



**Nicotinamid-N-Methyltransferase (NNMT) als Regulator des Energiehaushalts  
des Menschen: Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der NNMT-  
Aktivität und Anwendung auf humanes Fettgewebe**

***Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) as a regulator in human energy  
metabolism: development of a NNMT activity assay and application on human  
adipose tissue***

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Klinische Wissenschaften  
Vorgelegt von

**Bianca Rudolphi**

aus

**Stuttgart**

Würzburg **2021**

Eingereicht am: .....

Bürostempel

### **Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende: Prof. Dr. med. Heike Rittner**

**1. Betreuer: Prof. Dr. med. Christoph Wanner**

**2. Betreuer: Dr. med. Daniel Kraus**

**3. Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. Oliver Ritter**

**Tag des Promotionskolloquiums: 28.10.2021**

**Doktorurkunden ausgehändigt am: .....**

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eidesstatt, die Dissertation „Nicotinamid-N-Methyltransferase (NNMT) als Regulator des Energiehaushalts des Menschen: Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der NNMT-Aktivität und Anwendung auf humanes Fettgewebe“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt zu haben und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,



## **Publikationen – Originalarbeiten aus dieser Dissertation**

**Rudolphi B**, Zapp B, Kraus NA, Ehebauer F, Kraus BJ & Kraus D (2017). Body weight predicts Nicotinamide-N-Methyltransferase activity in mouse fat. *Endocrine Research*, Oct. 16/1-9/2017

## **Publikationen – Vorträge und Poster aus dieser Dissertation**

**Rudolphi B**, Kraus D (2019). NNMT beim Menschen  
Vortrag. Wissenschaftlichen Klausurtagung der Medizinischen Klinik I, Franken Akademie, Schloss Schney, Februar 2019.

**Rudolphi B**, Seyfried F, Jurowich C, Jakubietz R, Kraus D (2017).  
Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT) in human adipose tissue.  
Vortrag. 60. Deutscher Kongress für Endokrinologie, März 2017, Würzburg.

**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.  
Poster + Vortrag. Diabetes Kongress, Mai 2016, Berlin.

**Rudolphi B**, Jurowich C, Jakubietz R, Kraus D (2015).  
Nicotinamide N-methyltransferase, a novel regulator of energy metabolism in adipose tissue. 15. Poster. Internationales Symposium der Graduate School of Life Sciences  
Oktober 2015, Würzburg.

# Inhaltsverzeichnis

---

1	Einleitung.....	1
1.1	NNMT, Substrate und Produkte .....	3
1.2	Hypothese und Ziele der Arbeit.....	5
2	Material und Methoden.....	6
2.1	Material.....	6
2.1.1	Geräte .....	6
2.1.2	Materialien .....	7
2.1.3	Chemikalien und Lösungen.....	8
2.2	Zellkultur .....	13
2.3	Klinische Studie .....	13
2.3.1	Ein- und Ausschlusskriterien der Probanden .....	14
2.3.2	Empfang und Lagerung der Proben.....	14
2.3.3	Messgrößen und Parameter.....	15
2.3.4	Ethikkommission und Datenschutz .....	15
2.4	Statistik und Programme .....	15
2.5	Analysemethoden.....	16
2.5.1	Lysatherstellung.....	16
2.5.2	Proteinbestimmung.....	17
2.5.3	Aktivitätstest.....	17
2.5.4	Enzymologie von NNMT .....	20
2.5.5	Western Blot.....	21
3	Ergebnisse .....	23
3.1	Entwicklung des Aktivitätstests .....	23

3.1.1	Evaluation der Inkubationszeit von 1-MN mit KOH-EtOH und 20 % Acetophenon.....	23
3.1.2	Evaluation der Inkubationszeit von Ameisensäure .....	25
3.2	Enzymologie von NNMT.....	25
3.2.1	Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante von NNMT für Nicotinamid .....	25
3.2.2	Evaluation der Inkubationszeit der NNMT-Reaktion .....	26
3.3	Klinische Studie .....	27
3.3.1	Parameter der Patienten .....	27
3.3.2	NNMT-Aktivität im subkutanen Fettgewebe und Omentum majus .....	29
3.3.3	Korrelation der Proteinmenge und der NNMT-Aktivität.....	32
3.3.4	Korrelation des BMI mit der NNMT-Aktivität.....	33
3.3.5	Korrelation von Diabetes mellitus Typ 2 und der NNMT-Aktivität .....	34
4	Diskussion.....	35
5	Zusammenfassung/Conclusion .....	40
6	Literaturverzeichnis.....	42
7	Abbildungsverzeichnis.....	47
8	Abkürzungsverzeichnis.....	49

# 1 Einleitung

---

Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 stellen ein zunehmendes gesamtgesellschaftliches Problem dar [1,2]. Die Prävalenz hat sich seit 1980 verdreifacht und steigt stetig weiter an [3,4]. Die Gründe für die Entstehung der Adipositas sind vielfältig. Es handelt sich um ein multifaktorielles Geschehen, dem eine dysregulierte Energiehomöostase zugrunde liegt [5]. Das Fettgewebe ist hier der zentrale Punkt des Interesses, da es als endokrines Organ einen großen Einfluss auf den Stoffwechsel der Zelle und des Organismus hat [6].

Vor kurzem wurde die Nicotinamid-N-Methyltransferase (NNMT) als neuer Regulator des Energiegleichgewichts im Fettgewebe beschrieben [7]. Bisher stand vor allem die NNMT-Expression in Nagetieren im Focus des Interesses. Hier wird es als neuartiger Regulator des Energiemetabolismus von Mäusen deklariert, da es vor allem im Fettgewebe einen starken Einfluss auf den Grundumsatz der Zelle hat [7]. Kraus et al. zeigte, dass die NNMT-Expression in adipösen Mäusen im Vergleich zu schlanken Mäusen erhöht ist. Mit einem NNMT-Knockdown konnte eine signifikante Fettgewebsreduktion in vorher adipösen Mäusen im Vergleich zu Kontrollen erreicht werden. Dies beruhte auf einem erhöhten Energieumsatz des Fettgewebes. Zugleich schützt die Suppression der NNMT-Expression vor ernährungsbedingter Adipositas.

Im Menschen ist bislang nur wenig über die Rolle von NNMT in der Energiehomöostase bekannt. In einer klinischen Studie wurden aus einer Population von Pima-Indianern, die eine der höchsten Prävalenzen für Adipositas besitzen, zahlreiche Gene aus subkutanen Fettgewebsbiopsien transkribiert, um Unterschiede zwischen adipösen und nicht adipösen Pima Indianern aufzuzeigen. Hier imponierte eine Hochregulation von inflammatorischen und Adipositas-assoziierten Genen im Fettgewebe der adipösen im Vergleich zu den nicht adipösen. Hierunter fand sich auch NNMT [8]. Einen weiteren, wenngleich indirekten Anhalt auf eine veränderte NNMT-Expression bei dysregulierter Energiehomöostase, lieferte eine Studie, die sich mit diversen Metaboliten im Urin von Diabetikern gegenüber gesunden Probanden befasste. Es imponierte eine erhöhte

Konzentration des Produkts von NNMT (1-Methylnicotinamid) im Urin und im Serum in der Gruppe der Diabetiker im Vergleich zu den Nicht-Diabetikern [9]. Unklar bleibt jedoch, ob eine vermehrte Produktion ursächlich ist oder ob eine geringere Clearance des Metaboliten besteht.

Nur wenig ist derzeit aber über die NNMT-Expression in humanem Fettgewebe und noch gar nichts über die *Aktivität* dieses Enzyms im Kontext mit menschlicher Adipositas bekannt. Sollte hier ein Unterschied zwischen adipösen und nicht adipösen Patienten vorliegen, könnte NNMT ein neuer pharmakologischer Angriffspunkt zur Therapie von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 sein.

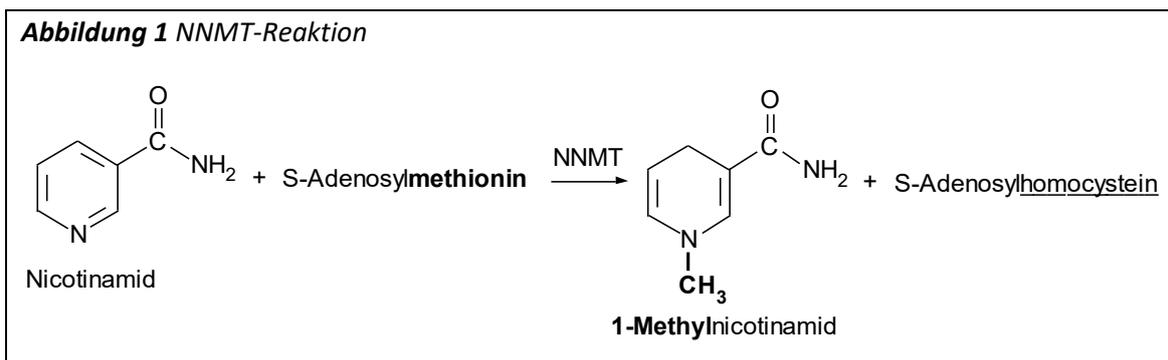
Zur Messung der NNMT-Aktivität existieren zahlreiche Assays. Die Pionierarbeit leisteten Weinshilbom et al. [10]. Sie entwickelten einen radioaktiven Test zur Bestimmung der NNMT-Aktivität, der es ermöglichte, das Reaktionsprodukt 1-[C14]-Methylnicotinamid nachzuweisen. Hierbei fällt jedoch radioaktiver Abfall an, der sehr aufwendig zu entsorgen ist. Eine alternative Methode ist der chromatographische und massenspektrometrische Nachweis von 1-Methylnicotinamid, welches bei einer enzymatischen Reaktion gebildet wird [11]. Zwar ist diese Methode spezifisch und ermöglicht einen hohen Probendurchsatz, jedoch hat sie den Nachteil, dass ein kompliziertes laboratorisches Equipment und anspruchsvolles technisches Knowhow erfordert wird, um zahlreiche aneinander gekoppelte Schritte durchführen zu können. Das Phänomen, dass 1-MN mit Ketonen im alkalischen Milieu ein gelbliches fluoreszierendes Produkt bildet, wurde bereits 1947 von Huff et al. und in weiteren Publikationen beschrieben [12–14]. Weiterentwicklungen erfolgten durch verschiedene Autoren, bis ein auf Fluoreszenz-basierender Aktivitätstest entwickelt war [15,16]. Diese Vorarbeiten sind die Basis für die Entwicklung und Evaluation einer, einfach durchzuführenden und mit einer hohen Durchlaufleistung, fähigen Methode zur Messung der Aktivität in humanen Fettgewebshomogenisaten, welche in der vorliegenden Dissertation beschrieben wird.

## 1.1 NNMT, Substrate und Produkte

NNMT ist eine Methyltransferase im Zytosol von diversen Gewebearten [17]. Vor allem zeigt sich eine starke Expression von NNMT im Leber- und Fettgewebe [17–19]. Zusätzlich wurden Veränderungen in der NNMT-Expression in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen [20–24]. Auch in neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel M. Parkinson, konnte eine vermehrte Expression des Enzyms gezeigt werden [25–27].

Die Aufgabe von NNMT besteht in der Methylierung von Nicotinamid mit Hilfe des Co-Substrats S-Adenosylmethionin (SAM) zu 1-Methylnicotinamid (1-MN) und S-Adenosylhomocystein (SAH) (Abbildung 1) [17–19].

1-MN und SAH hemmen über einen negativen Feedback das Enzym NNMT [11,17,28,29].

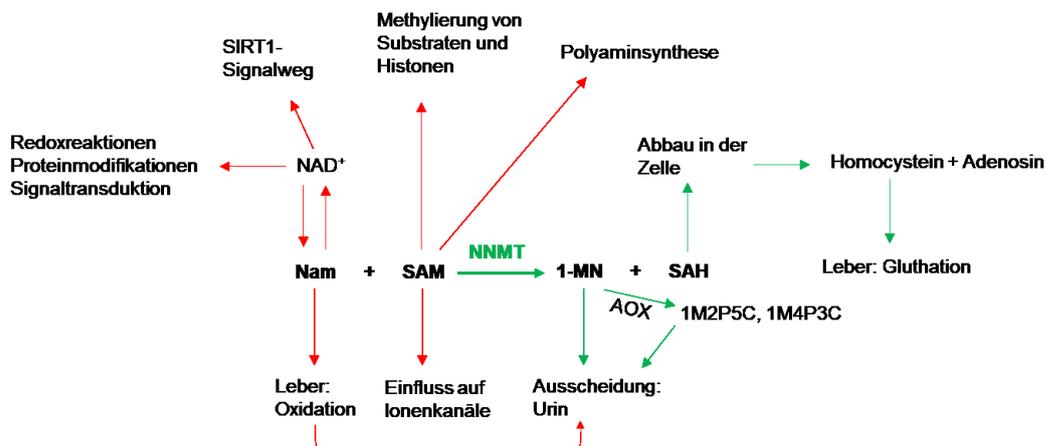


Nicotinamid ist das affinste Substrat für NNMT in der Schweine- und Rattenleber [16,30]. Es steigt bei Inhibition von NNMT in der Fettzelle nicht an, da es zu einer Gleichgewichtsreaktion von Nicotinamidadenosindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) und Nicotinamid kommt [7].  $\text{NAD}^+$  wird hierbei in verschiedenste Redoxreaktionen der Zelle (z.B. Atmungskette, Fettstoffwechsel) geschleust und steht als Coenzym bei Proteinmodifikationen und bei der Signaltransduktion zur Verfügung [31]. Auch fungiert es als Cofaktor für den Sirtuin(SIRT)1-Signalweg [32]. Nicotinamid kann in der Leber über CYP2E1 zu Nicotinamid-N-oxid oxidiert und dann über den Urin ausgeschieden werden. SAM hingegen steigt bei Inhibition von NNMT im Fettgewebe an und wird in die Polyaminsynthese eingebracht, wodurch vermehrt polykationische Proteine produziert werden [7,33]. Des Weiteren dient es als Methyl donor zur Methylierung von Substraten

und Histonen im Zellkern [31]. Außerdem wird die Genexpression angeregt und auch ein Einfluss auf Ionenkanäle wird beschrieben [7,33,34]. Durch fehlendes oder zu niedriges Substratangebot, stellt NNMT die Funktion ein und nimmt die Methylierung erst bei ausreichenden SAM-Konzentrationen wieder auf [35].

