wurden kommerziell erhältliche quantitative *Sandwich-ELISA* verwendet. Das heißt, ein Analyt bindet an spezifische Antikörper, die an der Oberfläche des Reagenzgefäßes haften. Ein zweiter analytspezifischer und mit einem Enzym konjugierter Antikörper bindet wiederum an den zuvor gebundenen Analyten. Das konjugierte Enzym löst eine chemische Reaktion mit einem Farbumschlag aus. Dieser kann photometrisch gemessen werden.

Alle Reagenzien wurden entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Um eine gleichmäßige Verteilung des Leptins bzw. Adiponektins im Überstand zu erreichen, wurden die Zellkulturplatten vor der Entnahme der Proben des Überstandes sorgfältig geschwenkt. Bei den Waschvorgängen wurden die Wells nach dem letzten Verwerfen des Waschpuffers umgedreht, auf ein saugfähiges Papiertuch gelegt und anschließend der durch Adhäsion weiterhin im Well befindliche Waschpuffer vorsichtig herauspipettiert. Nach dem Erstellen einer Standardkurve konnten die Konzentrationen aller Proben ermittelt werden. Die Werte jeder Gruppe wurden mit der Bildung des arithmetischen Mittels zusammengefasst.

2.2.7.1 Leptin-ELISA

Alle Wells des ELISA wurden zwei Mal mit je 300 μl Waschpuffer gewaschen und 45 μl /Well Verdünnungspuffer sowie 50 μl /Well Anti-Leptin-Serum hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 5 μl /Well Standardprobe bzw. Überstandproben sowie eine Inkubation über 16-20 Stunden bei 4 °C. Nun wurde fünf Mal mit 300 μl /Well Waschpuffer gewaschen, 100 μl /Well konjugierter Antikörper (*Anti-guinea-pig IgG*) hinzugegeben und 3 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden nach sieben Mal Waschen (300 μl /Well Waschpuffer) mit 100 μl Substratlösung versehen, bei Raumtemperatur an einem dunklen Ort über 30 Minuten inkubiert und die Reaktion mit je 100 μl Stopp-Lösung gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm im Photometer gemessen.

2.2.7.2 Adiponektin-ELISA

Zunächst wurden je 100 μl /Well Standardprobe bzw. Zellüberstand in die mit dem Antikörper beschichteten Wells pipettiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden alle Wells drei Mal mit je 300 μl Waschpuffer gewaschen, 100 μl /Well des konjugierten anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers hinzugegeben und erneut eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es schlossen sich ein fünfmaliger Waschvorgang mit Waschpuffer und die Zugabe von 100 μl /Well des unmittelbar zuvor hergestellten Substratmixes an. Nach einer erneuten Inkubation über 20 Minuten bei Raumtemperatur an einem dunklen Ort wurde die Reaktion mit je 100 μl /Well Stopplösung beendet und die Absorption aller Wells unmittelbar danach bei 450 nm im Photometer gemessen.

2.2.8 Statistik und Software

Die statistische Auswertung erfolgte in Excel unter Verwendung der Excel-Erweiterung "Daniel's XL Toolbox" [D. Kraus 2014]. Dabei wurden lineare Regressionen und Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ definiert. Die Fehlerbalken in den Abbildungen zeigen den Standardfehler. Als Literaturdatenbank wurde Zotero genutzt. Die Dissertation wurde mit Latex erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung des experimentellen Ansatzes

Für die experimentelle Manipulation der NNMT stehen bislang wenige Verfahren zur Verfügung. Verschiedene gentechnische Methoden wie Antisense-Oligonukleotide oder die Transfektion von Plasmiden sind für kultivierte Fettzellen nicht gut geeignet, weil sie in diesen Zellen ineffizient und sehr teuer sind. Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurde deshalb eine pharmakologische Hemmung des Enzyms durch 1-Methylnicotinamid (1-MN) gewählt [Scheller et al. 1996]. Das vorherige Medium wurde zunächst verworfen, die Zellen ein Mal mit warmem PBS gewaschen und anschließend serumfreies DMEM der 1-MN-Konzentrationen 1 E-5 , 1 E-4 , 1 E-3 mol/l für 16 Stunden hinzugegeben. Als Kontrolle diente DMEM ohne Zugabe von 1-MN. Zur Erhöhung der Aussagekraft der Daten, wurde jede Kondition in Gruppen zu 3 Wells ausgeführt und in den Tests jeweils in Duplikaten gemessen. Die für die Vorbehandlung gewählten Konzentrationen sind hoch und entsprechen eher pharmakologischen Konzentrationen als physiologisch zu erwartenden. Deshalb sollten mögliche toxische Effekte durch den Zellviabilitätstest mit MTT ausgeschlossen werden. Die Vorbehandlung mit 1-MN beeinträchtigt selbst in hohen Konzentrationen die Zellviabilität nicht (Abbildung 3.1).

Dem pharmakologischen Rückkopplungshemmer 1-MN wurde zudem eine Hemmung der mitochondrialen Atmungskette durch die Inhibition des Komplex I der Atmungskette zugeschrieben [Fukushima et al. 1995]. Um auszuschließen, dass

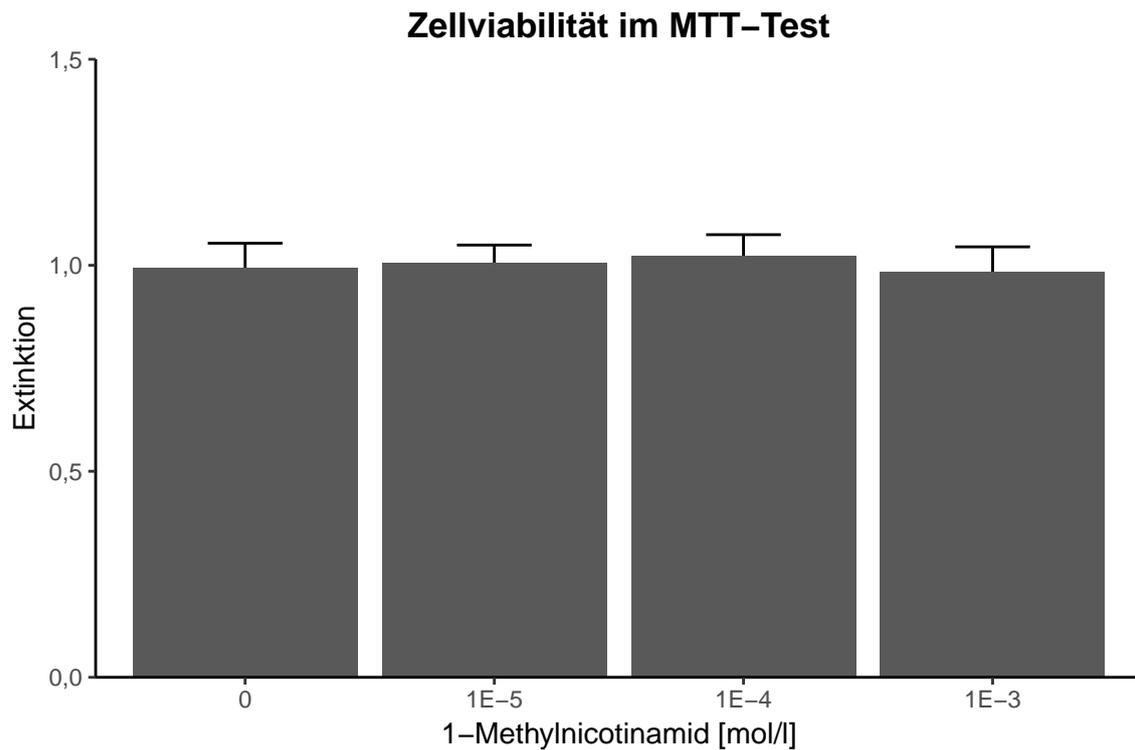


Abbildung 3.1: Zellviabilität mittels MTT nach der Vorbehandlung mit 1-MN.
ANOVA: $p = 0,97$

die hier gewählte Vorbehandlung einen solchen, im Sinne des Experimentes, unerwünschten Effekt hat, wurde die Laktatfreisetzung in das Kulturmedium gemessen. Somit sollten Effekte auf die anaerobe Glykolyse analysiert werden. Die Laktatfreisetzung unterschied sich selbst bei hohen 1-MN-Konzentrationen nicht von der Freisetzung aus unbehandelten Zellen, sodass in den Fettzellen kein relevanter Effekt durch 1-MN auf die Atmungskette anzunehmen ist (Abbildung 3.2).

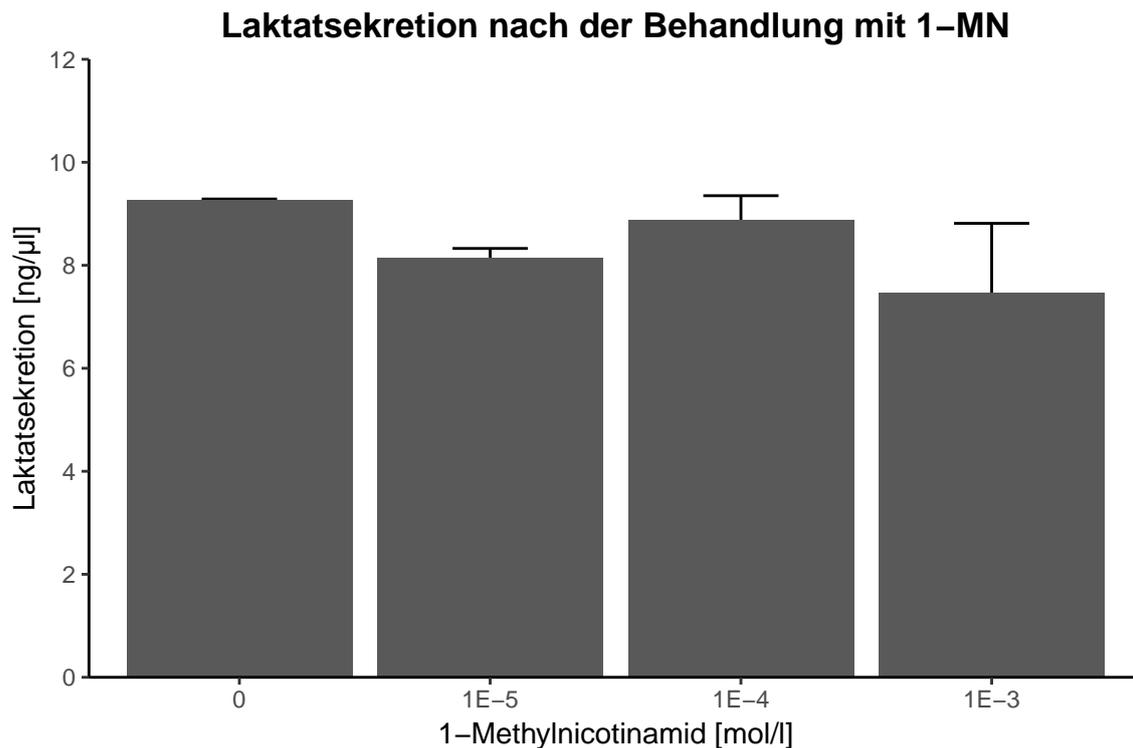


Abbildung 3.2: Sekretion von Laktat in Abhängigkeit der Vorbehandlung mit 1-MN. ANOVA: $p = 0,29$

