

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Stefan Frantz

**Einfluss der Nikotinamid N-Methyltransferase-Aktivität
auf die Glukoseaufnahme rate weißer und brauner
Adipozyten**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Benedikt Alexander Zapp

aus München

Würzburg, Februar 2020

Referent bzw. Referentin: Prof. Dr. med. Christoph Wanner

Korreferent bzw. Korreferentin: Prof. Dr. med. Nicolas Schlegel

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2020

Der Promovend ist Arzt.

Eidesstattliche Versicherung

Zapp, Benedikt Alexander

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einfluss der Nikotinamid N-Methyltransferase-Aktivität auf die Glukoseaufnahmerate weißer und brauner Adipozyten

selbstständig verfasst habe, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht habe.

Die Gelegenheit zum Promotionsverfahren wurden mir nicht kommerziell vermittelt. Insbesondere wurde keine Person oder Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Die Regeln über gute wissenschaftliche Praxis der Universität Würzburg habe ich eingehalten.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

2.2.3.3	<i>Aufbereitung der Zellen zur Messung der Glukoseaufnahme aus dem Zytosol</i>	- 28 -
2.2.3.4	<i>Bestimmung des Proteingehaltes des Lysates und Einstellung der Proteinmenge</i>	- 29 -
2.2.3.5	<i>Bestimmung der Glukoseaufnahme aus dem Zytosollysate</i>	- 29 -
2.2.4	Experimente zur Bestimmung der Behandlungsbedingungen beim Glukoseaufnahmeassay	- 35 -
2.2.4.1	<i>Experiment zur Bestimmung der Konzentration der 2DG im Medium beim Glukoseaufnahmeassay</i>	- 35 -
2.2.4.2	<i>Experiment zur Bestimmung der Inkubationsdauer mit 2-Deoxyglukose beim Glukoseaufnahmeassay</i>	- 36 -
2.2.4.3	<i>Versuch zur Bestimmung der Präinkubationsdauer mit Insulin zur maximalen Stimulation der Glukoseaufnahme</i>	- 36 -
2.2.5	Experiment zur internen Validierung des Glukoseaufnahmeassays mit Insulin- und Isoproterenolbehandlung	- 37 -
2.3	Mathematische und statistische Analyse	- 38 -
3	Ergebnisse	- 39 -
3.1	Hemmung der NNMT-Aktivität durch lentiviralen Knock-down	- 39 -
3.2	Evaluation der verschiedenen Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzyme	- 42 -
3.2.1	Substratspezifität der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzyme	- 42 -
3.2.2	pH abhängige Aktivität der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzyme im Glukoseaufnahmeassay	- 44 -
3.3	Lineare Abhängigkeit der 2-Deoxyglukose-6-phosphat-Konzentration der Standardkurve von der gemessenen Absorption im Glukoseaufnahmeassay	- 45 -
3.4	Inkubationsbedingungen zur Bestimmung der Glukoseaufnahme in Fettzellkulturen	- 46 -
3.4.1	Konzentration der 2-Deoxyglukose bei der Glukoseaufnahmeinkubation	- 47 -
3.4.2	Dauer der Aufnahmeinkubation mit 2-Deoxyglukose	- 49 -
3.4.3	Inkubationszeit mit Insulin zur maximalen Stimulation der Glukoseaufnahme	- 50 -
3.5	Testung der Effekte von Insulin und Isoproterenol auf die Glukoseaufnahme in weißen und braunen Adipozyten	- 51 -
3.6	Einfluss der zytosolischen NNMT-Aktivität auf die Glukoseaufnahmerate	- 54 -
3.6.1	Beeinflussung der NNMT-Aktivität durch die Vorbehandlung für den Glukoseaufnahmeassay	- 54 -

3.6.2 Einfluss der NNMT-Aktivität auf die insulinstimulierte Glukoseaufnahme	- 57 -
4 Diskussion	- 62 -
4.1 NNMT-Aktivität in den transduzierten Adipozytenkulturen	- 62 -
4.2 Der enzymatische Glukoseaufnahmeassay mit 2-Deoxyglukose	- 63 -
4.3 Kein Effekt des Isoproterenols bei 3T3-L1 Adipozyten	- 65 -
4.4 Differenzieller Einfluss der NNMT-Aktivität auf die Glukoseaufnahme und Insulinsensitivität in weißen und braunen Adipozyten	- 66 -
5 Zusammenfassung	- 69 -
6 Literatur-, Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	- 70 -
6.1 Literaturverzeichnis	- 70 -
6.2 Abkürzungsverzeichnis	- 74 -
6.3 Abbildungsverzeichnis	- 76 -
6.4 Tabellenverzeichnis	- 79 -

1 Einleitung

1.1 Adipositas, Insulinresistenz und zelluläre Glukosetransporter

Adipositas besteht, wenn der Anteil der Fettmasse am Körpergewicht bei Frauen 30 %, bei Männern 20 % übersteigt. Adipositas ist in 95 % der Fälle primär, da sie zumeist aus der Kombination verschiedener genetischer Faktoren, Lebengewohnheiten und/oder psychischer Faktoren hervorgeht. Bei der wesentlich selteneren sekundären Adipositas (ca. 5 %) ist die Gewichtszunahme Symptom anderer Erkrankungen, wie M. Cushing oder Hypothyreose (Herold, 2015).

23,9 % der weiblichen und 23,3 % der männlichen Bevölkerung Deutschlands im Alter zwischen 18 und 79 Jahren waren nach einer Analyse des Robert-Koch-Institutes von 2013 adipös, wobei sich gleichzeitig eine deutliche Zunahme der Adipositasprävalenz gegenüber der vorhergehenden Studie von 1988 zeigte (Mensink et al., 2013).

Dabei besteht der Krankheitswert der Adipositas in der mit ihr assoziierten Morbidität und Mortalität (Herold, 2015). Zu den Risikofaktoren und Erkrankungen, die die Adipositas begleiten zählt, insbesondere eine Insulinresistenz, welche sich letztlich in einem Diabetes mellitus Typ 2 manifestieren kann (Herold, 2015).

Bei der Entstehung einer Insulinresistenz nimmt das Fettgewebe eine besondere Rolle ein. Unter normalen Bedingungen ist dieses für etwa 15 % der insulinabhängigen Glukoseaufnahme verantwortlich. Charakteristisch für die Insulinresistenz ist eine Störung des insulinabhängigen Glukosetransporters GLUT4, der für die insulinabhängige Glukoseaufnahme zuständig ist (Kahn und Flier, 2000). Im Frühstadium einer systemischen Insulinresistenz ist der insulinabhängige GLUT4 jedoch nur im Fettgewebe, nicht aber in anderen Organen wie etwa dem Skelettmuskel, vermindert exprimiert (Shepherd und Kahn, 1999). Transgene Mäuse, die nur im Fettgewebe GLUT4 überexprimieren, sind systemisch hypersensitiv für Insulin, und Knock-out-

Mäuse, die GLUT4 selektiv im Fettgewebe nicht exprimieren, sind systemisch insulinresistent (Minokoshi et al., 2003).

1.2 Weiße und braune Adipozyten

Die Parenchymzellen des Fettgewebes sind die Adipozyten. Klassischerweise werden aufgrund ihrer unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften, weiße von braunen Adipozyten unterschieden.

Weißer Adipozyten dienen der Speicherung von Energie in Form von Fettsäuren, welche in Hungerphasen zur Aufrechterhaltung der körperlichen Funktion wieder abgegeben werden. Sie besitzen eine große, zentrale Fettvakuole, die etwa 90% ihrer Größe ausmacht (Cinti, 2012). Neben ihrer Funktion als Energiespeicher greifen weiße Adipozyten in vielfältiger Weise in die Homöostase des Körpers ein und zeigen endokrin, sekretorische Funktionen. Dabei spielt nicht nur Leptin, als Hormon zur Regulation des Hungergefühls und Fettstoffwechsels, sondern auch die Sekretion von Steroidhormonen eine Rolle. Das weiße Fettgewebe sezerniert zudem verschiedenste andere Faktoren mit Einflüssen auf Blutdruckregulation (Angiotensinogen), Blutgerinnung (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, Tissue Faktor) und Entzündungen (Interleukin-6, TNFalpha) (Trayhurn und Beattie, 2001).

Braune Adipozyten stellen sich mit vielen kleinen Fettvakuolen und zahlreichen großen Mitochondrien dar. Dabei sind braune Adipozyten durch die Expression des uncoupling protein 1 (UCP1) charakterisiert, das einen Protonenkanal in der Mitochondrienmembran bildet und so die Atmungskette von der ATP-Synthese entkoppelt (Cinti, 2012). Dies führt zur Oxidation metabolischer Substrate ohne deren Energie für weitere Prozesse zur Verfügung zu stellen und damit zur Umwandlung chemischer Energie in Wärme (Thermogenese) (Cannon und Nedergaard, 2004). Diese Funktion kann einen direkten Einfluss

auf die Energiehomöostase des Menschen haben, was insbesondere durch die Korrelation einer erhöhten kälteaktivierten Aktivität des braunen Fettgewebes mit einem niedrigeren BMI gezeigt wurde (Saito et al., 2009).

1.3 Nikotinamid N-Methyltransferase (NNMT) bei Adipositas und Insulinresistenz

Die Nikotinamid N-Methyltransferase (NNMT) ist ein 264 Aminosäuren großes Protein mit einer molekularen Masse von 29,6 kDa. Ihre enzymatische Aktivität ist die N-Methylierung von Nikotinamid zu 1-Methylnikotinamid (1-MN), wobei S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor dient (Aksoy et al., 1994). Die NNMT wird vorwiegend in weißem Fettgewebe und nur in deutlich geringerem Ausmaß in anderen Organen, wie der Leber und Lunge, exprimiert (Riederer et al., 2009; Rudolphi et al., 2017).

In DNA-Microarray Untersuchungen von Mausmodellen zur Insulinresistenz, mit adipozytenspezifischem GLUT4 Knock-out und zur Insulinhypersensitivität, mit adipozytenspezifischer Überexpression des GLUT4, wurde die NNMT als stark reguliertes Gen identifiziert. Für Mäuse mit GLUT4 Knock-out wurde eine deutlich gesteigerte NNMT-mRNA Expression nachgewiesen, während bei einer GLUT4-Überexpression eine verminderte mRNA Expression gezeigt wurde (Kraus et al., 2014).

Die beiden Adipositas-Mausmodelle mit Leptin-Defizienz und Leptin-Rezeptor-Defizienz (Friedman und Halaas, 1998) zeigen wegen des fehlenden Leptinsignals ein unkontrolliertes Fressverhalten. Daher leiden diese an Adipositas und den daraus resultierenden Folgen der Insulinresistenz und des Typ 2 Diabetes. Für beide Adipositas-Mausmodelle zeigte sich eine 1,5 – 2-fach erhöhte NNMT-Proteinmenge im weißen Fettgewebe (Kraus et al., 2014).

Ein Knock-down des NNMT Gens durch Antisense-Oligonukleotide (ASO) schützte Mäuse vor der durch eine hochkalorische Diät induzierten Adipositas.

Die Nahrungseffizienz, definiert als Gewichtszunahme pro aufgenommene kcal, war in der NNMT-Knock-down Gruppe um 50% reduziert. Hierbei zeigte sich kein Einfluss auf die Energiezufuhr oder die körperliche Aktivität der NNMT-Knock-down Mäuse, sondern ein erhöhter Energieumsatz im Fettgewebe. Unterschiede in der Körpertemperatur der Mäuse waren nicht nachweisbar. Der Sauerstoffverbrauch der NNMT-Knock-down Mäuse war jedoch erhöht und sie zeigten eine höhere Glukosetoleranz (Kraus et al., 2014).

In Zellkulturexperimenten mit 3T3-L1 Adipozyten stellte sich heraus, dass sich die NNMT Expression direkt auf den Sauerstoffverbrauch der Adipozyten auswirkt. Während eine NNMT-Überexpression mit verringertem Sauerstoffverbrauch einherging, stieg der Sauerstoffverbrauch bei einer NNMT-Expressionsinhibition mit NNMT-ASO. Auch bei pharmakologischer Hemmung der Enzymaktivität, mittels Produkthemmung durch 1-MN, war der Sauerstoffverbrauch der Adipozyten erhöht (Kraus et al., 2014).

Ergebnisse zum Einfluss der NNMT im Menschen entstammten zunächst der Population der Pima-Indianer, welche die höchste bekannte Rate an Typ 2 Diabetes Erkrankungen und Adipositas aufweist. In einer Studie zu Unterschieden der Genexpression subkutaner Fettzellen adipöser und nicht-adipöser Pima-Indianer, wurde eine differenzielle Expression der NNMT festgestellt. In der adipösen Kohorte war die NNMT-Expression 2,6-fach gesteigert (Lee et al., 2005).

Bei adipösen Menschen, Ratten und Mäusen fanden sich erhöhte Level des NNMT-Produkts 1-Methylnikotinamid (1-MN) im Urin (Salek et al., 2007), was suggestiv für eine erhöhte Aktivität des Enzyms ist. Auch eine gesteigerte Plasmakonzentration von 1-MN zeigte sich mit Insulinresistenz assoziiert. Des Weiteren war das mRNA Expressionslevel der NNMT im subkutanen wie auch viszeralen weißen Fettgewebe von Patienten mit Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes gesteigert (Kannt et al., 2015).

1.4 Glukoseaufnahme

1.4.1 Wissenschaftliche Bedeutung der Glukoseaufnahme

Die Versorgung des Organismus mit Energie ist für katabole als auch anabole Prozesse essentiell. Auf zellulärer Ebene ist Adenosintriphosphat (ATP) das Hauptenergieäquivalent. Dieses stellt durch die Hydrolyse einer oder zweier Phosphatgruppen benötigte Energie bereit. Reduzierte ATP-Level führen rasch zum nekrotischen Zelltod (Eguchi et al., 1997), weshalb die ständige Regeneration des ATPs durch die ATP-Synthase der Mitochondrien von entscheidender Bedeutung für das Überleben der Zelle ist. Die ATP-Synthase nutzt hierfür einen Protonengradienten, der durch Oxidation von reduziertem Nikotinamidadenindinukleotid (NADH/H⁺) aufrechtgehalten wird. Dieses entsteht bei der Oxidation von Nahrungsbestandteilen, insbesondere der schnell verfügbaren Glukose, aus seiner oxidierten Form NAD⁺ (Klinke et al., 2009). Die Glukoseaufnahme einer einzelnen Zelle ist damit ein wesentlicher Parameter für ihre intrazelluläre Stoffwechselleistung.

Vor diesem Hintergrund findet die Messung der Glukoseaufnahme, als Parameter der Zellaktivität und des Zellmetabolismus, sowohl in der Tumorforschung, wie auch in der metabolischen und immunologischen Forschung Anwendung.

1.4.2 Insulinabhängige und insulinunabhängige Glukoseaufnahme

In der metabolischen Forschung liegt das Hauptaugenmerk, wie eingangs dargestellt (1.1), auf den insulin sensitiven Organen, der Muskulatur und dem Fettgewebe. Diese zeichnen sich durch die Expression des insulinabhängigen GLUT4 aus. Folglich ist hier die insulinstimulierte Glukoseaufnahme von besonderem Interesse.

Die basale Glukoseaufnahme wird in allen Geweben über einen insulinunabhängigen Glukosetransporter (GLUT1) vermittelt, spielt in den

insulinsensitiven Geweben allerdings eine insgesamt untergeordnete Rolle. Wesentlicher ist GLUT4, der ohne Insulinwirkung zwischen zytosolischen Vesikeln und der Plasmamembran zyklisiert, jedoch zu etwa 90% intrazellulär vorliegt. Durch Insulin wird dieses Gleichgewicht stark verschoben, die GLUT4-Vesikel verstärkt in die Plasmamembran transloziert (Shepherd und Kahn, 1999). In L6 Muskelzellen aus Ratten führt die Insulinstimulation so zu einem 1,5- bis 4-fachen Anstieg der Glukoseaufnahme (Walker et al., 1989). Für die Fettzellkulturen der 3T3-L1 Adipozyten und für braune Adipozyten aus Mäusen ist ein etwa 5-facher Anstieg der Glukoseaufnahme durch Insulinstimulation gezeigt (Klein et al., 1999; Mulder et al., 2005).

1.4.3 Methode des Radioglukoseassays

Aufgrund der Bedeutung der Glukoseaufnahme wurden in der Wissenschaft Methoden zur Messung der zellulären Glukoseaufnahme entwickelt. Als Standard zur Messung der zellulären Glukoseaufnahme gilt hierbei die Messung der Aufnahme radioaktiv markierter Glukose. Hierbei können verschiedenste Monosaccharide mit den radioaktiven Isotopen ^3H oder ^{14}C markiert werden. Die radioaktiv markierten Glukosederivate 2-Desoxyglukose und 3-O-Methylglukose werden auf demselben Wege wie Glukose aufgenommen, unterliegen jedoch aufgrund ihrer Modifizierung nicht der kompletten Glykolyse. Dadurch akkumulieren die radioaktiven Glukosederivate intrazellulär. Über die Strahlungsintensität kann hochsensitiv dann auf die Menge der aufgenommenen Glukose geschlossen werden (Sokoloff, 1982). Jedoch bringt die Arbeit mit radioaktiven Substanzen einige Nachteile mit sich. So bedarf es nach der Strahlenschutzverordnung (StrlSchV) der Bundesrepublik Deutschland erhöhter personeller, baulicher und organisatorischer Anforderungen, die oftmals nicht einfach vorzuhalten oder neu einzurichten sind. In der Folge wurden zunehmend insbesondere enzymatische Verfahren entwickelt, die ohne Isotope auskommen.

1.4.4 Methoden der enzymatischen Glukoseaufnahmebestimmung

Die publizierten Methoden der enzymatischen Bestimmung der Glukoseaufnahme beruhen auf der Aufnahme von 2-Deoxyglukose (2DG), die durch Glukosetransporter über die Zellmembran tritt und intrazellulär durch die Hexokinase am C6 Atom zu 2-Deoxyglukose-6-phosphat (2DG6P) phosphoryliert wird. Aufgrund der Desoxygenierung des C2 Atoms ist die nachfolgende Reaktion der Glykolyse, die Isomerisierung des Glukose-6-phosphats zu Fructose-6-phosphat, nicht möglich. Wird 2DG6P bestimmt so entspricht diese demnach der aufgenommenen Menge 2DG.

Erste enzymatische Tests wurden für Hirngewebeextrakte entwickelt. Hier wurde die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) der Hefe verwendet, um aus Glukose-6-phosphat (G6P) NADPH zu produzieren. Letzteres wurde bei geringen Konzentrationen quantifiziert, indem es für eine amplifizierende Produktion von 6-Phosphoglukonat verwendet wurde, das abschließend in einer eigenen Nachweisreaktion bestimmt wurde. Da es sich um Gewebeextrakte handelte, kamen Glukose, G6P, 2DG und 2DG6P in dem Gewebe vor und in dem Assay wurden drei der vier Glukosederivate (Glukose, 2DG und 2DG6P) nur indirekt bestimmt (Chi et al., 1987).

Eine Weiterentwicklung erfuhr dieser Assay durch die Einführung eines amplifizierenden NADP⁺ Nachweises, womit es möglich war, das im Assay produzierte NADPH spektrophotometrisch nachzuweisen. Diese Methoden wurden zur Bestimmung der Glukoseaufnahme aus Hirngewebslysaten von in vivo mit 2DG behandelten Mäusen entwickelt. Das Nebeneinander der vier Glukosederivate im Lysat (Glukose, G6P, 2DG, 2DG6P) erforderte allerdings die differenzierte Betrachtung eines jeden. Dies machte die Bestimmung der Glukoseaufnahmezeitintensiv und nur bedingt direkt bestimmbar (Akabayashi und Kato, 1992).

Yamamoto et al. beschrieben einen enzymatischen Glukoseaufnahmeassay für Myozyten-Zellkulturen. Dabei wurde ebenfalls 2DG unter Verwendung des

G6PDH Isoenzym der Hefe nachgewiesen. Der Nachweis des gebildeten NADPH erfolgte über eine Rezyklisierung desselben zwischen G6PDH und Diaphorase, wobei aus Resazurin das fluoreszierende Produkt Resorfin gebildet wurde. Dies verlangt jedoch das Vorhandensein eines Fluoreszenzmessgerätes. Zudem wurde der Einfluss von kontaminierendem endogenem G6P in diesem Assay nicht beachtet. Glukose-6-phosphat ist in den Myozyten, beispielsweise auch aus dem Muskelglykogen, stets in zumindest geringer Konzentration vorhanden. Dieses reagiert mit der G6PDH in der 2DG6P-Nachweisreaktion identisch und müsste für eine exakte Bestimmung zuvor entfernt werden (Yamamoto et al., 2006).

Saito et al. (Saito et al., 2011) beschrieben einen Glukoseaufnahme Assay in 3T3-L1 Adipozyten und verwendeten hierbei das G6PDH Isoenzym des Bakteriums *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides*), welches im Unterschied zum Isoenzym aus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) die Oxidation von Glukose-6-phosphat mit beiden Redox-Systemen des Nikotinadenins (NAD^+/NADH und $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) katalysieren kann. Dies wurde zur Einführung einer Eliminationsreaktion für zelleigenes G6P genutzt. Die Elimination der G6P wurde mit dem NAD^+/NADH -System bei geringen G6PDH-Enzymkonzentrationen katalysiert. So konnte eine hohe Spezifität für die G6P erzielt werden, da die 2DG6P erst bei hohen G6PDH-Konzentrationen als Substrat relevant ist und eine geringere Reaktivität mit NAD^+ aufweist als G6P. Den Nachweis der 2DG6P führen Saito et al. ebenfalls über die G6PDH-Reaktion, diesmal jedoch unter Bildung von NADPH. Hierfür wurde erneut das G6PDH-Isoenzym des Bakteriums *L. mesenteroides* eingesetzt. Die beschriebene, abschließende Amplifikationsreaktion für NADPH nutzte die Reduktion von oxidiertem Glutathion durch das 2DG6P-abhängig produzierte NADPH und die erneute Oxidation der Thiolgruppe des Glutathions durch 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (Ellmans Reagenz), unter Produktion des dann photometrisch nachgewiesenen 2-Nitro-5-thiobenzoats. (Saito et al., 2011).