Diese zahlreichen Reaktionsmöglichkeiten der beiden Substrate, die den Zellstoffwechsel beeinflussen, führen zu einem erhöhten Energieverbrauch der Zelle [7]. 1-Methylnicotinamid kann über eine Aldehydoxidase zu N1-Methyl-2-pyridon-5-carboxamid und N1-Methyl-4-pyridon-3-carboxamid oxidiert oder direkt über den Urin ausgeschieden werden [9,13,36]. S-Adenosylhomocystein wird zu Homocystein und Adenosin reversibel mit Hilfe einer SAH-Hydrolase abgebaut [37]. Des Weiteren kann Homocystein über eine Vitamin B6-abhängige Reaktion in der Leber zu Gluthation abgebaut werden [38]. (Abbildung 2)

**Abbildung 2** Stoffwechselwege der Substrate und Produkte von NNMT



Bei Inhibition der NNMT-Reaktion stehen die Substrate Nam und SAM dem Stoffwechsel der Zelle zur Verfügung (rote Pfeile). Bei der NNMT-Reaktion werden die Produkte weiter in der Zelle verarbeitet und abgebaut (grüne Pfeile). Nam = Nicotinamid, AOX = Aldehydoxidase, 1M2P5C = 1-Methyl-2-pyridon-5-carboxamid, 1M4P3C = 1-Methyl-4-pyridon-3-carboxamid.

## **1.2 Hypothese und Ziele der Arbeit**

Die vorliegende Dissertation hatte zum Ziel, eine Methode zum Nachweis der NNMT-Aktivität zu entwickeln und diese auf humanes Fettgewebe anzuwenden. Im Rahmen des Projektes sollte dann untersucht werden, ob es Unterschiede in der Expression und vor allem in der Aktivität des Enzyms NNMT im Fettgewebe von adipösen, nicht adipösen und ehemals adipösen Patienten gibt.

Spezifische Ziele waren:

- I. Entwicklung einer fluorometrischen Methode zum Nachweis der NNMT-Aktivität
- II. Charakterisierung der Enzymologie von NNMT anhand der Zellkultur
- III. Anwendung des entwickelten Aktivitätstests in einer klinischen Studie mit der Frage, ob die NNMT-Aktivität in adipösen im Vergleich zu nicht adipösen und ehemals adipösen Patienten erhöht ist

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 1** Geräte

Geräte	Typbezeichnung	Hersteller
Autoklav	VE-75	Systemec, Linden
CO <sub>2</sub> -Inkubator	CB160	Binder, Tuttlingen
Computer	HP	HP, Wilmington, USA
Dewargefäß	-	Nalgene
Dispergiergerät	IKA T25 digital Ultra-Turrax	IKA, Staufen
Feinwaage Electronic Balance	Typ ABS120-4	Kern und Sohn, Balingen-Frommern
Fluorometer	Victor III	Perkin Elmer, Rodgau
Gefrierschrank	bioline	Gram, Vojens, Dänemark
Kühlschrank	bioline	Gram, Vojens, Dänemark
Lichtmikroskop	Wilovert 30	Hund, Wetzlar
Multipipette	Multipipette E3	Eppendorf, Hamburg
Orbitalshaker	REAX3	Heidolph, Schwabach
pH-Meter	pH 537	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim
Photometer	ASYS UVM 340	biochrom, Cambridge, England
Pipetten	Research Einkanal 0,1-2,5 µl	Eppendorf, Hamburg
	Research Einkanal 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg
	Research Einkanal 2-20 µl	Eppendorf, Hamburg
	Research Einkanal 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg
	Research Einkanal 20-200 µl	Eppendorf, Hamburg
	Research Einkanal 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Transferpipette-12 200 µl	Brand, Wertheim
Präzisionswaage	Kern 440-33	Kern & Sohn, Balingen
Quartztimer	KM 15	A. Hartenstein, Würzburg
Reagenzglasschüttler (Vortexer)	L46	A. Hartenstein, Würzburg
Scanner	9000F Mark II	Canon, Krefeld
Sterile Arbeitsbank	HS18	Heraeus, Hanau
Trockenschrank	Modell 700	Memmert, Schwabach

Zentrifugen	Heraeus Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
	Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen
	Micro Centrifuge SD	Roth, Karlsruhe
	Mikro 20	Hettich, Tuttlingen

## 2.1.2 Materialien

<b>Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien</b>		
<b>Material</b>	<b>Typbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
96-Well-Mikrotiterplatte	Weiß 821.581	Sarstedt, Nümbrecht
	Schwarz BR. 781611	Brand, Wertheim
96-Well-Mikrotiterplatte Deckel	821.584	Sarstedt, Nümbrecht
Alufolie	AF50	A. Hartenstein, Würzburg
Criterion Blotter	Criterion	Biorad, Hercules, USA
Criterion Empty Cassetes (Western Blot Kasette)	Criterion Empty Cassetes 18 + 2 Well	Biorad, Hercules, USA
Criterion Vertical Electrophoresis Cell (Gelelektrophoresekammer)	-	Biorad, Hercules, USA
Ecomax X-Ray Film Processor	Ecomax	Protec
Einmalkanülen	Neojeckt EU01	A. Hartenstein, Würzburg
Einmalskalpell	5518059	Braun, Rottweil
Faltenfilter	FF18	A. Hartenstein, Würzburg
Filterpapier (Blotting Filter Paper)	1704085	Biorad, Hercules, USA
Insulinspritzen	Omnican 40	Braun, Rottweil
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
Labor- und Hygienetücher	zetBox	ZVG, Troisdorf
Latexhandschuhe	micro touch	Ansell, Iselin, USA
Maßband	180 cm	Akula Medizintechnik, Lauf a.d. Pegnitz
Mikroliterspritze Hamilton	705N/80500	A. Hartenstein, Würzburg
Mundschutz (Gummibandgesichtsmaske)	1826	3M Health Care Deutschland, Neuss
Nitrilhandschuhe	Microflex xceed	Starlab, Hamburg
Nitrocellulosemembran	Whatman Protran BA 83 Membran,	GE Healthcare, Little Chalfont, England
Pinzette	-	A. Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen	Pipettenspitze 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht
	Pipettenspitze 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
	Pipettenspitze 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht

Pipettierhelfer	accu-jet pro	Brand, Wertheim
Power Supply PowerPac HC	-	Biorad, Hercules, USA
Präzisionstücher	Kimtech 05511	Kimberly-Clark Professional, Koblenz
Reaktionsgefäße	SafeSeal Gefäß 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
	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
Röntgenfilm	13x18 cm Fuji Film Super RX	Fuji Film, Tokio, Japan
Serologische Pipetten	Pipette 5 ml	steril Greiner Bio-One, Frickenhausen
	Pipette 10 ml	Frickenhausen
	Pipette 25 ml	
Sterilfiltereinheit	Nalgene Rapid-Flow	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vernichtungsbeutel	VB20	A. Hartenstein, Würzburg

### 2.1.3 Chemikalien und Lösungen

**Tabelle 3** Chemikalien und Lösungen

Chemikalien	Hersteller
1-Methylnicotinamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
30 % Acrylamid	Biorad, Hercules, USA
Absolutes Ethanol (99 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acetophenon	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ameisensäure	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Rabbit IgG HRP linked Antibody (Sekundärantikörper)	Cell Signaling, Danvers, USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua ad injectabilia	Braun, Rottweil
Aqua destillata	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromophenolblau	Roth, Karlsruhe
Chemifluoreszenz (Western Lightning Enhanced Luminol Reagent)	Perkin Elmer, Rodgau
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eis	Universitätsklinikum, Würzburg
fettfreies BSA (Rinderalbumin)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma- Aldrich, Steinheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kochsalz (NaCl)	Braun, Rottweil
Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)	Braun, Rottweil
KOH (Kaliumhydroxid) Flocken	Sigma-Aldrich, Steinheim

Kupfer-II-Sulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Milchtrockenpulver	Cell Signaling, Danvers, USA
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdiphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nicotinamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PI3 Kinase p85 Rabbit Antibody (Primärantikörper)	Cell Signaling, Danvers, USA
Ponceau Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinmarker (Precision Plus Protein Kaleidoscope)	Biorad, Hercules, USA
S-Adenosylmethionin	Denestra, Union City, USA
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Stickstoff	Universitätsklinikum, Würzburg
Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth, Karlsruhe
Tris-Cl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trockeneis	Universitätsklinikum, Würzburg
Tween	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.1.3.1 Spezielle Chemikalienmixturen

#### a) Aktivitätstest

**Tabelle 4** Substratmix

Substratmix
Nicotinamid-Vorratslösung (1 mol/l) (in Aqua dest.) und SAM-Vorratslösung (100 mmol/l) (in 0,1 mM Schwefelsäure) im Verhältnis 2:1

**Tabelle 5** 20 % Acetophenon

20 % Acetophenon
Acetophenon mit absolutem Ethanol im Verhältnis 1:5

**Tabelle 6** 2 M Kalilauge in Ethanol (KOH-EtOH)

KOH-EtOH
2 M KOH in absolutem Ethanol (1,4 g KOH in 2 ml Aqua dest. versetzen und 11,5 ml 99 % Ethanol hinzufügen)

**Tabelle 7** Fluoreszenzmix

Fluoreszenzmix
KOH-EtOH + 20 % Acetophenon im Verhältnis 1:1

**Tabelle 8** Lysepuffer

Lysepuffer (pH = 7,4)		
Für 100 ml:	Konzentration	Volumen [ml]
Tris-Cl	1000 mM	2
EDTA	500 mM	1
Natriumdiphosphat	100 mM	10
Natriumfluorid	1000 mM	10
Igepal CA-630	10 mM	10
Hinzufügen von 65 ml Aqua dest.		
Aprotinin	10 mg/ml	0,067
Leupeptin	10 mg/ml	0,067
Natriumorthovanadat	100 mM	2
Aliquotieren à 10 ml, Lagerung bei -20 °C		
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	100 mM	100x verdünnen in Isopropanol, aliquotieren à 100 µl, Lagerung bei -20 °C
PMSF im Verhältnis 1:100 bei Verwenden des Lysepuffers frisch hinzufügen.		

b) Western Blot

**Tabelle 9** Laemmli-Puffer

<b>Laemmli-Puffer, 4 x konzentriert („Sample Buffer“)</b>		
Für 20 ml:	Masse/Volumen	Konzentration im 4x-Puffer
2 M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml	250 mmol/l
20 % SDS	8 ml	8 %
Glycerol	8 ml	40 %
DTT (MW 154,3)	1,234 g	400 mmol/l
Bromphenolblau	1 Spatelspitze	
Aqua dest.	1,5 ml	
Lagerung bei -20 °C in Aliquots à 300 µl		

**Tabelle 10** SDS-Polyacrylamid-Gel

<b>SDS-Polyacrylamid-Gel</b>		
	Sammelgel 4 % (5 ml)	Trenngel 12 % (14 ml)
30 % Acrylamid/bis	0,66 ml	5,6 ml
0,5 M Tris-Cl, pH 6,8	1,26 ml	-
1,5 M Tris-Cl, pH 8,8	-	3,5 ml
10 % SDS	50 µl	140 µl
Aqua dest.	3 ml	4,7 ml
TEMED	5 µl	7 µl
10 % APS	25 µl	70 µl

**Tabelle 11** Laufpuffer

<b>Laufpuffer, 10 x konzentriert</b>		
Für 1000 ml:	Masse/Volumen	Konz. im 10x-Puffer
Tris-Base	30,3 g	250 mmol/l
Glycin	144,0 g	1,918 mol/l
20 % SDS	50 ml	1 %
Aqua dest.	Ad 1000 ml	
Lagerung bei 4 °C		

**Tabelle 12** Transferpuffer

<b>Transferpuffer, 10 x konzentriert</b>		
Für 1000 ml:	Masse/Volumen	Konz. im 10 x-Puffer
Tris-Base	30,3 g	250 mmol/l
Glycin	144,0 g	1,918 mol/l
Aqua dest.	900 ml, dann auf 1000 ml auffüllen	
Lagerung bei 4 °C		
Beim Verdünnen des 10x-Konzentrat, Hinzufügen von 20 % Methanol und anschließend mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.		

**Tabelle 13** Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (TBS), 10 x konzentriert

<b>TBS, 10 x konzentriert</b>		
Für 1000 ml:	Masse/Volumen	Konz. im 10 x-Puffer
Tris-Base	24,23 g	200 mmol/l
NaCl	87 g	1,49 mol/l (8,7 %)
Aqua dest.	Ad 1000 ml; pH 7,4 einstellen	

**Tabelle 14** TBS mit Tween (TBS-T)

<b>TBS-T</b>		
Für 1000 ml:	Masse/Volumen	Konz. im 10 x-Puffer
10x TBS	100 ml	200 mmol/l
Tween	500 µl	0,05 %
Aqua dest.	Ad 1000 ml; pH 7,4 einstellen	

**Tabelle 15** Stripping-Puffer

<b>Stripping-Puffer</b>		
Für 10 ml:	Volumen	Endkonzentration
20 % SDS	1 ml	2 %
1 M Tris-Cl, pH 6,8	625 µl	62,5 mmol/l
β-Mercaptoethanol	75 µl	7,5 %
Aqua dest.	8,3 ml	
Membran mit Stripping-Puffer bei 50 °C für 30 min schwenkend inkubieren.		

## 2.2 Zellkultur

Für die Zellkultur-Experimente wurden 3T3-L1-Adipozyten verwendet. Die Zellkultur mit 3T3-L1-Adipozyten wurde von einer technischen Assistentin durchgeführt. Die reifen Zellen wurden durch die Verfasserin für die Versuche verwendet.

## 2.3 Klinische Studie

Bei der klinischen Studie handelt es sich um eine monozentrische analytische Querschnittsstudie, die in Kooperation mit den beiden Chirurgischen Kliniken des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt wurde.

Für die klinische Studie wurden im Rahmen eines elektiven bauchchirurgischen Eingriffs jeweils ca. 1 cm<sup>3</sup> große Biopsien von subkutanem und viszeralem (Omentum majus) Fettgewebe von adipösen und nicht adipösen Patienten entnommen und anschließend analysiert. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte bei Vorstellung in der chirurgischen Ambulanz zur Vorbereitung auf die geplante Operation. Diese mündliche Aufklärung erfolgte durch den operierenden Arzt und die Einwilligung oder die Ablehnung zur Studie wurde schriftlich auf einem separaten Formular mit Unterschrift dokumentiert. Der Patient erhielt unmittelbar eine Kopie der Aufklärung.

Die Fallzahlberechnung beruht auf der relativ konsistent 2-fach höheren Expression von NNMT, welche in verschiedenen Modellen nachgewiesen wurde [7,8]. Zum einen von Kraus et al. 2014, wobei hier die NNMT-Proteinmessungen im Fettgewebe von Mäusen herangezogen wurden [7]. Zum anderen auch die Studie von Lee et al. 2005, bei der unter anderem eine quantitative PCR für NNMT im subkutanem Fettgewebe von Pima-Indianern durchgeführt wurde [8]. Dabei errechnet sich eine Effektgröße  $f = 0,685$ , welche für 4 Gruppen mit einem Freiheitsgrad a priori, eine Gesamtprobandenzahl von 30 bzw. gerundet 32 ergibt. Somit lässt sich eine Power von 0,95 erreichen. Es wurde eine gleiche Verteilung mit je 8 adipösen Männern und Frauen, sowie je 8 nicht adipösen Männer und Frauen angestrebt. Zusätzlich wurden Fettgewebeproben, welche im Rahmen von plastisch-chirurgischen Fettschürzenreduktionen bei ehemals adipösen Patienten, die nach bariatrischer Operation eine erhebliche Gewichtsreduktion erfahren hatten, analysiert. Auch diese Patienten hatten in die wissenschaftliche Verwendung

ihres nun überschüssigen subkutanen Fettgewebes eingewilligt. Omentum-majus-Proben wurden diesen, nur plastisch operierten Patienten, nicht entnommen.