3.2 Quantifizierung der Adipozytendifferenzierung

Bei den Experimenten mit Fettzellen wurde deutlich, dass die Kulturschalen verschiedener Passagen unterschiedliche Mengen differenzierter Adipozyten enthielten. Obwohl von kultivierten Zelllinien im Allgemeinen eine große Homogenität zu erwarten ist, lässt sich die Differenzierung von Fettzellen und insbesondere die der weit verbreiteten 3T3-L1-Linie nicht immer in gleichem Maße reproduzieren. Dies ist ein bekanntes Phänomen [Zebisch et al. 2012]. Die Menge an tatsächlich differenzierten Fettzellen kann einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse eines Experiments haben. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt, um den Grad der Differenzierung zu quantifizieren [N. A. Kraus et al. 2016]. Die Methode basiert auf der Färbung von differenzierten Fettzellen mit Oil-Red-O und wird in der Literatur bereits seit vielen Jahren für diesen Zweck beschrieben. Eine kritische Würdigung der bisherigen Literatur ergab allerdings, dass die Methode ohne Validierung und mit scheinbar willkürlich ge-

wählten Parametern – im Folgenden Typisches Protokoll genannt – angewendet wurde (Tabelle 3.1). Deshalb wurde die Methode in der vorliegenden Arbeit systematisch validiert. Zu diesem Zweck wurden mit einem Zellschaber 25, 50, 75, 87,5 und 100 Prozent der Fläche einer Kulturschale von ausdifferenzierten Fettzellen befreit, um eine systematische Variierung der Fettzellmenge zu erreichen. Hilfsmarkierungen auf der Unterseite der Wells dienten der Genauigkeit der Zellentfernung. Um ein Verwischen der Zellen zu vermeiden, wurde zunächst PBS vorgelegt, in dem anschließend auch die abgewischten Zellen entfernt werden konnten. Durch die Ergebnisse des Typischen Protokolls konnte keine Diskriminierung der Fettzellmenge erreicht werden (Abbildung 3.3). Die Extinktionen des Typischen Protokolls lagen alle über 1,5 und damit im oberen, ungenauen Messbereich des Photometers (0 - 3,2) [Youmans et al. 1976]. Auch mit Hilfe des Originalprotokolls gelang keine ausreichende Diskriminierung des Differenzierungsgrades. Die beste Näherung zeigte dort eine quadratische Funktion mit einer Sättigung der Färbung bei einem Zellgehalt von mehr als 50 Prozent (Abbildung 3.4). Insbesondere in diesem für die Praxis relevanten Messbereich nahe der Konfluenz der Kulturschalen bestand also keine Linearität. Zudem lagen in diesem Messbereich erneut alle Extinktionen über 1,5. Nach der systematischen Optimierung der ORO-Konzentration, der Färbedauer sowie des Elutionsvolumens (Abschnitt 2.2.5.1) stiegen die Extinktionen linear mit der Menge differenzierter Fettzellen an und zwar über dem gesamten Messbereich (Abbildung 3.5). Auch bei 6-Well-Kulturschalen konnte das Ergebnis bestätigt werden, wenn die verwendeten Volumina an die größeren Wells angepasst wurden (Abbildung 3.6).

Das Entfernen der Zellen ist lediglich ein Surrogat zur Simulation eines geringeren Zellgehalts differenzierter Adipozyten. Statt Areale ohne Zellwachstum, wie sie durch das Entfernen der Zellen generiert werden, besteht bei Kulturschalen mit schlechter differenzierten Adipozyten eher ein höherer Anteil nicht differenzierter Präadipozyten. Deshalb wurde zur Kontrolle die Anfärbung von nicht differenzierten Präadipozyten untersucht. Dabei ergaben sich ausschließlich Extinktionen um 0,2 (Abbildung 3.8). Die Präadipozyten wiesen damit dasselbe Fär-

beverhalten auf, wie die Zellkulturplatten nach der vollständigen Entfernung von ausdifferenzierten Fettzellen. Folglich beeinflusst der Anteil der entfernten Präadipozyten nicht die Extinktion und das Entfernen der Zellen ist eine valide Methode zur Simulation unterschiedlicher Differenzierungsgrade der Adipozyten. Im Vergleich der Kulturschalen, in denen alle Präadipozyten bzw. Adipozyten entfernt wurden, mit weiteren Kulturschalen, die bisher keinen Zellkontakt hatten, bildeten sich in denjenigen ohne Zellkontakt Farbkonglomerate. Diese waren im Waschvorgang nicht abspülbar und führten zu signifikant höheren Oil-Red-O-Extinktionen, wodurch sich diese nicht als Negativkontrolle eigneten (Abbildungen 3.6, 3.7 und 3.8).

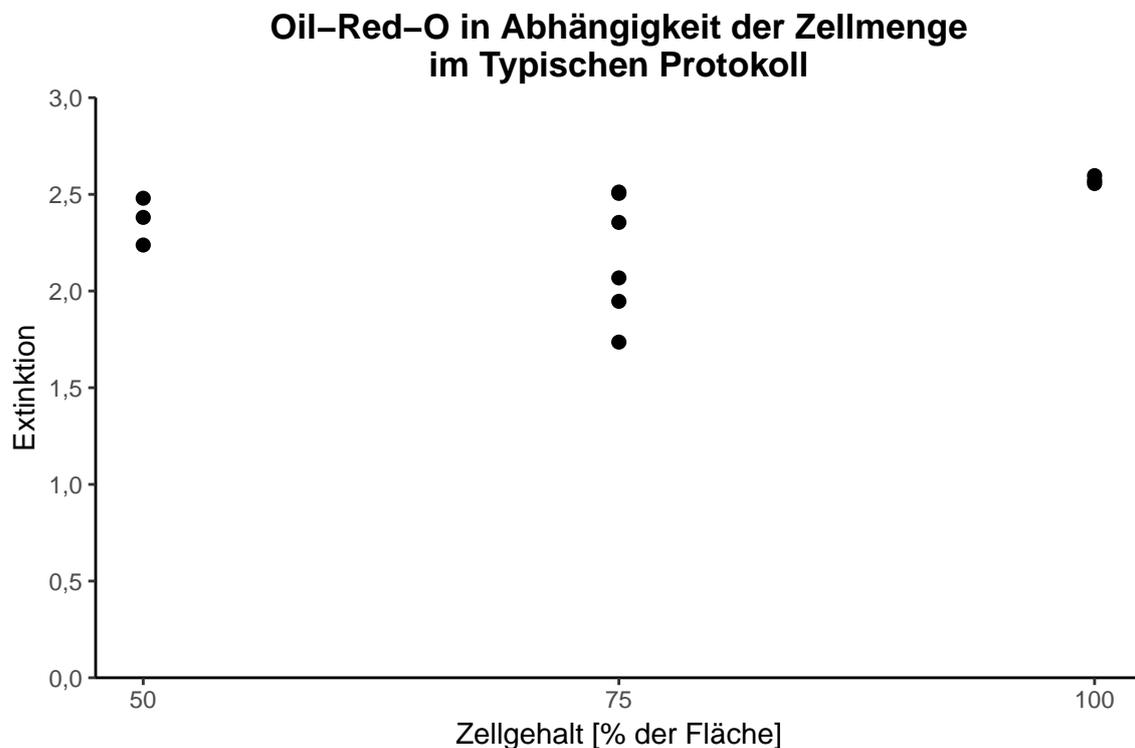


Abbildung 3.3: ORO-Färbung in Abhängigkeit des Zellgehaltes beim Typischen Protokoll. Es werden Extinktionen von mehr als 1,5 erreicht. Lineare Regression: $R^2 = 0,077$; $p = 0,382$

Autor	basierend auf	1. Waschen	Fixierung	2. Waschen	ORO-Färbung	3. Waschen	Trocknung	Eluierung	Wellenlänge [nm]
[Ramirez-Zacarias et al. 1992]	[Humason 1962]	—	1 h RT 10% FA	Wasser	2 h RT 0,2% in 2-Prop	erschöpfend	32 °C	1 ml 2-Prop	510
[C. N. Bennett et al. 2002]	[Erickson et al. 2001]	—	—	—	—	—	—	15 min 4% Igepal CA-630 in 2-Prop	520
[Janderová et al. 2003]	[Ramirez-Zacarias et al. 1992]	—	1 h RT 10% FA	—	10 min Konzentration unklar in 60% 2-Prop	Wasser, mehrfach	—	15 min 2-Prop	500
[Yang et al. 2007]	—	2x PBS	1 h RT 10% FA	—	1 h RT 0,6% in 60% 2-Prop	3x 60% 2-Prop	—	4% NP-40 in 2-Prop	490
[Mäuser 2007]	—	—	15 min FA	—	1 h 0,25% in 60% 2-Prop	Wasser, mehrfach	—	2-Prop	500
[Arsenescu et al. 2008]	[Ramirez-Zacarias et al. 1992], [Hanlon et al. 2003]	1x PBS	5 min RT 10% FA	—	30 min 0,3% in 60% 2-Prop	—	—	2-Prop	510
[Rossmislová et al. 2013]	[Janderová et al. 2003]	—	—	—	—	—	—	—	—
[W. Wang et al. 2015]	—	PBS	30 min 4% FA	—	20 min 0,3%	—	—	2-Prop	518
[Cheung et al. 2015]	—	—	—	—	—	—	—	2-Prop	580
[Koc et al. 2015]	[Rossmislová et al. 2013]	—	—	—	—	—	—	—	—
[Kim et al. 2016]	kommerzieller Test von Cayman Chemical	PBS	1 h RT 10% FA	2-Prop	2 h in einer vorgefertigten Lösung	—	—	100% 2-Prop	520
[Mori et al. 2016]	—	2x PBS	1 h RT 3,7% FA	—	0,6% in 60% 2-Prop	—	—	keine	Fotoanalyse
Typisches Protokoll (Abschnitt 3.2)	—	1x PBS	15 min 4% FA	—	1 h 0,3% in 40% 2-Prop	Wasser, 5-mal	—	10 min 100% 2-Prop	510
Optimiertes Protokoll (Abschnitt 2.2.5.1)	[Ramirez-Zacarias et al. 1992]	1x PBS	15 min 4% FA	—	30 min 0,132 ml/cm ² 0,2% in 40% 2-Prop	Wasser, 5-mal	—	0,263 ml/cm ² 100% 2-Prop	510

Tabelle 3.1: Überblick über die verschiedenen ORO-Protokolle zur Quantifizierung der Fettselddifferenzierung.