1.5 Fragestellung

Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde mit der Fragestellung nach einem Einfluss der Nikotinamid N-Methyltransferase auf die Glukoseaufnahme von weißen und braunen Adipozyten angefertigt.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollte ein enzymatisch-photometrisches Messverfahren zur Bestimmung der Glukoseaufnahme in Adipozyten entwickelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Materialien

Laborgerät /-material	Hersteller
Brutschrank	Binder
Laborarbeitsbank („Heara safe“, steril)	Haereus
Nitrilhandschuhe	Meditrade
sterile Handschuhe	Meditrade
Laborglasflaschen (100; 250; 500; 1000; 2000 mL)	Duran
Pasteurpipette, Glas, 14,5 cm	Brand
Pipette, Mehrkanal 200 µL	Eppendorf
Pipetten (10; 20; 100; 200; 1000 µL)	Eppendorf
Pipetten (serologisch) (2; 5; 10; 2; 50 mL)	Greiner
Pipettierhilfe	Hirschmann
Pipettierhilfe (unter Arbeitsbank, steril)	Brand
Pipettenspitzen 10 µL farblos	Eppendorf
Pipettenspitzen 200 µL gelb	Sarstedt
Pipettenspitzen 1000 µL transparent	Sarstedt
Sterilisator	Varioklav
Sterilisator Systec V-75 (für S2 Materialien)	Systec
Wärmeschrank	Memmert
Wasserbad	Memmert
Trockenschrank	Memmert
Tischzentrifuge für Zentrifugenröhrchen zu 15 mL und 50 mL	Hettich
Tischzentrifuge mit Kühlfunktion für Reaktionsgefäße	Hettich
Tischzentrifuge	Hettich
Zellkulturplatten 15 cm	Greiner

Zellkulturplatten, 6-well	Greiner
Microtestplatte, 96-well, flacher Boden, transparent	Sarstedt
Microtestplatte, 96-well, flacher Boden, schwarz	Perkin-Elmer
Zentrifugenröhrchen / Reaktionsgefäße 0,5; 1,5 und 2,0 mL	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen / Reaktionsgefäß 15 mL und 50 mL	Greiner
Präzisionswaage	Gram
Laborwaage	Kern
Wägeschälchen	neoLab
Metallspatel, unterschiedliche Ausführungen	
Photometer Asys UVM340 für Microtestplatten	BioChrom
Fluoreszenzmessgerät für Microtestplatten „Victor X3“	Perkin-Elmer
Eismaschine für Flockeneis	Scotsman
Spritzen, Omnifix-F 1 mL	B. Braun Melsungen AG
Spritzen, Omnifix Lock-Ansatz, zentrisch, 10 mL	B. Braun Melsungen AG
Spritzennadeln Hypodermic Needle-Pro 18G	B. Braun Melsungen AG
Wippschüttler	
pH-Meter	Mettler Toledo
Zellschaber	Sarstedt
Thermoschüttler für Reaktionsgefäße 1,5; 2,0 mL	Eppendorf
sterile Einweg-Filtrationsgeräte mit CN-Membran	Thermo Scientific
Alufolie	
Kyroaufbewahrungsboxen	
Vortexmischer	
Eiswannen rechteckig und rund	
Gelkammern für Polyacrylamidgele	Bio-Rad
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad
Gel-Transfer Zelle mit Gel-Kassetten, Schwämmen und Kühlelement	Bio-Rad

Worthman-Papier	Bio-Rad
Nitrozellulosemembran 0,2 µm	Amersham
Röntgenfilm Super RX, UV / blauempfindlich	Fujifilm

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Reagenzien	Hersteller
1-Methylnikotinamid	Sigma-Aldrich Co. LLC
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Hepes)	Sigma-Aldrich Co. LLC
2-Deoxyglukose	Carl Roth GmbH + Co. KG
2-Deoxyglukose-6-phosphat Natriumsalz	Carbo Synth
3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich Co. LLC
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoë Säure (DTNB)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Acetophenon	Sigma-Aldrich Co. LLC
Acrylamid/bis, 40%	Bio-Rad
Ammoniumperoxodisulfat, (APS)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Amphotericin B (Fungizone)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Aprotinin	Sigma-Aldrich Co. LLC
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Co. LLC
Calciumchlorid (CaCl)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Dexamethasone	Sigma-Aldrich Co. LLC
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Ethanol, 99,9%	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethylendiamintetraacetat-Lsg. (0,5 M) (EDTA)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Ethylendiamintetraacetat-Natriumsalz (EDTA)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Formylsäure	Sigma-Aldrich Co. LLC
Glukose 6-phosphat Natriumsalz (G6P)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) (G6PDH _{s. cerev.})	Alpha Aesar

Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .) (G6PDH _{L. mes.})	Sigma-Aldrich Co. LLC
Glutathiondisulfid (oxidierte Form des Glutathions) (GSSG)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Glutathionreduktase (aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) (GR)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Glycerol (Propan-1,2,3-triol)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Co. LLC
Indomethacin	Sigma-Aldrich Co. LLC
Insulin, human, Zellkultur geeignet	Sigma-Aldrich Co. LLC
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumhydroxid, Flakes (KOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Leupeptin	Sigma-Aldrich Co. LLC
L-Glutathion	Sigma-Aldrich Co. LLC
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Methanol, 100%	Carl Roth GmbH + Co. KG
Milchpulver, fettarm (< 1,5% Lipide)	Sigma-Aldrich Co. LLC
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, (TEMED)	Sigma-Aldrich Co. LLC
NAD ⁺ ~98%	Carl Roth GmbH + Co. KG
NADP ⁺ -Dinatriumsalz ~97%	Sigma-Aldrich Co. LLC
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natrium-dodecyl-sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich Co. LLC
Natriumhydroxid, standard volumetric solution, 2 M (NaOH)	AppliChem GmbH
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Nikotinamid	Sigma-Aldrich Co. LLC
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich Co. LLC
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich Co. LLC

Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween20)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Proteinstandard f. Westernlot, „Kaleidoskop™“	Bio-Rad
Rosiglitazon	Sigma-Aldrich Co. LLC
S-Adenosylmethionin (SAM)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Salzsäure, 5 M (HCl)	Merck Millipore
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich Co. LLC
Trijodthyronin	Sigma-Aldrich Co. LLC
Tris gepufferte Salzlösung	Sigma-Aldrich Co. LLC
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG
NNMT-Antikörper, rabbit (PA5-76986)	Invitrogen
p85-Antikörper, rabbit (PA5-32550)	Invitrogen
HRP-gekoppelter anti-rabbit Sekundärantikörper (A16104)	Invitrogen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	gibco® by life technologies
Fötale Kälberserum (FCS)	gibco® by life technologies
Neugeborenen Kälberserum (NBCS)	gibco® by life technologies

2.1.3 Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
3T3-L1 Grundmedium	Dulbecco's modified Eagle's Medium + 10% NBCS
3T3-L1 Induktionsmedium	Dulbecco's modified Eagle's Medium + 10% FBS + 1µM Insulin + 100 nM Dexamethason + 500 µM 3-isobutyl-1-methylxanthin + 250 µM Indomethacin

	+ 1 μM Rosiglitazone + 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Fungizone
3T3-L1 Differenzierungsmedium	Dulbecco's modified Eagle's Medium + 10% FBS + 1 μM Insulin + 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Fungizone
BAT Grundmedium	Dulbecco's modified Eagle's Medium + 20% FBS
BAT Induktionsmedium	Dulbecco's modified Eagle's Medium + 20% FBS + 20 nM Insulin + 1 nM Trijodthyronin + 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Fungizone + 100 nM Dexamethason + 500 μM 3-isobutyl-1-methylxanthin + 250 μM Indomethacin
BAT Differenzierungsmedium	Dulbecco's modified Eagle's Medium + 20% FBS + 20 nM Insulin + 1 nM Trijodthyronin + 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Fungizone

2.1.4 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
KRPH pH 7,4	20 mM Hepes 5 mM KH_2PO_4 1 mM MgSO_4 1 mM CaCl_2 136 mM NaCl 4.7 mM KCl in Wasser
Lyse Puffer eingestellt auf pH 7,4	5 mM Tris-Base 99 mM EDTA 10 mM Natriumpyrophosphat

	100 mM Natriumfluorid 1 % Igepal CA-630 10 mg/L Aprotinin 10 mg/L Leupeptin 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid 2 mM Natriumorthovanadat
4x Lämmli-Puffer pH 6,8	250 mM Tris-HCl 8% Natrium-dodecyl-sulfat 40% Glycerol 400 mM Dithiothreitol Bromphenolblau (1 Spatelspitze bei 20 mL Ansatz) in Aqua dest.
TBS-Tween pH 7,4	20 mM TBS 0,005% Tween in Aqua dest.
Tris-Puffer	Tris-HCl und Tris-Base, gelöst in Wasser in der jeweils angegebenen Molarität und pH. Einstellung des pH bei Raumtemperatur mit 2 M HCl oder NaOH-Lösung
Westernblot Laufpuffer	25 mM Tris-Base 0,1918 M Glycin 0,1% SDS in Aqua dest.
Westernblot Transferpuffer	25 mM Tris-Base 0,1918 M Glycin in 80% Aqua dest. und 20% Methanol

2.1.5 Viren

Lentivirus	Klon ID	Hersteller
sh-NNMT	V2LMM_8374	Thermo Scientific
sh-CTRL	V3LMM_492781	Thermo Scientific

2.2 Methoden

2.2.1 Adipozyten-Zellkultur

Alle Zellkulturplatten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Die Zellkulturmedien der adhärennten Adipozyten wurden alle 2-3 Tage unter einer sterilen Arbeitsbank gewechselt. Hierzu wurden die Medien auf 37 °C erwärmt. Angesetzte Medien wurden steril filtriert und bei 4 °C gelagert. Induktionsmedien wurden aus dem entsprechenden Differenzierungsmedium mit den benötigten Zusätzen unmittelbar vor Verwendung angesetzt.

2.2.1.1 3T3-L1

Die 3T3-L1 Präadipozyten stammten aus der American Type Culture Collection und wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in 15 cm Zellkulturplatten mit Grundmedium gehalten. Bei 60 - 80 %iger Konfluenz wurde mittels 4-minütiger Inkubation mit 4 mL 0,25 % Trypsin, bei 37 °C die Ablösung der Zellen vom Plattenboden angestoßen, die Reaktion nach durch Zugabe von 4 mL Grundmedium terminiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1.200 rpm (Rotordurchmesser 172 mm) für 5 Minuten abzentrifugiert. Nach 1:8 - 1:20 Verdünnung der Zellen mit Grundmedium wurde ein entsprechender Anteil als neue Passage auf eine 15 cm Platte überführt. Übrige Zellen wurden auf 6-well Zellkulturplatten zur Differenzierung ausgesät (2000 Zellen/ mL). Diese wurden bis 72 h nach vollständiger Konfluenz in 3T3-L1 Grundmedium (2.1.3) gehalten und anschließend mit 48-sündiger Inkubation mit 3T3-L1 Induktionsmedium (2.1.3) induziert. Im Anschluss wurden die Zellen in 3T3-L1 Differenzierungsmedium (2.1.3) gehalten. 10 Tage nach Induktion waren die Zellen ausdifferenziert. Experimente mit differenzierten 3T3-L1 Adipozyten wurden 10 - 12 Tage nach Induktion durchgeführt.

2.2.1.2 Braune Adipozyten

Die immortalisierte Zelllinie brauner Präadipozyten stammte von Prof. Johannes Klein aus Lübeck (Klein et al., 2002).

Die braunen Präadipozyten wurden in BAT Grundmedium (2.1.3). gehalten. Bei der Passagierung wurde mit den braunen Präadipozyten wie mit den 3T3-L1 Präadipozyten verfahren. Aufgrund eines schnelleren Wachstums wurden diese mit 1:15-1:80 höher gesplittet als die 3T3-L1 Adipozyten.

Identisch zum Vorgehen bei den 3T3-L1 Präadipozyten wurden Zellen aus der Passagierung zur Aussaat und Differenzierung in 6-well Zellkulturplatten verwendet. Das Aussäen der braunen Präadipozyten zur Differenzierung erfolgte direkt in BAT Differenzierungsmedium (2.1.3). Sobald die braunen Präadipozyten vollständig konfluent waren, wurden sie für 24 Stunden in BAT Induktionsmedium (2.1.3) zur Differenzierung induziert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel zurück auf das BAT Differenzierungsmedium. Die Differenzierung war an Tag 9 abgeschlossen und die Experimente wurden 9-12 Tage nach Induktion durchgeführt.

2.2.1.3 Virale Transduktion von Adipozyten zu NNMT-Knock-down Zellen

Das Transduktionsprotokoll mit Lentiviren wurde für 3T3-L1-Präadipozyten, wie braune Präadipozyten verwendet.

Die jeweiligen Präadipozyten wurden in 12-well Platten mit entsprechendem Grundmedium (2.1.3) bis zu einer Konfluenz von ca. 60-80% gehalten.

Zur Kontrolle wurde ein well im BioRad TC20 Cell counter mit Trypanblau-Färbung ausgezählt, wobei etwa 100.000 Adipozyten erwartet wurden.

Die Präadipozyten wurden einmalig mit reinem, serumfreien, 37°C warmem DMEM gewaschen und anschließend für 16 Stunden mit 250 µL

Virussuspension (5×10^6 Viren/ mL in reinem DMEM +8 µg/ mL Polybrene) inkubiert. Bei deutlicher Abweichung der Präadipozytenzahl/ well (> oder <

100.000) wurde die Konzentration der Viren entsprechend auf das Ziel einer multiplicity of infection von 50 (MOI, Zahl der Viren pro zu transduzierende Zelle) angepasst. Nach der 16-stündigen Inkubation erfolgte eine Volumenexpansion des Mediums durch Zugabe von 1 mL des entsprechenden Grundmediums (2.2).

Nach 48-stündiger Gesamtinkubationsdauer mit den Viren erfolgte ein Mediumwechsel auf Grundmedium mit 20 µg/ mL Puromycin als Selektionszusatz, wobei die Viren zusätzlich die Expression eines entsprechenden Resistenzgens sowie des Fluoreszenzmarkers GFP übertrugen. Die Selektion erfolgte über vier Tage unter fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle. Die anschließende Kultivierung der transduzierten Adipozyten wurde ohne weiteren Zusatz von Puromycin identisch mit den Protokollen der nicht transduzierten Präadipozyten durchgeführt (2.2.1.1 und 2.2.1.2.).

Die erfolgreiche Transduktion mit NNMT-knock-down der spezifischen NNMT-Transduktion gegenüber der Kontrolltransduktion wurde mittels Western Blot und NNMT-Aktivitätsmessung aus Zelllysaten bestätigt (3.1).

2.2.1.4 Bestimmung der NNMT- Enzymaktivität und des NNMT-Proteingehalts

Die Messung der Nikotinamid N-Methyltransferase Enzymaktivität erfolgte aus Zytosollysaten der beschriebenen transduzierten 3T3-L1 und braunen Adipozytenkulturen. Für die Bestimmung wurden Protokolle von Rudolphi (Rudolphi et al., 2017), Clark (Clark et al., 1975) und Sano (Sano et al., 1992) zu Grunde gelegt.

Die Bestimmung des NNMT-Proteingehalts erfolgte im Westernblot.

Zellkulturen aus denen Enzymaktivität oder Proteingehalt von NNMT bestimmt wurden, wurden zur Lyse direkt auf Eis gesetzt, das Zellkulturmedium entfernt

und die Zellen mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Die Lysate wurden anschließend wie unter 2.2.3.3 beschrieben hergestellt. Wie ebendort erfolgte die Bestimmung des Proteingehaltes der Lysate. Die Proteinkonzentration wurde mit Lysepuffer auf 1 mg Protein/ mL eingestellt, bei geringerer Proteinausbeute auch niedriger, bis minimal 0,6 mg Protein/ mL. Um die möglichst uneingeschränkte Aktivität der NNMT im Lysat zu bestimmen, wurde die Bestimmung der Aktivität direkt im Anschluss an die Lyse durchgeführt.

NNMT-Aktivitätstest

Das Reaktionsprodukt der NNMT, 1- Methylnikotinamid (1-MN) wurde fluorometrisch nachgewiesen. S-Adenosylmethionin und Nikotinamid reagierten unter Vermittlung der in den Lysaten enthaltenen NNMT zu 1-Methylnikotinamid (1-MN) und S-Adenosylhomocystein. Das produzierte 1-MN wurde anschließend mit Ketonen in basischer Lösung zu fluoreszierenden 2,7-Naphthyridin-Derivaten (Exzitationsmaximum: 395 nm, Emissionsmaximum: 459 nm (Clark et al., 1975)) umgesetzt (Sano et al., 1992).

Der Aktivitätstest wurde mit einem Reaktionsansatz und einer Negativkontrolle, zur Bestimmung des Hintergrundwertes, aus jedem Zytosollysat durchgeführt. Dabei wurden je 97 µL Zytosollysat zu vorgelegten 3 µL eines Substratmixes für die Nikotinamid N-Methyltransferase, bestehend aus Nikotinamid und S-Adenosylmethionin (Tabelle 1) pipettiert (Sano et al., 1992).

2 Teile (2 µL/ Ansatz)	1 M Nikotinamid in Aqua dest
1 Teil (1 µL/Ansatz)	100 mM SAM in 0,1 mM Schwefelsäure

Tabelle 1: Substratmix für NNMT im Aktivitätstest.

In die Negativkontrolle wurden 200 µL 2 M KOH, gelöst in 92% Ethanol (1 mL Aqua dest. + 11,5 mL 99,9% Ethanol), gegeben. Dies führte zu einer sofortigen Terminierung der Reaktion und diente der Bestimmung des Hintergrundwertes der Fluoreszenz. Anschließend erfolgte eine 180-minütige Inkubation der Lysate mit dem Substratmix bei 37 °C.

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde in den Reaktionsansatz 200 μL 2 M KOH, in 92 % Ethanol, gegeben und die Reaktion somit beendet.

Auf eine neue für fluorometrische Messungen geeignete 96-well Platte wurden anschließend je 60 μL der Reaktions- bzw. Negativkontrollansätze in Duplikaten übertragen. Eine Standardkurve für 1-MN in Lysepuffer wurde in 1,5 mL Reaktionsgefäßen mit einer Konzentration von 0 - 100 μM und einem Volumen von 100 μL vorgelegt. Die Proben der Standardkurve wurden wie die Lysatproben mit 200 μL der 2 M KOH Lösung in 92 % Ethanol versetzt und auf die Platte in Duplikaten zu je 60 μL aufgetragen.

Anschließend wurden 40 μL 20 % Acetophenon in absolutem Ethanol zu jeder Probe pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Danach erfolgte eine Ansäuerung mit 100 μL reiner Formylsäure und eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss.

Die Fluoreszenzintensität wurde unmittelbar nach Abschluss der Inkubationszeit im Fluoreszenz-Microplatten-Reader für 0,5 Sekunden bei einer Anregungswellenlänge von 375 nm und Emissionswellenlänge von 430 nm bestimmt (Rudolphi et al., 2017).

Mit einer linearen Regressionsgeraden aus den Fluoreszenzen der 1-MN Standardkurve wurde die 1-MN Konzentration der Proben errechnet. Für den Fluoreszenzwert jeder Probe wurde vom Fluoreszenz-Mittelwert der jeweilige Fluoreszenz-Mittelwert der Negativkontrolle abgezogen. Es erfolgte die Umrechnung der 1-MN Konzentration [μM] in die Aktivität pro mg Protein des Zelllysats ($\text{pmol}/\text{min}/\text{mg Protein} = \mu\text{U}/\text{mg Protein}$). Hierzu wurde die molare Menge an produziertem 1-MN, das verwendete Lysatvolumen mit dessen Proteinkonzentration und die Inkubationszeit zur 1-MN Produktion in

entsprechenden Bezug zueinander gesetzt ($\frac{1\text{-MN Konzentration} \times \text{Messvolumen}}{\text{Inkubationszeit} \times \text{Proteinkonzentration}_{\text{Lysat}} \times \text{Lysatvolumen}}$).

SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

Zum relativen, quantitativen Proteinnachweis aus Zelllysaten wurden zweiteilige Gele für eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe hergestellt. In vorgefertigte Einmal-Gelkammern mit 18 Probestaschen wurde zuerst ein 12 %iges Trenngel (5,6 mL 30% Acrylamid/bis; 3,5 mL 1,5 M Tris-Puffer, pH 8,8; 140 µL 10% SDS; 7 µL TEMED; 70 µL 10% APS; 4,7 mL H₂O; Gesamtvolumen 14 mL) gegossen. Dieses wurde mit einem 4 %igen Sammelgel (0,66 mL 30 % Acrylamid/bis; 1,26 mL 0,5 M Tris-Puffer, pH 6,8; 50 µL 10 % SDS; 5 µL TEMED; 25 µL 10% APS; 3 mL H₂O; Gesamtvolumen 5 mL) überschichtet.

Die Zytosollysate wurden mit Lyse-Puffer auf möglichst hohe, identische Gesamtproteinkonzentrationen eingestellt, 1:4 mit 4x konzentriertem Lämmli-puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C unter konstantem Schütteln aufgekocht.

Nach Assemblierung, wurde das Gel mit je 30 µL Probe oder Proteinmarker Kaleidoskop™ beladen. Die Elektrophorese wurde mit niedrigerer Spannung (100 V) gestartet und im Trenngel auf 200 V gesteigert.

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine in Sandwichtechnik auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (geblottet). Die Blotting-Kassette wurde nass mit Transferpuffer vorbereitet, der Transfer bei 4 °C für 30 Minuten mit etwa 100 V bei einer maximalen Stromstärke von 0,5 mA durchgeführt.

Schließlich wurde die Nitrozellulosemembran mit 5 % Milch in TBS-Tween (5 % Milch/TBS-Tween) für 15 Minuten geblockt, dann mit spezifischen Primärantikörpern (rabbit-anti-p85 oder rabbit-anti-NNMT, 1:1000 in 5 % Milch/TBS-Tween) bei 4 °C über Nacht unter Schwenken inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal gewaschen (5 % Milch/TBS-Tween), anschließend für 1 h bei RT mit HRP-gekoppeltem anti-rabbit Sekundärantikörper, ebenfalls unter Schwenken, inkubiert, danach erneut dreimal gewaschen (5 % Milch/TBS-Tween).

Enhanced Luminol Reagent und Oxidizing Reagent wurden nach Herstellerangaben 1:1 gemischt, die Membran damit überschichtet, eine Minute mit dem Chemolumineszenz-Reagenz inkubiert und dann in eine Filmkassette eingelegt. Durch die Chemolumineszenzreaktion wurden in der Filmkassette Röntgenfilme belichtet, die anschließend mit einer automatisierten Entwicklermaschine entwickelt wurden. Mit einer Masse von 29,6 kDa war in diesem Proteingrößenbereich die NNMT-Bande zu erwarten. Die Bande von p85 (Phosphoinositid-3-Kinase, 85 kDa) wurde als Ladekontrolle verwendet.

2.2.2 Versuche zur Substratspezifität und pH-abhängigen Enzymkinetik der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzyme

2.2.2.1 Versuch zur Substratspezifität der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzyme

Substratspezifität und Reaktivität der verwendeten Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzyme wurden bezüglich G6P und 2DG6P, sowie NAD^+ und NADP^+ , in einem einfachen Vorversuch verglichen.

Die Nachweisreaktion des nachfolgend detailliert beschriebenen Glukoseaufnahmeassays (2.2.3) nutzend, wurde NAD^+ oder NADP^+ mit den beiden Zuckerderivaten unter Katalyse jeweils eines der beiden Isoenzyme in einer 96-well Platte inkubiert.

Der verwendete Reaktionsmix bestand aus einem Reagenz mit dem Isoenzym der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase des Bakteriums *L. mesenteroides* oder der Hefe aus *S. cerevisiae*. Als Probe wurde ein Substratmix aus NAD^+ oder NADP^+ (je 0,2 mM) mit G6P oder 2DG6P (je 5 mM) verwendet. Das Gesamtvolumen betrug während der Reaktion 100 μL je well.