### **2.3.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Probanden**

Die Einschlusskriterien für die drei Probandengruppen waren volljährige, einwilligungsfähige Patienten mit elektivem bariatrischen (Roux-en-Y-Bypass, Magensleeve), abdominellen (Cholezystektomie, Sigmaresektion, Ileostoma-Anlage, Hernien-Operation oder explorative Laparoskopie) oder plastischen (Abdominoplastik, zirkulärer Bodylift) Eingriffen. Definiert wurde die Gruppe der adipösen Patienten mit einem Body-Mass-Index (BMI) von  $\geq 40 \text{ kg/m}^2$  und die nicht adipösen mit einem BMI von  $\leq 30 \text{ kg/m}^2$ . Die ehemals adipösen Patienten wurden aufgrund ihrer zweizeitigen Operation eingeschlossen, unabhängig des BMIs.

Es wurden vier Ausschlusskriterien festgelegt: Nicht-Einwilligungsfähigkeit, Minderjährigkeit, Tumorleiden oder das Vorhandensein einer chronisch parenchymatösen Lebererkrankung. Bei Vorliegen einer dieser Ausschlusskriterien konnte keine Rekrutierung erfolgen.

### **2.3.2 Empfang und Lagerung der Proben**

Die Proben wurden während der Operation entnommen und jeweils in ein 50 ml-Probenröhrchen verpackt. Unmittelbar danach wurden die Proben an der Operationsschleuse entgegengenommen, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und ins Labor transportiert. Auf Trockeneis erfolgte die Aliquotierung und Verpackung in 2 ml-Reaktionsgefäße. Die Lagerung erfolgte bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **2.3.3 Messgrößen und Parameter**

Zusätzlich zu den Fettgewebsbiopsien wurden anthropometrische Daten und Laborwerte aus dem universitätsinternem Verwaltungssystem erhoben. Es erfolgten keine zusätzlichen Blutentnahmen. Postoperativ wurden der Hüft- und Taillenumfang nach den WHO-Richtlinien gemessen [39]. Hier soll der Taillenumfang als Mittelpunkt zwischen der Crista iliaca und dem unteren Rippenbogen gemessen werden. Der Hüftumfang beschreibt den breitesten Umfang des Gesäßes. Dieser muss parallel zum Boden und in Expiration gemessen werden. Die Messung sollte zwei Mal durchgeführt werden [39].

### **2.3.4 Ethikkommission und Datenschutz**

Das Studienprotokoll wurde der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Würzburg vorgelegt und genehmigt. Es erfüllt die Kriterien der Deklaration von Helsinki mit Stand von Oktober 2013. Nach Erhalt der Proben ist durch Anonymisierung kein Rückschluss auf die Identität der Probe mehr möglich.

## **2.4 Statistik und Programme**

Die Statistische Auswertung erfolgte mit Excel anhand eines Add-ins („Daniel’s XL Toolbox“) [40]. Die statistische Signifikanz wurde mit einer Varianzanalyse (ANOVA) berechnet, wobei  $p < 0,05$  als signifikant eingestuft wurde. Als Post-hoc-Test der Signifikanz zwischen den Gruppen wurde die Bonferroni-Holm-Methode verwendet.

Zusätzlich erfolgte zur Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante die Verwendung des StatistikProgramms „R“.

Die Berechnung der Power erfolgte mit Hilfe des Programmes G\*Power, Version 3.1.9 [41].

Die Strukturformeln wurden mit dem Programm „Chemograph Plus“ erstellt.

Die Auswertung des Western Blots erfolgte mit Hilfe des Programms „ImageJ!“.

## **2.5 Analysemethoden**

Im folgenden Kapitel werden die Methode zur Bestimmung der NNMT-Aktivität (sog. Aktivitätstest), sowie die Herstellung des hierfür benötigten Lysats aus der Zellkultur und der humanen Proben, beschrieben. Anschließend erfolgt die Erläuterung der Analysemethoden zur Bestimmung der Enzymologie von NNMT. Zur quantitativen Bestimmung der Proteinmenge erfolgt abschließend die Beschreibung des Western-Blot-Protokolls.

### **2.5.1 Lysatherstellung**

#### **2.5.1.1 Zellkultur**

Die zu lysierenden Wells mit den 3T3-L1-Adipozyten wurden zunächst zwei Mal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und auf Eis gelagert. Anschließend wurde Lysepuffer in die Wells gegeben. Mit einem Schaber wurden die Zellen abgenommen und als Suspension in ein 15-ml-Proberöhrchen überführt. Nach 10-minütigen Schütteln bei 4 °C erfolgte die erneute Überführung in neue 2 ml-Reaktionsgefäße und das anschließende Zentrifugieren für 10 min bei 13000 U/min. Mit einer Insulinspritze wurde das fertige Lysat unter dem Fettpellet entnommen und in neue 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Das Fettpellet wurde verworfen. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung oder die Lagerung bei -80 °C.

#### **2.5.1.2 Humane Proben**

Die humanen subkutanen und viszerale Fettgewebsproben wurden aus dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und zunächst auf Eis (4 °C) gelagert. Anschließend wurden die Proben mit einer geeichten Feinwaage gewogen. Um grobe Blutverunreinigungen der Proben zu beseitigen, wurden diese mit gekühlter (4 °C) physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,09 %) ein bis zwei Mal gewaschen. Darauffolgend erhielt jede Probe gewichtsadaptiert, 0,7 – 1,0 ml Lysepuffer und wurde mit einem Stabdispergiergerät für 90 s auf Eis homogenisiert. Nach 10-minütiger schüttelnder Inkubation bei 4 °C erfolgte die erneute Überführung in neue 2 ml-Reaktionsgefäße und das anschließende Zentrifugieren für 10 min bei 13000 U/min. Mit einer Insulinspritze wurde das fertige Lysat unter dem Fettpellet entnommen und in neue 2 ml-

Reaktionsgefäße überführt. Das Fettpellet wurde verworfen. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung.

### 2.5.2 Proteinbestimmung

Zur Ermittlung der Proteinmenge und zur Normierung der Proben erfolgte ein Protein-Bicinchoninsäure-Assay (BCA). Dieser basiert auf einer Bindung von Kupfer-Ionen an Proteinen und anschließender Anlagerung von Bicinchoninsäure, wobei es zu einem Farbumschlag kommt [42,43]. In eine 96-well Mikrotiterplatte wurde eine Standardreihe mit Bovinem Serumalbumin (BSA 10 mg/ml) in Konzentrationen von 0 mg/ml bis 10 mg/ml (0 bis 10 µl) vorgelegt. Das Lysat der Proben wurde in Duplikaten à 10 µl und à 5 µl ebenfalls in die 96-well Platte aufgetragen. Anschließend wurden alle Wells mit Lysepuffer auf insgesamt 10 µl aufgefüllt. Für die photometrische Messung der Proteinkonzentration wurde ein Reaktionsgemisch aus Bicinchoninsäure und Kupfer-II-Sulfat (im Verhältnis 1:50) hergestellt und je 100 µl in die Wells überführt. Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation der 96-well Platte bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Eine lila Farbreaktion zeigte sich in den Wells. Die photometrische Messung erfolgte bei 562 nm. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde anhand der Standardkurve berechnet.

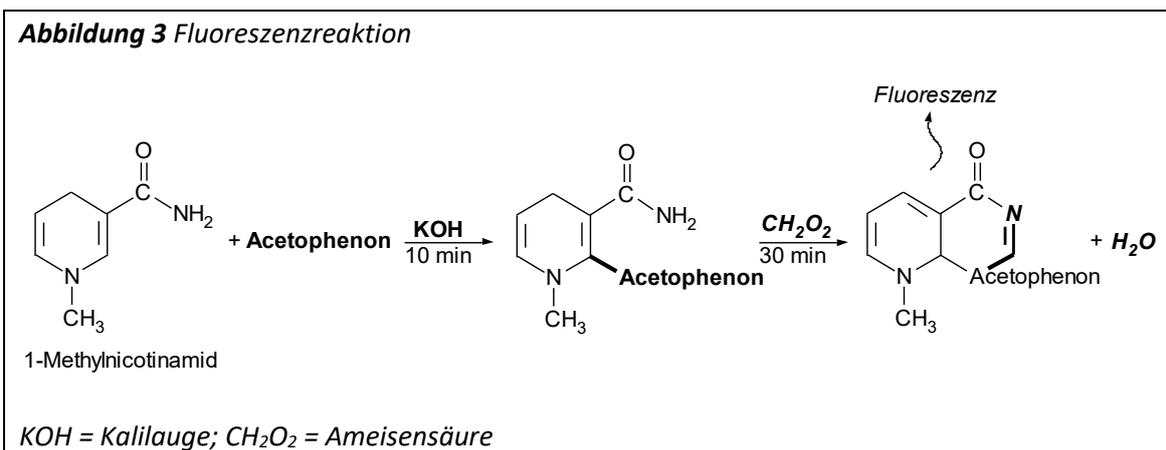
### 2.5.3 Aktivitätstest

Das im Folgenden präsentierte Versuchsprotokoll stellt die Endversion des von der Verfasserin entwickelten Aktivitätstests dar [44]. Mithilfe der Proteinbestimmung erfolgte die Normierung der Lysate auf eine Proteinmenge von 2 bis 3 g/l (je nach vorhandener Gewebsmenge) in einem Gesamtvolumen von 450 µl. In eine neue 96-well Mikrotiterplatte mit durchsichtigem Boden wurden jeweils zwei Reaktionswells und Nullproben mit je 100 µl angelegt. Die Reaktionswells erhielten zunächst je 3 µl Substratmix und wurden anschließend mit 97 µl des normierten Lysats aufgefüllt. Die Nullproben erhielten nur 97 µl Lysat ohne Substratmix. Es folgte eine 60-minütige Inkubation bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Währenddessen erfolgte das Präparieren der 1-MN Standardkurve aus einem 1:1-Gemisch von Lysepuffer und 1-MN, ausgehend von 50 µmol/l mit insgesamt zwölf Verdünnungsstufen, inklusive einer Nullprobe. Diese

Verdünnungsreihe wurde mit je 30 µl in Duplikaten in eine neue schwarze 96-well Mikrotiterplatte mit durchsichtigem Boden überführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit erhielten die Nullproben 3 µl des Substratmix und es wurden je 30 µl der Reaktionswells und der Nullproben, unter Auf- und Abpipettieren, in die bereits vorbereitete 96-well Platte mit der 1-MN-Verdünnungsreihe übertragen. Daraufhin wurden 120 µl pro Well des Fluoreszenzmix (KOH-EtOH und 20 % Acetophenon im Verhältnis 1:1) hinzugefügt und abgedunkelt bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Ameisensäure zum Vollenden der gelblichen Farbreaktion hinzugegeben und weiterhin abgedunkelt, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (

Abbildung 3). Die Fluoreszenz-Messung erfolgte mit dem Fluorometer bei  $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$  (0,5 s) [15]. Die abschließende Berechnung der NNMT-Aktivität erfolgte anhand der Fluoreszenzwerte der Verdünnungsreihe und der daraus ermittelten 1-MN Konzentrationen.

Die SI-Einheit der Enzymaktivität ist [ $\mu\text{mol}/\text{min} = \text{Units (U)}$ ] entsprechend der spezifischen katalytischen Aktivität mit [ $\text{U}/\text{mg}$ ] angegeben. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte bei Aktivitätswerten im pmol-Bereich entsprechend [ $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg Protein} = \text{pU}/\text{mg}$ ].



### 2.5.3.1 Evaluation der Inkubationszeit von 1-MN mit KOH-EtOH und 20 % Acetophenon

In diesem Versuchsaufbau soll die optimale Inkubationszeit und die Reihenfolge der für die Fluoreszenzreaktion benötigten Chemikalien ermittelt werden, um etwaige Interaktionen zu erkennen und die besten Fluoreszenzwerte zu erzielen [44]. Zunächst soll die Wirkung von alleiniger Inkubation von 1-MN mit KOH für 0, 15, 30, 60 min und anschließender Zugabe von 20 % Acetophenon, sowie die simultane Gabe von KOH-EtOH und 20 % Acetophenon (= Fluoreszenzmix) für 10 min und 70 min abgedunkelter Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Fluoreszenzmix, evaluiert werden. Initial erfolgte die Vorbereitung der Verdünnungsreihe von 1-MN in 2-ml Reaktionsgefäßen mit drei Konzentrationen (100, 50, 0 µM) in Triplikaten für fünf Zeitpunkte. Anschließend wurden diese mit je 30 µl in eine 96-well Mikrotiterplatte mit durchsichtigem Boden übertragen. Dann wurden 60 µl KOH-EtOH zu den Proben für die genannten Inkubationszeiten hinzugegeben. Erst nach Ablauf der Zeitspanne wurden 60 µl des 20 % Acetophenons hinzugefügt und die Proben wurden, für 10 min abgedunkelt bei Raumtemperatur, inkubiert. Die Weiterverarbeitung erfolgte nach der Endversion des Protokolls, mit der Inkubation mit Ameisensäure und anschließend die Fluoreszenzbestimmung ( $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$  (0,5 s)).

### 2.5.3.2 Evaluation der Inkubationszeit mit Ameisensäure

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit mit Ameisensäure, unter oben genannten Gründen, wurde ein Aktivitätstest mit einer Verdünnungsreihe von 1-MN in drei Konzentrationsstufen (100, 50, 0 µM) mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (1,3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min) für Ameisensäure durchgeführt [43]. Dazu wurde die Verdünnungsreihe von 1-MN (0, 50, 100 µl) in 2-ml Reaktionsgefäße angelegt und je 30 µl in Duplikaten in eine 96-well Mikrotiterplatte mit durchsichtigem Boden überführt. Anschließend wurden 120 µl des Fluoreszenzmix hinzugefügt und 10 min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde mit 150 µl Ameisensäure aufgefüllt, bei Raumtemperatur abgedunkelt, für die oben genannten Zeitpunkte inkubiert und abschließend die Fluoreszenzmessung mit dem Fluorometer bei  $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$  (0,5 s) durchgeführt.