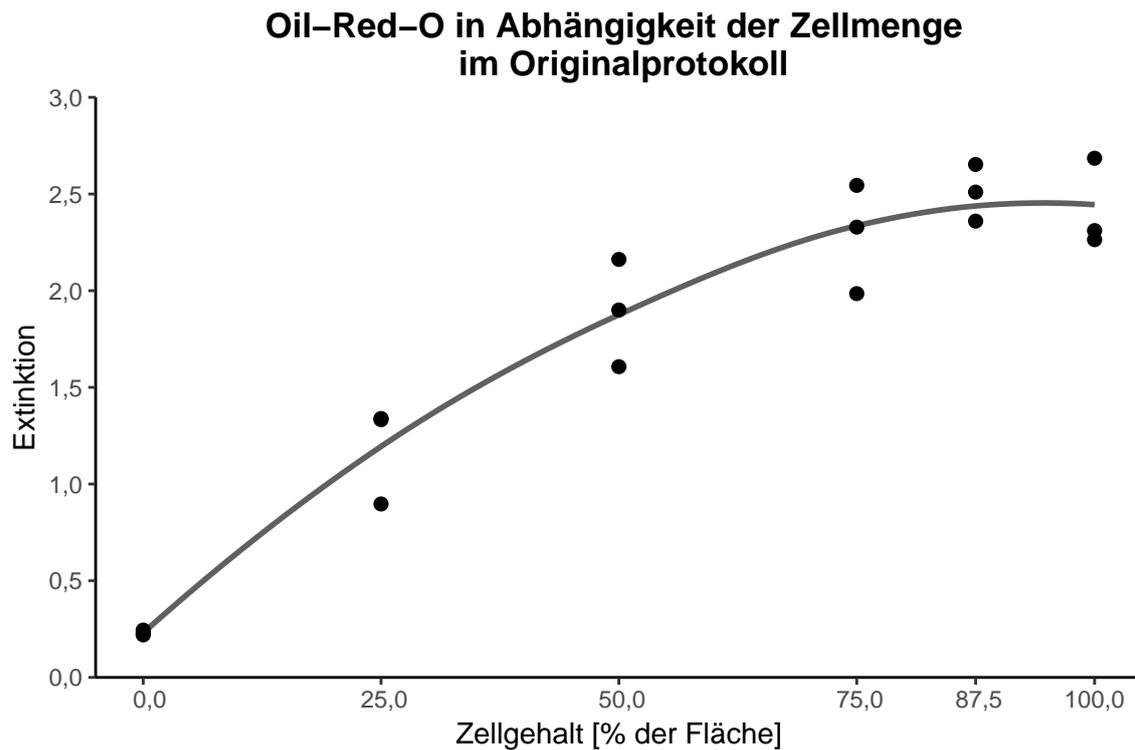


Abbildung 3.4: ORO-Färbung in Abhängigkeit des Zellgehaltes beim Originalprotokoll aus dem Jahr 1992 [Ramirez-Zacarias et al. 1992]. Die beste Näherung zeigt eine quadratische Funktion. Insbesondere bei einem Zellgehalt von mehr als 50 % besteht, mit einer nur geringen Steigung des Graphen, keine Linearität mehr. Die Extinktionen liegen größtenteils über 1,5. Lineare Regression: $R^2 = 0,953$; $p = 1,179 \text{ E-}10$

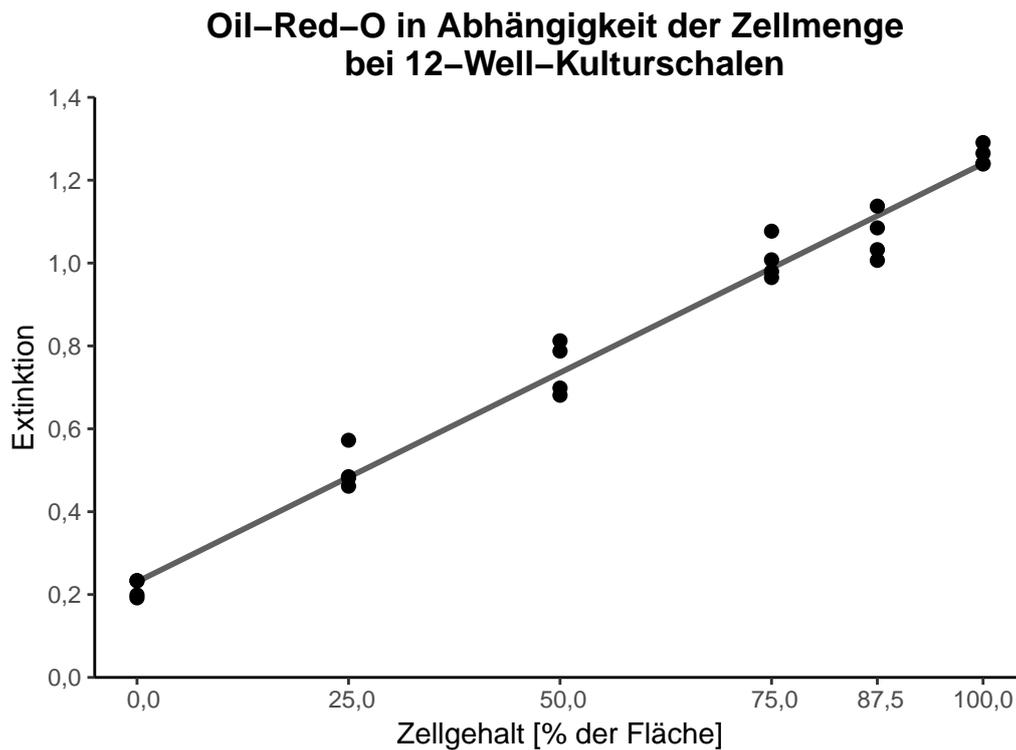


Abbildung 3.5: Kulturschalen mit definierten Mengen an ausdifferenzierten Adipozyten (ausgedrückt als prozentualer Anteil an der Fläche der Kulturschale) wurden nach dem optimierten Protokoll (Abschnitt 2.2.5.1) gefärbt und das Ausmaß der Färbung anschließend gemessen. Mit Zunahme des Gehalts an differenzierten Zellen pro Well steigen die Extinktionen um circa das 5-Fache an. Lineare Regression: $R^2 = 0,982$; $p = 1,128 \text{ E-}20$

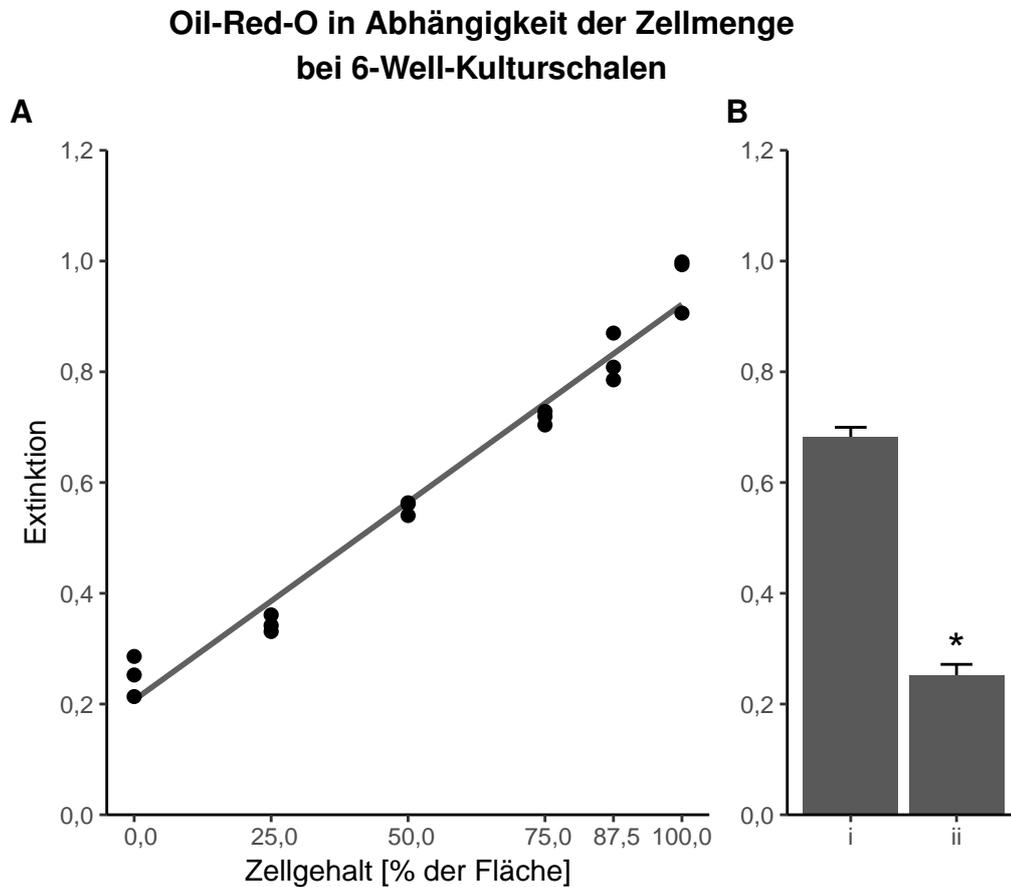


Abbildung 3.6: Optimierter Oil-Red-O-Test für 6-Well-Kulturschalen (Abschnitt 2.2.5.1). **A**: Entsprechend der Ergebnisse bei 12-Well-Kulturschalen steigen die Extinktionen mit zunehmendem Zellgehalt deutlich an. Lineare Regression: $R^2 = 0,972$; $p = 6,585 \text{ E-}14$ **B**: Bei Kulturschalen ohne vorherigem Zellkontakt (i) und Kulturschalen, auf denen alle Zellen entfernt wurden (ii), bildeten sich makroskopisch sichtbare Farbkonglomerate (Abbildung 3.7). Diese wurden während des Waschprozesses nicht entfernt und erzeugen in diesen Proben erhöhte Extinktionen. In Kulturschalen ohne vorherigem Zellkontakt (i) war dieser Prozess ausgeprägter als in Kulturschalen, auf denen alle Zellen entfernt wurden (ii). t-Test: $p = 0,001$