Gesamtvolumen/ well: 100 µl	Endkonzentrationen (nach Mischung von Reagenz und Probe)
Reagenz: 30 µl/ well	
10 mM Tris-Puffer pH 8,1 bei Raumtemperatur	
EDTA	1 mM
Glutathion, oxidiert (GSSG)	10 µM
Glutathionreduktase (GR)	1,5 U/ml
DTNB	1 mM
Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase aus <i>L. mes.</i> oder <i>S. cerev.</i>	0,01 U/ml
Probe: 70µl/ well	
10 mM Tris-Puffer pH 8,1 bei Raumtemperatur	
G6P oder 2DG6P*	5 mM
NAD ⁺ oder NADP ⁺	0,2 mM

Tabelle 2: Reaktionsansätze zur Bestimmung der Substratspezifität der G6PDH Isoenzyme.

Für den Reaktionsmix wurden bewusst niedrige Enzymkonzentrationen gewählt, um einem zu schnellen Ablauf der Reaktion vorzubeugen. Die Reaktion wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Es wurde die Absorption bei 412 nm durch 2-Nitro-5-thiobenzoat, das bei der Reaktion von DTNB mit Thiolgruppen des reduzierten Glutathions in stöchiometrischem Verhältnis entsteht, gemessen. Alle Reaktionen wurden in Triplikaten angesetzt und ausgewertet.

2.2.2.2 Versuch zur pH Abhängigen Enzymaktivität der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzyme

In der verwendeten Methode zur 2DG Aufnahmebestimmung wird das Ellman's Reagenz eingesetzt, welches sich bei alkalischem pH autokatalytisch in das gemessene 2-Nitro-5-thiobenzoat zersetzt. In diesem pH Bereich liegt allerdings das pH-Optimum der G6PDH Isoenzyme (Afolayan, 1972; Olive et al., 1971). Daher wurde der Einfluss, eines neutralen bis leicht sauren pH-Wertes auf die Aktivität der beiden Isoenzyme aus *L. mesenteroides* und *S. cerevisiae*

untersucht, um die Aktivität der G6PDH während des Glukoseaufnahme Assays einschätzen zu können.

G6P und NADP⁺ sind die natürlichen Substrate der G6PDH und zeigen die höchste Reaktivität mit beiden Isoenzymen (3.2.1). Die katalysierte Reaktion in der NADPH als Reduktionsäquivalent entsteht, kann photometrisch beobachtet werden, da NADPH gegenüber NADP⁺ ein weiteres Absorptionsmaximum bei 340 nm besitzt (Horecker und Kornberg, 1948). Als Substratkonzentrationen wurden für Glukose-6-phosphat 5 mM (62- bzw. 66-fache K_m-Wert) und für NADP⁺ 1 mM (176- bzw. 172- facher K_m-Wert) gewählt, um einen Einfluss des Edukt-Produkt-Gleichgewichts vernachlässigbar zu halten.

	Leuconostoc mesenteroides (Olive et al., 1971)	Hefe (Candida utilis) (Afolayan, 1972)
K _m (NADP ⁺)	5,69 µM (pH 7,2)	5,8 µM (pH 7,5)
K _m (G6P) Reaktion mit NADP ⁺	81,0 µM (pH 7,2)	76 µM (pH 7,5)
K _m (NAD ⁺)	106 µM (pH 7,8)	-
K _m (G6P) Reaktion mit NAD ⁺	52,7 µM (pH 7,8)	-

Tabelle 3: Michaelis-Menten Konstanten (K_m) der G6PDH Isoenzyme.

Die eingesetzte Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Aktivität wurde niedrig gehalten, um die Reaktion im linearen Bereich des Photometers messen zu können. Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C inkubiert, um einen weiteren Effekt der Temperatur ebenfalls weitgehend ausschließen zu können.

Da der Einfluss der Temperatur auf den pH-Wert von Tris-Puffern bekannt ist (Bernhard, 1956) und die Konzentration der verschiedenen Puffer nicht durch zu starkes Verdünnen bei der Einstellung des pH verändert werden sollte, wurden Tris-Puffer nach dem Datenblatt des Chemikalien Anbieters angesetzt und entsprechend Tabelle 4 mit 2 M NaOH bzw. 2 M HCl Lösung titriert. Der pH wurde mit einer kombinierten Temperatur-/ pH-Sonde eingestellt.

Die Puffer wurden in einer Konzentration von 500 mM angesetzt, um den Einfluss des 10 mM Lösungspuffers (Tris; pH 8,1) für die Substrate und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenasen, vernachlässigbar klein zu halten.

Ausgangspuffer pH bei 25°C	6,6	6,9	7,2	7,5	7,8	8,2	9,0
Daraus mit 2M NaOH bzw. HCl eingestellte Puffer pH bei 25°C	6,5	6,8	7,1	7,4	7,7	8,0	8,4
	6,6	6,9	7,2	7,5	7,8	8,2	9,0
	6,7	7,0	7,3	7,6	7,9	8,4	

Tabelle 4: Tris-Puffer-Ansätze und die hieraus titrierten Puffer für die Testung der pH-Abhängigkeit der G6PDH.

G6P und NADP⁺ wurden als Mastermix in den wells einer 96-well Platte vorgelegt und anschließend der entsprechende 500 mM Tris-Puffer zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe des jeweiligen Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzym gestartete.

Im Reaktionsansatz ergab sich damit folgende Zusammensetzung:

	Volumen	Endkonzentration
200 mM G6P in 10 mM Tris pH 8,1	5 µL	5 mM
20 mM NADP ⁺ in 10 mM Tris pH 8,1	10 µL	1 mM
500 mM Tris-Puffer pH bei 25 °C nach Protokoll [6.5 – 9.0]	175 µL	
0,2 U/ml G6PDH (S. cerevisiae / L. mesenteroides) in 10 mM Tris pH 8,1	10 µL	0,01 U/ml

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die Bestimmung der pH-abhängigen Aktivität der G6PDH.

Durch die Mischung verschieden konzentrierter und mit unterschiedlichem pH bei Raumtemperatur eingestellten Tris-Puffer, war der finale pH-Wert im Reaktionsansatz bei 37 °C unklar. Daher wurde mit einer pH Elektrode der endgültige pH-Wert jeder Probe bei 37 C bestimmt und dieser bei der Auswertung aufgetragen.

2.2.3 Enzymatischer Glukoseaufnahmeassay

Als Grundlage für den im nachfolgenden entwickelten Glukoseaufnahmeassay diente die von Saito et al. veröffentlichte Methode eines derartigen enzymatischen Tests (Saito et al., 2011). Dieser wurde unter Nutzung der Substratspezifitäten der prokaryotischen bzw. eukaryotischen G6PDH weiterentwickelt.

2.2.3.1 Vorbereitung der Zellen

Aufgrund potentieller insulinolytischer und insulinomimetischer Faktoren, die in Seren enthalten sein können, welche für die Zellkultur verwendet wurden, wurden die Zellen über Nacht (≥ 16 Stunden) mit DMEM ohne Zusätze („Hungermedium“) vorinkubiert. Hiernach wurden die Zellen zweimalig mit jeweils 2 mL 37 °C warmem KRPH-Puffer gewaschen.

Anschließend wurden in jedem well der Zellkulturplatten das Medium mit 2 mL KRPH-Puffer (37 °C) ersetzt. Dies erfolgte je nach Versuchsaufbau und Behandlungsgruppe mit oder ohne Zusatz von Insulin, Isoproterenol oder der Kombination von beidem (vgl. 2.2.4 und 2.2.5).

Sowohl Insulin als auch Isoproterenol vermitteln ihren Einfluss rasch, über membrangebundene Rezeptoren. Die Zusätze wurden in KRPH-Puffer gelöst und mit diesem auf die Zellen gegeben.

2.2.3.2 Inkubation mit 2-Deoxyglukose zur Glukoseaufnahme

Nach der oben beschriebenen Vorbehandlung wurden mit einer elektronischen Multipipette 100 μ L einer 105 mM 2DG Lösung (KRPH-Puffer, 37 °C) in die Behandlungsmedien gegeben. Dabei wurden die Platten zur Verteilung der 2DG-Lösung geschwenkt. Die 2DG-Gesamtkonzentration betrug damit 5 mM im

well. Direkt nach Zugabe wurden die Zellkulturplatten für 2 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

In dieser Zeit fand die Aufnahme der 2DG statt. Im Anschluss hieran wurden die Zellen auf Eis gesetzt, was ihre Stoffwechselaktivität abrupt herunterfährt. Anschließend wurde die 2DG-haltige Lösung entfernt und die Adipozyten dreimal mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Im ersten Waschschrift wurde PBS mit 200 µM Phloretin versetzt. Phloretin ist ein kompetitiver Inhibitor des insulinunabhängigen GLUT1 und insulinabhängigen GLUT4 (Augustin, 2010) und verhindert so eine fortgesetzte Glukoseaufnahme. In jedem Waschschrift wurden 2 mL PBS pro well verwendet.

2.2.3.3 Aufbereitung der Zellen zur Messung der Glukoseaufnahme aus dem Zytosol

Für die Herstellung des Zelllysates wurde der PBS-Überstand nach dem Waschen entfernt. Im Anschluss wurden 200 µL 4 °C kalter Lysepuffer je well zugegeben, die Adipozyten mit Hilfe von Zellkulturschabern, vom Boden gelöst und die Zell- und Lysepuffer Suspension in 1,5 mL Reaktions-Gefäße auf Eis überführt. Anschließend wurde die Suspension bei 4 °C mit 600 rpm für 10 Minuten geschüttelt und zentrifugiert (10 Minuten bei 4 °C mit 13.000 rpm, Rotordurchmesser 19 cm). Dadurch wurden nicht lösliche Bestandteile auf den Boden abzentrifugiert. In der flüssigen Phase fand sich der Lysepuffer mit dem hierin gelösten Zytosol. Auf dieser schwamm ein Fettkuchen aus den intrazellulären Triglyzeriden der Adipozyten. Mit Hilfe von 1 mL Tuberkulinspritzen mit 18 G Nadel, wurde die flüssige Phase aus dem zentrifugierten Lysat in neue 1,5 mL Reaktions-Gefäße überführt und weiterverarbeitet.

2.2.3.4 Bestimmung des Proteingehaltes des Lysates und Einstellung der Proteinmenge

Aus allen Lysaten wurde mittels der Bicinchoninsäure-Methode die enthaltene Proteinmenge bestimmt (Smith et al., 1985). Hierfür wurden 10 µL Lysat in Doppelbestimmung auf eine 96-well Platte gegeben und eine Standardkurve aus Rinderalbumin für den Proteingehalt von 0 bis 5 mg Protein/ mL, in Schritten von 0,5 mg/ mL pipettiert.

Zu den Proben wurde anschließend 100 µL frisch angesetztes Nachweisreagenz (Bicinchoninsäure, 1:50 mit 4 % Cu-II-Sulfat Lösung versetzt) gegeben, die Platte abgedeckt und für 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Abschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm im Mikroplatten-Reader bestimmt. Über die lineare Standardkurve wurde der Proteingehalt der Lysate bestimmt und diese mit Lysepuffer auf gleiche Konzentrationen von 1 mg Protein/ mL, bei geringer Ausbeute auch niedriger, bis 0,6 mg Protein/ mL, eingestellt.

2.2.3.5 Bestimmung der Glukoseaufnahme aus dem Zytosollysate

Bei der hier beschriebenen enzymatischen Messung der Glukoseaufnahme werden Prinzipien angewandt, die in anderen enzymatischen Tests bereits ähnlich vorbeschrieben wurden (vgl. 1.4.4 und Saito et al., 2011).

Es wird zusätzlich die Substratspezifität für NADP⁺/NADPH des G6PDH-Isoenzym aus *Sacc. cerevisiae* ausgenutzt, um den Assay schneller durchzuführen. Die Elimination von NADH/H⁺ aus der G6P Eliminationsreaktion ist mit Verwendung des *Sacc. cerevisiae* G6PDH-Isoenzym für die nachfolgenden Schritte nicht mehr notwendig. Die Amplifikationsreaktion wird

hierdurch spezifisch für das in der 2DG6P Nachweisreaktion produzierte NADPH/H⁺ (Abbildung 1).

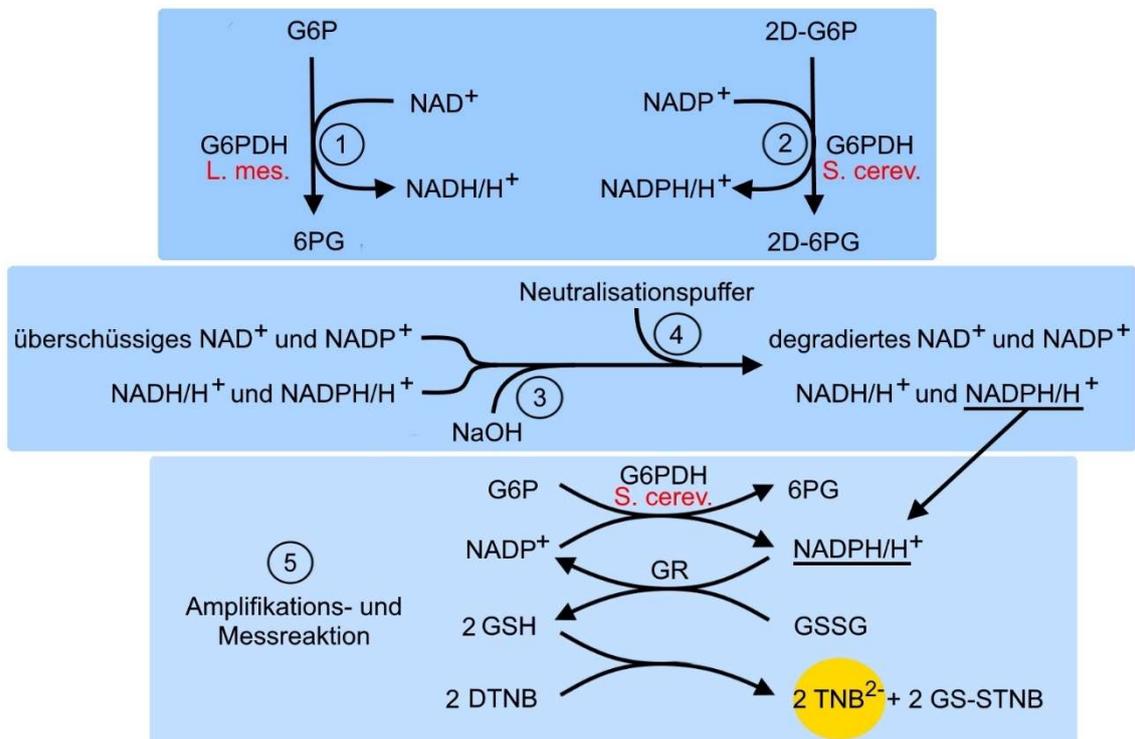


Abbildung 1: Schaubild der Reaktionen des Glukoseaufnahmeassays
 (1) Elimination von endogenem Glukose-6-phosphat
 (2) Umsatz von 2DG6P mit Produktion von NADP⁺/H⁺ für den abschließenden Nachweis
 (3) und (4) Elimination von überschüssigem NADP⁺
 (5) amplifizierende, spezifische Nachweisreaktion für NADPH/H⁺

Probenvorbereitung

Für den Assay wurden jeweils 20 µL Zytosollysat mit einer Proteinkonzentration von 0,1 mg Protein/ mL verwendet. Diese wurde mit Lysepuffer, eingestellt. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht, um Enzyme des Zytosollysats zu degradieren und so einen Einfluss auf den Assay auszuschließen.

Des Weiteren wurde aus 100 µM 2DG6P in reinem Wasser mit Lysepuffer eine Standardkurve von 0 µM (reiner Lysepuffer) bis 10 µM 2DG6P, in Konzentrationsschritten von 1 µM pipettiert.

Alle Proben wurden in Doppelbestimmung auf eine für photometrische Messungen geeignete 96 well Platte mit flachem Boden aufgetragen.

Elimination des endogenen Glukose-6-phosphates

Im ersten Schritt der Glukoseaufnahme-Bestimmung wurde die im Zytosol vorhandene G6P durch Reaktion mit NAD^+ , katalysiert durch die $\text{G6PDH}_{\text{L. mes.}}$, entfernt. G6P zeigt eine deutlich höhere Reaktivität mit der G6PDH als das Derivat 2DG6P und könnte bei dessen Nachweis über die G6PDH-Reaktion einen großen Fehler verursachen. Zur G6P-Elimination wurden 50 μL des Reagenzes #1 (Tabelle 6) verwendet, die direkt zu den Proben dazugegeben und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden.

10 mM Tris Puffer pH 8.1 (bei 25°C)

4,20 mM EDTA

140 μM NAD^+

1,26 U/ml Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase,
Isoenzym aus *L. mesenteroides*

Tabelle 6: Zusammensetzung Reagenz #1 zur Elimination endogener G6P aus dem Lysat.

Bei dieser geringen Aktivität der $\text{G6PDH}_{\text{L. mes}}$, bei gleichzeitig sehr schlechter Substratbindung des 2-DG6P, liegt ein beinahe ausschließlicher Umsatz des endogenen G6P zu 6-Phosphogluconolacton (6PG) vor (vgl. 3.2.1).

Nachweisreaktion für 2-Deoxyglukose-6-phosphat

Nach der eliminierenden Reaktion für die G6P wurden 20 μL des Reagenzes #2 (Tabelle 7) zu den Proben hinzugefügt und diese erneut für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert.

10 mM Tris Puffer pH 8.1 (bei 25°C)

3,00 mM EDTA

30 μM NADP^+

133,33 U/ml Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, Isoenzym der *S. cerevisiae*

Tabelle 7: Zusammensetzung Reagenz #2 für die Nachweisreaktion von 2DG6P.

Bei nun sehr hohen Enzymkonzentrationen der G6PDH_{S. cerev.} wurde die Oxidation des 2DG6P katalysiert. Als Oxidationsmittel wurde NADP⁺ in hoher Konzentration (~ 5,2-fache K_m-Konzentration; K_m = 5,8 µM) verwendet (Afolayan, 1972). Bei der Oxidation von 2DG6P zu 2-Deoxy-6-phosphogluconolacton (2D6PG) entstand NADPH/H⁺ in äquimolaren Mengen. Mit Verwendung des eukaryoten Isoenzym G6PDH_{S. cerev.} diente NAD⁺ aus der vorhergehenden G6P-Eliminationsreaktion nicht als Reaktionspartner. Die 2DG6P wurde unter spezifischer Reduktion von NADP⁺ zu NADPH/H⁺ umgesetzt.

Elimination von überschüssigem NADP⁺

Die später anschließende amplifizierende Reaktion zur Messung des produzierten NADPH/H⁺ beruht auf der abwechselnden Reduktion und Oxidation des Redox-Paares NADP⁺ - NADPH/H⁺. Daher wurde als nächstes verbliebenes NADP⁺ degradiert. Hierzu wurden die Proben mit 20 µL 0.60 M Natronlauge alkalisiert und bei 75 °C für 60 Minuten inkubiert. Dieses Vorgehen zerstört das verbliebene NADP⁺ ebenso wie das, noch aus der G6P-Eliminationsreaktion vorhandene, NAD⁺ (Lowry et al., 1961).

Für die anschließende Messung der Glukoseaufnahme über eine Rezyklisierung von NADP⁺ - NADPH/H⁺ mit Produktion des photometrisch messbaren Farbstoffes 2-Nitro-5-thiobenzoat, wurde die 96 well Platte für 10 Minuten auf Eis gekühlt und die Proben anschließend mit 20 µl Neutralisationspuffer neutralisiert.

500 mM Tris-Puffer pH 7.1 (25°C)

0.6 M HCl

Table 8: Zusammensetzung des Neutralisationspuffers.

Mit diesem erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach diesem Schritt befand sich im Proben-Reagenzgemisch eine, zum umgesetzten 2DG6P äquimolare Menge NADPH/H⁺ und das aus der Elimination der G6P stammende NADH/H⁺.

Amplifizierende, spezifische Nachweisreaktion für NADPH/H⁺

Abschließend wurde eine Nachweisreaktion für kleine Mengen NADPH/H⁺ verwendet (Jørgensen und Rasmussen, 1979).

Zu jeder Probe wurden 60 µL des Reagenzes #3 mit nachfolgender Zusammensetzung gegeben (Tabelle 9).

500 mM Tris-Puffer pH 7,1 (25°C)
3,33 mM EDTA
16,67 mM Glukose-6-phosphat
30 µM Glutathiondisulfid (oxidierte Form des Glutathions)
3,33 mM 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoë Säure (DTNB)
66,67 U/ml Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, Isoenzym der <i>S. cerevisiae</i>
3,33 U/ml Glutathionreduktase, aus <i>S. cerevisiae</i>

Tabelle 9: Zusammensetzung Reagenz #3 zur Amplifikation des NADPH/H⁺-Signals aus der Nachweisreaktion.

Die Proben wurden mit dem Reagenz #3 bei 37 °C inkubiert. Während der 15-minütigen Inkubationszeit kam es durch Bildung von 2-Nitro-5-thiobenzoat zu einem gelben Farbumschlag, welcher ein photometrisch messbares Absorptionsmaximum bei 412 nm aufweist. Die Produktionsgeschwindigkeit von 2-Nitro-5-thiobenzoat ist dabei abhängig von der aufgenommenen 2DG (Saito et al., 2011).

G6P und Glutathiondisulfid (GSSG) werden mit G6PDH_{S. cerev.} und Glutathionreduktase (GR) in Anwesenheit des aus der Nachweisreaktion für 2DG6P stammenden NADPH/H⁺ inkubiert. Die GR oxidiert dabei NADPH/H⁺ zu NADP⁺ um GSSG zu reduzieren. Das hierbei in doppelt-äquimolarer Menge entstehende Thiol Glutathion reagiert stöchiometrisch mit DTNB in neutralem Milieu zu deprotoniertem 2-Nitro-5-thiobenzoat mit einem Absorptionsmaximum bei 412 nm. Dies kann zum quantitativen Thiolnachweis eingesetzt werden (Riddles et al., 1983). Durch Anwesenheit von G6P und G6PDH wird das NADP⁺ erneut reduziert. Es entsteht ein Kreislauf für das aus der 2DG6P-Nachweisreaktion stammende NADPH/H⁺, wobei jeder Zyklus in der Bildung von 2 Molekülen photometrisch messbarem, deprotoniertem 2-Nitro-5-thiobenzoat resultiert. Dabei ist die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion von

der Geschwindigkeit der GR abhängig. In diesem Reaktionsansatz ist die wiederum von der Menge des NADPH/H⁺ in der Probe und damit direkt von der 2DG6P-Konzentration des Zelllysates abhängig (Saito et al., 2011).

In der Amplifikationsreaktion wurde die G6PDH_{S. cerev.} verwendet und so eine für NADPH/H⁺ spezifische Reaktion durchgeführt. Das aus der G6P-Eliminationsreaktion stammende NADH/H⁺ dient der eukaryoten G6PDH_{S. cerev.} nicht als Substrat (Olive et al., 1971), zusätzlich katalysiert die Glutathionreduktase die Reduktion von GSSG mit NADH/H⁺ als Reduktionsmittel deutlich schlechter als mit NADPH/H⁺ (Bulger und Brandt, 1971).