#### 2.5.4 Enzymologie von NNMT

In diesem Kapitel sollen die optimalen Bedingungen für die NNMT-Reaktion ermittelt werden. Die NNMT-Reaktion erfolgte bei 37 °C und optimalem pH-Wert (Lysis Puffer pH = 7,4) [17,18,31,44].

##### 2.5.4.1 Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante für Nicotinamid im Fettgewebe

Zur Bestimmung der optimalen Nicotinamid Konzentration im Reaktionsmix, erfolgte die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante von NNMT für Nicotinamid [44]. Hier wurden Nicotinamid Konzentrationen (0 – 10 mmol/l) in zehn Verdünnungsstufen, jeweils in Quadruplikaten, auf eine 96-well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Zur optimalen Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante wird die Bestimmung zehn Mal durchgeführt [45].

Zunächst erfolgte die Herstellung eines Lysats aus 3T3-L1 Adipozyten mit einer Proteinmenge von 3 mg/l (Lysatherstellung und Proteinbestimmung siehe 2.5.1/2). Zu Beginn wurden neun Verdünnungsstufen der Nicotinamid-Verdünnungsreihe, ausgehend von 0 mmol/l (pures Aqua inject.) bis 10 mmol/l (Nicotinamid Stock 1 mol/l wird 1:1 mit Aqua inject. verdünnt) präpariert und je 2 µl der Verdünnungsstufen in Quadruplikaten und in Nullproben ebenfalls in Quadruplikaten (nur Aqua inject.), übertragen. Anschließend wurde 1 µl SAM (Stock SAM 100 mmol/l) in alle Wells hinzugefügt und mit 97 µl des gepoolten 3T3-L1-Adipozyten-Lysats aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 37 °C im Inkubator. Währenddessen wurde die 1-MN-Standardkurve nach der Endversion des Aktivitätstest vorbereitet und auf eine neue 96-well Platte mit je 30 µl übertragen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionswells und Nullproben mit je 30 µl auf diese, unter Auf- und Abpipettieren, übertragen. Die Weiterverarbeitung erfolgte nach der Endversion des Aktivitätstests-Protokolls und Messen der Fluoreszenzwerte. Die Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante für Nicotinamid erfolgte anhand der Erstellung einer linearen Regression mithilfe eines Statistikprogramms und einer anschließenden Berechnung des Mittelwerts der zehn Versuche.

#### 2.5.4.2 Evaluation der Inkubationszeit der NNMT-Reaktion

Um die initialen Reaktionsbedingungen der NNMT-Reaktion zu bestimmen, wurden insgesamt fünf Aktivitätstests für 30, 60, 90, 120, 240 min angelegt, beginnend rückwärts mit einer maximalen Inkubation von 4 h [44]. Hierbei wurden ein gepooltes Lysat aus 3T3-L1-Adipozyten mit einem Proteingehalt von 2 g/l verwendet. Es erfolgte das Auftragen des Reaktionsmix à 3 µl in Triplikaten auf eine 96-well-Mikrotiterplatte und Hinzufügen von 97 µl des Lysats. Zusätzlich wurden Nullproben in Triplikaten ohne Reaktionsmix aufgetragen. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten bei 37 °C erfolgte die Weiterverarbeitung anhand der Endversion des Aktivitätstests. Abschließend wurden die Ergebnisse einer Regressionsanalyse unterzogen.

#### 2.5.5 Western Blot

Der Western Blot diente zur Quantifizierung der NNMT-Proteinmenge in den humanen Zelllysaten.

Die zuvor eingefrorenen Lysate wurden zur Verwendung für den Western Blot auf Eis gelagert, langsam aufgetaut und anhand der bereits ermittelten Proteinmenge normiert. Danach wurden diese mit Laemmli-Puffer versetzt und anschließend für 5 min aufgekocht und kurz zentrifugiert. Dann folgte das Beladen des vorher hergestellten Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gels (SDS-PAGE-Gel) mit den Proben (30 µL). Zusätzlich wurde das Gel mit einem geeigneten Proteinmarker und einer Ladekontrolle (z.B. 3T3-L1 Lysat) beladen. Die Gelelektrophorese lief für 10 min bei 100 V und dann weitere 60 min bei 150-200 V bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Gel in die Transferbox mit Transferpuffer und einer Nitrozellulosemembran überführt. Der Transfer fand bei 4 °C für 30 min bei 100 V (< 0,5 A) statt. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran mit 5 % Magermilchpulver in Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung mit Tween (= TBS-T) geblockt. Der spezifische Primärantikörper wirkte unter Schütteln über Nacht bei 4 °C ein. Am nächsten Morgen wurde für 3 x 5 min mit TBS-T gewaschen, gefolgt von einer Ladekontrolle mit der Ponceau Lösung. Anschließend wurde der HRP-gekoppelter Sekundärantikörper hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Orbitalshaker inkubiert, gefolgt von erneutem Waschen für 3 x 8 min bei Raumtemperatur mit TBS-T. Auf die Nitrozellulosemembran wurde 3

ml der Chemifluoreszenz aufgetragen und kontinuierlich für 1 min bei Raumtemperatur benetzt. Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend in eine Röntgenkassette eingelegt und in der Dunkelkammer durch Auflegen des Röntgenfilms für die gewünschte Belichtungszeit, entwickelt. Abschließend erfolgte das Einscannen des Röntgenfilms und die Auswertung.

Gegebenenfalls erfolgte ein Stripping der Membran mit Stripping Puffer bei 50 °C für 30 min und erneutes Blocken mit 5 % Milch in TBS-T.

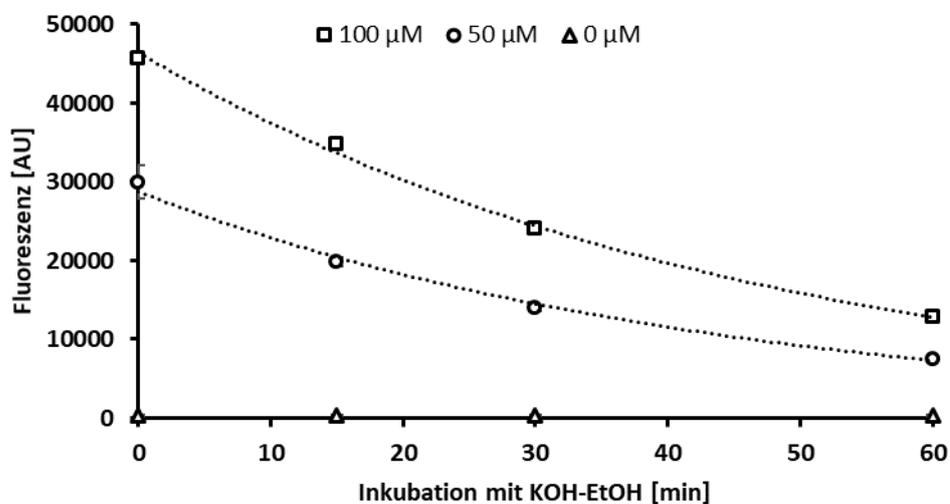
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Entwicklung des Aktivitätstests

#### 3.1.1 Evaluation der Inkubationszeit von 1-MN mit KOH-EtOH und 20 % Acetophenon

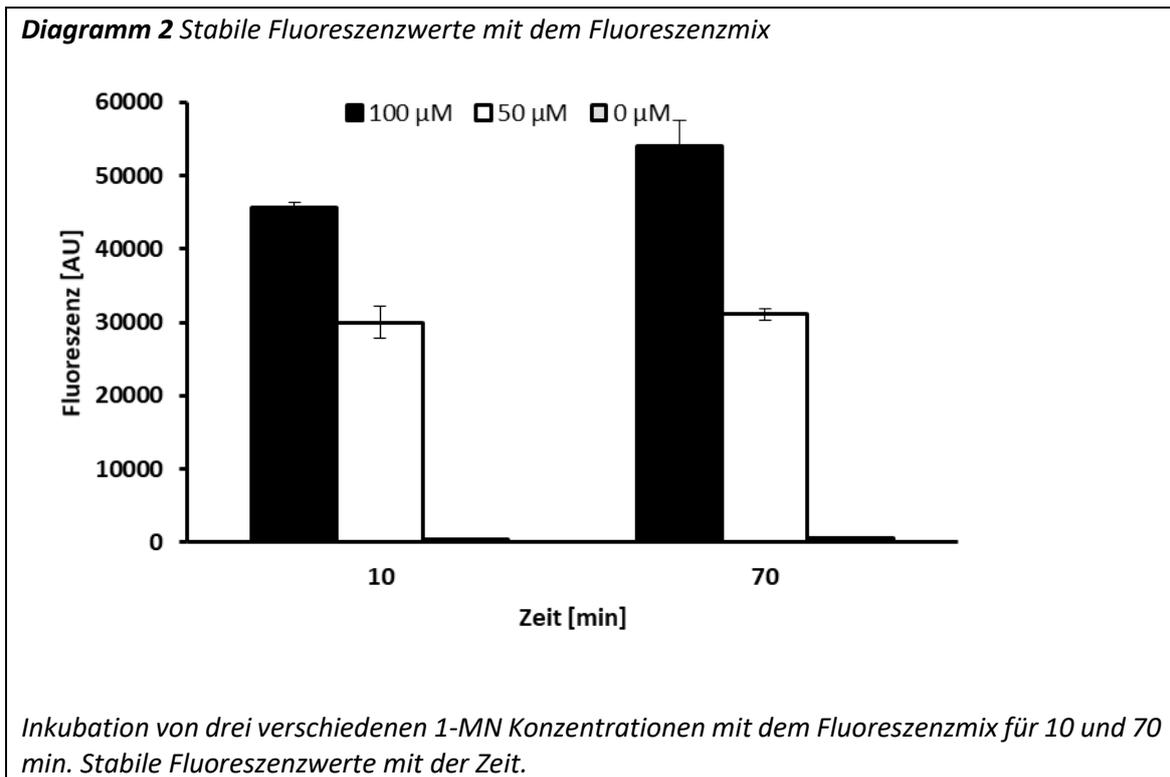
Drei Konzentrationen von 1-MN (0  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) wurden für vier Zeitpunkte (0, 15, 30, 60 min) mit KOH-EtOH bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 20 % Acetophenon versetzt und weitere 10 min abgedunkelt inkubiert (Diagramm 1), um die Fluoreszenzreaktion abzuschließen. Die Weiterverarbeitung erfolgte nach dem Protokoll der Endversion des Aktivitätstests. Hier zeigt sich eine signifikante Abnahme (50  $\mu$ M:  $p = 0,04$  und 100  $\mu$ M:  $p = 0,016$ ) der Fluoreszenzwerte bei zunehmender Inkubationszeit von KOH-EtOH ohne 20 % Acetophenon. Folglich findet ein Abbau von 1-MN durch KOH-EtOH statt.

**Diagramm 1** Abbau von 1-MN unter Inkubation mit KOH-EtOH



Drei verschiedene Konzentrationen von 1-MN (0, 50, 100  $\mu$ M) wurden für 0, 15, 30, 60 min mit KOH-EtOH inkubiert. Anschließend Hinzufügen von 20 % Acetophenon. Bei 0 min wurde direkt 20 % Acetophenon hinzugegeben. Signifikante negative Korrelation bei 50  $\mu$ M ( $r = -0,921$ ;  $p = 0,04$ ) und bei 100  $\mu$ M ( $r = -0,984$ ;  $p = 0,016$ ) 1-MN.

Dieser Abbau kann mit Zugabe von 20 % Acetophenon verhindert werden, da bei simultaner Inkubation von KOH-EtOH und 20 % Acetophenon kein Abbau von 1-MN stattfindet [44]. In Diagramm 2 wurden drei Konzentrationen von 1-MN (0, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) für zwei Zeitpunkte (10, 70 min) mit dem Fluoreszenzmix inkubiert. Hier zeigen sich stabile Fluoreszenzwerte [44].

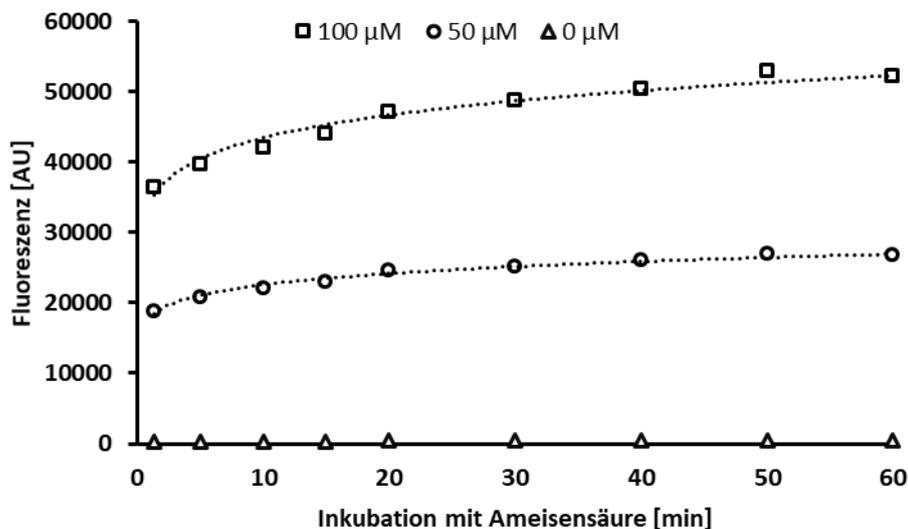


Sodass eine simultane Gabe, also die Herstellung des Fluoreszenzmix (2 M KOH-EtOH und 20 % Acetophenon; Verhältnis 1:1), stabile Fluoreszenzwerte über die Zeit generiert und kein Abbau des Fluoreszenzproduktes stattfindet. Als optimale Inkubationszeit für den Fluoreszenzmix wurden 10 min bestimmt [44].

### 3.1.2 Evaluation der Inkubationszeit von Ameisensäure

Es wurden drei 1-MN Konzentrationen (100, 50, 0  $\mu\text{M}$ ) mit dem Fluoreszenzmix für 10 min inkubiert und anschließend Ameisensäure für unterschiedliche Zeitintervalle (1,3; 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min) bei Raumtemperatur und unter lichtfreien Bedingungen hinzugefügt (Diagramm 3). Es kommt ab 30 min zu einer Sättigung der ausreichend hohen Fluoreszenzwerte, sodass eine längere Inkubation keinen Nutzen bringt. Die Inkubationszeit von Ameisensäure konnte somit auf 30 min festgelegt werden [44].