Zellentfernung und Farbkonglomerate

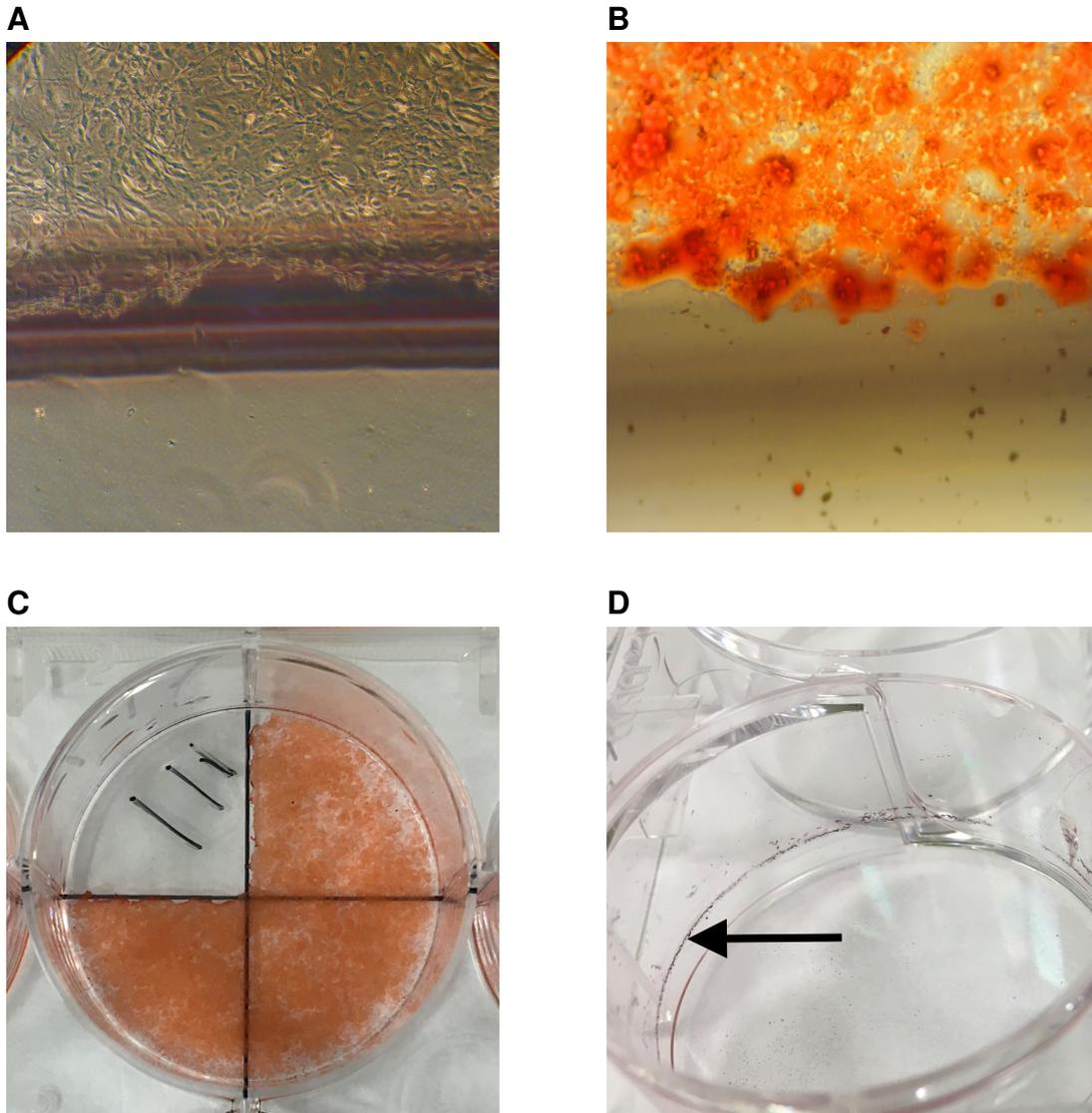


Abbildung 3.7: **A** und **B**: Foto von (undifferenzierten) Präadipozyten (A) und ORO-gefärbten Adipozyten (B) bei 1:100 Vergrößerung. Es zeigt exemplarisch die Effektivität der Zellentfernung für alle Oil-Red-O-Experimente. Mittig ist die schwarze – sich auf der Rückseite der Wells befindliche – Hilfsmarkierung zu erkennen. Im Areal unter der Linie wurden die Zellen bereits entfernt, oben sind weiterhin alle Zellen vorhanden. **C**: Foto nach ORO-Färbung von Adipozyten bei 75%- Zellgehalt. **D**: Beispielhafte Farbstoffkonglomerate am Rand der Wells (Pfeilspitze). Diese entstehen, makroskopisch sichtbar, nur in Kulturschalen ohne vorherigem Zellkontakt und in geringerer Intensität in Kulturschalen, auf denen alle Zellen entfernt wurden.

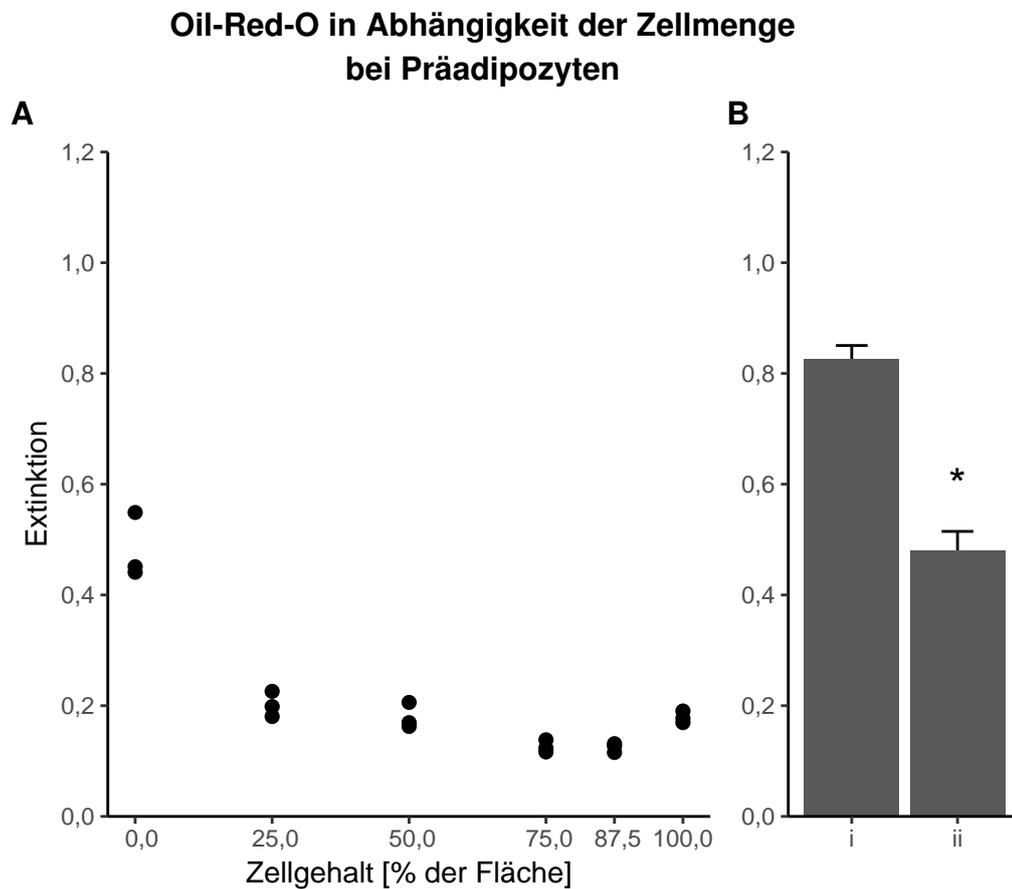


Abbildung 3.8: Optimierter Oil-Red-O-Test für (undifferenzierte) Präadipozyten (Abschnitt 2.2.5.1). **A:** Undifferenzierte Präadipozyten erzeugten deutlich niedrigere Extinktionen als die differenzierten Adipozyten (vergleiche Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6). **B:** In Analogie zu den Ergebnissen bei 6-Well-Platten ergeben sich in Kulturschalen ohne vorherigem Zellkontakt (i) und Kulturschalen, auf denen alle Zellen entfernt wurden (ii), makroskopisch sichtbare Farbkonglomerate mit entsprechend erhöht messbaren Extinktionen. t-Test: $p=0,001$

3.3 Lipolyse

Die Lipolyse ist eine wichtige Fettzellfunktion. Die Triglyzeride als Energiespeicher werden gespalten und können anschließend der Beta-Oxidation zur Energiebereitstellung zugeführt werden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der NNMT-Aktivität auf die Lipolyse untersucht (Abschnitt 3.1). Mit zunehmenden 1-MN-Konzentrationen nahm auch die Glycerol-Freisetzung zu. Die Lipolyse verhielt sich also umgekehrt proportional zur NNMT-Aktivität (Abbildung 3.9).