Auswertung des Glukoseaufnahmeassays

Die beschriebene Farbreaktion wurde in einem Mikroplatten-Reader bei 412 nm gemessen. Dabei erfolgte die erste Messung direkt nach Zugabe des Reagenzes #3, bei Start der messbaren Farbreaktion. Danach wurden die Proben bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweite Messung der Absorption bei 412 nm im Mikroplatten-Reader.

Die Absorptionsdifferenz zwischen Reaktionsstart und nach Inkubation wurde errechnet und für die Standardkurve gegen die 2DG6P-Konzentration aufgetragen. Mittels linearer Regression der Standardkurve wurden die 2DG6P Konzentrationen der Lysat-Proben errechnet. Durch Einbezug der Proteinkonzentration der Lysate, des verwendeten Lysatvolumens sowie der Zeitdauer der Inkubation mit 2DG wurde die Glukoseaufnahme mit der Einheit [$\mu\text{mol 2DG/ mg Protein/ Minute}$] errechnet.

Um die Intensität der Endpunktbestimmung für hohe 2DG6P-Konzentrationen innerhalb des linearen Bereiches des Mikroplatten-Readers zu messen, wurde die 15-minütige Inkubationszeit teilweise verkürzt. Längere Inkubationszeiten ließen eine bessere Diskriminierung von Unterschieden bei niedrigen 2DG6P-Konzentrationen zu.

2.2.4 Experimente zur Bestimmung der Behandlungsbedingungen beim Glukoseaufnahmeassay

In einem ersten Versuch wurden 3T3-L1 Adipozyten, die mit 100 nM Insulin für 20 Minuten prästimuliert wurden, mit 1 mM 2DG wie unter 2.2.3.2 beschrieben für vier verschiedene Zeitintervalle von 2, 5, 10 und 15 min inkubiert. Dies erfolgte in direkter Anlehnung an das Protokoll von Saito et al. (Saito et al., 2011).

Unter diesen Bedingungen konnte die Glukoseaufnahme nur eingeschränkt beurteilt werden (vgl. 3.4), sodass die Parameter der 2DG-Konzentration im Medium bei Aufnahmeinkubation, die Dauer der 2DG-Aufnahmeinkubation und die Dauer der Insulinstimulation bei der Bestimmung der insulinstimulierten Glukoseaufnahme mit den nachfolgenden Experimenten untersucht wurde.

2.2.4.1 Experiment zur Bestimmung der Konzentration der 2DG im Medium beim Glukoseaufnahmeassay

Zur Bestimmung der benötigten Konzentration von 2DG im Medium zur Glukoseaufnahme in die Zellen wurden 5 verschiedene Konzentrationen untersucht. Diese wurden durch die Zugabe verschiedener Volumina, der verwendeten 105 mM 2DG Lösung (Tabelle 10), zu den 2 mL KRPH-Puffer aus der Vorbehandlung, erreicht (vgl. 2.2.3.1). Die Adipozyten wurden mit 100 nM Insulin für 20 Minuten behandelt, die Inkubationsdauer mit 2DG betrug 2 min (3.4.2 und 3.4.3).

Anschließend erfolgte die Messung der Glukoseaufnahme wie unter 2.2.3 beschrieben.

Der Versuch wurde stets in Triplikaten angesetzt, 3 Mal wiederholt und für beide untersuchten Fettzellkulturen durchgeführt.

Volumen der 105 mM 2DG-Lösung	entsprechende Konzentration bei Inkubation
0 µL	0 mM
20 µL	1,04 mM
50 µL	2,56 mM
100 µL	5,00 mM
150 µL	7,33 mM

Tabelle 10: Volumina der 2DG-Lösung und entsprechende 2DG-Konzentration bei Inkubation.

2.2.4.2 Experiment zur Bestimmung der Inkubationsdauer mit 2-Deoxyglukose beim Glukoseaufnahmeassay

Um die nötige Dauer der Inkubation mit 2DG zu bestimmen wurde die Glukoseaufnahme rate differenzierter weißer und brauner Adipozyten nach 20-minütiger Insulin-Vorstimulation gemessen. Diese wurde für 2-, 5-, 10- und 20-minütige Inkubation mit 5 mM 2DG bestimmt. Die Behandlung der Adipozyten erfolgte hierzu, mit Ausnahme der getesteten Inkubationsdauer, wie unter 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschrieben und unter 3.4.1 und 3.4.3 bestimmt.

2.2.4.3 Versuch zur Bestimmung der Präinkubationsdauer mit Insulin zur maximalen Stimulation der Glukoseaufnahme

In der Literatur zur Insulinstimulation von Adipozyten wird meist eine Konzentration von 100 nM Insulin genutzt, diese variiert jedoch zum Teil deutlich in der Dauer der Vorstimulation, die von 5 bis 60 min reicht (Smith et al., 1980; Stahl et al., 2002).

Es wurden daher Experimente zur Dauer der Präinkubation mit 100 nM Insulin durchgeführt, um den maximalen Effekt der Insulinwirkung in Bezug auf die Glukoseaufnahme zu beurteilen.

Nach der unter 2.2.3.1 beschriebenen Vorbereitung der Zellen wurden diese für 0, 10, 20, 40 und 60 Minuten mit 100 nM Insulin in KRPB-Puffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 mM 2DG für 2 min, wie unter 2.2.3.2 beschrieben (vgl. zudem 3.4.1 und 3.4.2) und die Glukoseaufnahme wurde wie unter 2.2.3 beschrieben bestimmt.

2.2.5 Experiment zur internen Validierung des Glukoseaufnahmeassays mit Insulin- und Isoproterenolbehandlung

Zur internen Validierung des unter 2.2.3 beschriebenen Glukoseaufnahmeassays wurden die Effekte von Insulin und Isoproterenol auf beide Adipozytenkulturen untersucht. Isoproterenol ist ein β -Sympathomimetikum und inhibiert die Aufnahme von Glukose in Adipozyten über die Wirkung der membranständigen β -Rezeptoren des sympathikoadrenergen Systems. Zur Behandlung wurde nach Mulder et al. eine Konzentration von 1 μ M gewählt (Mulder et al., 2005). Insulin vermittelt über die Insulinrezeptoren die Translokation von GLUT4-Transportern in die Plasmamembran und führt somit zur verstärkten Glukoseaufnahme (Shepherd und Kahn, 1999). Die Behandlung erfolgte mit 100 nM Insulin für 20 min. Die Adipozyten wurden, entsprechend Tabelle 11, in KRPB-Puffer je nach Gruppe mit / ohne 100 nM Insulin und / oder 1 μ M Isoproterenol behandelt.

Zeit vor 2DG-Zugabe	Zusätze in 2 mL KRPB-Behandlungsmedium	
	40 min	20 min
Isoproterenol	1 μ M Isoproterenol	1 μ M Isoproterenol
Isoproterenol + Insulin	1 μ M Isoproterenol	1 μ M Isoproterenol + 100 nM Insulin
Insulin	-	100 nM Insulin
neg. Kontrolle	-	-

Tabelle 11: Behandlungsgruppen mit Isoproterenol und Insulin.

Die Glukoseaufnahme wurde mit den entsprechenden Vorbehandlungen, wie in 2.2.3 beschrieben, bestimmt. Der Versuch wurde in identischer Weise je dreimal für 3T3-L1 sowie braune Adipozytenkulturen in Triplikaten durchgeführt.

2.3 Mathematische und statistische Analyse

Die mathematischen und statistischen Analysen der Ergebnisse und Versuche wurden mit Microsoft Excel® 2010, 2013 und 2016, der Freeware Erweiterung Daniel's XL Toolbox in den Versionen 6.22, 6.23, 6.52 und 6.60 und GraphPad Prism® Version 5.0a durchgeführt.

3 Ergebnisse

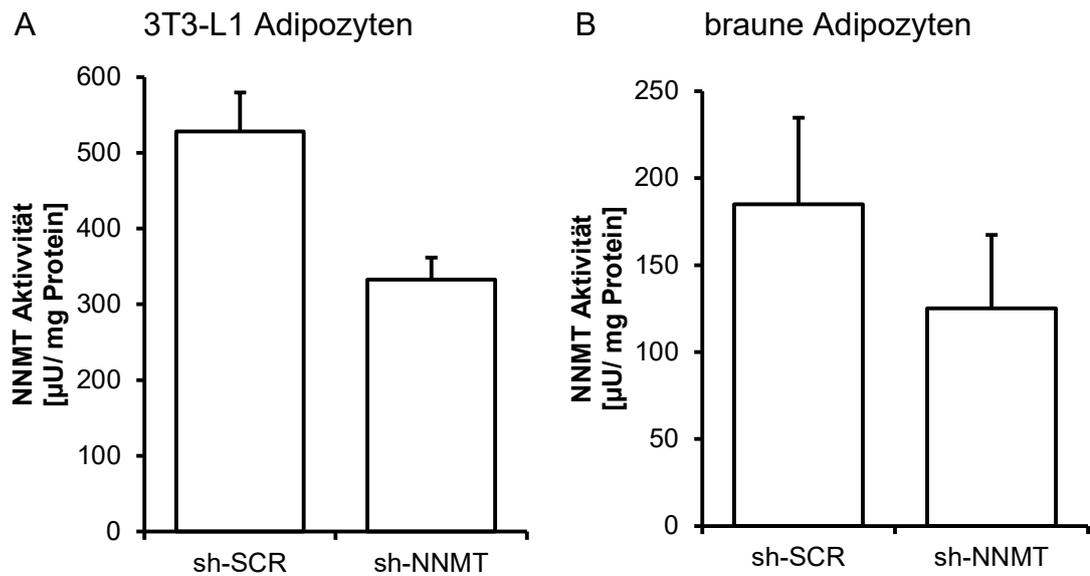
Um den Einfluss der NNMT Aktivität auf die Insulinvermittelte Glukoseaufnahme von Fettzellen zu bestimmen, wurde auf Basis bekannter enzymatischer Glukoseaufnahmeassays ein optimierter Assay entwickelt.

Anschließend folgten mit diesem Glukoseaufnahmeassay Untersuchungen zum Einfluss der NNMT-Aktivität auf die Glukoseaufnahme weißer und brauner Fettzellen. Hierzu wurden Fettzellkulturen mit einem lentiviralen Knock-down für NNMT mit einer unspezifisch transduzierten Kontrollgruppe verglichen.

3.1 Hemmung der NNMT-Aktivität durch lentiviralen Knock-down

Die effektive NNMT-spezifische Transduktion (sh-NNMT) von 3T3-L1 und braunen Präadipozyten mit Knock-down der NNMT-Aktivität im Vergleich zur Kontrolltransduktion mit unspezifischen Lentiviren (sh-SCR) wurde im Aktivitätstest und Westernblot nachgewiesen.

Die NNMT-Aktivität sank für die NNMT spezifische-Transduktion in ausdifferenzierten 3T3-L1 Adipozyten auf 58,2 %, in ausdifferenzierten braunen Adipozyten auf 67,6% der Aktivität in der Kontrolle (Abbildung 2).



NNMT-Aktivität [μ U/mg Protein]	Mittelwert	Stabw.	%	p =
3T3-L1 sh-SCR	523,7	43,6	100	
3T3-L1 sh-NNMT	304,8	76,1	58,2	<0,001
braune Adipozyten sh-SCR	185,1	49,8	100	
braune Adipozyten sh-NNMT	125,1	42,4	67,6	0,02

Abbildung 2 NNMT-Aktivität der NNMT-Knock-down Adipozyten im Vergleich zu ihrer Kontrolle. A) NNMT-Aktivität in 3T3-L1 Adipozyten. B) NNMT-Aktivität in braunen Adipozyten.
Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in Triplikaten.

Die Aktivitätsminderung im Zelllysate konnte im Westernblot sowohl in 3T3-L1 als auch in braunen Adipozyten auf eine Reduktion des NNMT Proteingehaltes zurückgeführt werden. Dies belegte eine effektive Hemmung der Transkription von NNMT durch die spezifische, lentivirale Transduktion (Abbildung 3 und Abbildung 4).

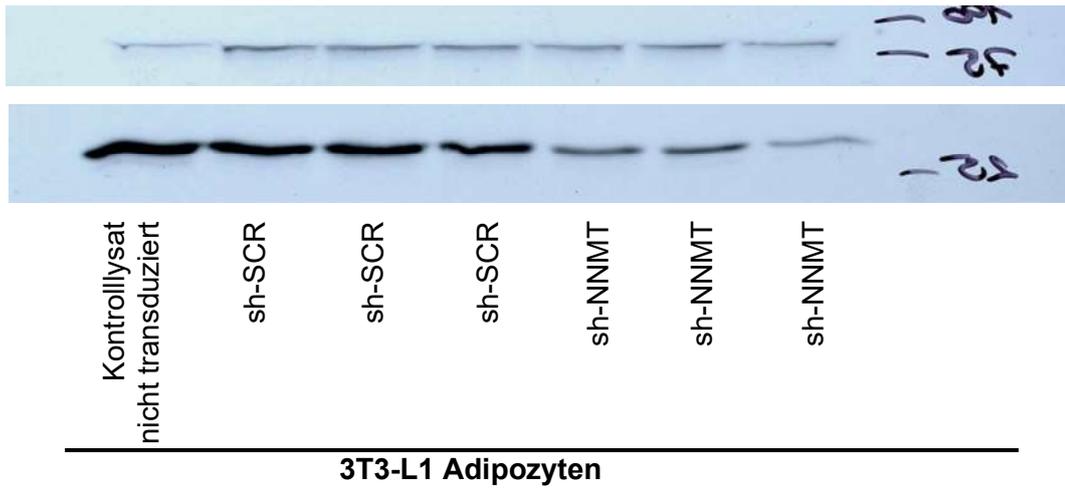


Abbildung 3: Beispiel eines Western-Blot Films für NNMT (~30 kDa, unten) von transduzierten 3T3-L1 Adipozyten-Lysaten mit zugehöriger p85-Ladungskontrolle (oben). sh-SCR: Kontrolltransduktion; sh-NNMT: NNMT-spezifische Transduktion. Zur besseren Lesbarkeit wurde der Film horizontal gespiegelt.

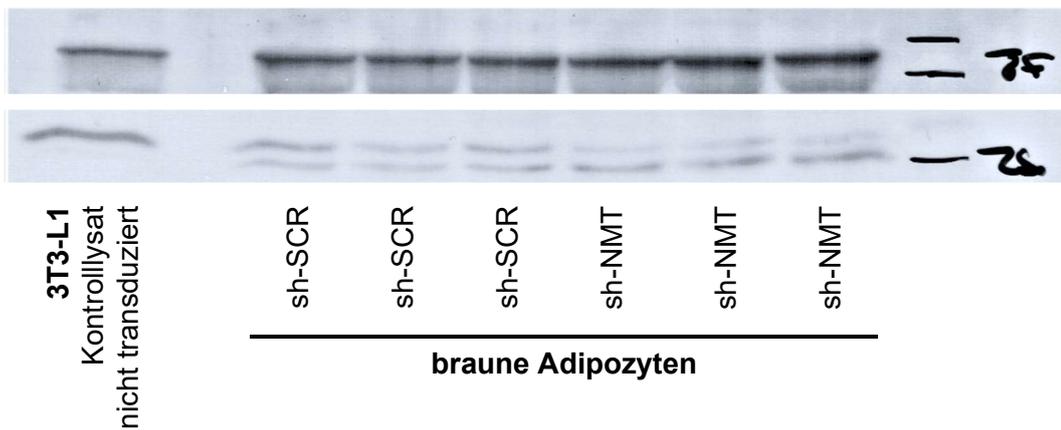


Abbildung 4: Beispiel eines Western-Blot Films für NNMT (~30 kDa, unten) von transduzierten braunen Adipozyten-Lysaten mit zugehöriger p85-Ladungskontrolle (oben). sh-SCR: Kontrolltransduktion; sh-NNMT: NNMT-spezifische Transduktion. Zusätzlich ist ein nicht-transduziertes 3T3-L1 Lysat als positive Kontrolle aufgetragen. Zur besseren Lesbarkeit wurde der Film horizontal gespiegelt.

3.2 Evaluation der verschiedenen Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzyme

Es gibt zwei verschiedene Isoenzyme der G6PDH. Das erste stammt aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae*, während das zweite Isoenzym aus dem Bakterium *L. mesenteroides* stammt und sich von ersterem in der Substratspezifität unterscheidet. Die G6PDH des Bakteriums *L. mesenteroides* kann sowohl mit NAD^+ als auch mit NADP^+ die Oxidation der G6P katalysieren. Das eukaryote Isoenzym ist spezifisch für NADP^+ und zeigt keine Reaktion mit NAD^+ (Olive et al., 1971). Dieser Umstand wurde für eine Weiterentwicklung des enzymatischen Glukoseaufnahmeassay nach Saito et al. (Saito et al., 2011) genutzt, sodass die Elimination des NADH/H^+ aus der G6P-Eliminationsreaktion schließlich obsolet war (2.2.3.5). Da der pH-Wert des Assays zudem nicht im pH Optimum der G6PDH liegt wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität beider G6PDH-Isoenzyme untersucht.

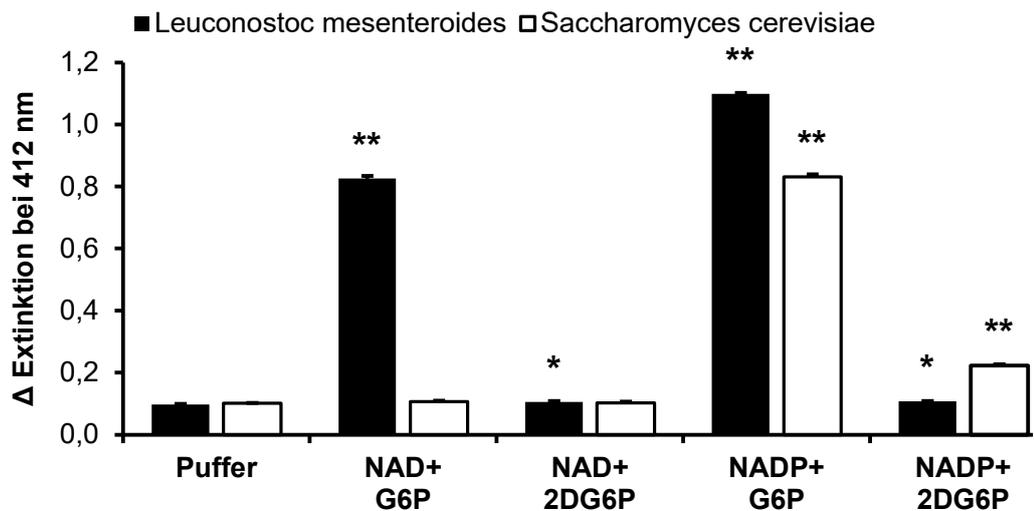
3.2.1 Substratspezifität der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzyme

Substratspezifität und Reaktivität der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzyme für NAD^+ bzw. NADP^+ und Glukose-6-phosphat bzw. 2-Deoxyglukose-6-phosphat wurde in einem einfachen Vorversuch verglichen (vgl. 2.2.2.1).

Während das Enzym aus dem Bakterium *L. mesenteroides* mit NAD^+ und NADP^+ reagierte, zeigte sich für das Isoenzym aus *S. cerevisiae* eine Spezifität für NADP^+ . In keinem Reaktionsansatz des *S. cerevisiae* Isoenzym mit NAD^+ kam es zu einem signifikanten Unterschied der Absorption gegenüber dem negativen Kontrollansatz ohne Substrate.

Für beide Isoenzyme zeigte sich eine deutlich höhere Absorption nach der Reaktion mit Umsatz des natürlicherweise vorkommenden G6P im Gegensatz zu dem Derivat 2DG6P.

Das L. mesenteroides Isoenzym zeigte in diesem Versuch mit NAD⁺ im Vergleich zu NADP⁺ eine geringere Absorption, was einem geringeren Glukose-6-phosphat Umsatz entspricht (Abbildung 5).



		Puffer	NAD ⁺ G6P	NAD ⁺ 2DG6P	NADP ⁺ G6P	NADP ⁺ 2DG6P
<i>L. mesenteroides</i>	Mittelwert	0,097	0,825	0,106	1,099	0,108
	Stabw.	0,003	0,009	0,003	0,003	0,001
	p-Wert		<0,001	<0,05	<0,001	<0,001
<i>S. cerevisiae</i>	Mittelwert	0,101	0,106	0,103	0,830	0,224
	Stabw.	0,001	0,004	0,005	0,009	0,004
	p-Wert		n.s.	n.s.	<0,001	<0,001

Abbildung 5: Substratspezifität der G6PDH Isoenzyme aus *L. mesenteroides* und *S. cerevisiae*. Die Extinktion bei 412 nm ist Maß der Umsetzung von G6P oder 2DG6P mit NAD⁺ oder NADP⁺. Mittelwert, Standardabweichung und p-Wert gegen Puffer. Ansätze in Triplikaten. n.s. – nicht signifikant.

Im Vergleich der beiden Isoenzyme für die Reaktionen mit NADP⁺ zeigte sich eine höhere Extinktion im Ansatz des prokaryoten Isoenzym gegenüber dem eukaryoten, nach der Umsetzung von Glukose-6-phosphat.

Hingegen wurde bei Angebot von 2DG6P für das *S. cerevisiae* Isoenzym der G6PDH eine deutlich höhere Absorption im Vergleich zum Isoenzym aus *L. mesenteroides* gemessen (Abbildung 5).

3.2.2 pH abhängige Aktivität der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzyme im Glukoseaufnahmeassay

Mit der unter 2.2.2.2 beschriebenen Methode wurde die Reaktivität der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzyme unter gesättigten Substratbedingungen in Abhängigkeit des pH-Wertes untersucht. Der Fokus lag dabei auf neutral bis leicht sauren pH-Werten, da der pH bei der Nachweisreaktion, wie unter 2.2.3.5. beschrieben, in diesem Bereich und damit außerhalb des pH-Optimums liegt.

Die so ermittelte pH-abhängige Aktivität (in % der maximal bestimmten Enzymaktivität) der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzyme, zeigte sich im alkalischen Bereich von pH 8 – 9 weitgehend stabil. Mit von pH 8 abnehmendem pH-Wert sank die Aktivität der G6PDH-Isoenzyme stetig. Im letzten Messpunkt verblieben für das *S. cerevisiae* Isoenzym eine Restaktivität von 43,5% (pH 6,28) und für das prokaryote Isoenzym aus *L. mesenteroides* eine Restaktivität von 51,0% (pH 6,38) der maximalen, bestimmten, Aktivität erhalten (Abbildung 6).