**Diagramm 3** Verschiedene Inkubationszeiten mit Ameisensäure



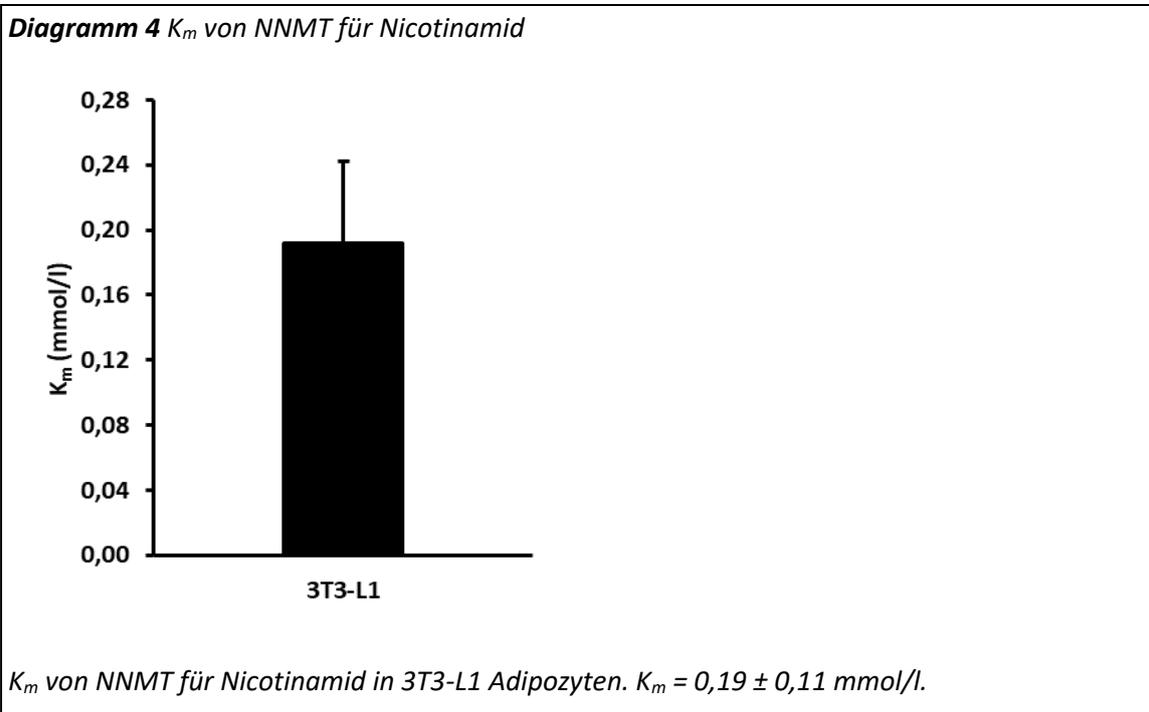
Drei verschiedene Konzentrationen von 1-MN (100, 50, 0  $\mu\text{M}$ ) wurden mit dem Fluoreszenzmix für die angegebenen Inkubationszeiten (1,3; 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min) mit Ameisensäure versetzt.

## 3.2 Enzymologie von NNMT

### 3.2.1 Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante von NNMT für Nicotinamid

Die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) von NNMT für Nicotinamid wurde durch eine nichtlineare Regression berechnet [46], um die Substrataffinität für NNMT im Fettgewebe und die optimale Stoffkonzentration zu ermitteln, um somit gesättigte Standardreaktionsbedingungen (Anfangsbedingungen) zu schaffen. Die Michaelis-

Menten-Konstante von NNMT für Nicotinamid wurde mit  $0,19 \pm 0,11$  mmol/l bestimmt [44] (Diagramm 4).



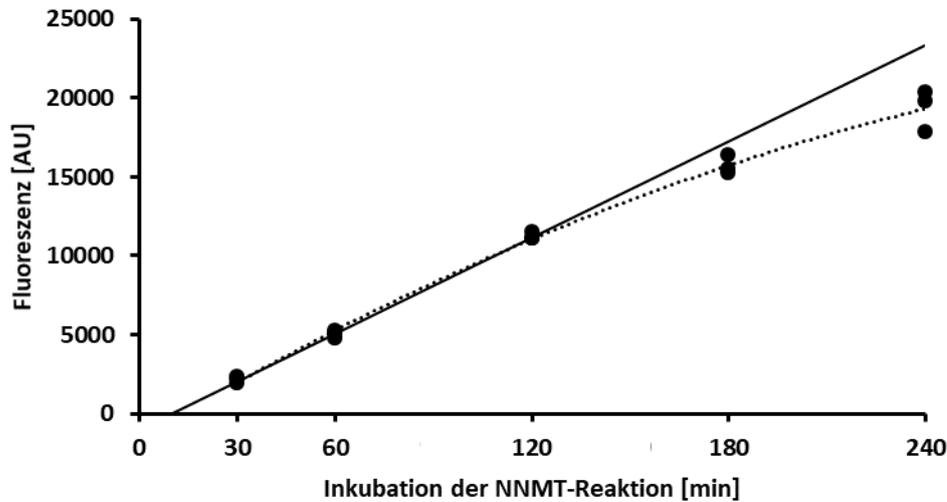
Die publizierten Michaelis-Menten-Konstanten für S-Adenosylmethionin ( $K_m$  (SAM)) liegen im Durchschnitt bei  $5 \mu\text{mol/l}$  [11,17,19,47,48].

In der Endversion des Versuchsprotokolls findet die NNMT-Reaktion folglich weit im Substratüberschuss statt. Der Substratmix setzt sich aus folgenden Konzentrationen im Verhältnis 2:1 zusammen:  $20 \text{ mmol/l}$  Nicotinamid (Stock  $1 \text{ mol/l}$ , 1:50 in Aqua inject.) und  $100 \mu\text{mol/l}$  SAM (Stock  $100 \text{ mmol/l}$ , 1:100 in Aqua inject.).

### 3.2.2 Evaluation der Inkubationszeit der NNMT-Reaktion

Zur Ermittlung der initialen Reaktionsbedingungen der NNMT-Reaktion wurden Fluoreszenzwerte nach Inkubation für 30, 60, 120, 180, 240 min bei  $37^\circ\text{C}$  bestimmt. Die Kurve der Reaktionsgeschwindigkeit flacht mit zunehmender Inkubationszeit ab. Innerhalb der ersten 120 min zeigt sich eine lineare Regression der Fluoreszenz in Bezug auf die Inkubationszeit ( $R^2 = 0,9973$ ,  $p = 0,01$ ), sodass für die weiteren Experimente eine Reaktionszeit von 60 min festgelegt wurde (Diagramm 5) [44].

**Diagramm 5** Evaluation der Inkubationszeit der NNMT-Reaktion



Fünf Inkubationszeiten der NNMT-Reaktion. Gestrichelte Linie entspricht der polynomischen Regression durch alle Zeitpunkte ( $R^2 = 0,9921$ ). Die durchgehende Linie entspricht der linearen Regression durch die ersten drei Zeitpunkte ( $R^2 = 0,9973$ ,  $p = 0,01$ ). Regressionsgleichung:  $y = 101,27 x - 961,92$ .

### 3.3 Klinische Studie

#### 3.3.1 Parameter der Patienten

Insgesamt konnten 43 Probanden (16 adipöse, 15 nicht adipöse und 12 ehemals adipöse) rekrutiert werden. Hier zeigen sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) in Bezug auf das Körpergewicht, den BMI, sowie den Taillen- und Hüftumfang zwischen den nicht adipösen und ehemals adipösen im Vergleich zu den adipösen Patienten. Zudem zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den nicht adipösen und ehemals adipösen in Bezug auf das Körpergewicht ( $p < 0,05$ ). Im Übrigen konnten keine weiteren Unterschiede zwischen den drei Probandengruppen detektiert werden ( Tabelle 16).

**Tabelle 16** Parameter der Patienten

Parameter	Adipöse Patienten (N = 16)	Nicht adipöse Patienten (N = 15)	Ehemals adipöse Patienten (N = 12)
Alter – a	48,0 ± 10,6	50,7 ± 13,7	43,0 ± 13,1
Männer – n (%)	8 (50)	3 (10,7)	3 (25)
Gewicht – kg **, *	171 ± 31	69,4 ± 12,5	78,9 ± 8,9
Größe – m	1,72 ± 0,11	1,68 ± 0,07	1,72 ± 0,11
Hüftumfang – m **	1,63 ± 0,21	1,00 ± 0,11	1,04 ± 0,09
Taillenumfang – m **	1,51 ± 0,16	0,89 ± 0,14	0,94 ± 0,08
Waist-to-Hip-Ratio	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,3
BMI – kg/m <sup>2</sup> **	58,3 ± 12,4	24,5 ± 3,1	26,7 ± 2,2
<b>Laborwerte</b>			
Blutzucker – mg/dl	110,5 ± 28,1	99,4 ± 23,0	104,8 ± 25,9
Serumkreatinin – mg/dl	1,3 ± 1,4	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,3
eGFR (CKD-EPI)	81,8 ± 27,3	85,5 ± 20,2	96,3 ± 14,8
GOT – U/l	35,4 ± 23,1	29,4 ± 16,0	26,7 ± 23,1
GPT – U/l	50,7 ± 45,4	22,8 ± 11,2	28,7 ± 35,2
HbA1c – %	6,2 ± 1,0	5,1 ± 0,7	-
Diabetes mellitus – n (%)	7 (43,8)	0 (0)	1 (8,3)
Hypertonie – n (%)	11 (68,8)	3 (10,7)	3 (25)
Medikamente – n	3,8	1	1
<b>Operationen – n (%)</b>			
Roux-en-Y Magenbypass	6 (37,5)	0 (0)	0 (0)
Magensleeve	10 (62,5)	0 (0)	0 (0)
Cholezystektomie	0 (0)	6 (40,0)	0 (0)
Hernien	0 (0)	5 (33,3)	0 (0)
Loop Ileostoma	0 (0)	1 (6,7)	0 (0)
Sigmaresektion	0 (0)	1 (86,7)	0 (0)
Explorative Laparoskopie	0 (0)	2 (13,3)	0 (0)
Abdominalplastik	0 (0)	0 (0)	11 (91,7)
Zirkulärer Bodylift	0 (0)	0 (0)	1 (8,3)

Plus-Minus-Werte sind Mittelwerte ± SD

- Es wurden keine Daten erhoben

\*\* =  $p < 0,001$  zwischen adipösen und nicht adipösen, sowie adipösen und ehemals adipösen

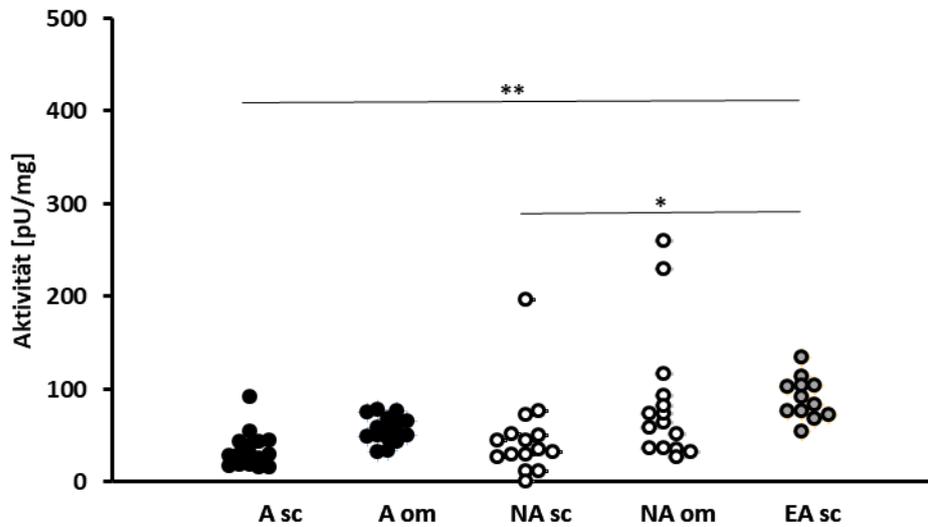
\* =  $p < 0,05$  zwischen nicht adipösen und ehemals adipösen

### 3.3.2 NNMT-Aktivität im subkutanen Fettgewebe und Omentum majus

Ziel war es, wie eingangs erwähnt, eine Methode zur Bestimmung der NNMT-Aktivität zu entwickeln und diese im Rahmen einer klinischen Studie einzusetzen, um Unterschiede in der NNMT-Aktivität zwischen adipösen, nicht adipösen und ehemals adipösen Patienten zu untersuchen. Die durchschnittlichen Aktivitätswerte im subkutanen Fettgewebe betrugen bei der Gruppe der adipösen  $33,96 \pm 18,80$  [pU/mg], der nicht adipösen  $50,90 \pm 44,41$  [pU/mg] und der ehemals adipösen Patienten  $89,98 \pm 21,41$  [pU/mg]. Entgegen der Hypothese ließen sich somit die höchsten Aktivitätswerte in der Gruppe der ehemals adipösen Patienten finden, gefolgt von den nicht adipösen Patienten. Die geringsten NNMT-Aktivitäten wurden bei den adipösen Probanden gemessen. Es besteht ein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen, also Unterschiede im subkutanen Fettgewebe bei adipösen im Vergleich zu den ehemals adipösen Patienten ( $p < 0,001$ ) und ein signifikanter Unterschied zwischen den nicht adipösen und den ehemals adipösen Patienten ( $p < 0,05$ ).

Im Omentum majus sind die Aktivitätswerte auch hier bei den nicht adipösen ( $84,61 \pm 67,52$  [pU/mg]) höher, als bei den adipösen Patienten ( $56,58 \pm 13,66$  [pU/mg]) (6), wobei sich kein signifikanter Unterschied nachweisen lässt.

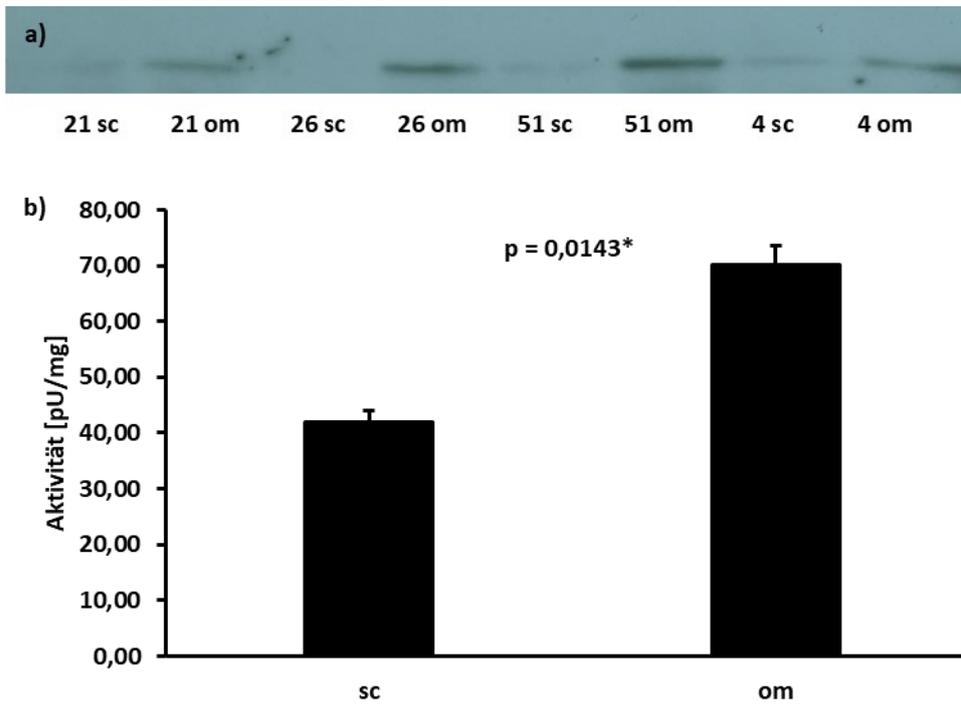
**Diagramm 6 NNMT-Aktivität im Fettgewebe**



NNMT-Aktivität in den drei Gruppen (A = Adipöse, NA = Nicht adipöse, EA = Ehemals adipöse). Zwischen den Gruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied in den Aktivitätswerten im subkutanen Fettgewebe (sc) zwischen A vs. EA (\*\*  $p < 0,001$ ) und NA vs. EA (\*  $p < 0,05$ ).