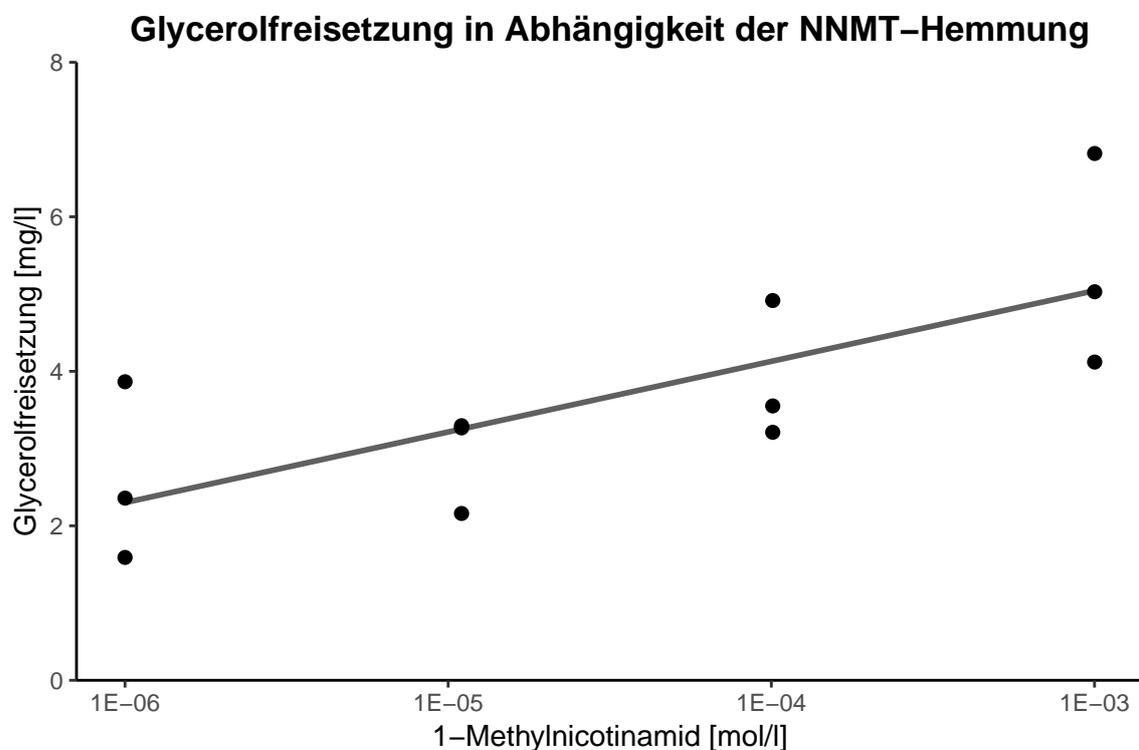


Abbildung 3.9: Glycerolfreisetzung nach der Vorbehandlung mit 1-MN. Die Proben wurden vor der Verwendung 1 : 2 mit dem Verdünnungspuffer des Tests verdünnt. Mit zunehmender 1-MN-Konzentration steigt die Glycerol-Freisetzung in das Kulturmedium an. Lineare Regression: $p = 0,008$

3.4 Adipokinsekretion

Als wichtige Hormone der Fetthomöostase wurde der Einfluss der NNMT-Hemmung auf die Leptin- und Adiponektinsekretion untersucht. Die NNMT-Hemmung erfolgte nach der Standardvorbehandlung (Abschnitt 3.1). Bei dem nach Herstellerangaben durchgeführten Adiponektin-ELISA lagen die Messergebnisse außerhalb des Messbereichs, woraufhin die Verdünnungen systematisch angepasst wurden. Das Vorbehandlungsmedium wurde für den Adiponektin-ELISA nach 15 Stunden verworfen, die Zellen mit warmem PBS gewaschen und anschließend erneut Medium der entsprechenden 1-MN-Konzentrationen hinzugegeben. Von diesem Überstand wurden daraufhin die Proben entnommen. Weder bei Leptin (Abbildung 3.10), noch bei Adiponektin (Abbildung 3.11) zeigte sich eine NNMT-abhängige Veränderung der Sekretion.

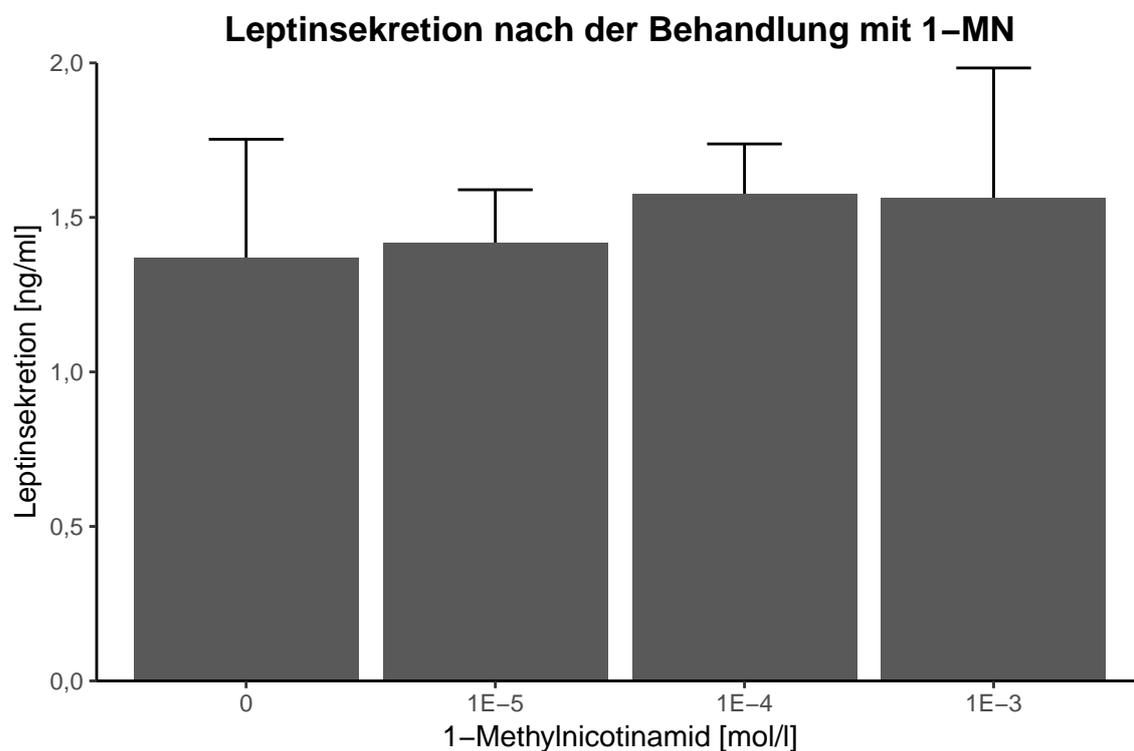


Abbildung 3.10: Sekretion von Leptin in Abhängigkeit der Vorbehandlung mit 1-MN. Eine signifikante Veränderung der Leptinsekretion nach der 1-MN-Vorbehandlung zeigt sich nicht. ANOVA: $p = 0,95$

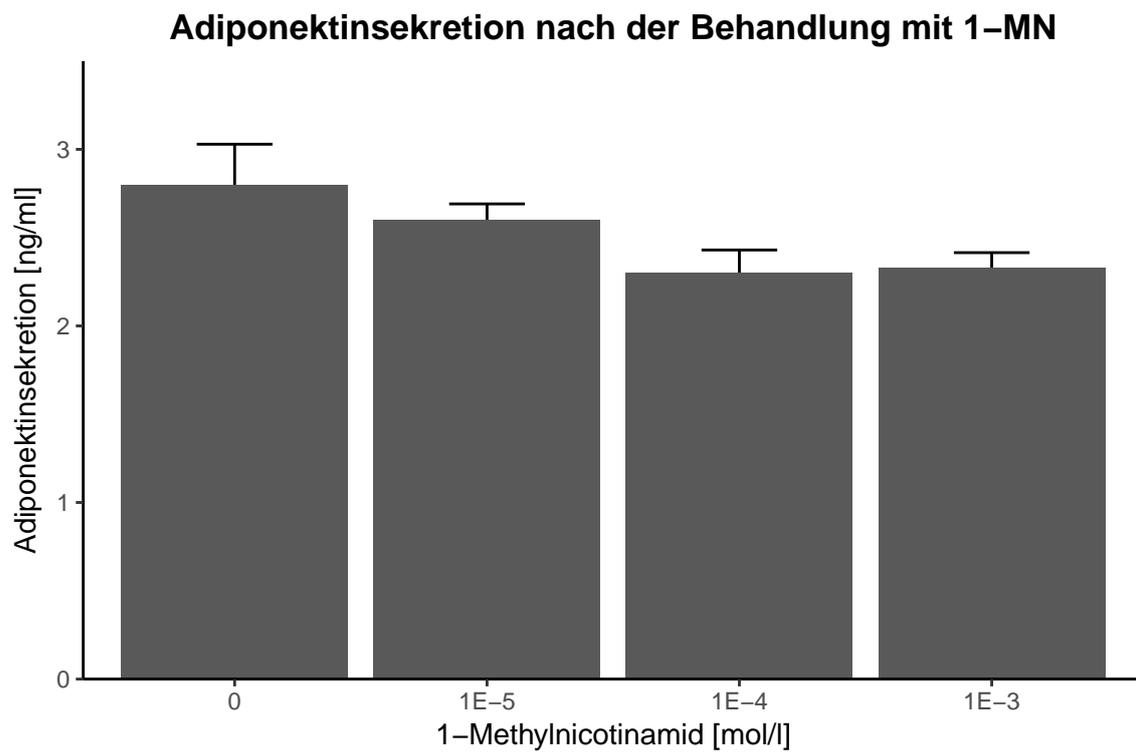


Abbildung 3.11: Sekretion von Adiponektin in Abhängigkeit der Vorbehandlung mit 1-MN. Eine signifikante Veränderung der Adiponektinsekretion nach der 1-MN-Vorbehandlung zeigt sich nicht. ANOVA: $p = 0,12$

4 Diskussion

Die Nicotinamid-N-Methyltransferase (NNMT) ist ein neu entdeckter Regulator des Energiestoffwechsels im Fettgewebe [D. Kraus et al. 2014]. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun, die Modulation der Fettgewebefunktion durch NNMT – eben diese Neuentdeckung – zu untersuchen. Im Zuge dessen wurde eine Methode entwickelt und validiert, mit der die Differenzierung von Fettzellen quantifiziert wird.