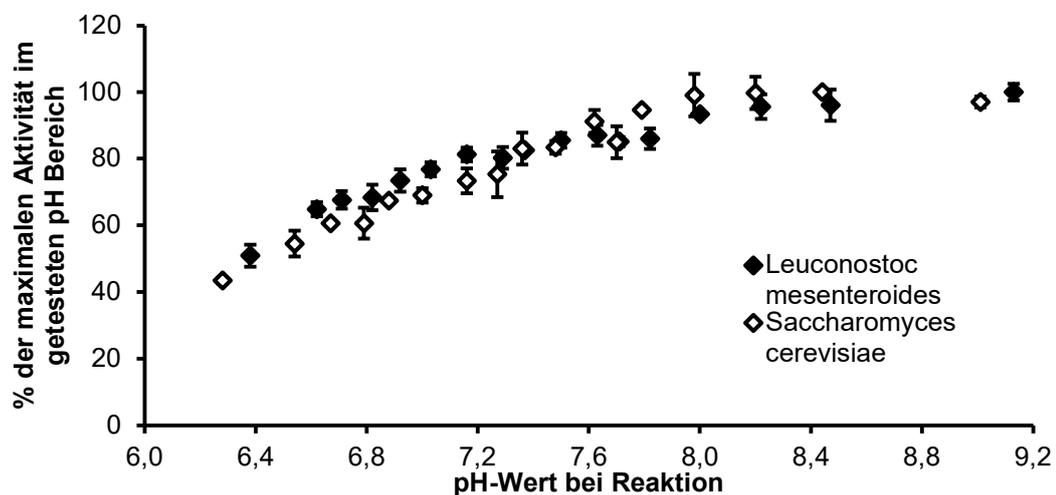


Abbildung 6: Relative Aktivität der G6PDH Isoenzyme in Abhängigkeit des pH-Wertes. 100% entsprechen der maximalen Aktivität im getesteten pH Bereich. Mittelwert und Standardabweichung, Bestimmung in Triplikaten.

Die pH-Werte der einzelnen Schritte des Glukoseaufnahmeassays (2.2.3.5) wurden mittels einer pH-Elektrode in einem 1,5 mL Reaktions-Gefäß bestimmt.

Für diese Bestimmung wurde als Probe Lysepuffer (pH 7,4) verwendet und alle Volumina verfünffacht, um eine ausreichende Flüssigkeitsmenge in den 1,5 mL Reaktionsgefäßen zu erhalten, sodass die Messelektrode sicher bedeckt war.

	pH-Wert nach Zugabe und Inkubation, bei der unter 2.2.3.5 angegebenen Temperatur
Lysepuffer / Lysat	7,40
Reagenz #1 (G6P Elimination)	7,63
Reagenz #2 (Nachweisreaktion)	7,57 ± 0,03
Alkalische Lösung	12,16 ± 0,02
Neutralisationspuffer	7,02 ± 0,08
Reagenz #3 (Amplifikationsreaktion)	6,71 ± 0,05

Tabelle 12: pH-Werte im Verlauf des Glukoseaufnahmeassays.
Mittelwert und Standardabweichung aus 2 unabhängigen Ansätzen in Triplikaten.

Aus der pH abhängigen Aktivität (Abbildung 6) und den im Assay bestimmten pH-Werten im Reaktionsgemisch (Tabelle 12) ging hervor, dass die Reaktionen nicht im pH Optimum der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase ablaufen. Dennoch blieb eine ausreichend hohe Restaktivität, auch im niedrigen pH Bereich in dem die einzelnen Reaktionen ablaufen (Tabelle 12), bestehen. Damit war in den Reaktionsansätzen von einer Reaktion des jeweiligen Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Isoenzym auszugehen und eine unspezifische Reaktion konnte ausgeschlossen werden.

3.3 Lineare Abhängigkeit der 2-Deoxyglukose-6-phosphat-Konzentration der Standardkurve von der gemessenen Absorption im Glukoseaufnahmeassay

Als Standardkurve für den unter 2.2.3.5 beschriebenen Assay wurde 2DG6P in Aqua dest. verwendet. Dieses wurde als Konzentrationsreihe in 10 gleichen Intervallen in einer Konzentration von 0 µM bis 10 µM auf den jeweiligen Assay-Platten aufgetragen. Mit dem beschriebenen Assay wurde eine annähernd

lineare Abhängigkeit der Absorptionsdifferenz zwischen den Messpunkten direkt nach Zugabe des Reagenzes #3 und nach 10-15 minütiger Inkubation bei 37 °C gezeigt (Abbildung 7).

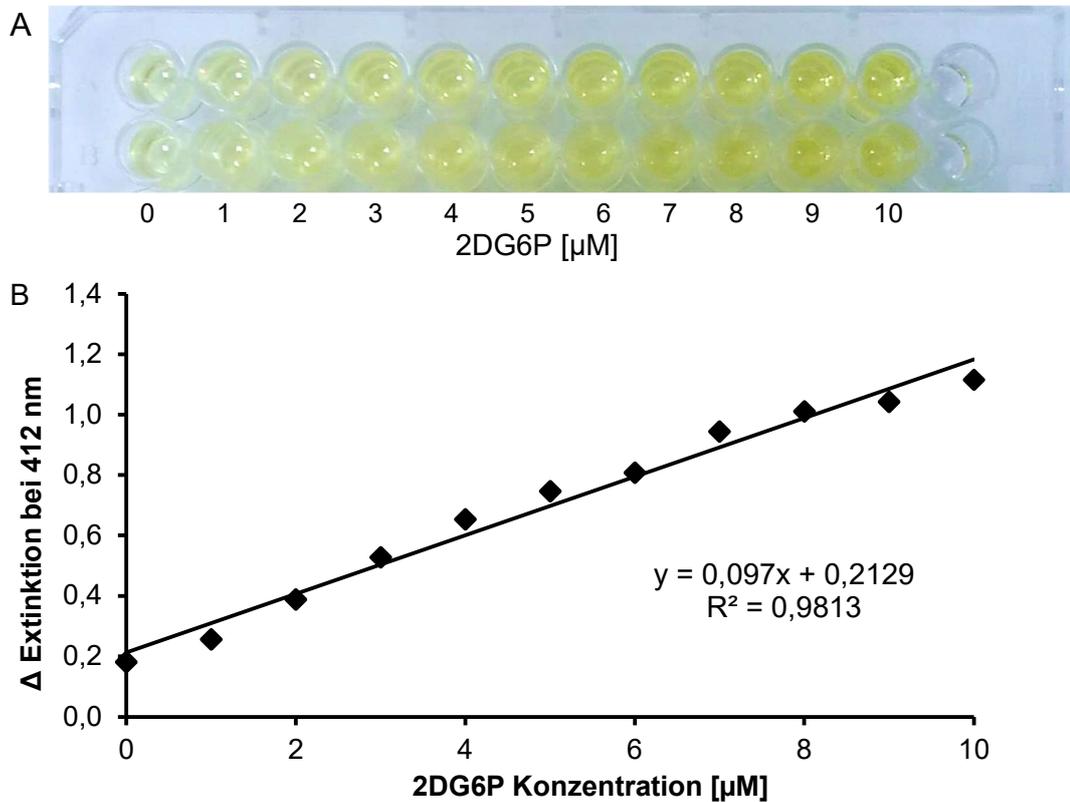


Abbildung 7: Standardkurve für 2DG6P. A) Photographie einer Standardkurve nach abgeschlossener Inkubation zur Messung der 2DG6P-Konzentration. B) Extinktionsdifferenz der Standardkurve mit Regressionsgerade.

3.4 Inkubationsbedingungen zur Bestimmung der Glukoseaufnahme in Fettzellkulturen

Inkubationsdauer und Konzentration der 2DG sind entscheidende Einflussgrößen, auf die Bestimmung der Glukoseaufnahme. Deren Effekt wurde im Folgenden evaluiert, um die idealen Inkubationsbedingungen für den Glukoseaufnahme Assay zu finden.

3.4.1 Konzentration der 2-Deoxyglukose bei der Glukoseaufnahmeinkubation

Erste Versuche an differenzierten 3T3-L1 Adipozyten, die nach Saito et al. (Saito et al., 2011) mit 100 nM Insulin für 20 Minuten prästimuliert wurden und anschließend unter fortgesetzter Insulinstimulation mit 1 mM 2DG inkubiert wurden, zeigten eine lineare Abhängigkeit der Glukoseaufnahme von der Zeit (Abbildung 8B). Die Glukoseaufnahmezeit zeigte sich damit annähernd konstant (Abbildung 8A).

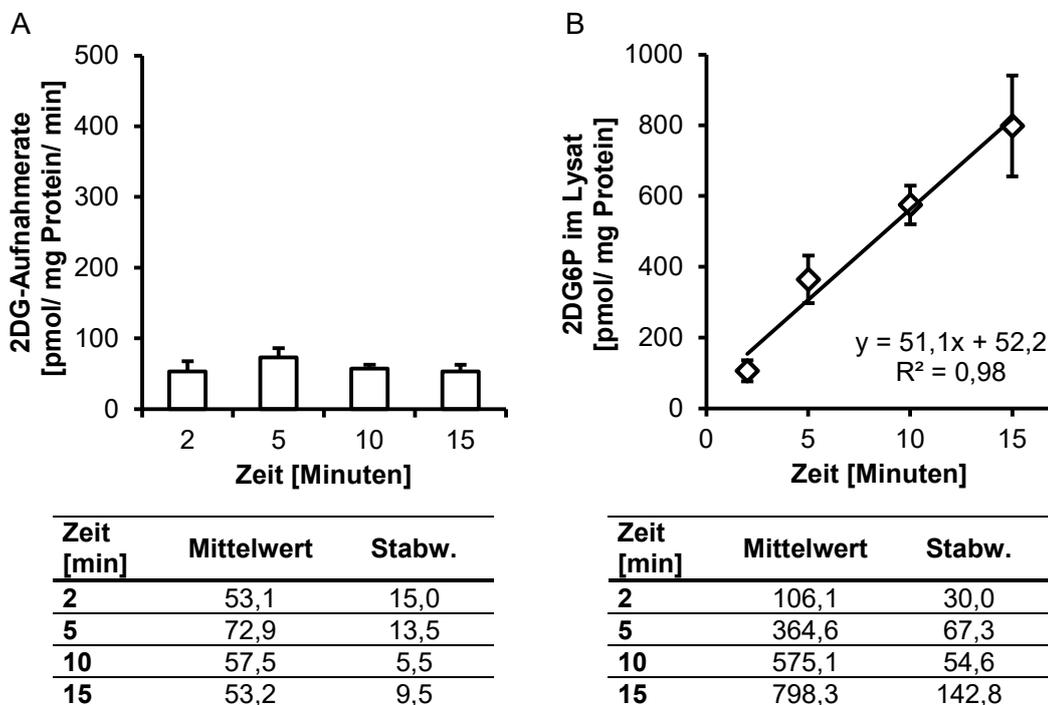


Abbildung 8: Glukoseaufnahme nach 20-minütiger Insulinstimulation (100 nM) und anschließender Inkubation mit 1 mM 2DG im Medium für die indizierte Zeitdauer. A) Durchschnittliche 2DG-Aufnahmerate [pmol 2DG/ mg Protein/ min] während der Inkubation zur 2DG-Aufnahme. B) Absolute Menge 2DG6P im Lysat [pmol/ mg Protein] nach entsprechender Inkubationsdauer. Mittelwerte und Standardabweichungen. Alle Werte in Triplikaten bestimmt.

Unter den in diesem Versuch getesteten Bedingungen zeigte sich eine konstante Glukoseaufnahmezeit über die gesamte Zeit, obwohl diese ATP abhängig ist und keine weiteren schnellen Energielieferanten zur Verfügung standen. Die maximal stimulierbare Glukoseaufnahmezeit der Adipozyten

konnte bei Inkubation mit 1 mM 2DG im Medium nicht zweifelsfrei ermittelt werden.

Wie unter 2.2.4.1 beschrieben, wurde die daher maximale Aufnahmegeschwindigkeit für fünf verschiedene Konzentrationen 2DG während einer 2-minütigen Aufnahmeinkubationsdauer (3.4.2) unter Stimulation mit 100 nM Insulin bestimmt (Abbildung 9).

Dabei zeigte sich für beide untersuchte Adipozytenkulturen ein Plateau der insulinstimulierten Glukoseaufnahmegeschwindigkeit ab 5 mM 2DG.

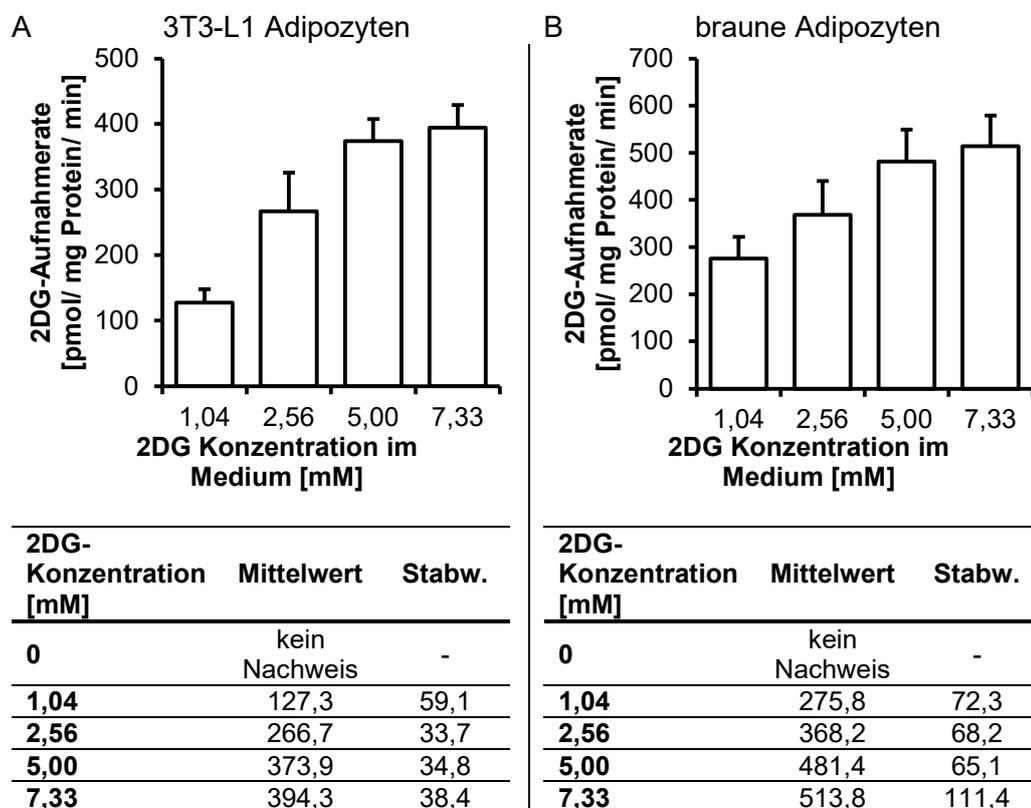


Abbildung 9: 2DG-Aufnahmerate in Abhängigkeit der 2DG-Konzentration im Inkubationsmedium. A) Ergebnis der Experimente mit 3T3-L1 Adipozyten. B) Ergebnis der Experimente mit braunen Adipozyten. Mittelwerte und Standardabweichung in [pmol 2DG/mg Protein/min], aus 3 jeweils unabhängigen Experimenten in Triplikaten.

Ab einer Konzentration von 5 mM 2-DG während der Aufnahmeinkubation war damit von einer maximalen Geschwindigkeit der Glukoseaufnahme auszugehen. Diese konnte durch eine weitere Konzentrationssteigerung nicht mehr erhöht werden. Allerdings stieg die Standardabweichung zumindest der

braunen Adipozyten mit 7,33 mM gegen über 5 mM 2DG im Inkubationsmedium stark an. Die Inkubation mit 2DG zur Bestimmung der Glukoseaufnahme wurde in der Folge unter gesättigten Bedingungen mit einer Konzentration von 5 mM durchgeführt.

3.4.2 Dauer der Aufnahmeinkubation mit 2-Deoxyglukose

Um die Auswirkung der Inkubationsdauer mit 2DG auf die gemessene Glukoseaufnahme beurteilen zu können wurde diese für 2-, 5-, 10- und 15-minütige 2DG-Inkubation, wie unter 2.2.4.2 beschrieben, bestimmt.

Die durchschnittliche Glukoseaufnahme pro Minute zeigte sich mit der 2DG-Inkubationsdauer fallend. Dies war hinweisend auf eine maximale Menge 2DG6P, die von den Zellen aufgenommen werden konnte.

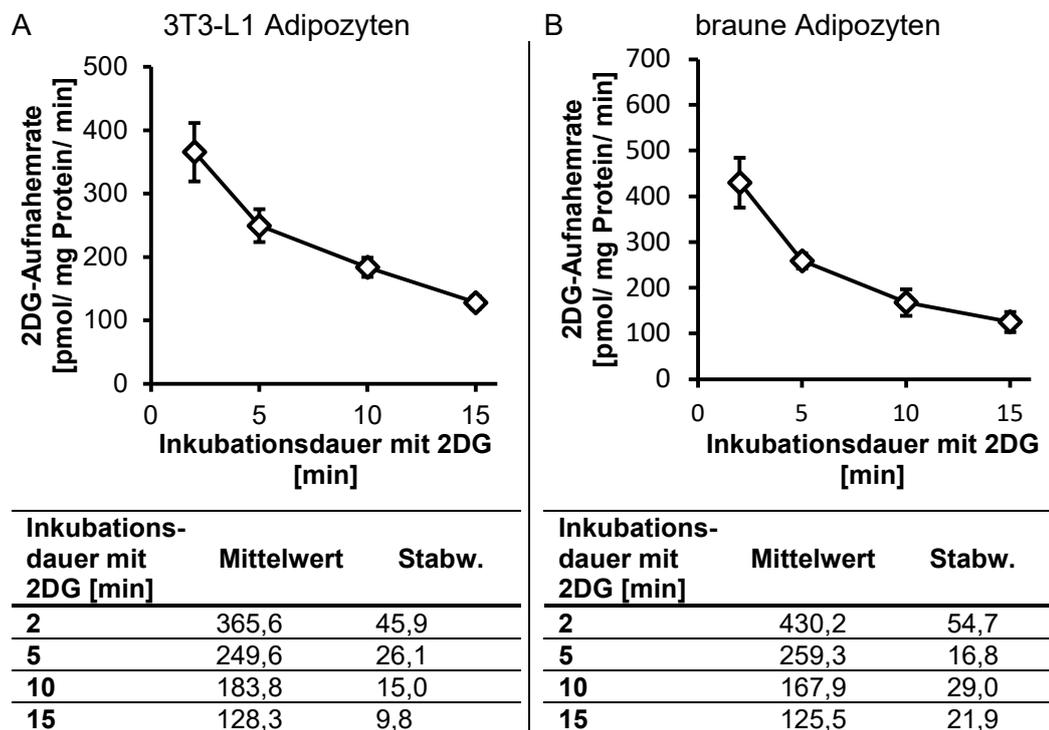


Abbildung 10: 2DG-Aufnahmerate in Abhängigkeit der Inkubationsdauer mit 2DG. A) Ergebnis der Experimente mit 3T3-L1 Adipozyten. B) Ergebnis der Experimente mit braunen Adipozyten. Mittelwerte und Standardabweichung in [pmol/ mg Protein/ min], aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten.

Das Maximum der Glukoseaufnahmerate zeigte sich bei den getesteten Inkubationszeiten nach 2-minütiger Inkubation (Abbildung 10). Die Zeitabhängigkeit der durchschnittlichen Glukoseaufnahmerate deutete auf eine Beschränkung der 2DG Menge, die durch die Zellen aufgenommen werden konnte, hin. Um die maximale Glukoseaufnahmerate differenziert 3T3-L1 und brauner Adipozyten zu bestimmen, wurde in der Folge die 2DG-Inkubationsdauer mit 2 Minuten entsprechend kurz gehalten.

3.4.3 Inkubationszeit mit Insulin zur maximalen Stimulation der Glukoseaufnahme

Wie unter 2.2.4.3 beschrieben, wurde die Dauer der Insulin Präinkubation untersucht um, den Zeitpunkt des maximalen Effektes der Insulinstimulation auf die Glukoseaufnahme zu bestimmen und somit auch die maximale insulinstimulierte Glukoseaufnahme messen zu können. Hier zeigte sich in den ersten 20 Minuten eine von der Dauer der Präinkubation abhängige Glukoseaufnahme.

Der maximale Effekt des Insulins war für beide Adipozytenkulturen nach 20-minütiger Präinkubation erreicht. Eine längere Präinkubation führte zu keiner weiteren Zunahme der Glukoseaufnahmerate (Abbildung 11).

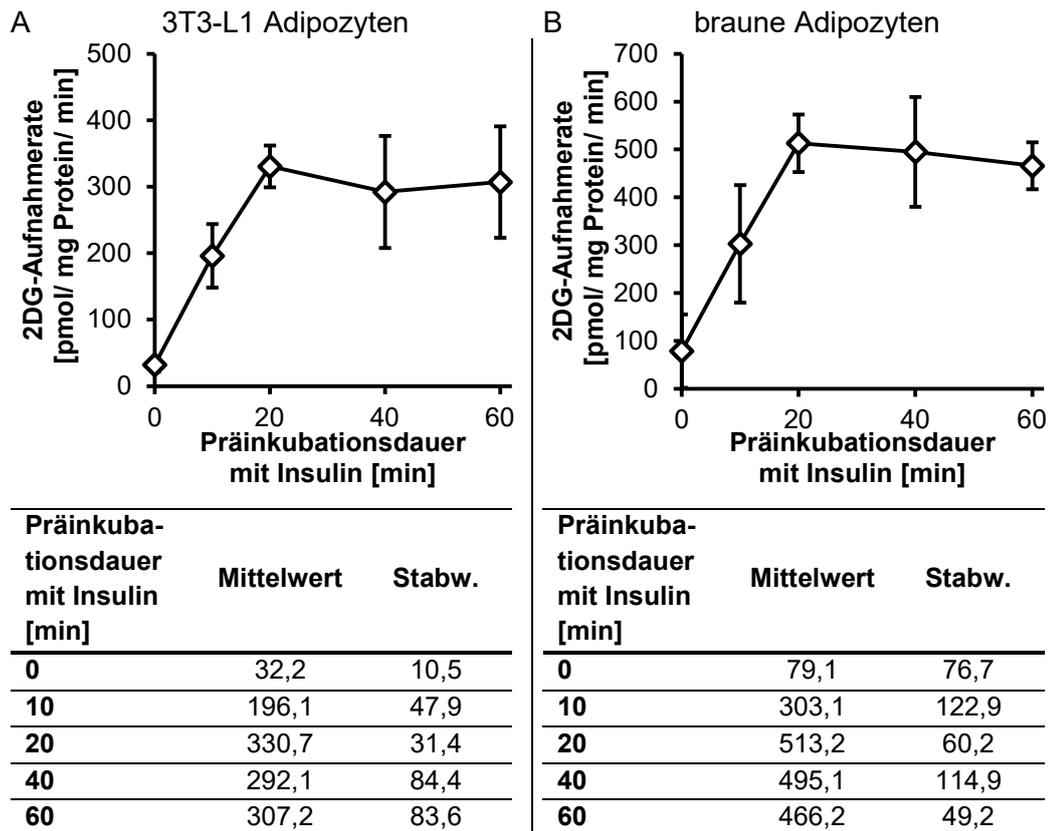


Abbildung 11: 2DG-Aufnahmerate in Abhängigkeit der Präinkubationsdauer mit Insulin. A) Ergebnis der Experimente mit 3T3-L1 Adipozyten. B) Ergebnis der Experimente mit braunen Adipozyten. Mittelwerte und Standardabweichung in [pmol 2DG/ mg Protein/ min], aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten.