Insgesamt war die mittlere Aktivität im viszeralen Fettgewebe signifikant höher als im subkutanen Fettgewebe ( $p = 0,0143$ ). (7 b)). So zeigt sich ergänzend eine erhöhte Proteinmenge im Omentum majus im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe im Westernblot. Hier sieht man beispielhaft die Banden von vier adipösen Patienten (Nr. 21, 26, 51, 04). Die schwache Bande entspricht dem subkutanen Fettgewebe und die stärkere Bande dem Omentum majus. Folglich wurde eine höhere Proteinmenge im Omentum majus ( $70,14 \pm 50,0$  [pU/mg]) im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe ( $41,86 \pm 34,4$  [pU/mg]) detektiert ( $p = 0,0143$ ) (Diagramm 7 a)).

**Diagramm 7** Vergleich NNMT-Aktivität im Omentum majus vs. subkutanem Fettgewebe

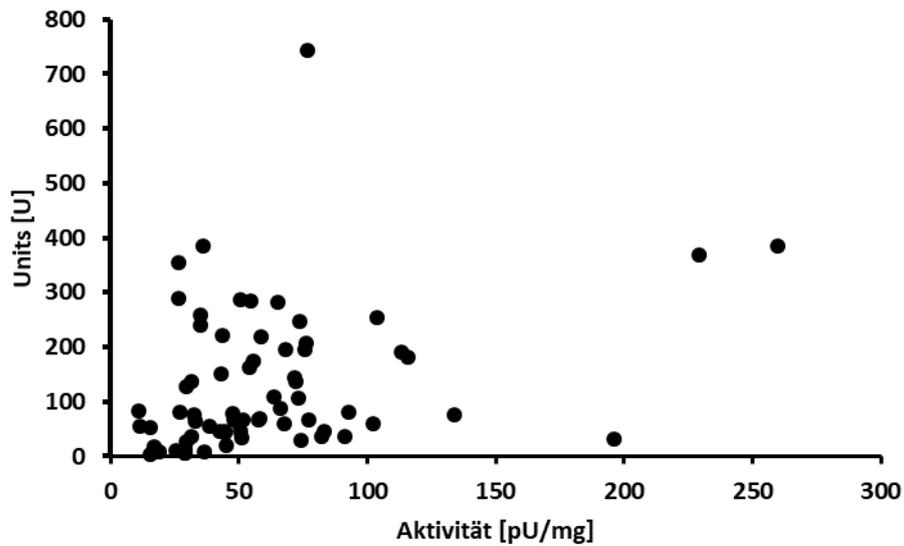


a) Westernblot. Zeigt beispielhaft vier Proben (Nr. 21, 26, 51, 04) mit jeweils subkutanem Fettgewebe (sc) und Omentum majus (om), nebeneinander aufgetragen. b) Signifikanter Unterschied der Aktivität zwischen subkutanem Fettgewebe und Omentum majus.

### 3.3.3 Korrelation der Proteinmenge und der NNMT-Aktivität

Die Ermittlung der Proteinmenge der Proben erfolgte mit dem Western Blot. Hier zeigte sich eine schwache, wenngleich statistisch signifikante positive Korrelation ( $r = 0,32$ ;  $p = 0,007$ ) für alle Proben zwischen NNMT-Aktivität und der Proteinmenge (Diagramm 8). Jedoch kann die geringe Ausprägung durch die semiquantitative Methode des Western Blots bedingt sein.

**Diagramm 8** Korrelation NNMT-Aktivität und Proteinmenge

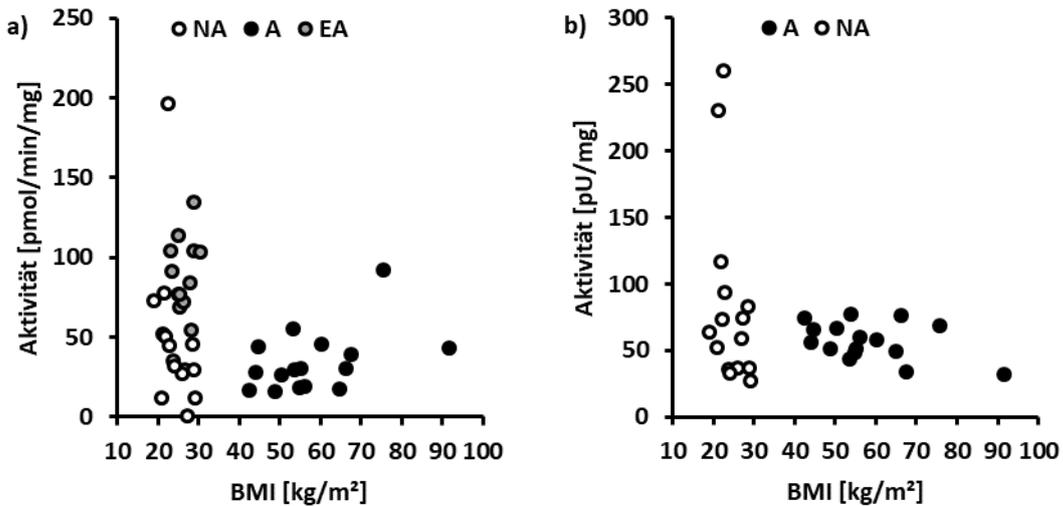


Auftragung der ermittelten Units (= Einheit zur Wiedergabe der ermittelten Bandenbreite im Westernblot, entspricht der Proteinmenge) zur NNMT-Aktivität aller drei Patientengruppen. Positive Korrelation ( $r = 0,32$ ;  $p = 0,007$ ).

### 3.3.4 Korrelation des BMI mit der NNMT-Aktivität

Es erfolgte die Untersuchung der Korrelation zwischen BMI und NNMT-Aktivität im Omentum majus (Diagramm 9 b)) und subkutanem Fettgewebe (Diagramm 9 a)), da es kontroverse Daten diesbezüglich in der Literatur gibt [9,40,49]. Eine Korrelation konnte nicht nachgewiesen werden (Diagramm 9).

**Diagramm 9** Korrelation NNMT-Aktivität und BMI im Fettgewebe

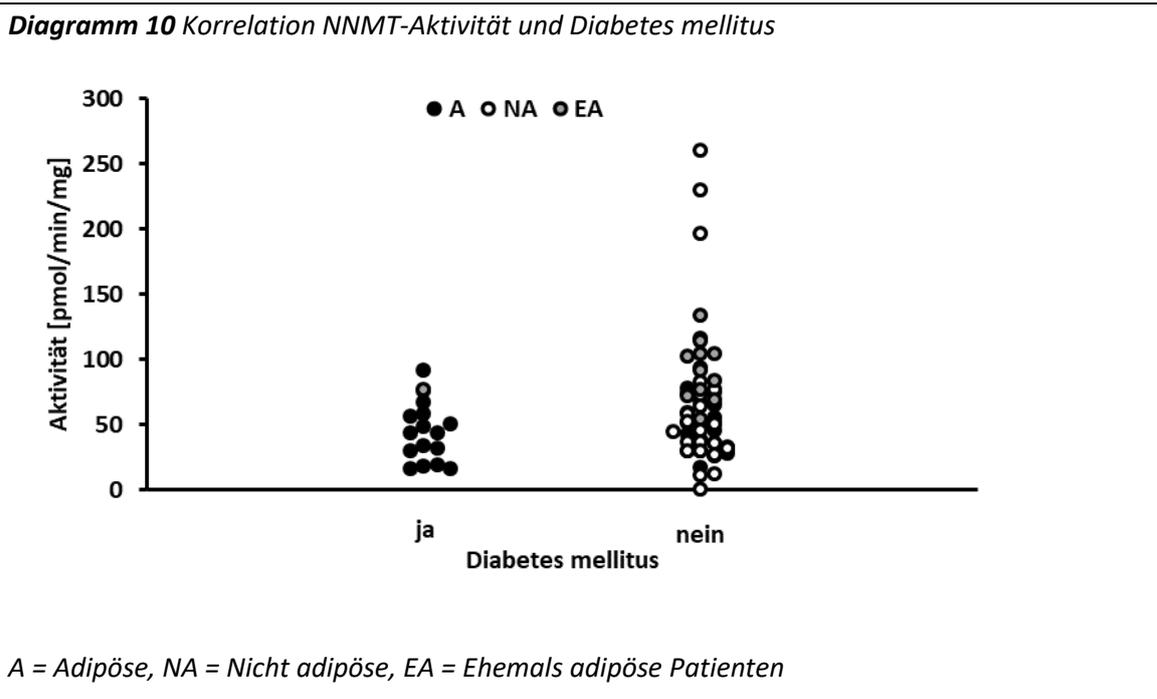


a) Subkutanes Fettgewebe. b) Omentum majus.

A = Adipöse, NA = Nicht adipöse Patienten, EA = Ehemals adipöse Patienten

### 3.3.5 Korrelation von Diabetes mellitus Typ 2 und der NNMT-Aktivität

Betrachtung der Korrelation zwischen Diabetes mellitus Typ 2 und der NNMT-Aktivität. Hier zeigt sich kein Unterschied in den Aktivitätswerten bei Diabetikern, im Vergleich zu Nicht-Diabetikern (Diagramm 10).



## 4 Diskussion

---

Mit der vorliegenden Arbeit sollte eine leicht durchzuführende Methode zur fluorometrischen Bestimmung der NNMT-Aktivität entwickelt werden, um die Hypothese zu überprüfen, dass die spezifische NNMT-Aktivität im Fettgewebe von adipösen Menschen höher ist, als im Fettgewebe von nicht adipösen und ehemals adipösen Patienten.

Die wenigen zuvor publizierten Methoden zur Messung der NNMT-Aktivität produzieren radioaktiven Sondermüll und erlauben keinen hohen Probendurchsatz [10,11]. Die in dieser Dissertation entwickelte Methode kann auf einer 96-well-Platte durchgeführt werden, was eine effiziente quantitative Analyse mit einem hohen Durchsatz ermöglicht [44]. In den ursprünglichen Publikationen wurden die Proben zum Abstoppen der NNMT-Reaktion aufgekocht [15,16]. Hier konnte gezeigt werden, dass durch Hinzufügen von KOH-EtOH ein Abstoppen der NNMT-Reaktion ebenfalls möglich ist, sodass das Aufkochen entbehrlich ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine alleinige Inkubation mit KOH-EtOH das Reaktionsprodukt 1-MN degradiert, was bei direkter Hinzugabe von 20 % Acetophenon nicht der Fall ist. Der nun entwickelte Fluoreszenzmix aus KOH-EtOH und 20 % Acetophenon im Verhältnis 1:1 verhindert die Degradation [44]. Die anschließende Inkubation mit Ameisensäure erfolgte abgedunkelt, bei Raumtemperatur für 30 min. Clark und Kollegen beobachteten eine Sättigung der Fluoreszenzwerte mit Inkubation von Ameisensäure nach 4-6 Stunden [15]. Es konnte nun gezeigt werden, dass mit dem ermittelten Fluoreszenzmix bereits eine Sättigung der Fluoreszenzwerte bei Inkubation mit Ameisensäure nach 30 min eintritt und somit eine enorme Zeitersparnis erreicht wird [44].

Zur weiteren Bestimmung der Enzymologie von NNMT, sowie zur Validierung der Methode, erfolgte die Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante von Nicotinamid. Diese entspricht  $0,19 \pm 0,11$  mmol/l in 3T3-L1-Adipozyten [44]. Derselbe Wert wurde zwischenzeitlich von van Haren et al. bestätigt, die Versuche mit rekombinanten humanem NNMT-Enzym durchführten (Tabelle 17) [11]. Die Michaelis-Menten-Konstante von Nicotinamid im Lebergewebe hingegen wird in mehreren Publikationen

mit 0,35 bis 0,43 mmol/l angegeben [17,19,47,48]. Demnach hat NNMT im Fettgewebe eine etwas höhere Affinität für Nicotinamid als im Lebergewebe.

Anzumerken ist, dass die  $K_m$  für SAM, die zur Festlegung der Anfangskonzentration von SAM diente, lediglich aus der Literatur entnommen wurde, wo sie mit 1,8 bis 6,8  $\mu\text{mol/l}$  (Tabelle 17) angegeben wird (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung =  $5,0 \pm 2,5 \mu\text{mol/l}$ ) [17,47,48]. Mit der hier verwendeten SAM-Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  läuft die Reaktion weit im gesättigten Bereich ab.

**Tabelle 17**  $K_m$ -Werte für NNMT

Referenz	Spezies/Organ /Zelllinie	$K_m$ (Nicotinamid) [mmol/l]	$K_m$ (SAM) [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Methode
Aksoy 1994	Leber, human	0,43	1,8	$^{14}\text{C}$ -SAM
Aksoy 1994	Rekombinant, human	0,38	2,2	$^{14}\text{C}$ -SAM
Clark 1975	Walker 256 (Mamma- Karzinom, Ratte)	0,50	7,0	Fluorometrie
Rini 1989	Leber, human	0,35	1,8	$^{14}\text{C}$ -SAM
Scheller 1996	Leber, Maus	0,37	6,5	$^{14}\text{C}$ -SAM
van Haren 2016	Niere, human, kloniert	0,20	8,5	Massenspektrometrie
Yan 1997	Leber, Maus	0,36	4,8	$^{14}\text{C}$ -SAM
Yan 1997	Rekombinant, Maus	0,43	6,8	$^{14}\text{C}$ -SAM

$^{14}\text{C}$ -SAM = radioaktiv markiertes SAM

Die hier beschriebene Methode verwendet Nicotinamid als natürliches und affinstes Substrat, was bei dem kürzlich von Neelakantan et al. publizierten Assay nicht der Fall ist [50]. Zwar ist hier ebenso ein hoher Durchsatz möglich, jedoch wird hier rekombinantes NNMT-Enzym und Chinolin als Substrat verwendet. Chinolin hat spezifische fluorometrische Eigenschaften und kann gezielt nachgewiesen werden, jedoch ist es kein physiologisches Substrat von NNMT im Fettgewebe.