4.1 Zellvorbehandlung mit 1-MN

Um die NNMT-Aktivität experimentell zu manipulieren, wurde eine pharmakologische Hemmung mit 1-MN gewählt (Abschnitt 3.1). NNMT methyliert Nicotinamid zu 1-MN. 1-MN wiederum ist ein Rückkopplungshemmstoff der NNMT [Rini et al. 1990] [van Haren et al. 2016]. Allerdings können sich durch die Behandlung auch toxische Effekte auf die Zellen ergeben. Bei 25 E-3 mol/l 1-MN zeigte sich an Ratten-Neuroblastomzellen nach 20 Stunden Inkubation ein Zelltod von 20,5 Prozent aller Zellen [Willets et al. 1993]. Indes reduzierte sich die Leber-NNMT-Aktivität bereits bei einer 1-MN-Konzentration dosisabhängig zwischen 1 E-5 bis 1 E-3 auf nahezu null [Aksoy et al. 1994]. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Toxizität der 1-MN-Vorbehandlung mittels des MTT-Tests ausgeschlossen (Abbildung 3.1) und im Anschluss wurden die nichttoxischen Konzentrationen 0, 1 E-5, 1 E-4 und 1 E-3 mol/l 1-MN zur standardisierten Vorbehandlung ausgewählt (Abschnitt 3.1). Vorbeschrieben ist zudem eine 1-MN-abhängige, cerebrale Hemmung der Atmungskette durch die Destruktion von Komplex I-Untereinheiten [Fukushima et al. 1995]. Es fand sich in dieser Disser-

tation jedoch kein Anstieg der Laktatproduktion nach einer Behandlung der Zellen mit 1-MN, was eine Hemmung der Atmungskette in den Adipozyten unwahrscheinlich macht (Abbildung 3.2). Limitationen dieses experimentellen Ansatzes sind jedoch durch die Behandlung mit 1-MN ausgelöste mögliche Nebeneffekte. Bei Nematoden war so nämlich nach einer 1-MN- und Nikotinsäurebehandlung eine Erhöhung der Lebenserwartung nachgewiesen worden [Schmeisser et al. 2013]. Es handelt sich hierbei um eben eine solche Art der Vorbehandlung, wie sie zur Erzielung der NNMT-Produkt hemmung auch in dieser Dissertation Anwendung fand. In vivo erfolgte bei Tierexperimenten die NNMT-Hemmung mittels *Antisenseoligonukleotiden* [D. Kraus et al. 2014]. Diese Mechanismen unterscheiden sich insofern, dass *Antisenseoligonukleotide* die Translation der mRNA hemmen [C. F. Bennett et al. 2010], wohingegen eine Produkt hemmung die Enzymaktivität minimiert und keinen bisher bekannten, direkten Einfluss auf die Translation der mRNA hat [Aksoy et al. 1994]. Dadurch ist grundsätzlich eine veränderte Wirksamkeit der NNMT-Hemmung denkbar. Allerdings wurde bereits in der ersten Publikation zur energiehomöostatischen Rolle der NNMT gezeigt, dass 1-MN im Fettgewebe ähnliche Effekte hat wie eine gentechnische Suppression des Enzyms [D. Kraus et al. 2014]. Da die Transfektion von ausdifferenzierten Adipozyten mit Plasmiden und Oligonukleotiden ausgesprochen ineffizient und zudem sehr teuer ist, wurde für die vorliegende Arbeit die Hemmung durch 1-MN gewählt.

4.2 Abschätzung der Fettzell differenzierung mittels Oil-Red-O

Die Zellkultur ermöglicht es in der Regel bei jedem Experiment, die exakt gleichen Bedingungen einzuhalten. In der Praxis schwankt die Effektivität der Adipozytendifferenzierung aus Präadiopzyten allerdings zum Teil sehr [Zebisch et al. 2012]. Einflussfaktoren auf die Fettzell differenzierung sind u.a. die Passagezahl, die hinzugefügten Zusätze, die Zeitpunkte der Induktion und die interpersonellen

Unterschiede der verschiedenen Anwender. Um die Ergebnisse der einzelnen Experimente auf den Grad der Differenzierung normieren zu können, ist daher eine Methode zur Quantifizierung der Adipozytendifferenzierung notwendig. Dafür bietet sich die Färbung mit Oil-Red-O als eine effiziente Methode an [Ramirez-Zacarias et al. 1992]. Als spezifischer Fettfarbstoff wird Oil-Red-O bereits seit 1974 zur Färbung eingesetzt [Green et al. 1974]. Zunächst galt die Färbung nur der Visualisierung des Fetts in Gewebeschnitten, ehe seit 1992 erstmals eine photometrische Messung des Farbstoffs publiziert wurde, um Rückschlüsse auf die Fettmenge zu erhalten [Ramirez-Zacarias et al. 1992]. Die Methode ist vielfach zur Quantifizierung der Fettzellendifferenzierung verwendet worden, in vielen Fällen allerdings mit scheinbar willkürlich gewählten Parametern (Tabelle 3.1). Bislang fehlte eine Validierung der Methode, welche auch für das Originalprotokoll nie erfolgte. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Methode weder mit willkürlich gewählten Parametern, noch mit den Originalparametern valide Ergebnisse liefert (Abbildungen 3.3 und 3.4).

Anzumerken ist, dass sowohl das Originalprotokoll als auch das vielfach verwendete Typische Protokoll Extinktionswerte von deutlich über 2 ergeben. Die im Photometer gemessenen Extinktionen sind definiert als der dekadische Logarithmus aus dem Quotienten der eingesetzten Lichtintensität I_0 und der nach Durchtritt durch die Küvette gemessenen Lichtintensität I (Extinktion = $\lg[I_0/I]$) [Gey 2015, S. 276]. Laut dieser Definition hat der Verlauf des Logarithmusgraphen (Abbildung 4.1) zur Folge, dass die Extinktionen zwischen null und unendlich liegen, allerdings mit nur geringer Steigung des Graphen. So prägen sich vergleichsweise große Veränderungen in der Absorption bzw. im Quotienten aus I_0 und I durch geringe Veränderungen der Extinktion aus, wobei die Extinktionen zur Ermittlung der Standardkurven und dementsprechend zur Bestimmung der Stoffkonzentrationen in den entsprechenden Versuchen herangezogen werden. Bei einer Extinktion von 1 gelangen noch 10 Prozent der Lichtintensität zum Sensor ($10^1 = 10 = 100/10 = I_0/I \Rightarrow I = 10\%$), bei einer Extinktion von 2 ist es nur noch 1 Prozent ($10^2 = 100/1 = I_0/I \Rightarrow I = 1\%$), bei einer Extinktion von 3 gar nur

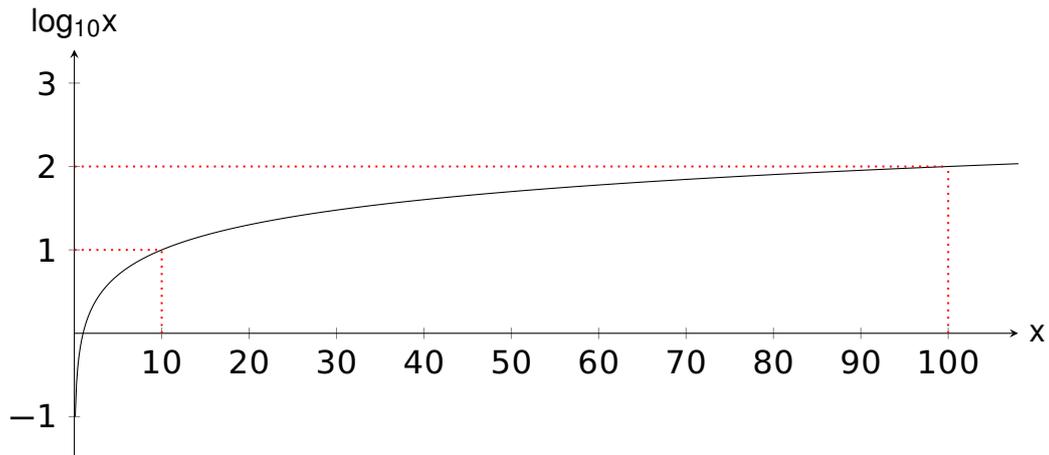


Abbildung 4.1: Darstellung des dekadischen Logarithmus

noch 0,1 Prozent ($10^3 = 1000/1 = 100/0,1 = I_0/I \Rightarrow I = 0,1\%$) der ursprünglichen Lichtintensität. Bei Extinktionen von mehr als 1,5 steigen die Messfehler daher exponentiell an, sodass die Messwerte eines optimierten Protokolls diese Grenze nicht überschreiten sollten [Youmans et al. 1976].

Optimiert wurden deshalb die Oil-Red-O-Konzentration, die Zeit der Färbung sowie das Eluierungsvolumen [N. A. Kraus et al. 2016]. Veränderungen der Formaldehydkonzentration, der Fixierdauer und der Waschvorgänge wirkten sich nicht aus. Die Extinktionen nehmen im optimierten Protokoll Werte zwischen 0,2 und 1,2 an und liegen damit vollständig unter der oben genannten Grenze von 1,5 [Youmans et al. 1976]. Darüber hinaus werden die Qualitätsmerkmale eines biochemischen Tests – Steilheit des Graphen, Linearität und Zuverlässigkeit der Ergebnisse – im optimierten Oil-Red-O-Protokoll erreicht [The United States Pharmacopeial Convention 2015]. Die Steilheit kann unter anderem mittels einer linearen Regression abgeschätzt werden, wobei sehr kleine p-Werte angestrebt werden [The United States Pharmacopeial Convention 2015]. Während das Typische Protokoll kein signifikantes p-Niveau erzeugen kann, erzeugt das Originalprotokoll aufgrund einer gewissen Steigung des Graphen ein signifikantes p-Niveau. Dies ist allerdings bedeutend größer als das p-Niveau bei dem optimierten Protokoll. Darüber hinaus wird bei dem Originalprotokoll das Qualitätskriterium Linearität nicht erreicht (Abbildung 3.4). Weder das Original- noch das

Typische Protokoll eignen sich daher zur validen Quantifizierung der Adipozyten-differenzierung.