Zur Messung der maximalen, insulinabhängigen Glukoseaufnahme wurde folglich eine 20-minütige Präinkubation mit Insulin durchgeführt.

3.5 Testung der Effekte von Insulin und Isoproterenol auf die Glukoseaufnahme in weißen und braunen Adipozyten

Zur internen Validierung der Methode zur Bestimmung der Glukoseaufnahmerate sollte die stimulierende Wirkung von Insulin sowie die inhibierende Wirkung von Isoproterenol auf die Glukoseaufnahme, mit dem unter 2.2.5 beschriebenen Versuch, gezeigt werden. Beide Wirkungen sind so in der Literatur vorbeschrieben (Klein et al., 1999; Mulder et al., 2005; Shepherd und Kahn, 1999).

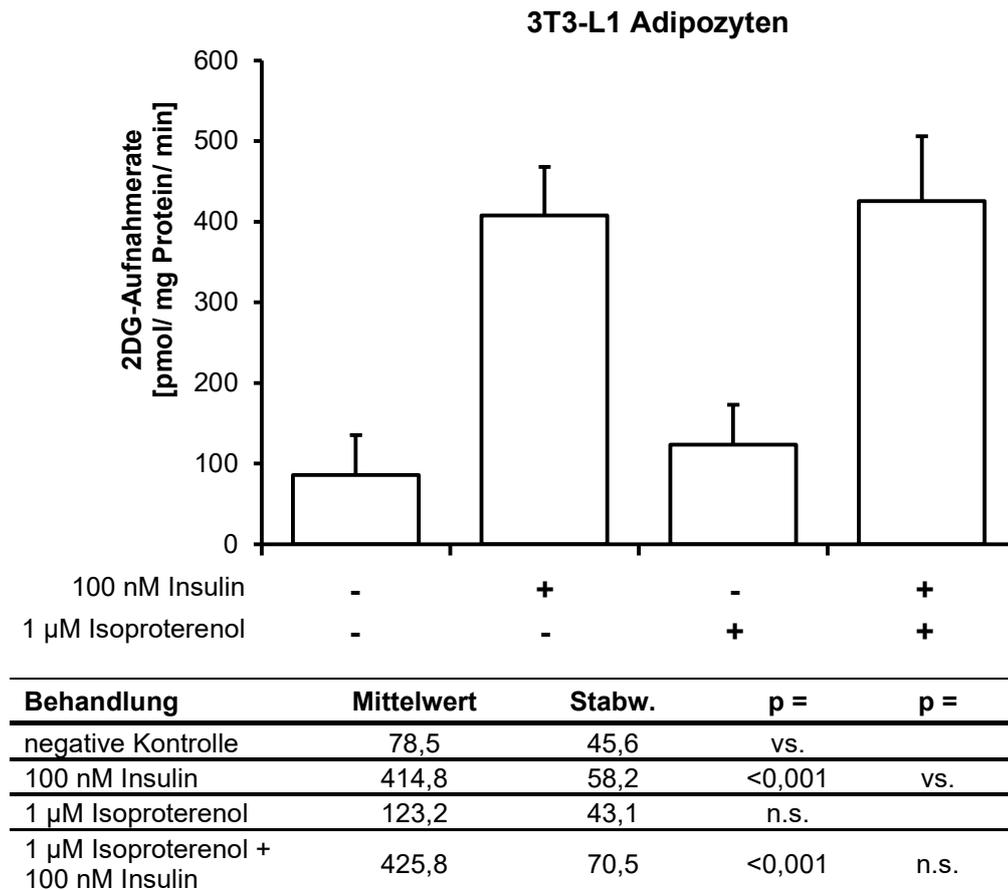


Abbildung 12: Glukoseaufnahme von 3T3-L1 Adipozyten nach Behandlungen mit Insulin und Isoproterenol. Mittelwert und Standardabweichung jeder Behandlungsgruppe in [pmol 2DG/ mg Protein/ min] aus 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten. n.s. – nicht signifikant.

Die Präinkubation mit 100 nM Insulin führte gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu einer deutlichen, signifikanten Steigerung der Glukoseaufnahmerate bei 3T3-L1 Adipozyten. Überraschenderweise führte Isoproterenol bei 3T3-L1 Adipozyten nicht zu einer Hemmung bzw. signifikanten Reduktion der insulinabhängigen Glukoseaufnahme. Isoproterenol allein zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Glukoseaufnahme (Abbildung 12).

Auch in braunen Adipozyten führte die Stimulation mit Insulin zu einem robusten Anstieg der Glukoseaufnahme.

Die Prä- und Kostimulation mit Isoproterenol reduzierte die insulinabhängige Glukoseaufnahme signifikant.

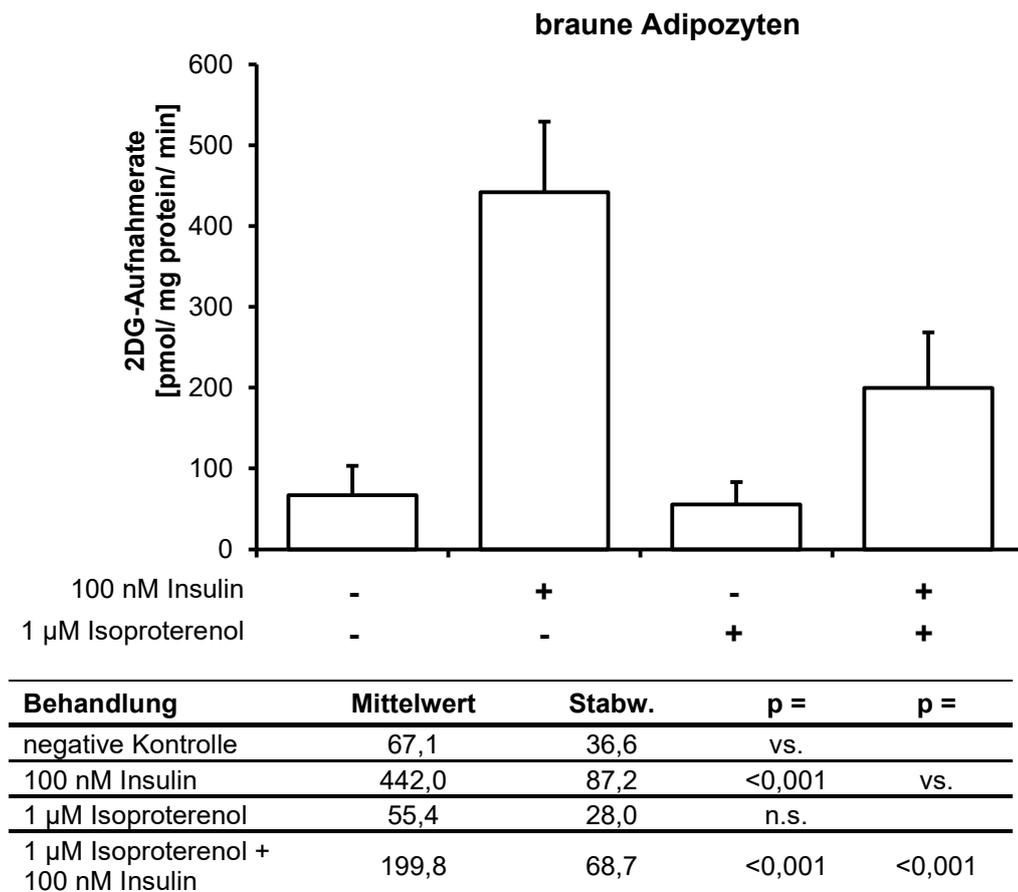


Abbildung 13: Glukoseaufnahme von braunen Adipozyten nach Behandlungen mit Insulin und Isoproterenol Mittelwert und Standardabweichung jeder Behandlungsgruppe in [pmol 2DG/ mg Protein/ min] aus 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten. n.s. – nicht signifikant.

Bei der Behandlung mit Isoproterenol allein konnte kein signifikanter Effekt gegenüber der Kontrolle gezeigt werden (Abbildung 13).

3.6 Einfluss der zytosolischen NNMT-Aktivität auf die Glukoseaufnahme

Mit der dargestellten Methodik zur Bestimmung von Glukoseaufnahme (2.2.3) und NNMT-Aktivität (2.2.1.4) wurde die Frage nach einem Einfluss der NNMT Aktivität auf die insulinstimulierte, wie nicht insulinstimulierte Glukoseaufnahme untersucht. Dieser Fragestellung wurde in 3T3-L1 sowie braunen NNMT-Knock-down Adipozyten nachgegangen. Als Vergleich dienten die jeweiligen Adipozyten mit einer unspezifischen Kontrolltransduktion.

3.6.1 Beeinflussung der NNMT-Aktivität durch die Vorbehandlung für den Glukoseaufnahmeassay

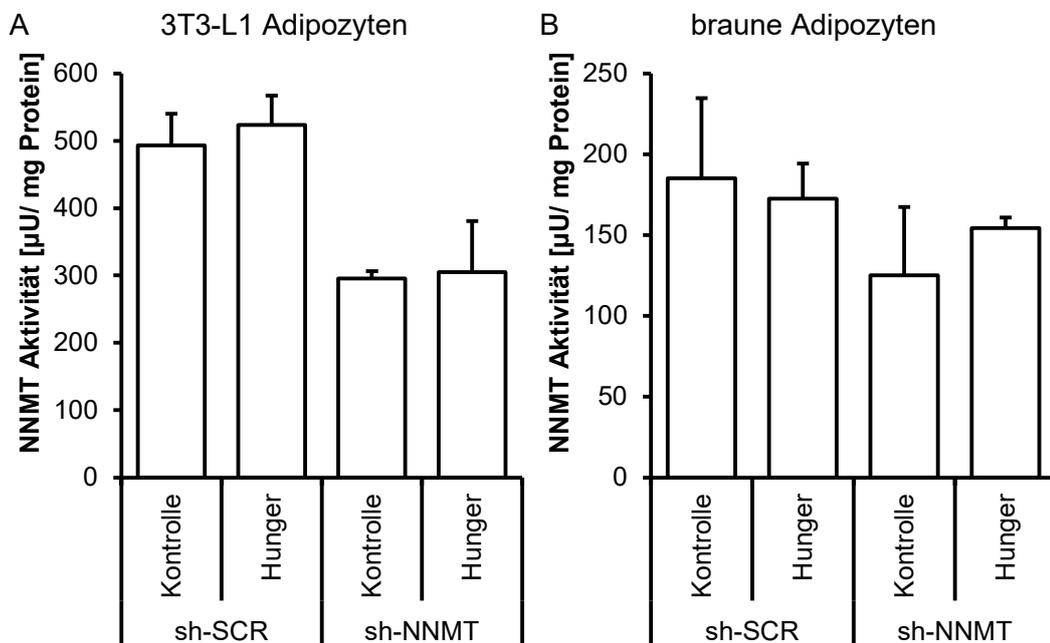
Die NNMT-Aktivität wird nach dem Protokoll aus Lysaten bestimmt, die direkt auf Eis gesetzt wurden. Wenn die NNMT Aktivität aus den Adipozyten bestimmt werden soll, von denen auch die Glukoseaufnahme bestimmt wird so erfahren diese eine Vorbehandlung durch die > 16 stündige Inkubation mit reinem DMEM (Hungermedium), und die Insulinstimulation zur Messung der insulinstimulierten Glukoseaufnahme.

Um Effekte auf die NNMT-Aktivität durch diese Vorbehandlung auszuschließen wurde die NNMT Aktivität transduzierter Adipozyten nach 16-stündiger Inkubation mit reinem DMEM (Hungermedium) mit der aus einer nicht gehungerten Kontrollgruppe verglichen.

Sowohl für NNMT-spezifisch transduzierte wie auch für mit Kontrollviren transduzierte 3T3-L1 Adipozyten zeigte sich nach 16 stündiger Inkubation mit reinem DMEM im Vergleich zur Kontrollgruppe, die in Differenzierungsmedium gehalten wurde, kein Unterschied in der NNMT-Aktivität.

In braunen Adipozyten zeigten NNMT-Knock-down-Zellen mit Hungerinkubation eine leicht höhere NNMT-Aktivität (123 %) als die nicht gehungerte Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war nicht signifikant. In mit Kontrollviren

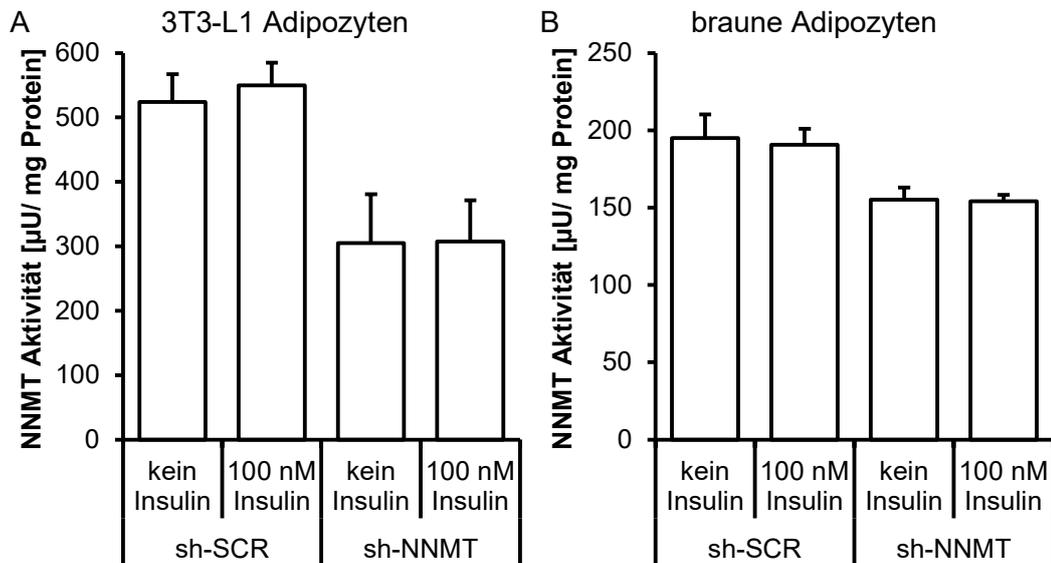
transduzierten braunen Adipozyten zeigte sich dieser Effekt leicht umgekehrt mit einer etwas niedrigeren NNMT-Aktivität der gehungerten braunen Adipozyten (93 %) (Abbildung 14).



NNMT-Aktivität	Mittelwert	Stabw.	p =
3T3L1 sh-SCR Kontrolle	493,3	47,2	
3T3-L1 sh-SCR Hungerinkubation	523,7	43,6	n.s.
3T3-L1 sh-NNMT Kontrolle	295,6	11,1	
3T3-L1 sh-NNMT Hungerinkubation	304,8	76,1	n.s.
braune Adipozyten sh-SCR Kontrolle	185,1	49,8	
braune Adipozyten sh-SCR Hungerinkubation	172,5	21,8	n.s.
braune Adipozyten sh-NNMT Kontrolle	125,1	42,4	
braune Adipozyten sh-NNMT Hungerinkubation	154,4	6,6	n.s.

Abbildung 14: A) NNMT-Aktivität transduzierter 3T3-L1 Adipozyten nach 16-stündiger Hungermediuminkubation. B) NNMT-Aktivität transduzierter brauner Adipozyten nach 16-stündiger Hungermediuminkubation. Mittelwert und Standardabweichung in $[\mu\text{U}/\text{mg Protein}]$ aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in Triplikaten. n.s. – nicht signifikant.

Genauso wurde ein Einfluss der 20-minütigen Insulinstimulation auf die NNMT-Aktivität untersucht und die NNMT-Aktivität in insulinstimulierten und nicht-insulinstimulierten Adipozyten verglichen. Es zeigten sich für die differenzierten 3T3-L1, wie auch für die braunen Adipozyten (Abbildung 15) keine signifikanten Unterschiede der NNMT-Aktivität mit oder ohne 20-minütige Stimulation mit 100 nM Insulin.



NNMT-Aktivität	Mittelwert	Stabw.	p =
3T3L1 sh-SCR kein Insulin	523,7	43,6	n.s.
3T3-L1 sh-SCR 100 nM Insulin	549,6	35,6	
3T3-L1 sh-NNMT kein Insulin	304,8	76,1	n.s.
3T3-L1 sh-NNMT 100 nM Insulin	307,6	64,1	
braune Adipozyten sh-SCR kein Insulin	194,9	15,5	n.s.
braune Adipozyten sh-SCR 100 nM Insulin	190,7	10,4	
braune Adipozyten sh-NNMT kein Insulin	155,1	7,9	n.s.
braune Adipozyten sh-NNMT 100 nM Insulin	154,0	4,2	

Abbildung 15: A) NNMT-Aktivitäten transduzierter 3T3-L1 Adipozyten mit und ohne 20-minütiger Insulinstimulation. B) NNMT-Aktivitäten transduzierter brauner Adipozyten mit und ohne 20-minütiger Insulinstimulation. Mittelwert und Standardabweichung in [µU/ mg Protein] aus 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in Triplikaten. n.s. – nicht signifikant.

Für die 3T3-L1 Adipozyten zeigte sich kein Effekt auf die NNMT-Aktivität durch die Vorbehandlungen zur Messung der insulinstimulierten Glukoseaufnahme.

Für diese Adipozyten konnten NNMT-Aktivität Glukoseaufnahmerate aus dem gleichen Zelllysate bestimmt werden.

Bei den braunen Adipozyten zeigte sich für die spezifisch NNMT-transduzierten Adipozyten ein leichter Unterschied der NNMT-Aktivität durch die Inkubation mit Hungermedium. Die 20-minütige Insulinstimulation hatte keinen Einfluss auf die NNMT-Aktivität. Obwohl der Effekt der Hungerinkubation sich nicht signifikant darstellte und nicht offensichtlich zu erklären war, zeigte er sich von höherem Ausmaß als für 3T3-L1 Adipozyten. Daher wurden NNMT-Aktivität und

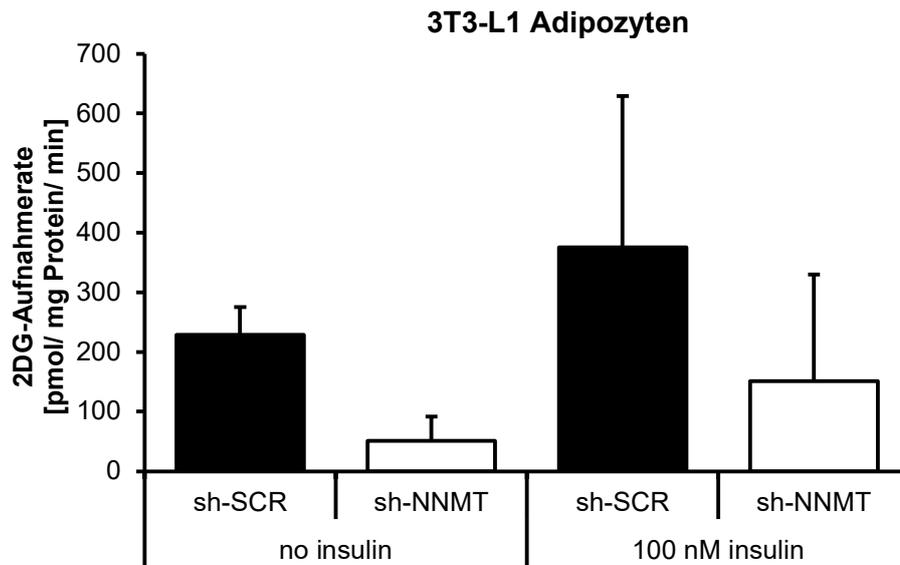
Glukoseaufnahmerate der braunen Adipozyten der Vorsicht halber aus getrennten, einander zugeordneten und parallel differenzierten Zellkulturwells bestimmt. Braune Adipozyten aus denen die NNMT-Aktivität bestimmt wurde, wurden direkt lysiert und nicht vorbehandelt.

3.6.2 Einfluss der NNMT-Aktivität auf die insulinstimulierte Glukoseaufnahme

In differenzierten 3T3-L1 und braunen Adipozyten wurde die Glukoseaufnahmerate (2.2.3) und NNMT-Aktivität (2.2.1.4) aus Zytosollysaten bestimmt. NNMT-Aktivität und Glukoseaufnahmerate wurde für braune Adipozyten aufgrund des unter 3.6.1 gezeigten Effektes aus getrennt behandelten, einander zugeordneten Lysaten, die unter identischen Bedingungen differenziert wurden, bestimmt.

NNMT-Knock-down korreliert in 3T3-L1 Adipozyten mit einer verringerten Glukoseaufnahme

Die mit NNMT-spezifischen Lentiviren (sh-NNMT) transduzierten 3T3-L1 Adipozyten wiesen eine signifikant niedrigere insulinstimulierte Glukoseaufnahmerate von 40% derer der Kontrollgruppe (sh-SCR) auf. Dies zeigte sich ebenso für die basale, nicht insulinstimulierte Glukoseaufnahmerate der sh-NNMT 3T3-L1 Adipozyten, die nur 22% der Kontrollgruppe betrug. Dabei blieb für beide Transduktionen (sh-NNMT und sh-SCR) der Effekt des Insulins, die Glukoseaufnahme zu steigern erhalten (Abbildung 16), war aber im Vergleich zu nicht-transduzierten 3T3-L1 Adipozyten (3.5) schwächer.



2DG-Aufnahmerate	Mittelwert	Stabw.	p =	
kein Insulin	sh-SCR	229,2	47,8	<0,001
	sh-NNMT	51,1	13,6	
100 nM Insulin	sh-SCR	375,6	115,7	<0,001
	sh-NNMT	151,3	111,3	

Abbildung 16: Basale und insulinstimulierte 2DG-Aufnahme transduzierter 3T3-L1 Adipozyten. Mittelwert und Standardabweichung in [pmol/ mg Protein/ min] aus 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in Triplikaten.

Weitergehend zeigte sich sowohl für die basale wie auch die insulinstimulierte Glukoseaufnahmerate der 3T3-L1 Adipozyten eine statistisch signifikante, positive Korrelation zwischen NNMT-Aktivität und Glukoseaufnahmegeschwindigkeit (basal $R^2 = 0,61$; $p=0,003$ und insulinstimuliert $R^2 = 0,64$; $p < 0,001$) (Abbildung 17).

Die Differenz im relativen Anstieg der Glukoseaufnahmerate durch Insulinstimulation um das 1,6-fache (sh-SCR) gegenüber dem 3,0-fachen (sh-NNMT) zeigte sich in der zweifaktoriellen Varianzanalyse nicht signifikant ($p = 0,45$).