Des Weiteren erfolgte die Evaluation der Inkubationszeit der NNMT-Reaktionszeit. Es konnte eine lineare Regression innerhalb der ersten drei Zeitpunkte abgeleitet werden,

weshalb eine Inkubationszeit von 60 min ermittelt wurde. Diese Beobachtung deckt sich mit Angaben in der Literatur, wo ebenfalls die gleiche Inkubationszeit angegeben wurde [16].

Die NNMT-Aktivität korrelierte schwach mit der mittels Western Blot bestimmten NNMT-Expression ( $r = 0,32$ ;  $p = 0,007$ ), wobei festzuhalten ist, dass der Western Blot allenfalls eine semiquantitative Analyse ermöglicht. Die Ergebnisse bestätigen jedoch die positive Korrelation, die mittels ELISA und isotonenbasierter Aktivitätsmessung in Lebern von Organspendern festgestellt wurde [51] und unterstreichen die Validität der Aktivitätsmessung.

Zur Klärung der Hypothese, dass die NNMT-Aktivität im Fettgewebe von adipösen im Vergleich zu nicht adipösen Patienten erhöht ist, wurde der oben genannte Assay entwickelt und angewendet. In einer Studie mit adipösen Pima-Indianern konnte eine, um den Faktor zwei, erhöhte NNMT-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden [8]. Auch adipöse Mäuse weisen im Fettgewebe eine NNMT-Expression auf, die doppelt so hoch ist wie die von schlanken Mäusen [7]. Aufgrund dieser Erkenntnisse war zu erwarten, dass die NNMT-Aktivität im Fettgewebe adipöser Menschen deutlich höher ist als bei schlanken Personen.

Überraschend konnte dies in der vorgelegten Arbeit jedoch nicht gezeigt werden. Die spezifischen Aktivitäten unterschieden sich nicht zwischen nicht adipösen und adipösen Probanden. Interessant war hingegen, dass die Aktivität im Fettgewebe ehemals adipöser, bariatrisch operierter Patienten statistisch signifikant höher war als bei den beiden anderen Gruppen. Bei Teilnehmern einer Studie, die ihr Gewicht gezielt durch Lebensstilmodifikation veränderten, war die mediane NNMT-Expression in subkutanem Fettgewebe nach der Gewichtsreduktion ebenfalls höher als vorher [52]. Im Gegensatz dazu jedoch konnte in einer anderen Kohorte, in der die Gewichtsreduktion wie in der vorliegenden Arbeit durch eine bariatrische Operation erzielt wurde, kein Anstieg, sondern ein Abfall der NNMT-Expression festgestellt werden [9].

Die Gründe für die diskrepanten Befunde sind unklar. Möglicherweise spielt die Dynamik von Gewichtsveränderungen, also der Zeitpunkt der Messung, eine Rolle. Darauf deuten

eigene Ergebnisse hin, wonach Mäuse mit beginnender ernährungsbedingter Adipositas höhere NNMT-Aktivitäten haben als Mäuse mit voll ausgeprägter Adipositas [44].

Im viszeralen Fettgewebe konnte kein signifikanter Unterschied der NNMT-Aktivität zwischen den zwei Patientengruppen aufgezeigt werden. Auch imponiert, dass die nicht adipösen Probanden, trotz fehlender Signifikanz, sogar etwas mehr Aktivität aufweisen (Nicht adipöse ( $84,61 \pm 67,52$  [pU/mg]), adipöse Patienten ( $56,58 \pm 13,66$  [pU/mg]). Es konnte aber ein signifikanter Unterschied zwischen dem viszeralen und dem subkutanen Fettgewebe detektiert werden, mit Nachweis von höherer NNMT-Aktivität im Omentum majus, im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe. Ergänzend hierzu zeigt sich diese Beobachtung auch in der Literatur. Hier wurde die Expression von NNMT mRNA im subkutanen und viszeralen Fettgewebe von Organspendern ( $n = 3$ ) untersucht und ein potentieller Unterschied zwischen beiden Fettgewebsdepots festgestellt [18]. Das Blut aus dem viszeralen Fettgewebe wird im Gegensatz zum Blut aus dem subkutanen Fettgewebe über die Pfortader und die Leber drainiert. Metabolische Signale aus dem viszeralen Fettgewebe können somit direkt auf die Leber einwirken, sodass die höhere NNMT-Aktivität im viszeralen Fettgewebe ein Hinweis auf die metabolische Bedeutung dieses Enzyms ist.

Kontroverse Daten liefern einige Studien bezüglich der Korrelation zwischen BMI und der NNMT-Expression bzw. den NNMT-Metaboliten [7,9,49]. In der vorliegenden Arbeit konnte überraschend keine Korrelation zwischen BMI und der NNMT-Aktivität erkannt werden. Eine mögliche Erklärung für die interindividuelle Varianz der NNMT-Aktivität könnten posttranslationale Modifikationen darstellen, welche die Aktivität beeinflussen. So zeigte eine Studie von Nemmara et al. eine Inaktivierung von NNMT im synovialen Gewebe nach Citrullinierung [53]. Auch könnten genetische und epigenetische Faktoren eine Rolle spielen, da die NNMT-Expression in Leber und Fettgewebe bei Menschen und verschiedenen Mausstämmen erhebliche Unterschiede aufweist [9,49,54,55].

In einer Studie von Kannt et al. wurde die NNMT-Expression in subkutanem und viszeralem Fettgewebe von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und gesunden

Kontrollen untersucht [9]. Es konnte eine höhere NNMT-Expression bei den Diabetikern nachgewiesen werden, sowie eine erhöhte Konzentration von 1-MN im Serum. Zusätzlich konnte eine positive Korrelation zwischen 1-MN und dem BMI detektiert werden als möglicher Hinweis auf erhöhte NNMT-Aktivität bei erhöhtem BMI. 1-MN wird jedoch renal eliminiert und abhängig von der Nierenfunktion ausgeschieden, was die Interpretation dieser Korrelation erschwert [56,57]. Auch kommt es zu einer schrittweisen Oxidation von 1-MN im Serum durch verschiedene Enzyme, sodass 1-MN als Surrogatparameter für die NNMT-Aktivität nicht geeignet ist und die direkte Messung der Enzymaktivität, wie in dieser Arbeit dargelegt, umso wichtiger erscheint. Die von Kannt et al. gefundene Korrelation zwischen Diabetes und NNMT-Aktivität konnte leider in diesem Dissertationsprojekt nicht mit hinreichender statistischer Sicherheit überprüft werden, da nicht ausreichend Diabetiker in die Studie eingeschlossen wurden.

## 5 Zusammenfassung/Conclusion

---

Die Nicotinamid-N-Methyltransferase (NNMT) reguliert den Energiehaushalt des Fettgewebes und spielt eine Rolle in der Pathogenese von Adipositas. Während die NNMT-Expression im Fettgewebe und die Konzentrationen von NNMT-Metaboliten in Serum und Urin vielfach beschrieben sind, ist bisher wenig über die spezifische Aktivität des Enzyms im humanen Fettgewebe bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine fluoreszenzbasierte Methode zur Bestimmung der NNMT-Aktivität zu entwickeln und die spezifischen Aktivitäten im Fettgewebe von nicht adipösen und adipösen Probanden zu vergleichen. Eingeschlossen wurden 43 Probanden (16 adipöse, 15 nicht adipöse, 12 ehemals Adipöse nach bariatrischer Operation) in einer monozentrischen analytischen Querschnittsanalyse. Es wurde eine Methode entwickelt, optimiert und validiert, mit der die NNMT-Aktivität zahlreicher Proben unter Anfangsbedingungen in überschaubarer Zeit gemessen werden kann. Die Michaelis-Menten-Konstanten für die Kosubstrate Nicotinamid und S-Adenosylmethionin wurden mit  $0,19 \pm 0,11$  mmol/l und  $5 \pm 2,5$   $\mu$ mol/l (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) bestimmt, was mehreren veröffentlichten Werten entspricht. Die spezifischen Aktivitäten im subkutanen Fettgewebe der adipösen, nicht adipösen und ehemals adipösen Probanden wurden mit  $34 \pm 19$ ,  $51 \pm 44$  und  $90 \pm 21$  pU/mg bestimmt. Entgegen der Annahme war die Aktivität bei adipösen Probanden gegenüber nicht adipösen also nicht erhöht. Überraschend wurden sogar die höchsten Aktivitäten bei den ehemals Adipösen gemessen ( $p < 0,05$  in der Varianzanalyse). Die Aktivitäten im Omentum-majus-Fettgewebe betragen  $57 \pm 14$  pU/mg (Adipöse) und  $85 \pm 66$  pU/mg (nicht Adipöse). Die Aktivität im Omentum majus war zudem signifikant höher als im subkutanen Fett ( $p = 0,01$ ).

Wie es zu einer Steigerung der NNMT-Aktivität nach Gewichtsabnahme kommt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden. Vorläufige eigene Experimente mit Mäusen legen aber nahe, dass NNMT während der Entwicklung von Adipositas dynamisch reguliert ist. Dies muss Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, auch um NNMT als mögliches Ziel therapeutischer Interventionen zur Bekämpfung der sich pandemisch ausbreitenden Adipositas und ihrer Folgeerkrankungen zu definieren.

Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) is a novel regulator of energy metabolism in adipose tissue. Its expression is increased in obesity, and inhibition of NNMT prevents diet-induced obesity in mice. However, while NNMT expression as well as circulating and urinary levels of NNMT metabolites have been extensively studied, little is known about specific NNMT activity in human adipose tissue.

The aim of the current dissertation was to develop a fluorometric method to assay NNMT activity and to study specific NNMT activity in adipose tissue of 16 obese, 15 non-obese, and 12 formerly obese human subjects; the latter had lost weight after bariatric surgery.

In enzymological analyses, the Michaelis-Menten constants for the two co-substrates nicotinamide and S-adenosyl methionine were determined with  $0,19 \pm 0,11$  mmol/l (mean +/- standard deviation) and  $5 \pm 2,5$   $\mu$ mol/l, respectively, which corresponds to values reported in the literature. The specific activities in subcutaneous adipose tissue of obese, non-obese, and formerly obese subjects were determined with  $34 \pm 19$ ,  $51 \pm 44$  and  $90 \pm 21$  pU/mg. Thus, contrary to the hypothesis, obese subjects did not have higher NNMT activity than non-obese subjects. Surprisingly, formerly obese subjects on average had the highest NNMT activity ( $p < 0,05$  by analysis of variance). In visceral fat from the greater omentum, NNMT activities were  $57 \pm 14$  and  $85 \pm 66$  pU/mg in obese and non-obese subjects, replicating the findings from subcutaneous adipose tissue. Since the formerly obese patients did not undergo abdominal surgery, there was no visceral adipose tissue from this group.

While it is not known definitively why NNMT activity is increased after weight loss, preliminary results from mouse experiments suggest that NNMT activity might be dynamically regulated in periods of weight change. This hypothesis will need to be tested in future studies, which may aid in establishing NNMT as a therapeutic target for the prevention or therapy of obesity.

## 6 Literaturverzeichnis

---

1. Organization, W.H. (2000). Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic (World Health Organization).
2. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants (2016). *The Lancet* 387, 1377–1396.
3. WHO | 10 facts on obesity Available at: <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/en/index6.html> [Accessed March 19, 2017].
4. WHO/Europe approaches to obesity (2017). Available at: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity/obesity> [Accessed March 19, 2017].
5. Cinti, S. (2007). The adipose organ. In *Adipose tissue and adipokines in health and disease* (Springer), pp. 3–19. Available at: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-370-7\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-370-7_1) [Accessed November 9, 2016].
6. Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2548–2556.
7. Kraus, D., Yang, Q., Kong, D., Banks, A.S., Zhang, L., Rodgers, J.T., Pirinen, E., Pulinilkunnil, T.C., Gong, F., Wang, Y., *et al.* (2014). Nicotinamide N-methyltransferase knockdown protects against diet-induced obesity. *Nature* 508, 258–262.
8. Lee, Y.H., Nair, S., Rousseau, E., Allison, D.B., Page, G.P., Tataranni, P.A., Bogardus, C., and Permana, P.A. (2005). Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese Pima Indians: increased expression of inflammation-related genes. *Diabetologia* 48, 1776–1783.
9. Kannt, A., Pfenninger, A., Teichert, L., Tönjes, A., Dietrich, A., Schön, M.R., Klötting, N., and Blüher, M. (2015). Association of nicotinamide-N-methyltransferase mRNA expression in human adipose tissue and the plasma concentration of its product, 1-methylnicotinamide, with insulin resistance. *Diabetologia* 58, 799–808.
10. Weinshilboum, R.M., Otterness, D.M., and Szumlanski, C.L. (1999). Methylation pharmacogenetics: catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 19–52.
11. van Haren, M.J., Sastre Toraño, J., Sartini, D., Emanuelli, M., Parsons, R.B., and Martin, N.I. (2016). A Rapid and Efficient Assay for the Characterization of Substrates and Inhibitors of Nicotinamide N-Methyltransferase. *Biochemistry* 55, 5307–5315.