Eine Limitation dieser Methode besteht darin, dass nur Ergebnisse nicht-zell-destruktiver Experimente normiert werden können, da die Zellen am Boden fixiert und anschließend angefärbt werden. Lysiert man die Zellen, ist die Normierung der Messdaten mit diesem Protokoll nicht möglich. Ob eine Färbung des bei lysierten Zellen abzentrifugierten Fettkörpers in den Reaktionsgefäßen valide Ergebnisse liefert, wurde nicht getestet. Je nach absoluter Fettmenge ist der Durchmesser des abzentrifugierten Fettkörpers nicht konstant, was die Diffusion und damit die Färbung während der Färbedauer beeinträchtigen könnte. Verwendet man die Methoden bei nicht-zelldestruktiven Experimenten, bleibt die einlagig gewachsene Adipozytenschicht am Boden der Kulturschalen erhalten. Dadurch variieren die Diffusionsstrecken für die Oil-Red-O-Färbung nur marginal und es werden zuverlässige Ergebnisse generiert.

Die Normierung der experimentellen Ergebnisse wird durch die Division der Messdaten durch die Oil-Red-O-Extinktionen erzielt [N. A. Kraus et al. 2016]. Da die Oil-Red-O-Extinktionen dimensionslos sind, bleibt die Einheit des zu normierenden Messwertes bestehen. Allerdings sollten zuvor alle Oil-Red-O-Extinktionen durch den kleinsten Wert aller Oil-Red-O-Extinktionen dividiert werden. Würde dies unterbleiben, so führte die Division durch Oil-Red-O-Extinktionen kleiner Null zu einer Vergrößerung des Gesamtergebnisses. Da durch dieses Vorgehen alle Extinktionen einen Wert größer 1 haben, wird dieser mögliche Fehler ausgeschlossen.

4.3 Einfluss der NNMT auf die Adipokine und die Lipolyse

Eine NNMT-Hemmung steigert in vivo den Energieumsatz des Fettgewebes [D. Kraus et al. 2014]. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass passend dazu in vitro eine NNMT-Hemmung zu einer vermehrten Lipolyse führt. Fettzellen mit verminderter NNMT-Aktivität kompensieren den durch die Energieumsatzsteigerung bedingten Verlust von Energieträgern also mit dem vermehrten Abbau von Speicherfett (Abbildung 3.9). Nicht untersucht wurde allerdings die methodisch sehr aufwendig zu messende Lipogeneserate. Daher lässt sich nicht sicher ausschließen, dass durch die NNMT-Hemmung neben der gesteigerten Lipolyserate auch eine erhöhte Lipogeneserate besteht und sich der Effekt der vermehrten Lipolyse zumindest teilweise wieder aufheben könnte. Da Fettzellen ihren metabolischen Zustand über die Sekretion von Adipokinen kommunizieren, wurde auch das Adipokinprofil untersucht [Galic et al. 2010]. Ursprünglich war erwartet worden, dass die Fettzellen unter der 1-MN-Hemmung weniger Leptin und mehr Adiponektin sezernieren. Trotz der beschriebenen Auswirkungen auf die Lipolyse konnte allerdings keine Veränderung der endokrinen Aktivität der Fettzellen nachgewiesen werden (Abbildungen 3.10 und 3.11). Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist, dass die Veränderung des Sekretionsprofils zu gering ausfiel, als dass sie mittels des ELISA detektiert werden konnte. Um die absolute Konzentration der Adipokine im Zellüberstand zu steigern, wurde das Zellkulturmedium reduziert, was allerdings nicht zu optimierten Ergebnissen führte. Eine weitere Reduktion des Zellmediums limitiert sich durch die dann mangelnde Versorgung der Zellen und deren Einflüsse auf die Homöostase. Weitere Analysemethoden mit größerer Sensitivität standen nicht zur Verfügung.

5 Zusammenfassung

Die Nicotinamid-N-Methyltransferase (NNMT) ist ein vor kurzem neu erkannter Regulator der Energiehomöostase im Fettgewebe. Ziel dieser Dissertation war es, die Modulation der Fettzellfunktion durch NNMT zu untersuchen, insbesondere in Bezug auf die Lipolyse und die Adipokinsekretion. Die Hemmung von NNMT durch 1-Methylnicotinamid (1-MN) führte dosisabhängig zu einer Steigerung der Glycerolfreisetzung aus 3T3-L1-Adipozyten im Sinne einer gesteigerten Lipolyse. Die Sekretion von Adiponektin und von Leptin wurde durch 1-Methylnicotinamid nicht messbar verändert. Toxische Wirkungen der Behandlung mit 1-Methylnicotinamid auf die Zellviabilität und die mitochondriale Atmungskette wurden ausgeschlossen. Um die Messwerte unterschiedlich stark ausdifferenzierter Zellkulturpassagen miteinander vergleichen zu können, wurde eine photometrische Methode entwickelt und publiziert. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass NNMT die Lipolyse in Fettzellen reguliert, was zum besseren Verständnis der physiologischen Funktion dieser im Fettgewebe neu entdeckten Methyltransferase beiträgt.

Literatur

- Aksoy, Saime et al. (1994).** „Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 269.20, S. 14835–14840. ISSN: 0021-9258.
- Arita, Yukio et al. (1999).** „Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. 1999“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425.3, S. 560–564. ISSN: 1090-2104. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.08.024.
- Arsenescu, Violeta et al. (2008).** „Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis“. In: *Environmental Health Perspectives* 116.6, S. 761–768. ISSN: 0091-6765. DOI: 10.1289/ehp.10554.
- Bennett, C. Frank et al. (2010).** „RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform“. In: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50, S. 259–293. ISSN: 1545-4304. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654.
- Bennett, Christina N. et al. (2002).** „Regulation of Wnt Signaling during Adipogenesis“. In: *The Journal of Biological Chemistry*. DOI: 10.1074/jbc.M204527200.
- Cantoni, G. L. (1951).** „Methylation of nicotinamide with soluble enzyme system from rat liver“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 189.1, S. 203–216. ISSN: 0021-9258.
- Cheung, Sin Ying et al. (2015).** „Activation of transient receptor potential vanilloid 3 channel suppresses adipogenesis“. In: *Endocrinology* 156.6, S. 2074–2086. ISSN: 1945-7170. DOI: 10.1210/en.2014-1831.

- Deng, Yingfeng et al. (2010).** „Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome“. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1212, E1–E19. ISSN: 1749-6632. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05875.x.
- Erickson, Robin L. et al. (2001).** „p300 coactivates the adipogenic transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276.19, S. 16348–16355. ISSN: 0021-9258.
- Fukushima, T. et al. (1995).** „Radical formation site of cerebral complex I and Parkinson’s disease“. In: *Journal of Neuroscience Research* 42.3, S. 385–390. ISSN: 0360-4012. DOI: 10.1002/jnr.490420313.
- Galic, Sandra et al. (2010).** „Adipose tissue as an endocrine organ“. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 316.2, S. 129–139. ISSN: 1872-8057. DOI: 10.1016/j.mce.2009.08.018.
- Gey, Manfred (1952-) (2015).** *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. 3. Aufl. Springer-Lehrbuch. Berlin [u.a.]: Springer Spektrum. 533 Seiten. ISBN: 978-3-662-46255-3.
- Green, Howard et al. (1974).** „Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid“. In: *Cell* 1.3, S. 113–116. ISSN: 0092-8674. DOI: 10.1016/0092-8674(74)90126-3.
- Hanlon, Paul R. et al. (2003).** „AhR- and ERK-dependent pathways function synergistically to mediate 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 expression and subsequent adipocyte differentiation“. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 189.1, S. 11-27. ISSN: 0041-008X.
- Holm, Cecilia (2003).** „Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis“. In: *Biochemical Society Transactions* 31 (Pt 6), S. 1120–1124. ISSN: 0300-5127. DOI: 10.1042/.
- Humason, Gretchen L. (1962).** *Animal tissue techniques*. San Francisco, W.H. Freeman.

- Janderová, Lenka et al. (2003).** „Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis“. In: *Obesity Research* 11.1, S. 65–74. ISSN: 1071-7323. DOI: 10.1038/oby.2003.11.
- Kannt, Aimo et al. (2015).** „Association of nicotinamide-N-methyltransferase mRNA expression in human adipose tissue and the plasma concentration of its product, 1-methylnicotinamide, with insulin resistance“. In: *Diabetologia* 58.4, S. 799–808. ISSN: 0012-186X. DOI: 10.1007/s00125-014-3490-7.
- Kershaw, Erin E. et al. (2004).** „Adipose tissue as an endocrine organ“. In: *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89.6, S. 2548–2556. ISSN: 0021-972X. DOI: 10.1210/jc.2004-0395.
- Kim, Gi Yong et al. (2016).** „Efficient and reliable screening of anti-obesity agents on a micro-cell pattern chip“. In: *Wiley Online Library*. DOI: 10.1002/jctb.4876.
- Koc, Michal et al. (2015).** „Stress of endoplasmic reticulum modulates differentiation and lipogenesis of human adipocytes“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460.3, S. 684–690. ISSN: 1090-2104. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.090.
- Kraus, Daniel (2014).** „Consolidated data analysis and presentation using an open-source add-in for the Microsoft Excel® spreadsheet software“. In: *Medical Writing*.
- Kraus, Daniel et al. (2014).** „Nicotinamide N-methyltransferase knockdown protects against diet-induced obesity“. In: *Nature* 508.7495, S. 258–262. ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/nature13198.
- Kraus, Nils A. et al. (2016).** „Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture“. In: *Adipocyte* 5.4, S. 351–358. ISSN: 2162-397X. DOI: 10.1080/21623945.2016.1240137.
- Kwon, Hyokjoon et al. (2013).** „Adipokines Mediate Inflammation and Insulin Resistance“. In: *Frontiers in Endocrinology* 4. ISSN: 1664-2392. DOI: 10.3389/fendo.2013.00071.