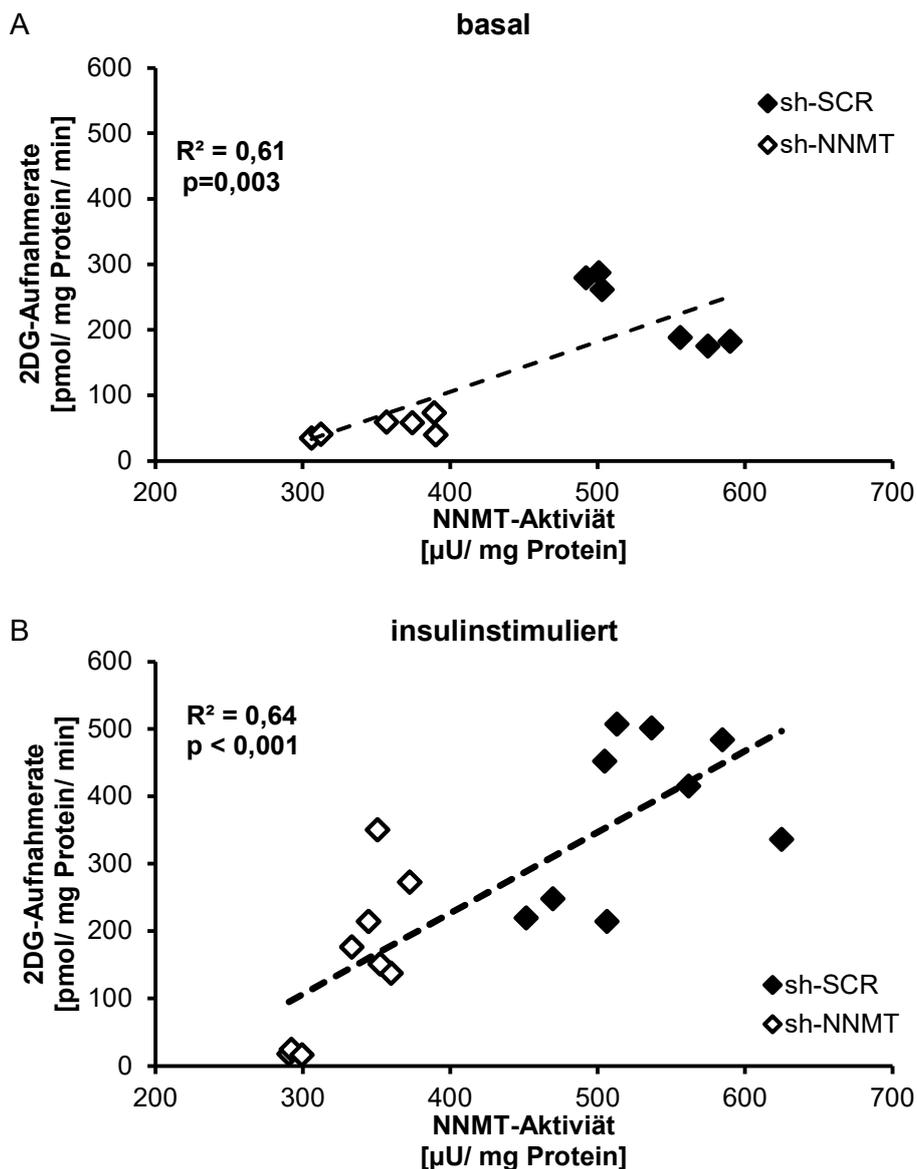


Abbildung 17: A) basale und B) insulinstimulierte Glukoseaufnahmerate transduzierter 3T3-L1 Adipozyten, aufgetragen gegen die NNMT-Aktivität. Ergebnisse aus 2 bzw. 3 unabhängigen Versuchen in Triplikaten mit Regressionsgerade, Korrelationskennwert und p-Wert.

Gegensätzlich zu den 3T3-L1 Adipozyten stieg die insulinstimulierte Glukoseaufnahmerate brauner Adipozyten, die eine verringerte NNMT-Aktivität aufwiesen, signifikant auf 160% der Rate in der Kontrollgruppe.

Für die basale, nicht insulinstimulierte Glukoseaufnahmerate zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den NNMT-spezifisch transduzierten braunen Adipozyten und ihrer Kontrolle. Der grundsätzliche Effekt einer

Insulinbehandlung, die zur verstärkten Glukoseaufnahme führt, blieb auch für die braunen Adipozyten erhalten.

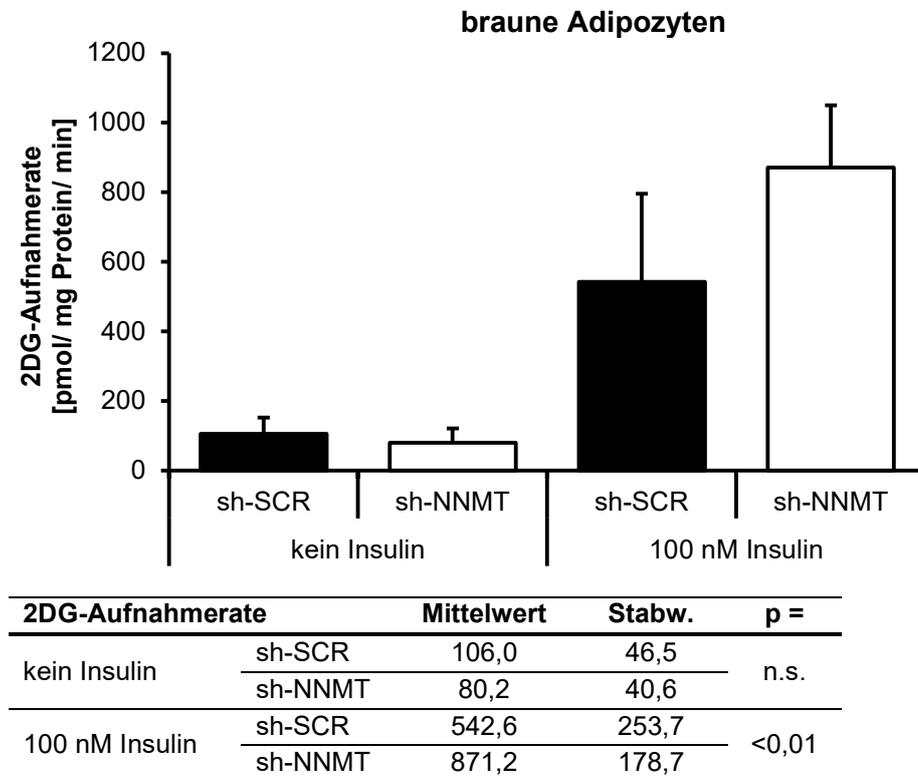


Abbildung 18: Basale und insulinstimulierte 2DG-Aufnahme transduzierter brauner Adipozyten. Mittelwert und Standardabweichung in [pmol/ mg Protein/ min] aus 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in Triplikaten. n.s. – nicht signifikant.

Eine Korrelation zwischen NNMT-Aktivität und insulinstimulierter Glukoseaufnahmerate war in braunen Adipozyten ebenfalls signifikant, stellte sich aber im Gegensatz zu den Ergebnissen der 3T3-L1 Adipozyten negativ dar ($R^2=0,56$; $p<0,001$) (Abbildung 19).

Der etwa doppelt so starke relative Anstieg der Glukoseaufnahmerate durch Insulinstimulation (sh-SCR: 5,1-fach; sh-NNMT: 10,9-fach) zeigte sich in der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit $p = 0,02$ signifikant.

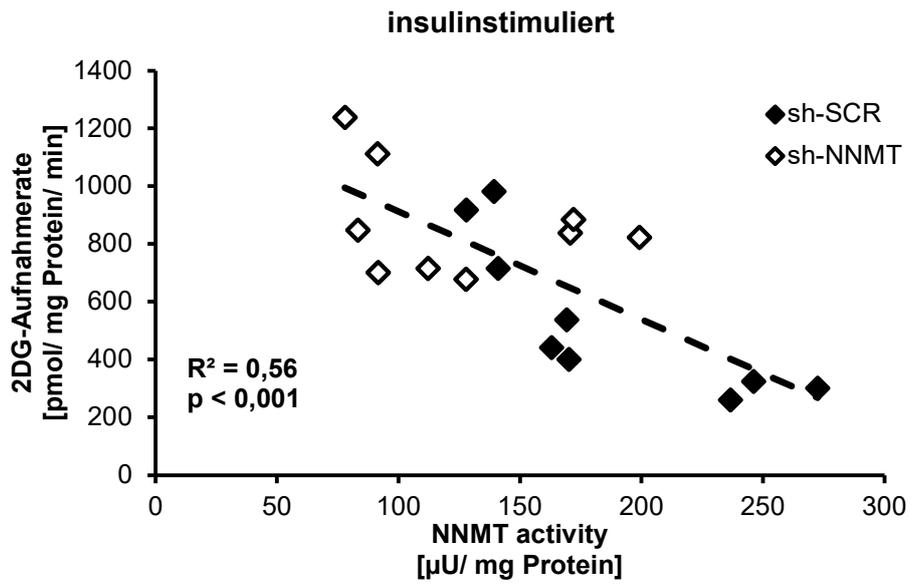


Abbildung 19: Insulinstimulierte Glukoseaufnahmerate transduzierter brauner Adipozyten, aufgetragen gegen die NNMT-Aktivität. Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen in Triplikaten mit Regressionsgerade, Korrelationskennwert und p-Wert.

4 Diskussion

Um den Einfluss der NNMT-Aktivität auf die basale wie insulinabhängige Glukoseaufnahme in weißen und braunen Adipozyten zu untersuchen, wurde der enzymatisch-photometrische Test zur Bestimmung der Glukoseaufnahme von Saito et al. (Saito et al., 2011) adaptiert und weiterentwickelt. Mit Reduktion der NNMT Aktivität zeigte sich in weißen Adipozyten eine Abnahme der Glukoseaufnahmerate unter basalen, wie insulinstimulierten Bedingungen. Braune Adipozyten mit verringerter NNMT-Aktivität nahmen bei Insulinstimulation hingegen deutlich mehr Glukose auf als die entsprechende Kontrolle.

Die NNMT ist dabei ein wichtiger Regulator des Gesamtenergiehaushaltes. Ihre reduzierte Expression in weißem Fettgewebe und Leber schützte Mäuse vor einer ernährungsbedingten Gewichtszunahme und verbesserte die Glukosetoleranz (Kraus et al., 2014). Eine erhöhte NNMT-Expression im weißen Fettgewebe ist demgegenüber bei Pima-Indianern mit Adipositas und Typ 2 Diabetes assoziiert (Lee et al., 2005). Dabei zeichnet sich die systemische Insulinresistenz, die dem Typ 2 Diabetes vorausgeht, im Frühstadium durch eine reduzierte Expression des insulinabhängigen GLUT4 im Fettgewebe aus (Shepherd und Kahn, 1999).

Bei einer verminderten NNMT-Expression in weißen Adipozyten wäre demnach eine erhöhte Glukosetoleranz, das heißt eine verbesserte Insulinsensitivität, zu erwarten gewesen.

4.1 NNMT-Aktivität in den transduzierten Adipozytenkulturen

Insgesamt zeigte sich die NNMT-Aktivität der Kontrollgruppen in braunen Adipozyten ($185,1 \pm 49,8 \mu\text{U}/\text{mg Protein}$) im Vergleich zu den 3T3-L1 Adipozyten ($532,7 \pm 43,6 \mu\text{U}/\text{mg Protein}$) deutlich geringer. Dieser Unterschied ist konsistent zu den Literaturdaten für Mausgewebe (Rudolphi et al., 2017).

Dort wies braunes Fettgewebe (10 μ U/ mg Protein) ebenfalls eine deutlich geringere NNMT-Aktivität auf, als das subkutane (55,0 μ U/ mg Protein) bzw. das epididymale weiße Fett (35,6 μ U/ mg Protein).

Die im Vergleich zum Gesamtgewebe deutlich höhere NNMT-Aktivität der Adipozytenkultur ist am ehesten auf die heterogene Zusammensetzung von in vivo Fettgewebe zurückzuführen.

Die Hemmung der NNMT-Aktivität durch lentiviralen Knock-down war in beiden Adipozytenkulturen erfolgreich, für die 3T3-L1 Adipozyten (- 41,8 %) gegenüber den braunen Adipozyten (- 31,4 %) lediglich etwas stärker.

4.2 Der enzymatische Glukoseaufnahmeassay mit 2-Deoxyglukose

Die Glukoseaufnahme gibt Auskunft über die metabolische Aktivität von Zellen und ist in Fett- und Muskelzellen über die insulinvermittelte Translokation der Typ 4 Glukosetransporter (GLUT4) in die Zellmembran stark stimulierbar (Mueckler und Thorens, 2013). Als Alternative zu radioaktiv markierter Glukose zur Messung der Glukoseaufnahme (Sokoloff, 1982) gibt es in der Literatur einige enzymatisch-photometrische oder fluorometrische Tests, die insbesondere zur Analyse der Glukoseaufnahme von Neuronen entwickelt wurden (Akabayashi und Kato, 1992; Chi et al., 1987; Yamamoto et al., 2006). In dieser Arbeit wurde zunächst der enzymatisch-photometrische Test für die Analyse der Glukoseaufnahme in Adipozyten (Saito et al., 2011) betrachtet. Auf dieser Basis wurden die Durchführungsbedingungen für die Inkubation mit 2-Deoxyglukose für differenzierte weiße 3T3-L1 und braune Adipozyten optimiert. Die Daten für beide untersuchten Adipozytenkulturen zeigten, dass eine wenigstens 20-minütige Prästimulation mit 100 nM Insulin notwendig ist, um den maximalen Effekt der Insulinstimulation messen zu können (3.4). Glukose verteilt sich entlang ihres Konzentrationsgefälles Dieses wird durch Phosphorylierung zu Glukose-6-phosphat bzw. hier 2-Deoxyglukose-6-phosphat bei Aufnahme in die Zelle aufrecht gehalten (Wilson, 2003).

Entsprechend dem Verteilungsprinzip eines Konzentrationsgefälles beeinflusst die Konzentration der 2-Deoxyglukose im extrazellulären Medium die Geschwindigkeit der Glukoseaufnahme (Klinke et al., 2009). Zudem ist die Gesamtmenge des intrazellulären 2-Deoxyglukose-6-phosphats von der Inkubationszeit abhängig. Die Betrachtung dieser Faktoren (3.4.1 und 3.4.2) ergab, dass mit 2-minütiger Inkubation bei einer 2-Deoxyglukose Konzentration von 5 mM die maximale Rate der Glukoseaufnahme bestimmbar war.

Durch die dargestellte Kombination der G6PDH Isoenzyme aus *L. mesenteroides* und *S. cerevisiae* mit ihren Spezifitäten für die Redox-Systeme $\text{NAD}^+ - \text{NADH}/\text{H}^+$ und $\text{NADP}^+ - \text{NADPH}/\text{H}^+$ wurde zudem ein gegenüber Saito et al. (Saito et al., 2011) vereinfachtes Verfahren entwickelt (2.2.3). Dabei ist der Test mit geringem Aufwand an einem Labortag durchzuführen und besitzt ein Testintervall von 0-1000 pmol 2DG/ mg Protein/ min. Im angegebenen Intervall verhielten sich Standardkurven mit einem R^2 von annähernd 1 linear (3.3). Über die Regressionsgerade ließ sich die 2-Deoxyglukose-6-phosphat-Konzentration in den Proben und damit die Glukoseaufnahmerate der Adipozyten berechnen. Mit den, für die untersuchten weißen und braunen Adipozytenkulturen bekannten Effekte des Insulins bzw. Isoproterenols auf die Glukoseaufnahme (Klein et al., 1999; Mulder et al., 2005), wurde der Assay erstmals validiert (3.5).

Zur raschen Abnahme der Glukoseaufnahmerate bei längerer Inkubation mit 2-Deoxyglukose (3.4.2) muss in Betracht gezogen werden, dass sich im KRPH-Puffer, der bei Aufnahmeinkubation als Medium dient, keine zur Produktion von ATP verwertbaren Verbindungen befanden. Mit fortschreitender Aufnahme der 2-Deoxyglukose unter ATP-Verbrauch zur Phosphorylierung mindert dies das Phosphorylierungspotential der Hexokinase (Wilson, 2003) und die Aufnahmereaktion findet unter veränderten Voraussetzungen statt.

4.3 Kein Effekt des Isoproterenols bei 3T3-L1 Adipozyten

Mit dem Assay wurden die Daten des Effektes von Insulin auf die Zuckeraufnahme in weißen 3T3-L1 (Mulder et al., 2005) sowie braunen Adipozyten (Klein et al., 1999) reproduziert. Auch konnte der β -adrenerge Effekt der Reduktion der insulinstimulierten Glukoseaufnahme mit dem unspezifischen β -Agonisten Isoproterenol auf die braunen Adipozyten reproduziert werden. Dieser Effekt wurde mit braunen Adipozyten für hochspezifische β_3 -Agonisten bereits so gezeigt (Klein et al., 1999).

Ebenso wurde eine reduzierte Glukoseaufnahme bei Isoproterenolbehandlung für frisch isolierte weiße Adipozyten von Ratten (Klein et al., 1991), wie auch für 3T3-L1 Adipozyten (Mulder et al., 2005), bereits gezeigt. Allerdings konnte diese inhibierende Wirkung von Isoproterenol auf die Glukoseaufnahme in differenzierten 3T3-L1 Adipozyten hier nicht reproduziert werden.

Diese Diskrepanz kann durch deutliche Unterschiede zwischen den Protokollen von Mulder et al. und des hier verwendeten zustande kommen. Mulder et al. stimulierten für 10 Minuten mit Isoproterenol bzw. Insulin, sodass, den hier gezeigten Ergebnissen (3.4.3) zufolge, die maximale Stimulation der Glukoseaufnahme durch Insulin nicht zwangsläufig gegeben war. Die hier durchgeführte, längere Stimulation mit Insulin (20 Minuten), die für eine reproduzierbare insulinstimulierte Glukoseaufnahmerate notwendig war, könnte den Effekt des Isoproterenols relativiert haben. Zudem unterschied sich das Differenzierungsprotokoll für die 3T3-L1 Präadipozyten von Mulder et al. stark von dem hier gezeigten. Für den Unterschied der hier ermittelten Daten zur Literatur können damit insbesondere die verschiedenen Bedingungen der Vorbereitung und Stimulation der 3T3-L1 Adipozyten ursächlich sein.

Nachdem für die braunen Adipozyten die Effekte von Insulin und Isoproterenol und für die 3T3-L1 Adipozyten der Insulineffekt, wie aus der Literatur bekannt, gezeigt werden konnten, wurde eine interne Validität des Glukoseaufnahmeassays angenommen.

4.4 Differenzieller Einfluss der NNMT-Aktivität auf die Glukoseaufnahme und Insulinsensitivität in weißen und braunen Adipozyten

Ein NNMT-Knock-down hatte eine gegensätzliche Wirkung auf die Glukoseaufnahmerate in 3T3-L1 und braunen Adipozytenkulturen (3.6.2). Die verringerte NNMT-Aktivität im Modell weißer Adipozyten, den 3T3-L1 Adipozyten, führte zu einer verringerten basalen und insulinstimulierten Glukoseaufnahmerate. Dagegen wiesen braune Adipozyten mit reduzierter NNMT-Aktivität eine gesteigerte Glukoseaufnahme nach Insulinstimulation auf, während die basale Glukoseaufnahmerate unbeeinflusst blieb.

Wie eingangs dargestellt korrelieren Adipositas und Insulinresistenz zum einen mit einer reduzierten GLUT4 Expression weißer Adipozyten in Mäusen und Menschen (Shepherd und Kahn, 1999), zum anderen mit einer erhöhten NNMT-Expression, insbesondere im weißen Fettgewebe (Kannt et al., 2015; Kraus et al., 2014).

Eine reduzierte NNMT-Aktivität im Zellkulturmodell für weiße Adipozyten führte, zu einer verringerten insulinstimulierten Glukoseaufnahme gegenüber der Kontrolle. Die Vervielfachung der Glukoseaufnahmerate mit Insulin zeigte sich bei weißen NNMT-Knock-down Adipozyten gegenüber ihrer Kontrolle zwar etwas stärker, war aber nicht signifikant. Auch ein stärkerer relativer Anstieg der Glukoseaufnahmerate durch Insulinstimulation, im Sinne einer höheren Insulinsensitivität, konnte damit nicht gezeigt werden (vgl. 3.6.2). Dies widerspricht der Erwartung, dass die Verringerung der NNMT-Aktivität in der weißen Adipozytenkultur mit einer gesteigerten Insulinsensitivität einhergeht. Eine insgesamt reduzierte basale, wie auch insulinstimulierte Glukoseaufnahme von weißen Adipozyten nach NNMT-Knock-down bleibt das wesentliche Ergebnis.

Damit lässt sich der erhöhte Sauerstoffverbrauch und Gesamtenergieumsatz von 3T3-L1 Adipozyten mit reduzierter NNMT-Expression (Kraus et al., 2014) nicht mit einer vermehrten Aufnahme und anschließenden Verstoffwechslung

von Glukose erklären. Der erhöhte Sauerstoffbedarf muss demnach auf die Oxidation anderer Nährstoffe, insbesondere von Fettsäuren und Glycerol, oder andere Stoffwechselwege zurückgeführt werden. ASO-NNMT-Knock-down Mäuse hatten deutlich kleinere Fettvakuolen in ihren weißen Adipozyten als die Kontrollmäuse und wiesen reduzierte Serumlevel von Triglyceriden und freien Fettsäuren auf (Kraus et al., 2014). Weitere hierzu unveröffentlichte Daten zeigten bei pharmakologischer Hemmung der NNMT in 3T3-L1 Adipozyten eine erhöhte Glycerolfreisetzung, was für eine verstärkte Lipolyse spricht. Insgesamt lässt dies einen erhöhten Abbau im Triglycerid- und Fettsäurestoffwechsel in Adipozyten mit reduzierter NNMT-Aktivität vermuten. Wesentliche Faktoren der Steuerung der Lipolyserate in Adipozyten sind katecholaminerge und insulinerge Einflüsse auf die hormonsensitive Lipase, wobei Katecholamine die lipolytische Aktivität steigern und Insulin die Lipolyse inhibiert (Frühbeck et al., 2014). Die beobachtete reduzierte Glukoseaufnahmerate in 3T3-L1 NNMT-Knock-down Adipozyten spricht für ein insgesamt abgeschwächtes Insulinsignal, welches wiederum zu einer erhöhten Lipolyse dieser Adipozyten passen würde. Eine unter Umständen umfangreiche Aufklärung möglicher Einflüsse der NNMT-Aktivität auf den Insulinsignalweg könnte Erklärungsansätze für die hier beschriebenen Beobachtungen liefern.

Nachdem die Insulinwirkung auf den Anstieg der Glukoseaufnahmerate in beiden transduzierten weißen Adipozyten-Kulturen (sh-SCR: 1,6-fach; sh-NNMT: 3,0-fach) deutlich hinter der nicht-transduzierten Kultur (5,3-fach) zurückbleibt, kann eine Verzerrung der Ergebnisse durch Mechanismen der Transduktion nicht abschließend ausgeschlossen werden.

In braunen Fettzellen ist die Atmungskette der oxidativen Phosphorylierung durch den UCP1-Kanal in der Mitochondrienmembran entkoppelt. Dies führt zu einem gesteigerten Energieumsatz ohne Produktion von Energieäquivalenten, für anabole Funktionen (Nicholls et al., 1978). Glukose wird von braunen Adipozyten in vielfältiger Weise zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion benötigt und braunes Fettgewebe ist eines der insulinsensitivsten Gewebe. Dabei wirkt

Insulin als anaboler Stimulus auf braune Adipozyten in gleichem Sinne wie in weißen Adipozyten und führt zu einer Aktivierung der GLUT4 (Cannon und Nedergaard, 2004).