12. Huff, J.W. (1947). The Fluorescent Condensation Product of N1-Methylnicotinamide and Acetone: I. Synthesis and Properties. *JBC J. Biol. Chem*, 151–156.
13. Huff, J.W., and Perlzweig, W.A. (1947). The Fluorescent Condensation Product of N1-Methylnicotinamide and Acetone: II. A sensitive Method for the Determination of N1-Methylciotinamide in Urine. *JBC J. Biol. Chem.*, 157–167.
14. Levitas, N., and Robinson, J. (1947). The fluorescent condensation product of N1-methylnicotinamide and acetone; a rapid fluorometric method for the determination of the total pyridine nucleotides in the red blood cells. *J. Biol. Chem.* 167, 169–175.
15. Clark, B.R., Halpern, R.M., and Smith, R.A. (1975). A fluorimetric method for quantitation in the picomole range of N1-methylnicotinamide and nicotinamide in serum. *Anal. Biochem.* 68, 54–61.
16. Sano, A., Endo, N., and Takitani, S. (1992). Fluorometric Assay of Rat Tissue N-Methyltransferases with Nicotinamide and Four Isomeric Methylnicotinamides. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 40, 153–156.
17. Rini, J., Szumlanski, C., Guerciolini, R., and Weinshilboum, R.M. (1990). Human liver nicotinamide N-methyltransferase: ion-pairing radiochemical assay, biochemical properties and individual variation. *Clin. Chim. Acta* 186, 359–374.
18. Riederer, M., Erwa, W., Zimmermann, R., Frank, S., and Zechner, R. (2009). Adipose tissue as a source of nicotinamide N-methyltransferase and homocysteine. *Atherosclerosis* 204, 412–417.
19. Aksoy, S., Szumlanski, C.L., and Weinshilboum, R.M. (1994). Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 269, 14835–14840.
20. Tomida, M., Mikami, I., Takeuchi, S., Nishimura, H., and Akiyama, H. (2009). Serum levels of nicotinamide N-methyltransferase in patients with lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 135, 1223.
21. Tang, S.-W., Yang, T.-C., Lin, W.-C., Chang, W.-H., Wang, C.-C., Lai, M.-K., and Lin, J.-Y. (2011). Nicotinamide N-methyltransferase induces cellular invasion through activating matrix metalloproteinase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma cells. *Carcinogenesis* 32, 138–145.
22. Kim, J., Hong, S.J., Lim, E.K., Yu, Y.-S., Kim, S.W., Roh, J.H., Do, I.-G., Joh, J.-W., and Kim, D.S. (2009). Expression of nicotinamide N-methyltransferase in hepatocellular carcinoma is associated with poor prognosis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 28, 20.
23. Wu, Y., Siadat, M.S., Berens, M.E., Hampton, G.M., and Theodorescu, D. (2008). Overlapping gene expression profiles of cell migration and tumor invasion in human

- bladder cancer identify metallothionein 1E and nicotinamide N-methyltransferase as novel regulators of cell migration. *Oncogene* 27, 6679–6689.
24. Roeßler, M., Rollinger, W., Palme, S., Hagmann, M.-L., Berndt, P., Engel, A.M., Schneidinger, B., Pfeffer, M., Andres, H., Karl, J., *et al.* (2005). Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 6550–6557.
  25. Aoyama, K., Matsubara, K., Kondo, M., Murakawa, Y., Suno, M., Yamashita, K., Yamaguchi, S., and Kobayashi, S. (2001). Nicotinamide-N-methyltransferase is higher in the lumbar cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 298, 78–80.
  26. Parsons, R.B., Smith, M.-L., Williams, A.C., Waring, R.H., and Ramsden, D.B. (2002). Expression of nicotinamide N-methyltransferase (EC 2.1. 1.1) in the Parkinsonian brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 111–124.
  27. Parsons, R.B., Smith, S.W., Waring, R.H., Williams, A.C., and Ramsden, D.B. (2003). High expression of nicotinamide N-methyltransferase in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 342, 13–16.
  28. Cantoni, G.L. (1985). The role of S-adenosylhomocysteine in the biological utilization of S-adenosylmethionine. *Prog. Clin. Biol. Res.* 198, 47–65.
  29. Swiatek, K.R., Simon, L.N., and Chao, K.-L. (1973). Nicotinamide methyltransferase and S-adenosylmethionine: 5'-methylthioadenosine hydrolase. Control of transfer ribonucleic acid methylation. *Biochemistry* 12, 4670–4674.
  30. Alston, T.A., and Abeles, R.H. (1988). Substrate specificity of nicotinamide methyltransferase isolated from porcine liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 260, 601–608.
  31. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, and Löffler, G. (1935-) (2014). *Biochemie und Pathobiochemie* 9., vollst. überarb. Aufl. (Berlin ; Heidelberg: Springer).
  32. Anastasiou, D., and Krek, W. (2006). SIRT1: Linking Adaptive Cellular Responses to Aging-Associated Changes in Organismal Physiology. *Physiology* 21, 404–410.
  33. Teperino, R., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2010). Histone methyl-transferases and demethylases; can they link metabolism and transcription ? *Cell Metab.* 12, 321–327.
  34. Friedel, H.A., Goa, K.L., and Benfield, P. (1989). S-adenosyl-L-methionine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in liver dysfunction and affective disorders in relation to its physiological role in cell metabolism. *Drugs* 38, 389–416.

35. Mato, J., Alvarez, L., Ortiz, P., and Pajares, M.A. (1997). S-adenosylmethionine synthesis: Molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol. Ther.* *73*, 265–280.
36. Felsted, R.L., and Chaykin, S. (1967). N1-Methylnicotinamide Oxidation in a Number of Mammals. *J. Biol. Chem.* *242*, 1274–1279.
37. Finkelstein, J.D. (1990). Methionine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem.* *1*, 228–237.
38. Lu, S.C. (1998). Regulation of Hepatic Glutathione Synthesis. *Semin. Liver Dis.* *18*, 331–343.
39. World Health Organization (2011). Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation, Geneva, 8-11 December 2008 (Geneva: World Health Organization).
40. Kraus, D. (2014). Consolidated data analysis and presentation using an open-source add-in for the Microsoft Excel® spreadsheet software. *Med. Writ.* *23*, 25–28.
41. Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., and Buchner, A. (2007). G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav. Res. Methods* *39*, 175–191.
42. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* *150*, 76–85.
43. Wiechelman, K.J., Braun, R.D., and Fitzpatrick, J.D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* *175*, 231–237.
44. Rudolphi, B., Zapp, B., Kraus, N.A., Ehebauer, F., Kraus, B.J., and Kraus, D. (2017). Body weight predicts Nicotinamide N-Methyltransferase activity in mouse fat. *Endocr. Res.* *0*, 1–9.
45. Ritchie, R.J., and Prvan, T. (1996). Current statistical methods for estimating the Km and Vmax of Michaelis-Menten kinetics. *Biochem. Educ.* *24*, 196–206.
46. Ritz, Christian; Streibig, Jens Carl 9780387096155: Nonlinear Regression with R (Use R!) - AbeBooks - Ritz, Christian; Streibig, Jens Carl: 0387096159. Available at: <https://www.abebooks.de/9780387096155/Nonlinear-Regression-R-Use-Ritz-0387096159/plp> [Accessed September 7, 2020].
47. Yan, L., Otterness, D.M., Craddock, T.L., and Weinshilboum, R.M. (1997). Mouse Liver Nicotinamide N-Methyltransferase:: cDNA Cloning, Expression, and Nucleotide Sequence Polymorphisms. *Biochem. Pharmacol.* *54*, 1139–1149.

48. Scheller, T., Orgacka, H., Szumlanski, C.L., and Weinshilboum, R.M. (1996). Mouse liver nicotinamide N-methyltransferase pharmacogenetics: biochemical properties and variation in activity among inbred strains. *Pharmacogenet. Genomics* 6, 43–53.
49. Liu, M., Li, L., Chu, J., Dai, G., Ju, W., Wang, Z., and Fang, Z. (2016). OS 33-03 SERUM N1-METHYLNICOTINAMIDE IS ASSOCIATED WITH OBESITY AND DIABETES IN CHINESE. *J. Hypertens. 34 Suppl 1-ISH 2016 Abstract Book*, e393–e394.
50. Neelakantan, H., Vance, V., Wang, H.-Y.L., McHardy, S.F., and Watowich, S.J. (2017). Noncoupled Fluorescent Assay for Direct Real-Time Monitoring of Nicotinamide N-Methyltransferase Activity. *Biochemistry*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01215> [Accessed February 9, 2017].
51. Smith, M.-L., Burnett, D., Bennett, P., Waring, R.H., Brown, H.M., Williams, A.C., and Ramsden, D.B. (1998). A direct correlation between nicotinamide N-methyltransferase activity and protein levels in human liver cytosol. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 1442, 238–244.
52. Brachs, S., Polack, J., Brachs, M., Jahn-Hofmann, K., Elvert, R., Pfenninger, A., Bärenz, F., Margerie, D., Mai, K., Spranger, J., *et al.* (2019). Genetic Nicotinamide N-Methyltransferase (Nnmt) Deficiency in Male Mice Improves Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obesity but Does Not Affect Glucose Tolerance. *Diabetes* 68, 527–542.
53. Nemmara, V.V., Tilwawala, R., Salinger, A.J., Miller, L., Nguyen, S.H., Weerapana, E., and Thompson, P.R. (2018). Citrullination Inactivates Nicotinamide-N-methyltransferase. *ACS Chem. Biol.* 13, 2663–2672.
54. Hong, S., Moreno-Navarrete, J.M., Wei, X., Kikukawa, Y., Tzameli, I., Prasad, D., Lee, Y., Asara, J.M., Fernandez-Real, J.M., Maratos-Flier, E., *et al.* (2015). Nicotinamide N-methyltransferase regulates hepatic nutrient metabolism through Sirt1 protein stabilization. *Nat. Med.* 21, 887–894.
55. Yan, L., Otterness, D.M., Craddock, T.L., and Weinshilboum, R.M. (1997). Mouse Liver Nicotinamide N-Methyltransferase:: cDNA Cloning, Expression, and Nucleotide Sequence Polymorphisms. *Biochem. Pharmacol.* 54, 1139–1149.
56. Maïza, A., Waldek, S., Ballardie, F.W., and Daley-Yates, P.T. (1992). Estimation of renal tubular secretion in man, in health and disease, using endogenous N-1-methylnicotinamide. *Nephron* 60, 12–16.
57. Deen, C.P.J., van der Veen, A., Gomes-Neto, A.W., Geleijnse, J.M., Borgonjen-van den Berg, K.J., Heiner-Fokkema, M.R., Kema, I.P., and Bakker, S.J.L. (2020). Urinary Excretion of N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N1-methylnicotinamide in Renal Transplant Recipients and Donors. *J. Clin. Med.* 9.

## 7 Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abbildung 1</b> NNMT-Reaktion .....	3
<b>Abbildung 2</b> Stoffwechselwege der Substrate und Produkte von NNMT .....	4
<b>Abbildung 3</b> Fluoreszenzreaktion.....	18
<b>Diagramm 1</b> Abbau von 1-MN unter Inkubation mit KOH-EtOH .....	23
<b>Diagramm 2</b> Stabile Fluoreszenzwerte mit dem Fluoreszenzmix .....	24
<b>Diagramm 3</b> Verschiedene Inkubationszeiten mit Ameisensäure.....	25
<b>Diagramm 4</b> $K_m$ von NNMT für Nicotinamid .....	26
<b>Diagramm 5</b> Evaluation der Inkubationszeit der NNMT-Reaktion .....	27
<b>Diagramm 6</b> NNMT-Aktivität im Fettgewebe .....	30
<b>Diagramm 7</b> Vergleich NNMT-Aktivität im Omentum majus vs. subkutanem Fettgewebe .....	31
<b>Diagramm 8</b> Korrelation NNMT-Aktivität und Proteinmenge .....	32
<b>Diagramm 9</b> Korrelation NNMT-Aktivität und BMI im Fettgewebe .....	33
<b>Diagramm 10</b> Korrelation NNMT-Aktivität und Diabetes mellitus .....	34
<b>Tabelle 1</b> Geräte .....	6
<b>Tabelle 2</b> Verbrauchsmaterialien .....	7
<b>Tabelle 3</b> Chemikalien und Lösungen.....	8
<b>Tabelle 4</b> Substratmix.....	10
<b>Tabelle 5</b> 20 % Acetophenon.....	10
<b>Tabelle 6</b> 2 M Kalilauge in Ethanol (KOH-EtOH).....	10
<b>Tabelle 7</b> Fluoreszenzmix .....	10
<b>Tabelle 8</b> Lysepuffer .....	10
<b>Tabelle 9</b> Laemmli-Puffer .....	11
<b>Tabelle 10</b> SDS-Polyacrylamid-Gel .....	11
<b>Tabelle 11</b> Laufpuffer .....	11
<b>Tabelle 12</b> Transferpuffer.....	12

<b>Tabelle 13</b> Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (TBS), 10 x konzentriert.....	12
<b>Tabelle 14</b> TBS mit Tween (TBS-T).....	12
<b>Tabelle 15</b> Stripping-Puffer .....	12
<b>Tabelle 16</b> Parameter der Patienten .....	28
<b>Tabelle 17</b> $K_m$ -Werte für NNMT .....	36

## 8 Abkürzungsverzeichnis

---

1M2P5C	1-Methyl-2-pyridon-5-carboxamid
1M4P3C	1-Methyl-4-pyridon-3-carboxamid
1-MN	1-Methylnicotinamid
A om	Adipöse Patienten, Omentum majus
A sc	Adipöse Patienten, subkutanes Fettgewebe
AOX	Aldehydoxidase
Aqua inject.	Aqua injectabilia
BCA	Bicinchoninsäure Assay
CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ameisensäure
EA sc	Ehemals adipöse Patienten, subkutanes Fettgewebe
EtOH	Absolutes Ethanol
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
KOH	Kalilauge
KOH-EtOH	2 M Kalilauge in Ethanol gelöst
NA om	Nicht adipöse Patienten, Omentum majus
NA sc	Nicht adipöse Patienten, subkutanes Fettgewebe
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenosindinukleotid
NNMT	Nicotinamid-N-Methyltransferase
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin

Ich danke allen an dieser Dissertation beteiligten Personen. Danke für die unermüdliche und vollkommene Unterstützung im Labor durch Anja Sauer, Franziska Ehebauer, Benedikt Zapp und Nils Kraus. Danke an die Abteilungen der Chirurgie I und II der Universitätsklinik Würzburg für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. C. Wanner für die großartige Unterstützung als Doktorvater, der jederzeit für Fragen und Anregungen zur Seite stand. Ein weiteres Danke geht an Herrn Univ. Prof. Dr. med. O. Ritter als Mitglied des Supervisor Teams für die Graduate School of Life Sciences, worüber ich dieses großartige Stipendium und eine ergänzende Ausbildung im wissenschaftlichen Arbeiten erhalten habe.

Der größte Dank geht jedoch an Dr. med. Daniel Kraus, dem ich die Möglichkeit zur Durchführung dieser Dissertation verdanke. Er stand zu jeder Tag- und Nachtzeit für Fragen, Rat und Hilfe zur Verfügung. Danke für die Unterstützung in der Teilnahme an den verschiedenen Kongressen und der Publikationen. Ich danke ihm für die großartige Betreuung und die Mentorenrolle, die er als Arzt und Wissenschaftler für mich eingenommen hat.

Und zu guter Letzt, Danke ich noch meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden, die mich die ganzen Jahre über zum Durchhalten ermuntert und unterstützt haben.

## **Weitere Publikationen – Originalarbeiten**

Kraus NA, **Rudolphi B**, Zapp B, Wanner C, Kraus D (2016). Valid assessment of lipid content of cultured adipocytes using oil red O. *Adipocyte*, Sep 26/5(4):351-358/2016

## **Weitere Vorträge und Poster**

Zapp B, Kraus NA, **Rudolphi B**, Kraus B, Sauer A, Klein J, Wanner C, Kraus D (2016). Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT) regulates insulin sensitivity differentially in white and brown adipocytes. Poster. Diabetes Kongress, Mai 2016, Berlin.

Zapp B, **Rudolphi B**, Kraus NA, Klein J, Wanner C, Kraus D (2016). Pharmacological inhibition of nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) in adipocytes by romidepsin. Poster. Diabetes Kongress, Mai 2016, Berlin.

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