- Mäuser, Wanda (2007).** *Direkte Statin-Wirkungen auf Adipozyten: Atorvastatin induziert stadienabhängig Apoptose und beeinflusst endokrine und metabolische Fetzellfunktionen.*
- Mori, Eisaku et al. (2016).** „Impaired adipogenic capacity in induced pluripotent stem cells from lipodystrophic patients with BSCL2 mutations“. In: *Metabolism: Clinical and Experimental* 65.4, S. 543–556. ISSN: 1532-8600. DOI: 10.1016/j.metabol.2015.12.015.
- Mosmann, Tim (1983).** „Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays“. In: *Journal of Immunological Methods* 65.1, S. 55–63. ISSN: 0022-1759.
- Ng, Marie et al. (2014).** „Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013“. In: *Lancet (London, England)* 384.9945, S. 766–781. ISSN: 1474-547X. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60460-8.
- Patel, Alpa V. et al. (2014).** „Body Mass Index and All-Cause Mortality in a Large Prospective Cohort of White and Black U.S. Adults“. In: *PloS One* 9.10, e109153. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0109153.
- Ramirez-Zacarias, J. L. et al. (1992).** „Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining with Oil Red O“. In: *Histochemistry* 97.6, S. 493–7. ISSN: 0301-5564. DOI: 10.1007/BF00316069.
- Riederer, Monika et al. (2009).** „Adipose tissue as a source of nicotinamide N-methyltransferase and homocysteine“. In: *Atherosclerosis* 204.2, S. 412–417. ISSN: 1879-1484. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.015.
- Rini, J. et al. (1990).** „Human liver nicotinamide N-methyltransferase: ion-pairing radiochemical assay, biochemical properties and individual variation“. In: *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 186.3, S. 359–374. ISSN: 0009-8981.
- Rosen, Evan D. et al. (2014).** „What we talk about when we talk about fat“. In: *Cell* 156.1, S. 20–44. ISSN: 1097-4172. DOI: 10.1016/j.cell.2013.12.012.

- Rossmeislová, Lenka et al. (2013).** „Weight loss improves the adipogenic capacity of human preadipocytes and modulates their secretory profile“. In: *Diabetes* 62.6, S. 1990–1995. ISSN: 1939-327X. DOI: 10.2337/db12-0986.
- Rudolphi, Bianca et al. (2018).** „Body weight predicts Nicotinamide N-Methyltransferase activity in mouse fat“. In: *Endocrine Research* 43.1, S. 55–63. ISSN: 1532-4206. DOI: 10.1080/07435800.2017.1381972.
- Scheller, Timo et al. (1996).** „Mouse liver nicotinamide N-methyltransferase pharmacogenetics: biochemical properties and variation in activity among inbred strains“. In: *Pharmacogenetics* 6.1, S. 43–53. ISSN: 0960-314X.
- Schmeisser, Kathrin et al. (2013).** „Role of sirtuins in lifespan regulation is linked to methylation of nicotinamide“. In: *Nature Chemical Biology* 9.11, S. 693–700. ISSN: 1552-4469. DOI: 10.1038/nchembio.1352.
- The United States Pharmacopeial Convention, Hrsg. (2015).** *Design and Development of Biological Assays*. URL: http://www.ipqpubs.com/wp-content/uploads/2010/06/USP_1032.pdf.
- van Haren, Matthijs J. et al. (2016).** „A Rapid and Efficient Assay for the Characterization of Substrates and Inhibitors of Nicotinamide N-Methyltransferase“. In: *Biochemistry* 55.37, S. 5307–5315. ISSN: 1520-4995. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00733.
- Wang, Weimin et al. (2015).** „Mitochondrial reactive oxygen species regulate adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells in hematopoietic stress induced by arabinosylcytosine“. In: *PLoS One* 10.3, e0120629. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0120629.
- Wang, Zhao V. et al. (2016).** „Adiponectin, the past two decades“. In: *Journal of Molecular Cell Biology*. ISSN: 1759-4685. DOI: 10.1093/jmcb/mjw011.
- Weltgesundheitsorganisation (2014).** *GLOBAL STATUS REPORT on noncommunicable diseases 2014*. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf (besucht am 06.04.2016).
- Willets, Jonathon M. et al. (1993).** „Neurotoxicity of nicotinamide derivatives: their role in the aetiology of Parkinson's disease“. In: *Biochemical Society Transactions* 21 (Pt 3).3, 299S. ISSN: 0300-5127.

-
- Williams, A. C. et al. (2005).** „Parkinson’s disease: the first common neurological disease due to auto-intoxication?“ In: *QJM: monthly journal of the Association of Physicians* 98.3, S. 215–226. ISSN: 1460-2725. DOI: 10.1093/qjmed/hci027.
- Wilson, Peter W. F. et al. (2002).** „Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience“. In: *Archives of Internal Medicine* 162.16, S. 1867–1872. ISSN: 0003-9926.
- Xu, Yong et al. (2016).** „Expression profile and prognostic value of NNMT in patients with pancreatic cancer“. In: *Oncotarget* 7.15, S. 19975–19981. ISSN: 1949-2553. DOI: 10.18632/oncotarget.7891.
- Yang, Ying et al. (2007).** „Emodin with PPARgamma ligand-binding activity promotes adipocyte differentiation and increases glucose uptake in 3T3-L1 cells“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353.2, S. 225–230. ISSN: 0006-291X. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.11.134.
- Youmans, Hubert L. et al. (1976).** „Selection of optimum ranges for photometric analysis“. In: *Analytical Chemistry* 48.8, S. 1152–1155. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac50002a022.
- Zebisch, Katja et al. (2012).** „Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes“. In: *Analytical Biochemistry* 425.1, S. 88–90. ISSN: 1096-0309. DOI: 10.1016/j.ab.2012.03.005.
- Zhang, Yiying et al. (1994).** „Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue“. In: *Nature* 372.6505, S. 425–432. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/372425a0.

Tabellenverzeichnis

2.1	Geräte	6
2.2	Verbrauchsmaterialien	7
2.3	Chemikalien	9
2.4	Analyssetests	9
2.5	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer	12
2.6	Lysepuffer	13
2.7	Verdünnungsreihe des Glycerolstandards	17
3.1	Überblick über die verschiedenen ORO-Protokolle zur Quantifizierung der Fettzellendifferenzierung.	25

Abbildungsverzeichnis

3.1	Einfluss der 1-MN-Vorbehandlung auf die Zellviabilität	21
3.2	Einfluss der NNMT-Hemmung auf die Laktatsekretion	22
3.3	Oil-Red-O-Färbung in Abhängigkeit des Zellgehaltes beim Typischen Protokoll	24
3.4	Oil-Red-O-Färbung in Abhängigkeit des Zellgehaltes beim Originalprotokoll	26
3.5	Ergebnis des optimierten Oil-Red-O-Tests bei 12-Well-Kulturschalen	27
3.6	Ergebnis des optimierten Oil-Red-O-Tests bei 6-Well-Kulturschalen	28
3.7	Zellentfernung und Farbkonglomerate	29
3.8	Ergebnis des optimierten Oil-Red-O-Tests bei Präadipozyten	30
3.9	Einfluss der NNMT-Hemmung auf die Lipolyserate	31
3.10	Einfluss der NNMT-Hemmung auf die Leptinsekretion	32
3.11	Einfluss der NNMT-Hemmung auf die Adiponektinsekretion	33
4.1	Darstellung des dekadischen Logarithmus	37

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Christoph Wanner für die Bereitstellung des Themas und Herrn Dr. med. Daniel Kraus für die herausragende Betreuung der Dissertation. Auch möchte ich für die wichtige Unterstützung innerhalb meiner sowie der verbundenen Arbeitsgruppen einen gebührenden Dank aussprechen. Anja Sauer, Dr. med. Bettina Kraus, Raphael Pohly, Benedikt Zapp, Bianca Rudolphi, Franziska Ehebauer, Maria Scheurich, Alice Schaaf, Sandra Bandleon, Sonja Hartmann, Nadine Kirschmer, Dr. rer. nat. Petra Eder-Negrin, Sylvia Renker und Margarete Wechner standen mir in labortechnischen Fragestellungen und in vielen Gesprächen zur Seite.

Weiterhin danke ich Julian, Philipp, Anne, Laura, Gerhard sowie Johannes für ihre Hilfsbereitschaft, die guten und interessanten Gespräche und die daraus entstandenen Denkanstöße. Dank gebührt ebenfalls Andrea, die mich darüber hinaus auch bei den Korrekturen unterstützte.

Ein abschließender Dank gilt meiner Familie – insbesondere meinen Eltern –, die mich auf meinem Weg stets ermutigten und mit Rat und Tat unterstützten.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Nils Arne Kraus

Originalveröffentlichungen

2016 Nils A. Kraus, Franziska Ehebauer, Benedikt Zapp, Bianca Rudolphi, Bettina J. Kraus & Daniel Kraus (2016). **Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture.** Adipocyte 5:351-358. DOI: 10.1080/21623945.2016.1240137

2018 Bianca Rudolphi, Benedikt Zapp, Nils A. Kraus, Franziska Ehebauer, Bettina J. Kraus & Daniel Kraus (2018). **Body weight predicts Nicotinamide N-Methyltransferase activity in mouse fat.** Endocrine Research, 43:1, 55-63. DOI: 10.1080/07435800.2017.1381972

Kongressbeiträge

2016 Kraus NA, Rudolphi B, Zapp B, Wanner C, Kraus D (2016). **Valid assessment of lipid content of cultured adipocytes using oil red O.** Diabetes Kongress 2016, Berlin.

- 2016 Rudolphi B, Sauer A, Zapp B, Kraus NA, Wanner C, Kraus D (2016). **Tissue distribution of nicotinamide N-methyltransferase activity in lean and in diet-induced obese mice.** Diabetes Kongress 2016, Berlin.
- 2016 Zapp B, Rudolphi B, Kraus NA, Klein J, Wanner C, Kraus D (2016). **Pharmacological inhibition of nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) in adipocytes by romidepsin.** Diabetes Kongress 2016, Berlin.
- 2016 Zapp B, Kraus NA, Rudolphi B, Kraus BJ, Sauer A, Klein J, Wanner C, Kraus D (2016). **Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT) regulates insulin sensitivity differentially in white and brown adipocytes.** Diabetes Kongress 2016, Berlin.