Die transduzierten braunen Adipozyten zeigten keinen signifikanten Unterschied der basalen Glukoseaufnahmerate. Unter Insulinstimulation lag die Glukoseaufnahmerate der NNMT-spezifisch transduzierten braunen Adipozyten signifikant über der Glukoseaufnahmerate der Kontrolltransduktion und diese etwa im Bereich der nicht transduzierten braunen Adipozyten. Auch die Insulinwirkung im Sinne des Anstiegs der Glukoseaufnahmerate stellte sich für die braunen NNMT-Knock-down Adipozyten signifikant stärker dar als für ihre Kontrolle, sodass für braune Adipozyten eine erhöhte Insulinsensitivität bei reduzierter NNMT-Aktivität festzuhalten bleibt.

Die Rolle der NNMT im braunen Fettgewebe ist aktuell unklar. Im braunen Fettgewebe von Mäusen die mit NNMT-ASO behandelt wurden war die NNMT-Proteinexpression nicht verändert und es zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle kein Unterschied in Gewicht und UCP1 Expression des braunen Fettgewebes (Kraus et al., 2014). Nachdem hier erstmals gezeigt wurde, dass die NNMT-Aktivität in braunen Fettzellen einen Einfluss auf die Glukoseaufnahme hat, ist von einer Rolle der NNMT für die Regulation brauner Adipozyten auszugehen. Die offensichtlichen Unterschiede für die insulinstimulierte Glukoseaufnahme in weiße und braune Adipozyten bei reduzierter NNMT-Aktivität, lassen hier eine divergierende Rolle in den Regulationsmechanismen der beiden Adipozytentypen vermuten. Diese könnte für die Funktion brauner Adipozyten ähnlich maßgeblich sein, wie sie es für weiße Adipozyten ist.

Insgesamt bedarf der genaue Mechanismus, durch den die NNMT-Aktivität differenziell auf die Glukoseaufnahme wirkt, weiterer Untersuchungen. Eine Aufklärung könnte beitragen die beobachteten Unterschiede genauer einzuordnen.

5 Zusammenfassung

Die Nikotinamid N-Methyltransferase (NNMT) wurde als wichtiger Regulator des Energiemetabolismus in Fettzellen beschrieben. So bewahrt ein NNMT Knock-down Mäuse vor einer nahrungsinduzierten Adipositas und bei reduzierter NNMT-Expression in weißen 3T3-L1 Adipozyten zeigen diese einen erhöhten zellulären Sauerstoffverbrauch.

Für den Adipozytenstoffwechsel ist die insulinstimulierte Glukoseaufnahme wesentlich. Um den Einfluss eines NNMT-Knock-downs auf diese zu untersuchen wurde unter Nutzung der Substratspezifitäten des prokaryotischen und eukaryotischen Isoenzym der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase ein enzymatisch-photometrischer Assay zur Messung der Glukoseaufnahmerate in adhärenen weißen 3T3-L1 und braunen Adipozytenkulturen entwickelt.

Mit lentiviraler Transduktion wurde in den Adipozytenkulturen ein persistenter NNMT-Knock-down induziert. Die NNMT-Aktivität wurde mit einem fluoreszenzbasierten Assay gemessen und die Glukoseaufnahmerate in deren Abhängigkeit bestimmt.

Die Reduktion der NNMT-Aktivität verminderte die Glukoseaufnahmerate der 3T3-L1 Adipozyten sowohl basal, wie auch unter Insulinstimulation. Braune Adipozyten hingegen zeigten bei verringerter NNMT-Aktivität eine erhöhte insulinstimulierte Glukoseaufnahmerate, aber keinen Unterschied der basalen Glukoseaufnahmerate.

Dieser differenzielle Einfluss auf die Glukoseaufnahme weißer und brauner Adipozyten stärkt die wichtige Rolle der NNMT, die ihr zur Regulation des Fettzellstoffwechsels zugeschrieben wird und enthüllt erstmals eine direkte Wirkung auf braune Adipozyten.

6 Literatur-, Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis

- Afolayan, A. (1972). Regulation and kinetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Candida utilis*. *Biochemistry* *11*, 4172–4178.
- Akabayashi, A., and Kato, T. (1992). Microdetermination of 2-Deoxyglucose and 2-Deoxyglucose 6-Phosphate to Determine Glucose Utilization Rates in Single Neurons and Small CNS Regions After Injecting Nontracer Amounts of 2-Deoxyglucose. *J. Neurochem.* *59*, 888–896.
- 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.
- Augustin, R. (2010). The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life* *62*, 315–333.
- Bernhard, S.A. (1956). Ionization Constants and Heats of Tris(hydroxymethyl)aminomethane and Phosphate Buffers. *J. Biol. Chem.* *218*, 961–969.
- Bulger, J.E., and Brandt, K.G. (1971). Yeast Glutathione Reductase I. SPECTROPHOTOMETRIC AND KINETIC STUDIES OF ITS INTERACTION WITH REDUCED NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE. *J. Biol. Chem.* *246*, 5570–5577.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* *84*, 277–359.
- Chi, M.M.-Y., Pusateri, M.E., Carter, J.G., Norris, B.J., McDougal, D.B., and Lowry, O.H. (1987). Enzymatic assays for 2-deoxyglucose and 2-deoxyglucose 6-phosphate. *Anal. Biochem.* *161*, 508–513.
- Cinti, S. (2012). The adipose organ at a glance. *Dis. Model. Mech.* *5*, 588–594.
- 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.
- Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (1997). Intracellular ATP Levels Determine Cell Death Fate by Apoptosis or Necrosis. *Cancer Res.* *57*, 1835–1840.
- Friedman, J.M., and Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* *395*, 763–770.

Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J.-A., Fernández, S., and Rodríguez, A. (2014). Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr. Res. Rev.* 27, 63–93.

Herold, G. (2015). *Innere Medizin 2016* (Köln: Herold, Gerd).

Horecker, B.L., and Kornberg, A. (1948). The Extinction Coefficients of the Reduced Band of Pyridine Nucleotides. *J. Biol. Chem.* 175, 385–390.

Jørgensen, B.M., and Rasmussen, H.N. (1979). Recycling analysis of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphates (NADP and NADPH). *Anal. Biochem.* 99, 297–303.

Kahn, B.B., and Flier, J.S. (2000). Obesity and insulin resistance.

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.

Klein, H.H., Matthaei, S., Drenkhan, M., Ries, W., and Scriba, P.C. (1991). The relationship between insulin binding, insulin activation of insulin-receptor tyrosine kinase, and insulin stimulation of glucose uptake in isolated rat adipocytes. Effects of isoprenaline. *Biochem. J.* 274, 787–792.

Klein, J., Fasshauer, M., Ito, M., Lowell, B.B., Benito, M., and Kahn, C.R. (1999). β 3-Adrenergic Stimulation Differentially Inhibits Insulin Signaling and Decreases Insulin-induced Glucose Uptake in Brown Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 34795–34802.

Klein, J., Fasshauer, M., Klein, H.H., Benito, M., and Kahn, C.R. (2002). Novel adipocyte lines from brown fat: a model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 24, 382–388.

Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A., and Silbernagl, S. (2009). *Physiologie* (Stuttgart: Thieme).

Kraus, D., Yang, Q., Kong, D., Banks, A.S., Zhang, L., Rodgers, J.T., Pirinen, E., Puliniilkunnil, T.C., Gong, F., Wang, Y., et al. (2014). Nicotinamide N-methyltransferase knockdown protects against diet-induced obesity. *Nature* 508, 258–262.

Lee, Y.H., Nair, S., Rousseau, E., Tataranni, P.A., Bogardus, C., Permana, P.A., Allison, D.B., and Page, G.P. (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.

Lowry, O.H., Passonneau, J.V., and Rock, M.K. (1961). The Stability of Pyridine Nucleotides. *J. Biol. Chem.* 236, 2756–2759.

Mensink, G.B.M., Schienkiewitz, A., Haftenberger, M., Lampert, T., Ziese, T., and Scheidt-Nave, C. (2013). Übergewicht und Adipositas in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 56, 786–794.

Minokoshi, Y., Kahn, C.R., and Kahn, B.B. (2003). Tissue-specific Ablation of the GLUT4 Glucose Transporter or the Insulin Receptor Challenges Assumptions about Insulin Action and Glucose Homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278, 33609–33612.

Mueckler, M., and Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 121–138.

Mulder, A.H., Tack, C.J., Olthaar, A.J., Smits, P., Sweep, F.C.G.J., and Bosch, R.R. (2005). Adrenergic receptor stimulation attenuates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting GLUT4 translocation. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 289, E627–E633.

Olive, C., Geroch, M.E., and Levy, H.R. (1971). Glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Kinetic studies. *J. Biol. Chem.* 246, 2047–2057.

Riddles, P.W., Blakeley, R.L., and Zerner, B. (1983). Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol.* 91, 49–60.

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.

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.* 1–9.

Saito, K., Lee, S., Shiuchi, T., Toda, C., Kamijo, M., Inagaki-Ohara, K., Okamoto, S., and Minokoshi, Y. (2011). An enzymatic photometric assay for 2-deoxyglucose uptake in insulin-responsive tissues and 3T3-L1 adipocytes. *Anal. Biochem.* 412, 9–17.

Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., et al. (2009). High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans. *Diabetes* 58, 1526–1531.

Salek, R.M., Maguire, M.L., Bentley, E., Rubtsov, D.V., Hough, T., Cheeseman, M., Nunez, D., Sweatman, B.C., Haselden, J.N., Cox, R.D., et al. (2007). A

metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human. *Physiol. Genomics* 29, 99–108.

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.

Shepherd, P.R., and Kahn, B.B. (1999). Glucose Transporters and Insulin Action — Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* 341, 248–257.

Smith, C.J., Rubin, C.S., and Rosen, O.M. (1980). Insulin-treated 3T3-L1 adipocytes and cell-free extracts derived from them incorporate ³²P into ribosomal protein S6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 2641–2645.

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.

Sokoloff, L. (1982). The Radioactive Deoxyglucose Method. In *Advances in Neurochemistry*, (Springer, Boston, MA), pp. 1–82.

Stahl, A., Evans, J.G., Pattel, S., Hirsch, D., and Lodish, H.F. (2002). Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev. Cell* 2, 477–488.

Trayhurn, P., and Beattie, J.H. (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc.* 60, 329–339.

Walker, P.S., Ramlal, T., Donovan, J.A., Doering, T.P., Sandra, A., Klip, A., and Pessin, J.E. (1989). Insulin and glucose-dependent regulation of the glucose transport system in the rat L6 skeletal muscle cell line. *J. Biol. Chem.* 264, 6587–6595.

Wilson, J.E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* 206, 2049–2057.

Yamamoto, N., Sato, T., Kawasaki, K., Murosaki, S., and Yamamoto, Y. (2006). A nonradioisotope, enzymatic assay for 2-deoxyglucose uptake in L6 skeletal muscle cells cultured in a 96-well microplate. *Anal. Biochem.* 351, 139–145.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

1-MN	1-Methyl-Nikotinamid
2DG	2-Deoxyglukose
2DG6P	2-Deoxyglukose-6-phosphat
2D6PG	2-Deoxy-6-phosphogluconolacton
6PG	6-Phosphogluconolacton
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
ASO	Antisense-Oligonukleotide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
G6P	Glukose-6-phosphat
G6PDH	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
GR	Glutathionreduktase
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidierte Form des Glutathions)
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthin
K _m	Michaelis-Menten Konstante
L. mes. L. mesenteroides	Leuconostoc mesenteroides
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH/H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH/H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NNMT	Nikotinamid N-Methyltransferase
NBCS	Neugeborenen Kälberserum (newborn bovine calf serum)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

S. cerev. S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae) S. cerev.
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natrium-dodecyl-sulfat
sh-NNMT	mit NNMT-spezifischen Viren transduzierte Zellen
sh-SCR	mit Kontrollviren transduzierte Zellen
Stabw.	Standardabweichung
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid
UCP1	uncoupling protein 1

Einheiten

g	Gramm
h	Stunde (hour)
L	Liter
m	Meter
M	Molar; = mol/ L
min	Minute
mol	SI-Einheit der Stoffmenge
U	Unit; = mol/ min Maß für Enzymaktivität: umgesetzte Stoffmenge pro Zeit

Einheiten-Vorsätze

m	milli-; 10^{-3}
μ	mikro-; 10^{-6}
n	nano-; 10^{-9}
p	pico-; 10^{-12}

6.3 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Schaubild der Reaktionen des Glukoseaufnahmeassays - 30 -
(1) Elimination von endogenem Glukose-6-phosphat
(2) Umsatz von 2-Deoxyglukose-6-phosphat mit Produktion von $NADP^+/H^+$ für den abschließenden Nachweis
(3) und (4) Elimination von überschüssigem $NADP^+$
(5) *amplifizierende, spezifische Nachweisreaktion für $NADPH/H^+$*
- Abbildung 2** NNMT-Aktivität der NNMT-Knock-down Adipozyten im Vergleich zu ihrer Kontrolle. A) NNMT-Aktivität in 3T3-L1 Adipozyten. B) NNMT-Aktivität in braunen Adipozyten. Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in Triplikaten. - 40 -
- Abbildung 3:** Beispiel eines Western-Blot Films für NNMT (~30 kDa, unten) von transduzierten 3T3-L1 Adipozyten-Lysaten mit zugehöriger p85-Ladungskontrolle (oben). sh-SCR: Kontrolltransduktion; sh-NNMT: NNMT-spezifische Transduktion. Zur besseren Lesbarkeit wurde der Film horizontal gespiegelt. - 41 -
- Abbildung 4:** Beispiel eines Western-Blot Films für NNMT (~30 kDa, unten) von transduzierten braunen Adipozyten-Lysaten mit zugehöriger p85-Ladungskontrolle (oben). sh-SCR: Kontrolltransduktion; sh-NNMT: NNMT-spezifische Transduktion. Zusätzlich ist ein nicht-transduziertes 3T3-L1 Lysat als positive Kontrolle aufgetragen. Zur besseren Lesbarkeit wurde der Film horizontal gespiegelt. - 41 -
- Abbildung 5:** Substratspezifität der G6PDH Isoenzyme aus *L. mesenteroides* und *S. cerevisiae*. Die Extinktion bei 412 nm ist Maß der Umsetzung von G6P oder 2DG6P mit NAD^+ oder $NADP^+$. Mittelwert, Standardabweichung und p-Wert gegen Puffer. Ansätze in Triplikaten. n.s. – nicht signifikant. - 43 -
- Abbildung 6:** Relative Aktivität der G6PDH Isoenzyme in Abhängigkeit des pH-Wertes. 100% entsprechen der maximalen Aktivität im getesteten pH Bereich. Mittelwert und Standardabweichung, Bestimmung in Triplikaten. - 44 -

- Abbildung 7:** Standardkurve für 2DG6P. A) Photographie einer Standardkurve nach abgeschlossener Inkubation zur Messung der 2DG6P-Konzentration. B) Extinktionsdifferenz der Standardkurve mit Regressionsgerade. - 46 -
- Abbildung 8:** Glukoseaufnahme nach 20-minütiger Insulinstimulation (100 nM) und anschließender Inkubation mit 1 mM 2DG im Medium für die indizierte Zeitdauer. A) Durchschnittliche 2DG-Aufnahmerate [pmol 2DG/ mg Protein/ min] während der Inkubation zur 2DG-Aufnahme. B) Absolute Menge 2DG6P im Lysat in [pmol/ mg Protein] nach entsprechender Inkubationsdauer. Mittelwerte und Standardabweichungen. Alle Werte in Triplikaten bestimmt. - 47 -
- Abbildung 9:** 2DG-Aufnahmerate in Abhängigkeit der 2DG-Konzentration im Inkubationsmedium. A) Ergebnis der Experimente mit 3T3-L1 Adipozyten. B) Ergebnis der Experimente mit braunen Adipozyten. Mittelwerte und Standardabweichung in [pmol 2DG/mg Protein/min], aus 3 jeweils unabhängigen Experimenten in Triplikaten. - 48 -
- Abbildung 10:** 2DG-Aufnahmerate in Abhängigkeit der Inkubationsdauer mit 2DG. A) Ergebnis der Experimente mit 3T3-L1 Adipozyten. B) Ergebnis der Experimente mit braunen Adipozyten. Mittelwerte und Standardabweichung in [pmol/ mg Protein/ min], aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten. - 49 -
- Abbildung 11:** 2DG-Aufnahmerate in Abhängigkeit der Präinkubationsdauer mit Insulin. A) Ergebnis der Experimente mit 3T3-L1 Adipozyten. B) Ergebnis der Experimente mit braunen Adipozyten. Mittelwerte und Standardabweichung in [pmol 2DG/ mg Protein/ min], aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten. - 51 -
- Abbildung 12:** Glukoseaufnahme von 3T3-L1 Adipozyten nach Behandlungen mit Insulin und Isoproterenol. Mittelwert und Standardabweichung jeder Behandlungsgruppe in [pmol 2DG/ mg Protein/ min] aus 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten. n.s. – nicht signifikant. - 52 -

- Abbildung 13:** Glukoseaufnahme von braunen Adipozyten nach Behandlungen mit Insulin und Isoproterenol Mittelwert und Standardabweichung jeder Behandlungsgruppe in [pmol 2DG/ mg Protein/ min] aus 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten. n.s. – nicht signifikant. - 53 -
- Abbildung 14:** A) NNMT-Aktivität transduzierter 3T3-L1 Adipozyten nach 16-stündiger Hungermediuminkubation. B) NNMT-Aktivität transduzierter brauner Adipozyten nach 16-stündiger Hungermediuminkubation. Mittelwert und Standardabweichung in [μ U/ mg Protein] aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in Triplikaten. n.s. – nicht signifikant. - 55 -
- Abbildung 15:** A) NNMT-Aktivitäten transduzierter 3T3-L1 Adipozyten mit und ohne 20-minütiger Insulinstimulation. B) NNMT-Aktivitäten transduzierter brauner Adipozyten mit und ohne 20-minütiger Insulinstimulation. Mittelwert und Standardabweichung in [μ U/ mg Protein] aus 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in Triplikaten. n.s. – nicht signifikant. - 56 -
- Abbildung 16:** Basale und insulinstimulierte 2-Deoxyglukoseaufnahme transduzierter 3T3-L1 Adipozyten. Mittelwert und Standardabweichung in [pmol/ mg Protein/ min] aus 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in Triplikaten. - 58 -
- Abbildung 17:** A) basale und B) insulinstimulierte Glukoseaufnahmerate transduzierter 3T3-L1 Adipozyten, aufgetragen gegen die NNMT-Aktivität. Ergebnisse aus 2 bzw. 3 unabhängigen Versuchen in Triplikaten mit Regressionsgerade, Korrelationskennwert und p-Wert. - 59 -
- Abbildung 18:** Basale und insulinstimulierte 2-Deoxyglukoseaufnahme transduzierter brauner Adipozyten. Mittelwert und Standardabweichung in [pmol/ mg Protein/ min] aus 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in Triplikaten. n.s. – nicht signifikant. - 60 -
- Abbildung 19:** Insulinstimulierte Glukoseaufnahmerate transduzierter brauner Adipozyten, aufgetragen gegen die NNMT-Aktivität. Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen in Triplikaten mit Regressionsgerade, Korrelationskennwert und p-Wert. - 61 -

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substratmix für NNMT im Aktivitätstest.	- 20 -
Tabelle 2: Reaktionsansätze zur Bestimmung der Substratspezifität der G6PDH Isoenzyme.	- 24 -
Tabelle 3: Michaelis-Menten Konstanten (K_m) der G6PDH Isoenzyme.	- 25 -
Tabelle 4: Tris-Puffer-Ansätze und die hieraus titrierten Puffer für die Testung der pH-Abhängigkeit der G6PDH.	- 26 -
Tabelle 5: Reaktionsansatz für die Bestimmung der pH-abhängigen Aktivität der G6PDH.	- 26 -
Tabelle 6: Zusammensetzung Reagenz #1 zur Elimination endogener G6P aus dem Lysat.	- 31 -
Tabelle 7: Zusammensetzung Reagenz #2 für die Nachweisreaktion von 2DG6P.	- 32 -
Tabelle 8: Zusammensetzung des Neutralisationspuffers.	- 32 -
Tabelle 9: Zusammensetzung Reagenz #3 zur Amplifikation des NADPH/H ⁺ -Signals aus der Nachweisreaktion.	- 33 -
Tabelle 10: Volumina der 2DG-Lösung und entsprechende 2DG-Konzentration bei Inkubation.	- 36 -
Tabelle 11: Behandlungsgruppen mit Isoproterenol und Insulin.	- 37 -
Tabelle 12: pH-Werte im Verlauf des Glukoseaufnahmeassays. Mittelwert und Standardabweichung aus 2 unabhängigen Ansätzen in Triplikaten.	- 45 -

Danksagung

Ich danke allen die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstütz und gefördert haben:

Prof. Dr. med. Christoph Wanner, für die Begleitung des Promotionsverfahrens und die Unterstützung unserer Arbeitsgruppe.

Dr. med. Daniel Kraus für die Vergabe dieses Promotionsthemas, eine vertrauensvolle Zusammenarbeit und effektive Betreuung.

Frau Anja Sauer für die Einführung in die Laborarbeit und Hilfe bei allen akuten Fragen.

Meinen Mitdoktoranden Bianca Rudolphi und Nils Kraus für die stets hilfreichen Diskussionen über Probleme, Fragestellungen und Ideen.

Trotz aller wissenschaftlichen Unterstützung ist eine solche Arbeit nur mit der gleichzeitigen Unterstützung durch die Familie gut zu Ende zu bringen. Ein herzlicher Dank an meine Eltern Angelika und Gerhard, meine Schwester Cornelia, meine Oma Gretl, meine Großeltern Helga und Norbert, Christoph Hiemens und Sandra Rohrer.

Lebenslauf

Benedikt Alexander Zapp

Leonrodstraße 26

80636 München

Deutschland

Geburtsdatum,-ort: 26. Januar 1990; München

Staatsangehörigkeit: deutsch

seit 01/2017	Sektion Rheumatologie und Klinische Immunologie; Medizinische Klinik und Poliklinik IV; Ludwig- Maximilians Universität München
19.12.2016	Approbation als Arzt
12. und 13.12.2016	<u>Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung</u>
Herbst 2015	<u>Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung</u>
04/2012 - 12/2016	Studium der Humanmedizin im klinischen Studienabschnitt an der Julius-Maximilians Universität Würzburg
Frühjahr 2012	<u>Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung</u>
10/2009 – 03/2012	Studium der Humanmedizin im vorklinischen Studienabschnitt an der Georg-August Universität Göttingen
26.06.2009	Schulabschluss, Allgemeine Hochschulreife
09/1996 – 06/2009	Schulbildung an der Grundschule Pullach i.l. und dem staatl. Gymnasium Pullach i.l.

gez. Benedikt Alexander Zapp